



UAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

DEFINIÇÃO DOS MECANISMOS DE
POLARIDADE CELULAR DURANTE A
CITOCINESE

FREDERICA GIL FIGUEIREDO LEITÃO SILVA

Dissertação de Mestrado em Oncobiologia-Mecanismos Moleculares
do Cancro

Trabalho efectuado sob a orientação de:
Orientadora: Doutora Cláudia Florindo
Co-Orientador: Professor Doutor Álvaro Tavares

2016

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

DEFINIÇÃO DOS MECANISMOS DE
POLARIDADE CELULAR DURANTE A
CITOCINESE

FREDERICA GIL FIGUEIREDO LEITÃO SILVA

Mestrado em Oncobiologia – mecanismos
moleculares do cancro

Trabalho efectuado sobre a orientação de:

Orientadora: Doutora Cláudia Florindo

Co-orientador: Professor Doutor Álvaro Tavares

2016

“Definição dos mecanismos de polaridade celular durante a Citocinese”

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Frederica Gil Figueiredo Leitão Silva

Copyright © Frederica Silva, 2016

A Universidade do Algarve reserva para si o direito em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respectivos.

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização de todo este trabalho:

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Cláudia Florindo, minha orientadora, pela oportunidade de trabalhar neste laboratório e pelo apoio em tudo o que foi necessário de modo a poder realizar com êxito todo o meu trabalho. Quero agradecer toda a paciência e disponibilidade, por todo o apoio que me deu e tudo o que me ensinou. Sem ela o meu trabalho não teria sido possível nem conseguiria obter resultados que obtive (valeu a pena as vindas às sete horas da manhã e os “puxões de orelhas”). Obrigada por ter sempre insistido comigo para eu fazer sempre mais e melhor.

Ao Professor Douro Álvaro Tavares, meu co-orientador, por me ter permitido realizar este trabalho no seu laboratório, por toda a disponibilidade e por tudo o que me ensinou sobre ciência e sobre tantas outras coisas da vida. Obrigada por ter partilhado tantas histórias de vida comigo, que de algum modo me fizeram pensar e crescer.

Ao Doutor Lars Jansen, por nos fornecer material biológico e informações muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Jan Ellenberg, por nos fornecer material biológico e informações muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho

À Fundação Para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento do projecto EXPL/BEX-BCM/1104/2013, que me permitiu realizar este trabalho excelente

Ao CBMR (Center for Biomedical Research) na Universidade do Algarve onde realizei todo este trabalho prático, pelo bom ambiente criado por todas as pessoas que lá trabalham.

À Joana Sousa, minha colega de mestrado e de laboratório, durante estes dois últimos anos, que tanto me ajudou nos momentos mais difíceis, pela boa disposição, pela amizade, pelos conselhos científicos. Sem ela este trabalho também não teria sido possível.

Aos colegas dos outros grupos do nosso laboratório, em especial, à Ana Luísa, à Margarida, ao Gil e ao Om, por toda a boa disposição e bom ambiente criado no nosso laboratório e por terem a disponibilidade de me ajudar em diversas coisas na realização deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais e à minha irmã por me terem dado a oportunidade de estudar e por me apoiarem incondicionalmente. Quero agradecer também ao meu namorado, Telmo Nascimento, por todo o apoio incondicional e por toda a paciência durante este ano.

Resumo

A conclusão do processo da citocinese é o evento final da divisão celular. De forma a garantir a estabilidade genética dos organismos a citocinese não pode ocorrer antes que os cromossomas sejam fielmente segregados. Falhas neste processo são uma importante causa de instabilidade genética, ou seja, quando desregulado este processo poderá conduzir a anormalidades em organismos multicelulares, como o cancro.

Durante a citocinese há a constrição do anel de actmiosina, seguindo-se a formação da ponte intercelular, na qual no meio se encontra o *midbody*. Este é constituído por várias proteínas que são necessárias para o início da abscisão (ex: hsMOB4A e hsMOB4B, γ -tubulina, centriolina, etc). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que as proteínas hsMOB4A e hsMOB4B são essenciais para a execução da abscisão e que quando depletadas aumentam a mobilidade celular. Muitas proteínas que se localizam no *midbody*, encontram-se também noutras estruturas (ex: centrossomas). Esta diversidade de localizações e funções, torna a dissecação do mecanismo citocinético complicado, sendo de difícil análise a função de cada proteína associada a uma localização celular, apenas através da técnica de RNAi.

Uma técnica que permite a inactivação temporal e local é a *Chromophore Assited Laser Inactivation* (CALI). A base desta técnica é a inactivação local da proteína de interesse devido a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) após a iluminação com um laser. Neste trabalho, foram desenvolvidas ferramentas para a realização de ensaios de CALI. Criaram-se linhas estáveis a expressar β -tubulina-SNAP-tag e γ -tubulina-SNAP-tag para otimização dos ensaios de CALI e, também, para analisar qual a função destas proteínas na abscisão.

Para ensaios de CALI em conjunto com a técnica de RNAi (para depleção da hsMOB4A e hsMOB4B endógenas) nas proteínas hsMOB4A e hsMOB4B, foram concebidos e caracterizados clones hsMOB4A e hsMOB4B resistentes ao RNAi, com o objectivo da geração de duas linhas estáveis, SNAP-tag-hsMOB4A e SNAP-tag-hsMOB4B resistentes ao RNAi, de modo a perceber qual a localização necessária destas proteínas para que ocorra o processo de abscisão.

Todas estas ferramentas desenvolvidas ao longo deste trabalho, permitirão realizar ensaios de CALI nas proteínas de interesse e compreender qual a sua localização para que ocorra o evento final da citocinese, a abscisão.

Palavras-chave: Citocinese, abscisão, hsMOB4, CALI, centrossomas e *midbody*

Abstract

The completion of cytokinesis process is the final event of cell division. In order to guarantee the genetic stability of organisms cytokinesis cannot occur before the chromosomes are properly segregated. Failures in this process are an important cause of genetic instability, that is, when dysregulated this may lead to abnormalities in multicellular organisms, such as cancer. During cytokinesis there is a constriction actin-myosin ring, following the formation of the intercellular bridge, in which in the middle is the midbody. This is composed of various proteins, these proteins which are necessary for the start of the constriction (eg hsMOB4A and hsMOB4B, γ -tubulin, centriolin etc.). Previous work from our group showed that the hsMOB4A and hsMOB4B proteins are essential for the implementation of abscission and when depleted increase cell motility. Many proteins that are located in the midbody, are also found on other structures (eg centrosomes). This diversity of locations and functions turns the dissection of cytokinetic mechanism difficult, and is also difficult to analyze the function that is associated with the location of each protein through the RNAi technique.

The technique that allows temporal inactivation and locally is the Chromophore-Assisted Laser Inactivation (CALI). The basis of this technique is the local inactivation of the protein of interest due to generation of reactive oxygen species (ROS) after illumination with a laser. In this work, tools have been developed for conducting assays CALI. Stable lines were created, expressing β -tubulin-SNAP-tag and γ -tubulin-SNAP-tag for optimization of CALI tests and also to analyze what the function of these proteins in abscission.

For CALI tests together with the RNAi technique (for depletion of endogenous and hsMOB4A hsMOB4B) in the hsMOB4A and the hsMOB4B proteins, the hsMOB4A and hsMOB4B RNAi-resistant clones were designed and characterized, with the aim of generating two stable lines, SNAP- hsMOB4A and SNAP-tag-tag-resistant hsMOB4B RNAi, in order to understand what is localization of this protein to occur the abscission process.

All of these tools developed during this work, will allow to perform CALI tests in proteins of interest and, understand what is the location that the signal has to come to occur the final event of cytokinesis, the abscission.

Key-Words: cytokinesis, abscission, hsMOB4, CALI, centrosomes and midbody.

Abreviaturas

CALI	do inglês <u>C</u> hromophore- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>I</u> nactivation
CDK	Cinases dependentes de ciclinas (do inglês Cyclin-dependent Kinase)
CPC	Complexo de proteínas passageiras dos cromossomas (do inglês <u>C</u> hromossomal <u>P</u> assenger <u>C</u> omplex)
DNA	do inglês <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
ESCRT-III	do inglês <u>E</u> ndossomal <u>S</u> orting <u>C</u> omplex <u>R</u> equired for <u>T</u> ransport-III
GEF	do inglês <u>G</u> uanine <u>N</u> ucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor
MLKP	do inglês <u>M</u> itotic <u>K</u> inesin- <u>L</u> ike <u>P</u> rotein
MEN	do inglês <u>M</u> itotic <u>E</u> xit <u>N</u> etwork
MOB	<u>M</u> ps <u>O</u> ne <u>B</u> inder
kDa	<u>K</u> ilodalton
PBS	Tampão Salino de fosfato (do inglês <u>P</u> hosphate <u>S</u> aline <u>B</u> uffer)
PCR1	Proteína Requerida para a Citocinese 1 (do inglês <u>P</u> rotein <u>R</u> equired for <u>C</u> ytokinesis 1)
PLK1	do inglês <u>P</u> olo- <u>L</u> ike <u>K</u> inase 1
RNAi	do inglês RNA interference
ROS	espécies reactivas de oxigénio do inglês (<u>R</u> eactive <u>O</u> xigen <u>S</u> pecies)
<i>S. cerevisiea</i>	<u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 DIVISÃO CELULAR	1
1.1.1 CICLO CELULAR	1
1.1.2. MITOSE	2
1.2. CITOCINESE	3
1.2.1. ESTÁDIOS INICIAIS DE CITOCINESE: REORGANIZAÇÃO DO FUSO DURANTE A ANAFASE E FORMAÇÃO DO SULCO DE CLIVAGEM	6
1.2.2. MONTAGEM E CONTRACÇÃO DO ANEL DE ACTOMIOSINA	9
1.2.3. FORMAÇÃO DO <i>MIDBODY</i> E MATURAÇÃO DA PONTE INTERCELULAR	10
1.2.3.1 Reorganização do citoesqueleto e das membranas	10
1.2.4. ABSCISÃO	11
1.2.4.1 Constrição e clivagem da ponte intercelular	11
1.3. COORDENAÇÃO DE MITOSE COM A CITOCINESE	12
1.3.1 MEN (MITOTIC EXIT NETWORK)	12
1.3.2 COORDENAÇÃO ENTRE A SAÍDA DE MITOSE COM A CITOCINESE	13
1.4. CENTROSSOMAS E A CITOCINESE	13
1.4.1 CENTROSSOMAS	13
1.4.2. O PAPEL DOS CENTROSSOMAS NA CITOCINESE	14
1.5. CANCRO E A CITOCINESE	15
1.5.1. CANCRO	15
1.5.2 CANCRO E A CITOCINESE	15
1.6. GENES MOB	16
1.6.1 MOB1 EM <i>S. CEREVISIAE</i>	16
1.6.2 MOB1 EM <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	16
1.6.3. MOB EM HUMANOS	17
1.6.3.1 MOB4 em Humanos	18
1.6.3.1.1 Interacção da hsMOB4A e hsMOB4B com as cinases NDR/LATS	18
1.6.3.1.2 Efeitos da depleção da hsMOB4A e da hsMOB4B	20
1.6.4. MOB1 EM TETRAHYMENA	22
1.7. OUTRAS PROTEÍNAS ESSENCIAIS PARA A ABSCISÃO	23
1.7.1 CENTRIOLINA	23
1.7.2. AURORA B	24
1.8. CALI	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	28
2.1.1 ESTIRPES BACTERIANAS	28
2.1.2 LINHAS CELULARES DE CELULARES DE MAMÍFEROS	28
2.1.3 VECTORES	29
2.1.4. OLIGONUCLEOTIDEOS DE RNA E DNA:	29

2.1.5. ANTICORPOS	30
2.2. TÉCNICAS VARIADAS	31
2.2.1 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES (<i>E. COLI</i>) PELO MÉTODO DE $CaCl_2$	31
2.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS	31
2.2.3. ANNEALING DOS OLIGONUCLEOTIDOS PARA LINKER FLÉXIVEL	32
2.2.4. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E GEL DE AGAROSE	32
2.2.5. REACÇÃO DE LIGAÇÃO	32
2.2.6. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO	32
2.2.7. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)	33
2.2.8. ELECTROFORESE DE PROTEÍNAS E <i>WESTERN BLOT</i>	33
2.2.8.1 Electroforese de proteínas	33
2.2.8.2. Western Blot	34
2.2.8.3. Remoção de anticorpos em membrana	34
2.2.8.3.1. Remoção de anticorpos com Glicina	34
2.2.8.3.2 Remoção de anticorpos com β -mercaptoetanol	34
2.3. MANIPULAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	35
2.3.1. SINCRONIZAÇÃO DE CÉLULAS	35
2.3.2. TRANSFECCÕES	35
2.3.2.1 Transfecções de DNA plasmidico	35
2.3.2.2 Transfecções de siRNAs	35
2.3.3. SELECÇÃO DE CLONES PARA CRIAÇÃO DE LINHA ESTÁVEL	36
2.3.4. ANÁLISE DA EFICIÊNCIA AOS OLIGONUCLEOTÍDOS DE RNA DO HSMOB4A E B	36
2.4. TÉCNICAS CITOLÓGICAS	36
2.4.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
2.4.1.1. Fixação com Metanol/Acetona	37
2.4.2. MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SNAP-CELL FLUORESCÉINA	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO GFP.HSMOB4A E GFP.HSMOB4B RESISTENTES AO RNAi	40
3.1.1. WESTERN BLOT	40
3.1.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO	41
3.2. CONFIRMAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTIDOS PARA HSMOB4A RNAiR E HSMOB4B RNAiR	46
3.2.1. TESTE DE RESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE A OLIGONUCLEOTIDOS ESPECÍFICOS PARA HSMOB4A	48
3.2.2. TESTE DE RESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE A OLIGONUCLEOTIDOS ESPECÍFICOS PARA HSMOB4B	50
3.3. CLONAGENS – HA-SNAP-HSMOB4	53
3.4. OBTENÇÃO DE LINHAS CELULARES ESTÁVEIS DE B E Γ-TUBULINA-SNAP-TAG	55
3.4.1. LINHA CELULAR ESTÁVEL DE B-TUBULINA-SNAP-TAG	55
3.4.2. LINHA CELULAR ESTÁVEL DE Γ -TUBULINA-SNAP-TAG	57
3.5. ENSAIOS DE CALI	59
4. CONCLUSÃO	63
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	65
6. BIBLIOGRAFIA	66
ANEXO I	73
ANEXO II	74

Índice de figuras

FIG. 1. 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS QUATRO FASES DO CICLO CELULAR	1
FIG. 1. 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DA MITOSE	3
FIG. 1. 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CITOCINESE EM CÉLULAS ANIMAIS	4
FIG. 1. 4. MECANISMOS GERAIS DA CITOCINESE EM EUCARIOTAS	5
FIG. 1. 5. REPRESENTADO UM MODELO PARA A FUNÇÃO DA PROTEÍNA PRC1 ASSOCIADA A MICROTÚBULOS NO FUSO MITÓTICO	8
FIG. 1. 6. DIAGRAMA QUE ILUSTRA AS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS DO FUSO, QUE FUNCIONAM DURANTE AS DIFERENTES FASES DA DIVISÃO CELULAR.	11
FIG. 1. 7. SINALIZAÇÃO DA HSMOB EM CÉLULAS HUMANAS	22
FIG. 1. 8. VISÃO ESQUEMÁTICA DE DOIS MÉTODOS DO CALI	25
FIG. 1. 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CALI BASEADO NA MARCAÇÃO COM SNAP-TAG.	27
FIG. 3. 1. GFP.HSMOB4A RNAIR E GFP.HSMOB4B RNAIR POR <i>WESTERN BLOT</i> APRESENTAM O PESO MOLECULAR ESPERADO.	41
FIG. 3. 2. GFP.HSMOB4A RNAIR E GFP.HSMOB4B RNAIR EM INTERFASE LOCALIZAM NOS CENTROSSOMAS.	42
FIG. 3. 3. GFP.HSMOB4A RNAIR E GFP.HSMOB4B RNAIR EM TELOFASE/CITOCINESE LOCALIZAM NO <i>MIDBODY</i> .	43
FIG. 3. 4. GFP.HSMOB4A RNAIR E GFP.HSMOB4B RNAIR EM METAFASE LOCALIZAM NOS CENTROSSOMAS E SOBRE O FUSO.	44
FIG. 3. 5. GFP.HSMOB4B RNAIR LOCALIZA SOBRE O FUSO EM METAFASE.	45
FIG. 3. 6. SEQUÊNCIA DE HSMOB4A RNAIR E HSMOB4B RNAIR.	47
FIG. 3. 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPERIÊNCIA DE RNAI.	48
FIG. 3. 8. GFP.HSMOB4A RNAIR É SENSÍVEL E RESISTENTE A CADA OLIGONUCLEOTIDO ESPECIFICAMENTE.	49
FIG. 3. 9. GFP.HSMOB4A É SENSÍVEL A AMBOS OS OLIGONUCLEOTIDOS.	50
FIG. 3. 10. GFP.HSMOB4B RNAIR É SENSÍVEL E RESISTENTE A CADA OLIGONUCLEOTIDO ESPECIFICAMENTE.	51
FIG. 3. 11. GFP.HSMOB4B É SENSÍVEL A AMBOS OS OLIGONUCLEOTIDOS.	52
FIG. 3. 12. LINKER FLÉXIVEL INTRODUZIDO NO VECTOR DE SNAP-TAG	54
FIG. 3. 13. <i>POOL</i> DE CLONES DA LINHA ESTÁVEL DE B-TUBULINA-SNAP-TAG APRESENTA O TAMANHO ESPERADO EM <i>WESTERN BLOT</i> .	56
FIG. 3. 14. <i>POOL</i> DE CLONES DA LINHA DE B-TUBULINA-SNAP-TAG ESTÁ A EXPRESSAR A PROTEÍNA DE FUSÃO B-TUBULINA-SNAP-TAG.	57
FIG. 3. 15. CLONES DA LINHA ESTÁVEL DE Γ -TUBULINA-SNAP-TAG NÃO APRESENTAM O TAMANHO ESPERADO DA PROTEÍNA DE FUSÃO POR <i>WESTERN BLOT</i> .	58
FIG. 3. 16. OS CLONES DA LINHA ESTÁVEL Γ -TUBULINA-SNAP-TAG SÃO NEGATIVOS.	59

Índice de tabelas

TABELA 2. 1. VECTORES UTILIZADOS.	29
TABELA 2. 2. OLIGONUCLEOTÍDEOS DE SIRNA.	29
TABELA 2. 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DNA.	30
TABELA 2. 4. ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS.	30

1.Introdução

1.1 Divisão celular

O processo de divisão celular assegura a continuidade da vida, bem como a evolução de células e organismos. Assim, seres unicelulares ou multicelulares são produtos dos ciclos de crescimento celular.

Após a divisão, as células têm de se separar em duas células filhas. A este processo em que ocorre a separação física das células dá-se o nome de citocinese. De forma a garantir a estabilidade genética dos organismos a citocinese não pode ocorrer antes que os cromossomas tenham sido fielmente segregados em mitose. Erros nestes processos, assim como na coordenação entre ambos os processos (mitose e citocinese), podem dar origem ao desenvolvimento de tumores.

1.1.1 Ciclo celular

O ciclo celular é o fenómeno biológico que permite a todas as células originar células filhas com as mesmas características genéticas.

O Ciclo celular é pois composto por quatro fases: G1, S, G2 e M (Mitose) (Fig.1.1.). Na fase G1, há crescimento e preparação para a replicação dos cromossomas. Após G1, a célula entra na fase S em que há a síntese de DNA e duplicação dos centrossomas. Em G2, a célula prepara-se para a divisão mitótica. Havendo por fim a fase M, onde ocorre a divisão celular (segregação do material genético idêntico para duas células filhas).

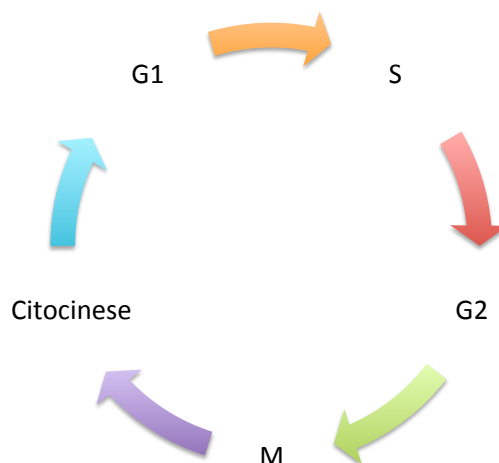


Fig. 1. 1. Representação esquemática das quatro fases do ciclo celular: G1, S, G2 e M.

Existem vários pontos de controlo ao longo da progressão de cada uma das fases do ciclo celular, em que alguns passam por verificar se existem lesões do DNA celular.

As principais proteínas que controlam o ciclo celular são as ciclinas e as proteínas-quinases dependentes das ciclinas (CDKs). As CDKs são activadas pelas ciclinas, formando complexos moleculares CDK-ciclinas. A primeira ciclina a ser descoberta foi a ciclina B, sendo sintetizada no final da interfase e por fim degradada em mitose [revisto em, 1].

Em humanos, foram identificadas sete CDK. As CDKs fazem parte de um grupo de enzimas que activam reacções químicas necessárias para as células efectuarem as diferentes fases do ciclo celular [revisto em, 1].

1.1.2. Mitose

A mitose é o processo pelo qual há segregação do material já replicado, que, em conjunto com a citocinese, faz com que uma célula dê origem a duas células filhas iguais. Este processo é constituído por quatro fases, consoante o seu grau de condensação do DNA: profase, metafase, anafase e telofase. Foi descrito e ilustrado em detalhe por Walter Flemming há mais de um século. Actualmente sabe-se que a mitose é coordenada pelo fuso mitótico, uma máquina subcelular que utiliza os microtúbulos e vários motores moleculares. O fuso mitótico é o principal responsável pela segregação dos cromossomas durante o processo da mitose, tendo que adquirir uma configuração bipolar de modo a repartir os cromossomas equitativamente pelas duas células filhas.

Em profase, há a condensação dos cromossomas, desaparece o nucléolo e o envelope nuclear, inicia-se a formação do fuso mitótico através da polimerização dos microtúbulos.

Em metafase, dá-se o alinhamento dos cromossomas no plano equatorial da célula, formando a placa metafásica. Cada cromossoma encontra-se ligado aos microtúbulos de cada polo do fuso, originando a orientação bipolar. Esta organização assegura que, quando os cromossomas são separados, cada célula filha receba uma cópia de cada cromossoma.

Em anafase, há a segregação dos cromossomas para os polos opostos da célula.

Por fim, em telofase, os cromossomas iniciam o processo de descondensação, voltando a formar-se a membrana nuclear. Os microtúbulos que constituem o fuso dispersam e dá-se a constrição da zona equatorial da célula. Dá-se início aos processos que irão originar a divisão em duas células filhas (Citocinese). Simultaneamente, as células filhas têm que voltar para um estado de interfase onde, entre outros eventos, se observa o reformar da

membrana nuclear e a reestruturação dos microtúbulos do fuso mitótico numa rede de microtúbulos de interfase (Fig.1.2.).

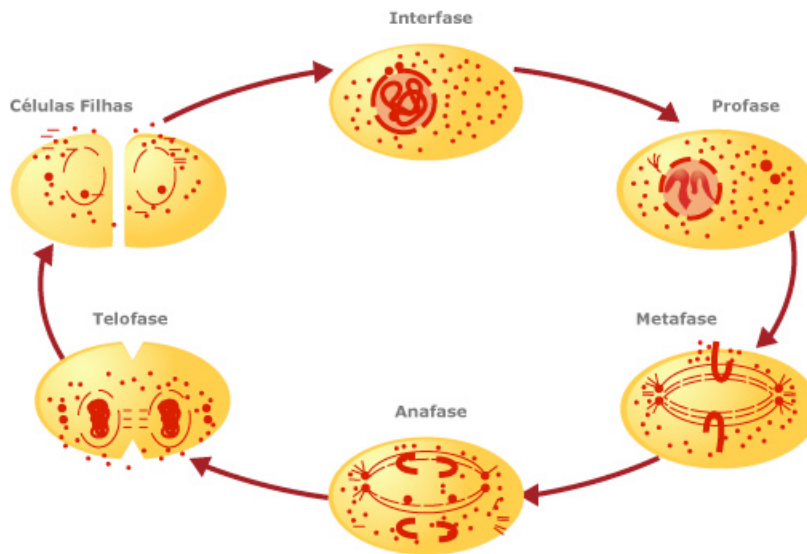


Fig. 1. 2. Representação esquemática das fases da Mitose: Profase, Metafase, Anafase, Telofase e por fim a citocinese

1.2. Citocinese

A citocinese inicia durante a anafase, quando os cromossomas são segregados para os polos opostos do fuso. Os microtúbulos do fuso mitótico, em seguida, reorganizam-se para formar o eixo central. A sinalização entre o eixo da anafase e o córtex da célula indica o local da montagem do anel actomiosina.

Citocinese é o evento final da divisão celular em que ocorre a separação física das duas células filhas. Para assegurar que as duas células filhas tenham exactamente o mesmo conteúdo genómico é essencial que a citocinese só ocorra após a mitose. Ao analisar-se em detalhe a execução do processo da citocinese, verifica-se que esta é variável nos diversos organismos. Porém, os principais mecanismos encontram-se conservados.

Devido à complexidade da citocinese e a um grande conhecimento existente sobre várias proteínas associadas a este mecanismo, a sua descrição torna-se bastante complexa.

Na citocinese, as células pós-mitóticas irmãs permanecem ligadas por uma ponte intercelular, ponte essa que contém microtúbulos que se sobrepõem numa região central denominada o *midbody*. Esta ponte intercelular persiste até finalmente, as células executarem a abscisão, que divide fisicamente as duas células. Vários eventos celulares precisam de estar espacial e temporalmente coordenados para assegurar uma divisão celular fiável (Fig. 1.3.).

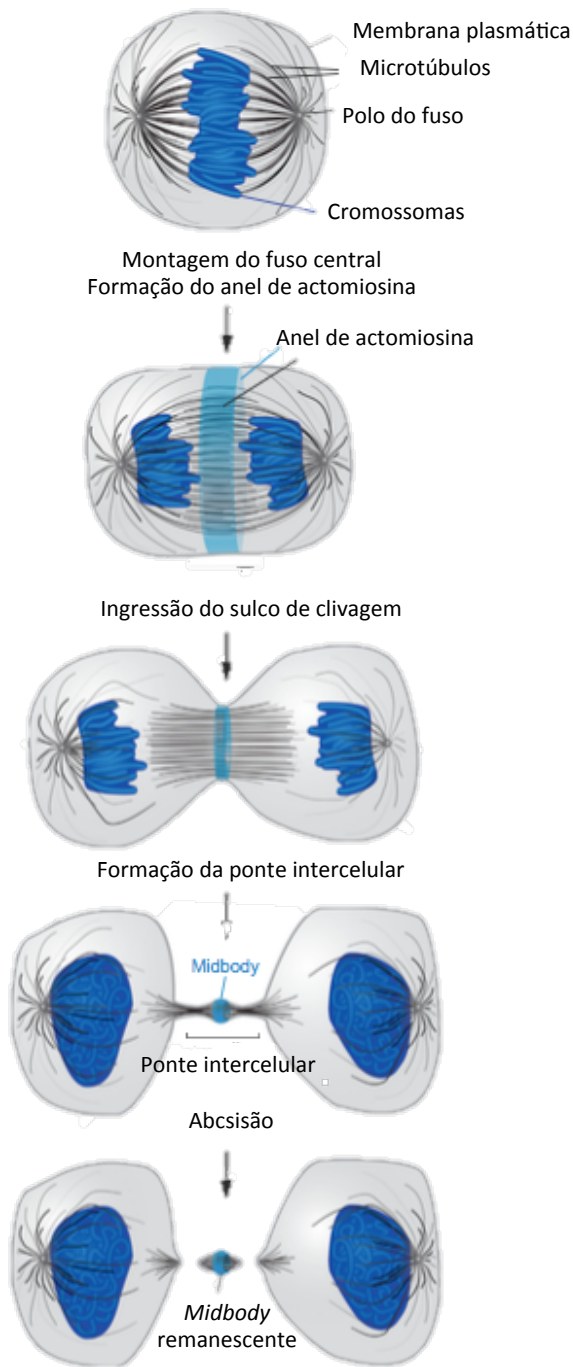


Fig. 1. 3. Representação esquemática da citocinese em células animais: A citocinese inicia durante a anáfase, quando os cromossomas são segregados para os polos opostos do fuso. Os microtúbulos do fuso mitótico, em seguida, reorganizam-se para formar o eixo central. A sinalização entre o eixo da anáfase e o córtex da célula indica o local da montagem do anel actomiosina. A contração do anel actomiosina ingressa no córtex celular para formar o sulco de clivagem, que divide o citoplasma em duas partes. Em conclusão a contração do anel actomiosina resulta na formação da ponte intercelular, que no meio contém *midbody*. A abscisão ocorre quando há despolimerização dos microtúbulos adjacentes ao *midbody* e há a fissão da membrana para separar fisicamente as células filhas. A Azul escuro está representado o DNA. (adaptado de [2])

Antes de prosseguir para mais detalhes, indica-se a ordem do vários eventos do processo citocinético em *S.cerevisiae*, em *S. pombe* e em células animais (Fig. 1.4.).

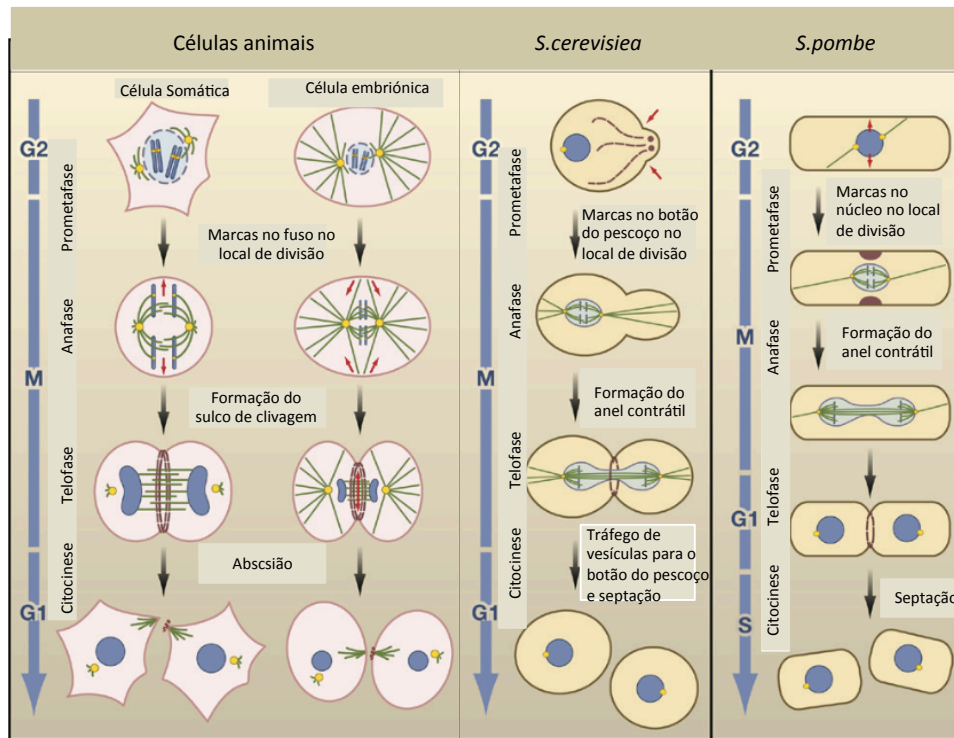


Fig. 1. 4. Mecanismos gerais da citocinese em eucariotas: Está representada no esquema, a citocinese em animais, *S.cerevisiae* e *S.pombe*. (adaptado de [3])

A *S. cerevisiae* divide-se por gemulação. Ao contrário do que se observa em células animais e em *S. pombe*, neste organismo a definição do local de gemulação é definido antes de se iniciar a divisão. A gémula cresce para fora do cortéx da célula mãe e o anel contráctil é formado no pescoço da gémula. Tanto em *S. pombe* como em *S. cerevisiae* é formado um septo e este é sintetizado atrás do anel de constrição e que, para que haja separação física das células filhas, também tem que ser degradado por enzimas digestivas [revisado em, 2].

A *S. pombe* tem o anel de actomiosina posicionado no equador da célula. Estas sintetizam também um septo, e consoante o anel de actomiosina contrai, este promove a formação de parede celular entre ambas as células filhas. No final de todo o processo, o septo é degradado também por enzimas digestivas, de modo a separar as duas células filhas [revisado em, 2].

Em células animais, a definição do local de clivagem é o primeiro evento da citocinese, normalmente no plano equatorial da célula. O sulco de clivagem contém miosina, actina e outras proteínas que são organizadas no anel contráctil, o anel de actomiosina. Ao contrair este anel cria uma barreira física entre os citoplasmas de cada célula filha. A contracção do anel faz com que os componentes da zona mediana do fuso se juntem todos

apenas numa estrutura, o *midbody*. O último evento da citocinese, é a abscisão onde ocorre a separação física das duas células filhas [revisto em, 2].

1.2.1. Estádios iniciais de Citocinese: Reorganização do fuso durante a anafase e formação do sulco de clivagem

Citocinese está intimamente ligada à segregação dos cromossomas, tanto em termos de sua regulação espacial como temporal. Um dos primeiros passos da citocinese é a definição do local de divisão e, é importante que este seja corretamente posicionado em relação aos cromossomas, já segregados, de forma a que cada célula filha receba uma cópia única do genoma. O posicionamento do local de divisão difere entre animais, plantas, e leveduras. No entanto, em todos os casos, os microtúbulos desempenham um papel essencial na definição deste local.

O fuso central das células animais gera, durante a anafase, dois sinais redundantes para o posicionamento do plano de clivagem, que surgem a partir do fuso central e dos microtúbulos astrais, respectivamente [5], [6].

O fuso central leva à activação da GTPase RhoA no córtex equatorial e, os microtúbulos astrais inibem a GTPase RhoA em regiões próximas dos polos do fuso [revisto em, 5]. Além de que, tem sido proposto que uma população de microtúbulos astrais podem fornecer um sinal de activação no plano equatorial da célula [8].

Nas células animais, o posicionamento do sulco de clivagem envolve a comunicação permanente entre o eixo da anafase e o córtex célula. A proteína essencial desta via de sinalização, é a GTPase RhoA, que se acumula no córtex equatorial da célula para promover a montagem e a contracção do anel actomiosina [9].

As GTPases caracterizam-se por alterarem o seu estado entre activo e inactivo. Quando activas estão ligadas ao GTP, quando inactivas estão ligadas ao GDP. Quando estão no estado activo estas são activadoras de cascatas de sinalização intercelulares. As famílias de GTPases, que já se verificou estarem envolvidas no processo da citocinese em diferentes organismos, foram as proteínas tipo Rho, Rac e Cdc42. Em células animais, quando inactivadas, as GTPases tipo Rho impedem a montagem dos filamentos de actina e promovem a despolimerização do anel contráctil, inibindo, dessa forma, a constrição [10].

Semelhante a outras GTPases de baixo peso molecular, a RhoA é regulada por GEFs (*Guanine-nucleotide Exchange Factors*) e por GTPase activadoras de proteínas (GAPs). Um importante activador de RhoA é a GEF ECT2, que desempenha um papel central na sinalização do plano equatorial para o córtex da célula, o qual especifica o plano de clivagem

[6][11]. Em anafase, ECT2 liga-se à MgcRacGAP (subunidade do complexo *Centralspindlin*) e está localizada no fuso central [11] [10]. A ligação da ECT2 à subunidade MgcRacGAP durante a anafase recruta a ECT2 para o fuso central e estimula a sua actividade catalítica [9] [10]. Consequentemente, os sinais da ECT2 sobrejacentes ao córtex equatorial através da activação de RhoA, levam à formação do anel contráctil e à ingressão do sulco de clivagem.

Quando os cromossomas se movem em direcção aos polos, durante a anafase, os microtúbulos da zona mediana do fuso formam matrizes que se sobrepõe na zona central do mesmo [13]. A zona de sobreposição dos microtúbulos estreita gradualmente durante a progressão da anafase para formar o fuso central, uma plataforma de sinalização que contribui para o posicionamento do sulco de clivagem [revisto em, 12].

As proteínas mais importantes para controlar a dinâmica do fuso central são as proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs), a PCR1, o complexo *centralspindlin*, composto pela MKLP1 (*mitotic kinesin-like protein*) e pela MgcRacGAP, e o complexo de proteínas passageiras dos cromossomas (CPC).

A PCR1 é fosforilada pela CDK1 no início da mitose e transforma-se num estado inactivo e monomérico. Durante a transição metafase-anafase a PCR1 é desfosforilada e como resultado interage com a KIF4, uma cinesina que transloca a PCR1 ao longo do fuso mitótico. Através da sua desfosforilação, a PCR1 é oligomerizada, e isso promove a sua actividade da agregação dos microtúbulos. Em suma, a PCR1 está ligada aos microtúbulos e é essencial para manter o fuso central [15].

O complexo *Centralspindlin* é activado no início da anafase, através da remoção da fosforilação inibidora da CDK1 (Fig. 1.5.).

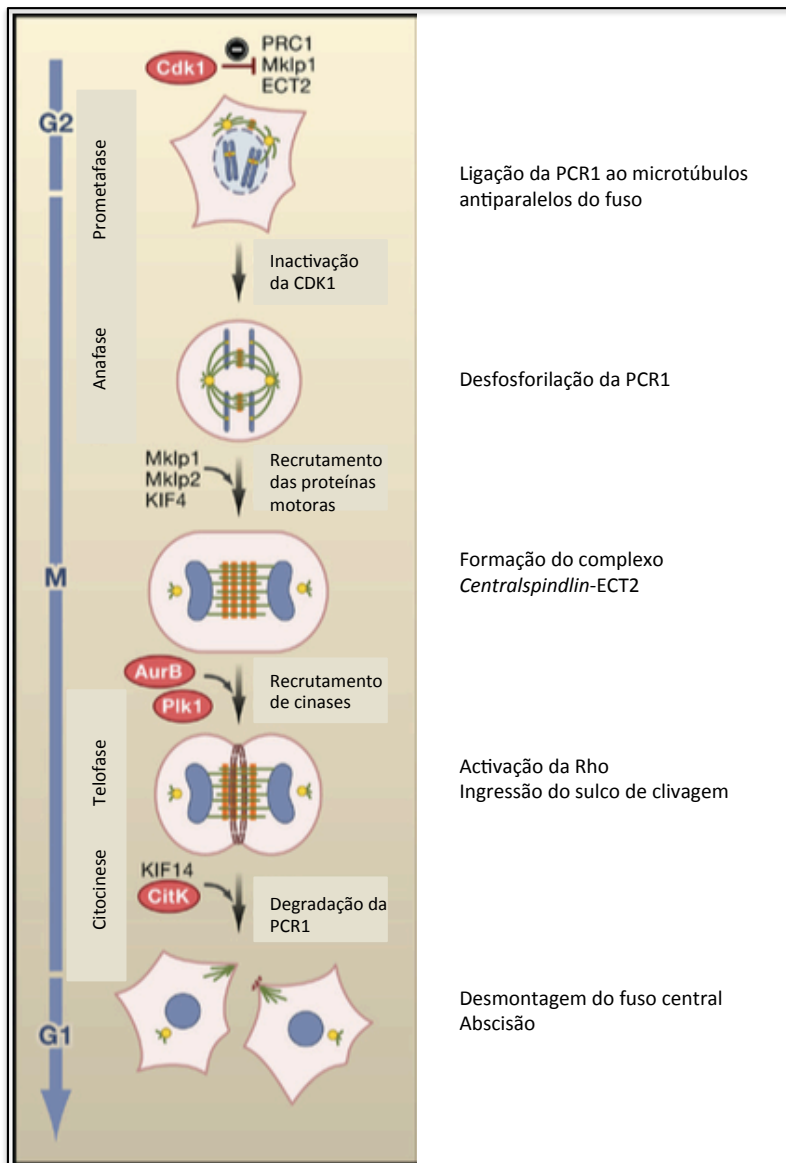


Fig. 1. 5. Representação de um modelo para a função da proteína PRC1 associada aos microtúbulos no fuso mitótico, que leva ao recrutamento sequencial de vários factores necessários para as diferentes fases da citocinese. (adaptado de Barr and Gruneberg 2007)

Um terceiro componente essencial do fuso central é o complexo das proteínas passageiras dos cromossomas, compreendendo a cinase Aurora B, a proteína centrómero interior (INCENP), a borealina, e a survivina [revisto em, 17]. Este complexo de proteínas localiza-se nos centrómeros em metafase, em anáfase localiza-se no sulco de clivagem e, por fim em telófase tardia localiza-se no *midbody* [17].

A realocização do complexo das proteínas passageiras dos cromossomas dos centrómeros para o fuso central durante o início da anáfase, depende da remoção da fosforilação na Thr59 da INCENP [18] e da cinesina MKLP2 [19]. O comprimento do fuso central é regulado pela Aurora B, envolvendo as cinesinas KIF4A e KIF2A. Em células

humanas, a Aurora B estabiliza o fuso central pela activação local da KIF4A e por inibição da KIF2A [20].

Um declínio da actividade Cdk1 e realocização da Aurora B promovem a agregação dos microtúbulos e a montagem do fuso central durante os estadios iniciais da anafase (Fig. 1.5.).

1.2.2. Montagem e contracção do anel de actomiosina

Uma vez activada no córtex equatorial da célula, a RhoA promove a montagem e a contracção do anel actomiosina através de duas vias reguladoras.

Por um lado, a RhoA estimula a nucleação dos filamentos de actina [21][22], e por outro lado, activa a miosina II indirectamente. A Miosina II é o principal motor de responsável pela citocinese.

Em eucariotas superiores, a fosforilação da cadeia leve reguladora de miosina II é um meio primário para a activação desta e é conhecida como sendo essencial para a execução da divisão celular.

Em embriões de *C. elegans*, a nucleação de actina mediada pela formina é necessária apenas até estadios iniciais da ingressão do sulco de clivagem, enquanto a atividade da miosina II é necessária até completar contracção do anel contráctil [23].

A actina e a miosina são, como o próprio nome indica, componentes essenciais do anel actomiosina, mas não são no entanto os únicos, existem outras proteínas necessárias à sua formação, tais como, as septinas [24]. As septinas foram inicialmente descritas em *S. cerevisiae* e são uma família de proteínas essenciais para a citocinese e para a morfologia celular neste organismo [10]. Na levedura de gemulação, as septinas funcionam como um suporte estrutural para que seja feita a montagem de outras componentes do anel de actomiosina, as chitinas [25].

Durante a ingressão do sulco de clivagem, muitos filamentos de actina e miosina estão alinhados com a zona equatorial, consistente com um mecanismo de deslizamento de filamentos de actina e miosina [26]. No entanto, em fases iniciais da montagem do anel actomiosina em vertebrados, muitos filamentos de actina parecem ser orientados em direcções aleatórias. Estudos *in vitro* e considerações biofísicas, sugerem que essas redes de filamentos de actina orientados aleatoriamente também podem gerar forças contrácteis [revisado em, 29]. Durante a ingressão do sulco de clivagem, a quantidade de actina e miosina por unidade de

comprimento permanece constante, o que implica que a contração do anel actomiosina seja simultânea com a desmontagem do filamento[28].

1.2.3. Formação do *midbody* e maturação da ponte intercelular

A contração do anel actomiosina sobre o sulco de clivagem é exercida até que seja alcançado um diâmetro 1-2 μm . Após a divisão, as duas células filhas, permanecem ligadas por uma ponte intercelular, que persiste durante várias horas, até que ocorra a abscisão. Esta ponte intercelular contém feixes de microtúbulos antiparalelos derivados do fuso mitótico, que se sobrepõem no *midbody*.

1.2.3.1 Reorganização do citoesqueleto e das membranas

Durante a formação da ponte intercelular, os componentes do fuso central realocizam-se em domínios distintos do *midbody*. A KIF4 e a PRC1 permanecem associadas aos microtúbulos na zona de sobreposição central, enquanto que as proteínas motoras CENP-E, MKLP2, e Aurora B localizam-se nos microtúbulos adjacentes ao *midbody*. Vários componentes do anel actomiosina, incluindo septinas e RhoA, localizam-se, também, em redor do *midbody* (Fig. 1.6) [19] [29].

A membrana plasmática da ponte intercelular é enriquecida por lípidos específicos. Fosfoinosítidos e seus derivados fosforilados desempenham um papel particularmente importante na citocinese [30][31]. O *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PtdIns (4,5) P₂) acumula no córtex equatorial, aquando a ingressão do sulco de clivagem [32], o PtdIns3P acumula perto do *midbody*, onde se liga ao FYVE-CENT e ao TTC19, dois factores que medeiam a acumulação do factor de abscisão CHMP4B (Fig. 1.6.)[33].

Após estar completa ingressão do sulco de clivagem, a maioria dos filamentos de actina são despolimerizados [34], dependendo da inactivação da GTPase RhoA, que é mediada pela Proteína Cinase C (PKC) e pelas proteínas 14-3-3 [35]. A despolimerização dos filamentos de actina da ponte intercelular é também regulada pela alteração da composição lipídica da membrana plasmática. As vesículas endossomais que contém a Rab11 e a FIP3, também contribuem para a despolimerização dos filamentos de actina da ponte intercelular. Para além da sua função na remodelagem dos filamentos de actina, as vesículas que contém Rab11/FIP3 também contribuem para uma redução gradual do tamanho da ponte intercelular

[36], que precede a formação de zonas de constrição que contêm ESCRT-III (*endosomal sorting complex required for transport-III*).

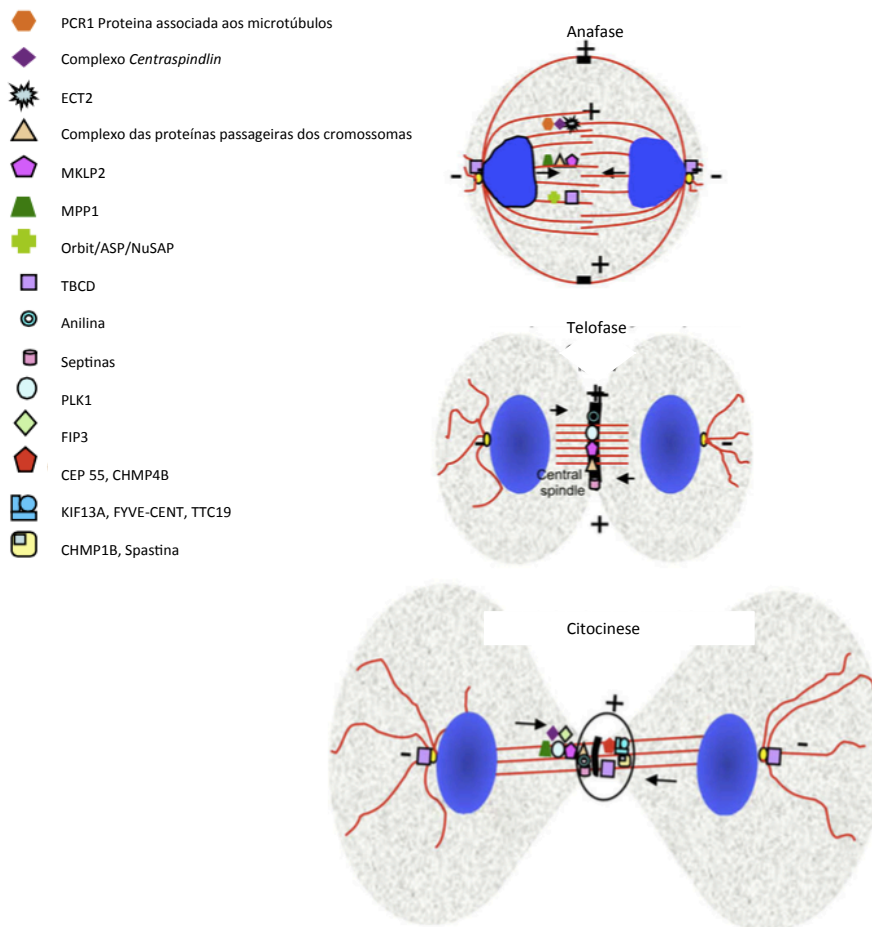


Fig. 1. 6. Diagrama que ilustra as funções das proteínas do fuso, que funcionam durante as diferentes fases da divisão celular. DNA está indicada a azul, centrossomas a amarelo e microtúbulos a vermelho. (adapatdo de *Sagona and Stenmark* 2010)

1.2.4.Abscisão

1.2.4.1Constrição e clivagem da ponte intercelular

Durante a sua maturação, a ponte intercelular estreita gradualmente até cerca de metade da sua largura inicial. Estas zonas de constrição contêm filamentos associados a membranas de 17 nm de diâmetro, que circundam a ponte intercelular como grandes hélices.

A identidade molecular dos 17 nm de diâmetro dos filamentos, associados a membrana, da abscisão é ainda desconhecida. Um candidato é o ESCRT-III que é essencial para abscisão e durante as fases finais acumula-se na ponte intercelular e nas zonas de constrição [34], [38].

O tempo de abscisão é regulado por várias cinases mitóticas e pela tensão mecânica. As cinases Aurora B e a Plk1, que também desempenham papéis importantes durante a montagem do fuso mitótico e a formação de sulco de clivagem, têm funções adicionais na regulação do ESCRT-III. A Plk1 suprime a acumulação do ESCRT-III através da fosforilação de CEP55 até que o ESCRT-III seja degradado pelo complexo de promoção da anafase durante saída de mitose [39]. A Aurora B também funciona como um regulador negativo de abscisão por fosforilação da subunidade CHMP4C do ESCRT-III [40].

1.3. Coordenação de mitose com a citocinese

Uma divisão celular fiel exige que no local de clivagem seja eliminada toda a cromatina antes de ser iniciada a citocinese. Caso contrário, a maquinaria da citocinese pode danificar os cromossomas [41][42] ou pode falhar a divisão das células, devido aos cromossomas não estarem bem segregados.

O evento mais importante para que as células saiam de mitose é a inativação das CDKs mitóticas. A inativação ocorre durante a anafase através da degradação das ciclinas mitóticas pelo APC (Complexo Promotor de Anafase).

1.3.1 MEN (Mitotic Exit Network)

A divisão da célula envolve a sua reorganização para garantir a distribuição coordenada do material genético entre as duas células filhas. No final da divisão, as estruturas mitóticas são desagregadas, os reguladores da mitose são inativados, e a interfase é reintegrada. Este processo, denominado de saída de mitose (*Mitotic Exit*), começa com a inativação da CDK1 e a desfosforilação dos seus substratos. Como consequência, o fuso mitótico despolimeriza-se, ocorre a citocinese, os cromossomas descondensam, e as funções da interfase são retomadas.

Em *S. cerevisiae*, a MEN desencadeia a inativação da Cdk1 e o início da citocinese. A MEN é constituída por uma GTPase Tem 1, pelo complexo Bub2/Bfa/Byr4 (uma GAP), por uma GEF a Let1, pela fosfatase Cdc14, por cinases (Cdc5, Dbf2 e Cdc15) e por uma proteína que forma um complexo com a cinase Dbf2, a MOB1 e uma proteína estrutural, a Nud1. Os mutantes nos genes que codificam para as proteínas da MEN, são caracterizados por apresentarem elevados níveis de ciclinas mitóticas, uma paragem em anafase tardia, com fuso alongado, o que resulta na sua incapacidade de sair de mitose [4].

No topo da MEN (revisto em [43]) está a GTPase Tem1, que actua como um interruptor, que é activo quando está ligado ao GTP e inactivo quando ligado ao GDP. Quando activa, a Tem1, liga-se à Cdc15, promovendo a activação desta cinase. Por consequência a Cdc15 irá activar o complexo cinásico Dbf2/MOB1. O complexo Dbf2/MOB1 permite que a fosfatase Cdc14 seja libertada do nucléolo (revisto em [43]). A Cdc14, em seguida, antagoniza e inactiva a CDK1, desfosforilando os seus alvos, promovendo a destruição da ciclina e mediando a acumulação do inibidor da CDK1, Sic1 (revisto em [43]). Em paralelo, a Dbf2, fosforila componentes envolvidos na citocinese, tal como a proteína M-BAR Hof1, promovendo assim o início da citocinese (revisto em [43]). Assim, a activação da MEN e da Cdc14 promove a inactivação da CDK1 e, por consequência, a saída de mitose.

1.3.2 Coordenação entre a saída de mitose com a citocinese

A coordenação entre a saída de mitose a citocinese parece depender da MEN. As primeiras pistas de que componentes da via MEN estariam envolvidos na citocinese, foram as observações de que, após a libertação de Cdc14 do nucléolo, vários componentes da via MEN (Cdc15, Dbf2 e MOB1) localizam-se no pescoço da gémula [46] [47]. Para analisar funções citocinéticas dos componentes da MEN utilizou-se mutantes nos quais as células conseguiam sair de mitose, no entanto, tinham defeitos na citocinese. Mutantes de MOB1 e de Cdc15 faziam diversos ciclos de duplicação de DNA sem executarem a citocinese, resultando na formação de cadeias de células interligadas. Analisando os componentes do anel contráctil, observou-se que havia a presença de actina nos mutantes de Cdc15 e nos mutantes de MOB1, e que não só havia actina como também Myo1 (miosina) e a Igp1 (IQGAP) [46][47]. Em conjunto, estes resultados sugerem que estes mutantes têm um recrutamento normal dos componentes deste anel contráctil, porém não executam a sua constrição.

1.4. Centrossomas e a Citocinese

1.4.1 Centrossomas

Os centrossomas foram descritos por Walter Fleming em 1875 e batizados por Theodor Boveri em 1988 de centrossomas, por terem uma localização central na célula.

Os únicos organelos de uma célula que não possuem membrana são os centrossomas. Estes são constituídos por duas principais estruturas: os centríolos e o material pericentriolar.

Cada centrossoma possui 2 centríolos, o centríolo mãe (centríolo mais velho) e o centríolo filho (o centríolo mais novo), que estão agregados numa das extremidades (a extremidade proximal), formando um ângulo recto. Um centríolo é formado por nove conjuntos de triplete de microtúbulos. O centríolo mãe possui apêndices extras na extremidade distal. Ao redor dos dois centríolos está o material pericentriolar, sendo este o local de nucleação dos microtúbulos.

Os centrossomas sofrem uma duplicação semi-conservativa, duplicam-se uma vez em cada ciclo celular. Em G1/S os centrossomas são separados e, durante a fase S, um novo centríolo, chamado centríolo filho, é formado. Este vai alongar-se em G2, atingindo a sua maturidade em G2/Início de mitose. Na transição G2/M, os centrossomas são separados num passo que envolve dois processos: a cinase Nek-2 que promove a quebra do elo de ligação entre ambos os centrossomas que se duplicaram, que de seguida são afastados pela acção de proteínas motoras. Em mitose os centrossomas participam na organização do fuso mitótico [revisto em, 56].

1.4.2. O papel dos centrossomas na citocinese

Além do seu papel de nucleação de microtúbulos e organização do fuso mitótico, os centrossomas têm um papel bastante importante na finalização da citocinese e progressão para G1.

Numa célula em interfase ou em profase, foram removidos os centrossomas (por laser ou microagulhas) e observou-se que a célula consegue não só formar o fuso mitótico como ainda segregar os cromossomas em anafase [49], [50]. Porém, as células filhas ficavam ligadas por pontes intercelulares e em metade dos casos falhavam a citocinese, originando células binucleadas [51].

A hipótese de que há sinais provenientes dos polos do fuso que controlam e promovem a citocinese já tem cerca de 30 anos, tendo sido inicialmente proposta por Rappaport. Este introduziu uma esfera de vidro no meio de uma célula, para que esta adoptasse uma forma de anel. Na sua primeira divisão, executou a citocinese entre os dois centrossomas, fazendo uma forma de ferradura. Na sua segunda divisão, dividiu-se entre os dois centrossomas na região do DNA e, após essa divisão, os microtúbulos astrais da célula binucleada aproximaram-se e formaram um sulco de clivagem ectópico, local onde ocorreu a

segunda divisão. Este sulco de clivagem extra, mesmo iniciando-se mais tarde, consegue levar até ao fim a citocinese mesmo não existindo fuso nem cromossomas [52].

Conclui-se então que além da função inicialmente descrita, de nucleação dos microtúbulos, os centrossomas têm também um papel na citocinese, de modo a assegurar a fidelidade deste processo.

1.5. Cancro e a Citocinese

1.5.1. Cancro

Cancro é uma doença caracterizada por uma população de células que se dividem e proliferam descontroladamente, invadem e destroem tecidos adjacentes, podendo espalhar-se por partes distantes no corpo através de um processo denominado de metastização.

Quase todos os cancros são originários de anomalias genéticas, tais como erros na replicação do DNA e instabilidade genómica.

Existem duas classes de genes que podem levar a anomalias genéticas. Os oncogenes, que promovem o cancro e estão geralmente activos nos tumores, levando a uma proliferação e divisão descontrolada, não permitem a apoptose, etc. Os genes supressores de tumores estão por norma inactivos em tumores, o que resulta de uma perda de funções normais para o bom funcionamento celular.

1.5.2 Cancro e a citocinese

Compreender o mecanismo de citocinese é um problema central na biologia da célula e é importante investigar este processo por vários motivos. Uma hipótese de longa data no mecanismo de tumorigenese afirma que as falhas na divisão celular levam à formação de células tetraplóides geneticamente instáveis, com múltiplos centrossomas e consequentemente, resultando em instabilidade genómica. Falhas na citocinese, são uma importante causa de instabilidade genómica, o que implica, que quando desregulado, o mecanismo citocinético poderá conduzir a várias anormalidades celulares, como cancro [53].

Theodor Boveri foi o primeiro a introduzir a ideia de que pode haver uma ligação entre a mitose anormal e tumores malignos. Este caracterizou os centrossomas em 1888 e sugeriu que uma célula com vários centrossomas origina instabilidade genómica e, por sua vez, cancro. Este propôs que isso poderia acontecer por causa de divisão anormal dos

centrossomas ou pela supressão da divisão celular, e que, em seguida, poderia levar a tetraploidia.

1.6. Genes MOB

1.6.1 MOB1 em *S. cerevisiae*

Em 1998, o gene MOB1 (Mps One Binder) foi primeiramente descrito em *S. cerevisiae* por Luca e Winey após um rastreio duplo híbrido, numa busca de proteínas que pudessem interagir com a cinase Mps1. A Mps1 é muito importante para o ponto-de-controlo da montagem do fuso e para a duplicação do corpo polar do fuso (corresponde ao centrossoma em células humanas). Porém, apesar de se ter observado uma interação entre Mps1 e a MOB1, esta não parece estar envolvida nem na duplicação dos centrossomas nem no ponto-de-controlo de montagem do fuso.

Também através de um rastreio de duplo híbrido, foi identificado outro interactuante da MOB1, a cinase Dbf2 [54]. Esta cinase pertence à MEN. Dado a sobreexpressão de MOB1 suprimir o fenótipo característico da MEN observado nas leveduras, que têm uma deleção para o gene Dbf2, propõe-se que a MOB1 actua através da Dbf2 [54]. De acordo com esta hipótese, observou-se que a interação entre as proteínas Dbf2-MOB1 era essencial para uma activação completa da Dbf2, e desta forma essencial para a saída de mitose [55].

Mutantes de leveduras de MOB1 demonstram uma paragem em anafase tardia, com níveis elevados de ciclina B não degradada, com um fuso mitótico alongado já com os cromossomas segregados. MOB1 foi identificado como pertencente à MEN, sendo um gene essencial em leveduras[56]. Além destes fenótipo observado dos genes pertencentes a MEN, foram identificados outros alelos de MOB1 nos quais as células realizavam vários ciclos de duplicação de DNA. Porém não executavam a citocinese, originando a formação de cadeias de células interligadas

1.6.2 MOB1 em *Drosophila Melanogaster*

Dado tanto em *Drosophila* como em Humanos existirem várias nomenclaturas para os MOBs, no anexo I está presente uma tabela com as correspondências dos vários MOBs nestes organismos.

Em 2005, foi descoberto um supressor de tumor, a Mats (Mob as a Tumor Suppressor), que é necessária para controlar a proliferação celular e a apoptose em *Drosophila*, isto é, a

perda da função da Mats resulta num aumento da proliferação celular, defeitos na apoptose e indução de crescimento de tecidos tumorais [57]. Supressores de tumores actuam normalmente como inibidores da proliferação celular ou activadores de apoptose e usam vários mecanismos para a supressão do crescimento dos tecidos. A Mats regula negativamente a expressão da ciclina E e DIAP, duas proteínas essenciais na regulação do ciclo celular e controlo da apoptose [57].

Uma vez que as proteínas MOB são altamente conservadas, a sua função pode ser conservada entre espécies. Em consistência com isso, descobriu-se que a MOB4 humana pode substituir funcionalmente a Mats em *Drosophila*. De notar que a perda de função, por mutações da Mats1, foi identificada num cancro de pele humano e num tumor da mama do rato, sugerindo que os genes de mamífero podem, de facto, actuar como supressores de tumor [57].

A Mats é também essencial para o desenvolvimento embrionário, sendo necessário para segregação adequada dos cromossomas durante o desenvolvimento dos embriões de *Drosophila* [58].

Uma possibilidade para explicar o mecanismo pelo qual a perda de função da Mats leva a mitoses é que em mitose a Mats funcione em conjunto com Warts (Hómologo de LATS1/2 em *Drosophila*) no controlo da proliferação celular e apoptose [57].

Analisou-se também o papel da Mats na membrana plasmática. Significativamente, observou-se que a Mats endógena é localizada na membrana plasmática durante o desenvolvimento de tecidos. Através de uma marcação constitutiva, Lai *et al*, mostraram que quando a Mats está na membrana, reduz o crescimento do tecido e o tamanho do órgão através da regulação da cinase Warts [59]. Portanto, é muito provável que, pelo menos em moscas, a membrana plasmática seja um sítio de acção importante para a Mats no que diz respeito ao seu papel na supressão de tumores.

1.6.3. MOB em humanos

No nosso laboratório fizeram-se os primeiros estudos que caracterizaram a família dos genes tipo MOB em humanos. Sabemos que existem pelo menos sete proteínas diferentes tipo MOB em células humanas. As proteínas hsMOB1 e hsMOB2 codificadas por apenas um gene cada, as proteínas hsMOB3 (codificadas por três genes distintos, hsMOB3A, hsMOB3B e hsMOB3C) e as proteínas hsMOB4 (codificadas por dois genes distintos, hsMOB4A e hsMOB4B).

1.6.3.1 MOB4 em Humanos

Relativamente às proteínas da família MOB em humanos, as proteínas tipo hsMOB4 são as mais idênticas à proteína de MOB1 em levedura ~44%. A identidade entre as proteínas hsMOB4A e hsMOB4B é de cerca de 96%.

Comparando as duas sequências proteicas de hsMOB4A e hsMOB4B, é notório que existe uma enorme semelhança entre ambas, logo poderia pensar-se que estas proteínas seriam polimorfismos do mesmo gene. Porém, ao alinhar-se as duas sequências de DNA das regiões codificantes, é perceptível que estas são apenas 78% idênticas, divergindo maioritariamente no 3º nucleótido de cada codão. A hsMOB4A localiza-se no cromossoma 4 na região genómica 4q22 e a hsMOB4B localiza-se na região 2q19 do cromossoma 2. Em conjunto, percebe-se que existem dois genes distintos [4].

Em células humanas, a hsMOB4A e a hsMOB4B acumulam nos centrossomas no *midbody* [60].

As proteínas hsMOB4A e hsMOB4B também desempenham um papel na duplicação centrossoma [61], embora a hsMOB4A e a hsMOB4B tenham sido descritas como localizadas nos centrossomas, não é ainda claro se o conjunto centrossomal de hsMOB4A e hsMOB4B são essenciais para duplicação centrossomal. As proteínas hsMOB4A e hsMOB4B foram também encontradas em estruturas de células mitóticas, os cinetócoros [62].

1.6.3.1.1 Interação da hsMOB4A e hsMOB4B com as cinases NDR/LATS

As proteínas hsMOB4A e hsMOB4B ligam-se às quatro cinases humanas NDR/LATS. Curiosamente, estas interações são mediadas através de um domínio das cinases NDR/LATS que é conservado da levedura para o homem [63].

A hsMOB4A e a hsMOB4B são especificamente fosforiladas nas Thr12 e Thr35 por MST1 e MST2 (dois homólogos humanos de Cdc15p e cinases da Hippo em levedura e moscas, respectivamente) [64]. A fosforilação da hsMOB4A e da hsMOB4B nas Thr12 / Thr35 é necessária para a interação da hsMOB4A e da hsMOB4B com as NDR/LATS [64]. Ao analisar esta interação percebe-se que mais provável é que a hsMOB4A e a hsMOB4B tenham uma maior afinidade para as NDR/LATS devido a alterações conformacionais desencadeadas pela fosforilação das Thr12/Thr35.

Ensaio estruturais e bioquímicos mostraram que a hsMOB4A e a hsMOB4B ligam-se às cinases NDR/LATS através de resíduos conservados, tanto na hsMOB4A como na hsMOB4B, como nas cinases NDR/LATS [63]. Uma extensão de resíduos hidrofóbicos carregados positivamente, conservados no N-terminal dos domínios catalíticos das cinases NDR/LATS, é necessária para a associação da hsMOB4A e da hsMOB4B a estas cinases [61][65][66]. Por outro lado, é necessário um conjunto conservado de resíduos carregados negativamente na hsMOB4A e na hsMOB4B para a interacção desta com as cinases NDR/LATS [61].

A ligação da hsMOB4A e da hsMOB4B às cinases NDR1/2, através destes domínios conservados, desencadeia a autofosforilação das NDR1/2 no segmento de activação (*T-loop phosphorylation*), facilitando também a fosforilação de NDR1/2 no motivo hidrofóbico pelas cinases MST[65] [67].

Em contraste, a ligação da hsMOB4A e da hsMOB4B com as cinases LATS1/2 parece ser necessária apenas para *T-loop phosphorylation*, enquanto que a fosforilação do motivo hidrofóbico é independente da formação dos complexos hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS [64]. Em conjunto, estes resultados mostram que hsMOB4A/NDR e hsMOB4B/NDR não são iguais aos complexos hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS, permitindo assim às células desencadear saídas biológicas diferentes através da sinalização da hsMOB4A e da hsMOB4B.

Outra diferença entre os complexos hsMOB4A/NDR e hsMOB4B/NDR dos hMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS é a forma como podem ser influenciados por hsMOB2. Surpreendentemente, apesar de o domínio de ligação entre hsMOB4A e hsMOB4B e as cinases NDR/LATS, ser altamente conservado, [revisto em, 51] a hsMOB2 interage com as cinases NDR1/2 através do domínio de ligação da hsMOB4A e hsMOB4B. No entanto, não se associa às cinases LATS1/2 [65].

A ligação da hsMOB2 às NDR1/2 inibe a sua autofosforilação, bloqueando assim a activação da mesma. Esta inibição é provavelmente causada pela competição entre hsMOB4A e hsMOB4B e hsMOB2 para uma ligação directa ao mesmo domínio destas cinases [65]. Portanto, a hsMOB2 foi classificada como uma inibidora da sinalização NDR, enquanto a hsMOB4A e a hsMOB4B foram classificadas como co-ativadoras da cascata de sinalização NDR / LATS.

Então, a eficácia de ligação da hsMOB4A e da hsMOB4B às cinases NDR/LATS aumenta dramaticamente mediante a fosforilação nas Thr12 / Thr35 da hsMOB4A e da hsMOB4B pelas cinases MST1/2. O Aumento da formação dos complexos hsMOB4A/NDR,

hsMOB4B/NDR, hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS resulta num aumento da autofosforilação das cinases NDR/LATS. A interação da hsMOB4A e da hsMOB4B com NDR também é importante para a fosforilação dos motivos hidrofóbicos das NDR1/2 pelas cinases MST, enquanto que a fosforilação dos motivos hidrofóbicos das cinases LATS1/2 pelas MST pode ser desacoplado da formação dos complexos hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS.

Além disso, a perda da fosforilação de Thr12/Thr35 da hsMOB4A e da hsMOB4B tem sido associada à diminuição da fosforilação inibidora do proto-oncogene YAP [68]. Dado que a fosforilação de Thr12/Thr35 da hsMOB4A e da hsMOB4B é necessária para uma eficiente ligação às cinases NDR/LATS [64], esta constatação sugere que, a fosforilação de YAP é diminuída devido à redução da formação dos complexos hsMOB4A/NDR, hsMOB4B/NDR, hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS.

A perda da fosforilação de Thr12/Thr35 da hsMOB4A e da hsMOB4B resulta num aumento da proliferação celular de células de origem humana [64]. Portanto, considerando que a fosforilação de Thr12 / Thr35 da hsMOB4A e da hsMOB4B são necessárias para uma eficiente ligação das cinases NDR/ LATS [64][69], pode ser que o aumento descontrolado da formação dos complexos hsMOB4A/NDR, hsMOB4B/NDR, hsMOB4A/LATS e hsMOB4B/LATS tenha um efeito negativo sobre o ciclo celular (Fig. 1.7.)

Como descrito anteriormente, LATS1 interage com a hsMOB4A e com a hsMOB4B, e este complexo parece ser funcionalmente requerido para a execução da citocinese [66].

1.6.3.1.2 Efeitos da depleção da hsMOB4A e da hsMOB4B

Ao depletar-se por RNAi a hsMOB4A e a hsMOB4B, simultaneamente, observa-se que estas são importante para a re-associação dos centríolos, execução da citocinese e ainda que esta depleção induz mobilidade celular [60].

No nosso laboratório percebeu-se que a depleção simultânea da hsMOB4A e da hsMOB4B parece causar a separação dos centríolos durante a fase G1, dado que, primeiro os polos do fuso mitótico contêm sempre dois centríolos cada, em segundo lugar, porque nunca se observou células com quatro centríolos separados (ou com um par mais dois centríolos separados) indicando que nenhuma separação ocorreu após a duplicação do centríolo [60]. Os centríolos estão frequentemente separados no final telofase e re-aderem após abscisão. Em contraste com o efeito de depleção, a sobre-expressão de ambos as hsMOB4 reduz a percentagem de células com centríolos separados. A sobre-expressão das hsMOB4 impede a separação dos centríolos no final da divisão celular, sendo importante para a re-associação de centríolos após a mitose [60].

Ao depletar-se em simultâneo, por RNAi, a hsMOB4A e a hsMOB4B, conclui-se também que as células humanas permanecem ligadas durante mais tempo (~17h) que células normais (~4h), por uma ponte citoplasmática que contem o *midbody* e, têm uma mobilidade bastante aumentada, dado que se movem em direcções aleatórias mesmo após a ponto intercelular ser cortada [60].

No nosso laboratório, demonstrou-se que a depleção da hsMOB4A e da hsMOB4B, simultaneamente, inibe a remoção de microtúbulos localizados no *midbody*, remoção essa que é necessária para permitir a fusão da membrana e abscisão [60]. Apesar de pouco explorada, a dinâmica dos microtúbulos têm um papel importante na citocinese [14]. Células sem Spastina falham a abscisão porque retêm microtúbulos no *midbody* [70]. Fazendo da Spastina um potencial candidato para a regulação por hsMOB4A e hsMOB4B [60].

Populações de microtúbulos com diferentes estabilidades estão envolvidas em vários aspectos da citocinese [8]. A dinâmica dos microtúbulos e a sua reorganização são também cruciais para a mobilidade celular e, de forma interessante, a dinâmica alterada dos microtúbulos pode induzir separação dos centríolos [60]. Actualmente, não está claro se a divisão dos centríolos, falha na abscisão e hipermobilidade de células depletadas de hsMOB4A e hsMOB4B sejam todas as consequências de estabilidade alteradas dos microtúbulos [60].

Em conclusão, mostrou-se que o recrutamento de membrana para o *midbody* não é, por si só suficiente, e que os microtúbulos têm que ser reorganizados antes das vesículas de membrana se fundirem. Estes resultados abrem a porta para explorar a regulação da dinâmica dos microtúbulos pela (s) cinase (s) dependente(s) da hsMOB4A e da hsMOB4B. Além disso, todos estes resultados apontam também para a possibilidade interessante que a via Hippo, que tem um papel importante na regulação da proliferação celular e da apoptose, possa influenciar a dinâmica dos microtúbulos em resposta a sinais extracelulares e intracelulares e, assim, influenciar a polaridade celular [60].

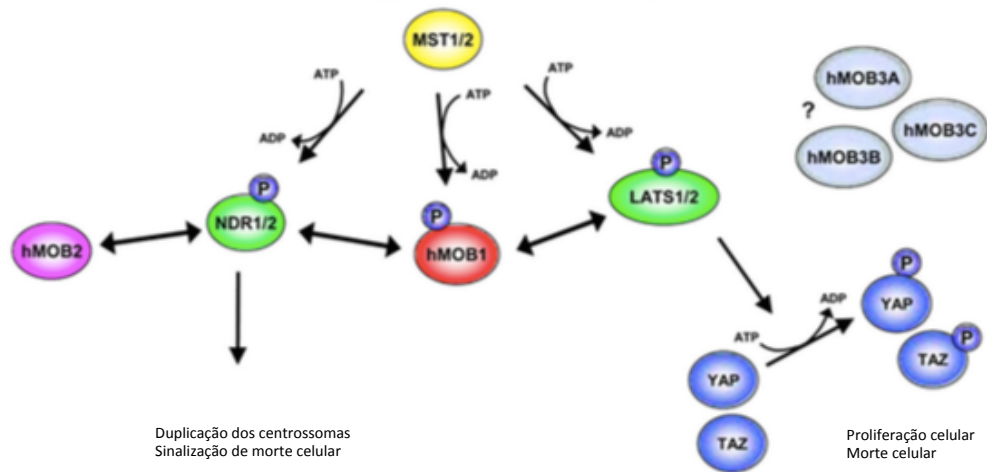


Fig. 1. 7. Sinalização da hsMOB em células humanas. (adaptado de Hergovich *et al.*, 2011)

1.6.4. MOB1 em *Tetrahymena*

A *Tetrahymena thermophila* é um protozoário unicelular permanentemente polarizado que se divide simetricamente e possui um eixo antero-posterior e assimetria esquerda-direita, fazendo deste organismo um modelo atractivo para investigar como polaridade celular intrínseca está relacionada com a divisão celular simétrica. A *Tetrahymena* codifica apenas um único gene MOB, MOB1 que apresenta 61% de identidade com o homólogo humano (hsMOB4).

O gene MOB1 da *Tetrahymena* acumula nos corpos basais do pólo posterior, criando um gradiente através do eixo antero-posterior. Além disso, durante a divisão celular o MOB1 da *Tetrahymena* também é recrutado para os corpos basais na zona equatorial da célula onde o sulco de clivagem será formado, sendo este o primeiro e único marcador de polaridade molecular, do polo posterior para os corpos basais do polo anterior, até agora descritos em *Tetrahymena*. Esta localização polarizada específica do MOB1 de *Tetrahymena* aponta para a importância de os corpos basais possuírem composições distintas, criando pontos de referência especializados dentro de um organismo unicelular [72].

Os fenótipos observados nas células mutantes de MOB1 de *Tetrahymena* sugerem que o gradiente MOB1 ao longo do eixo antero-posterior é essencial para a manutenção da polaridade celular, que é crucial para o estabelecimento do plano de divisão celular. Células de *Tetrahymena* com Mob1 depletado têm o posicionamento do plano de divisão muito alterado. Nessas células, a citocinese fica comprometida. No entanto as células continuam a tentar dividir-se, permanecendo ligadas [72].

Em levedura e em células humanas, em mutantes MOB1, as células também ficam com a citocinese comprometida, não sendo capaz de a finalizar, gerando cadeias de células [46] [4], o que sugere um papel conservado para MOB1 em toda a linhagem eucariótica.

O MOB1 em *Tetrahymena* está, também, envolvido na biogénese cílios dado a sua depleção atrasa recuperação dos mesmos [72].

Em suma, a polaridade celular pode estar ligada a uma divisão celular e citocinese correctas e, com isto poderá, estar relacionado o cancro. Assim, a formação de tumores em mutantes de MATS [57], poderá estar relacionada com as alterações da polaridade celular. Vários estudos indicam que alterações na polaridade celular estão na formação e progressão do tumor, tal como no caso proteína humana polarizada LKB1 (Ortologo PAR-4) cujas mutações causam a síndrome de Peutz-Jeghers, que é caracterizada por hematomas benignos e uma frequência alta de carcinomas [73].

1.7. Outras proteínas essenciais para a abscisão

1.7.1 Centriolina

Em 2003, a centriolina foi caracterizada como uma componente do centríolo mãe, esta localiza-se no centríolo mãe durante a telófase e nos centrossomas nas restantes fases do ciclo [74].

Como descrito anteriormente, o hsMOB4A e hsMOB4B possuem estas mesmas localizações. Células com níveis reduzidos de centriolina apresentam fenótipos muito semelhantes às células com a depleção de hsMOB4A e hsMOB4B. Apresentam várias características de falhas em citocinese, permanecem ligadas por mais tempo que o normal por pontes intercelulares longas, sem conseguirem executar a separação física entre as duas células filhas [74].

Sugere-se ainda, que a associação da centriolina ao centríolo mãe pode ser um requisito para a activação molecular do último evento da citocinese.

Em células que foram retirados os centrossomas, estão também presentes pontes intercelulares longas estão também presentes nessas células e, isso pode refletir um defeito na citocinese [74].

Dadas estas semelhanças no fenótipo da centriolina com a hsMOB4A e a hsMOB4B faz desta uma boa candidata para estudos de modo dissecar todo o mecanismo da citocinese.

1.7.2. Aurora B

Durante a mitose, quando se inicia a prometáfase, a Aurora B deixa de estar localizada no núcleo e realocaliza-se nos centrómeros até à metáfase. Quando começa a anáfase, a Aurora B desloca-se de forma constante até à zona mediana da célula e permanece no *midbody* até ao final da citocinese [revisto em, 81].

Como descrito anteriormente, durante a mitose, a Aurora B faz parte do complexo proteico das proteínas passageiras dos cromossomas, constituído por INCENP, borealina, survivina e a Aurora B [16].

A Aurora B é essencial para a segregação dos cromossomas, para a regulação do *checkpoint* mitótico e para a citocinese. A inibição da Aurora B, inactiva os *checkpoints* mitóticos, conduz ao desalinhamento dos cromossomas e leva a falhas na citocinese [revisto em, 82].

1.8. CALI

A *Chromophore-Assisted Laser Inactivation* (CALI) é uma técnica bastante poderosa que permite uma análise funcional e temporal de uma proteína de interesse, tornando possível relacionar a sua função com a sua localização [77]. Ao mesmo tempo evita as desvantagens de outras técnicas de inactivação de proteínas, tais como, *knockout* de uma gene ou RNA de interferência, que sofrem de compensação genética e tem baixa resolução temporal, em que o efeito de perda da proteína, depende do tempo de vida da mesma [78].

A base desta técnica é a inactivação de uma proteína de interesse devido a Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) geradas após a iluminação de um laser com um determinado comprimento de onda. Através da absorção da luz de um laser, os cromóforos/fotosensibilizadores são excitados produzindo radicais livres altamente reactivos, como as ROS, que são as únicas moléculas que conseguem actuar como “*double-edged swords*”, sendo altamente oxidativos, mas que possuem um curto tempo de vida e o raio da sua actuação é cerca de 3-4nm, logo apenas a proteína em fusão com o cromóforo irá ser inactivada [79].

A fluoresceína tem sido o fotossensibilizador amplamente mais utilizado [79]. A Fluoresceína tem um rendimento quântico elevado para produção de singletos de oxigénio que têm sido mostrados como uma espécie reactiva capaz de destruir uma proteína através de foto-oxidação de resíduos de metionina [80]. A Fluoresceína é 50 vezes mais potente do que

malachite green, utilizado pela primeira vez, em 1988, como marcação para ensaios de CALI [81].

A CALI foi desenvolvida com base na fotossensibilizadores geneticamente codificados que não precisam de qualquer adição de fluoróforos externos, tais como proteínas autofluorescentes como EGFP e Killerred (Fig. 1.9.) [82].

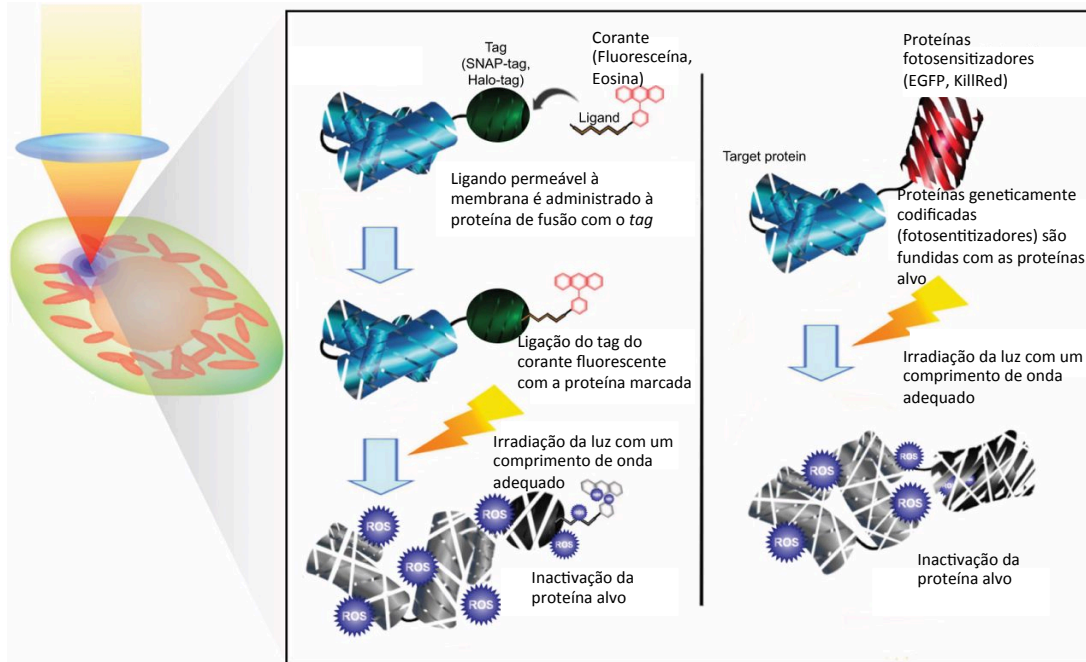


Fig. 1. 8. Visão esquemática de dois métodos do CALI: usando tags ou proteínas geneticamente codificadas. Por um método, a proteína alvo e o tag são expressas como uma proteína de fusão. Um fotossensibilizador membrana permeável é adicionado num momento posterior (esquerda). Por outro método, a proteína alvo e o fotossensibilizador são expressas como uma proteína de fusão (à direita). Em ambos os casos, são gerados ROS que inativam as proteínas-alvo nas proximidades. (adaptado de Sano *et al.*, 2014)

O EGFP foi usado para inativar α -actina, mas em comparação com fluoresceína a sua eficiência é muito menor e em experiências quantitativas só poderia inativar 40% da proteína alvo, sendo necessária uma maior quantidade de energia para inativar as proteínas alvo [79]. Logo, a energia de iluminação necessária com EGFP pode tornar-se num problema, dado que poderá criar danos inespecíficos na célula.

A proteína dimérica Killerred tem o seu máximo de excitação a 585 nm, tendo como vantagem um grande comprimento de excitação e de ser um fotossensibilizador geneticamente codificado com um elevado rendimento de singletos de oxigénio. No entanto, como muitas proteínas multiméricas fluorescentes, Killerred pode introduzir a dimerização dos seus parceiros de fusão, e, portanto, o uso em CALI é limitado até que uma variante monomérica seja desenvolvida [79].

Durante a última década novas técnicas foram desenvolvidas para adicionar funcionalidades de proteínas *in vitro*, bem como *in vivo*, que não sejam geneticamente codificadas por proteínas. As ligações covalentes e não-covalentes dos compostos químicos aos *tags* e proteínas de fusão abre inúmeras possibilidades para caracterizar uma proteína de interesse, desmitificar a sua funcionalidade, ou simplesmente purificá-la. Alguns exemplos importantes são o sistema biasernical-tetracysteine, a Halo-Tag, β -galactosidase ou SNAP-tag [79] (Fig. 1.9.).

Sabe-se que certos *tags* (ex: SNAP-tag), quando iluminados com um feixe de laser produzem ROS, inativando proteínas alvo em fusão com estes (Fig. 1.9.). Quando um feixe de laser de uma intensidade específica é dirigido a uma região da célula, a fracção celular da proteína que está associada ao tag vai ser localmente inativada. Desta forma, podemos perceber a função/ localização de uma proteína de interesse.

Os parâmetros mais importantes da criação destes *tags* são a alta eficiência e especificidade de marcação. Na flexibilidade de marcação destes *tags*, a mesma proteína em fusão com estes tem uma variedade de compostos químicos a que se pode ligar, logo é uma importante vantagem em comparação com as marcações geneticamente codificadas, tais como proteínas fluorescentes. Uma vez gerada, a mesma proteína de fusão pode ser usada para vários tipos experiências, tais como aplicações de microscopia de fluorescência, purificação de proteínas, ou análise de interação proteína-proteína, simplesmente variando o composto químico que é vinculado ao *tag*.

O sistema de marcação biasernical-tetracysteina permite a ligação de FIAsh-EDT2, um derivado específico da fluoresceína, num motivo do peptídeo contem quatro resíduos de cisteína que podem ser geneticamente fundidos com uma proteína de interesse. Quando utilizada para CALI, esta abordagem foi demonstrada para inactivar synaptotagmin I e conexina-43. Um segundo fluoróforo sintético que se liga a tetracysteine é ReAsH [83]. Tem a vantagem de um máximo de excitação a um comprimento de onda de 593 nm, os cromóforos naturais dentro das células mostram menos do que a absorção na gama de luz azul. É também mais potente do que a fluoresceína e o risco de danos inespecíficos causados é diminuída devido à menor energia de iluminação. No entanto, mostrou limitações em termos de sensibilidade e integridade de marcação. A ligação inespecífica de corantes biarsenical a cisteínas em proteínas endógenas e a alta citotoxicidade resultante repetidamente têm sido criticadas e, além disso, requerem a adição de um concorrente reagente *dithiol* para diminuir a ligação inespecífica [84].

Em 2008 foi relatado uma abordagem promissora de CALI com base no HaLo-Tag marcadas com Ru (II), tris (bipyridyl), um fotocatalisador eficiente para a geração de singletos de oxigénio. No entanto, mais experiências com CALI para a inativação específica em compartimentos subcelulares precisam ser realizados para avaliar a resolução espacio-temporal e especificidade desse fotosensibilizador dentro das células [85].

O SNAP-tag, o tag utilizado para as experiências deste trabalho, consiste numa O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (ATG), com cerca de 20 kDa que actua como uma “enzima suicida”, transferindo covalentemente modificações no seu próprio DNA. Após este ser fundido com a proteína alvo, “*a synthetic probe*” é especificamente ligada ao SNAP-tag através de uma irreversível transferência do grupo benzil de O⁶-benzilguanina (O⁶-BG) para um resíduo de cisteína [86]. Uma das principais vantagens desta abordagem é a disponibilidade de vários derivados fluorescentes permeáveis à célula de O⁶-BG (31): BG *diethylamino coumarim*, BG diacetil fluoresceína (BGAF = SNAP-Cell Fluoresceína), BG *Oregon Green*, BG *Rhodamine Green* e TMRstar estão disponíveis para marcação intracelular directa de células vivas, incluindo a fluoresceína, um fotossensibilizador (Fig. 1.10) [revisto em, 94].

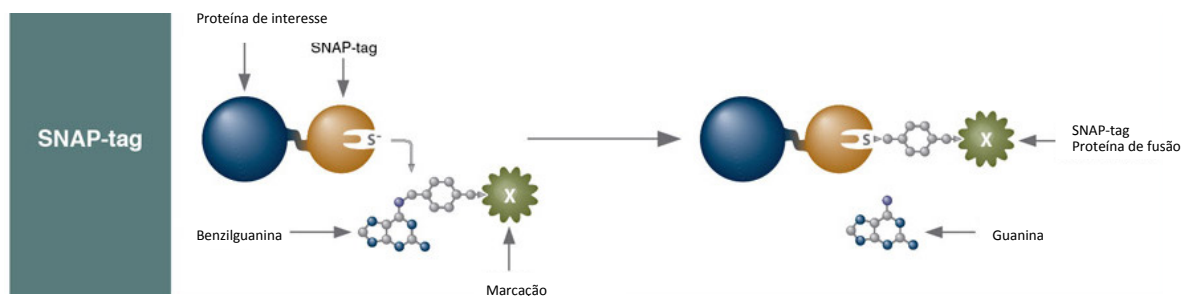


Fig. 1. 9. Representação esquemática de CALI baseado na marcação com SNAP-tag. (adaptado do Website da BioLabs)

Foi demonstrada a eficiência de CALI baseada no SNAP-tag pela aplicação da técnica para a inativação de α e γ -tubulina durante a mitose. A SNAP-tag- α -tubulina e a SNAP-tag- γ -tubulina são proteínas de fusão que foram marcadas com o substrato de SNAP-tag, BGAF, em células de mamíferos e inativadas por iluminação com um laser. A inativação do α -tubulina, uma subunidade do heterodímero que compõe a rede de microtubulos (MTs), leva a mudanças dramáticas na morfologia do fuso mitótico e leva à paragem da célula em metáfase. A γ -tubulina, um outro membro da família da tubulina, é essencialmente envolvido na nucleação de novos MTs em centros de organização de microtúbulos. A inativação da γ -tubulina reduziu o número de eventos de nucleação e diminuiu drasticamente as taxas de crescimento dos MTs proveniente do centrossoma iluminado com laser [88].

2. Materiais e métodos

2.1 Material Biológico

2.1.1 Estirpes Bacterianas

Para realização deste trabalho foi utilizado uma estirpe bacteriana de *Escherichia coli*, DH5 α para subclonagens de DNA.

2.1.2 Linhas celulares de celulares de mamíferos

A linha celular HeLa utilizada neste trabalho obtida na ATCC (American Type Culture Colletion) foi mantida segundo as condições descritas no ATCC. Resumidamente, as células foram cultivadas em meio Advanced-DMEM (GIBCO) suplementado com 4% FBS, 2mM de Glutamina (GIBCO) e Pen/Strep (GIBCO), e incubadas a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂. As culturas foram sub-divididas 1:8 a cada 2-3 dias (aproximadamente a 90% de confluência), utilizando tripsina para ressuspender as células.

2.1.3 Vectores

Utilizaram-se diferentes vectores consoante o objectivo das experiências.

vectores	descrição	fonte/referencia
pIC113	Expressão de GFP em HeLa	Cheeseman and Desai, 2005
pCRF58	Expressão em pIC113 de MOB4B RNAiR-GFP	Florindo & Tavares
pCRF59	Expressão em pIC113 de MOB4A RNAiR-GFP	Florindo & Tavares
pCRF25	Expressão em pIC113 de MOB4B-GFP	Florindo & Tavares
pCRF26	Expressão em pIC113 de MOB4A-GFP	Florindo & Tavares
pLJ223	Expressão de SNAP-tag	Lars Jansen
pGFS1	Expressão em pLJ223 SNAP-tag + linker flexível	Home made
	Expressão de SNAP-tag- γ -tubulina	Ian Ellenberg
	Expressão de SNAP-tag β -tubulina	Ian Ellenberg

Tabela 2. 1. Vectores utilizados

2.1.4. Oligonucleotídeos de RNA e DNA:

oligonucleotido	Sequência	RNA alvo
Oli 1	ACA CGC AGA AGC CAC ACU U dT dT	hsMOB4A
Oli 2	CAC CUC CUU UAA GCA CUU U dT dT	hsMOB4B
Oli 7	GGG UUG CAG UUA ACA CUG U tt	hsMOB4A
Oli 8	GAG UUU AAU CUG AUU GAU A tt	hsMOB4B

Tabela 2. 2. Oligonucleotídeos de siRNA.

oligonucleotido	Sequencia (5'-3')	Características e aplicação	Usado para:
InFGS_1(Mob4B)Dr	gatatcagtcgacggatccatgagcttctctc tcagcagccgc	Primer para Mob4B Directo; Locais de restrição: com duas fases de leitura diferentes EcoRV, BamHI e Sall Objectivo: Clonar pCRF58 (MOB4B RNAi R) em pFGS1	PCR
InFGS_2 (Mob4BRV)	gatatcgcggccgctcgattatctgtctttg atccaagtttc	Primer para Mob4B Reverso Locais de restrição: XhoI, NotI e EcoRV Objectivo: Clonar pCRf58 (MOB4B RNAi R) em pFGS1. A clonagem em pFGS1 é com restrição por PCR NotI/BAmHI.	PCR
InFGS_3 Mob4ADr	gat atc a gtc gac gga tcc atg agc tte ttg ttt ggt agt cgc	Primer para Mob4A Directo; Locais de restrição: com duas fases de leitura diferentes EcoRV, BamHI e Sall Objectivo: Clonar PCRf59 (MOB4A RNAi R) em pFGS1.	PCR
In_FGS4(Mob4ARv)	gat atc gcg gcc gct cga g tta tct gtc ttt tga ggt gag ttt	Primer para Mob4A Reverso Locais de restrição: XhoI, NotI e EcoRV Objectivo: Clonar pCRF 59 (MOB4A RNAi R) em pFGS1 A clonagem em pFGS1 é com restrição por PCR NotI/ BAmHI.	PCR
INCF80_(FlexLinker)Dr	ggt ggc gga ggg agt ggc ggg gga ggt agc ggg gga ggc ggt agt aag ctt g	Criar um linker flexível em pLJ223 e acrescentar a sequência de restrição de HindIII Linker a 5'pstI e a 3'BAmHI	Linker Fléxivel
INCF81_(FlexLinker)Rv	gatccaagcttactaccgctccccctac ctccccgccactccctccgcacctgca	Criar um linker flexível em pLJ223 e acrescentar a sequência de restrição de HindIII Linker a 5'pstI e a 3'BAmHI	Linker Fléxivel

Tabela 2. 3. Oligonucleotídeos de DNA.

2.1.5. Anticorpos

anticorpo	descrição	diluição	utilização	proveniência
GTU88	anti- γ -tubulina, mouse monoclonal	1/200-IF e 1/1000-WB	Imunofluorescência e <i>Western Blot</i>	Sigma-Aldrich
DM1A	anti- α -tubulina, mouse monoclonal	1/200	Imunofluorescencia	Sigma-Aldrich
TUB 2.1	anti- β -tubulina, mouse monoclonal	1/100	<i>Western Blot</i>	Sigma-Aldrich
Mob4	anti-Mob4	1/1000	<i>Western Blot</i>	In House
GFP	anti-GFP	1/250	<i>Western Blot</i>	In House
SNAP-tag	anti-SNAP, rabbit polyclonal	1/1000	<i>Western Blot</i>	New England Biolabs
A11032	goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa594	1/250	Imunofluorescência	
111-035-144	goat anti-rabbit IgG conjugado com HRP	1/5000	<i>Western Blot</i>	Jackson ImmunoResearch
115-035-146	goat anti-mouse IgG conjugado com HRP	1/1500	<i>Western Blot</i>	Jackson ImmunoResearch

Tabela 2. 4. Anticorpos primários e secundários utilizados.

2.2. Técnicas Variadas

2.2.1 Preparação de células competentes (*E.coli*) pelo método de CaCl_2

Durante trabalho esteve-se sempre condições de esterilidade e à chama.

Na preparação de células competentes (*E.coli*) pelo método de CaCl_2 começou por se fazer uma placa de LB (de isolamento (riscado), a partir de uma ansada de células congeladas em glicerol a -80°C ou de uma colónia isolada provenientes de outra placa. Incubou-se durante a noite a 37°C . No dia seguinte, inoculou-se uma colónia, crescida na placa do dia anterior, em 5 ml de meio LB líquido. Incubou-se a 37°C durante a noite com agitação. No seguinte dia, retirou-se uma ansada da suspensão celular anterior e fez-se uma nova placa de isolamento em meio LB + Agar. Incubou-se a placa durante a noite a 37°C . Inoculou-se uma colónia em 10ml de meio LB líquido e voltou-se a incubar durante a noite a 37°C com agitação. No dia seguinte, inoculou-se os 10ml da suspensão celular em 400ml de meio LB líquido e voltou-se a incubar a 37°C com agitação. Mediu-se a D.O. (Densidade Óptica) de meia em meia hora, até atingir 0,6-0,8. A quando nestes valores, no seu crescimento exponencial. Para a medição da D.O. utilizou-se o Nanodrop – *Cell Cultures*.

A partir destes passos, trabalhou-se sempre no gelo e com bastante rapidez. Os utensílios devem estar estéreis e frios.

Colocou-se a suspensão celular num frasco de centrífuga autoclavado e centrifugou-se durante 10 minutos a 5000 rpm a 4°C (Centrífuga tipo “Bekmann”). De seguida, deitou-se fora o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 80ml de CaCl_2 a 50mM. Deixou-se 30 minutos em gelo. Após esse tempo voltou-se a centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm a 4°C . Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 36ml de CaCl_2 15% glicerol. Seguidamente incubou-se as células durante 24 horas em gelo. Por último, dividiu-se a suspensão celular em *ependorfs* estéreis em alíquotas de 200 μl e congelou-se a -80°C .

2.2.2. Transformação de bactérias

Transformaram-se bactérias quimicamente competentes *Escherichia coli*, DH5a, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al: a 200 μl de bactérias adicionaram-se 100ng de DNA plasmídico. Incubou-se a mistura em gelo durante 20 minutos, seguida de choque térmico, durante 1 minuto a 42°C e incubou-se novamente em gelo durante 3 minutos. Após a recuperação em 400 μl de LB durante 30-60 minutos a 37°C . Plaqueram-se 50-100 μl de bactérias em meio selectivo (LB sólido suplementado com o antibiótico apropriado) e incubaram-se as placas a 37°C durante a noite.

2.2.3. Annealing dos oligonucleotidos para linker Fléxivel

Para a preparação do vector SNAP-tag começou-se por introduzir um linker flexível no vector pLJ223 (tabela 2.1.). Para a preparação do linker flexível fez-se o annealing dos oligonucleotidos InCF80 e InCF81 em solução de NaCl 3M. Colocou-se a mistura durante 3 minutos a 90°C e centrifugou-se 15 segundos à velocidade máxima e voltou-se a colocar a mistura 1 minuto no gelo. Por fim, incubou-se a 37°C durante uma hora.

2.2.4. Restrição enzimática e gel de agarose

Digeriu-se o plasmídeo pLJ223 com enzimas de restrição, 2µl de PSTI (NzyTech) e 2µl de BamHI (Promega) durante 3 horas a 37°C.

A confirmação da introdução do linker flexível foi feita por análise dos DNAs plasmídicos purificados através de reacção de restrição com a enzima HindIII (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram separados em geis de agarose 1% em TAE e corados com GreenSafe 3µl/100ml (Nyztech). Os clones positivos foram também confirmados por sequenciação.

2.2.5. Reacção de ligação

Procedeu-se á ligação entre o vector e o linker fléxivel utilizando T4 DNA ligase (Thermo Sientific), conforme as instruções do fabricante.

2.2.6. Preparação de DNA plasmídico

Para a análise dos clones, inocularam-se cada uma das colónias em 5ml de meio de cultura (LB contendo o antibiótico apropriado) e deixou-se crescer durante a noite a 37°C a 200 rpm. O DNA plasmídico foi extraído e purificado com algumas modificações no protocolo de acordo com o protocolo de lise alcalina descrito em Sambrook et al. Resumidamente, sedimentou-se a cultura por centrifugação a 4000 xg durante 5 minutos, e ressuspendeu-se o *pellet* em 50µl de solução I (10mM EDTA e 25 mM Tris-HCL pH8). A lise foi feita adicionando 200 µl da solução II (10% NaOH 2M, 10% de SDS) seguida de neutralização com 150µl da solução III (KAc 5M e H₂O). Após centrifugação à velocidade máxima, precipitou-se o DNA presente no sobrenadante através da adição de 1 ml de Etanol absoluto e centrifugação durante 15 minutos a velocidade máxima. Lavou-se o *pellet* com Etanol a 70% e ressuspendeu-se em ddH₂O.

Para extração de DNA plasmídico mais puro utilizou-se o Quia-Prep spin Miniprep Kit (Quiagen #27106).

2.2.7. Reações de polimerização em cadeia (PCR)

Para extracções de DNA plasmídico de géis de agarose utilizou-se o kit “*QIAEX II Agarose Gel Extration protocolo*” da Quiagen.

Para amplificação de fragmentos de DNA, realizaram-se reacções de PCR utilizando 100ng de DNA, 10 μ M de primer, 10X Buffer de PCR (100mM Tris-HCL pH8,3 15mM de MgCl² e 500mM de KCL), 8mM dNTPs e Taq Polimerase (5u/50 μ l) (Fermentas), para um volume final de 50 μ l. As condições da reacção foram as seguintes: 1) desnaturação inicial de 5 min a 95°C; 2) 35 ciclos com desnaturação a 95°C durante 45 segundos, *annealing* a 55°C durante 35 segundos e extensão a 70°C durante 60 segundos; 3) extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os oligonucleotidos utilizados encontram-se descritos na tabela 2.3.

2.2.8. Electroforese de Proteínas e *Western Blot*

2.2.8.1 Electroforese de proteínas

Para preparação das amostras as células foram lavadas com PBS 1X e fizeram-se extractos totais de células. Centrifugou-se os extratos durante 5 minutos a 2000rpm. Descartou-se o sobrenadante e congelou-se o pellet a -20°C. Antes de serem coladas as amostras em gel, ressuspendeu-se o pellet em *loading buffer* (200mM Tris-HCL pH8, 8% SDS, 0,4% azul bromofenol, 40% glicerol e 400mM β -Mercaptoetanol). Para colocação das amostras no gel desnaturou-se a 100°C durante 5 minutos cada uma.

Para a separação de proteínas de acordo com o seu peso molecular, realizou-se uma electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1970). Para a preparação do gel de resolução (pH 8,8) utilizaram-se os seguintes componentes: 10% (v/v) de acrilamida *stock* (Bio-Rad), 375 mM de Tris-HCl, 0,1% (m/v) de SDS, 0,05% (m/v) de persulfato de amónia (PSA) e 0,033% (v/v) de *N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine* (TEMED). Para o gel de concentração (pH 6,8) utilizou-se: 5% (v/v) de acrilamida *stock*, 125 mM Tris-HCl, 0,1% (m/v) de SDS, 0,05% (m/v) de PSA e 0,167% (v/v) TEMED.

As electroforeses foram realizadas no sistema Mini-PROTEAN III (BioRad) em *running buffer* (25mM Tris, 0,192 glicina, 0,1% SDS, pH 8,3), a uma corrente eléctrica de 30mA no gel de concentração e 50mA no gel de resolução.

2.2.8.2. Western Blot

Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (*polyvinylidene fluoride*; 0,45 µm) (GE Healthcare) previamente hidratada em 1 minuto em metanol 5 minutos em H₂O e equilibrada em tampão de transferência durante 10 minutos (25mM de Tris-HCL, 192 mM de Glicina, 20% de Metanol, pH 8-8,3) utilizando o sistema *wet-blotting* (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1 hora a 200mA ou 30mA durante a noite (14-16 horas).

Para detecção de proteínas nas membranas utilizaram-se anticorpos primários e anticorpos secundários descritos na tabela 2.4. Resumidamente, incubaram-se as membranas em solução de bloqueio (TBS, 0,1% Tween20 (TBS-T)), contendo 10% de leite magro) durante 1 hora (temperatura ambiente), lavaram-se 1X com TBS-T contendo 1% de leite magro e incubaram-se com o anticorpo primário durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3 vezes durante 5 minutos com TBS-T contendo 1% de leite magro e incubadas com anticorpo secundário durante uma hora. Todos os anticorpos foram diluídos na solução de TBS-T a 1% de leite magro. Lavaram-se novamente as membranas 3 vezes durante 5 minutos com TBS-T contendo 1% de leite magro e uma vez com TBS durante 10 minutos. Para detecção adicionou-se 1ml de uma solução contendo o substrato da peroxidase (ECL – Solução I (1M Tris pH 8,5, 250mM luminol (*3-aminophthalhydrazid*) em DMSO e 90mM *p-coumaric acid* em DMSO e 1ml da Solução II – (1M Tris pH8,5, H₂O e 30% H₂O₂) e procedeu-se à exposição e revelação dos filmes fotográficos.

2.2.8.3. Remoção de anticorpos em membrana

Os anticorpos ligados às membranas de PVDF foram removidos através do stripping com glicina e stripping com β-Mercaptoetanol.

2.2.8.3.1. Remoção de anticorpos com Glicina

Incubaram-se as membranas com a solução de stripping (glicina 2M, 1%SDS e H₂O pH 2,6) durante 1 h em agitação, à temperatura ambiente, seguida lavagens de 3X5 minutos em TBS.

2.2.8.3.2 Remoção de anticorpos com β-mercaptoetanol

As incubações foram feitas em solução de stripping (62,5 mM Tris-HCl, 100 mM β-mercaptoetanol, 2% SDS e H₂O pH 6,8) durante 30 minutos a 50°C com agitação e de seguida lavou-se 6 X 5 minutos com TBS-T.

2.3. Manipulação de células de mamífero

2.3.1. Sincronização de células

Para o estudo das células em mitose, as culturas foram sincronizadas em fase G1/S através de um duplo bloqueio com timidina (2.5mM). Para tal, bloqueou-se as células com timidina durante 24h, após esse tempo libertou-se as células lavando-as 3X com PBS 1X (*phosphate buffered saline*), pH 7,4 (137mM NaCl, 1,5mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 2,7mM KCl). As células foram incubadas com meio sem timidina. Após 12h voltou a bloquear-se as células com timidina durante 24horas. Após esse tempo, libertaram-se as células lavando-as novamente com PBS 1X. Após 8-10horas as células encontravam-se em mitose, e foram fixadas para estudos de imunofluorescência.

2.3.2. Transfecções

As células foram semeadas com as densidades de 3×10^4 e 4×10^4 células/poço em placas de 24 e 12 poços respectivamente, no dia anterior à transfecção. As células HeLa foram transfectadas utilizando o reagente Lipofectamine2000 (Life technologies), com algumas variações das instruções do fabricante. As células foram transfectadas 14-16 horas após serem semeadas foram transfectadas com DNA plasmídico ou siRNAs (ver tabela 2.1. e tabelas 2.2.).

2.3.2.1 Transfecções de DNA plasmídico

Nas transfecções com DNA plasmídico, em *ependorfs* separados misturou-se 1µg de DNA em 50 µl de meio sem soro e 1 µl de lipopfectamina 2000 em 50µl de meio sem soro durante 3 minutos, de seguida juntaram-se as misturas durante 20 minutos, num volume final de 100 µl. Após esse tempo, os 100 µl foram adicionados às células, após a troca de meio completo por meio sem soro das mesmas. As células foram incubadas a 37°C/5%CO₂, durante 2 horas e 30 minutos, período após o qual se voltou a repor o meio de cultura completo. As células foram analisadas 24h após a transfecção.

2.3.2.2 Transfecções de siRNAs

No caso dos siRNAs misturaram-se 3µl do reagente de transfecção com 50µl de meio sem soro e misturaram-se 20 nM de cada dúplex de siRNA 50µl de meio sem soro. Juntaram-se as misturas e, as mesmas foram incubadas durante 20 minutos, e adicionadas às células após troca de meio completo por meio sem soro. As células foram incubadas a

37°C/5%CO₂, durante 2 horas e 30 minutos, período após o qual se voltou a repor o meio de cultura completo. As células foram analisadas 24, 48 e 72 horas após as transfecções.

2.3.3. Selecção de clones para criação de linha estável

A selecção de clones resistentes à geneticina foi realizada no decurso deste trabalho. Resumidamente, após a transfecção do DNA colocaram-se as células em meio com geneticina (250µg/ml). Após essa transfecção e feitas várias diluições em placas de cultura em Advanced-DMEM com geneticina os vários clones foram isolados e expandidos individualmente. Para isolar cada clone colocou-se uma ponta de pipeta cortada com a base coberta de vaselina, para de seguida se colocar tripsina durante 5 minutos. Após esse tempo, colocou-se meio em cada ponta (que está a isolar o clone), ressupendeu-se e colocou-se num poço, contendo meio com geneticina, de uma placa de 24 alvéolos.

2.3.4. Análise da eficiência aos oligonucleotídeos de RNA do hsMOB4A e B

Para análise da resistência e sensibilidade aos oligonucleotídeos específicos de RNA do hsMOB4A e hsMOB4B, primeiramente transfectaram-se os DNAs plasmídicos GFP.hsMOB4A, GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi, GFP.hsMOB4B e GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi, separadamente. De seguida foram transfectados os oligonucleotídeos respectivos (ver tabela 2.2.). Procedeu-se à contagem do número de células fluorescentes em quatro zonas previamente delimitadas da placa de cultura (estas definiram-se antes do início da experiência, por marcação da placa de cultura de células). Este processo foi repetido durante 4 dias, sempre à mesma hora. Antes de cada contagem foi substituído o meio de cultura para remover as células mortas.

2.4. Técnicas Citológicas

2.4.1. Imunofluorescência

Para estudos de imunofluorescência, as células foram semeadas 4×10^4 células/poço em placas de 12 poços e transfectadas com GFP.MOB4A RNAiR e GFP.MOB4B RNAiR (ver tabela 2.1.). No dia seguinte, as células foram fixadas. Utilizaram-se dois métodos diferentes para a fixação metanol/acetona ou paraformaldeído.

2.4.1.1. Fixação com Metanol/Acetona

Neste caso, lavaram-se as células com PEM (10mM PIPES, 2 mM MgCl₂ e 5mM de EDTA, pH 6,8) e incubaram-se durante 2 minutos à temperatura ambiente com uma solução de Metanol/Acetona (50/50), preparada de fresco e previamente refrigerada a -20°C. Lavaram-se as células (2X5 minutos) com PEM,

Permeabilizaram-se com 0,5% de TritonX-100 em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, lavaram-se as células 3X durante 5 minutos com PBS e 1 X durante 5 minutos com PBS.

Para a imunofluorescência, os anticorpos foram diluídos em ADB (PBS contendo 1% FBS e 0,05% de Tween-20). Incubaram-se as células com os anticorpos primários durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida e escura. De seguida, fizeram-se três lavagens de 5 minutos com PBS e uma lavagem de 5 minutos com PBS contendo 0,05% de Tween-20. Seguidamente, incubaram-se as células durante 30 minutos com os anticorpos secundários, em câmara húmida e escura. Após esta incubação, as células foram lavadas tal como descritas após a incubação dos anticorpos primários. Posteriormente incubaram-se as células durante 15 minutos com DAPI (Life Technologies) e lavaram-se 3X durante 5 minutos com PBS. Por último, montaram-se as células em lâminas de vidro com Moiwol, tendo-se selado a preparação com verniz transparente.

Todos os anticorpos utilizados nestes ensaios, bem como as suas diluições encontram-se descritos na tabela 2.4.

Preparação do Moiwol: Para a preparação de Moiwol foram diluídas 2,4g de Moiwol em 6ml de glicerol e misturados com agitação. Seguidamente adicionou-se 6 ml de H₂O e deixou-se a agitar durante a noite. No dia seguinte, juntou-se 12ml de tampão 0,2 M Tris a pH 7,4 e aqueceu-se a 50°C com agitação moderada durante 10 minutos. De seguida, centrifugou-se a 5000g durante 15 minutos. Por último, adicionou-se DABCO (SIGMA) para uma concentração final de 2,4%. A solução foi alíquotada e posta a -20°C. Uma vez descongelada a alíquota deverá ser mantida a 4°C.

2.4.1.2. Fixação com Paraformaldeído

No segundo método de fixação, lavaram-se as células com PEM contendo 30% de glicerol. O paraformaldeído foi diluído 3,7% PEM, aquecido a 38°C e adicionado às células durante 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas 3X durante 5 minutos

com PEM contendo 30% de glicerol. O restante protocolo foi executado como descrito na fixação com Metanol/Acetona.

2.4.2. Marcação de proteínas com SNAP-Cell Fluoresceína

Para marcação das células com SNAP-Cell Fluoresceína (New England BioLabs) semearam-se no dia anterior 4×10^4 células/poço em placas de 24 poços das linhas celulares β -tubulina-SNAP-tag e γ -tubulina-SNAP-tag. No dia seguinte, preparou-se meio de cultura com $2 \mu\text{M}$ de SNAP-Cell Fluoresceína e centrifugou-se durante 5 minutos a $1600 \times g$ à temperatura ambiente. Aspirou-se o meio de cultura das células semeadas e adicionaram-se $65 \mu\text{l}$ /poço do meio com SNAP-Cell Fluoresceína. Incubou-se durante 15 minutos a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ e de seguida lavaram-se as células 3x com PBS. Adicionou-se novamente o meio de cultura e incubou-se durante 30 minutos a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Montaram-se as amostras em PBS e observou-se ao microscópio.

3. Resultados e Discussão

Existem vários exemplos de proteínas que são activadas apenas quando correctamente localizadas nas células e, como tal, a localização celular de uma proteína pode fornecer pistas sobre a sua possível função e sobre possíveis parceiros moleculares.

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostram que a hsMOB4A e a hsMOB4B estão localizadas nos centrossomas, mais propriamente entre os centríolos e no *midbody*. Sabe-se também que com a depleção destas proteínas as células falham o processo da abscisão e têm um aumento da sua mobilidade [60].

Dado já se saber que tanto os centrossomas como os *midbodies* são essenciais para a citocinese, neste estudo decidiu usar-se uma técnica que permitisse inactivar localmente e espacialmente uma proteína de interesse, para perceber de que estrutura viria o sinal para que o processo da abscisão ocorresse correctamente. A técnica em questão denomina-se a *Chromophore Assisted Laser Inactivation* (CALI).

Para realizar a técnica referida CALI com hsMOB4A e hsMOB4B, em trabalhos anteriores realizados por Cláudia Florindo, as regiões codificantes de hsMOB4A e hsMOB4B foram clonadas em vectores de expressão em células de mamíferos, que possibilitam a produção de proteínas de fusão com GFP. De seguida, foram criadas mutações pontuais na regiões codificantes de cada hs.MOB4 de modo a que os produtos resultantes da expressão (mRNA) fossem resistentes aos oligonucleotidos de RNA desenhados nessa zona de mutações. Mais concretamente as resistências introduzidas são fundamentais porque permitem a depleção das hs.MOB4 endógenas e simultaneamente a manutenção da hsMOB4A resistente ao RNAi e da hsMOB4B resistente ao RNAi.

Será necessário introduzir hsMOB4A e hsMOB4B resistentes ao RNAi no vector do SNAP-tag para futuros ensaios de CALI. Então para se poder produzir linhas estáveis a expressar SNAP-tag-hsMOB4A resistente ao RNAi e SNAP-tag-hsMOB4B resistentes ao RNAi (para futuros ensaios de CALI), teve que se garantir que a hs.MOB4A e a hs.MOB4B com mutações pontuais eram resistentes aos oligonucleotidos de RNA desejados e sensíveis aos oligonucleotidos desejados. Teve também que se garantir que as mutações pontuais não afectavam a sua localização, confirmou-se também a expressão destas proteínas por *western blot*. De seguida apresentam-se os resultados referentes a essa caracterização.

3.1. Caracterização das proteínas de fusão GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B Resistentes ao RNAi

O nosso laboratório tinha previamente construídos clones que expressam GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi e já tinham sido sequenciados até então. No entanto, mais controlos eram necessários para garantir que estas mutações pontuais não alteravam as estruturas e funções da hsMOB4A e hsMOB4B resistentes ao RNAi.

Iniciamos então os nossos estudos para confirmar que as mutações pontuais introduzidas não alteravam qualquer tipo de localização e função, dos clones GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi. Começámos por confirmar por *western blot*, seguido de imunolocalização e por último ensaios de RNAi para verificar a resistência e sensibilidade a oligonucleotídeos específicos.

3.1.1. Western Blot

Para verificar se as proteínas codificadas pelos clones GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi apresentavam as mesmas massas moleculares que os clones sem as mutações pontuais inseridas, realizaram-se dois *westerns Blot*, com extratos de células HeLa transfectadas com pCRF58 (GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi) e pCRF59 (GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi) e, como controlo, extratos de células HeLa e extratos de células transfectadas com pIC113 (GFP). As massas moleculares esperadas seriam de ~25kDa para as proteínas hsMOB4A e hsMOB4B endógenas, ~50kDa para a proteína de fusão GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi e 25 kDa para GFP. De acordo com os resultados obtidos, identificaram-se por *western blot* proteínas cujas bandas correspondiam aos tamanhos esperados, confirmando-se que o anticorpo anti-MOB reconhecia a proteína GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi (Fig. 3.1.) resultante da expressão do vector de fusão.

Simultaneamente, a partir das mesmas amostras, identificou-se com o anticorpo anti-GFP uma proteína exactamente com o mesmo tamanho esperado para proteína de fusão GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi (Fig. 3.1.).

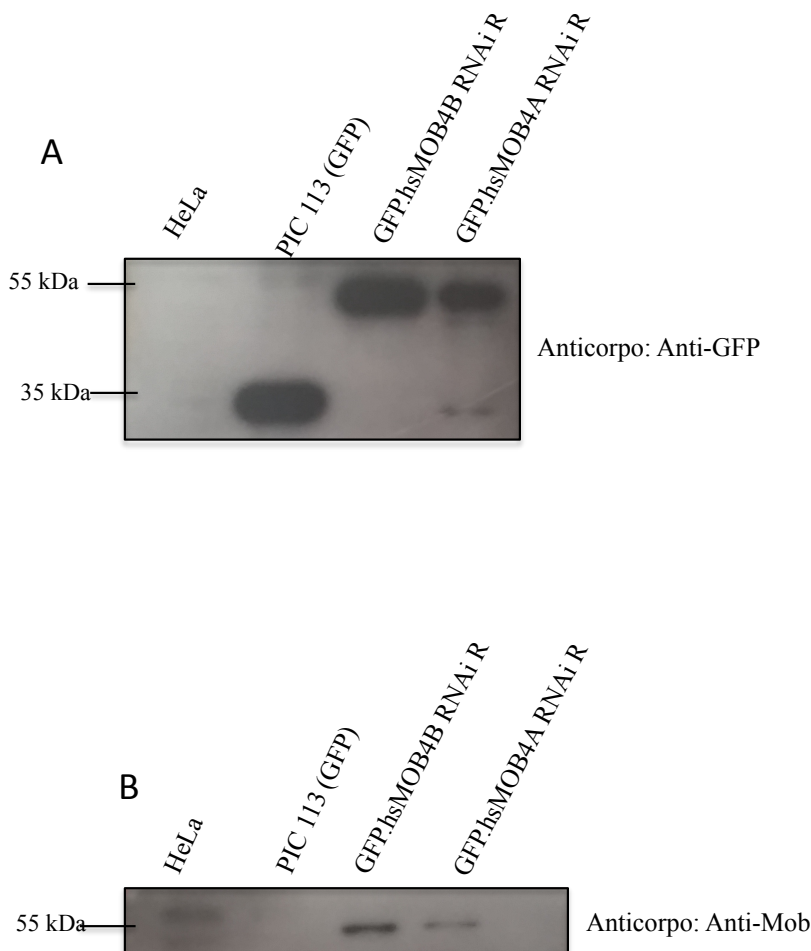


Fig. 3. 1. GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR apresentam o peso molecular esperado por *Western Blot*. Foram analisados extratos de células HeLa transfectadas com GFP.hsMOB4A RNAi R e GFP.hsMOB4B RNAiR, como controlo foram usadas células HeLa e células HeLa transfectadas com GFP (pIC113). A) Incubação com anticorpo Anti-GFP que se observa a expressão da proteína GFP com cerca de 27kDa e as proteínas de fusão GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR com ~55kDa, que corresponde ao tamanho do GFP (~27kDa) mais o tamanho do hsMOB4 (~25kDa). B) Incubação com o anticorpo anti-MOB em que se observa a expressão da proteína de fusão GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR com cerca de ~55kDa. WB realizado em colaboração com Cláudia Florindo.

Estes resultados confirmaram que os clones GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi estão a expressar exactamente a mesma massa molecular que os clones sem as mutações pontuais inseridas, confirmando os resultados obtidos anteriormente por sequenciação e permitindo-nos concluir que as mutações pontuais não causaram nenhuma alteração nas nossas proteínas, dando-nos uma segurança para a sua utilização em futuros ensaios. Este *western blot* foi realizado em colaboração com a Cláudia Florindo.

3.1.2. Imunolocalização

Para confirmar se as proteínas resultantes da expressão destes vectores GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi tinham a mesma localização que os

clones onde não foram inseridas essas mesmas mutações pontuais, GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B, respectivamente, realizou-se a técnica de imunofluorescência em células HeLa transfectadas com GFP (pIC113-controlo) e em células HeLa transfectadas com pCRF58 (GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi) e pCRF59 (GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi). Nestas células, utilizaram-se dois anticorpos para detectar α -tubulina (DM1A), γ -tubulina (GTU88) e DAPI para marcar DNA genómico.

Pela análise da fig. 3.2. percebe-se que tanto a GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi como a GFP.MOB4B resistente ao RNAi nas células em interfase se acumulam nos centrossomas como indicado pelas setas. Nas células em interfase, é possível observar na fig. 3.2. (Painel E e I) que há uma acumulação mais acentuada num centrossoma do que noutra.

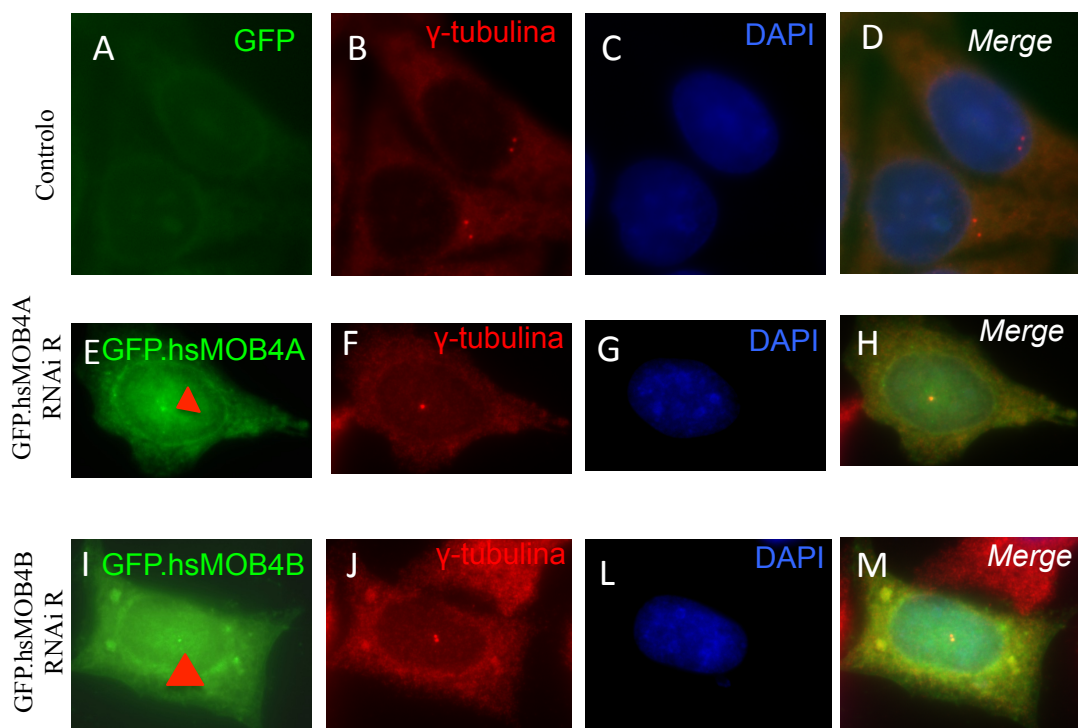


Fig. 3. 2. GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR em interfase localizam nos centrossomas. Painéis A,B,C e D representam células HeLa (controlo) analisadas por imunofluorescência marcadas GFP (verde), anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis E, F, G e H está representado células HeLa transfectada com GFP.hsMOB4A RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis I, J, L e H está representada HeLa transfectada com GFP.hsMOB4B RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Comparando os painéis A (controlo) com E e I pode-se perceber que há uma marcação nos centrossomas, tanto com GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR que não se apresenta no controlo.

Em telofase/citocinese estas proteínas localizam-se no *midbody*, tal como indicado pelas setas na fig. 3.3. (Painéis E e I).

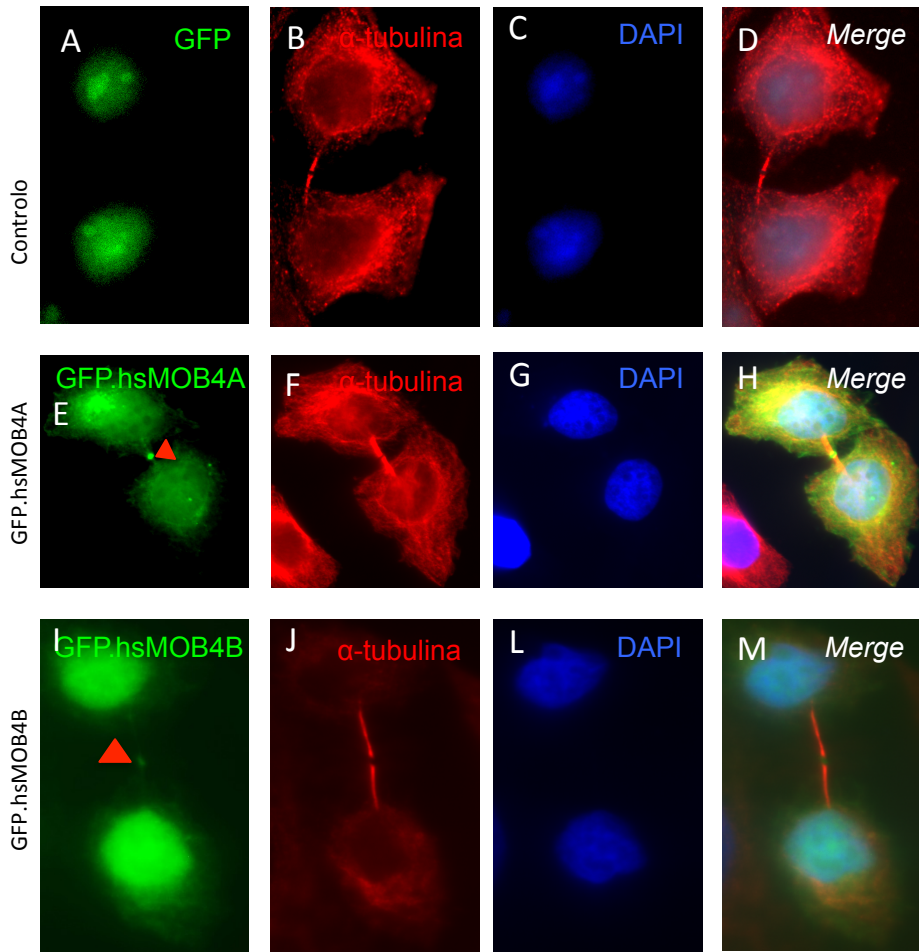


Fig. 3.3. GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR localizam no *midbody* em telofase/citocinese. Painéis A,B,C e D representam células HeLa (controle) analisadas por imunofluorescência marcadas GFP (verde), anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis E, F, G e H está representado células HeLa transfectada com GFP.hsMOB4A RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis I, J, L e H está representada HeLa transfectada com GFP.hsMOB4B RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Comparando os painéis A (controle) com E e I pode-se perceber que há uma marcação no *midbody*, tanto com GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR que não se apresenta no controle.

Em metafase, tanto GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi, acumulam-se também, tal como nas células em interfase, nos centrossomas (Fig. 3.4., painéis E e I). Nestas últimas, as proteínas de fusão também se localizam sobre o fuso mitótico (Painéis I e N).

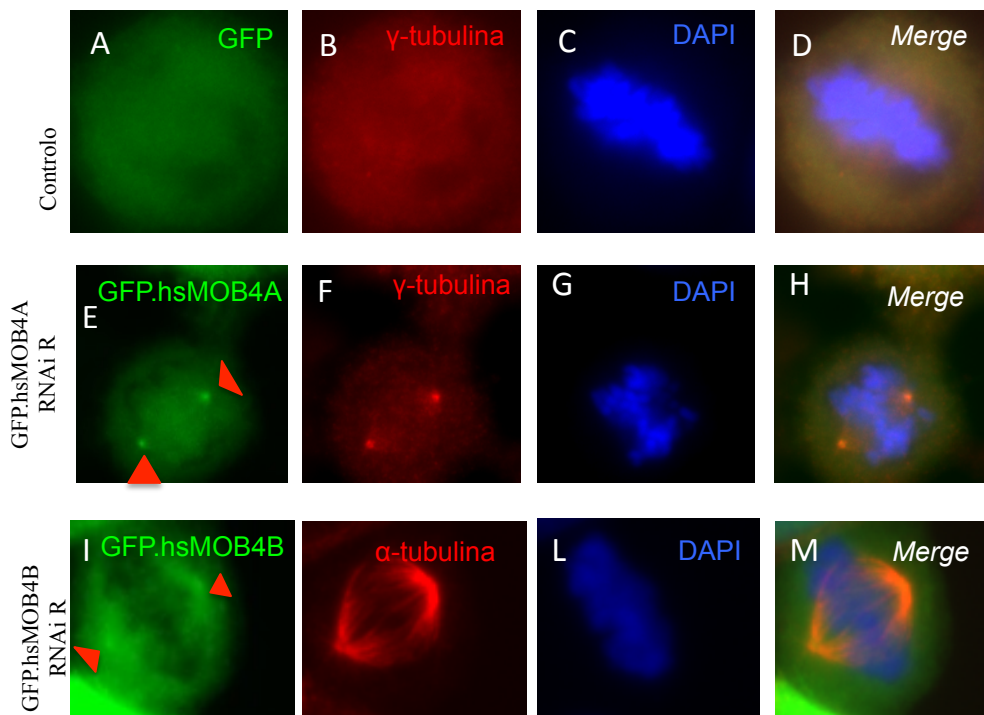


Fig. 3. 4. GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR localizam nos centrosomas e sobre o fuso em metafase. Painéis A,B,C e D representam células HeLa (controle) analisadas por imunofluorescência marcadas GFP (verde), anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis E, F, G e H está representado células HeLa transfectada com GFP.hsMOB4A RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Nos painéis I, J, L e H está representada HeLa transfectada com GFP.hsMOB4B RNAiR marcado a verde analisadas por imunofluorescência com anti- γ -tubulina-Alexa 594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). Comparando os painéis A (controle) com E e I pode-se perceber que há uma marcação nos centrosomas, tanto com GFP.hsMOB4A RNAiR e GFP.hsMOB4B RNAiR que não se apresenta no controle. Nos painéis N, O, P e Q está representada em metafase uma células HeLa transfectada com GFP.hsMOB4B RNAiR (Verde), anti- α -tubulina-Alexa594 (vermelho), DNA marcado com DAPI (Azul). No painel N pode-se observar uma marcação obvia dos microtubulos que nunca foi encontrada no controle.

Dado a imagem da fig. 3.5. (Painel A) em que mostra uma marcação clara dos microtúbulos, teve que se confirmar esse resultado, pois não seria o esperado, dado que o suposto seria apenas uma marcação apenas sobre o fuso. Para tal, foram transfectadas células com GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi R e fixaram-se as células do mesmo modo (PFA 3,7%) mas não se as marcou células com α -tubulina. Os resultados das imagens da fig. 3.5. Painel E, mostra que a marcação evidente dos microtúbulos é um artefacto, que pode ser explicado por uma passagem de sinal de um canal para outro (vermelho para o verde) . Na figura 3.5 (Painel A, D e G), foi possível verificar que há apenas uma acumulação sobre o fuso, tal como já tinha sido mostrado anteriormente no nosso grupo. Além disso, nestas imagens também se pôde observar que há uma marcação dos cinetocoros, tal como mostrado em resultados anteriores do grupo.

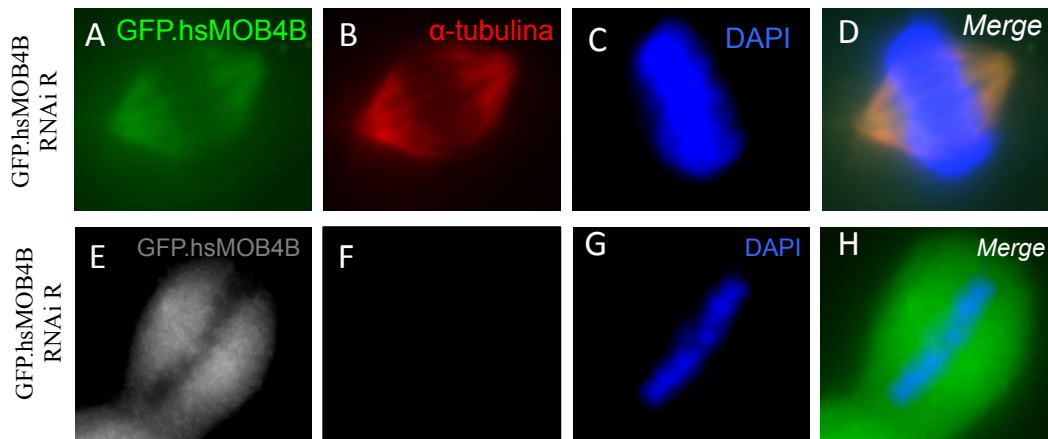


Fig. 3. 5. GFP.hsMOB4B RNAiR localiza sobre o fuso em metafase. Painéis A, B, C e D: Localização da proteína de fusão GFP.hsMOB4B RNAiR. Transfectaram-se células HeLa com o clone PCRF58 e analisou-se o resultado por imunofluorescência. Observou-se uma marcação clara dos microtúbulos. Painéis E, F, G e H: Localização da proteína de fusão GFP.hsMOB4B RNAiR. Transfectaram-se células HeLa com o clone PCRF58 e analisou-se o resultado por imunofluorescência, mas sem usar anticorpo para a α -tubulina. A cinzento apresentam-se a proteína de fusão e a azul corado com DAPI o DNA. Localização de GFP.hsMOB4B em metafase é apenas sobre o fuso e não nos microtúbulos como indicava a imagem do A desta mesma figura.

Os resultados aqui obtidos sugerem que GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes aos RNAi acumulam exactamente nas estruturas esperadas, isto é, acumula-se nos centrossomas, *spindle midzone* e no *midbody*.

Resultados anteriores do nosso grupo mostram que a hsMOB4A e a hsMOB4B em telofase tardia localizam-se no *midbody* e em um dos centríolos de cada par, que se sabe ser no centríolo mãe [60]. Ou seja, durante todo o ciclo celular a hsMOB4A e hsMOB4B localizam-se entre os centríolos, excepto em telofase, quando há a separação dos centríolos, durante esta fase hsMOB4 acumulam-se no centríolo mãe até que ocorra a citocinese [60].

Qual o interesse de hsMOB4 se situar nos centrossomas? Dr. Rieder apresentou um estudo onde demonstrava que as células acentrossomais, têm problemas em assegurar a fidelidade da citocinese, 50% falham a mesma e não conseguem iniciar o ciclo celular seguinte, parando antes de se iniciar o seguinte ciclo celular [51]. Como referido, a hipótese de que os centrossomas suportam um papel bastante importante na citocinese já é bastante antiga, tendo sido inicialmente proposta por Rappaport na sequência dos resultados obtidos pelas suas experiências com ovos de invertebrados marítimos [52].

Sabe-se que depletar a hsMOB4A e a hsMOB4B em células humanas, estas permanecem ligadas durante mais tempo (~17h) que células controlo (~4h) por uma ponte citoplasmática que contem o *midbody*, falhando a citocinese, que têm uma mobilidade bastante aumentada e que há separação dos centríolos [60]. A depleção da hsMOB4A e da hsMOB4B, em simultâneo, inibe a remoção de microtúbulos localizados no *midbody*, remoção essa que é necessária para permitir a fusão da membrana e abscisão [60].

Actualmente, não está claro se a divisão dos centríolos, falha na abscisão e hiper mobilidade de células depletadas da hsMOB4A e hsMOB4B são todas consequências da estabilidade alterada dos microtúbulos ou reflectem diferentes funções de hsMOB4A e hsMOB4B [60].

Em resumo, sabe-se então que hsMOB4A e hsMOB4B têm um papel importante na citocinese e que se acumulam em duas estruturas importantes para que esta ocorra. No entanto, não se sabe de qual das estruturas, ou se até mesmo das duas, é proveniente o sinal do hsMOB4 para que haja o evento final da citocinese, a abscisão.

Com estes ensaios de imunolocalização, podemos garantir que as mutações pontuais criadas tanto em hsMOB4A e hsMOB4B, não interferem na sua localização, dando nos assim maior segurança para iniciarmos ensaios de CALI.

3.2. Confirmação da especificidade dos oligonucleotidos para hsMOB4A RNAiR e hsMOB4B RNAiR

O objectivo destes ensaios foi comprovar que os vectores que codificam as proteínas de fusão GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi (PCRF59 e PCRF58, respectivamente) eram resistentes aos oligonucleotidos anteriormente desenhados contra o mRNA das GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B (PCRF26 e PCRF25, respectivamente) e sensíveis a outros oligonucleotidos.

Para futura realização de ensaios de CALI com hsMOB4A e hsMOB4B têm de ser produzidas duas linhas estáveis, uma expressar SNAP-tag-hsMOB4A e, outra a expressar SNAP-tag-hsMOB4B, ambas resistentes ao RNAi. Como descrito anteriormente, no nosso grupo já tinham sido previamente introduzidas mutações pontuais na sequência codificante tanto, do hsMOB4A, como do hsMOB4B que conferissem resistência aos oligonucleotidos específicos. Caso ao realizar CALI em células destas linhas não se observe fenótipo de inactivação das nossas proteínas de interesse, hsMOB4A e hsMOB4B, será necessário realizar RNAi de modo a depletar o hsMOB4A e hsMOB4B endógeno.

Mesmo possuindo um elevado grau de homologia ao nível do cDNA, as sequências das proteínas hsMOB4A e hsMOB4B divergem essencialmente no 3º codão e não existem sequências de mais de 21 nucleótidos que sejam iguais.

Considerando isto, no nosso laboratório foram desenhados previamente os oligonucleotidos específicos para cada hsMOB4. Usaram-se então 4 oligonucleotidos distintos: i) o oligonucleotido 1, desenhado contra hsMOB4A (pCRF26), na zona onde foram inseridas as mutações pontuais no hsMOB4A resistente ao RNAi (pCRF59) – o mRNA

deverá ser resistente; ii) o oligonucleotido 7, desenhado contra o hsMOB4A, fora do local onde foram inseridas as mutações pontuais do GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi – o mRNA deverá ser sensível; iii) o oligonucleotido 2, desenhado contra o GFP.hsMOB4B (pCRF25), na zona onde foram inseridas as mutações pontuais no GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi (pCRF58) – o mRNA deverá ser resistente; iv) o oligonucleotido 8, desenhado contra o hsMOB4B, fora do local onde foram inseridas as mutações pontuais no hsMOB4B resistente ao RNAi – o mRNA deverá ser sensível (Fig. 3.6.).

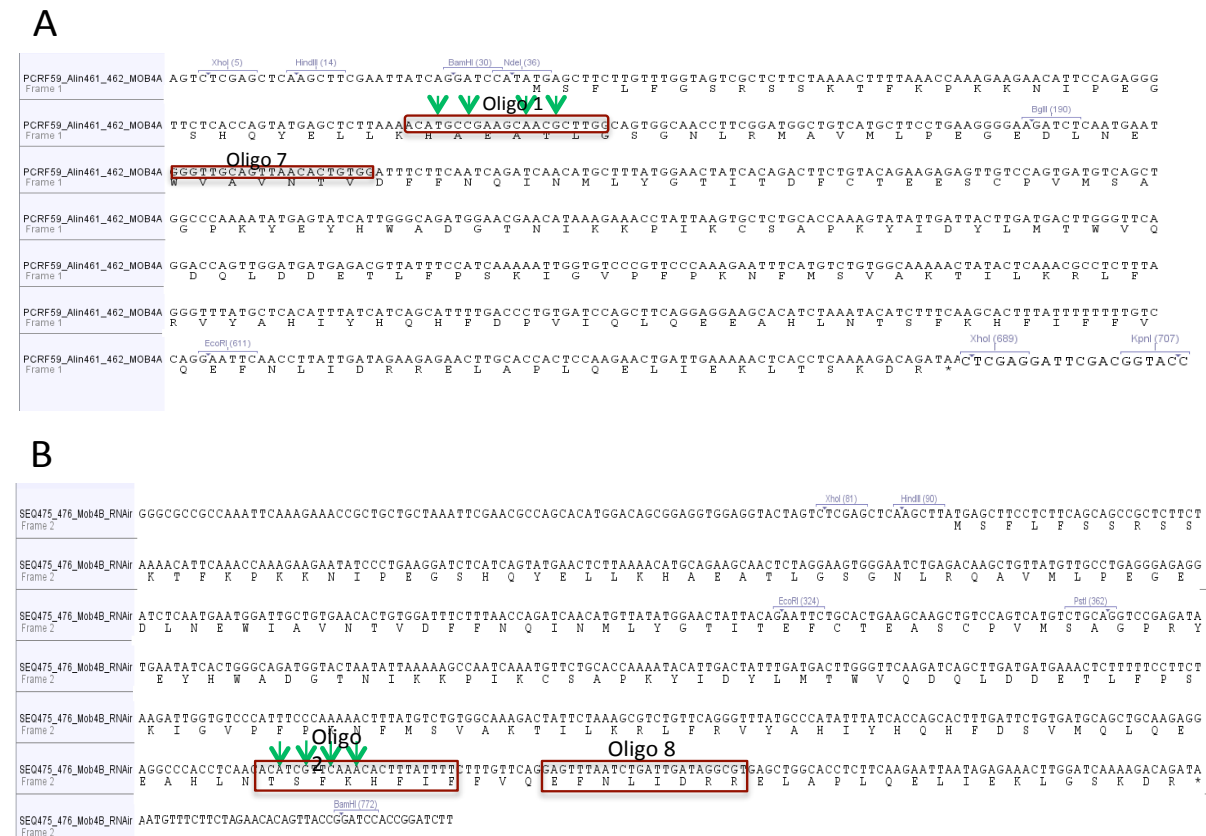


Fig. 3. 6. Sequência de hsMOB4A RNAiR e hsMOB4B RNAiR. **A)** Sequência do hsMOB4A RNAiR, com a mutações pontuais que lhe confere resistência ao oligonucleotido 1 que está indicado na figura e sensibilidade ao oligo 7 indicado também na figura. **B)** Sequência do hsMOB4B RNAiR, com a mutações pontuais que lhe confere resistência ao oligonucleotido 2 que está indicado na figura e sensibilidade ao oligonucleotido 8 indicado também na figura. Imagens de Cláudia Florindo

Pode-se observar esquematicamente a experiencia executada e quais os resultados esperados para estes testes (Fig. 3.7.).

A

	Sem oligo		Oligo 1 (Resistente)		Oligo7(Sensível)	
GFP.hsMOB4A	X			X		X
GFP.hsMOB4A RNAiR	X		X			X
	Verde	Não Verde	Verde	Não verde	Verde	Não verde

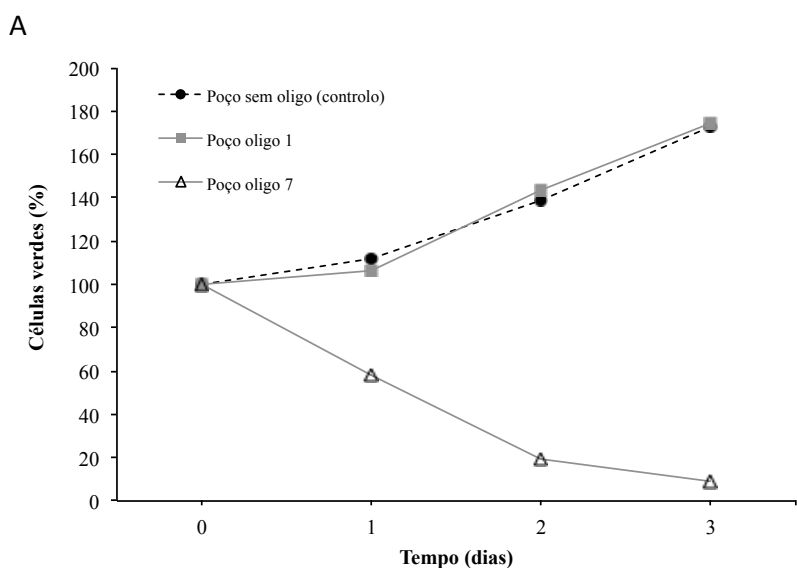
B

	Sem oligo		Oligo 2 (Resistente)		Oligo8 (Sensível)	
GFP.hsMOB4B	X			X		X
GFP.hsMOB4B RNAiR	X		X			X
	Verde	Não Verde	Verde	Não verde	Verde	Não verde

Fig. 3. 7. Representação esquemática da experiência de RNAi. **A)** Espera-se que ao transfectar as células HeLa com GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4A RNAiR e sem transfecção de nenhum oligonucleotido, o número de células verdes (através de fluorescência pelo GFP) continue a aumentar ao longo dos dias. Transfectando os mesmo DNAs e com transfecção do oligonucleotido 1 que apenas o GFP.hsMOB4A RNAiR continue a aumentar o número de células verdes, dado ser resistente a este oligonucleotido. Já com o oligonucleotido 7 espera-se que tanto o GFP.hsMOB4A, como o hsMOB4A RNAiR, diminuam o número de células verdes, dado serem os dois sensíveis a este oligonucleotido. **B)** Espera-se que ao transfectar as células HeLa com GFP.hsMOB4B e GFP.hsMOB4B RNAiR e sem transfecção de nenhum oligonucleotido, o número de células verdes (através de fluorescência pelo GFP) continue a aumentar ao longo dos dias. Transfectando os mesmo DNAs e com transfecção do oligonucleotido 2 que apenas o GFP.hsMOB4B RNAiR continue a aumentar o número de células verdes, dado ser resistente a este oligonucleotido. Já com o oligonucleotido 8 espera-se que ambos os DNAs diminuam o número de células verdes, dado serem os dois sensíveis a este oligonucleotido

3.2.1. Teste de resistência e sensibilidade a oligonucleotidos específicos para hsMOB4A

Procedeu-se então à transfecção das células HeLa com os vectores pCRF26 + oligonucleotido 1, pCRF26 + oligonucleotido 7 e pCRF26 sem oligonucleotido. E transfecção pCRF59 sem oligonucleotido, pCRF59 + oligonucleotido 1 e pCRF59 + oligonucleotido 7. A transfecção dos oligonucleotidos foi realizada um dia após a transfecção dos vectores, pCRF26 e pCRF59. Contaram-se então o número de células fluorescentes (verdes) após 1, 2 e 3 dias de transfecção, sempre à mesma hora. O pCRF59 (GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi) é resistente ao oligonucleotido 1, dado que no poço sem oligonucleotido e no poço com oligonucleotido 1, o número de células verdes continua a aumentar (ao fim de 3 dias, aprox. 172% e 174%, respectivamente), enquanto que no poço com oligonucleotido 7 o número de células verdes diminui para aproximadamente 9% ao fim de 3 dias. Isto sugere que o oligonucleotido 1 não reprime eficazmente o gene de interesse, enquanto que com o oligonucleotidos 7 acontece o inverso (Fig. 3.8.).



B

RNAi				
PCR59	Dia 0 Porcentagem de células verdes	Dia 1 Porcentagem de células verdes	Dia 2 Porcentagem de células verdes	Dia 3 Porcentagem de células verdes
Poço sem oligo	100%	112,1%	138,9%	172,4%
Poço com oligo 1	100%	106%	143,4%	174,2%
Poço com oligo 7	100%	57,8%	19,6%	9,1%

Fig. 3. 8. GFP.hsMOB4A RNAiR é sensível e resistente a cada oligonucleotido especificamente. **A)** Gráfico representativo do número de células verdes ao longo de 4 dias. Combinações de pCRF59 (GFP.hsMOB4A RNAi R) sem oligo, pCRF59 + Oligonucleotido 1 e pCRF59 + oligonucleotido 7. Este vector é resistente apenas ao oligonucleotido 1 como seria de esperar, observa-se que na presença deste oligonucleotido há uma aumento do número de células verdes (GFP) até cerca de 174,2%, tal como no controlo (Sem oligonucleotido) até cerca de 172,4%. Em relação ao oligonucleotido 7 é sensível, observando-se uma diminuição do número de células verdes até cerca de 9,1%. **B)** Representação do gráfico em tabela, onde podemos observar os valores em percentagem de diminuição e aumento de número de células verdes ao longo dos 4 dias de contagem.

Como controlo deste ensaio realizou-se a mesma experiencia com pCRF26 (GFP.hsMOB4A), sensível aos 2 oligonucleotidos. Ambos os oligonucleotidos reprimem da mesma forma o gene de interesse (verificado através do número de células verdes), já que seja com o oligonucleotido 1, ou com o oligonucleotido 7 há uma diminuição do número de células verdes (ao fim de 3 dias, aprox 13,6% e 11,6%, respectivamente) (Fig. 3.9.). Estes resultados sugerem que o vector GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi induz uma resistência ao oligonucleotido específico. Para a realização da análise estatística considerou-se 100% o número células contado em cada poço no primeiro dia.

Para garantir a fidelidade destes resultados a experiência foi repetida duas vezes nas mesmas condições. No anexo II encontram-se as tabelas com os números reais de células contadas para cada experiência.

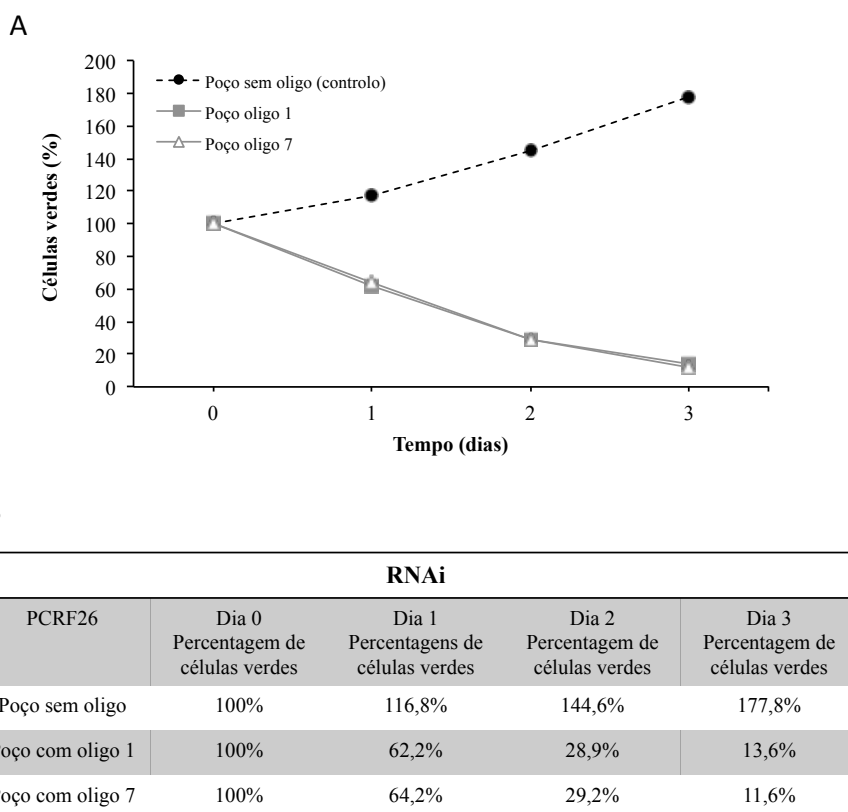


Fig. 3. 9. GFP.hsMOB4A é sensível a ambos os oligonucleotidos. A) Gráfico representativo do número de células verdes (GFP) ao longo de 4 dias. Combinações de pCRF26 (GFP.hsMOB4A) sem oligo, pCRF26 + Oligonucleotido 1 e pCRF26 + oligonucleotido 7. GFP.hsMOB4A mostra ser sensível a ambos os oligonucleotidos como seria de esperar, havendo uma diminuição do número de células verdes, com o oligonucleotido 1 até aos 13,6% e com o oligonucleotido 7 até aos 11,6%. Pelo contrário do controle que há um aumento do número de células verdes até aos 177,8%. **B)** Representação do gráfico em tabela, onde podemos observar os valores de diminuição e aumento de número de células verdes ao longo dos 4 dias de contagem.

3.2.2. Teste de resistência e sensibilidade a oligonucleotidos específicos para hsMOB4B

Realizou-se o mesmo procedimento para o pCRF25 e pCRF58 com os oligonucleotidos 2 e 8.

Em relação ao pCRF58 (hs.MOB4B resistente ao RNAi), realizaram-se exactamente os mesmos procedimentos que para o pCRF59, mas com os oligonucleotidos 2 e 8. Concluiu-se que existe uma resistência ao oligonucleotido 2, dado que no poço sem oligonucleotido e no poço com o oligonucleotido 2 o número de células verdes continua a aumentar (ao fim de 3 dias, aprox. 164% e 205%, respectivamente). Pelo contrário, o oligonucleotido 8 foi eficaz,

uma vez que o número de células verdes diminui para aproximadamente para 31% (Fig. 3.10.).

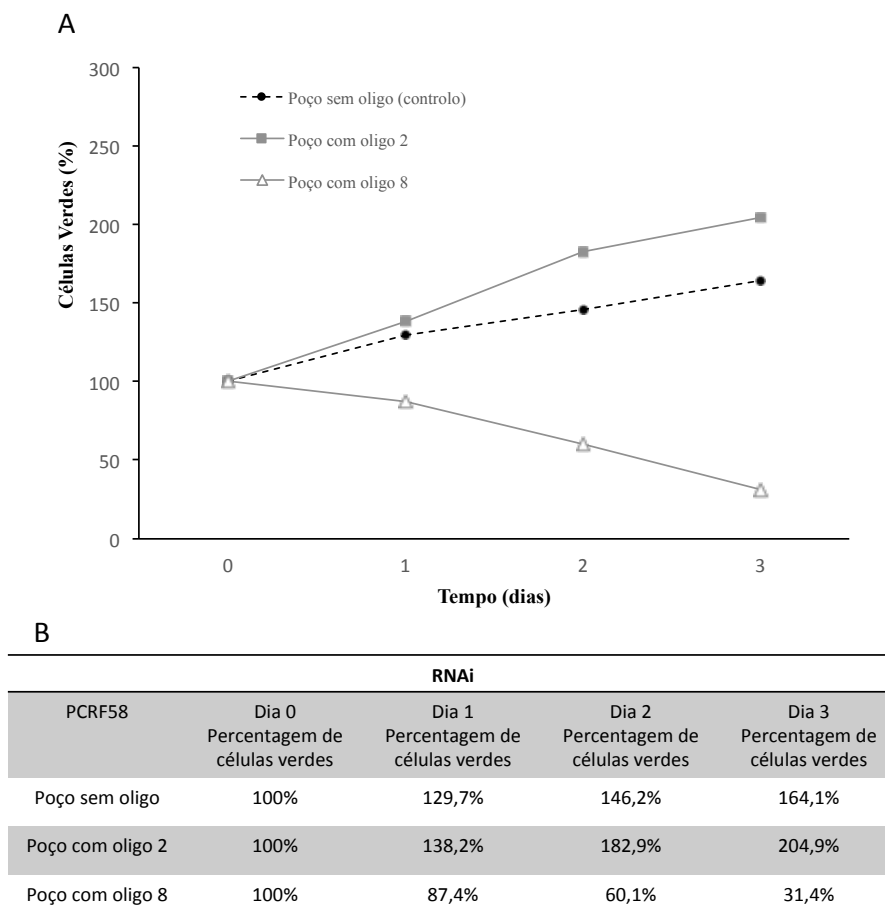
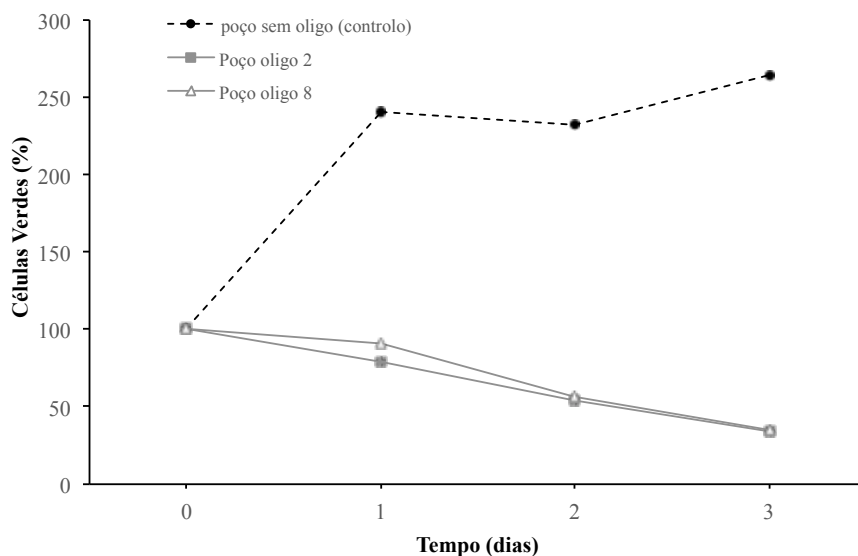


Fig. 3. 10. GFP.hsMOB4B RNAiR é sensível e resistente a cada oligonucleotido especificamente. A) Gráfico representativo do número de células verdes ao longo de 4 dias. Combinações de pCRF58 (GFP.hsMOB4B RNAi R) sem oligo, pCRF58 + Oligonucleotido 2 e pCRF58 + oligonucleotido 8. Este vector é resistente apenas ao oligonucleotido 2 como seria de esperar, observa-se que na presença deste oligonucleotido há um aumento do número de células verdes (GFP) até cerca de 204,9%, tal como no controlo (Sem oligonucleotido) até cerca de 164,1%. Em relação ao oligonucleotido 8 é sensível, observando-se uma diminuição do número de células verdes até cerca de 31,4%. **B)** Representação do gráfico em tabela, onde podemos observar os valores em percentagem de diminuição e aumento de número de células verdes ao longo dos 4 dias de contagem.

Mais uma vez, como controlo repetiu-se esta experiência com pCRF25 (GFP.hsMOB4B), que não deveria ter nenhuma resistência contra estes oligonucleotidos. Conclui-se que ambos os oligonucleotidos funcionaram eficazmente (i.e. verificou-se uma redução acentuada do número de células verdes ao fim de 3 dias – aprox. 34% e 35%, respectivamente) (Fig. 3.11.). Com estes resultados confirma-se que o vector GFP.hsMOB4B RNAiR confere a resistência desejada ao oligonucleotido específico. Para a realização da análise estatística considerou-se 100% o número células contado em cada poço no primeiro dia.

Para garantir a fidelidade destes resultados a experiência foi repetida duas vezes nas mesmas condições.

A



B

PCR25	RNAi			
	Dia 0 Porcentagem de células verdes	Dia 1 Porcentagem de células verdes	Dia 2 Porcentagem de células verdes	Dia 3 Porcentagem de células verdes
Poço sem oligo	100%	240,2%	232,8%	264,1%
Poço com oligo 2	100%	79,1%	53,8%	34,2%
Poço com oligo 8	100%	90,5%	56,9%	35%

Fig. 3. 11. GFP.hsMOB4B é sensível a ambos os oligonucleotidos. **A)** Gráfico representativo do número de células verdes (GFP) ao longo de 4 dias. Combinações de pCRF25 (GFP.hsMOB4B) sem oligo, pCRF25 + Oligonucleotido 2 e pCRF25 + oligonucleotido 8. GFP.hsMOB4B mostra ser sensível a ambos os oligonucleotidos como seria de esperar, havendo uma diminuição do número de células verdes, com o oligonucleotido 2 até aos 34,2% e com o oligonucleotido 8 até aos 35%. Pelo contrário do controlo que há um aumento do número de células verdes até aos 264,1%. **B)** Representação do gráfico em tabela, onde podemos observar os valores em percentagem de diminuição e aumento de número de células verdes ao longo dos 4 dias de contagem.

Pode então concluir-se que, as mutações pontuais não alteram a localização das proteínas de interesse, e são resistentes aos oligonucleotidos desejados. Portanto, este sistema poderá ser aplicado na técnica de CALI.

3.3. Clonagens – HA-SNAP-hsMOB4

A hs.MOB4A e a hs.MOB4B quando em fusão com outras proteínas sem um linker flexível apresentam a sua localização afectada, e por consequência poderão alterar a sua função, teve-se a necessidade de se introduzir também um linker flexível na construção dos vectores que expressam HA-SNAP-hsMOB4A e HA-SNAP-hsMOB4B, ambos resistentes ao RNAi.

Para obter os plasmídeos finais HA-SNAP-hsMOB4A e hsMOB4B foram necessárias várias clonagens. Na primeira clonagem integrou-se um *linker* flexível no vector pLJ223 (vector com o HA-SNAP). Este *linker* flexível foi essencial para que a presença da *tag* não cause interferências com a estrutura da proteína, e consequentemente na sua função. Com a introdução deste linker foi também criado um local de restrição extra *HindIII* para posterior inserção do hsMOB4A e hsMOB4B neste vector.

Assim, após o *annealing* dos oligonucleotidos do *linker* e restrição com *PstI* / *BamHI*, procedeu-se à clonagem e transformação em DH5 α . Obtiveram-se 2 colónias positivas, confirmadas pela análise de restrição com *HindIII*. Nessa análise, esperavam-se 2 bandas, uma com ~2900pb, correspondente ao vector, e outra com ~700pb, correspondente ao HA-SNAP, o que se pôde confirmar através da electroforese em gel de agarose dos produtos dessa digestão (Fig. 3.12. A). Simultaneamente, a Cláudia Florindo confirmou esses clones através de sequenciação (Fig. 3.12. B). O nome dado a este vector foi pFGS1 (~3650pb), observar o mapa na Fig. 3.12.B e C.

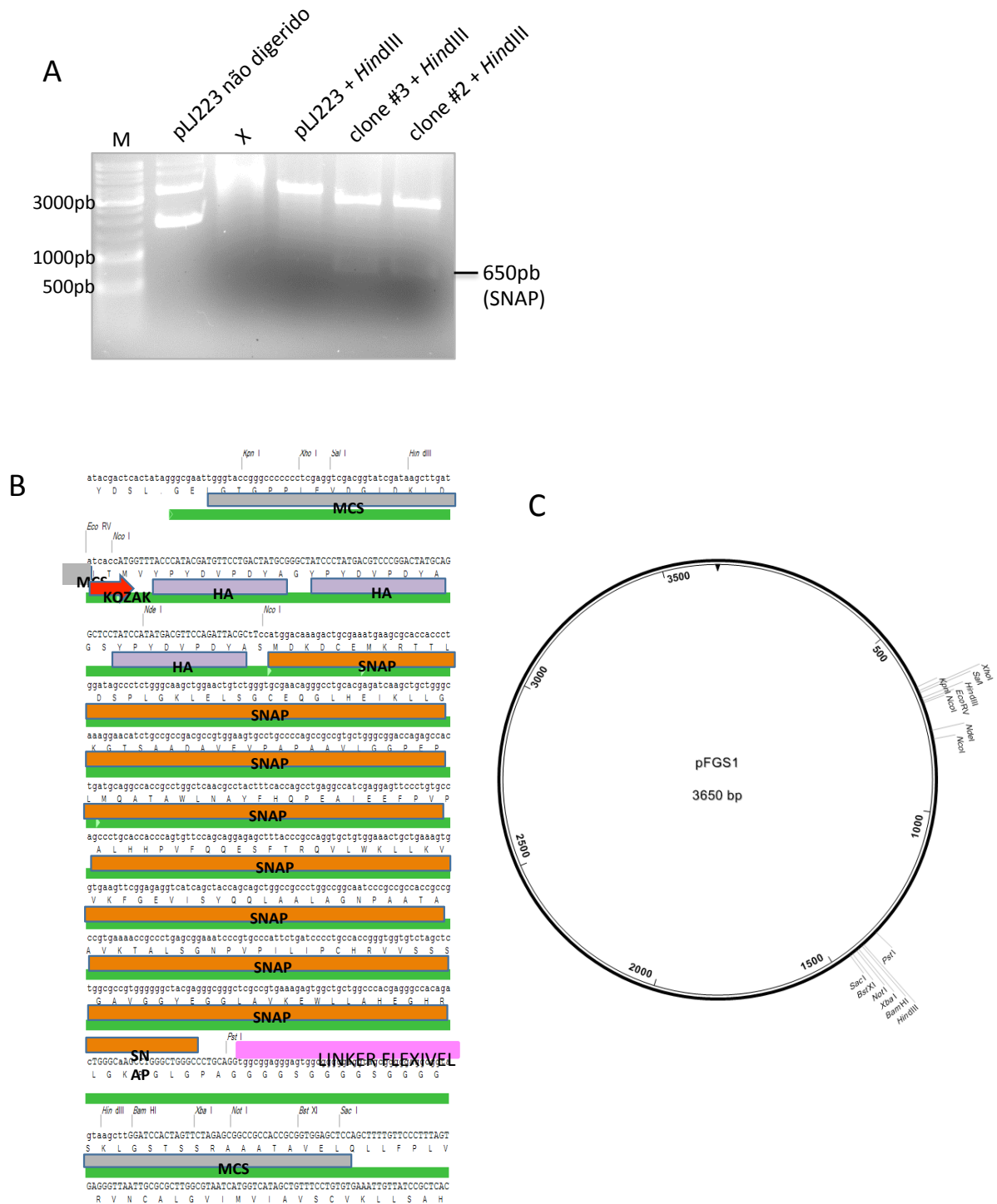


Fig. 3. 12. Linker flexível introduzido no vetor de SNAP-tag: **A)** Gel de agarose em que mostra que o *linker* flexível foi inserido no vetor pLJ223. Ao digerir-se os clones 2 e 3 com a enzima de restrição *HindIII* o SNAP-tag é retirado, aparecendo duas bandas, 650pb (SNAP) e 3000pb(restante do vetor pLJ223) **B)** |Confirmação por sequenciação da introdução do linker flexível no local desejado assinalado a cor-de-rosa. Figura B e C – Mapas feitos pela Cláudia Florindo.

Futuramente, os genes de interesse, *hsMOB4A* e *hsMOB4B* resistentes ao RNAi, serão inseridos no vetor pFGS1 (vetor com SNAP-tag + linker flexível). Com o intuito de proceder a esta clonagem, desenharam-se primers (ver tabela de oligonucleotídeos em Materiais e métodos) específicos para as sequências codificantes de *hsMOB4A* e *hsMOB4B*.

Para se amplificar por PCR a sequência destes genes usaram-se como *templates* os vector pCRF59 e pCRF58, respectivamente. Os fragmentos de cDNA amplificados foram clonados no vector pFGS1 pela Cláudia Florindo. Nas restantes clonagens pretendia-se introduzir o SNAP-tag-hsMOB4A e SNAP-tag-hsMOB4B resistentes ao RNAi num vector que permitisse a produção das duas linhas estáveis através de retrovírus. Nessa fase seria possível a realização de ensaios de CALI com a proteína de interesse.

Como descrito nestes resultados, até à data, apenas foram construídos os clones SNAP-tag-hsMOB4A e SNAP-tag-hsMOB4B resistentes ao RNAi, não tendo sido possível, clonar estes vectores num outro vector que nos permitiria conceber as duas linhas estáveis através da produção retrovírus, como pretendido. A criação de uma linha estável através de retrovírus terá como principal vantagem uma elevada taxa de integração dos nossos vectores em células HeLa, o que nos permitirá futuramente realizar ensaios de CALI com uma maior eficiência, dado haver um maior número de células a expressar os nossos genes de interesse.

Dado os clones GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes ao RNAi, apresentarem as massas moleculares e localização esperadas e, o mRNA da hsMOB4A e da hsMOB4B (com mutações pontuais) ser resistente aos oligonucleotidos pretendidos para cada um, verificámos que as mutações pontuais não alteraram a proteína. Estaremos em condições de iniciar-se os ensaios de CALI para hsMOB4A e hsMOB4B e perceber qual o local proveniente do sinal para que as células executem o evento final da citocinese, se dos centrossomas, se do *midbody* ou se de ambos.

3.4. Obtenção de linhas celulares estáveis de β e γ -tubulina-SNAP-tag

Para otimizar a técnica de CALI e perceber a função da β e γ -tubulina ao longo do ciclo celular, foram tentativamente desenvolvidas duas linhas celulares a partir das células HeLa, uma expressando β -tubulina-SNAP-tag e outra γ -tubulina-SNAP-tag.

3.4.1. Linha celular estável de β -tubulina-SNAP-tag

A linha celular β -tubulina-SNAP-tag foi previamente desenvolvida pela Dra. Cláudia Florindo através da transfecção de células HeLa com o vector que permite a expressão de β -tubulina-SNAP-tag. Este vector confere às células resistência à Geneticina, sendo este antibiótico usado para selecção dos clones positivos. Os clones previamente isolados foram testados no decurso deste trabalho.

Paralelamente, e após a recolha e isolamento de cada clone, foi feito um extracto proteico total das células a partir da placa da qual se isolaram os clones referidos – *pool* de clones 2. Este *pool* continha a mistura de todos os clones obtidos originalmente após a transfecção e foi utilizado para testar a presença de β -tubulina-SNAP-tag no total das células transfectadas.

Para confirmar a expressão de β -tubulina e SNAP-tag neste extracto (*pool* de clones 2), bem como em cada clone isolado, realizou-se um *western blot* com anticorpo específico contra o SNAP-tag. Nesta análise esperava-se uma banda da proteína de fusão com ~ 75 kDa (β -tubulina-SNAP-tag) dado que ~ 55 kDa corresponde β -tubulina e ~ 20 kDa SNAP-tag. Como se pode observar na Fig. 3.13., apenas se detectou a presença desta banda no extracto correspondente ao *pool* de clones 2.

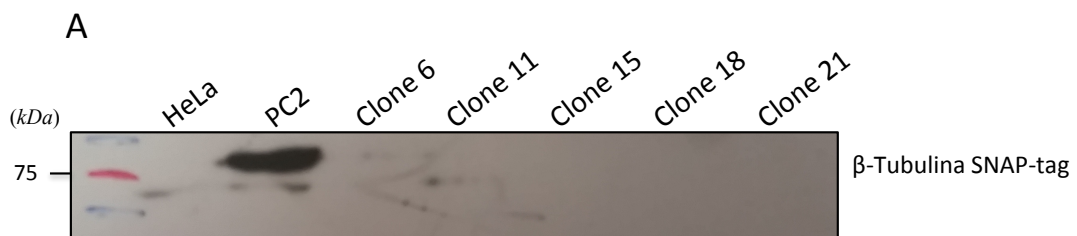


Fig. 3. 13. *Pool* de clones da linha estável de β -tubulina-SNAP-tag apresenta o tamanho esperado em *Western Blot*. Extratos de células de vários clones da linha estável de β -tubulina-SNAP-tag. Incubação com anticorpo anti-SNAP, quando positivo aparece uma banda com cerca de 75 kDa (SNAP-tag (~ 20 kDa) + β -tubulina (~ 55 kDa)). Apenas a *pool* of clones desta linha celular é positiva, apresenta uma banda com cerca de 75 kDa

A confirmação da presença da proteína de fusão nesta amostra foi feita também, através do ensaio de marcação das células em cultura com SNAP-Cell Fluoresceína, observando-se nestas células uma marcação óbvia dos microtúbulos em várias fases da mitose, interfase (Painéis A e B, Fig. 3.14.), anafase (painel C, Fig. 3.14.) e citocinese (painel D, Fig. 3.14.). O que indica que este *pool* de clones poderá ser utilizado para a realização de ensaios de CALI, após devida selecção de clones.

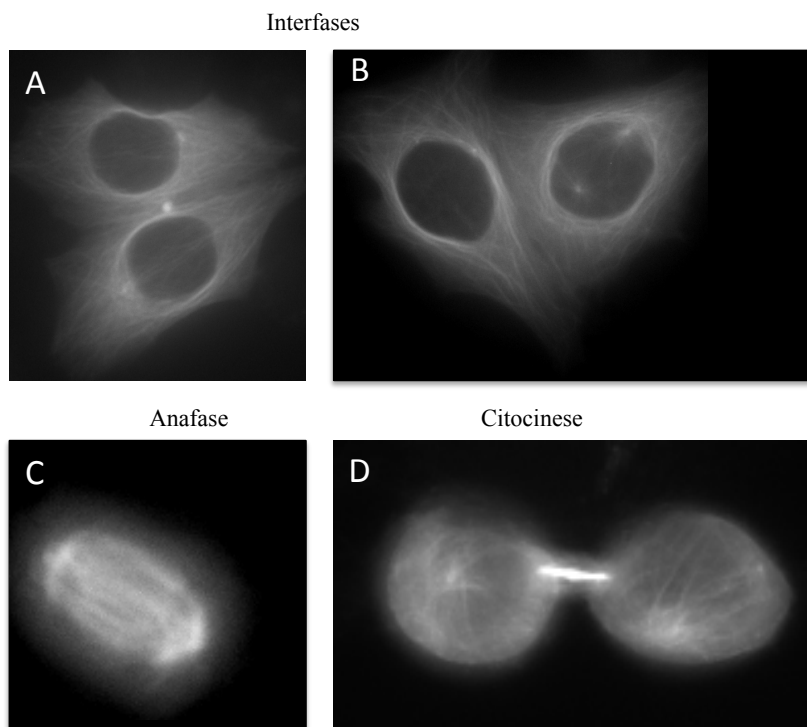


Fig. 3. 14. *Pool* de clones da linha de β -tubulina-SNAP-tag está a expressar a proteína de fusão β -tubulina-SNAP-tag. Painéis A e B representam células da *pool* de clones da β -tubulina-SNAP-tag em interfase quando incubadas com SNAP-Cell® Fluoresceína, apresentando uma marcação dos microtubulos. Painel C e D representam células da *pool* de clones da β -tubulina-SNAP-tag em anáfase e citocinese, respectivamente, quando incubadas com SNAP-Cell® Fluoresceína apresentando também uma marcação dos microtubulos.

3.4.2. Linha celular estável de γ -tubulina-SNAP-tag

Para a produção da linha estável de γ -tubulina-SNAP-tag foi realizado o mesmo processo anteriormente referido. A criação do vector com a proteína de fusão γ -tubulina-SNAP-tag e a transfecção das células HeLa foram também realizadas pela Cláudia Florindo. Alguns destes clones foram usados para preparação de extractos proteicos. Mais uma vez, após o isolamento dos clones pretendidos, preparou-se também um extracto proteico a partir da placa original da transfecção (*pool* de clones 1).

Para confirmar a expressão de γ -tubulina-SNAP-tag nos clones e no *pool* de clones 1, realizou-se uma *western blot* com anticorpos específico contra γ -tubulina, esperando-se uma banda com $\sim 55kDa$ (γ -tubulina endógena) e outra com $\sim 75kDa$ (γ -tubulina-SNAP-tag). Como se pode observar na Fig. 3.15. (Painel A), todos os clones analisados expressavam γ -tubulina endógena, tal como seria esperado. No entanto apenas um dos clones, o clone 37, apresentava as duas bandas referidas, sendo os restantes clones negativos. A *pool* of clones, que à partida deveria ser positiva, no entanto, não expressava a proteína de fusão.

Para confirmar este resultado, voltou a fazer-se um novo gel com os mesmos clones, mas desta vez incluiu-se o *pool* de clones de β -tubulina-SNAP-tag (PC2) previamente testado em *western blot* e por marcação com SNAP-Cell Fluoresceína.

Desta vez, fez-se a detecção com anti-SNAP-tag, esperando-se uma banda com ~ 75 kDa. Como se pode observar na Fig. 3.15. (Painel B), apenas o controlo positivo apresentava a banda esperada sugerindo que o clone 37 era afinal negativo e, que a banda identificada na Fig. 3.15. (Painel A) correspondia a um artefacto.

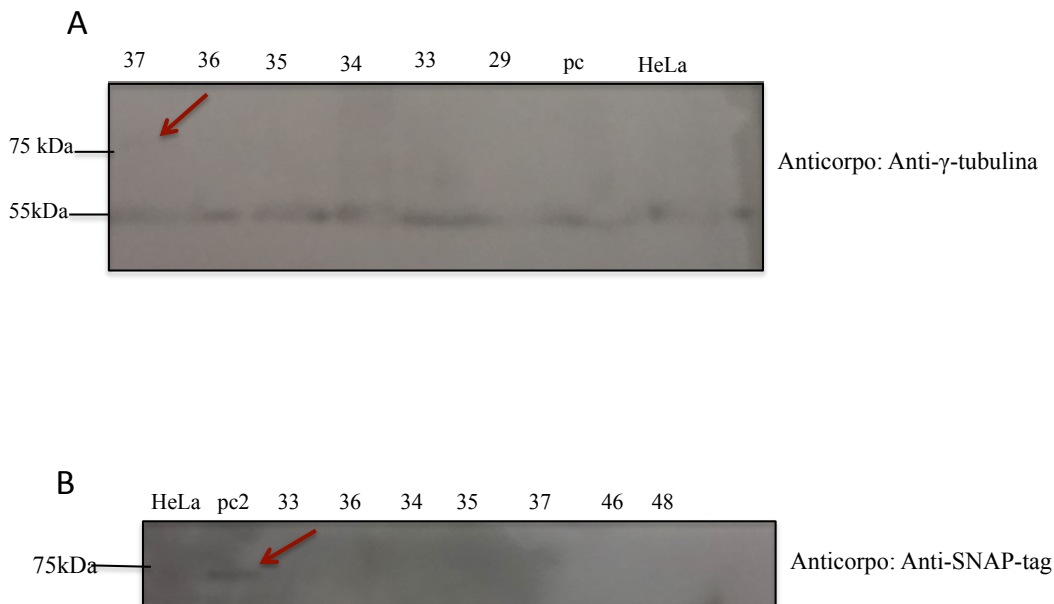


Fig. 3. 15. Clones da linha estável de γ -tubulina-SNAP-tag não apresentam o tamanho esperado da proteína de fusão por *Western Blot*. A) Extratos de células HeLa de vários clones de γ -tubulina-SNAP-tag, da *pool* de clones desta e como controlo extrato de células HeLa. Incubação com anticorpo anti- γ -tubulina, com cerca de 55 kDa está expressa a γ -tubulina endógena e quando positivo, isto é, estar a expressar a proteína de fusão γ -tubulina-SNAP-tag, deveríamos obter uma banda com cerca de 75 kDa (γ -tubulina ~ 55 kDa e SNAP-tag ~ 20 kDa). Apenas o clone 37 desta linha parece ter um resultado positivo. **B)** Extratos de células HeLa de vários clones de γ -tubulina-SNAP-tag, da *pool* de clones desta e como controlo extratos de células HeLa e extratos de células da *pool* de clones da β -tubulina-SNAP-tag. Incubação com anticorpo anti-SNAP-tag, em que quando positivo espera-se uma banda com cerca de 75 kDa (γ -tubulina ~ 55 kDa e SNAP-tag ~ 20 kDa). Pode-se observar que apenas a *pool* de clones da β -tubulina-SNAP-tag é positiva, sendo o clone 37 descartado.

Fez-se então uma marcação do clone 37, do PC2 (controlo positivo) e do clone 42 (controlo negativo) com SNAP-Cell Fluoresceína para reconfirmar o último resultado. Os resultados indicam que tanto o clone 37 (Fig. 3.16., painel B) como o clone 42 (Fig 3.16., painel D) são negativos (o sinal observado corresponde a background), concluindo-se assim que nenhum destes poderá ser usado para nos ensaios de CALI. No entanto, outros clones foram analisados pela Cláudia Florindo, tendo sido positivos.

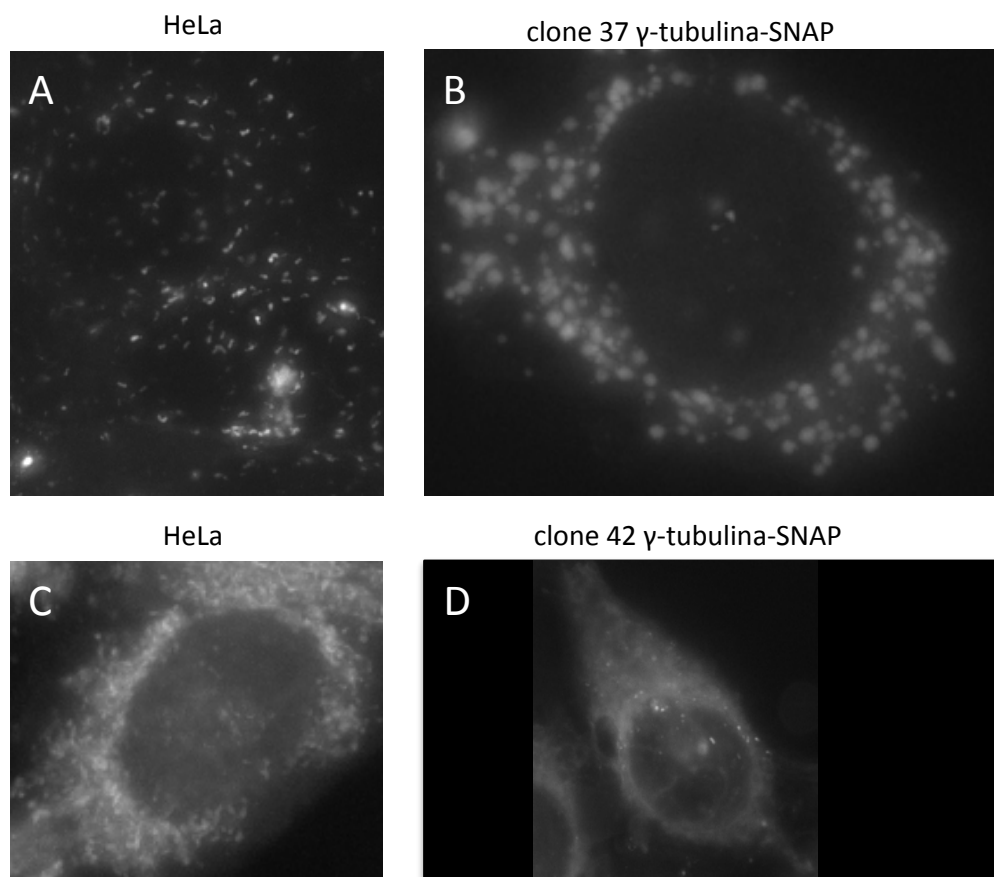


Fig. 3. 16. Os clones da linha estável γ -tubulina-SNAP-tag são negativos. Painéis A e C representam células HeLa marcadas com SNAP-Cell® Fluoresceína (Controlo) e os painéis B e D representam células dos clones 37 e 42, respectivamente, da linha de γ -tubulina-SNAP-tag quando incubadas com SNAP-Cell® Fluoresceína, podendo concluir que ambos os clones desta linha são negativos, dado que a marcação apresentada é apenas ruído de fundo como no controlo.

3.5. Ensaio de CALI

No final deste trabalho acompanhei o início de ensaios de CALI realizados pela Cláudia Florindo.

Para otimizar as condições de CALI, tais como, a potência do laser, concentração de SNAP-Fluoresceína, como direccionar o laser para atingir apenas uma determinada região da célula sem causar danos em locais inespecíficos, foi bastante importante a criação das linhas estáveis de α e γ -tubulina-SNAP-tag.

Para estabelecer a marcação com SNAP-tag como uma ferramenta para *in vivo* para CALI, realizamos ensaios de microscopia em células mitóticas que nos permitiram determinar a quantidade de energia necessária e detectar o efeito específico de CALI. Para este fim, expressámos α -tubulina-SNAP-tag em células HeLa e incubou-se com o substrato de SNAP-tag, BGAF (SNAP-Cell Fluoresceína), um derivado de fluoresceína permeável às células, resultando na marcação específica do fuso mitótico.

Após CALI em metafase, o fuso mitótico parece colapsar. Através da irradiação do laser sobre um polo de cada fuso de cada célula os microtúbulos parecem despolimerizar, parecendo ser apenas necessário irradiar em apenas um fuso de cada célula para que tal aconteça.

Kepler *et al*, obteve o mesmo resultado. Após CALI, o fuso mitótico fica parado em metafase durante 2 horas. Mais tarde, cromossomas começam a descondensar e perdem o seu alinhamento da placa metafásica [88].

A marcação de SNAP-tag tem a vantagem de ser mais rápido (<5min), altamente eficaz, específico e não tóxico, o que torna o SNAP-tag CALI muito mais adequado para as experiências de células vivas [88]. Em geral, não é possível comparar os valores de energia total dos fotossensibilizadores usados em CALI de forma quantitativa rigorosa, dado a maioria usarem diferentes proteínas-alvo proteínas e *set-ups* diferentes também.

No entanto, vários controlos ainda são necessários para provar que estas condições de CALI são as ideais e que os fenótipos observados são apenas causados por CALI e não por outro motivo.

Várias perguntas podem surgir, por exemplo: - Como provar que se inactiva a proteína devido às ROS? Sabe-se que a base da técnica CALI é a produção de singletos de oxigénio. Para provar que SNAP-Cell Fluoresceína tem o mesmo mecanismo, Kepler *et al*, adicionaram imidazole (que inibe os singletos de oxigénio) e noutras células adicionaram um meio enriquecido em oxigénio. Os resultados obtidos indicam que a eficiência de CALI com imidazole (30mM) baixa para 74% e com o meio enriquecido em oxigénio a eficiência duplica quando comparado ao controlo [88]. Realizando este controlo, poderemos comprovar que SNAP-tag CALI é dependente dos singletos de oxigénio com espécies reactivas de oxigénio.

- Como controlar a especificidade de CALI? Expressando células SNAP-tag sem proteína de interesse associada, marcando-se com SNAP-Cell Fluoresceína e irradiando o laser, todas as células progrediram durante a mitose sem defeitos [88], demonstrando assim a especificidade e dependência da grande proximidade da molécula de fluoresceína à marcação da sua proteína alvo.

- Como provar que a expressão de α -tubulina-SNAP-tag não interfere na progressão mitótica? Não marcando células com SNAP-Cell Fluoresceína, mas com irradiação de laser, todas as células progrediram para anafase, dividindo em duas células filhas sem anormalidades [88], confirmando-se que a intensidade da iluminação do laser e a expressão de α -tubulina-SNAP-tag não têm nenhum efeito na progressão de mitose.

- Ao fazer-se a inactivação local da hsMOB4A e da hsMOB4B, que se esperaria? Apesar de não ter sido referenciado na introdução deste trabalho, certos resultados do nosso grupo, que serão indicados de seguida, sugerem que a hsMOB4A e a hsMOB4B não são totalmente redundantes e, que têm funções ligeiramente especializadas [4]. Então, será que ao inactivarmos a hsMOB4A e a hsMOB4B, em células diferentes, mas na mesma estrutura (centrossomas ou *midbody*) teremos fenótipo diferentes?

Em análise de células fixas, observa-se que as células depletadas para a hsMOB4A têm um elevado número de células binucleadas (2 vezes maior que quando depletado para a hsMOB4B) [4]. As células binucleadas parecem formar-se por dois processos distintos: no caso da hsMOB4A, 40% das células binucleadas têm origem devido a erros da segregação do DNA e, 60% resultam de erros da citocinese [4]. Desses 60%, 50% forma-se por reversão do sulco de clivagem e 10% por erros de clivagem [4]. Com estes resultados, será que o sinal da hsMOB4A virá do *midbody*?

Pelo contrário, a depleção da hsMOB4B resulta numa maior percentagem de células com dois centríolos separados (14%) do que quando depletado com a hsMOB4A [4]. No entanto, a percentagem de células com os centríolos separados quase duplica (25,7%) quando depletadas ambas as hsMOB4, indicando que a depleção simultânea das hsMOB4 tem um efeito sinérgico, mostrando que ambas as hsMOB4 são importantes para a coesão dos centríolos [4].

Em análise de células em tempo real, percebe-se que células depletadas em hsMOB4A têm um movimento errático menor, uma velocidade de deslocação menor e percorrem uma menor distância do que células depletadas com a hsMOB4B [4]. A depleção de ambas as hsMOB4 provocam um aumento da mobilidade celular, no entanto, um efeito mais forte para a hsMOB4B. Então, se o movimento celular se encontrar directamente correlacionado com a polaridade celular, uma polaridade que seja dependente da organização do citoesqueleto, os fenótipos de movimentação celular para o caso da hsMOB4B, poderiam ser explicados pela hipótese da desorientação dos centríolos a movimentarem-se com um movimento errático. Então, será que, em citocinese, ao inactivarmos apenas um centrossoma numa célula, teremos um maior número de células com falhas na citocinese se inactivarmos células a expressar a hsMOB4B do que células a expressar a hsMOB4A? Será que é necessário inactivar os dois centrossomas para que isso aconteça?

Dado que o objectivo final deste trabalho será a dissecar todo o processo da citocinese, terá de se realizar ensaios de CALI com outras proteínas, como por exemplo, a centriolina e a Aurora B.

Sabemos que, a centriolina se localiza no centríolo mãe durante a telófase e nos centrossomas nas restantes fases do ciclo [74] e que, células com níveis reduzidos de centriolina apresentam fenótipos muito semelhantes às células com a depleção de hsMOB4A e hsMOB4B. Apresentam várias características de falhas em citocinese, permanecem ligadas por mais tempo que o normal por pontes intercelulares longas, sem conseguirem executar a separação física entre as duas células filhas. Então, caso inactivássemos, em citocinese, a centriolina apenas num dos centríolos mãe de uma célula, que fenótipo observaríamos? E se inactivássemos apenas no outro centríolo mãe, que fenótipo observaríamos? Será que a célula iria conseguir executar a abscisão? Caso não conseguisse poderá ser um sinal que necessitam de ser inactivados os dois centríolos mãe para que falhe o último passo da citocinese, a abscisão.

Tal como a centriolina, a hsMOB4A e a hsMOB4B, a Aurora B, também tem um papel essencial na citocinese, dado que, a inibição da Aurora B, inactiva os *checkpoints* mitóticos, conduz ao desalinhamento dos cromossomas e leva a falhas na Citocinese [76]. Então, ao inactivarmos localmente, a Aurora B, no *midbody*, será que iríamos observar falhas na citocinese, tal como na hsMOB4A e hsMOB4B?

Para dissecar o mecanismo da abscisão, estas e outras proteínas terão de ser exhaustivamente estudadas através de ensaios de CALI.

4. Conclusão

Algumas das ferramentas necessárias para realizar a técnica CALI de modo dissecar todo processo da citocinese, foram obtidas. Para perceber qual a localização necessária das proteínas de interesse, a hsMOB4A e a hsMOB4B através de ensaios de CALI e para tal, haver uma possibilidade de ser necessário usar a técnica de RNAi em ensaios de CALI nas linhas celulares a expressar SNAP-tag-hsMOB4A e SNAP-tag-hsMOB4B teve-se a necessidade de conceber e caracterizar proteínas codificadas pelos clones de GFP.hsMOB4A e GFP.hsMOB4B resistentes a RNAi (foram criadas mutações pontuais em locais específicos). Primeiramente, confirmou-se a introdução destas mutações pontuais através de sequenciação, de seguida através de *Western Blot* conseguiu-se provar que tanto, GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi como GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi têm exactamente as massas moleculares esperadas. Também, por imunofluorescência, provou-se que estas mutações não interferem na sua localização, já que ambas se localizam nos centrossomas e por fim acumuladas no *midbody*. Para se garantir que o GFP.hsMOB4A e o GFP.hsMOB4B eram resistentes aos oligonucleotídeos específicos realizou-se ensaios de RNA de interferência, que permitiram afirmar que tanto GFP.hsMOB4A resistente ao RNAi como GFP.hsMOB4B resistente ao RNAi são resistentes e sensíveis aos oligonucleotídeos pretendidos.

Com todos estes ensaios concluiu-se, as mutações pontuais inseridas nas regiões codificantes da hsMOB4A e hsMOB4B não alteram as proteínas e que estes clones estão em condições para a criação de duas linhas estáveis para futuros ensaios de CALI.

Para a utilização destes clones em ensaios de CALI, teve de se conceber uma proteína de fusão SNAP-tag-hsMOB4A resistente ao RNAi e SNAP-tag-hsMOB4B resistente ao RNAi. Para tal, primeiramente introduziu-se um linker flexível no vector de SNAP-tag para que ao colocar-se a hsMOB4, esta não interferisse na sua estrutura e sua função.

Para a optimização das condições de CALI e também para perceber a sua função no processo citocinético, foram criadas duas linhas estáveis de β -tubulina-SNAP-tag e γ -tubulina-SNAP-tag. Foi necessário caracterizar estas linhas celulares, para garantir a sua fidelidade nos ensaios de CALI. Através de *Western Blot* e marcação de SNAP-Fluoresceína, consegue-se concluir que apenas a linha β -tubulina-SNAP-tag estava em condições para serem iniciados os ensaios de CALI. Estas células com β -tubulina-SNAP-tag expressavam exactamente o tamanho esperado e, observando ao microscópio, tinham uma marcação dos microtúbulos, quando marcados com SNAP-Fluoresceína.

Foram iniciados ensaios de CALI com a linha estável de β -tubulina-SNAP-tag, através da marcação com SNAP-Fluoresceína e irradiação do laser num dos polos das células que deram uma ideia de despolimerização dos microtúbulos. No entanto, vários controlos terão de ser realizados para provar a fidelidade dos nossos resultados.

5. Perspectivas Futuras

Os resultados aqui apresentados requerem ainda bastante trabalho pela frente. Ao longo deste trabalho foram criadas várias ferramentas para que ensaios de CALI pudessem ser realizados com fidelidade e segurança dos nossos resultados.

Dado estarem criadas praticamente todas as ferramentas para se iniciarem ensaios de CALI para a hsMOB4A e para a hsMOB4B, o próximo passo deste trabalho será, através desses ensaios, tentar perceber de qual das estruturas, centrossomas ou *midbody*, ou se de ambas, vem o sinal necessário para que ocorra o evento final da citocinese, a abscisão. Através da técnica CALI, inactivaremos localmente as nossas proteínas de interesse, a hsMOB4A e a hsMOB4B, irradiando o laser apenas num centrossoma, ou apenas nos dois centrossomas, ou apenas no *midbody* ou em ambas as estruturas, para determinar qual o sinal da nossa proteína para que a abscisão ocorra.

Após termos conseguido obter resposta à nossa principal pergunta, que seria de onde vem o sinal da hsMOB4A e da hsMOB4B para que ocorra abscisão, estaremos em condições para fazer ensaios de CALI em várias proteínas envolvidas no processo da citocinese, tais como, centriolina, PLK1, Aurora B, etc.

Por exemplo, sabe-se que a centriolina é uma proteína que estruturalmente, tem alguma conservação com um componente da MEN em *S. cerevisiae*, a proteína Nud1. O grupo do Dr Doxsey verificou que a centriolina é um componente de um mecanismo regulatório da citocinese em eucariotas superiores. Células de mamíferos sem centriolina apresentam vários defeitos característicos de falhas da citocinese, como permanecerem conectadas por muito tempo por uma ponte intercelular sem conseguirem executar a separação física entre as duas células filhas, tal como acontece em células depletadas das hsMOB4.

Após uma análise a todas estas proteínas conseguir-se-á dissecar o complexo mecanismo da citocinese, o que permitirá perceber alguns problemas biológicos, tais como o cancro.

6. Bibliografia

- [1] S. Maza, "The Cultural Origins of the French Revolution," in *A Companion to the French Revolution*, 2012, pp. 42–56.
- [2] B. Mierzwa and D. W. Gerlich, "Review Cytokinetic Abscission : Molecular Mechanisms and Temporal Control," *Dev. Cell*, vol. 31, no. 5, pp. 525–538, 2014.
- [3] F. A. Barr and U. Gruneberg, "Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 847–860, 2007.
- [4] C. Susana and R. Florindo, "Estudo dos genes humanos tipo Mob : hsMob4A e hsMob4B," 2004.
- [5] H. Bringmann and A. A. Hyman, "A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals," *Nature*, vol. 436, no. 7051, pp. 731–734, 2005.
- [6] R. Dechant and M. Glotzer, "Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation," *Dev. Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 333–344, 2003.
- [7] J. P. Fededa and D. W. Gerlich, "Molecular control of animal cell cytokinesis," *Nature Cell Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 440–447, 2012.
- [8] V. E. Foe and G. Von Dassow, "Stable and dynamic microtubules coordinately shape the myosin activation zone during cytokinetic furrow formation," *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 3, pp. 457–470, 2008.
- [9] W. M. Bement, H. A. Benink, and G. Von Dassow, "A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification," *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 1, pp. 91–101, 2005.
- [10] D. A. Guertin, S. Trautmann, and D. McCollum, "Cytokinesis in eukaryotes," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 66, no. 2, pp. 155–178, 2002.
- [11] Y. Nishimura and S. Yonemura, "Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 1, pp. 104–114, 2006.
- [12] Ö. Yüce, A. Piekny, and M. Glotzer, "An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA," *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 4, pp. 571–582, 2005.
- [13] U. Euteneuer and J. R. McIntosh, "Polarity of midbody and phragmoplast microtubules," *J. Cell Biol.*, vol. 87, no. 2 I, pp. 509–515, 1980.
- [14] M. Glotzer, "The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 9–20, 2009.
- [15] C. Mollinari, J. P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, and R. L. Margolis, "PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone," *J. Cell Biol.*, vol. 157, no. 7, pp. 1175–1186, 2002.
- [16] M. Carmena, M. Wheelock, H. Funabiki, and W. C. Earnshaw, "The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 789–803, 2012.
- [17] C. A. Cooke, M. M. S. Heck, and W. C. Earnshaw, "The inner centromere protein

- (INCENP) antigens: Movement from inner centromere to midbody during mitosis," *J. Cell Biol.*, vol. 105, no. 5, pp. 2053–2067, 1987.
- [18] S. Hümmer and T. U. Mayer, "Cdk1 Negatively Regulates Midzone Localization of the Mitotic Kinesin Mklp2 and the Chromosomal Passenger Complex," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 7, pp. 607–612, 2009.
- [19] U. Gruneberg, R. Neef, R. Honda, E. A. Nigg, and F. A. Barr, "Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2," *J. Cell Biol.*, vol. 166, no. 2, pp. 167–172, 2004.
- [20] R. Uehara, Y. Tsukada, T. Kamasaki, I. Poser, K. Yoda, D. W. Gerlich, and G. Goshima, "Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase," *J. Cell Biol.*, vol. 202, no. 4, pp. 623–636, 2013.
- [21] D. H. Castrillon and S. A. Wasserman, "Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene," *Development*, vol. 120, no. 12, pp. 3367–3377, 1994.
- [22] S. Watanabe, Y. Ando, S. Yasuda, H. Hosoya, N. Watanabe, T. Ishizaki, and S. Narumiya, "mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 2328–2338, 2008.
- [23] T. Davies, S. N. Jordan, V. Chand, J. A. Sees, K. Laband, A. X. Carvalho, M. Shirasu-Hiza, D. R. Kovar, J. Dumont, and J. C. Canman, "High-Resolution Temporal Analysis Reveals a Functional Timeline for the Molecular Regulation of Cytokinesis," *Dev. Cell*, vol. 30, no. 2, pp. 209–223, 2014.
- [24] E. M. Reichl, Y. Ren, M. K. Morphew, M. Delannoy, J. C. Effler, K. D. Girard, S. Divi, P. A. Iglesias, S. C. Kuo, and D. N. Robinson, "Interactions between Myosin and Actin Crosslinkers Control Cytokinesis Contractility Dynamics and Mechanics," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 7, pp. 471–480, 2008.
- [25] D. J. DeMarini, A. E. M. Adams, H. Fares, C. De Virgilio, G. Valle, J. S. Chuang, and J. R. Pringle, "A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall," *J. Cell Biol.*, vol. 139, no. 1, pp. 75–93, 1997.
- [26] P. Maupin and T. D. Pollard, "Arrangement of actin filaments and myosin-like filaments in the contractile ring and of actin-like filaments in the mitotic spindle of dividing HeLa cells," *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, vol. 94, no. 1, pp. 92–103, 1986.
- [27] K. Kruse and F. Jülicher, "Self-organization and mechanical properties of active filament bundles," *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, vol. 67, no. 5 Pt 1, p. 051913, 2003.
- [28] A. Carvalho, A. Desai, and K. Oegema, "Structural Memory in the Contractile Ring Makes the Duration of Cytokinesis Independent of Cell Size," *Cell*, vol. 137, no. 5, pp. 926–937, 2009.
- [29] C.-K. Hu, M. Coughlin, and T. J. Mitchison, "Midbody assembly and its regulation during cytokinesis," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 1024–1034, 2012.
- [30] A. Echard, "Phosphoinositides and cytokinesis: The 'PIP' of the iceberg,"

Cytoskeleton, vol. 69, no. 11. pp. 893–912, 2012.

- [31] K. Emoto, H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, and M. Umeda, “Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 45, pp. 37901–37907, 2005.
- [32] S. J. Field, N. Madson, M. L. Kerr, K. A. A. Galbraith, C. E. Kennedy, M. Tahiliani, A. Wilkins, and L. C. Cantley, “PtdIns(4,5)P₂ functions at the cleavage furrow during cytokinesis,” *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 15, pp. 1407–1412, 2005.
- [33] A. P. Sagona, I. P. Nezis, N. M. Pedersen, K. Liestøl, J. Poulton, T. E. Rusten, R. I. Skotheim, C. Raiborg, and H. Stenmark, “PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 362–371, 2010.
- [34] J. Guizetti, L. Schermelleh, J. Mäntler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Müller-Reichert, and D. W. Gerlich, “Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments,” *Science*, vol. 331, no. 6024, pp. 1616–1620, 2011.
- [35] A. T. Saurin, J. Durgan, A. J. Cameron, A. Faisal, M. S. Marber, and P. J. Parker, “The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 891–901, 2008.
- [36] J. A. Schiel, G. C. Simon, C. Zaharris, J. Weisz, D. Castle, C. C. Wu, and R. Prekeris, “FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis,” *Nat Cell Biol*, vol. 14, no. 10, pp. 1068–1078, Oct. 2012.
- [37] A. P. Sagona and H. Stenmark, “Cytokinesis and cancer,” *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 12, pp. 2652–2661, 2010.
- [38] N. Elia, R. Sougrat, T. A. Spurlin, J. H. Hurley, and J. Lippincott-Schwartz, “Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 12, pp. 4846–4851, 2011.
- [39] R. N. Bastos and F. A. Barr, “Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission,” *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 4, pp. 751–760, Nov. 2010.
- [40] J. G. Carlton, A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, and J. Martin-Serrano, “ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C,” *Science*, vol. 336, no. 6078. pp. 220–225, 2012.
- [41] S. Cuylen, J. Metz, A. Hruby, and C. H. Haering, “Entrapment of Chromosomes by Condensin Rings Prevents Their Breakage during Cytokinesis,” *Dev. Cell*, vol. 27, no. 4, pp. 469–478, 2013.
- [42] A. Janssen, M. van der Burg, K. Szuhai, G. J. P. L. Kops, and R. H. Medema, “Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations,” *Science*, vol. 333, no. 6051. pp. 1895–1898, 2011.
- [43] M. Hotz and Y. Barral, “The Mitotic Exit Network: New turns on old pathways,” *Trends in Cell Biology*, vol. 24, no. 3. pp. 145–152, 2014.
- [44] S. Xu, H. K. Huang, P. Kaiser, M. Latterich, and T. Hunter, “Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in

- budding yeast," *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 329–332, 2000.
- [45] S. Yoshida and A. Toh-e, "Regulation of the localization of Dbf2 and mob1 during cell division of *saccharomyces cerevisiae*," *Genes Genet. Syst.*, vol. 76, no. 2, pp. 141–147, 2001.
- [46] F. C. Luca, M. Mody, C. Kurischko, D. M. Roof, T. H. Giddings, and M. Winey, "Saccharomyces cerevisiae Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 20, pp. 6972–6983, 2001.
- [47] R. Menssen, A. Neutzner, and W. Seufert, "Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 345–350, 2001.
- [48] S. Doxsey, "Re-evaluating centrosome function," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 9, pp. 688–698, 2001.
- [49] E. H. Hinchcliffe, F. J. Miller, M. Cham, A. Khodjakov, and G. Sluder, "Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase," *Science*, vol. 291, no. 5508, pp. 1547–1550, 2001.
- [50] A. Khodjakov, R. W. Cole, B. R. Oakley, and C. L. Rieder, "Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates," *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 59–67, 2000.
- [51] A. Khodjakov and C. L. Rieder, "Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 1, pp. 237–242, 2001.
- [52] R. Rappaport, "Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs," *J. Exp. Zool.*, vol. 234, no. 1, pp. 167–171, 1985.
- [53] T. Fujiwara, M. Bandi, M. Nitta, E. V Ivanova, R. T. Bronson, and D. Pellman, "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells," *Nature*, vol. 437, no. 7061, pp. 1043–1047, 2005.
- [54] S. I. Komarnitsky, Y. C. Chiang, F. C. Luca, J. Chen, J. H. Toyn, M. Winey, L. H. Johnston, and C. L. Denis, "DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 2100–2107, 1998.
- [55] A. S. Mah, J. Jang, and R. J. Deshaies, "Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 13, pp. 7325–7330, 2001.
- [56] F. C. Luca and M. Winey, "MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 29–46, 1998.
- [57] Z.-C. Lai, X. Wei, T. Shimizu, E. Ramos, M. Rohrbaugh, N. Nikolaidis, L.-L. Ho, and Y. Li, "Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 675–685, 2005.
- [58] T. Shimizu, L.-L. Ho, and Z.-C. Lai, "The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in *Drosophila*," *Genetics*, vol. 178, no. 2, pp. 957–965, 2008.
- [59] L. L. Ho, X. Wei, T. Shimizu, and Z. C. Lai, "Mob as tumor suppressor is activated at the cell membrane to control tissue growth and organ size in *Drosophila*," *Dev. Biol.*, vol. 337, no. 2, pp. 274–283, 2010.
- [60] C. Florindo, J. Perdigo, D. Fesquet, E. Schiebel, J. Pines, and A. A. Tavares, "Human

- Mob1 proteins are required for cytokinesis by controlling microtubule stability," *Journal of Cell Science*, vol. 125, no. 13. pp. 3085–3090, 2012.
- [61] A. Hergovich, R. S. Kohler, D. Schmitz, A. Vichalkovski, H. Cornils, and B. A. Hemmings, "The MST1 and hMOB1 Tumor Suppressors Control Human Centrosome Duplication by Regulating NDR Kinase Phosphorylation," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 20, pp. 1692–1702, 2009.
- [62] L. J. Wilmeth, S. Shrestha, G. Montañó, J. Rashe, and C. B. Shuster, "Mutual dependence of Mob1 and the chromosomal passenger complex for localization during mitosis.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 380–392, 2010.
- [63] A. Hergovich, M. R. Stegert, D. Schmitz, and B. A. Hemmings, "NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 253–264, 2006.
- [64] M. Praskova, F. Xia, and J. Avruch, "MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 311–321, 2008.
- [65] R. S. Kohler, D. Schmitz, H. Cornils, B. A. Hemmings, and A. Hergovich, "Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases.," *Mol. Cell Biol.*, vol. 30, no. 18, pp. 4507–4520, 2010.
- [66] J. Bothos, R. L. Tuttle, M. Ottey, F. C. Luca, and T. D. Halazonetis, "Human LATS1 is a mitotic exit network kinase," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 15, pp. 6568–6575, 2005.
- [67] A. Vichalkovski, E. Gresko, H. Cornils, A. Hergovich, D. Schmitz, and B. A. Hemmings, "NDR Kinase Is Activated by RASSF1A/MST1 in Response to Fas Receptor Stimulation and Promotes Apoptosis," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 23, pp. 1889–1895, 2008.
- [68] D. Zhou, C. Conrad, F. Xia, J. S. Park, B. Payer, Y. Yin, G. Y. Lauwers, W. Thasler, J. T. Lee, J. Avruch, and N. Bardeesy, "Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 425–438, 2009.
- [69] Y. Bao, K. Sumita, T. Kudo, K. Withanage, K. Nakagawa, M. Ikeda, K. Ohno, Y. Wang, and Y. Hata, "Roles of mammalian sterile 20-like kinase 2-dependent phosphorylations of Mps one binder 1B in the activation of nuclear Dbf2-related kinases," *Genes to Cells*, vol. 14, no. 12, pp. 1369–1381, 2009.
- [70] D. Yang, N. Rismanchi, B. Renvoisé, J. Lippincott-Schwartz, C. Blackstone, and J. H. Hurley, "Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1278–1286, 2008.
- [71] A. Hergovich, "MOB control: Reviewing a conserved family of kinase regulators," *Cellular Signalling*, vol. 23, no. 9. pp. 1433–1440, 2011.
- [72] A. Tavares, J. Goncalves, C. Florindo, A. A. Tavares, and H. Soares, "Mob1: defining cell polarity for proper cell division," *Journal of Cell Science*, vol. 125, no. 2. pp. 516–527, 2012.
- [73] A. F. Baas, J. Kuipers, N. N. Van Der Wel, E. Batlle, H. K. Koerten, P. J. Peters, and H. C. Clevers, "Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD," *Cell*, vol. 116, no. 3, pp. 457–466, 2004.

- [74] A. Gromley, A. Jurczyk, J. Sillibourne, E. Halilovic, M. Mogensen, I. Groisman, M. Blomberg, and S. Doxsey, "A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 3, pp. 535–545, 2003.
- [75] M. Carmena and W. C. Earnshaw, "The cellular geography of aurora kinases.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 842–854, 2003.
- [76] S. M. A. Lens, E. E. Voest, and R. H. Medema, "Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 12, pp. 825–841, 2010.
- [77] D. G. Jay, "Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 15, pp. 5454–5458, 1988.
- [78] Y. Dorsett and T. Tuschl, "siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 4, pp. 318–329, 2004.
- [79] Y. Sano, W. Watanabe, and S. Matsunaga, "Chromophore-assisted laser inactivation--towards a spatiotemporal-functional analysis of proteins, and the ablation of chromatin, organelle and cell function.," *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. Pt 8, pp. 1621–9, 2014.
- [80] P. Yan, Y. Xiong, B. Chen, S. Negash, T. C. Squier, and M. U. Mayer, "Fluorophore-assisted light inactivation of calmodulin involves singlet-oxygen mediated cross-linking and methionine oxidation," *Biochemistry*, vol. 45, no. 15, pp. 4736–4748, 2006.
- [81] T. Surrey, M. B. Elowitz, P. E. Wolf, F. Yang, F. Nédélec, K. Shokat, and S. Leibler, "Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 8, pp. 4293–4298, 1998.
- [82] M. E. Bulina, D. M. Chudakov, O. V Britanova, Y. G. Yanushevich, D. B. Staroverov, T. V Chepurnykh, E. M. Merzlyak, M. A. Shkrob, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov, "A genetically encoded photosensitizer.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 1, pp. 95–99, 2006.
- [83] O. Tour, R. M. Meijer, D. A. Zacharias, S. R. Adams, and R. Y. Tsien, "Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 12, pp. 1505–1508, 2003.
- [84] B. R. Martin, B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, and R. Y. Tsien, "Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1308–1314, 2005.
- [85] J. Lee, P. Yu, X. Xiao, and T. Kodadek, "A general system for evaluating the efficiency of chromophore-assisted light inactivation (CALI) of proteins reveals Ru(II) tris-bipyridyl as an unusually efficient 'warhead'.," *Mol. Biosyst.*, vol. 4, no. 1, pp. 59–65, 2008.
- [86] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson, "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo.," 2003.
- [87] E. Horstkotte, T. Schröder, J. Niewöhner, E. Thiel, D. G. Jay, and S. W. Henning, "Toward understanding the mechanism of chromophore-assisted laser inactivation--evidence for the primary photochemical steps.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, no. 2, pp. 358–366, 2005.

- [88] A. Keppler and J. Ellenberg, "Chromophore-assisted laser inactivation of ??-And ??-tubulin SNAP-tag fusion proteins inside living cells," *ACS Chem. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 127–138, 2009.

Anexo I

Nomenclatura dos MOBs

<i>Drosophila</i> (utilizado nesta dissertação)		Dmob2 ¹²		Mob3 ¹⁰		Mats	
Humano (utilizado nesta dissertação)	hsMOB1	hsMOB2	hsMOB3A	hsMOB3B	hsMOB3C	hsMOB4A	hsMOB4B
Humano (HUGO)	MOB4 (MOB family member 4, phocein) 2q33.1 Previous Symbols: PREI3, MOBKL3 MOB3, DKFZP564M112, CGI-95, 2C4D, PHOCN	MOB2 (MOB kinase activator 2) 11p15.5 Previous Symbols: hsMob2 (AJ580639) HCCA2 ¹¹	MOB3A (MOB kinase activator 3A) 19p13.3 Previous Symbols: hsMob3A MOBKL2A, MOB1C, MOB-LAK, moblak	MOB3B (MOB kinase activator 3B) 9p21.1 Previous Symbols: MOBKL2B, MOB1D, FLJ13204	MOB3C (MOB kinase activator 3C) 1p34.1 Previous Symbols: MOBKL2C, MOB1E	MOB1B (MOB kinase activator 1B) 4q13.3 Previous Symbols: MOBKL1A, MOB4A	MOB1A (MOB kinase activator 1A) 2p13.1 Previous Symbols: C2orf6, MOBKL1B, MOBKL1B, FLJ10788, MOB1, FLJ11595, Mob4B, Mats1

Anexo II

Ensaio de RNAi

RNAi				
PCRF26	Dia 0 Nº Células verdes	Dia 1 Nº Células verdes	Dia 2 Nº Células verdes	Dia 3 Nº Células verdes
Poço sem oligo	338	395	489	601
Poço com oligo 1	307	191	89	42
Poço com oligo 7	291	187	85	34

RNAi				
PCRF59	Dia 0 Nº Células verdes	Dia 1 Nº Células verdes	Dia 2 Nº Células verdes	Dia 3 Nº Células verdes
Poço sem oligo	395	443	549	681
Poço com oligo 1	396	420	568	690
Poço com oligo 7	494	286	97	46

RNAi				
PCRF25	Dia 0 Nº Células verdes	Dia 1 Nº Células verdes	Dia 2 Nº Células verdes	Dia 3 Nº Células verdes
Poço sem oligo	134	321	312	354
Poço com oligo 2	158	125	85	54
Poço com oligo 8	137	124	78	48

RNAi				
PCRF58	Dia 0 Nº Células verdes	Dia 1 Nº Células verdes	Dia 2 Nº Células verdes	Dia 3 Nº Células verdes
Poço sem oligo	145	188	212	238
Poço com oligo 2	141	195	258	289
Poço com oligo 8	143	125	86	45