

I. Introdução

1.1. Divisão Celular

Todos os organismos vivos, unicelulares ou multicelulares, são produtos de ciclos repetidos de crescimento celular e divisão, que se iniciaram há mais de três bilhões de anos, aquando do início da vida na Terra. O processo de divisão celular assegura, assim, a continuidade da vida, bem como a evolução de células e organismos.

1.1.1. Ciclo Celular

O ciclo celular representa a história de vida da célula. Este processo é de extrema importância, uma vez que as instruções genéticas para todas as características são passadas de célula para célula, durante várias gerações.

O ciclo celular é composto pelas fases: G₁, S, G₂ e M (figura 1.1). Na fase G₁, a célula cresce e as proteínas necessárias para a divisão são sintetizadas. Após esta fase as células podem sair do ciclo celular activo e passar a uma fase G₀, que é uma etapa estável em que as células estão num estado quiescente e mantêm um tamanho constante. As células podem permanecer em G₀ infinitamente ou voltar a entrar em G₁ e no ciclo celular activo. Após G₁, a célula entra na fase S (síntese de DNA), na qual o material genético e os centrossomas são duplicados. A fase final da interfase é a fase G₂, em que ocorrem vários eventos bioquímicos necessários para que a divisão ocorra.

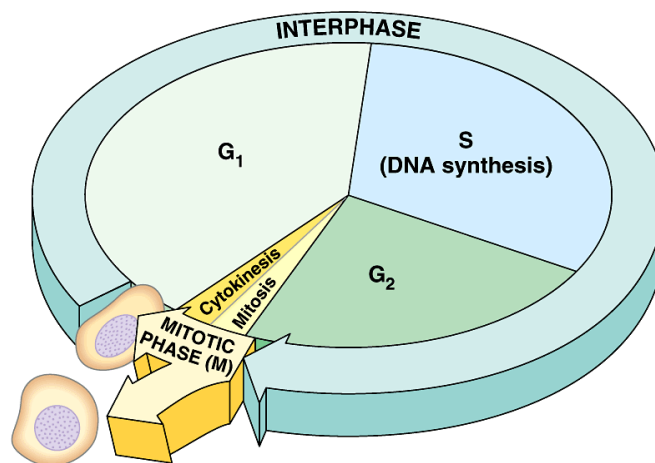


Figura 1.1 – Representação esquemática das fases do ciclo celular (G₁, S, G₂ e M).

Na fase M, os cromátídeos irmãos separam-se e, de seguida, a célula sofre divisão, através de um processo denominado citocinese.

A transição de uma fase do ciclo para a fase seguinte é coordenada, de modo a que todas as fases decorram numa ordem apropriada. Para tal, existem mecanismos denominados pontos de controlo, que monitorizam o ambiente celular e determinam se as condições são as apropriadas para que a célula possa prosseguir para a fase seguinte do ciclo. A principal função desses pontos de controlo é verificar se o genoma permanece intacto ao longo do ciclo e, cada um deles é constituído por três componentes: um mecanismo sensorial que detecta eventos anormais ou incompletos, como os danos no DNA, seguido de uma via de transdução de sinal, que transporta o sinal para o terceiro componente, o efector que solicita a paragem do ciclo celular até o problema estar resolvido (revisto em Garret, 2001).

O primeiro ponto de controlo ocorre na transição G1/S e é o principal sensor dos danos no DNA. Além disso, a célula também pode parar na fase S devido à replicação incompleta do DNA. Segue-se o ponto de controlo G2/M que monitoriza a fidelidade da replicação do DNA. Finalmente, o ponto de controlo de montagem do fuso ocorre durante a mitose se o fuso mitótico não foi formado correctamente.

1.1.2. Mitose

A mitose é o processo responsável pela divisão do material nuclear replicado, que em conjunto com a citocinese, permite que uma célula origine duas cópias geneticamente iguais a ela própria (figura 1.2) (revisto em Maiato, 2010). Este processo foi descrito e ilustrado em detalhe por Walter Flemming há mais de um século (Flemming, 1882), e actualmente sabe-se que é coordenado pelo fuso mitótico, uma máquina subcelular que utiliza os microtúbulos e vários motores moleculares e é o principal responsável pela segregação dos cromossomas durante a mitose, tendo que adquirir uma configuração bipolar de modo a repartir os cromossomas equitativamente pelas duas células filhas (revisto em Tanenbaum & Medema, 2010; Civelekoglu-Scholey & Scholey, 2010).

Assim, durante a profase, a primeira etapa da mitose, a cromatina condensa-se gradualmente em cromossomas bem definidos, ocorre a desintegração do invólucro nuclear e os centrossomas movem-se para pólos opostos da célula, iniciando a montagem do fuso mitótico através da polimerização dos microtúbulos.

Na metafase, os cromossomas são alinhados no centro do fuso, formando a placa equatorial. Quando todos os cromossomas estão ligados bilateralmente aos microtúbulos do fuso a célula está pronta para prosseguir para anafase, que começa quando ocorre a quebra da ligação entre os dois cromátídeos irmãos, que se separam e migram para pólos opostos do fuso.

A mitose termina com a telofase, que é marcada pela chegada dos cromossomas aos pólos do fuso. A membrana nuclear volta a formar-se, o DNA descondensa e o fuso mitótico despolimeriza. Posteriormente, iniciam-se os mecanismos que vão originar a divisão física em duas células filhas (citocinese).

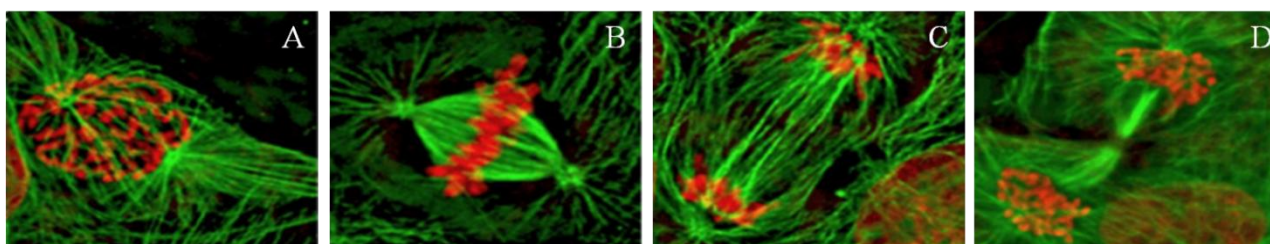


Figura 1.2 – Fases da Mitose. (A) Profase. (B) Metafase. (C) Anafase. (D) Telifase. O DNA está marcado a vermelho e os microtúbulos (tubulina) estão marcados a verde.

1.1.3. Microtúbulos em Mitose

Os microtúbulos são estruturas dinâmicas constituídas por dímeros de $\alpha\beta$ tubulina, indispensáveis para processos como mitose, transporte vesicular, mobilidade, forma e polaridade das células (revisto em Daire & Poüs, 2011). Estes polímeros podem transitar entre estados de polimerização e despolimerização, através de uma propriedade que é denominada “instabilidade dinâmica” (Mitchison & Kirschener, 1984). A transição entre um estado de polimerização para um estado de despolimerização denomina-se catástrofe, enquanto a transição de um estado de despolimerização para o estado de polimerização se chama salvamento (revisto em Walczak, 2000; Stanton, 2011).

As alterações na dinâmica dos microtúbulos são indispensáveis para a sua organização ao longo das diferentes fases do ciclo celular. Os rearranjos no citosqueleto dos microtúbulos durante a mitose controlam a segregação dos cromossomas, o posicionamento do anel contráctil e a clivagem da célula (revisto em Stanton *et al.*, 2011).

Em interfase os microtúbulos estão estáveis e têm um tempo de meia vida de 10 minutos, ao contrário do que acontece em mitose, onde os microtúbulos são muito dinâmicos e apenas polimerizam na área que envolve os cromossomas. Além disto,

quando as células entram em mitose a taxa de catástrofes aumenta aproximadamente de 7 a 10 vezes, resultando numa população de microtúbulos relativamente pequena e muito instável, com um tempo de meia vida de 60 segundos (revisto em Compton, 2000).

Esta dinâmica de polimerização é altamente regulada por várias proteínas que estabilizam ou destabilizam os microtúbulos. As MAPs (microtubule-associated proteins) ligam-se ao longo dos microtúbulos e aumentam a sua estabilidade (revisto em Daire & Poüs, 2011). Por exemplo, a XMAP215, que inibe os salvamentos e promove o crescimento e o encurtamento nas extremidades positivas dos microtúbulos, quando depletada provoca a desagregação do fuso ou a formação de fusos pequenos (Vasquez *et al.* 1999). Outra proteína que afecta esta dinâmica é a Op18/Statsmin, uma proteína destabilizadora dos microtúbulos, cuja actividade é regulada em todo o ciclo celular, embora pareça estar mais activa durante a interfase (Marklund *et al.*, 1996). Esta proteína é abundante e altamente induzida em algumas células tumorais e é um substrato para várias proteínas cinases. O aumento na concentração de Op18/Statsmin não fosforilável provoca um aumento na formação de fusos mais pequenos, o que é provocado possivelmente pelo aumento na frequência das catástrofes e/ou diminuição na taxa de crescimento (Marklund *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997).

1.1.3.1. Estrutura do Fuso Mitótico

O fuso mitótico é uma estrutura baseada nos microtúbulos e, o seu correcto funcionamento é essencial para a segregação dos cromossomas durante a mitose e a meiose e, como tal, é fundamental para assegurar a propagação das células e das espécies.

Os fusos típicos das células animais contêm mais de 3000 microtúbulos divididos entre as suas duas metades, e os microtúbulos do fuso têm uma polaridade uniforme, com a extremidade negativa junto dos pólos e a extremidade positiva próxima do córtex da células ou dos cromossomas. Assim sendo, de acordo com a posição da extremidade positiva dos microtúbulos existem três classes de microtúbulos no fuso mitótico (figura 1.3). A primeira classe é composta pelos microtúbulos dos cinetocoros, que se estendem desde o pólo do fuso até aos cromossomas, onde contactam com os cinetocoros. A segunda classe engloba os microtúbulos astrais, que provêm do pólo do fuso e se prolongam até ao centro da célula através da sua periferia. As suas

extremidades positivas interagem com o córtex da célula, o que parece ser importante para o posicionamento do fuso e para a determinação da localização do sulco de clivagem durante a citocinese. Finalmente, a terceira classe corresponde aos microtúbulos interpolares, que se estendem desde um pólo do fuso até ao pólo contrário. Estes microtúbulos normalmente associam-se em grupos de seis (durante a metafase), com preferência para as interações antiparalelas, o que pode ser importante para a manutenção da estrutura do fuso (revisto em Rogers *et al.*, 2005).

Ao longo do ciclo celular, a célula sofre alterações na organização e comportamento dos microtúbulos que são essenciais para a montagem do fuso. Assim, ocorre uma alteração no número de centros organizadores dos microtúbulos (MTOCs), que passam de um centrossoma na interfase a dois na mitose e, a população de microtúbulos estáveis na interfase é substituída por uma população de microtúbulos altamente dinâmica na mitose (revisto em Compton, 2000).

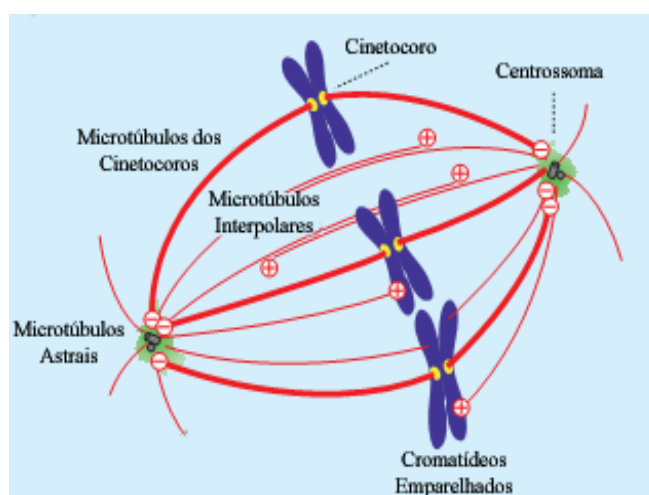


Figura 1.3 – Representação esquemática da anatomia do fuso mitótico durante a metafase, evidenciando os diferentes tipos de microtúbulos (adaptado de Gadde & Heald, 2004).

Na profase, a rede de microtúbulos da interfase vai dismantelar-se e os ásteres dos microtúbulos vão começar a formar-se nos centrossomas. A prometáfase é marcada pela quebra do invólucro nuclear e pelo fim da organização dos microtúbulos no fuso mitótico, o que permite que os microtúbulos do fuso comecem a interagir e a capturar os cromossomas pelo cinetocoro, alinhando-os na placa metafásica (revisto em Cassimeris & Skibbens, 2003 e Tanaka, 2010).

Na metafase o fuso é altamente dinâmico, com grandes flutuações e fluxos direccionais nos processos físicos e químicos, e a quantidade e posição de todos os componentes do fuso é relativamente constante ao longo do tempo (revisto em Dumont

& Mitchison, 2009). No início da anáfase, o fuso mitótico volta a sofrer várias alterações estruturais. Os microtúbulos astrais começam a crescer através do córtex da célula, e o feixe de microtúbulos anti-paralelos denominado fuso central é formado entre os cromossomas que estão a ser segregados. Essas estruturas do fuso em anáfase induzem a activação de pequenas GTPase Rho que desencadeiam a formação do anel contráctil de actina e miosina. Quando o sulco de clivagem atinge o centro da célula, e em conjunto com os microtúbulos do fuso central, forma-se uma estrutura especializada chamada midbody. Assim, o fuso central desempenha várias funções essenciais na citocinese, desde a sua iniciação até à sua finalização (revisto em Douglas & Mishima, 2010).

A montagem do fuso engloba uma variedade de actividades de proteínas e enzimas que influenciam a organização e a dinâmica dos microtúbulos, directa ou indirectamente, denominados motores moleculares (Inoue & Salmon, 1995).

As primeiras proteínas motoras identificadas foram as dineínas, que interagem com as extremidades negativas e, mais tarde, foram identificadas as cinesinas, que actuam tanto nas extremidades negativas como nas extremidades positivas (revisto em Gadde & Heald, 2004). Estas proteínas estabelecem ligações cruzadas entre os microtúbulos *in vivo* e *in vitro*, e a alteração da sua função provoca uma perda de coesão entre os pólos do fuso, o que resulta em feixes de microtúbulos projectados para fora do pólo como agulhas (revisto em Compton, 2000).

A dineína citoplasmática estabelece estas ligações cruzadas através da associação com a dinactina, uma proteína iniciadora da actividade citoplasmática da dineína, e com a NuMA (ou o seu homólogo Mud na *Drosophila*), uma proteína nuclear que se associa com o aparelho mitótico (Gaglio *et al.* 1995; Zeng, 2000; Bowman *et al.*, 2006). Este motor molecular localiza-se nos microtúbulos do fuso, no córtex e nos cinetocoros, e desempenha várias funções mitóticas. A dineína dos cinetocoros parece transportar cromossomas ao longo dos microtúbulos do fuso e controlar o ponto de controlo do fuso (revisto em Goshima & Scholey, 2010). Por exemplo, em extractos de ovos de sapo, o complexo formado pela dineína, dinactina e NuMA é essencial para a organização do pólo do fuso (Merdes *et al.*, 1996).

A cinesina 5 (kin5) actua na extremidade positiva dos microtúbulos, e é um factor determinante do tamanho do fuso em metafase. Por sua vez a cinesina 14 (kin14), que é direccionada para a extremidade negativa, parece ser antagonista da cinesina 5 durante a montagem e manutenção do fuso, e a sua depleção das células de mamíferos

provoca o encurtamento dos fusos, devido à inibição do deslizamento entre os microtúbulos paralelos dos centrossomas e os microtúbulos do cinetocoro (revisto em Goshima & Scholey, 2010).

1.1.4. Entrada em mitose

A iniciação da mitose nas células eucariotas é controlada pela activação ou inactivação de um membro de uma família de proteínas cinases conservadas conhecidas como CDKs (ciclin-dependent kinases). A activação das CDKs requer a acumulação de ciclinas mitóticas. Nas células animais existem duas ciclinas mitóticas, a ciclina A e a ciclina B (revisto em Timofeev *et al.*, 2010).

A ciclina A liga-se à Cdk2 (ou ao seu homólogo *cdc2* em *Drosophila*), para promover a entrada na mitose e, como tal, o seu pico de expressão é na transição G2/M. Esta ciclina é degradada imediatamente após a quebra do invólucro nuclear (den Elzen & Pines, 2001).

Nas células animais existem três ciclinas B diferentes: B1, B2 e B3 (revisto em Gunbin *et al.*, 2011). A ciclina B1 é uma proteína essencial que parece ser responsável pela maioria das actividades da Cdk1 no citoplasma e no núcleo (revisto em Takizawa & Morgan, 2000). A ciclina B2, por sua vez, é uma proteína não essencial que se associa com o aparelho de Golgi, e provavelmente desempenha uma função na remodelação do aparelho de Golgi durante a mitose (Jackman *et al.*, 1995). A ciclina B3 partilha propriedades das ciclinas A e B, e está localizada no núcleo durante o ciclo celular (Gallant & Nigg, 1994).

Durante a interfase, o complexo Cdk1-ciclina B (ou Cdc2-ciclina B na *Drosophila*) está localizado no citoplasma, contudo quando a mitose é iniciada este complexo é translocado para o núcleo, estando envolvidos na quebra do invólucro nuclear, condensação dos cromossomas e formação do fuso mitótico (revisto em Takizawa & Morgan, 2000)

A regulação da Cdk1, nos mamíferos, requer fosforilação, quer para a sua activação como para a sua inibição. Assim sendo, a fosforilação no resíduo Thr161 permite uma associação estável com a ciclina B, enquanto a fosforilação inibitória nos resíduos Tyr14 e Tyr15 restringem a sua actividade catalítica (Mueller *et al.*, 1995). Estas fosforilações, tanto nas células de mamífero como na *Drosophila*, são levadas a cabo pelas proteínas cinases Wee1 e Myt1, e é necessária a desfosforilação desses locais pela enzima Cdc25 (ou o seu homólogo String na mosca), para que a Cdk1 (ou Cdc2)

seja activada e o ciclo celular prossiga normalmente (Lew & Kornbluth, 1996; Edgar et al., 1994; Reed, 1995). A Cdc25, por sua vez, é activada pelo próprio complexo Cdk1-Ciclina B (Hoffman et al., 1993). A localização celular de estes reguladores do complexo Cdk1-ciclina B (Cdc2-ciclina B) parece ser importante para proteger a célula de uma mitose precoce (revisto em Lim & Surana 2003).

1.1.5. Transição Metafase-Anafase

A separação simultânea dos cromátídeos irmãos na transição metafase-anafase é um dos eventos mais dramáticos do ciclo celular, pois é um evento irreversível e tem que ser altamente regulado, uma vez que os erros gerados neste processo vão ser prejudiciais para as células filhas.

Na metafase, todos os cromossomas têm que estabelecer uma ligação bilateral com o fuso mitótico, que é mediada pelas conexões entre os cinetocoros e os microtúbulos do fuso (revisto em Lew & Burke, 2003). Os microtúbulos vão exercer forças de tensão nos cromossomas, direccionando-os para os pólos, de modo a que ocorra a separação dos cromátídeos irmãos. Além das forças de tensão, existem também forças de coesão entre os cromátídeos, que impedem a sua separação até que tenham sido estabelecidas todas as ligações ao fuso (revisto em Oliveira & Nasmyth, 2010). Quando todos os cromossomas estão alinhados na placa metafásica e ligados bilateralmente ao fuso, a coesão entre os cromátídeos irmãos desaparece e ocorre a segregação dos cromossomas para os pólos opostos da célula, possibilitando a transição metafase-anafase (revisto em Musacchio & Hardwick, 2002 e Nezi & Musacchio, 2009).

1.1.5.1. Ponto de Controlo de Montagem do Fuso – SAC

Quando a ligação bilateral dos cromossomas aos pólos do fuso é comprometida, a célula activa o ponto de controlo de montagem do fuso: o SAC (Spindle-Assembly Checkpoint), cujas proteínas vão emitir um sinal global ao longo da maquinaria mitótica para atrasar a progressão da célula para anafase, até que todos os cromossomas estejam correctamente ligados aos pólos do fuso (revisto em Musacchio & Hardwick, 2002).

As proteínas MAD (*Mitotic Arrest Deficient*), Mad1, Mad2 e Mad3, e BUB (*Budding Uninhibited by Bensimidazole*), Bub1 e Bub3, foram identificadas em rastreios genéticos em *S. pombe* e *S. cerevisiae*, e são consideradas os componentes centrais do ponto de controlo do fuso (revisto em Bharadwaj & Yu, 2004 e Matsun &

Stukenberg, 2011). Durante uma mitose normal, estas cinco proteínas estão localizadas nos cinetocoros, e os seus níveis aumentam nos cinetocoros que não estão ligados aos pólos do fuso (Cleveland et al., 2003), gerando um sinal inibidor da anafase (*wait anaphase*) que se difunde pelo citosol mitótico (revisto em Baker et al., 2007). Além das proteínas referidas, foram identificadas outros componentes, como o Zw10 e o Rod, Mps1, Prp4, entre outras (revisto em Musacchio & Hardwick, 2002 e Bharadwaj & Yu, 2004).

Quando ocorrem danos no fuso, ou a ligação dos cromossomas ao fuso é monopolar, a acção combinada das proteínas referidas atrasa o início da anafase, mantendo a coesão entre os cromátídeos irmãos, uma vez que estas proteínas se ligam ao Cdc20, impedindo a activação do APC/C (*Anaphase Promoting Complex or Cyclosome*) (revisto em Musacchio & Hardwick, 2002 e Bharadwaj & Yu, 2004). Como o APC/C é inibido, não ocorre a proteólise das proteínas específicas envolvidas na disjunção dos cromossomas, iniciação da citocinese e saída da mitose (revisto em Pines & Rieder, 2001 e Rahmani et al., 2009). Assim, quando todos os cromossomas estão correctamente alinhados na placa metafásica, o SAC é inactivado e a célula é, finalmente, capaz de transitar para anafase.

1.1.5.2. APC/C (Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome)

A transição de metafase para anafase é desencadeada pela activação do APC/C, uma ubiquitina ligase E3 responsável pela proteólise de várias proteínas inibitórias, como a ciclina B e a securina (revisto em Vodermaier, 2004 e Maresca & Salmon, 2010). Estas reacções de ubiquitinação requerem três tipos de enzimas: a enzima activadora da ubiquitina (E1), a enzima que conjuga a ubiquitina (E2) e a ubiquitina ligase (E3). A ubiquitina liga-se inicialmente a E1, sendo depois transferido para E2 que, em conjunto com a ubiquitina ligase (E3), catalisa a formação de uma ligação entre a ubiquitina e o substrato, facilitando a transferência da ubiquitina para o substrato (revisto em Baker et al. 2007).

Para realizar a proteólise, o APC/C precisa da Cdc20 e da Cdh1, que funcionam como activadores de várias etapas do ciclo celular. A Cdc20 inicia a degradação dependente do APC na transição metafase-anafase, mediando a degradação da securina e das ciclinas mitóticas e, por isso, exercendo um papel central no controlo da entrada e saída da anafase (revisto em Matsun & Stukenberg, 2011).

Assim sendo, a inativação de várias subunidades do APC pode provocar uma paragem do ciclo celular em metafase. Esta paragem parece ser desencadeada por inibidores da anafase, que têm que ser degradados para que o ciclo celular prossiga.

1.1.5.3. Inibidores da Anafase

Inicialmente, pensou-se que a ciclina B poderia ser um inibidor da anafase, contudo verificou-se que quando se altera a sequência consenso de destruição da ciclina B que é reconhecida pelo APC, impedindo a sua degradação, não ocorre uma paragem em metafase, mas sim no final da anafase. Assim, se a ciclina B não é a responsável pela paragem da célula em metafase, é possível que existam outras proteínas que desempenhem essa função (revisto em Farr & Cohen-Fix, 1999).

Nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* foram identificadas as proteínas Pds1 (Choen-Fix et al., 1996) e Cut2 (Funabiki et al., 1996), respectivamente. Estas proteínas pertencem à família das securinas e, apesar de serem pouco homólogas entre si, ambas possuem uma sequência consensos de destruição que é reconhecida pelo APC. Quando esta sequência consensos está alterada e as proteínas não são degradadas, ocorre uma paragem da célula em metafase porque os cromátídeos irmãos não se separam (Choen-Fix et al., 1996; Funabiki et al., 1996), o que sugere que as securinas são as proteínas responsáveis pela inibição da anafase.

Estas securinas interagem com as separases, uma classe de proteínas responsável pela clivagem da coesina no início da anafase (revisto em Uhlmann, 2001). Na *S. cerevisiae* foi identificada a separase Esp1, que medeia a clivagem da Scc1, uma proteína responsável pela coesão dos cromátídeos irmãos e, como tal, a sua clivagem vai permitir a migração dos cromátídeos irmãos para os pólos opostos da célula e, em consequência, a célula vai transitar de metafase para anafase. A actividade de Esp1 é bloqueada por Pds1 (Yamamoto et al., 1996). A proteína Pds1 está, assim, envolvida não só na iniciação da anafase, mas também na saída de mitose (Cohen-Fix & Koshland, 1999).

Por sua vez, na *S. pombe* foi identificada a separase Cut1, que é inibida por Cut2, e parece ser importante para modular a actividade das proteínas motoras da anafase e para a dinâmica dos microtúbulos, de modo a aumentar a tensão gerada pelos microtúbulos do fuso nos cinetocoros (Kumada et al., 1998).

Estas proteínas inibidoras da anafase nas leveduras são destruídas pelo APC/C, que permite que as separases se mantenham livres para destruir as coesinas e,

consequentemente, promover a separação dos cromatídeos irmãos e a transição para anafase (revisto em Uhlmann, 2001). Na *Drosophila melanogaster*, foi identificada a proteína Pim (Pimples), um inibidor da anafase com propriedades semelhantes às de Pds1 e Cut2, o que indica que é possível que o mesmo modelo de acção esteja conservado desde as leveduras até às células animais (Stratmann & Lehner, 1996 e Leismann & Lehner 2003).

1.1.6. Citocinese

A citocinese, a ultima etapa do ciclo celular, é o processo pelo qual uma célula se divide fisicamente, originando duas células filhas. A execução da citocinese varia de acordo com o organismo, contudo os mecanismos subjacentes estão altamente conservados nos eucariotas (figura 1.4).

Nas células animais, a citocinese pode ser dividida em quatro etapas. Primeiro é escolhido o local de divisão, geralmente no equador da célula, onde vai ser formado o sulco de clivagem. Este sulco é constituído por actina, miosina e outras proteínas organizadas num anel contráctil denominado anel de actomiosina, que vai contrair gerando uma barreira entre os conteúdos citoplasmáticos de cada célula filha. Na etapa final da citocinese, intitulada abscisão, o sulco vai ser fechado, originando duas células filhas separadas fisicamente (revisto em Guertin *et al.*, 2002 e Oliferenko *et al.*, 2009).

Na levedura *S. pombe*, o processo de citocinese é semelhante ao das células animais, pois o anel de actomiosina também é posicionado no equador da célula. Além disso, estas células também sintetizam um septo que, quando o anel de actomiosina contrai, promove a formação da parede celular das células filhas. Este septo é digerido no final da citocinese por enzimas digestivas, permitindo a separação física das duas células filhas (revisto em Guertin *et al.*, 2002 e Oliferenko *et al.*, 2009).

Na *S. cerevisiae*, ao contrário do que acontece nas células animais e em *S. pombe*, a divisão ocorre por gemulação. Nestas células, o local de gemulação é definido antes de se iniciar a divisão. Assim sendo, a gémula cresce gradualmente, de uma forma polarizada, para fora do córtex, e o anel contráctil é formado no pescoço da gémula. O septo de divisão sintetizado atrás do anel de constrição e, tal como acontece na *S. pombe*, também vai ser digerido por enzimas para que ocorra a separação das células (revisto em Wang *et al.*, 2003 e Oliferenko *et al.*, 2009).

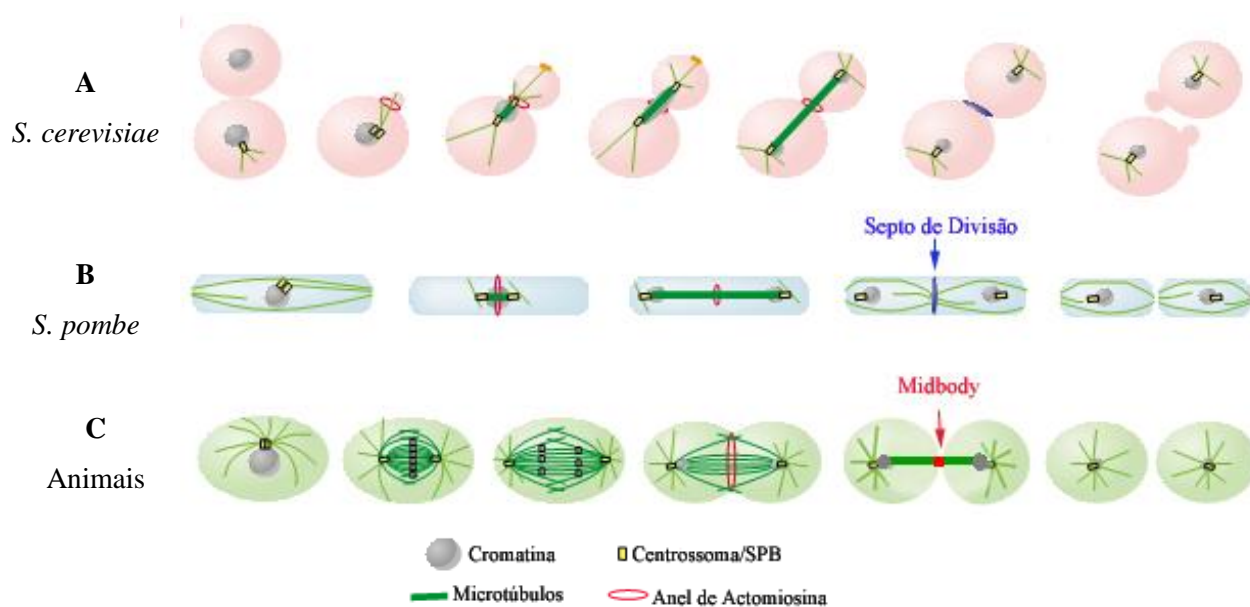


Figura 1.4 – Representação esquemática dos mecanismos gerais da citocinese em eucariotas. Estão representados os mecanismos de *S. cerevisiae* (A), *S. pombe* (B) e animais (C) (adaptado de Wang *et al.*, 2003).

Como está descrito anteriormente, o objectivo e o mecanismo base da citocinese são comuns nos eucariotas, contudo o processo de escolha do local de divisão varia de acordo com o organismo.

Nas células animais, existem três modelos para explicar o posicionamento do sulco de clivagem: o modelo de relaxamento astral (proposto por White e Borisi), o modelo de estimulação equatorial (sugerido por Rappaport) e o modelo em que a estimulação equatorial se obtém através de sinais que emergem da zona mediada do fuso (revisto em Oliferenko *et al.*, 2009). Em todos estes modelos é o fuso mitótico que especifica a posição do sulco de clivagem, contudo a função dos microtúbulos varia de acordo com o modelo. O modelo da relaxação astral sugere que os microtúbulos astrais do aparelho mitótico induzem uma relaxação do córtex, que produz uma diferença de tensão entre os pólos e o equador da célula, resultando na sua contracção. No modelo proposto por Rappaport, o modelo da estimulação equatorial, é sugerido que os sinais emitidos pelos microtúbulos astrais induzem a posição do sulco de clivagem. Estes sinais emitidos parecem ser mais elevados no equador da célula, ou seja, no local onde vai ser formado o anel contráctil. Por sua vez, o terceiro modelo, tal como a sua denominação indica, propõe que são os sinais que provêm da região mediana do fuso que determinam a posição do sulco de clivagem (revisto em Guertin *et al.*, 2002). Estes três modelos parecem coexistir na Natureza, uma vez que surgiram da interpretação de resultados obtidos através de experiências realizadas em diferentes modelos animais,

contudo ainda não se sabe em concreto qual ou se apenas um dos modelos explica melhor o mecanismo de definição do plano de clivagem nas células animais.

Em *S. pombe*, o local de divisão é definido pela posição do núcleo, que se mantém no centro da célula devido às forças exercidas pelos microtúbulos (Tran *et al.*, 2001). Isto é consistente com o facto de em leveduras mutantes, em que o núcleo não está bem posicionado, o local da divisão ocorrer sempre de acordo com a posição do núcleo, e não no centro da célula (Chang *et al.*, 1996). A definição do local de divisão é influenciada pela proteína Mid1, que durante a interfase e no início da mitose, varia a sua localização entre o núcleo e a região cortical do citoplasma próxima do núcleo. Durante a mitose, Mid1 é fosforilada e sai do núcleo, através da acção da cinase Plo1, passando a localizar-se no córtex da célula e sobrepondo-se ao núcleo, local para onde vão ser recrutadas as proteínas envolvidas na formação do anel de actomiosina e, sendo desta forma, especificado o local de clivagem (revisto em Guertin *et al.*, 2002 e Goyal *et al.*, 2011).

Por sua vez, na *S. cerevisiae*, o local de divisão é determinado logo no início do ciclo celular, pelo local da divisão anterior. Na fase G1, a cascata de sinalização da GTPase promove a formação de um anel de septinas no córtex da célula, próximo do local da divisão anterior. O anel de septinas vai promover a formação da nova gémula e, à medida que esta nova gémula cresce para fora do córtex da célula mãe, o pescoço da gémula vai tornar-se o próximo local de citocinese (revisto em Guertin *et al.*, 2002 e Oliferenko *et al.*, 2009).

Após a definição do local de divisão, vai ser formado um anel contráctil de actomiosina, que tanto em leveduras como em células animais promove a separação física entre as duas células filhas. Além disso, ocorre a formação do sulco de clivagem, que depende das proteínas passageiras dos cromossomas e das proteínas motoras. As proteínas passageiras dos cromossomas têm uma localização bastante dinâmica durante a mitose, e são detectadas inicialmente nos cromossomas e nos centrossomas e, no final da divisão no sulco de clivagem. As proteínas motoras, por sua vez, são necessárias para a manutenção da zona mediana do fuso. Finalmente, para que a divisão entre as duas células filhas estar completa, a célula tem selar o citoplasma que as une. Isto é feito através de uma interacção entre o anel contráctil e a membrana plasmática. Assim, as vesículas membranares vão ser transportadas para o sulco de clivagem, onde se vão fundir com a membrana existente, aumentando a área da membrana e permitindo a

separação das duas células filhas (revisto em Straight, & Field, 2000; Glotzer, 2001 e Guertin *et al.*, 2002)

1.1.6.1. Coordenação da Citocinese com a Mitose

De modo a assegurar que cada célula filha vai receber a quantidade certa de material genético e de material citoplasmático, as células têm que coordenar a mitose com a citocinese, no tempo e no espaço. No final da mitose, as células têm que descondensar os seus cromossomas, re-formar o invólucro nuclear e remodelar o seu fuso mitótico para a interfase, e tudo isto ocorre em simultâneo com a citocinese. Assim, embora não se saiba exactamente como é que a mitose e a citocinese são coordenadas, sabe-se que as cascatas de sinalização de *S. cerevisiae* MEN (Mitotic Exit Network) e de *S. pombe* SIN (Septation Initiation Network) contribuem para que estes organismos consigam essa coordenação (figura 1.5).

1.1.6.2. MEN (Mitotic Exit Network)

Na levedura *S. cerevisiae*, a via de transdução de sinal conhecida como MEN (Mitotic Exit Network) controla a saída da mitose, assegurando que esta etapa só ocorre após ter sido iniciada a separação dos cromatídeos irmãos (revisto em Bardin & Amon, 2001 e Bosi & Li, 2005). Esta via é uma cascata de cinases Gap, cujos componentes estão localizados no SPB e no pescoço da gémula (McCollum & Gould, 2001). A via MEN é constituída por quatro proteínas cinases (Cdc5, Cdc15, Dbf2 e Dbf20), uma GTPase (Tem1), uma GEF (Lte1), pelo complexo Bub2-Bfa1/Byr4, por uma fosfatase (Cdc14), uma proteína que liga a Dbf2 (Mob1) e por uma proteína estrutural, componente dos SPB, a Nud1 (revisto em Bardin & Amon, 2001 e Guertin *et al.*, 2002).

No topo desta cascata está a Tem1, uma GTPase que funciona como um interruptor, que está activo quando está ligado ao GTP e inactivo quando ligado ao GDP. A Tem1 é regulada negativamente pelo complexo Bub2-Bfa1/Byr4 e é activada quando se liga a Lte1 (Bardin *et al.*, 2000). Quando activa, a Tem1 recruta a Cdc15 para o SPB, promovendo a activação do complexo cinásico Dbf2/Mob1. O evento final da cascata MEN é activação da fosfatase Cdc14, que por sua vez altera o estado de fosforilação da CDK. Embora se saiba que a função da via MEN na anafase é inibir a libertação da fosfatase Cdc14 do núcleo, o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está definido. A fosfatase Cdc14 é, assim, o elemento central desta cascata de sinalização e, na interfase e no início da mitose está sequestrada e inactivada no

nucléolo pela acção de Cfi1/Nte1, um componente do complexo RENT (Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase) (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999).

Para promover a saída de mitose, Cdc14 desfosforila vários substratos das CDKs, incluindo as proteínas Sic1, Swi5 e Cdh1/Hct1. A proteína Sic1 é inibidora das CDKs que é degradado durante o ciclo celular e a sua desfosforilação permite a sua estabilização. Por sua vez, Swi5 é um factor de transcrição de Sic1, e a sua desfosforilação permite a sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, favorece a transcrição de Sic1. Finalmente, a Cdh1/Hct1 é um componente do APC que, quando desfosforilado pela Cdc14, se associa ao APC, e promove a proteólise das ciclinas mitóticas (revisto em Guertin *et al.*, 2002). Sabe-se que a inactivação do complexo Cdk1-Ciclina B é necessária para que ocorra citocinese, logo a via MEN, além do seu papel na saída de mitose, é essencial para a citocinese (em particular para a contracção do anel de actomiosina). Por exemplo, quando a função da via MEN é inibida e a saída de mitose é induzida por supressão artificial das CDKs mitóticas, a citocinese não ocorre (Shou *et al.*, 1999).

A Cdc5 também é necessária para a via MEN, e parece actuar em mais do que um ponto para regular a saída de mitose. Esta cinase promove a actividade cinásica de Dbf2 e parece activar o complexo Bub2/Bfa1 (revisto em Bardin & Amon, 2001).

1.1.6.3. SIN (Septation Initiation Network)

A SIN (Septation initiation Network) é uma cascata de sinalização semelhante à MEN, que foi identificada na levedura *S. pombe*, que assegura que a citocinese ocorra após a segregação dos cromossomas estar completa e após as CDKs mitóticas estarem inactivadas (revisto em Bardin & Amon, 2001). As proteínas que constituem esta cascata de sinalização são homólogas às da via MEN (figura 1.5B). Assim, os componentes de SIN são a GTPase Spg1, três proteínas cinases Cdc7, Sid1 e Sid2, as proteínas associadas Cdc14 (que se associa a Sid1) e Mob1 (que se associa a Sid2), a GAP Cdc16-Byr4 e as proteínas Cdc11 e Sid4 (possivelmente proteínas de ancoragem) (revisto em Bardin & Amon, 2001).

As leveduras com mutações em SIN são capazes de formar o anel de actomiosina, mas são incapazes de iniciar a constrição do anel e, por isso, aparecem células alongadas e multinucleadas, incapazes de formar um septo (revisto em Guertin *et al.*, 2002). A SIN é então uma cascata de sinalização que promove a septação e a

citocinese em *S. pombe*, apesar de não desempenharem nenhuma função na saída de mitose.

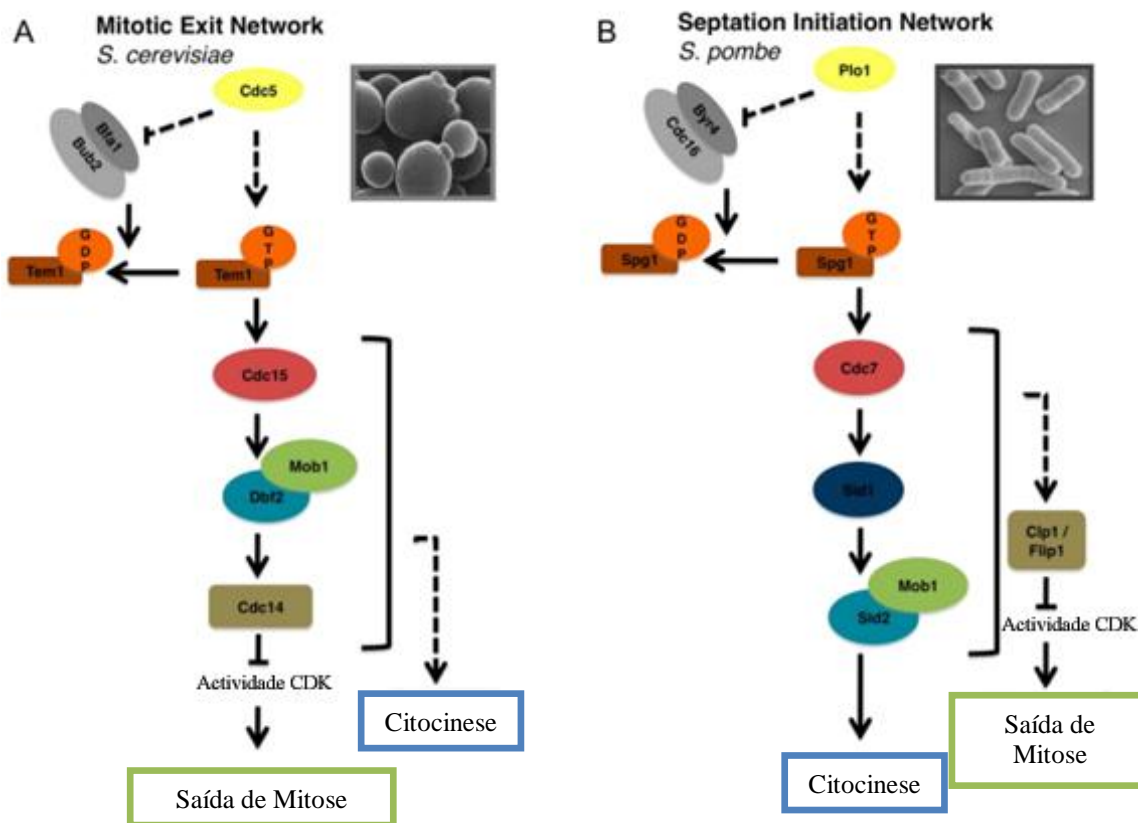


Figura 1.5 – Cascatas de sinalização que promovem a saída de mitose em leveduras. As proteínas que constituem as vias MEN (A) e SIN (B) são homólogas, tal como a sua função, apesar de a via SIN não ter uma função conhecida na saída de mitose.

1.2. Família Mob

As proteínas da família Mob pertencem a uma pequena família de proteínas não catalíticas altamente conservadas nos eucariotas (Luca & Winey, 1998). Estas proteínas partilham várias sequências muito semelhantes e são características de um domínio Mob conservado com cerca de 180 resíduos de aminoácidos. O facto de estas proteínas estarem conservadas sugere que elas desempenhem funções no estabelecimento e manutenção de características chave dos eucariotas durante a evolução (Ye *et al.*, 2009).

1.2.1. Mob1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A proteína Mob1 (Mps One Binder) foi a primeira proteína pertencente a esta família identificada na levedura *S. cerevisiae*, por Luca & Winey em 1998. Esta proteína foi identificada num rastreio de duplo-híbrido que visava identificar proteínas que interagissem com a cinase Mps1, uma proteína essencial para a duplicação do SPB

(spindle pole body) e para a regulação do ponto de controlo mitótico. Apesar da interacção verificada entre Mob1 e Mps1, a proteína Mob1 parece não ser necessária qualquer uma das funções referidas acima, embora seja necessária para a conclusão da mitose e para a manutenção da ploidia (Luca & Winey, 1998).

Mob1 interage física e geneticamente com a proteína Dbf2, uma cinase necessária para a correcta progressão através da mitose, especificamente durante a telofase (Toyn *et al.*, 1993). Esta associação física entre Mob1 e Dbf2, juntamente com a expressão semelhante ao longo do ciclo celular sugere que estas proteínas cooperam na regulação da parte final da mitose, ou seja, Dbf2 regula um passo crucial da telofase com o auxílio de Mob1 (Komarnitsky *et al.*, 1998). Mob1 desempenha, assim, um papel essencial na activação de Dbf2 pela cinase Cdc15. Além disso, Mob1 parece estabilizar Dbf2, uma vez que os níveis desta proteína são reduzidos significativamente em células mutantes para Mob1 (Mah *et al.*, 2001). Assim sendo, tal como Dbf2 (Zachariae & Nasmyth, 1999), também Mob1 é uma proteína essencial para o correcto funcionamento da via MEN (mitotic exit network) (Lee *et al.*, 2001; Luca *et al.*, 2001).

O gene Mob1 pertence à via MEN, e parece mediar o recrutamento e ligação de componentes críticos do anel contráctil. Leveduras mutantes em Mob1 apresentam defeitos na separação das células, que podem ser originados devido a uma falha na contracção do anel de actomiosina, que é aparentemente normal, visto ser possível detectar a actina, a Myo1 (miosina) e a Igp1 (IQGAP) correctamente localizadas. De acordo com as suas funções no ciclo celular, Mob1 localiza-se inicialmente no SPB e, quando a via MEN é activada, é localizada no pescoço da gémula. Estes dados suportam a ideia de que Mob1 e os genes da via MEN coordenam a execução de vários eventos associados com a transição da fase M para G1, sendo a citocinese uma possível função desta proteína (Luca *et al.*, 2001).

1.2.2. Mob1 de *Schizosaccharomyces pombe*

Na levedura *S. pombe* existe um gene Mob1 homólogo ao de *S. cerevisiae*, que também está envolvido no controlo da saída de mitose. Este gene foi identificado em simultâneo por dois grupos que utilizaram abordagens experimentais diferentes. Salimova e seus colaboradores (2000) identificaram Mob1 de *S. pombe* através de um rastreio genético de mutantes de septação, enquanto Hou *et al.* (2000) utilizaram um rastreio de duplo híbrido na procura de proteínas que interagem com Sid2, um homólogo de Dbf2 de *S. cerevisiae*.

Mob1 e Sid2 estão presentes nos SPB durante a mitose e, quando é activada a SIN, localizam-se no local de divisão da célula, o que sugere o seu possível envolvimento na transdução de sinal para iniciar a divisão celular a partir dos SPB até ao local de septação (Hou *et al.*, 2000).

Tal como em *S. cerevisiae*, Mob1 também é essencial em *S. pombe* e, células que perdem o gene apresentam um fenótipo típico dos mutantes na rede de sinalização de septação, uma vez que não conseguem formar o septo e falham a citocinese, originando a formação de células multinucleadas (Salimova *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000).

Como os mutantes Mob1 de *S. pombe* não apresentam qualquer defeito na saída de mitose e são apenas necessários para a citocinese é possível que, ao contrário do que acontece na *S. cerevisiae*, onde este gene está envolvido na regulação de vários eventos no final da mitose, a principal função de Mob1 de *S. pombe* seja o controlo da septação (Salimova *et al.*, 2000).

1.2.3. Mob2 de *Saccharomyces cerevisiae*

Luca & Winey (1998), além de Mob1, identificaram um segundo gene pertencente à mesma família, o gene Mob2. Este gene, ao contrário de Mob1, quando alterado não provoca nas leveduras problemas a nível da viabilidade, o que sugere que não é essencial (Luca & Winey, 1998). A sequência da proteína Mob2 é 90% idêntica à sequência de Mob1 (Racki *et al.*, 2000), e vários estudos demonstraram que a proteína Mob2 interage fisicamente com Cbk1, uma cinase muito semelhante a Dbf2 (Racki *et al.*, 2000; Colman-Lerner *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002). Cbk1 é uma proteína importante para o crescimento celular polarizado e é necessária para a separação final das células mãe e filha, um evento que se segue à citocinese e envolve a degradação do septo rico em quitina depositado entre as células mãe e filha (Racki *et al.*, 2000). Durante o crescimento polarizado, Mob2 e Cbk1 estão localizados no cortéx da gémula e, no fim da mitose localizam-se no pescoço da gémula e no núcleo da célula filha. Assim sendo, leveduras mutantes em Mob2 apresentam uma morfologia mais arredondada do que as leveduras normais, o que sugere que este gene exerce uma função no crescimento polarizado (Weiss *et al.*, 2002).

Mob2 (em conjunto com Cbk1) interage também com o factor de transcrição Ace2, regulando a sua activação e distribuição sub-celular específica nas células filhas,

que é necessária para a separação das células mãe e filha após a citocinese (Weiss *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001).

1.2.4. Mob2 de *Schizosaccharomyces pombe*

Na levedura *S. pombe*, tal como em *S. cerevisiae*, também foi identificado um segundo gene pertencente à família Mob, o gene Mob2. Ao contrário do que acontece em *S. cerevisiae*, nas leveduras de fissão, Mob2 é um gene essencial, envolvido no crescimento celular polarizado. A deleção de mob2 resulta na despolimerização dos citosqueletos de actina e de microtúbulos e na incapacidade das células crescerem numa forma polarizada. Além disso, a diminuição dos níveis da proteína Mob2 origina defeitos no crescimento bipolar. Assim, as leveduras mutantes em Mob2, em vez da morfologia cilíndrica normal, apresentam uma morfologia esférica. Por outro lado, a sobreexpressão de Mob2 atrasa o início da mitose e, como tal, as células vão ser maiores do que o normal. A proteína Mob2 localiza-se na periferia da célula e no citoplasma durante o ciclo celular, e na citocinese está localizado no local de divisão (Hou *et al.*, 2002).

Em semelhança ao que ocorre em *S. cerevisiae*, a proteína Mob2 de *S. pombe* também interage com uma cinase tipo Dbf2, a cinase Orb6. Mob2 e Orb6 formam um complexo que regula a polaridade da célula e a progressão do ciclo celular (Hou *et al.*, 2002). Estudos genéticos demonstraram que estas duas proteínas desempenham funções na regulação do início da mitose e que, para isso, necessitam da actividade da cinase Wee1, um inibidor da actividade mitótica de p34^{cdc2} (Verde, 1998). Em suma, Mob2 é uma proteína essencial em *S. pombe*, envolvida no crescimento celular polarizado e na regulação do início da mitose, através da interacção com Orb6.

1.2.5. Homólogos dos genes Mob em eucariotas superiores

Além dos genes Mob existentes em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, seres eucariotas unicelulares referidos anteriormente, já foram identificados mais de 270 membros da família Mob conservados nos eucariotas, desde os protistas até às plantas e animais (Ye *et al.*, 2009). Na figura 1.6 está representada uma árvore filogenética com algumas das proteínas da família Mob.

Nos protistas como a *Tetrahymena* existe um Mob (Tavares *et al.*, unpublished results), mas na *Giardia* existem pelo menos 3 genes Mob (Ye *et al.*, 2009), um número que pode ser comparado com o número de genes existentes nos invertebrados, como a

Drosophila melanogaster (Flybase) e a *C. elegans*, que têm quatro genes Mob. Geralmente os vertebrados têm mais membros da família Mob. Por exemplo, existem sete genes Mob nos genomas de *Mus musculus* (Mouse Genome Informatics), *Ratus norvegicus* (Rat Genome Database), *zebrafish* (The Zebrafish Model Organism Database) e humano (Florindo & Tavares, Human Genome Data Base, direct submission, 2003), oito no de *Xenopus* (Xenbase).

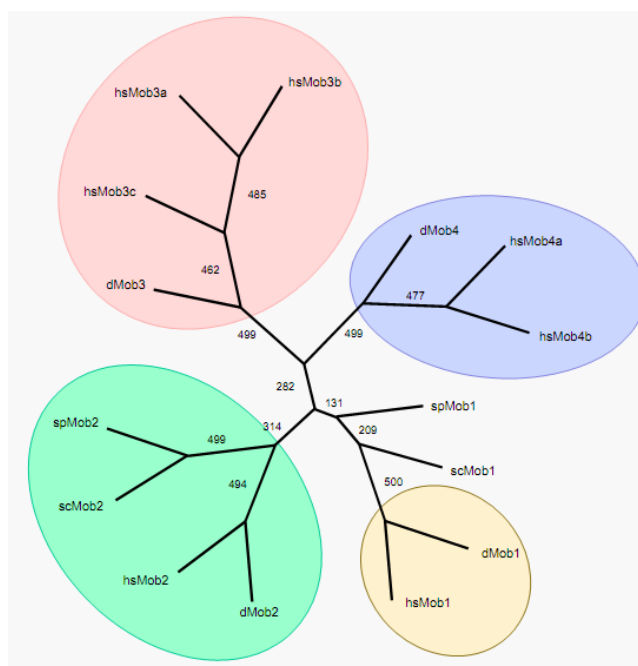


Figura 1.6 – Árvore filogenética evidenciando as distâncias relativas entre as proteínas tipo Mob de *Homo sapiens* (hs), *S. cerevisiae* (sc), *S. pombe* (sp) e *Drosophila melanogaster* (d). Nos eucariotas superiores existem 4 ramos da família das proteínas tipo Mob. O tamanho das linhas indica o grau de semelhança entre as sequências, e os valores indicados correspondem à distância genética entre os diferentes ramos da árvore (Florindo, 2004).

A função da maioria dos genes tipo Mob dos organismos referidos anteriormente ainda é ignorada, contudo, sabe-se por exemplo que na tetrahymena, o gene Mob é um factor essencial para o correcto estabelecimento do plano de divisão celular e para a citocinese (Tavares *et al.*, unpublished results).

Nas células humanas, verificou-se que a diminuição da expressão do gene hsMob1(phocein) origina uma falha no alinhamento dos cromossomas durante a metafase, um fenótipo comum ao observado aquando da ausência de várias proteínas que constituem o cinetocoro e que intervêm no SAC. Este defeito leva a que ocorra uma segregação incorrecta dos cromossomas durante a anafase e, conseqüentemente provoca uma distribuição desigual dos cromossomas pelas células filhas que origina aneuploidia (Florindo e Tavares, unpublished results). O gene hsMob2, por sua vez, parece estar

envolvido na separação dos centrossomas e, conseqüentemente na formação do fuso mitótico (Florindo, unpublished results). Relativamente a hsMob3 não existem, até à data, estudos publicados nesse gene, contudo resultados preliminares sugerem que esta proteína se localiza nos centrossomas, uma vez que durante as fases da mitose parece localizar-se nos pólos do fuso e, durante a telofase marca o midbody (Florindo, 2004).

Finalmente, hsMob4 está envolvido no processo de citocinese, uma vez que as células sem a expressão de Mob4 apresentam uma falha na abcisão. Esta falha na abcisão não impede, contudo, estas células ainda ligadas de entrar numa nova mitose, originando uma cadeia de células interligadas. Assim sendo, as proteínas hsMob4, embora sejam necessárias para a citocinese, não desempenham qualquer função na saída da mitose (Florindo, 2004).

No caso das plantas, foram clonados 3 genes Mob na alfafa (*Medicago sativa L.*) (Citterio *et al.*, 2005), e um gene Mob na *Arabidopsis thaliana* (Galla *et al.*, 2011), cujos produtos parecem estar envolvidos na reprodução das plantas, sendo expressos especificamente durante a meiose e a gametogénese (Citterio *et al.*, 2005).

1.2.6. Genes Mob de *Drosophila melanogaster*

O genoma de *D. melanogaster* codifica para quatro genes tipo Mob, que por sua vez, são traduzidos em quatro proteínas. As sequências das proteínas originadas estão previstas na base de dados de *Drosophila* (Flybase), e são designadas por CG3403, CG11711, CG4946 e CG13852, que correspondem, neste trabalho, a DMob1, DMob2, DMob3 e DMob4, respectivamente.

As informações publicadas sobre a função destes genes ainda são muito escassas, contudo parece que todos eles são essenciais para a *Drosophila*.

O gene Mob1 de *Drosophila melanogaster* está localizado no cromossoma 2R, e codifica para duas proteínas diferentes com cerca de 25 kDa. Este gene parece estar envolvido na organização dos microtúbulos do citosqueleto, morfogénese das projecções nos neurónios e regulação negativa do crescimento sináptico na junção neuromuscular (Schulte *et al.*, 2010). Está ainda descrito que as moscas mutantes no gene Mob1 apresentam defeitos na focagem dos microtúbulos e uma deslocalização dos centrossomas, além disso, os poucos machos que chegam à idade adulta são estéreis (Samora, 2007). Mob1 é, assim, necessário para a separação dos centrossomas e focagem das fibras K, o que corrobora a ideia de que esta proteína é fundamental para a

formação do fuso mitótico (Trammell *et al.*, 2008). Além das informações referidas sobre as funções desta proteína, existem também evidências experimentais da sua localização nos centrossomas (Domingues, 2005) e no citosol (Schulte *et al.*, 2010).

Por sua vez, DMob4 está localizado no cromossoma 3R e codifica para uma proteína com um peso molecular previsto de cerca de 25 kDa. Este gene parece funcionar como um modulador de cinases implicadas na supressão de tumores (Domingues, 2005) e, por isso, também é denominado Mats (Mob as tumor suppressor). Este gene está envolvido em processos biológicos como a apoptose, proliferação celular (Lai *et al.*, 2005) e transdução de sinal (He *et al.*, 2005).

Relativamente ao gene Mob3 não existem quaisquer dados publicados sobre a sua função, mas na flybase está referido que este gene está localizado no cromossoma 2L e codifica para uma proteína com cerca de 25 kDa. O gene Mob2 será descrito em pormenor no decorrer deste trabalho.

1.2.6.1. Gene Mob2 de *Drosophila melanogaster*

O gene Mob2 de *Drosophila melanogaster* (CG11711 na Flybase) está localizado no cromossoma 3L, na região genómica 68C12-68C13 e, por splicing, origina quatro transcritos alternativos, denominados Mob2-A, Mob2-B, Mob2-C e Mob2-D que, por sua vez, codificam quatro proteínas diferentes, com pesos moleculares superiores a 40 kDa, e com a região C-terminal em comum, mas com diferentes regiões N-terminais (figura 1.7).

Embora ainda existam poucos estudos sobre este gene em *Drosophila*, sabe-se que o Mob2 está envolvido na ligação de proteínas (He *et al.*, 2005) e, foi demonstrado experimentalmente que está implicado em vários processos biológicos como memória e aprendizagem olfactiva (Dubnau *et al.*, 2003), morfogénese celular (He *et al.*, 2005) e desenvolvimento dos fotorreceptores (Liu *et al.*, 2009).

Assim sendo, de acordo com o estudo realizado por Liu *et al.* (2009), a proteína Mob2 parece ser necessária para o desenvolvimento do olho, durante o estadio de pupa, devido à sua interacção com Crb (Crumbs), que desempenha um papel fundamental na morfogénese dos fotorreceptores (Izaddoost *et al.*, 2002; Pellikka *et al.*, 2002), e com Moe (Moesin), que estabelece ligações cruzadas entre os filamentos de actina e a membrana plasmática para determinar a forma da célula (Bretscher *et al.*, 2002). A diminuição da expressão de DMob2 altera a localização subcelular de Moe e Crb nas células fotoreceptoras (Liu *et al.*, 2009).

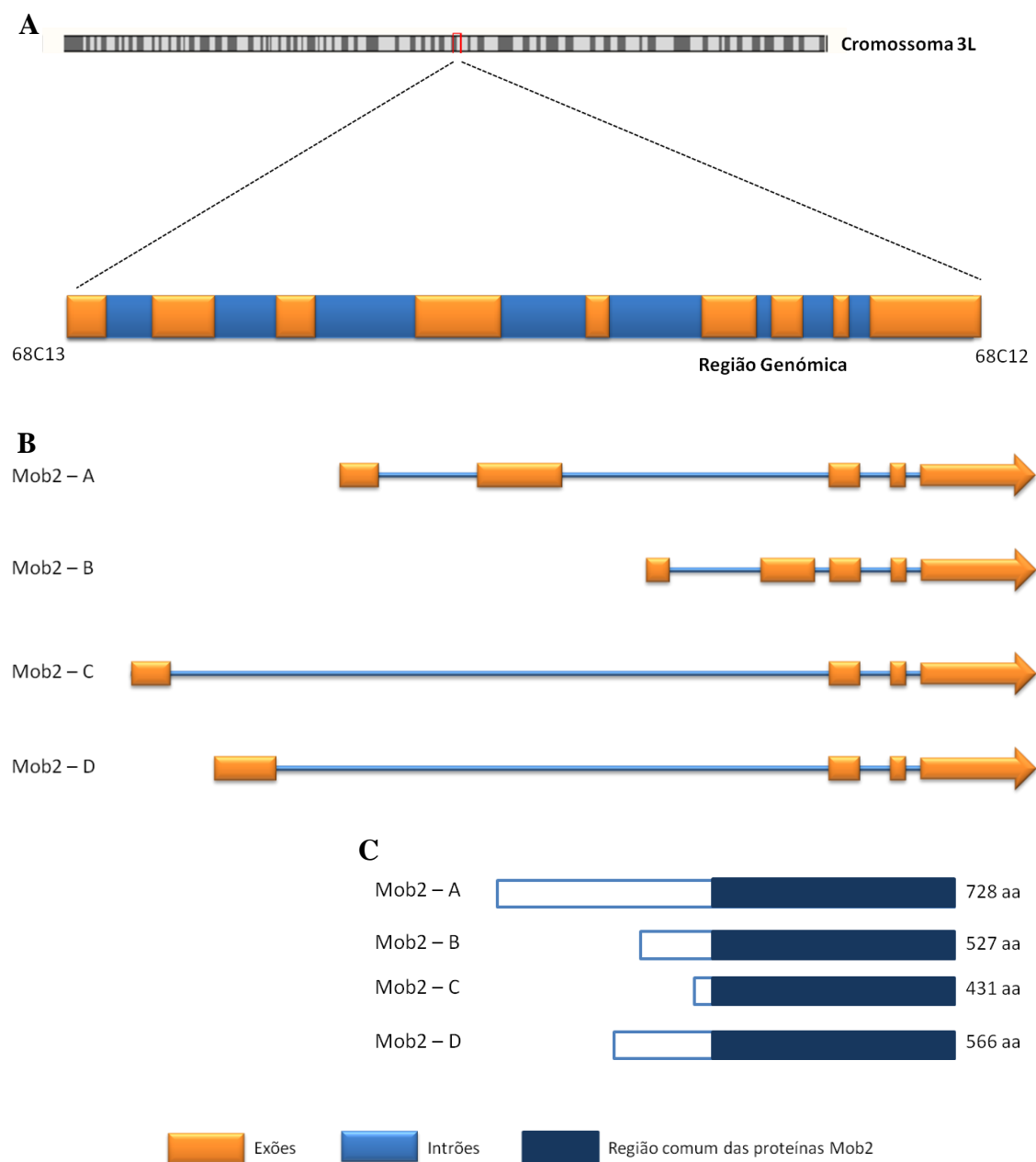


Figura 1.7 – Representação esquemática de DMob2. O gene Mob2 de *D. melanogaster* está localizado na região 68C do braço esquerdo do cromossoma 3 (A). A região genômica de DMob2 origina, por splicing alternativo, quatro transcritos (B), que codificam para quatro proteínas diferentes, que têm em comum a região C-terminal (C). A laranja estão representados os exões, a azul-claro os intrões e a azul-escuro está representada a região comum a todas as proteínas Mob2.

Mob2 interage também com a proteína Trc (Tricornered) (He *et al.*, 2005), uma cinase da família Ndr (Nuclear Dbf2 Related) na *Drosophila* (Geng *et al.*, 2000). Esta família inclui a Cbk1 e a Dbf2 de *S. cerevisiae*, a Orb6 de *S. pombe* e a Warts/Lats de *Drosophila* (revisto em He *et al.*, 2005). A proteína Trc é necessária para o desenvolvimento dos pelos epidermais, cerdas sensoriais, cerdas laterais, e arborização das dendrites (Geng *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2001; He & Adler, 2001; Emoto *et al.*,

2004). Como foi referido anteriormente, as proteínas da família Dbf2 são necessárias para a via de saída de mitose (Zachariae & Nasmyth, 1999).

Além da proteína Trc, Mob2 interage com a cinase Warts (Wts), um supressor de tumores, e as células mutantes para o gene que codifica esta proteína apresentam defeitos na morfogénese, como por exemplo cerdas deformadas e alteração na morfologia da cutícula (Justice *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995).

Mob2 parece assim ser de grande importância para a *Drosophila*, não só pelas várias razões apresentadas nos trabalhos referidos, mas também os mutantes para este gene morrem no 3º estadio de larva ou no estadio de pupa, o que mostra que Mob2 é essencial para a *Drosophila* (Samora, 2007).

1.3. *Drosophila melanogaster* no estudo do Ciclo Celular

A *Drosophila melanogaster*, ou mosca da fruta como é vulgarmente designada, desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento da biologia durante o século XX. Os primeiros estudos genéticos neste organismo foram realizados por Thomas Morgan, em 1909, e elucidaram vários princípios básicos da hereditariedade. Actualmente, a *Drosophila* é um dos organismos modelo mais usados em biologia e desempenha um papel de extrema importância em estudos de linkage, epistasia, genética, desenvolvimento, comportamento e evolução (revisto em Dahmann, 2008).

A frequente utilização da *Drosophila* como organismo modelo em estudos genéticos deve-se a características como a facilidade de manter em cultura, o ciclo de vida relativamente curto (15 dias) e uma descendência numerosa. A sua genética está muito bem estudada, o genoma está completamente sequenciado e é relativamente pequeno, cerca de 5% do genoma humano. Existe ainda um sistema de RNA de interferência (RNAi) e uma série de ferramentas genéticas prontas a ser utilizadas, que também contribuíram para que este organismo se tornasse um modelo na análise e função de genes conservados (revisto em Pierce, 2006).

Além de todas estas vantagens, existem particularidades no ciclo de vida da *Drosophila*, que passa por diferentes fases desenvolvimento, incluindo ovo, larva, pupa e adulto (figura 1.8), que a tornam um organismo de eleição para o estudo do ciclo celular. Desde a eclosão do ovo até ao 3º estágio larvar, o crescimento é realizado apenas através do crescimento das células larvares e só o sistema nervoso central e os discos imaginais apresentam actividade mitótica. O facto de os embriões terem centenas de células a dividirem-se sincronizadamente permite quantificar, de forma quase exacta,

a dinâmica do fuso e dos cromossomas. E os vários tipos de células da *Drosophila*, incluindo neuroblastos, espermatócitos e oócitos contêm diferentes tipos de fusos mitóticos que permitem a realização de diversos tipos de experiências e a identificação de mecanismos comuns (revisto em Kwon & Scholey 2004). O ciclo celular deste organismo é semelhante ao das células dos mamíferos, não só ao nível da organização geral do ciclo, que consiste das mesmas fases G1, S, G2 e M, mas também ao nível molecular. A maquinaria fundamental do ciclo, as ciclinas (A, B, D e E) e as suas cinases dependentes das ciclinas (cdk 1, 2, 3, 4, 6), é altamente conservada entre moscas e mamíferos. A semelhança entre a maquinaria do ciclo celular e as vias regulatórias da *Drosophila* e do humano sugerem que a mosca pode servir como modelo no estudo do processo de proliferação durante a tumorigénese. Em suma, o entendimento de processos inerentes ao ciclo celular na mosca da fruta ajuda-nos a compreender esses mesmos processos nos humanos e outros eucariotas (revisto em Potter *et al.*, 2000 e Pierce, 2006).

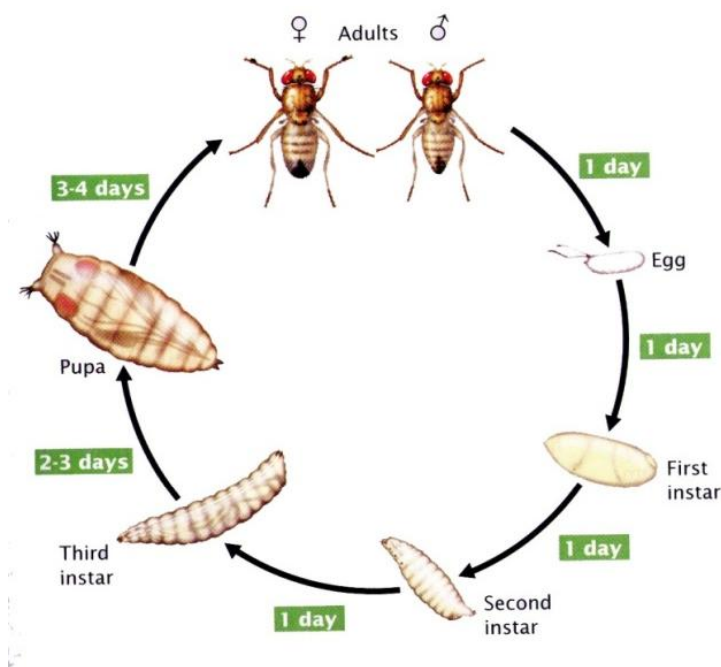


Figura 1.8 – Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.

Objectivo

O correcto funcionamento do ciclo de divisão celular é essencial para a correcta transmissão do material genético da célula mãe para as células filhas, durante várias gerações, assegurando a continuidade da vida e a evolução das espécies. E, quando este processo é comprometido podem surgir várias complicações que geram o aparecimento

de doenças como o cancro. Assim sendo, o objectivo deste trabalho foi determinar a função do gene Mob2 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular, através da análise do fenótipo dos mutantes Mob2 e pela determinação da localização da proteína Mob2 ao longo das várias fases da mitose.