

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

ESTUDO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA MOB1 NA ESTRUTURA DOS CENTROSSOMAS

Joana Patrícia Machado de Sousa

Dissertação de Mestrado em Oncobiologia - Mecanismos Moleculares
do Cancro

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Doutor Álvaro Tavares

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

ESTUDO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA MOB1 NA ESTRUTURA DOS CENTROSSOMAS

Joana Patrícia Machado de Sousa

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina
Mestrado em Oncobiologia – mecanismos
moleculares do cancro
Trabalho efectuado sobre a orientação de:
Orientador: Doutor Álvaro Tavares

2015

“Estudo da função da proteína Mob1 na estrutura dos centrossomas”

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.

Joana Patrícia Machado de Sousa

Copyright © Joana Sousa, 2015

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 respetivos.

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas pelo apoio e pela contribuição que tiveram para a realização deste trabalho, em particular:

Ao professor Álvaro Tavares, em primeiro lugar por me ter aceitado no seu laboratório. Por me ter ajudado, por todos os conselhos e, principalmente por acreditar sempre que eu era capaz. Por toda a sabedoria, porque como o professor Álvaro diz e passo a citar “Tudo o que eu digo são pérolas de sabedoria”. Levo as melhores memórias e os melhores conselhos.

À Doutora Cláudia Tavares, pela ajuda durante estes meses. Por ser uma pessoa sem rodeios, que me chamou à atenção e muitas vezes me chamou para a realidade. Pela paciência e pelas conversas que me mostravam o quanto eu tinha que trabalhar.

À Frederica Silva, com quem partilhei o laboratório neste últimos meses, mais que uma colega foi uma amiga, pela paciência, pela força e pela animação.

Aos colegas do CBMR, em especial á Ana Luísa e Margarida por toda a ajuda no laboratório e pelo apoio durante estes meses.

Aos meus amigos, Om, Gil, Gonçalo, Susana e Daniel pelo apoio, pelas conversas e pelas sextas-feiras que libertavam o stress.

Ao Pedro Charlito, que foi uma pessoa essencial e indispensável ao longo destes meses, sempre estive lá no fim de cada dia para me ouvir e me dar incentivo.

Aos meus pais e o irmão, pelos telefonemas e pela motivação que me deram todos os dias. Mesmo estando longe estão perto.

Resumo

A proteína hsMob1 faz parte de uma família reguladora de cinases altamente conservada de levedura até ao Homem. Em termos de função a proteína hsMob1 parece ser a mais distante do resto da família, pois as proteínas da sua família regulam a mitose e citocinese, enquanto a proteína hsMob1 está implicada em processos de tráfego vesicular.

Resultados preliminares do laboratório apontam uma função mitótica à proteína hsMob1, mais concretamente como sendo importante para estrutura dos centrossomas e fuso mitótico. Esses resultados também apontam para a função do hsMob1 na localização da CENP-A. A proteína CENP-A é a proteína que dá identidade ao centrómero e a partir da qual o cinetócoro se monta. Para perceber melhor a função do hsMob1, realizaram-se ensaios de RNAi e imunofluorescência para estudar os fenótipos e possíveis proteínas cuja localização poderia estar alterada. Antes do estudo dos fenótipos realizou-se uma experiência de localização, a qual revelou que a proteína é centrossomal ao longo do ciclo celular. Os fenótipos mitóticos observados sugerem que a proteína hsMob1 é importante para o alinhamento dos cromossomas, para a estrutura do fuso mitótico e para a localização da γ -tubulina nos centrossomas. A proteína hsMob1 não parece importante para a localização de proteínas Plk1 e Aurora B, que estão envolvidas na correção de erros entre os cinetócoros e microtúbulos evitando assim cromossomas desalinhados. Por outro lado, a proteína hsMob1 parece afetar a proteína centromérica CENP-C, que é uma proteína essencial na estabilização da CENP-A e importante para o recrutamento de outras proteínas que constituem o cinetócoro. Estes resultados sugerem que a proteína é importante para a normal progressão da mitose através do papel que desempenham na estrutura dos centrossomas e na possível montagem do cinetócoro.

Palavras-chave: hsMob1, mitose, centrossomas, cinetócoros

Abstract

The hsMob1 protein belongs to a family of kinase regulators that is highly conserved family of kinases from yeast to man. In terms of function hsMob1 protein seems to be the most divergent from the rest of the family, because this family of proteins regulates mitosis and cytokinesis, while hsMob1 is implicated in vesicle traffic processes.

Preliminary laboratory results point to a mitotic function of hsMob1 protein, specifically as being important to the structure of the centrosome and the mitotic spindle. These results also point to a role of hsMob1 in the location of the CENP-A. The CENP-A protein is a protein that gives the identity to the centromere and determines the starting point from which the kinetochore is assemble. To understand better the function of hsMob1 RNAi assays and immunofluorescence were held to study the phenotypes and possible proteins which location could be altered. A location experiment revealed that the protein is centrossomal throughout the cell cycle. The mitotic phenotypes observed suggest that the hsMob1 protein is important for the alignment of chromosomes, the structure of mitotic spindle and the location of gamma-tubulin to centrosomes. The hsMob1 protein does not appear to be important to the location of Plk1 and Aurora B proteins, which are involved in the error correction between the kinetochores and microtubule, avoiding misaligned chromosomes. Furthermore, the protein hsMob1 appears to affect the centromeric protein CENP-C, which is a protein responsible for the stabilization of CENP-A and important for the recruitment of other proteins that constitute the kinetochore. These results suggest that the protein is important for normal progression of the cell cycle, through the role that hsMob1 play in the structure of centrossomes and possible assembly of the kinetochore.

Key words: hsMob1, mitosis, centrosomes, kinetochores

Índice

Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1.Ciclo celular.....	1
1.1.1.Fases da mitose	1
1.1.2. Citocinese.....	2
1.2. Pontos de controlo (<i>checkpoints</i>).....	3
1.3.Estruturas mitóticas	4
1.3.1.Centrossomas	4
1.3.2.Microtúbulos	5
1.3.3.Cinetocoros	6
1.4.Transição metafase-anafase	9
1.4.1. Checkpoint SAC	9
1.4.2. Mecanismo de correção de erros.....	10
1.5. Aneuploidia: causa ou consequência do cancro?	12
1.7.Família das proteínas MOB	13
1.7.1. hsMob2	14
1.7.2. hsMob3	14
1.7.3. Mob4	15
1.7.4. HsMob1/Phocein.....	15
1.8. Lap-tag.....	21
Objetivo.....	22
2.Materiais e Métodos	23
2.1. Cultura de células	23
2.1.1. Sincronização de células HeLa	23
2.2. Transfecção com oligos de RNAi.....	24
2.3. Imunofluorescência de células em cultura.....	24
2.3.2. Método de fixação com metanol/acetona	25
2.3.3. Método de fixação com paraformaldeído 3.7%	25
2.3.4. Método de pré-extração com PEM1x-0.5% triton x100, fixação com paraformaldeído 3.7%	25
2.4. Análise de proteínas por SDS-PAGE	27
2.4.1 Recolha de células e preparação de amostras para géis de proteínas	27
2.5.Western Blot.....	29
2.6. Clonagem.....	30

2.6.1. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	31
2.6.2. Reação de ligação	32
2.6.3. Transformação de bactérias	32
2.7. Produção e Purificação de proteínas.....	33
2.7.1. Indução de proteína.....	34
2.7.2. Lise bacteriana	34
2.7.3. Purificação de proteína	34
2.8. Preparação de cromossomas	35
3. Resultados	36
3.1. Localização intracelular da proteína hsMob1	36
3.1.1. Teste às linhas celulares usadas na localização da proteína hsMob1	36
3.2.2. Localização das proteínas de fusão hsMob1-GFP e GFP-hsMob1	38
3.2. Estudo da função da proteína hsMob1	40
3.2.1. Parceiros moleculares	40
4.2.2. Efeitos de RNAi contra hsMob1 em células fixadas	43
4.3. Efeitos do RNAi do hsMob1 nos microtúbulos, centrossomas e cinetócoros.....	46
4.3.1. Estabilidade dos microtúbulos	46
4.3.2. Proteínas dos cinetócoros	49
4.4.1. Aurora B.....	49
4.4.2.PLK1	50
4.4.3.CENP-C	51
4.Discussão.....	53
5. Conclusões e perspetivas futuras.....	55
5.1. Conclusões.....	55
5.2 Perspetivas futuras	55
Bibliografia.....	56
Anexos.....	60
.....	61

Lista de figuras

Figura 1.1. Representação das fases da mitose..	2
Figura 1.2. Citocinese.....	3
Figura 1.3. Ciclo dos centróssomas.....	5
Figura 1.4. Estrutura dos centrómeros e cinetócoros.	8
Figura 1.5. Ponto de controlo M (SAC).	10
Figura 1.6. Mecanismo de correção dependente de um sensor de tensão.	11
Figura 1.7.	12
Figura 1.8. Hallmarks do cancro (adaptado de [36]).....	13
Figura 1.9. Localização do gene Mob1 no cromossoma 2.....	16
Figura 1.10. Expressão da proteína hsMob1 em vários cancros.	17
Figura 1.11. RNAi de proteína hsMob1 em células HeLa resulta em cromossomas desalinhados.	18
Figura 1.12. As células que sofrem RNAi de hsMob1 sofrem uma paragem em prometáfase e a morte em mitose é elevada.	19
Figura 1.13. A CENP-A diminui nos centrómeros nas células que sofrem RNAi de hsMob1.	19
Figura 1.14. Mutantes nulos são mais pequenos e as cerdas do torax também são mais pequenas.....	20
Figura 1.15. Representação da técnica Lap-tag.....	21
Figura 2.1. Representação esquemática dos passos realizados na clonagem de hsMob1 no vetor de expressão pet22b.	31
Figura 3.1. As linhas CAA9, CAB13 E CAB14 expressam as proteínas de fusão.....	37
Figura 3.2. A proteína hsMob1 acumula-se em volta de uma porção do núcleo em interfase e nos microtúbulos em mitose.....	38
Figura 3.3. A proteína hsMob1 é centróssomal ao longo do ciclo celular.....	39
Figura 3.4. Esquema representativo da clonagem de hsMob1 no vetor de expressão pet22b.	41
Figura 3.5. Clonagem de hsMob1 no vetor pet22b.....	42
Figura 3.6. Sequenciação do clone Jms2.....	42
Figura 3.7. Indução da proteína hsMob1.....	43
Figura 3.8. RNAi de hsMob1 resulta em defeitos mitóticos.....	45
Figura 3.9. RNAi de hsMob1 em células HeLa resulta na diminuição da γ -tubulina nos centróssomas.	46
Figura 3.10. Estabilidade dos microtúbulos.....	47
Figura 3.11. A Aurora B diminui nos centrómeros quando os microtúbulos são destabilizados.	48
Figura 3.12. RNAi de hsMob1 não altera a localização da proteína Aurora B. 1.....	50
Figura 3.13. RNAi de hsMob1 não altera a localização da proteína PLK1.....	51
Figura 3.14. RNAi de hsMob1 parece diminuir a localização da proteína CENP-C nos cinetócoros	52

Lista de tabelas

Tabela 2.1. Lista dos anticorpos primários usados em imunofluorescência e respetiva fixação utilizada.	27
Tabela 2.2. Lista de anticorpos secundários usados para imunofluorescência.	27
Tabela 2.3. Anticorpos primários usados em Western Blot.....	30
Tabela 2.4. Anticorpo secundário usado em Western Blot.....	30
Tabela 3.1. Linhas celulares usadas na localização da proteína hsMob1.....	36
Tabela 3.2. Localização observada em cada linha celular.....	40

Lista de abreviaturas

- APC – do inglês Anaphase Promoting Complex (Complexo promotor da anafase)
- CAK – do inglês CDK- Activating Kinases (Ativadores de cinases dependentes de ciclinas)
- CDK – do inglês Cyclin-Dependent Kinases (Cinases dependentes de ciclinas)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- CENP-A – do inglês Centromere Protein A
- CENP-C – do inglês Centromere Protein C
- CENP-E – do inglês Centromere Protein E
- CKI – do inglês Cyclin Kinase Inhibitors (Inibidor de cinases dependentes de ciclinas)
- CPC – do inglês Chromosome Passenger Complex.
- DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenil-indol
- DMEM – do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FBS – Soro fetal bovino
- GFP – do inglês Green Fluorescence Protein
- HJURP – do inglês Holliday Junction Recognition Protein
- IPTG – Isopropil β - D -1-tiogalactopiranósido
- LAP – do inglês Localization and Affinity Purification
- LATS – do inglês Large Tumor Supressor
- LB – Luria-Bertani broth
- MEN – do inglês Mitotic Exit Network (Saida de mitose)
- MOB – do inglês Mps One Binder
- NDR – do inglês Nuclear Dbf2-related
- PBS – Tampão fosfato salino
- PCM – do inglês Pericentriolar Material (Matriz pericentriolar)
- PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
- PIPES – piperazine-N,N'-bis
- PLK1 – do inglês Polo like kinase 1
- PVDF – Fluoreto de polivinilideno

SCF – do inglês Skp1-Cullin-Fbox protein complex

SAC – do inglês Spindle Assembly Checkpoint (Ponto de controlo da montagem do fuso)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

RNA – Ácido ribonucleico

TAP – Tandem Affinity Purification

γ -TuRC – do inglês γ -Tubulin Ring Complex (Complexo de anéis de γ -tubulina)

1. Introdução

A divisão celular é um processo importante e essencial para o desenvolvimento e sobrevivência de todos os organismos. Para o organismo multicelular sobreviver e crescer precisa de ser capaz de dividir as suas células através de um tipo de divisão celular chamado mitose. A mitose é importante para vários processos, desde a regeneração de tecidos após uma ferida ao sustento das células estaminais nos tecidos e órgãos. A mitose tem que ocorrer de forma exata e correta para que o organismo multicelular não sofra consequências a longo prazo, nomeadamente cancro. Para que todo o processo aconteça sem erros muitas proteínas estão envolvidas na regulação do mesmo.

1.1.Ciclo celular

O ciclo celular corresponde ao período de tempo em que uma célula origina duas células filhas idênticas. O ciclo celular divide-se em quatro fases G1, S, G2 e M (mitose). A fase G1 é o intervalo entre o final da fase M e a fase de síntese (fase S), em que a célula aumenta o seu citoplasma e sintetiza RNA e proteínas. A fase S é a fase de síntese em que se dá a replicação do DNA. A fase G2 é o intervalo entre a fase de síntese e a fase M, em que a célula se prepara para entrar em mitose, continuando a crescer em massa e a sintetizar proteínas [1]

1.1.1. Fases da mitose

A mitose (do termo grego *Mitos*=filamentos) é um fenómeno celular em que uma célula divide o DNA replicado na fase S de igual modo pelas duas células filhas, originando duas células filhas geneticamente idênticas com o mesmo número de cromossomas, perpetuando o genoma celular ao longo das gerações. A mitose classicamente subdivide-se em prófase, prometáfase, metafase, anáfase e telófase (Figura1.1). Em cada fase acontece um conjunto complexo de fenómenos celulares: na **prófase** os cromossomas começam a condensar, e consequentemente começam a ser mais visíveis. O nucléolo começa a dissipar-se, e gradualmente vai desaparecendo. Os centrossomas começam a movimentar-se para polos opostos; na **prometáfase** os cromossomas começam a migrar para o plano equatorial e começam a ligar-se aos microtúbulos. Dá-se a desorganização e dissipação do invólucro

nuclear. Os centrossomas encontram-se em polos opostos e o fuso mitótico forma-se; na **metafase** os cromossomas, que se encontram bilateralmente agarrados a microtúbulos de polos opostos, localizam-se no plano equatorial onde se alinham na chamada placa metafásica; na **anafase** dá-se a separação (segregação) dos cromátídeos irmãos para polos opostos. Esta fase subdivide-se em anafase A e anafase B. A anafase A inicia-se com a dissolução da coesão centromérica entre os cromátídeos, permitindo que os cromossomas sejam puxados pelos microtúbulos para polos opostos. Na anafase B ocorre um alongamento da célula levando ao aumento da distância entre centrossomas; na **telófase** os cromossomas começam a descondensar e dá-se a reorganização do invólucro nuclear. A maior parte dos microtúbulos do fuso mitótico despolimeriza, observando-se só os microtúbulos da zona central. Nesta fase, inicia-se a distribuição equitativa dos organelos celulares pelas duas células filhas [1].

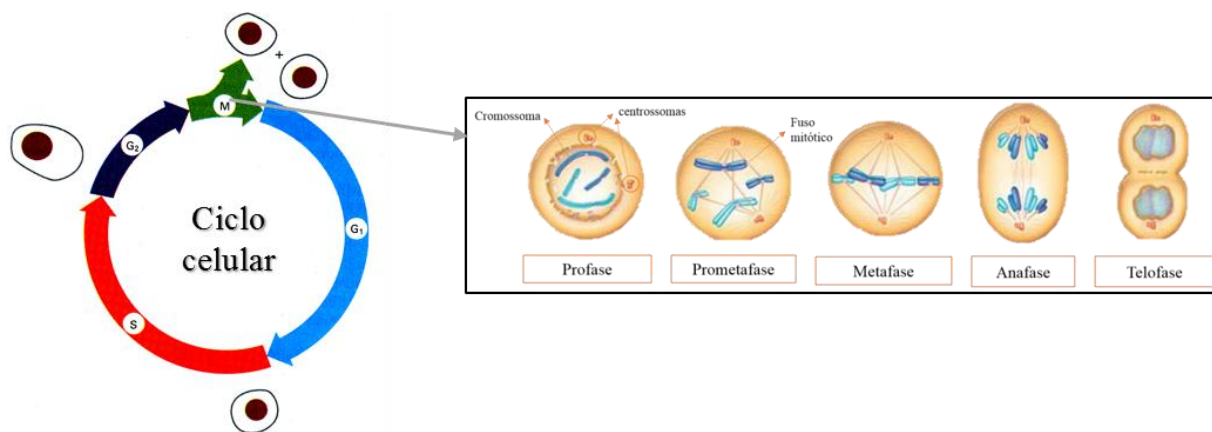


Figura 1.1. Representação das fases da mitose. O ciclo celular divide-se na fase G₁, S, G₂ e M. A fase M (mitose) subdivide-se em profase, prometafase, metafase, anafase e telófase. Em profase, os centrossomas começam a movimentar-se para polos opostos e os cromossomas começam a condensar. Em metafase, os cromossomas começam a ligar-se ao microtúbulos do fuso mitótico e, os cromátídeos irmãos começam a ser visíveis. Em metafase, os cromossomas alinham-se na placa equatorial e os cromátídeos irmãos estão agarrados por microtúbulos de polos opostos. Em anafase, os cromátídeos irmãos são puxados pelos microtúbulos para polos opostos (segregação dos cromossomas). Em telófase, dá-se a separação dos núcleos das células filhas e o invólucro nuclear reorganiza-se.

1.1.2. Citocinese

No fim da mitose dá-se a citocinese que se caracteriza pela divisão do citoplasma da célula resultando na separação física entre as duas células filhas. Inicialmente, forma-se um sulco de clivagem, geralmente situado no equador da célula. Neste sulco de clivagem, forma-

se um anel contráctil onde se situam a miosina, actina e outras proteínas, ao qual se dá o nome de anel de actomiosina. À medida que o anel contrai vai se formar uma ponte intracelular constituída por feixes de microtúbulos, até que o feixes se focam numa estrutura que se chama *midbody* (Figura 1.2). O evento final da citocinese é a abscisão em que se dá o corte da ponte intracelular e, desta forma a separação física das células filhas [2].

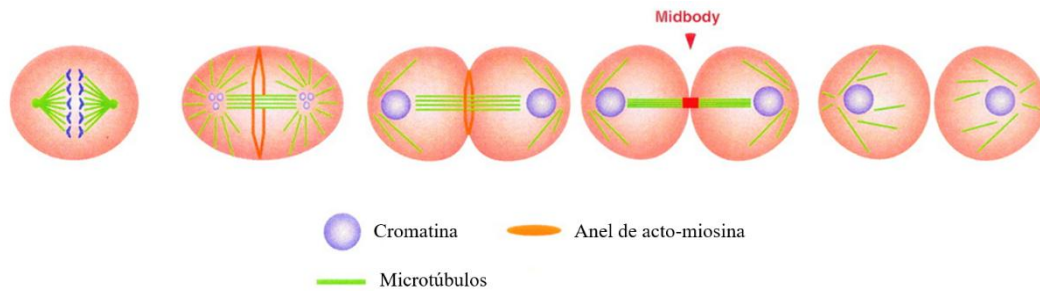


Figura 1.2. Citocinese. Primeiramente, dá-se a formação do anel contráctil que vai contrair e originar uma ponte intracelular que separa as duas células filhas. No passo final da citocinese dá-se a abscisão que se caracteriza pelo corte da ponte intracelular. (Adaptado de [2])

1.2. Pontos de controlo (*checkpoints*)

O ciclo celular é um processo complexo que envolve vários passos críticos, como a replicação de DNA em interfase e a segregação dos cromossomas para as células filhas em mitose. Erros nestes passos podem ocorrer e resultar em consequências para a célula e a longo prazo para o organismo multicelular. O mecanismo de regulação do ciclo celular só foi clarificado em 1989, por Hartwell e Weinert, que introduziram o conceito de checkpoints (pontos de controlo) [3]. Os pontos de controlo são compostos pelas CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) e pelas ciclinas. As CDKs são cinases serina/treonina heterodiméricas compostas pela subunidade catalítica (cinase) e uma subunidade regulatória (ciclina) [4]. A oscilação periódica da atividade CDK/ciclina de forma ordenada garante que o ciclo celular ocorra de forma ordenada e irreversível. Esta oscilação é regulada através de vários mecanismos: síntese de ciclinas, ativação das CDKs pelas CAKs (Cdk-Activating Kinases), inibição das CDKs pelas CKIs (Cyclin Kinase Inhibitors) e a degradação das ciclinas. As ciclinas são levadas para o proteossoma para serem degradadas através de dois sistemas de ubiquitina ligase: SCF (Skp1-Cullin-Fbox protein complex) e APC (Anaphase-Promoting Complex). O SCF reconhece as ciclinas como substratos quando estas se encontram

fosforiladas, enquanto o APC ubiquitina ciclinas quando fatores específicos se encontram fosforilados [4].

Existem três pontos de controle ao longo do ciclo celular: o ponto de controle na fronteira G1/S que monitoriza o tamanho e a integridade do DNA; o ponto de controle na fronteira G2/M que monitoriza se todo o DNA foi replicado e existe dano no mesmo; o ponto de controle M que monitoriza a formação do fuso mitótico e se todos os cromossomas se encontram corretamente ligados aos microtúbulos do fuso mitótico (mecanismo deste ponto de controle explorado no capítulo 2.4) [5].

1.3.Estruturas mitóticas

1.3.1.Centrossomas

Os centrossomas foram primeiramente descritos em 1888 por Theodor Boveri, estes são organelos citoplasmáticos que não possuem membranas e são constituídos por dois centríolos posicionados perpendicularmente. Os centrossomas são rodeados pela matriz pericentriolar (PCM), que é uma matriz rica em proteínas importantes para a integridade e função dos centrossomas, como por exemplo os anéis de γ -tubulina (γ -TuRC). [6]. Os γ -TuRC (γ - tubulin ring complex) são importantes para a nucleação e organização dos microtúbulos. Outras proteínas dos centrossomas são a centrina, Plk1, pericentrina, entre outras [7]. A centrina é uma pequena proteína que se encontra associada aos centríolos e desempenha um papel na duplicação dos centrossomas. A pericentrina desempenha um papel no recrutamento da γ -tubulina entre outras proteínas [6]. O Plk1 é uma proteína centrossomal que está envolvida no recrutamento da γ -tubulina [8].

Os centrossomas são responsáveis pela nucleação dos microtúbulos e funcionam como os principais centros de organização de microtúbulos (MTOC) em células animais. Muitas proteínas estão concentradas nos centrossomas, incluindo reguladores do ciclo celular como por exemplo ciclina E, Cdk2, Cdc25 e p53 levando a acreditar que o papel dos centrossomas vai além da organização dos microtúbulos [9].

Especificamente no ciclo celular, os centrossomas desempenham uma papel importante contribuindo para a bipolaridade do fuso mitótico, a posição do fuso e para a citocinese. Apesar de se encontrar descrito que os fusos bipolares se podem formar na ausência dos centrossomas, estes organelos têm uma importância dominante no número de fusos. Sabe-se que aberrações numéricas e estruturais dos centrossomas estão implicadas no cancro [6, 10].

Baseado em mudanças morfológicas, durante o ciclo celular, o ciclo dos centrossomas subdivide-se numa série de eventos: duplicação dos centrossomas, maturação, separação e desorientação (Figura 1.3). No início do ciclo celular, a célula apresenta um centrossoma (dois centríolos) sendo que na fase S a célula duplica o centrossoma resultando em dois centrossomas (quatro centríolos). Em G2, dá-se a maturação dos centrossomas, em que a γ -tubulina é recrutada para a zona da PCM. As cinases Plk1 e Aurora estão envolvidas neste recrutamento, pois fosforilam proteínas que recrutam a γ -tubulina e outras proteínas para a PCM. Na passagem G2/M, os centrossomas são separados por várias proteínas motoras. Por último, acontece a desorientação dos centrossomas em que o centríolo mais maturo se move para a zona de abscisão em citocinese [10].

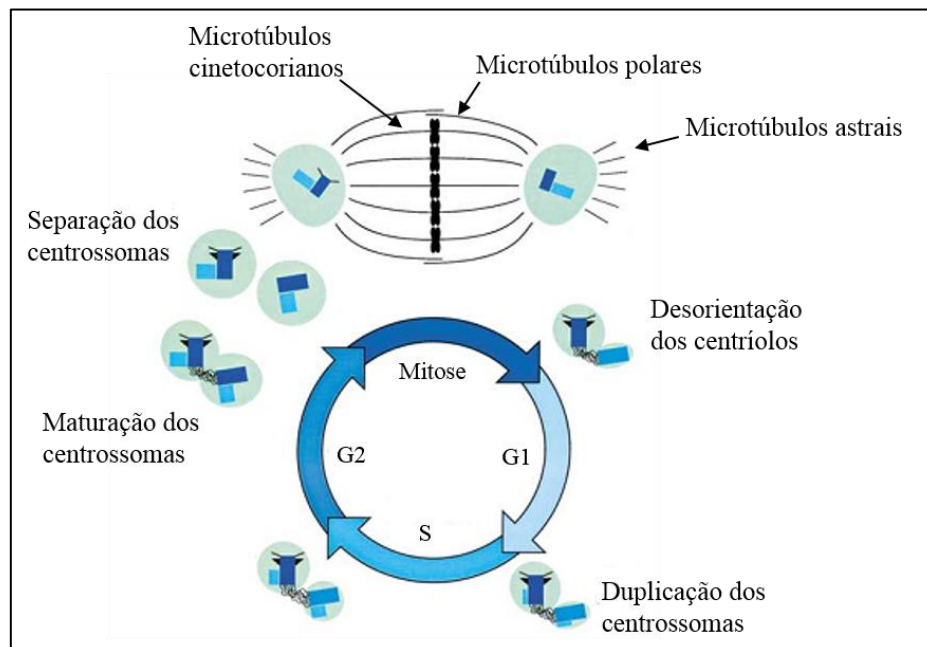


Figura 1.3. Ciclo dos centrossomas. Na fase S dá-se a duplicação dos centrossomas. Na fase G2 dá-se a maturação dos centrossomas. Em mitose dá-se a separação dos centrossomas. E por fim, no fim da mitose dá-se a desorientação dos centríolos. A azul escuro está representado o centríolo mais maturo. A verde claro está representada a matriz pericentriolar que rodeia os centrossomas. (Adaptado de [10])

1.3.2. Microtúbulos

Os microtúbulos são constituídos por heterodímeros de α/β tubulina e são nucleados a partir de anéis de γ -tubulina (γ -TuCR) que se encontram nos centrossomas. Estes anéis de γ -tubulina são o ponto de partida para a nucleação e crescimento do microtúbulos, deste modo os dímeros de α e β são adicionados a estes anéis numa orientação específica de maneira que a

extremidade – (minus) do microtúbulo fique embecida no centrossomas e, que o crescimento do microtúbulo só ocorra na extremidade + (plus). Os microtúbulos são estruturas dinâmicas que alternam entre os estadios em que crescem e encolhem, polimerizam e despolimerizam respetivamente. A este comportamento dá-se o nome de instabilidade dinâmica [7, 11]

Ao longo do ciclo celular ocorrem duas mudanças na organização e no comportamento dos microtúbulos que são essenciais para a montagem do fuso mitótico. Em interfase os microtúbulos são nucleados através de um único centro organizador e em mitose passam a ser nucleados a partir de dois centros organizadores (dois centrossomas). Para além desta mudança na organização dos microtúbulos de interfase para mitose, a dinâmica dos microtúbulos também muda drasticamente. Em interfase, os microtúbulos são longos e estáveis com um tempo de meia vida de mais de 10 minutos. Quando a célula entra em mitose os microtúbulos tornam-se curtos e bastante instáveis, sendo que o tempo de meia vida é menos de 60 segundos. Esta mudança possibilita o movimento dos cromossomas em anafase em que os microtúbulos despolimerizam e puxam os cromossomas para polos opostos [12].

Em mitose, os microtúbulos formam um fuso mitótico bipolar. Este fuso mitótico é composto por três classes de microtúbulos: os microtúbulos polares, astrais e cinetocorianos (representados na Figura 1.3). Estas diferentes classes de microtúbulos estão envolvidas em aspetos diferentes da organização e funcionamento do fuso. Os microtúbulos astrais são nucleados a partir dos centrossomas e crescem na orientação oposta à do fuso mitótico. Estes interagem com o córtex da célula, desempenhando uma papel importante no posicionamento do fuso mitótico. Os microtúbulos polares são nucleados a partir dos centrossomas e prolongam-se até o centro da célula, sendo responsáveis na fase inicial da formação do fuso, pela interação com proteínas que estabelecem pontes entre os microtúbulos de polos opostos. Por último, a classe dos microtúbulos cinetocorianos que também são nucleados a partir dos centrossomas e prologando-se até ao centro da célula onde se ligam aos cinetócoros dos cromossomas. Estes desempenham um papel no alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e na separação dos cromátídeos irmãos em anafase [13]

1.3.3.Cinetocoros

Como mencionado anteriormente, um dos passos críticos da mitose é a segregação correcta dos cromossomas para as células filhas. Os cromossomas têm uma zona especializada que se chama de centrómero, sob a qual um complexo de proteínas chamado cinetocoro é montado. Os cinetocoros desempenham um papel importante em vários

processos, nomeadamente na captura dos microtúbulos e no alinhamento dos cromossomas na placa metafásica, na correção de erros de ligação entre microtúbulos e cinetocoros, em manter o ponto de controlo M activo até que todos os cromossomas estejam correctamente biorientados e em estabelecer tensão no centrómero para que o ponto de controlo seja silenciado e, desta maneira a célula entrar em anafase [14].

Na ausência de um centrómero funcional, o cinetocoro não se monta e os cromossomas vão falhar a segregação em mitose. Sabe-se que o tamanho e o processo de reconhecimento da posição do centrómero varia entre organismos. Pensa-se que a natureza da identidade do centrómero em vertebrados é epigenética e, que a chave desta é a variante da histona H3 CENP-A [15]. Nos cromossomas, o DNA encontra-se enrolado em volta de nucleossomas constituído por quatro tipos de histonas, H3, H4, H2B e H2A, sendo que a CENP-A substitui a histona H3 nos centrómeros activos (Figura 1.4.A) [16]. Para a CENP-A funcionar como marcador de centrómeros tem que ser estruturalmente e funcionalmente diferente das outras histonas. De facto, existe uma região da sequência da CENP-A que providencia propriedades diferentes, garantindo que este nucleossoma seja reconhecido pelos factores de deposição especializados [17, 18].

A CENP-A está estavelmente associada com os centrómeros e, a incorporação de nova CENP-A só acontece nos sítios onde esta já existe. A incorporação de nova CENP-A só se dá em G1 e depende de uma série de factores especializados. Estes factores incluem um chaperone especializado HJURP que reconhece o domínio alvo da CENP-A. Inicialmente, o complexo HJURP liga-se aos dímeros de CENP-A/H4 solúvel que estão acumulados no citoplasma, de seguida o complexo Mis18 (composto por Mis18 α , Mis18 β e MisBP1/KNL2) que se localiza no centrómero, recruta o esse complexo para os centrómeros, levando à incorporação da CENP-A (Figura 1.4.B). A CENP-A interage com a proteína do cinetocoro CENP-C, responsável pela estabilização da CENP-A nos nucleossomas em mitose [19]. A CENP-C também funciona como recetor do complexo Mis 18 que garante que a cromatina que contem a CENP-A é capaz de ser propagar sozinha [18]. Em interfase, o centrómero contém 200 nucleossomas de CENP-A, que se dividem em 100 nucleossomas CENP-A nos cromossomas mitóticos. Cada nucleossoma tem duas cópias da molécula CENP-A [18].

A interação dos cinetocoros com os microtúbulos é uma tarefa especialmente difícil, pois os microtúbulos não são uma estrutura estática. Os microtúbulos estão constantemente a

crescer e a encolher através de polimerização e despolimerização, dado isto os cinetocoros têm que se manter estavelmente ligados aos polímeros dos microtúbulos que estão constantemente a encolher e a crescer. Em células animais, por cada cinetocoro ligam-se 15-20 microtúbulos [20]. A CENP-C interage também com o complexo Mis12, que por sua vez interage com KNL1 e com o complexo Ndc80 que são importantes para a ligação com os microtúbulos [21]. O complexo Ndc80 liga-se diretamente aos microtúbulos, criando ligações robustas entre os cinetócoros e os microtúbulos, sendo que a disrupção na função deste complexo resulta na segregação errada dos cromossomas [22]

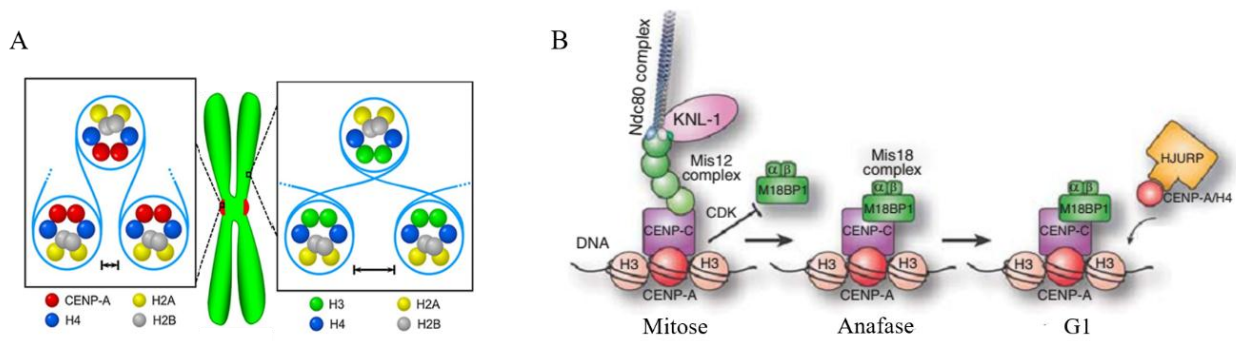


Figura 1.4. Estrutura dos centrômeros e cinetócoros. A) Representação de um cromossoma em que demonstra a diferença entre os nucleossomas dos centrômeros e os outros nucleossomas. Como se pode observar, o DNA encontra-se enrolado em volta de histonas, e em que no centrômero a histona H3 (representada por uma esfera verde) é substituída pela CENP-A (representada por um esfera vermelha) nos centrômeros; B) Na fase G1, o HJURP liga-se a dímeros de CENP-A/histona H4 e é recrutado para os centrômeros recrutado complexo Mis 18. (Adaptado de [16, 20])

Através de microscopia eletrónica pode-se distinguir três placas proteicas na estrutura dos cinetócoros, interior, exterior e a intermédia, sendo que a interior e a exterior são mais densas do que a intermédia. Cada placa proteica tem uma função atribuída e para isso apresentam um conjunto variado de proteínas. As proteínas localizadas na parte interior do cinetocoro são responsáveis pela montagem e a determinação do tamanho do cinetocoro, como por exemplo: a CENP-A. A interzona é onde se localiza os recetores de tensão e a sinalização do ponto de controlo M. As proteínas situadas na zona exterior são responsáveis pela ligação da extremidade (+) dos microtúbulos aos cinetócoros, pela regulação da dinâmica dos microtúbulos e sinalização do ponto de controlo, como por exemplo Plk1 [23]. Existe outra camada proteica que não pertence ao cinetocoro mas é a base da montagem deste que é a heterocromatina centromérica. As proteínas desta camada são responsáveis pelo suporte estrutural e pela correção de erros entre microtúbulos e cinetócoros [23].

1.4. Transição metafase-anafase

A transição metafase-anafase é irreversível em mitose, uma vez iniciada a célula prossegue para anafase e sai de mitose. Em metafase, os cinetócoros dos cromátídeos irmãos ligam-se agarrados por microtúbulos de polos opostos. Os microtúbulos exercem forças de tensão para separar os cromátídeos irmãos para polos opostos, estas forças são contrariadas pela coesão entre os cromátídeos irmãos. Quando chega o tempo da transição da metafase-anafase a coesão entre os cromátídeos irmãos é dissolvida permitindo que eles sejam puxados para polos opostos. O passo de segregação dos cromossomas é um passo crucial para as células, sendo que erros podem ser deletérios para a célula.

1.4.1. Checkpoint SAC

Para evitar erros na segregação dos cromossomas a célula tem que garantir que todos cromossomas estão bilateralmente agarrados ao fuso mitótico. Para isso, existe um ponto de controlo que monitoriza se os cromossomas estão bilateralmente e corretamente ligados ao fuso no fim de metafase. Este ponto de controlo impede que a célula entre em anafase prematuramente sem que os cromossomas estejam todos bilateralmente agarrados, emitindo um sinal para não se iniciar a anafase. As proteínas que desempenham esta importante função são as proteínas do ponto de controlo SAC (Sindle assembly checkpoint): Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, Bub3 e Mps [24, 25].

O sinal do ponto de controlo SAC depende em parte da proteína, Mad2. Mais concretamente depende do estado conformacional da proteína. Esta proteína pode apresentar uma conformação “fechada” ou “aberta”. Na conformação aberta, chamada O-Mad2, a proteína está essencialmente inativa. Por outro lado, na conformação fechada, C-Mad2, é a conformação que é mantida nos cinetócoros com defeitos de ligação. Quando o ponto de controlo SAC deteta alguma ligação errada entre cinetócoro e microtúbulo a proteína C-Mad2 sai do cinetócoro e, juntamente Bub3 e BubRI formam o complexo, que se associa à proteína Cdc20, prevenindo que esta ative o APC/C [24, 25] (Figura 1.5). O complexo APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) é uma ubiquitina ligase que leva substratos específicos para a degradação pelo proteossoma 26s [26]. Estes substratos específicos incluem a ciclina B e a securina. A securina inibe a separase, que é responsável por manter a coesão dos cromátídeos, até a célula estar preparada para entrar a anafase [26, 27].

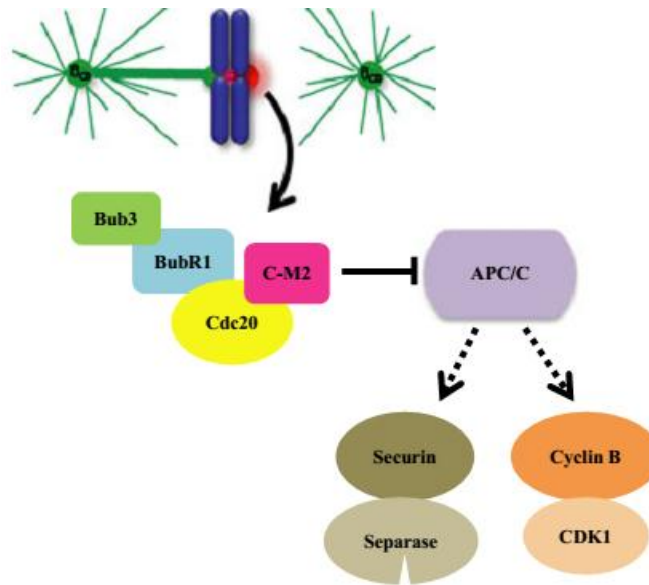


Figura 1.5. Ponto de controlo M (SAC). Quando o cinetócoro não se encontra ligado ao microtúbulo, o complexo composto por Bub3, BubR1 e Mad2 liga-se à proteína Cdc20 levando à inibição do APC/C. A inibição do APC/C vai impedir a degradação da Securina e da Ciclina B, impedindo que a célula prossiga para anafase. (Adaptado de [27])

Quando todos os cinetócoros se encontrarem corretamente ligados aos microtúbulos as proteínas do ponto de controlo deixam de ser recrutadas para o cinetócoro levando a ativação do APC/C pela proteína cdc20. A ativação do APC/C leva à degradação da securina que vai desencadear a separação dos cromátídeos irmãos, e conseqüentemente a entrada em anafase. A ativação do APC/C leva também à degradação da ciclina B [27, 28].

1.4.2. Mecanismo de correção de erros

Erros durante a mitose podem resultar em conseqüências catastróficas para a célula. Dado isto, o cinetócoro tem que mover os cromossomas, mas também monitorizar este processo e corrigi-lo se necessário. Os cromátídeos irmãos têm que se ligar a polímeros dos microtúbulos de polos opostos, esta é a forma correta. Porém, muitos erros podem ocorrer nesta ligação nomeadamente a falha na ligação a um ou aos dois cinetócoros, os cromátídeos irmãos estarem ligados ao mesmo polo do fuso mitótico ou o mesmo cromátídeo irmão estar ligado simultaneamente aos dois polos do fuso. Na presença deste erros é crítico que exista uma mecanismo que os detete e os corrija.

A proteína Aurora B, que se localiza na região interior do cinetócoro, é uma cinase chave no mecanismo de correção [29]. A Aurora B fosforila proteínas envolvidas na ligação

microtúbulo-cinetócoro inibindo a função destas, incluindo o complexo Ska1 e o complexo Ndc80. Estes complexos têm como função criar ligações robustas entre os cinetócoros e os microtúbulos. A combinação da fosforilação destes complexos elimina as ligações incorretas, deixando os cinetócoros livres para fazerem novas ligações. É crucial que este mecanismo afete as ligações erradas sem afetar as ligações corretas. Quando os cromossomos estão bilateralmente agarrados aos microtúbulos estão sobre tensão levando a que cromatina centromérica se afaste dos cinetócoros, desta forma os alvos da Aurora B estão fora de alcance [30]. Por esta razão, a Aurora B funciona como um “sensor de tensão” (Figura 1.6). Por sua vez quando os microtúbulos não estão corretamente ligados ao cinetócoro não existe a força de tensão, sendo que os alvos da Aurora B já são fosforilados por esta, pois encontram-se ao alcance desta cinase [31].

A fosforilação desempenha um papel importante em impedir as ligações incorretas entre microtúbulos e cinetócoros, porém esta fosforilação tem que ser removida quando a sua função está cumprida. As fosfatases PP1 e PP2, que se localizam no cinetócoro, são responsáveis para desfosforilar os substratos no momento certo [32, 33].

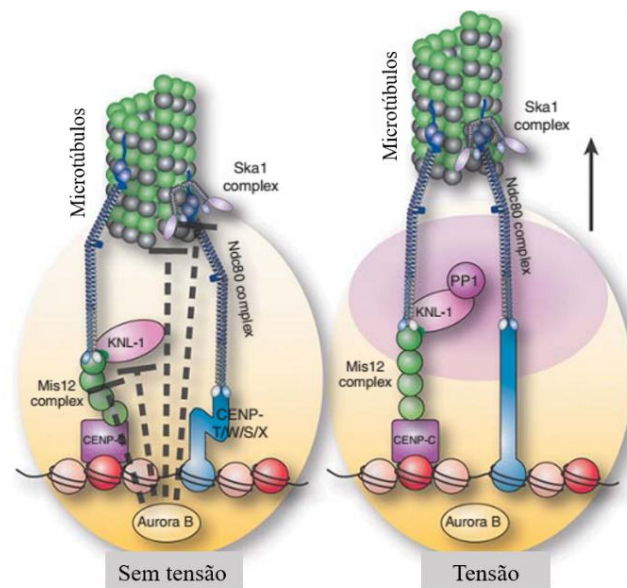


Figura 1.6. Mecanismo de correção dependente de um sensor de tensão. Quando o centrômero não está sujeito a pressão a Aurora B consegue fosforilar as suas proteínas alvo, resultando na destabilização das ligações erradas. Quando o centrômero está sujeito a pressão a Aurora B já não está ao alcance das proteínas alvo, deste modo não as consegue fosforilar (adaptado de [20])

1.5. Aneuploidia: causa ou consequência do cancro?

A mitose é um processo complexo que precisa de ser cuidadosamente controlado e regulado. As células devem corretamente segregar os cromossomas para que as células filhas recebam o mesmo número de cromossomas (Figura 1.7). Caso exista uma má segregação dos cromossomas resultará em aneuploidia para as células filhas[34]. Aneuploidia é a condição em a célula ganha ou perde cromossomas, condição muito associada a tumores. Existe controvérsia em volta da relação de causa e consequência entre o cancro e a aneuploidia.

Sabe-se que maior parte dos tumores sólidos apresenta um cariótipo de 40-90 ou mais cromossomas [35, 36]. Esta aneuploidia em cancro surge da chamada instabilidade cromossómica que se define pelas altas e persistentes taxas de perda e ganho de cromossomas. Esta constante perda e ganho podem dever-se a uma má segregação dos cromossomas, que pode derivar de vários erros durante a mitose como: defeitos no ponto de controlo SAC, coesão dos cromatídeos irmãos, ligação entre cinetócoro-microtúbulo e número de centrosomas [35]

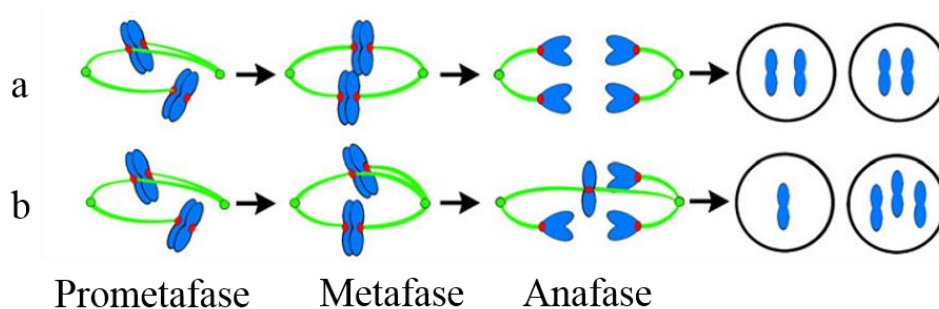


Figura 1.7. a) Ligações em que os cromatídeos irmãos estão ligados a microtúbulos do mesmo polo do fuso e em que um cromatídeo está desligado do fuso acontecem em prometáfase. Estas ligações são corrigidas e resultam em ligações corretas em metafase e numa anáfase com a correta segregação dos cromossomas; b) No caso em que essas ligações se perpetuam em metafase vai dar origem a cromossomas arrastados em anáfase, resultado em aneuploidia nas células filhas. (Adaptado de [36])

O cancro caracteriza-se pela divisão descontrolada das células que podem invadir e espalhar-se para outras partes do corpo (metástases), segundo a definição da Organização Mundial de saúde (WHO). As células cancerígenas comprometem capacidades biológicas e ganham capacidades que as torna capazes de proliferar descontroladamente, a que se chamam hallmarks do cancro. (Figura 1.8)[37].

Sabe-se que desregulação de genes envolvidos na reparação do DNA, oncogenes e supressores de tumores estão envolvidos na causa de tumores humanos [38]

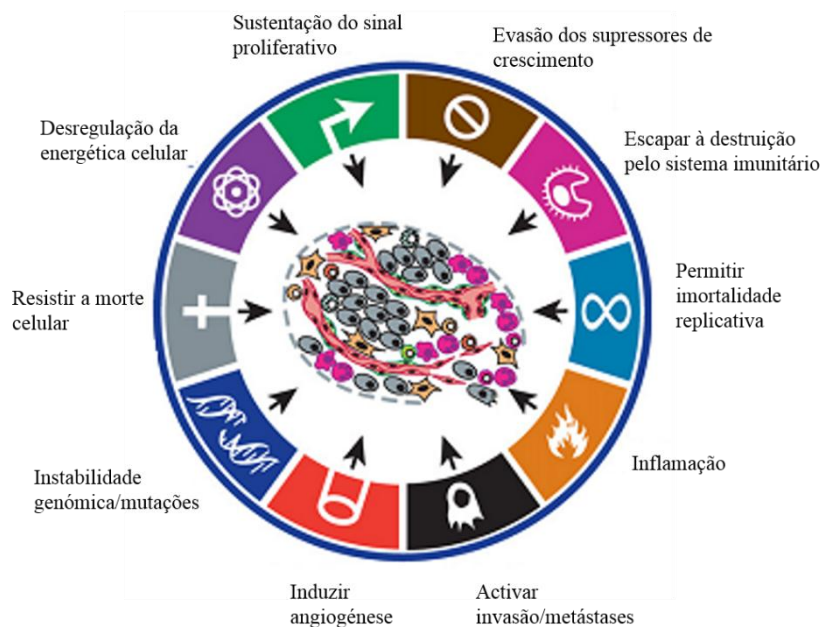


Figura 1.8. Hallmarks do cancro (adaptado de [37])

1.7.Família das proteínas MOB

A família das proteínas *Mps One Binder* (MOB) está altamente conservada desde a levedura ao Homem. As proteínas desta família são inúmeras vezes descritas como co-activadoras de cinases. As proteínas Mob estão implicadas em vias de sinalização importantes para a saída de mitose, progressão do ciclo celular, morfogénese, polaridade celular e apoptose [39, 40]. A primeira proteína desta família, Mob1p, foi descrita em levedura como parceira molecular da proteína Msp1 e, como sendo importante para a saída de mitose (MEN) e citocinese [41].

Estas proteínas Mob encontram-se altamente associadas às cinases NDR (nuclear Dbf2-related) /LATS (large tumor suppressor) [39]. As cinases NDR/LATS são um subgrupo da família de cinases AGC e, as células humanas expressam quatro tipos de cinases NDR/LATS: NDR1, NDR2, LATS1 e LATS2. Esta família de cinases NDR/LATS também se encontra altamente conservada de levedura até ao Homem, e são componentes essenciais nas vias de sinalização que controlam importantes processos celulares como saída de mitose, citocinese, proliferação celular e apoptose [42]. As cinases NDR/LATS também se encontram envolvidas na via de sinalização Hippo, uma cascata de sinalização supressora de tumores que controla o proto-oncogene YAP/TAZ. As cinases NDR/LATS não funcionam sozinhas, por

um lado necessitam de membros da família de cinases Ste20 para serem fosforiladas e, desta forma serem cativadas. Por outro lado, necessitam de alguns membros da família Mob para desempenhar a sua função na íntegra [42].

Apesar de ser uma família conservada de genes, o número de genes varia entre organismos. Em levedura, organismo unicelular, existem dois genes que codificam para duas proteínas diferentes, Mob1p e Mob2 [41]. Em *Drosophila*, o quadro estende-se para três genes que codificam 3 proteínas dMob (*Drosophila* Mob proteins) [39, 43]. Em Humanos existe ainda uma maior complexidade, pois até ao momento 7 genes desta família estão descritos: hsMob1 (Phocein), hsMob2, hsMob3A, hsMob3B, hsMob3c, hsMob4A e hsMob4B (Florindo & Tavares, *Human Genome Data Base*, direct submission, 2003).

1.7.1. hsMob2

A proteína hsMob2 está envolvida na duplicação dos centrossomas e na apoptose. Estudos de sobreexpressão e RNAi foram feitos para a proteína hsMob2, mostrando que quando a proteína hsMob2 é sobreexpressa afeta funções biológicas da cinase NDR, como a apoptose e a duplicação dos centrossomas. Por outro lado, quando as células são sujeitas a RNAi a atividade da cinase NDR aumenta. Conclui-se que a proteína hsMob2 regula negativamente as cinases NDR1/NDR2 humanas, e compete com a proteína hsMob4 para se ligar a estas cinases [44].

A proteína hsMob2 também é responsável pela ativação do ponto de controlo e pela resposta ao dano de DNA. Esta proteína interage com a proteína RAD50, que faz parte de um complexo importante envolvido na reparação de danos de DNA. Quando as células são sujeitas a RNAi contra hsMob2 apresentam sensibilidade para danos de DNA e apresentam pontos de controlo defeituosos [45].

1.7.2. hsMob3

As proteínas hsMob3a, hsMob3b e hsMob3 são as menos estudadas da família Mob e, por isso pouco se encontra descrito sobre estas proteínas. Sabe-se que estas proteínas não interagem com as cinases NDR/LATS [44]. Recentemente foi publicado que a proteína hsMob3 está sobreexpressa no glioblastoma multiforme humano, e estudos *in vivo* mostram que esta sustém o crescimento celular e promove a tumorigénese, impedindo a

apoptose. Nomeadamente a proteína hsMob1 interage com a proteína MST1 regulando negativamente [46]. A proteína MST1 desempenha um papel importante na regulação da apoptose e proliferação celular [47].

Deste modo, a proteína é um possível alvo terapêutico para o glioblastoma. Estas observações suportam a potencialidade da proteína hsMob3 como oncoproteína [46].

1.7.3. Mob4

A proteína Mob4 é a proteína mais estudada da família Mob. Na verdade, quando se menciona a proteína a Mob4 referimo-nos a duas proteínas Mob4A e Mob4B. Estas duas proteínas são 95% idênticas, mas transcritas por dois genes independentes. Estas proteínas interagem com as cinases NDR/LATS [48].

A proteína hsMob4 localiza-se nos centrossomas em mitose e no corpo central (*midbody*) em citocinese. Usando a técnica de RNAi, observou-se que quando se remove hsMob1 em células HeLa estas não são capazes de realizar a abscisão da ponte intracelular (passo final da citocinese), como consequência da hiper-estabilização dos microtúbulos na zona do corpo central. Para além da observação deste fenótipo também se observou que as células se tornavam mais moveis [49].

Em drosófila, a proteína dMob4 (também designada de MATS) é um supressor de tumores. Na ausência do MATS existe uma elevada proliferação celular, apoptose deficiente e sobre-crescimento dos tecidos, levando à formação de tumores. Isto pode ser justificado pelo fato que o MATS interage com a cinase WTS (homóloga da cinase NDR), que é uma cinase que matem o equilíbrio entre a apoptose e a proliferação [50, 51]

Estudos também foram feitos em *Tetrahymena* (protozoário ciliado), sendo que a remoção de Mob4 neste organismo unicelular resulta em planos anormais de divisão, paragem em citocinese e ciliogénese é atrasada. Conclui-se que o Mob4 é um importante marcador da polaridade celular, sendo crucial para o estabelecimento do correto plano de divisão, para completar a citocinese e para taxas de crescimento normal dos cílios [52].

1.7.4. HsMob1/Phocein

A proteína hsMob1 foi primeiramente descrita em 2001 com o nome de Phocein, através de um *yeast two hybrid* realizado no cérebro de ratinho que tinha como alvo a striatin [53]. Esta proteína é transcrita por um gene que se localiza no cromossoma 2 (Figura 1.9), resultando numa proteína de 26kDa.

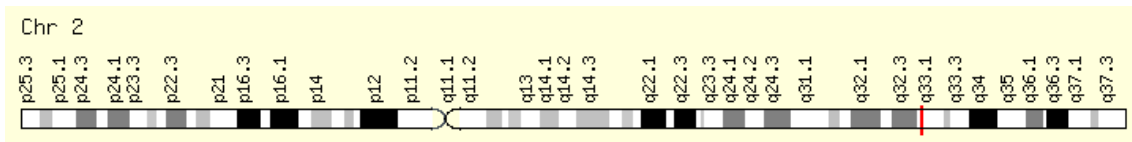


Figura 1.9. Localização do gene Mob1 no cromossoma 2

Esta proteína pertence à família dos Mobs mas em termos de função parece a proteína mais distante da família, pois todas estão envolvidas na regulação da mitose e da citocinese. A proteína hsMob1 é uma proteína intracelular que se localiza nos neurónios, nomeadamente nas células Purkinje [53, 54]. Estudos bioquímicos mostram que a proteína hsMob1 interage com várias proteínas envolvidas no tráfego vesicular, como a Striatin, Eps-15, Dinamina -1 e NDPK. Dadas estas interações pensa-se que esta proteína está implicada no tráfego vesicular [55].

Também foi realizada a localização da proteína em células HeLa, e observou-se que esta se localiza no complexo de Golgi. No seguimento desta experiência, verificou-se homologia de sequência entre a hsMob1 e os adaptadores das vesículas revestidas de clatrina. Dado esta observação, a hipótese é que tal como nos neurónios a hsMob1 está envolvida no tráfego vesicular em célula HeLa [53].

A proteína hsMob1 faz parte do complexo STRIPAK, que consiste na interação da Striatin com cinases e fosfatases. Este complexo parece estar implicado em vários processos como controlo do ciclo celular, apoptose, tráfego vesicular, polaridade celular, migração celular e desenvolvimento neuronal [56].

Através de uma pesquisa na base de dados The Protein Atlas, encontrou-se uma tabela que nos mostra os níveis de expressão da proteína hsMob1 em cancro e em tecidos normais (Figura 1.10). Pode-se observar na figura 1.10 que a proteína hsMob1 encontra-se mais expressa no cancro que no tecido saudável correspondente, em maior parte dos casos. Sendo que o azul-escuro corresponde a muito a expresso, o azul claro a expressão médio, vemos que por exemplo no cancro colo-rectal a proteína hsMob1 é claramente mais expressa no cancro que tecido saudável, o que corresponde a uma expressão média (azul claro). Estas observações parecem sugerir que o hsMob1 é um oncogene.

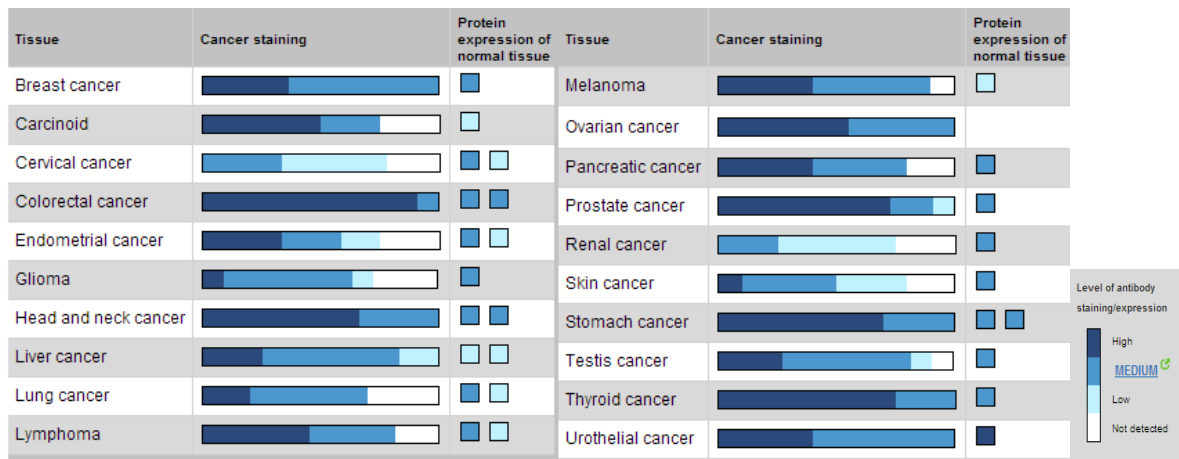


Figura 1.10. Expressão da proteína hsMob1 em vários cânceros. Imagem obtida a partir da base de dados Protein Atlas. Esta tabela representa a expressão da proteína hsMob1 em diferentes cânceros comparativamente com o tecido normal. A expressão da proteína é classificada como alta (azul escuro), média (azul), baixa (azul claro) e não detectada (branco).

Através de uma análise bioinformática sabe-se que a proteína hsMob1 tem como possíveis interatuantes cinases e fosfatases, o que seria de esperar de proteínas da família Mob. Outros interatuantes foram encontrados que não coincidem com as outras proteínas da família Mob1, sendo elas chaperonas [57]. As chaperonas são proteínas envolvidas no enrolamento de proteínas. O hsMob1 parece ser a única proteína da família Mob1 envolvida no enrolamento de proteínas.

1.7.4.1. *Drosophila* Mob1 (dMob1)

O homólogo da proteína hsMob1 em *Drosophila* é a dMob1 que partilham 80% de identidade em sequência de aminoácidos. Em *Drosophila*, está descrito que a proteína dMob1 se localiza nos pólos do fuso e que na sua ausência as células de *Drosophila* apresentam pólos monopolares e as fibras dos cinetocoros tem dificuldade em focarem-se nos polos do fuso [58]. O dMob1 também se encontra descrito como sendo importante para a formação das sinapses, o transporte axonal e organização dos microtúbulos [59].

1.7.4.2. hsMob1 é importante para a estrutura dos centrossomas e para o alinhamento dos cromossomas

O laboratório do professor Álvaro Tavares foca-se no estudo do ciclo celular e nos mecanismos envolvidos neste processo. Dado isto, a família Mob despertou interesse e foi feito um estudo preliminar sobre todas as proteínas desta família. Em relação a proteína hsMob1 obtiveram-se resultados interessantes. Observou-se que quando se diminuía os níveis de hsMob1 (usando a técnica de RNAi) as células falhavam o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e que a γ -tubulina se encontrava espalhada nos polos do fuso e não concentrada (Figura 1.11).

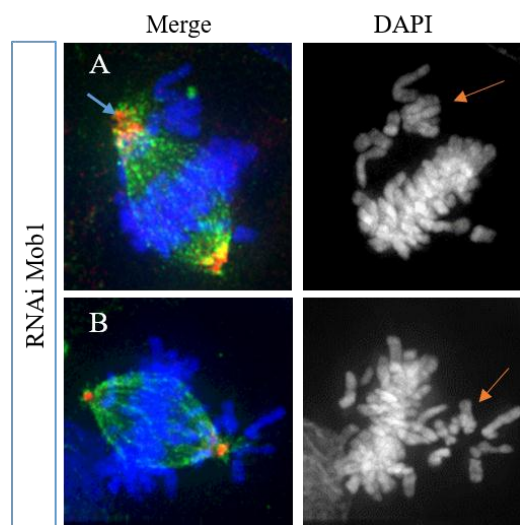


Figura 1.11. RNAi de proteína hsMob1 em células HeLa resulta em cromossomas desalinhados. A verde está representada a marcação da α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos), a vermelho a marcação da γ -tubulina (que se localiza nos centrossomas) e a azul o DNA. Paineis A e B) Podem observar-se células que sofreram RNAi de hsMob1 com cromossomas desalinhados (indicados com uma seta laranja) e a γ -tubulina espalhada pelo polo do fuso (indicada com seta azul). Resultados não publicados (Cláudia Florindo)

Microscopia em tempo real também foi realizada para observar melhor o que acontecia quando os níveis da hsMob1 eram reduzidos. Observou-se que as células sujeitas ao RNAi do hsMob1 apresentavam um atraso em prometáfase. Células controlo demoraram em média ~66 minutos a percorrer a prometáfase, enquanto células que sofreram RNAi demoraram em média ~303 minutos, sugerindo que o ponto de controlo foi ativado (Figura 1.12.A). Pode-se observar na figura 1.12.B que a morte celular em mitose é elevada (~40%).

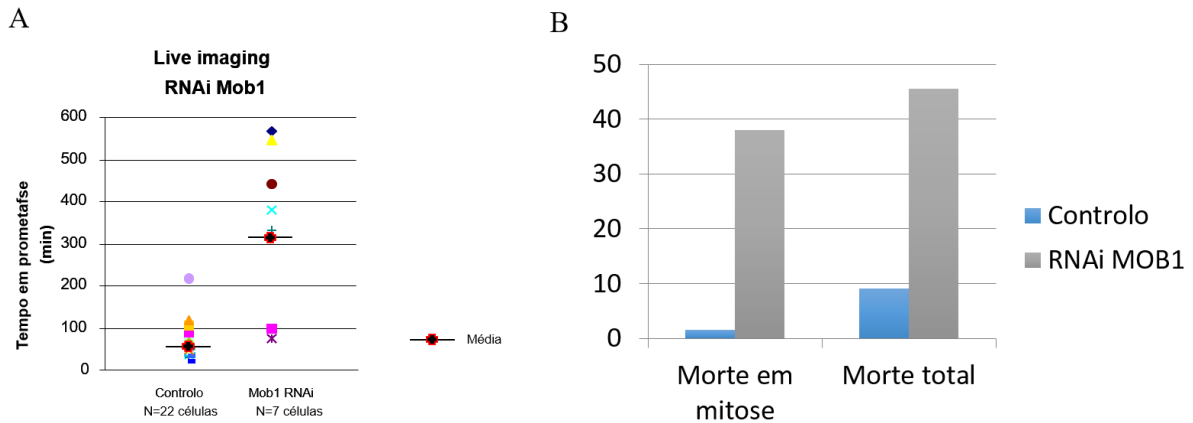


Figura 1.12. As células que sofrem RNAi de hsMob1 sofrem uma paragem em prometafase e a morte em mitose é elevada. A) As células que sofrem RNAi demoram em média ~306 minutos em prometafase, enquanto as células controlo demoram ~66 minutos. B) A morte celular em mitose é mais elevada nas células que sofreram RNAi de hsMob1 do que nas células controlo. Resultados não publicados (Cláudia Florindo).

De seguida, procuraram-se proteínas que quando sujeitas a RNAi apresentavam o mesmo fenótipo que o RNAi de hsMob1 para ver em que possíveis mecanismos a proteína está envolvida. Encontra-se publicado que quando os níveis proteicos da CENP-E são reduzidos resultam no mesmo fenótipo, isto é, cromossomas desalinhamos. Dado isto, foi-se observar se o RNAi do hsMob1 alterava a localização da CENP-E usando a proteína CENP-A como controlo. Surpreendentemente, a localização da proteína CENP-E não se encontrava alterada ao contrário da localização da CENP-A (figura 1.13). A CENP-A como mencionado na introdução é a proteína chave de um centrómero funcional.

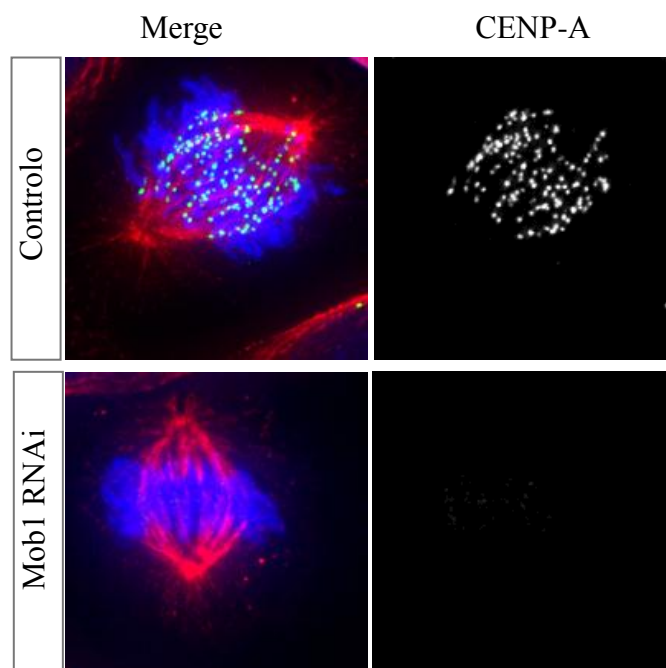


Figura 1.13. A CENP-A diminui nos centrómeros nas células que sofrem RNAi de hsMob1. A vermelho está representada a marcação da α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos), a verde a marcação da CENP-A (que se localiza nos centrómeros) e a azul o DNA. Pode observar-se na célula controlo a CENP-A se encontra localizada nos centrómeros. Por outro lado, na célula que sofreu RNAi de hsMob1, a CENP-A diminui drasticamente. Resultados não publicados (Cláudia Florindo).

Para além de estudos em células em cultura também se realizaram estudos em organismos, nomeadamente em *Drosophila*. Um mutante nulo foi criado e observou-se que os adultos eram mais pequenos, tanto em machos como em fêmeas (Figura 14.B) e, que os mutantes apresentavam as cerdas do tórax mais pequenas que nas *Drosophilas* selvagens (indicadas com setas na figura 14.C). Observou-se também que os mutantes machos eram estéreis. Este resultado é bastante interessante, pois a proteína dMob1 é importante para a meiose masculina mas não para a meiose feminina.

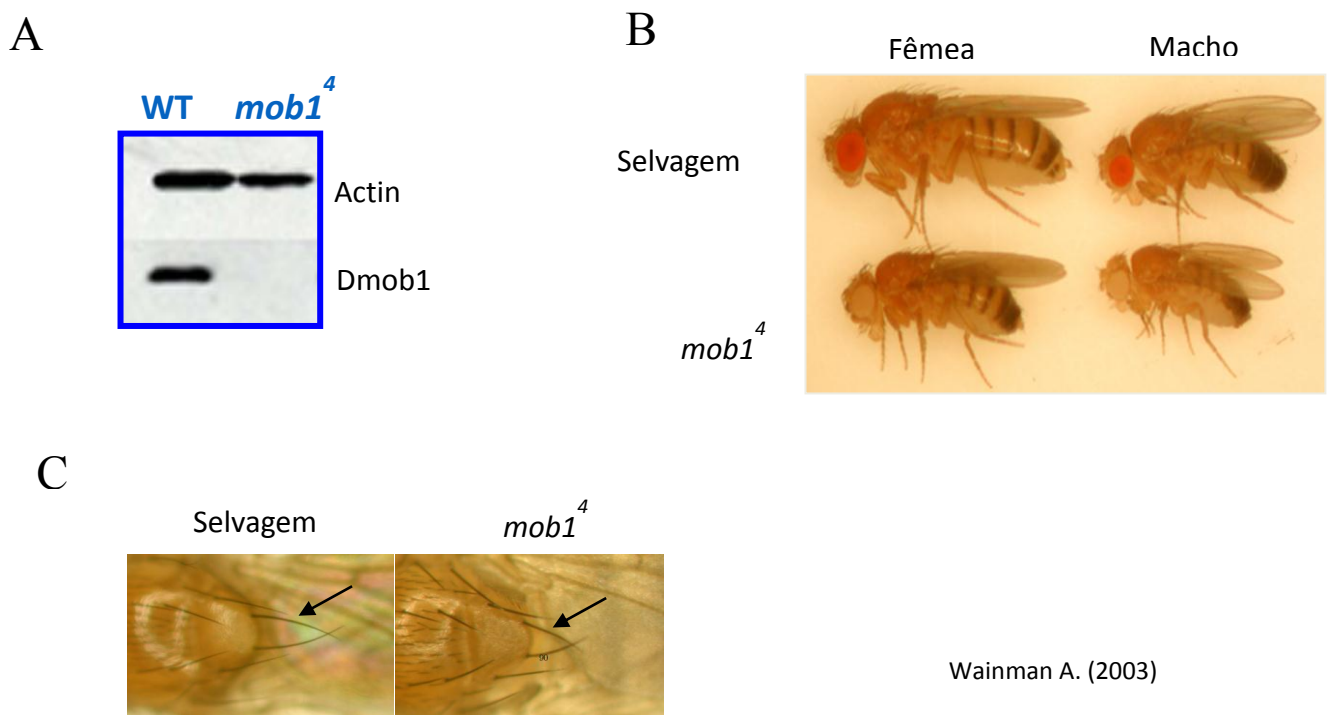


Figura 1.14. Mutantes nulos são mais pequenos e as cerdas do torax também são mais pequenas. A) Western blot, em que se pode observar que no mutante $mob1^4$ os níveis de proteína Dmob1 é nulo ou abaixo dos níveis de detecção. B) Pode-se observar que tanto os machos como as fêmeas selvagens são maiores que as mutantes. C) Pode-se observar que as cerdas do torax (indicadas com uma seta) são mais pequenas nas *Drosophilas* mutantes do que nas selvagens (wildtype).

1.8. Lap-tag

A técnica de Tandem affinity purification (TAP) é uma técnica que permite purificar complexos de proteínas. Esta técnica foi desenvolvida por Rigaut em 1999, e foi inicialmente testada em levedura e que mais tarde foi aplicável a outras células e organismos [60].

O princípio da técnica de TAP-tag é a expressão de uma proteína de fusão com dois tags de purificação distintos. Primeiro a proteína de fusão é isolado pela ligação do primeiro tag a uma matriz específica. Este tag é removido pela clivagem por parte de uma protease específica, libertando a restante proteína de fusão para o sobrenadante. De seguida, existe uma segunda ronda de purificação assegurada pela ligação do segundo tag com outra matriz específica. Existem várias possibilidades para estes dois tags de purificação [60]. Porém, foi criado uma versão que facilita a análise destes complexos de proteínas, em que um dos tags usados é GFP. Este tag possibilita a localização da proteína de fusão em células vivas. Sendo que este tag pode ser usado para purificação e para a localização, a esta versão foi atribuído o nome de LAP (Localization and affinity purification) [21]. Usar GFP como um dos tags tem duas vantagens, as células transformadas podem ser selecionadas através da citometria de fluxo e pode-se localizar a proteína de fusão. A localização da proteína de fusão pode mostrar se esta se comporta como a proteína endógena. Existem duas variações desta técnica como está representado na figura 1.15.

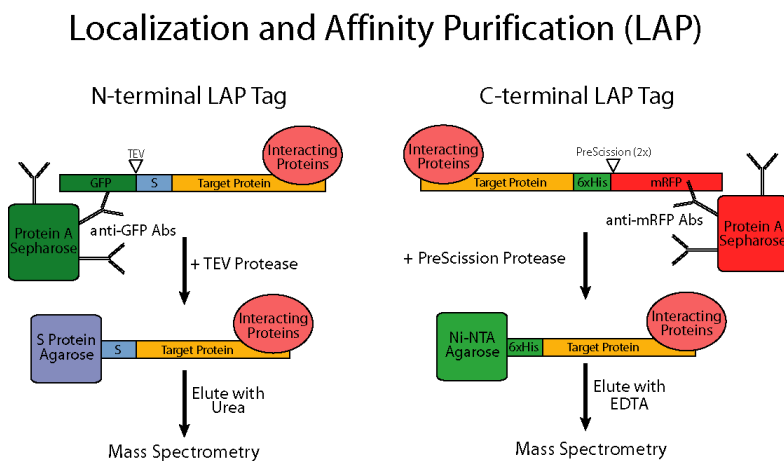


Figura 1.15. Representação da técnica Lap-tag (adaptado de [21]).

Objetivo

O objetivo central deste projeto de tese é perceber qual é a função mitótica da proteína hsMob1, sendo que a pergunta biológica por detrás deste objetivo é perceber de que maneira a mitose é executada e controlada.

Resultados preliminares sugerem que a hsMob1 está envolvida no alinhamento dos cromossomas e na estrutura dos centrossomas. Microscopia em tempo real também foi realizada e observou-se que quando se realizava RNAi da proteína hsMob1 levava a um bloqueio em mitose. Também se observou que o hsMob1 é importante para a localização da CENP-A. Dados estes resultados preliminares, que são o ponto de partida do projeto de tese desenvolvido, o objetivo central divide-se em objetivos mais específicos:

- ✓ Perceber de que maneira a hsMob1 é importante para a estrutura dos centrossomas;
- ✓ Perceber de que maneira o hsMob1 é importante para o alinhamento dos cromossomas;
- ✓ Perceber se a estrutura dos cinetócoros se encontra alterada, isto é, se outras proteínas se encontram alteradas como a CENP-A;
- ✓ Qual é o mecanismo que falha na localização da CENP-A, será o recrutamento ou a sua estabilização nos centrómeros;
- ✓ Qual dos mecanismos afetados pelo RNAi contra hsMob1 leva ao bloqueio em mitose.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células

Para este estudo foi utilizada a linha celular HeLa. Esta linha celular é uma linha celular imortalizada, que deriva a partir de células obtidas através de uma biópsia ao adenocarcinoma do colo do útero realizada em Henrietta Lacks, em 1951. As células foram mantidas em meio DMEM (GIBCO), suplementado com 4% FBS (GIBCO), 2mM de glutamina (GIBCO) e 1% Pen/Strep (GIBCO). As células foram mantidas na incubadora a 37°C, com atmosfera húmida e 5% de CO₂ na sala de cultura de células. A passagem de células (subcultura) foi realizada duas a três vezes por semana, quando a confluência da placa atingia aproximadamente os 90%. Para a passagem das células aspirou-se o meio e lavou-se as células três vezes com PBS 1x. De seguida, para que as células perdessem a aderência entre elas e à placa, adicionou-se tripsina 1x suficiente para cobrir o fundo da placa e incubou-se durante dois minutos na incubadora. As células foram observadas ao microscópio para garantir que já não se encontravam aderentes. Por fim, adicionou-se 5ml de meio DMEM e ressuspendeu-se gentilmente. Colocou-se 1/5 das células numa placa nova e adicionou-se 4ml de meio DMEM.

2.1.1. Sincronização de células HeLa

2.1.1.1. Bloqueio de timidina simples

O principal objetivo deste projeto de tese foi perceber a função mitótica da proteína hsMob1. De modo a aumentar o índice mitótico por experiência, sincronizaram-se as células de modo a que entrassem em mitose aproximadamente ao mesmo tempo. Para esta sincronização usou-se a timidina, uma molécula que inibe a síntese de DNA, bloqueando assim as células na fase S. Para realizar o bloqueio, adicionou-se para um volume final de 500µl de meio DMEM uma solução de timidina para uma concentração final de 2mM. Ao fim de 24 horas, lavou-se as células 3 vezes com meio DMEM para as desbloquear e foi colocado meio novo. Dado que as células estariam bloqueadas na fase S, colocaram-se as células na incubadora a 37°C e esperam-se 10horas, o tempo necessário para as células saírem da fase S, passarem por G2 e entrarem em mitose. Para controlar o número de células em mitose, as

células foram observadas ao microscópio antes de se proceder à fixação. As células em mitose têm um aspeto arredondado, que as distingue das restantes.

2.2. Transfecção com oligos de RNAi

Para baixar os níveis da proteína hsMob1 nas células HeLa usou-se a técnica de RNAi. Esta técnica requer oligos específicos que se vão ligar ao mRNA alvo levando à sua degradação. Para realizar RNAi em células HeLa usou-se o oligo 5 (CCA CCU GAA GGC CAA GAU G dT dT) que tem como alvo o mRNA da hsMob1. Usou-se como reagente de transfecção a lipofectamina 2000 (Life Technologies #11668027), que é um reagente de transfecção lipossomal, isto é, contém lipossomas que vão envolver o DNA permitindo que este entre na célula. No dia anterior à transfecção, semearam-se 0.5×10^5 células/poço em placas de 12 ou 24 poços. Num microtubo de 1.5ml dilui-se 1 μ l de lipofectamina 2000 em 50 μ l de meio sem soro e incubou-se durante dois minutos à temperatura ambiente. Noutro microtubo de 1.5 ml dilui-se 3 μ l de oligo5 (20 μ M) em 50 μ l de meio sem soro. De seguida, juntou-se a diluição do oligo à diluição da lipofectamina, misturou-se gentilmente e incubou-se a mistura durante 20 minutos à temperatura ambiente. O meio das células foi aspirado e substituído por 400 μ l de meio novo sem soro. Ao fim dos 20 minutos, a mistura do oligo com a lipofectamina foi novamente misturada gentilmente e adicionaram-se os 100 μ l às células por cada poço. As células foram colocadas na estufa a 37°C durante 2h e 30 minutos. Ao fim desse tempo, o meio foi substituído por um meio novo com soro e as células foram incubadas a 37°C durante 2 dias.

2.3. Imunofluorescência de células em cultura

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de proteínas em células ou tecidos usando anticorpos específicos acoplados a um fluorocromo capaz de absorver luz num comprimento de onda específico e emitindo a luz num comprimento de onda menor, permitindo a sua visualização ao microscópio de fluorescência. Para realizar imunofluorescência, semearam-se 4×10^4 células/poço em placas de 24 poços no dia anterior. A confluência das células no dia em que se realizava a imunofluorescência encontrava-se nos 70-80%. Usaram-se vários métodos de fixação, pois consoante as estruturas celulares que se

quer observar há fixações que permitem uma melhor visualização. Os diferentes métodos de fixação encontram-se discriminados na tabela 2.1.

2.3.1. Preparação de lamelas com poli-L-lisina

Quando as células são semeadas no dia anterior ou no mesmo dia não aderem bem à placa, resultando na perda de células durante a fixação. Para evitar essa perda trataram-se as lamelas com poli-L-lisina antes de semear as células. A poli-L-lisina tem a capacidade de melhorar a aderência das células às lamelas. Desta forma, cobriu-se a lamela com poli-L-lisina 0.1% (w/v) (sigma #6407) e esperou-se 5 minutos. Retirou-se a poli-L-lisina e lavou-se 5 vezes com água destilada. Esperou-se no mínimo 2 horas para as lamelas secarem e semearam-se as células sobre elas.

2.3.2. Método de fixação com metanol/acetona

Aspirou-se o meio das células e fez-se uma lavagem rápida com PEM 1x (10mM PIPES, 2mM MgCl₂ e 5mM de EDTA, pH 6.8) previamente aquecida no banho a 37°C. De seguida, as células foram fixadas com metanol/acetona (1/1) (solução a -20°C) durante 2 minutos. Retirou-se a solução de fixação e fizeram-se 3 lavagens de 5 minutos com PEM 1x.

2.3.3. Método de fixação com paraformaldeído 3.7%

Aspirou-se o meio das células e fez-se uma lavagem rápida com PEM 1x - 30% glicerol previamente aquecida no banho a 37°C. De seguida, as células foram fixadas durante 10 minutos com paraformaldeído 3.7% (3.7% paraformaldeído em PEM 4x) previamente aquecido no banho a 37°C. Retirou-se a solução de fixação e fizeram-se 3 lavagens de 5min com PEM 1x - 30% glicerol.

2.3.4. Método de pré-extração com PEM1x-0.5% triton x100, fixação com paraformaldeído 3.7%

Aspirou-se o meio das células e fez uma lavagem rápida com PEM1x previamente aquecida a 37°C. As células foram incubadas 1 minuto a 37°C em PEM1x-0.5% triton x100 (solução previamente aquecida). De seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído

3.7% (previamente aquecida) durante 10 minutos. Retirou-se a solução de fixação e fizeram-se 3 lavagens de 5min com PEM1x.

2.3.5. Permeabilização, incubação de anticorpos e montagem dos slides

O seguinte procedimento foi igual para todos os tipos de fixação descritas acima. As células foram permeabilizadas com PBS1x-0.5% triton x-100 durante 10 minutos. De seguida, descartou-se a solução de permeabilização e realizou-se 3 lavagens de 5 minutos com PBS1x e uma última de 5 minutos com PBS1x - 0.05% tween20. Diluiu-se o anticorpo primário em solução de diluição de anticorpos (PBS1x, 0.5% tween20, 1% FBS) e adicionou-se às células, incubou-se durante uma hora em câmara húmida. Ao fim de uma hora, repetiu-se a mesma sequência de lavagens. Diluiu-se o anticorpo secundário em solução de diluição de anticorpos e incubou-se as células com o anticorpo durante 30 minutos em câmara húmida. Repetiu-se novamente a mesma sequência de lavagens. Por fim, incubou-se as células com DAPI (0.25µg/µl) durante 15 minutos. O DAPI é uma molécula que se liga a zonas ricas de A-T (Adenina-Timidina) no DNA, corando desta forma o DNA. No fim dos 15 minutos realizaram-se três lavagens de 5 minutos com PBS1x. De seguida, usou-se o meio de montagem mowiol (preparação descrita abaixo), deixando-se a secar durante a noite. No dia seguinte, as lamelas foram seladas com verniz (RIMMEL London) e observadas ao microscópio Zeiss Axiomager Z2.

Preparação do Mowiol: Dilui-se 2,4g de Mowiol (SIGMA) em 6ml de glicerol e misturou-se. Seguidamente adicionou-se 6ml de H₂O e deixou-se em agitação durante a noite. No dia seguinte, juntou-se 12ml da solução tampão (0.2M Tris, 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 guardada a -20°C. Uma vez que a alíquota é descongelada deve ser mantida a 4°C.

2.3.6. Anticorpos usados em imunofluorescência

Tabela 2.1. Lista dos anticorpos primários usados em imunofluorescência e respectiva fixação utilizada.

Anticorpos primários	Feito em	Companhia	Fixação
Monoclonal, α -tubulina	Ratinho	Sigma (#T6199)	Metanol/acetona
Monoclonal, γ -tubulina (GTU88)	Ratinho	Sigma (#T6557)	Paraformaldeído 3.7%
Policlonal, Aurora B	Coelho	Abcam (#ab2254)	Metanol/acetona
Monoclonal, Cenp-c	Coelho	Abcam (#ab193666)	Metanol/acetona
Monoclonal, α -tubulina (YL 1/2)	Ratazana	Serotec (#MCA77G)	Metanol/acetona
Monoclonal, Plk1	Ratinho	Abcam (#ab17057)	Pré-extração com PEM1x-0.5% triton x100, fixação com paraformaldeído 3.7%

Tabela 2.2. Lista de anticorpos secundários usados para imunofluorescência.

Anticorpo secundário conjugado com	Feito em	Anti IgG de	Companhia
Alexa 488	Cabra	Coelho	Molecular Probes (#A11034)
Alexa 488	Burro	Ratinho	Bio-connect (#715-485-151)
Alexa 594	Cabra	Ratazana	Bio-connet (#112-515-167)

2.4. Análise de proteínas por SDS-PAGE

2.4.1 Recolha de células e preparação de amostras para géis de proteínas

Para recolher células em cultura para preparação de extratos a analisar em SDS-PAGE, aspirou-se o meio das células e lavaram-se com PBS 1x cuidadosamente. De seguida, adicionou-se PBS1x e raspou-se as células, sendo colhidas para um microtubo. Centrifugou-

se 5 min a 2000 rpm (rotações por minuto), descartou-se o sobrenadante e guardou-se o pellet a -20°C.

No dia seguinte, ressuspendeu-se o pellet guardado a -20°C em loading buffer (200mM Tris-HCl pH 8, 8% de SDS, 0.4% de azul bromofenol, 40% glicerol e 400mM β -Mercaptoetanol). O loading buffer (Laemmli buffer) contém SDS e β -Mercaptoetanol que vão desnaturar as proteínas e carregá-las negativamente, glicerol que dá peso à amostra fazendo com que a amostra fique no fundo do poço e azul bromofenol que dá cor à amostra e nos dá a informação da migração das proteínas. Imediatamente antes de carregar as amostras no gel, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 3 minutos no banho seco para desnaturar as proteínas e foram colocadas no gelo durante 1 minuto.

2.4.2. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Os géis de poliacrilamida são constituídos por uma rede de polímeros (acrilamida e bis acrilamida) que permitem a migração e a separação de proteínas segundo o seu peso molecular. Os géis de proteínas foram preparados de acordo com o descrito em Sambrook & Russel, 2001. As soluções usadas foram 30% acrilamida/bis acrilamida (BioRad), Tris-HCl (pH 8.8 e pH 6.8), 10% SDS (m/v), 10% persulfato de amónia (m/v) e TEMED (BioRad). Os géis de poliacrilamida foram montados e corridos no sistema Mini-PROTEANII (Bio-Rad), em tampão de corrida 1x (25mM de Tris, 0.19mM de glicina, 0.1% de SDS, pH=8.3). Utilizaram-se géis de 12%, com pentes de 10 poços e espaçadores de 0.75mm. No gel de concentração aplicou-se uma corrente elétrica de 15mA, sendo este valor de corrente duplicado para 30mA no gel de separação. Como marcador de peso molecular usou-se o Pre-stained protein Ladder Plus (Life Technologies #26620).

2.4.3. Géis corados com Coomassie Blue

Para visualizar as proteínas no gel, usou-se o corante Coomassie Blue R250 (Bio-Rad #1610400). Para corar as proteínas incubou-se o gel com Coomassie Blue (0.25% de Coomassie Blue, 45% Metanol e 10% Ácido acético glacial) durante 4 horas no agitador rotativo de bandeja com agitação suave à temperatura ambiente. Os géis foram descorados na solução descorante (40% de Metanol, 10% de Ácido acético glacial) durante a noite no agitador rotativo de bandeja com agitação suave à temperatura ambiente.

2.5. Western Blot

Depois de as amostras terem corrido o gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF para ficarem acessíveis à detecção dos anticorpos. Como a membrana de PVDF é hidrofóbica submergiu-se a membrana de PVDF em metanol durante 1 minuto e, de seguida em água destilada durante 5 minutos, tornando-a hidrofílica. Por último, a membrana foi equilibrada em tampão de transferência 1x (25 mM de Tris-HCL, 192 mM de Glicina, 20% de Metanol, pH 8-8.3) durante 10 minutos. Simultaneamente submergiu-se o gel de proteínas em tampão de transferência 1x durante 20 minutos. Também foram embebidos em tampão de transferência 6 papéis Whatman 3MM e 2 esponjas. O gel e a membrana foram colocados numa cassette entre 6 folhas de papel Whatman 3MM, seguidos de uma esponja. As proteínas foram transferidas durante 1 hora a 200mA em tampão de transferência 1x. Após a transferência, retirou-se a membrana e bloqueou-se a membrana em solução de bloqueio (PBS, 0.1% Tween20, 10% de leite magro) durante uma 1 hora. Como a membrana tem grande afinidade para proteínas é necessário bloqueá-la para evitar que o anticorpo se ligue inespecificamente à membrana. Seguiu-se uma lavagem rápida com a solução de lavagem (PBS, 0.1% Tween 20, 1% de leite magro) e incubação com os anticorpos primários diluídos na solução de lavagem durante uma hora. Lavou-se a membrana 3 vezes durante 5 minutos cada lavagem com solução de lavagem. Incubaram-se os anticorpos secundários diluídos na solução de lavagem durante uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes 10 minutos cada lavagem com a solução de lavagem e uma última com PBS durante 10 minutos. De seguida, a membrana foi incubada durante 1 minuto com uma mistura (50/50) de duas soluções de ECL (Solução I: 1M Tris pH 8.5, 250mM luminol em DMSO e 90mM ácido p-cumárico em DMSO; Solução II: 1M Tris pH8.5, H₂O e 30% H₂O₂), que vão reagir com a enzima HRP que está acoplada ao anticorpo secundário, produzindo um sinal. Este sinal foi detetado pelo filme Hyperfilm ECL (Amersham), usando vários tempos de exposição (1 minutos, 5 minutos e 10 minutos)

Tabela 2.3. Anticorpos primários usados em Western Blot.

Anticorpo primário	Feito em	Companhia
Monoclonal, anti hsmob3, clone 16E2	Ratinho	EMD Milipore(#MABS22)
Monoclonal, Lamina A/C	Ratinho	Santa Cruz (#SC-7792)

Tabela 2.4. Anticorpo secundário usado em Western Blot

Anticorpo secundário conjugado com	Feito em	Anti IgG de	Companhia
HRP	Cabra	Ratinho	Jackson ImmunoResearch (#115-035-146)

2.6. Clonagem

Um dos objetivos experimentais deste projeto de tese era clonar o gene hsMob1 no vetor de expressão pet22b, com a finalidade de induzir e purificar a proteína hsMob1 em bactérias. O primeiro passo da clonagem foi desenhar os primers para permitir a ligação do gene hsMob1 ao vetor de clonagem. O segundo passo foi amplificar o gene hsMob1 a partir do vetor PNA1 usando os primers desenhados. O terceiro passo foi fazer a restrição do vetor e da sequência amplificada com os primers usando duas enzimas de restrição de forma a criar extremidades coesivas e complementares entre o gene e o vetor de clonagem. O quarto passo foi fazer a ligação entre o gene hsMob1 e o vetor de expressão pet22b através de uma reação de ligação usando a enzima ligase. Por fim, transformou-se as bactérias com o resultado da ligação, escolheram-se colônias e extraiu-se o DNA. Para testar se os clones eram positivos (vetor com o gene hsMob1) o DNA foi analisado em gel de agarose. Para confirmar se a clonagem foi bem-sucedida, o DNA do clone escolhido foi mandado para sequenciação, que foi de seguida analisado.

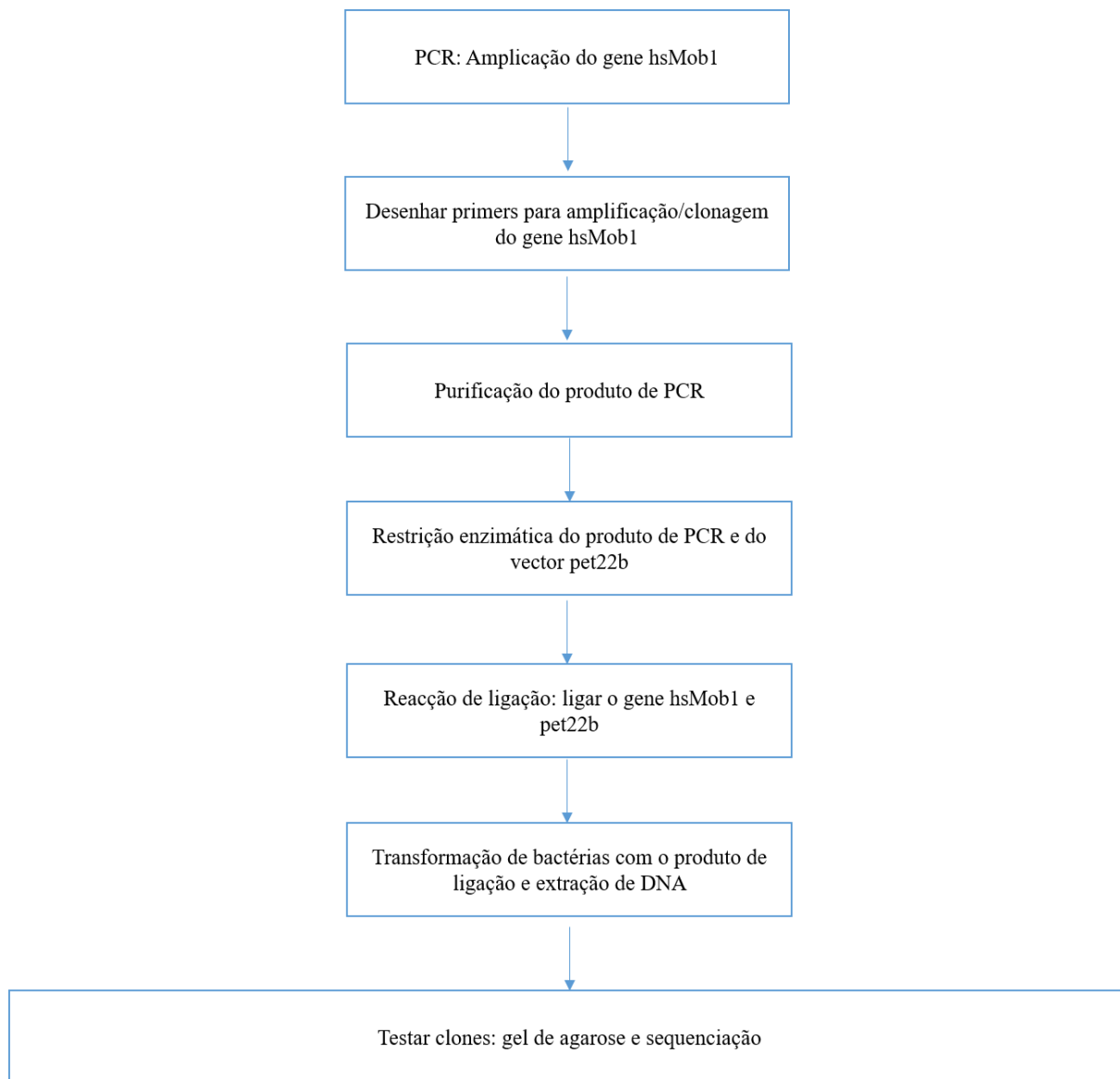


Figura 2.1. Representação esquemática dos passos realizados na clonagem de hsMob1 no vetor de expressão pet22b.

2.6.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para amplificar (criação de várias cópias) o gene hsMob1 procedeu-se à técnica de PCR usando os primers representados na tabela 2.5. O PCR consiste na criação de várias cópias de uma sequência de DNA, para isso precisa-se de primers e da enzima DNA polimerase. Os primers são desenhados de maneira a serem complementares ao início e ao final da sequência de DNA que se quer amplificar. O PCR divide-se em 3 fases: a desnaturação que se caracteriza pelo aquecimento para a separação da dupla cadeia de DNA, a hibridação que se caracteriza pelo arrefecimento que vai permitir que os primers se liguem à

sequência de DNA alvo, e a extensão em que a DNA polimerase adiciona nucleótidos ao lado 3' de cada primer. Para um volume total de 50µl, misturou-se 1µl do vetor PNA1 (97.5 ng/µl), 10µM de cada um dos dois primers (representados na tabela), 2mM de dNTPs mix (Invitrogen), 5µl de tampão de PCR 10X, 1µl de enzima DreamTaq e perpez-se com água até os 50µl. A reação de PCR teve um primeiro ciclo de desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 40 segundos e 72°C durante 60 segundos. Após estes 30 ciclos seguiu-se um ciclo de extensão durante 10 minutos a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%. A banda correspondente ao hsMob1 foi extraída e purificada a partir do gel de agarose usando o kit “QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol” (Quiagen #20021).

Tabela 2.5. Primers usados para clonar o hsMob1 no vetor de expressão pet22b.

Primer	Sequência	Informações
InCf78_Mob1Direto	actgatacccatATGGTCATGGCGGAGGG GACGGC	Primer para clonar Mob1 em pet22b. Insere dois locais de restrição para EcoRV e NdeI
InCf79_Mob1Reverso	gaggatatcggatccatTGCTTCACTTCCCC AGAAACTG	Primer para clonar Mob1 em pet22b. Insere dois locais de restrição para BamHI e EcoRV. Remove o STOP

2.6.2. Reação de ligação

Para proceder à reação de ligação, primeiramente usaram-se as enzimas BamHI e NdeI para digerir o vetor e o produto de PCR purificado resultando em extremidades coesivas e complementares entre ambos. Para a reação de ligação usou-se: 1µl ligase, 1µl de tampão ligase, DNA do vetor (pet22b), DNA do insert (hsMob1), água até perfazer um volume de 20µl. A reação de ligação teve a duração de uma hora e realizou-se à temperatura ambiente.

2.6.3. Transformação de bactérias

As bactérias foram transformadas com produto de ligação, isto é, cada bactéria mantém uma cópia do plasmídeo. Descongelou-se 100µl de células competentes (bactérias

DH5 α) e adicionou-se 100ng de DNA (plasmídeo clonado). Incubou-se no gelo durante 20 minutos. De seguida, colocou-se 1 minuto a 42°C e novamente 3 minutos no gelo. Adicionou-se 400 μ l de LB (meio de crescimento de bactérias) e incubou-se 30 minutos no banho com agitação a 37°C. Por fim, espalhou-se 30 μ l da mistura numa placa de LB Agar com o antibiótico de seleção (antibiótico a que o vetor é resistente). Deixou-se as placas durante a noite na incubadora a 37°C. No dia seguinte, picaram-se várias colónias das placas de LB Agar e deixaram-se a crescer durante a noite num falcon com LB e antibiótico de seleção (ampicilina). No dia seguinte, fez-se a extração do DNA dos clones utilizando mini-preps manuais ou o kit Quia-Prep spin MiniPrep (Quiagen #27106). No fim das mini-preps quantificou-se o DNA no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). De seguida, fez-se a restrição do DNA dos clones com as enzimas BamHI e NdeI e foram corridos em gel de agarose 1%.

Mini-preps manuais: Centrifugou-se a cultura que cresceu durante a noite a 4000rpm durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado na solução I (10mM EDTA, 25 mM Tris HCl – ph 8). Adicionou-se a solução II (10% NaOH [2M], 10% SDS), inverteu-se o tubo 6 vezes e deixou-se 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se a solução III (5M ácido acético) e agitou-se. Centrifugou-se 10 minutos à velocidade máxima. Recolheu-se o sobrenadante para um tubo novo e acrescentou-se etanol absoluto ou isopropanol. Centrifugou-se 15 minutos novamente à velocidade máxima. Retirou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com etanol 70%. Centrifugou-se novamente 15 minutos à velocidade máxima. Tirou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado na estufa a 37°C. Por fim eluiu-se o precipitado em água destilada.

2.7. Produção e Purificação de proteínas

Para a produção e purificação de proteína hsMob1 primeiro clonou-se o hsMob1 no vetor de expressão pet22b, como descrito no ponto 2.6. De seguida transformou-se as bactérias BL21 com o clone positivo JMS2 e induziu-se a produção de proteína nessas bactérias usando IPTG. A proteína tem um tag de histidinas (his-tag), que consiste em seis resíduos de histidinas. Esta cauda de histidinas vai possibilitar a purificação da proteína através de grãos de níquel, pois as histidinas ligam-se com grande afinidade e especificidade aos grãos de níquel.

2.7.1. Indução de proteína

Para a indução de proteínas usou-se o clone positivo, a que se chamou JMS2. As bactérias BL21 foram transformadas com o DNA do JMS2. Dessa placa de LB Agar da transformação de bactérias, picou-se uma colônia e deixou-se crescer durante a noite em LB mais o antibiótico de seleção. No dia seguinte, diluiu-se a cultura de bactérias que cresceu durante a noite em LB, de 1/100. Incubou-se a 37°C com agitação até atingir 0,13 OD (densidade ótica) que foi medida no NanoDrop 2000c. De seguida, induziu-se com 0,5mM de IPTG durante 4 horas. O IPTG é um análogo da lactose e indutor artificial da produção de lactose. Ao fim das 4 horas, centrifugou-se 5 minutos a 3000 rpm (rotações por minuto), retirou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com PBS 1x. Centrifugou-se novamente, retirou-se o sobrenadante e guardou-se o pellet a -20°C.

2.7.2. Lise bacteriana

Ressuspendeu-se o pellet da indução em solução de lise (500mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazole, 10mM β-mercaptoetanol, 0.5% Tween 20), deixou-se 30 minutos no gelo. Usando o sonicador, sonificou-se a amostra num total de 2 minutos, em pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos a 70% de frequência. O sonicador é um aparelho que usa a energia das ondas sonoras, sendo a mais comum o ultrassom, cujas vibrações geram tensões mecânicas nas bactérias levando à sua lise. De seguida, centrifugou-se a amostra a 1200 rpm (rotações por minuto) a 4°C durante 30 minutos. Retirou-se o sobrenadante para um novo falcon e guardou-se a -20°C.

2.7.3. Purificação de proteína

Colocou-se 500µl de grãos Ni-NTA agarose (Quiagen #30210) num falcon de 50ml. Equilibraram-se os grãos de níquel 2 vezes com tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.5% tween20). De seguida, incubou-se os grãos de níquel com o sobrenadante da lise durante 2 horas no roller à temperatura ambiente. Lavaram-se 2 vezes os grãos de Ni-NTA com PBS 1x para retirar todas as proteínas que não se encontravam ligadas aos grãos e, retirou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se aos grãos a solução de eluição (50mM NaH₂PO₄, 600mM NaCl, 250mM imidazole, 10mM β-mercaptoetanol, pH 8) para desligar a proteína dos grãos e, recuperou-se o sobrenadante. Repetiu-se este passo 6 vezes, analisando-se depois as eluições em gel de proteínas corado posteriormente com Coomassie Blue (protocolo descrito em 2.4.3.)

2.8. Preparação de cromossomas

Para ver defeitos a nível cromossomal usou-se o seguinte protocolo. Tripsinizaram-se as células em cultura, de seguida incubaram-se as células 5 minutos e 30 segundos com 40% de meio completo DMEM mais 60% água. De seguida adicionou-se o mesmo volume da solução de Carnoy's (75% de metanol puro, 25% de ácido acético glacial). Centrifugaram-se as células 5 minutos a 900 rpm (rotações por minuto). Retirou-se sobrenadante e adicionou-se nova solução de Carnoy's, que se incubou durante 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente 5 minutos a 900 rpm e ressuspenderam-se as células numa nova solução de Carnoy's. Repetiu-se este último passo 2 vezes. Deixou-se cair as células para a lamela em solução Carnoy's a 5 cm de altura. Deixou-se secar à temperatura ambiente. Os slides foram corados com 5% Giemsa em PBS 1x durante 7 minutos. Lavaram-se com água e deixaram-se a secar. As lamelas foram montadas com mowiol e deixadas a secar durante a noite. No dia seguinte, foram selados com verniz. As lâminas foram observadas no microscópio Zeiss Axiomager z2.

3. Resultados

3.1. Localização intracelular da proteína hsMob1

A proteína hsMob1 pertence a uma família de proteínas conservada de levedura até humanos. Encontra-se descrito que a proteína hsMob1 se acumula no complexo de Golgi em células HeLa e, que está envolvida no tráfego vesicular. Para além desta função, estudos preliminares do nosso laboratório mostram que a proteína hsMob1 tem uma função mitótica, sendo importante para a normal progressão da mitose. Para aprofundar o conhecimento desta função de hsMob1, começou-se por estudar a localização desta proteína ao longo do ciclo celular, pois a sua localização pode ajudar a perceber a sua função e a prever os seus parceiros moleculares.

Para estudar a localização da proteína hsMob1 usou-se quatro linhas celulares HeLa que expressam a fusão da proteína hsMob1 em fusão com GFP. As linhas CAA2 e CAA9 expressam a proteína hsMob1 em fusão com a sequência de GFP no N-terminal (GFP_{hsMob1}) e as linhas CAB13 e CAB14 expressam a proteína hsMob1 com a sequência de GFP no C-terminal (hsMob1GFP) (Tabela 3.1). Estas linhas celulares foram criadas anteriormente no nosso laboratório (Ana Severiano, 2009) e, resultam de uma transfecção estável.

Tabela 3.1. Linhas celulares usadas na localização da proteína hsMob1

Nome da linha celular HELA	Proteína de fusão
CAA2	GFP _{hsMob1}
CAA9	GFP _{hsMob1}
CAB13	hsMob1GFP
CAB14	hsMob1GFP

3.1.1. Teste às linhas celulares usadas na localização da proteína hsMob1

As quatro linhas celulares CAA2, CAA9, CAB13 e CAB14 expressam as proteínas de fusão estavelmente. Quando se realiza uma transfecção estável de uma sequência de DNA, esta é aleatoriamente introduzida no genoma da célula. Deste modo, esta inserção aleatória

pode mudar o comportamento da célula e consequentemente o comportamento da proteína. Por esta razão, usaram-se quatro linhas celulares que expressam a proteína hsMob1 em fusão com GFP para comparar a localização entre as quatro linhas celulares.

Antes de usar as linhas celulares CAA2, CAA9, CAB13 E CAB14 no estudo da localização da proteína hsMob1, estas foram testadas por Western Blot, para confirmar a presença das proteínas de fusão. A proteína hsMob1 endógena tem um peso molecular de 26kDa e as proteínas de fusão tem um peso molecular de ~50kDa. Como controlo no Western Blot usou-se as células HeLa que só expressam a proteína hsMob1 endógena, como podemos observar no poço 1 da figura 3.1 em que se observa uma banda de 26kDa. Na figura 3.1, nos poços 3, 4 e 5, que correspondem respetivamente às linhas celulares CAA9, CAB13 e CAB14, observam-se duas bandas, uma com um peso molecular de 26kDa, correspondente à proteína hsMob1 endógena e outra com um peso molecular de ~50kDa que corresponde à proteína de fusão. Ainda na figura 3.1, o poço 2, que corresponde à linha celular CAA2, só se observa uma banda de peso molecular de 26kDa que corresponde à proteína hsMob1 endógena, sendo que não se conseguiu detetar a proteína de fusão.

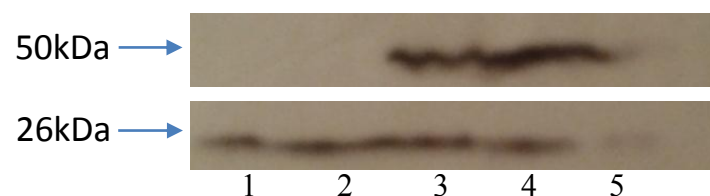


Figura 3.1. As linhas CAA9, CAB13 E CAB14 expressam as proteínas de fusão. Western blot em que foram usados extratos de células HeLa e das linhas celulares CAA2, CAA9, CAB13 E CAB14. A membrana foi incubada com o anticorpo 16E2 (anti-hsMob1) para comprovar a presença das proteínas de fusão. No poço: 1- Controlo (células HeLa), pode observar-se uma banda com o peso molecular de 26kDa que corresponde à proteína hsMob1 endógena; 2- Linha celular CAA2 pode observar-se uma banda com peso molecular de 26kDa que corresponde à proteína hsMob1 endógena, não se detectando a proteína de fusão GFPhsMob1; 3- Linha celular CAA9 pode observar-se duas bandas, uma com um peso molecular de 26 Kda e outra com um peso molecular de ~50 kDa, correspondendo respectivamente à proteína hsMob1 endógena e à proteína de fusão GFPhsMob1; 4-Linha celular CAB13 observa-se duas bandas, uma com um peso molecular de 26 kDa e outra com um peso molecular de ~50 kDa, correspondendo respectivamente à proteína hsMob1 endógena e à proteína de fusão hsMob1GFP; 5- Linha celular CAB14 observa-se duas bandas, uma com um peso molecular de 26 Kda e outra com um peso molecular de ~50 kDa, correspondendo respectivamente à proteína hsMob1 endógena e à proteína de fusão hsMob1GFP.

3.2.2. Localização das proteínas de fusão hsMob1-GFP e GFP-hsMob1

Dados os resultados de Western Blot, para os ensaios de fluorescência usaram-se somente as linhas celulares CAA9, CAB13 e CAB14, em que a presença das proteínas de fusão foi confirmada. Para estes ensaios usaram-se como controlo células HeLa, para se conseguir distinguir a autofluorescência das células e sinal de GFP e, deste modo distinguir o ruído de fundo. Usando a técnica de imunofluorescência, em que a vermelho está representada a marcação de α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos) e a azul o DNA, pode-se observar na figura 3.2 no painel A, que a proteína de fusão se acumula, durante a interfase, numa zona em volta do núcleo (representado por uma seta azul), que é similar à acumulação da proteína no complexo de Golgi já descrita para células HeLa. Ainda na figura 3.2 no painel B e C, em que se pode observar respetivamente uma célula em metafase e outra em anafase, a proteína de fusão parece acumular-se nos microtúbulos (representado com setas vermelhas), e também parece acumular-se nos polos do fuso.

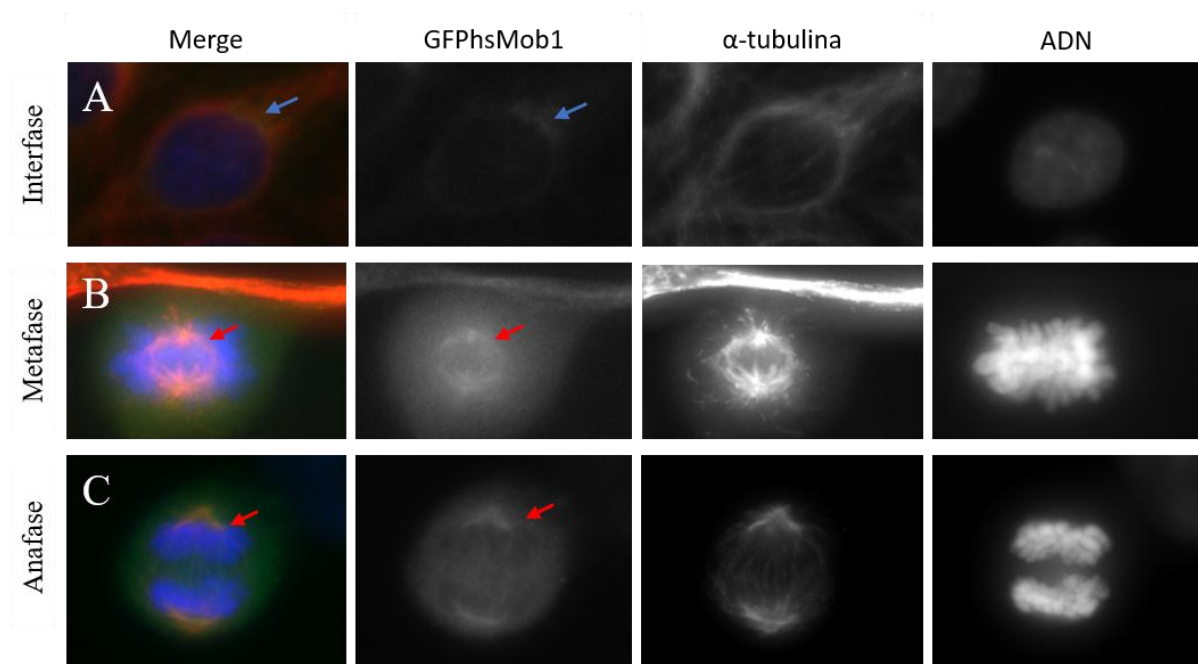


Figura 3.2. A proteína hsMob1 acumula-se em volta de uma porção do núcleo em interfase e nos microtúbulos em mitose. A localização da proteína hsMob1 foi feita usando linhas celulares HeLa que expressam a proteína hsMob1 em fusão com o GFP. A vermelho está representada a marcação da α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos), a verde o sinal de GFP e a azul o DNA. No painel A, em que se pode observar uma célula em interfase em que a proteína de fusão se acumula numa pequena porção em volta do núcleo (indicado com uma seta azul). No painel B e C, estão representadas duas células em mitose, respetivamente em metafase e anafase, em que a proteína de fusão parece acumular-se nos microtúbulos (indicado com seta vermelha).

Continuando nos ensaios de imunofluorescência na figura 3.3, em que o vermelho representa a marcação da γ -tubulina, a azul o DNA pode-se observar que em interfase (painel A) se acumula nos centrossomas. Durante a mitose, em prófase a proteína de fusão localiza-se dispersa pelos centrossomas e em volta dos mesmos (painel B). A partir de prometáfase (painel C) até metafase (painel D) as proteínas de fusão acumulam-se especificamente nos centrossomas (representado por setas verdes).

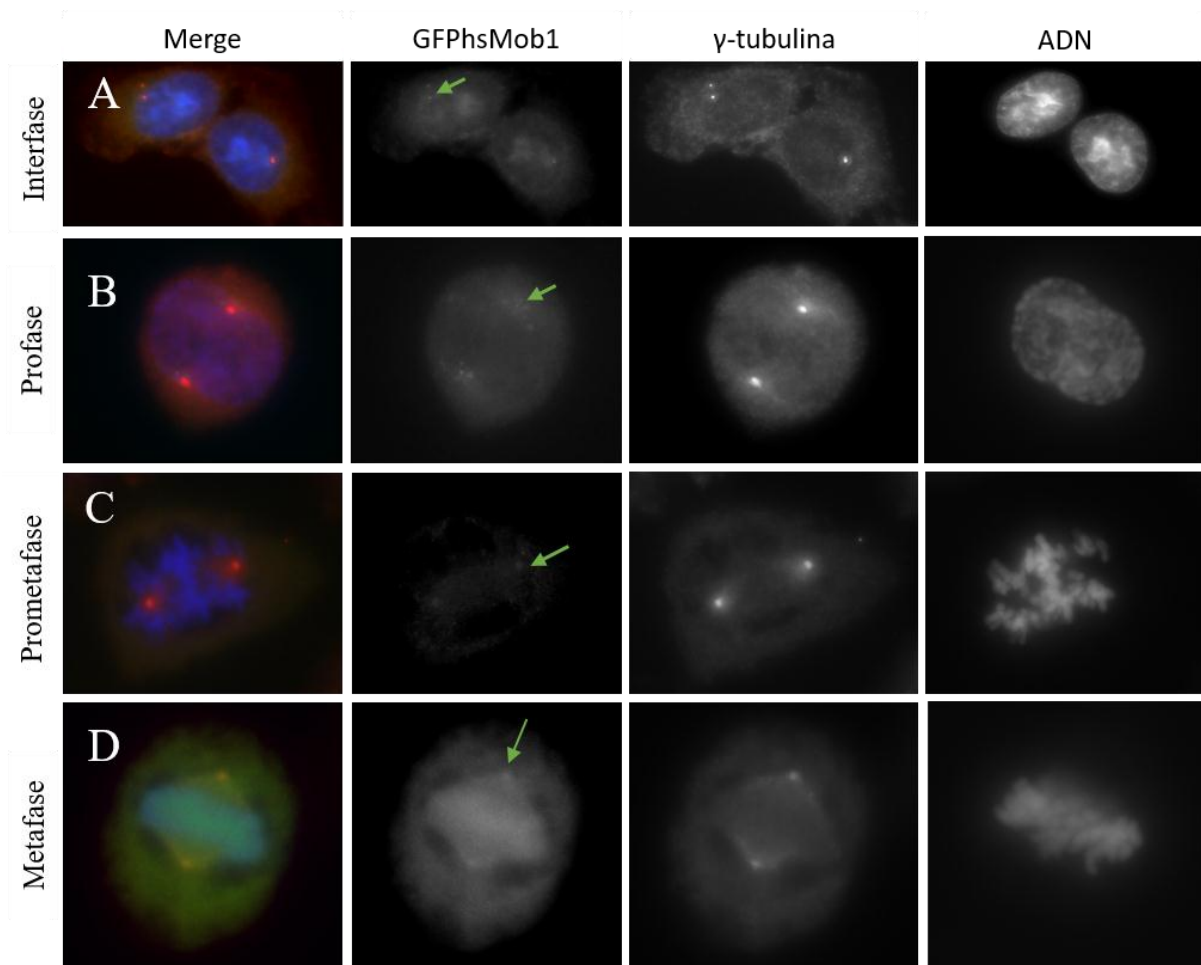


Figura 3.3. A proteína hsMob1 é centrossomal ao longo do ciclo celular. A localização da proteína hsMob1 foi feita usando linhas celulares HeLa que expressam a proteína hsMob1 em fusão com o GFP. A vermelho está representada a marcação da γ -tubulina (que se localiza nos centrossomas), a verde o sinal de GFP e a azul o DNA. No painel A, pode-se observar uma célula em interfase em que a proteína de fusão se acumula nos centrossomas (indicado por uma seta verde). No painel B, pode-se observar uma célula em prófase em que a proteína de fusão se acumula nos centrossomas e à volta dos mesmos (indicado com uma seta verde). No painel C, pode-se observar uma célula em prometáfase em que a proteína de fusão se acumula nos centrossomas (indicado por um seta verde). No painel D, pode-se observar uma célula em metafase em que a proteína de fusão se acumula nos centrossomas (indicado por uma seta verde).

As proteínas de fusão das três linhas celulares apresentam algumas localizações iguais mas também divergem noutras. A localização centrossomal em mitose e a acumulação numa porção em volta do núcleo é comum nas três linhas. Porém, a localização centrossomal em interfase só se observou nas linhas CAA9 e CAB13 e a localização nos microtúbulos só se observou na linha celular CAA9 (como representado na tabela 3.2)

Tabela 3.2. Localização observada em cada linha celular.

Localização	CAA9	CAB13	CAB14
Centrossomas			
○ Interfase	✓	✓	-----
○ Mitose	✓	✓	✓
Em volta do núcleo	✓	✓	✓
Microtúbulos	✓	-----	-----

3.2. Estudo da função da proteína hsMob1

Para estudar a função da proteína hsMob1 resolveu-se abordar o estudo de duas formas: estudar os parceiros moleculares e realizar a técnica de RNAi em células HeLa. Os parceiros moleculares podem dar-nos informação das vias de sinalização em que a proteína hsMob1 está envolvida. A técnica de RNAi, como diminui os níveis proteicos de hsMob1, mostra o que falha na normal progressão da mitose quando a proteína não se encontra presente.

3.2.1. Parceiros moleculares

As proteínas MOB são proteínas reguladoras de cinases, associando-se frequentemente às mesmas. Queria-se estudar os parceiros moleculares da proteína hsMob1 para além dos que se encontram descritos. Para esta finalidade decidiu usar-se a técnica de Lap-Tag, que se encontra descrita na introdução. Antes de proceder à técnica de Lap-Tag (técnica descrita na introdução), induziu-se e purificou-se a proteína hsMob1.

Para induzir a proteína, primeiro clonou-se o hsMob1 no vetor de expressão Pet22b, que possui todos os elementos genéticos que permitem a expressão de proteínas recombinantes sobre o comando do promotor T7 (informações sobre o vetor em anexo). Para além disso, o vetor tem uma cauda de histidinas (His-tag) no C-terminal, possibilitando a purificação da proteína através de grãos de níquel. Para a clonagem desenhou-se dois primers:

um direto e um reverso. O primer direto insere dois locais de restrição EcoRV e NdeI e o primer reverso insere dois locais de restrição BamHI e EcoRV. O primer reverso tem outra particularidade, remove o codão stop do hsMob1 para que o hsMob1 seja transcrito com a cauda de histidinas. Na figura 3.4, está representado o esquema de clonagem de hsMob1 no vetor pet22b.

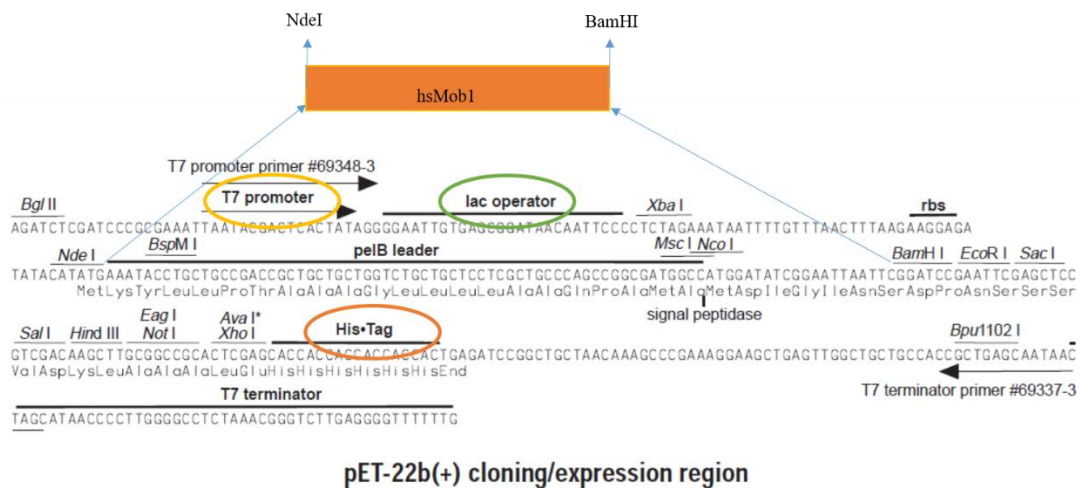


Figura 3.4. Esquema representativo da clonagem de hsMob1 no vetor de expressão pet22b. Pode-se observar que o vetor Pet22b possui o promotor T7 (indicado com um círculo amarelo), o operador lac (indicado com um círculo verde) e a cauda de histidinas (indicado com um círculo laranja). Encontra-se representado o sítio em que o hsMob1 foi clonado (indicado com setas azuis).

Usando estes primers desenhados amplificou-se o gene hsMob1 através de PCR, como se pode observar no poço 1 no gel de agarose da figura 3.5.A. De seguida, fez-se a reação de ligação e o produto dessa reação foi inserido em bactérias BL21. O DNA foi extraído e, foi feita a restrição com as enzimas BamHI e NdeI. Sendo que o vetor tem ~2000bp e o hsMob1 600bp, os clones positivos teriam que apresentar duas bandas com esses pesos moleculares. Fez-se a restrição enzimática com a BamHI e a NdeI que se sabe que remove o hsMob1 do vetor (Figura 3.4). Na Figura 3.5.B, pode-se observar duas bandas com ~2000 bp e 600bp nos quatro clones, comprovando que estes são positivos. Desses quatro clones, escolheu-se um, a que se chamou Jms2, para fazer a indução da proteína e seguidamente a purificação.

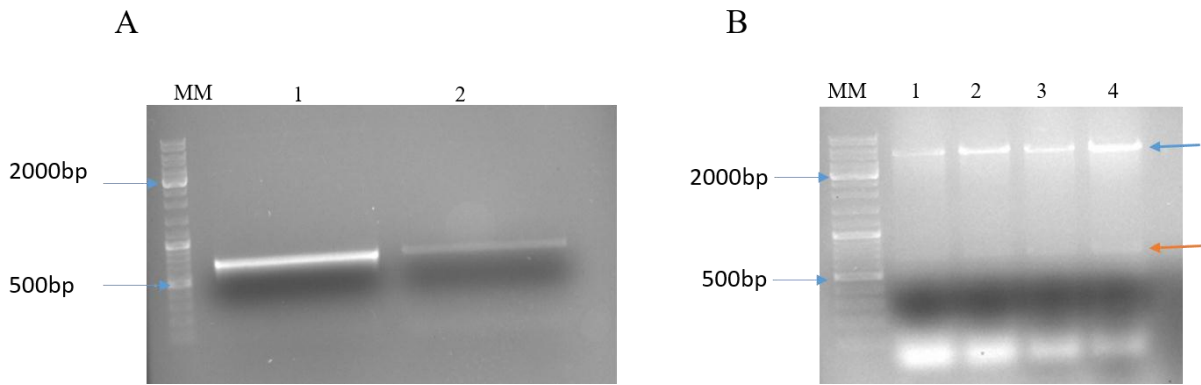


Figura 3.5. Clonagem de hsMob1 no vector pet22b. A) Pode-se observar um gel de agarose, no qual o poço 1 corresponde à amplificação do gene hsMob1 através de PCR, o segundo poço corresponde ao controlo. B) Os clones para serem testados primeiro fez-se a restrição com as enzimas BamHI e NdeI, de seguida foram corridos num gel de agarose. Pode-se observar no gel de agarose o DNA de 4 clones, pode-se observar duas bandas, uma de 2000 (representado com seta azul) e 600pb (representado com seta azul), que correspondem ao vector e ao hsMob1 respectivamente. Comprovando-se que os clones são positivos.

Antes de se usar o clone Jms2, este foi sequenciado para confirmar que a clonagem foi bem-sucedida. Como se pode observar na figura 3.6., a clonagem está de acordo com o que era esperado, nomeadamente o codão stop foi retirado e a cauda de histidinas encontra-se enquadrada com a sequência de hsMob1.

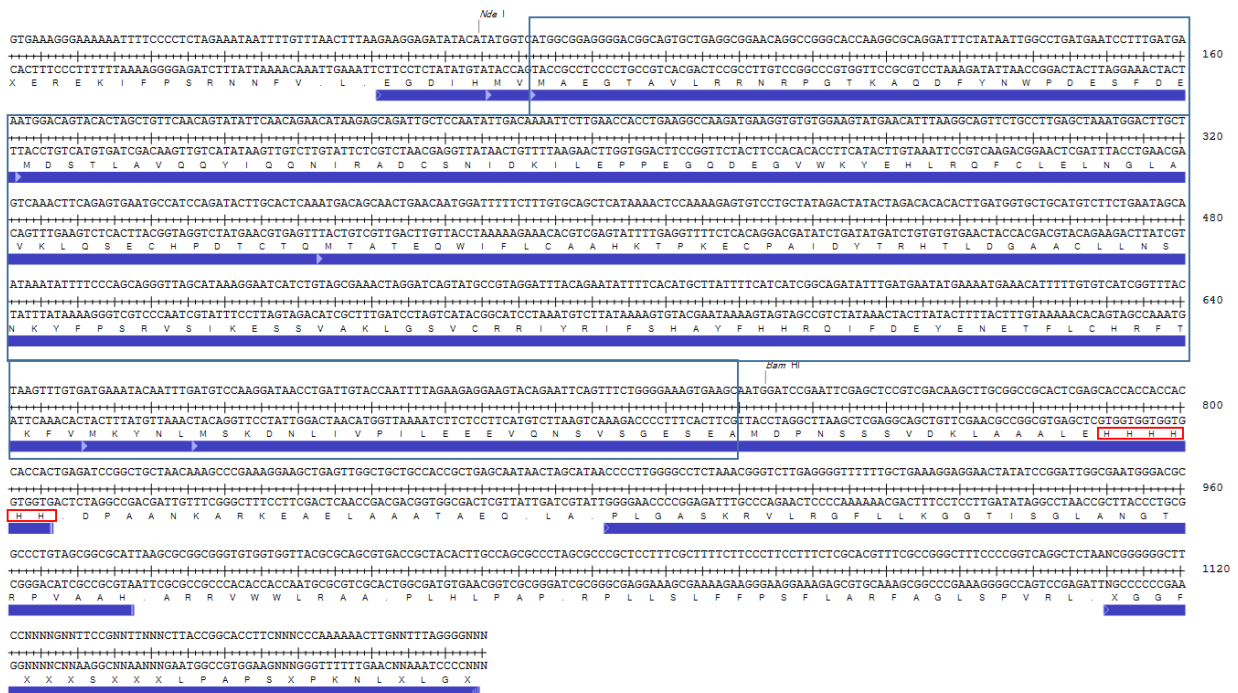


Figura 3.6. Sequenciação do clone Jms2. O gene hsMob1 está representado numa caixa azul. Pode-se observar que a primeira ORF inclui o gene hsMob1 e a cauda de histidinas (indicado por uma caixa vermelha), podendo-se confirmar que o codão STOP foi removido com sucesso e, que a cauda de histidinas vai ser transcrita juntamente com o gene hsMob1.

Depois de comprovar a correta clonagem de hsMob1 no vetor pet22b procedeu-se à indução da proteína hsMob1 em bactérias BL21. Para induzir a proteína hsMob1 em bactérias BL21 usou-se IPTG que é um indutor artificial do operão lac, isto é, liga-se ao operão lac do vetor pet22b induzindo a transcrição do gene Mob1. Procedeu-se à indução da proteína usando IPTG, durante 4 horas. Como podemos observar na figura 3.7, pode-se observar a indução da proteína hsMob1 no poço 3 e 4. (indicado com uma seta amarela).

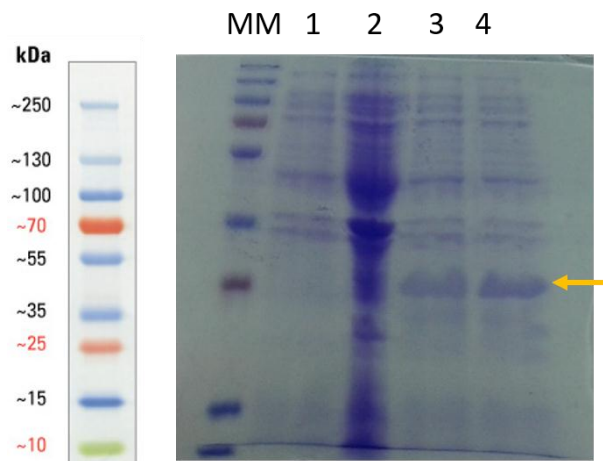


Figura 3.7. Indução da proteína hsMob1. Para realizar a indução da proteína hsMob1 transformou-se as bactérias BL21 com o DNA do clone positivo Jms2 e, usou-se IPTG para a indução. Na imagem, está representado um SDS-PAGE corado com Coomassie blue, em que os poços de corrida 1 e 2 correspondem ao controlo (sem indução) e poços de corrida 3 e 4 correspondem à indução. Pode-se observar nos poços de corrida 2 e 4 a indução da proteína hsMob1, com um peso molecular de aproximadamente 25 kDa (indicado com uma seta amarela).

Depois da indução realizou-se a lise das bactérias através de sonicação, de forma a libertar as proteínas e permitir a purificação de hsMob1. A purificação foi feita com grãos de agarose carregados com iões de níquel, pois as histidinas ligam-se com muita afinidade aos iões de níquel. O extrato final purificado foi analisado em SDS-PAGE, e não se detetou proteína. O facto de a purificação ter falhado pode ser devido à indução ser fraca e como resultado a quantidade de proteína purificada encontra-se abaixo dos limites de deteção do gel.

4.2.2. Efeitos de RNAi contra hsMob1 em células fixadas

Através das experiências de localização sabe-se que a proteína hsMob1 se localiza nos centrossomas, sendo que esta estrutura desempenha um papel importante na organização do fuso mitótico durante a mitose. Resultados anteriores do nosso laboratório mostram

fragmentação dos centrossomas e diminuição da γ -tubulina nos mesmos, sendo que pode existir uma relação entre a localização e a sua função. Para além destes fenótipos, também se observou desalinhamento dos cromossomas em metafase. Com o objetivo de confirmar estes resultados realizou-se RNAi de hsMob1 em células HeLa.

Como o interesse era especialmente em defeitos mitóticos queria-se aumentar o número de mitoses por lamela/experiência, para ter uma maior amostragem de mitoses por experiência. Para este efeito, usou-se timidina que é uma molécula que inibe a síntese de DNA, bloqueando assim as células na fase S. Depois as células são desbloqueadas, retirando-se a timidina do meio das células, permitindo que as células continuem a percorrer o ciclo até chegar a mitose. Fez-se um ensaio de bloqueio simples para saber qual seria o tempo a esperar nas condições da nossa experiência entre o desbloqueio em que as células se encontram na fase S e uma população grande de células se encontrar em mitose. Para isso, as células HeLa foram bloqueadas durante 24 horas e desbloqueadas. As células foram observadas através do microscópio e o índice mitótico foi quantificado ao fim de 6, 8 e 10 horas após o desbloqueio (anexo 2). O índice mitótico é a fração entre o número de células em mitose e o número de células totais. O tempo em que o índice mitótico em que era superior foi às 10 horas, em que o índice mitótico era de 60%.

De seguida, iniciou-se os ensaios de RNAi seguidos de desbloqueio de 10 horas. Para os ensaios de RNAi usou-se o oligo5, que foi anteriormente usado no nosso laboratório e que se sabe que diminui de forma eficiente os níveis da proteína hsMob1. Os defeitos mitóticos que resultam da remoção de hsMob1 foram observados através de microscopia de fluorescência. Como controlo foram usadas células HeLa não transfectadas com o oligo. O que se pode observar na figura 3.8.A, no painel a e c, é que a remoção de hsMob1 resulta em cromossomas desalinhados em metafase e, observa-se também no painel a e b defeitos no fuso mitótico. Em anafase, pode-se observar na figura 3.8.B cromossomas arrastados nas células que sofreram RNAi de hsMob1. A contagem de células foi feita e a quantificação dos fenótipos foi feita, podendo-se observar que os cromossomas desalinhados em células que sofrem RNAi aumentaram em 36% em relação ao controlo, os problemas estruturais aumentaram 25% e os cromossomas arrastados aumentaram em 46%. Estas percentagens resultaram da contagem de 90 mitoses de cada lamela (controlo e RNAi) de uma só experiência.

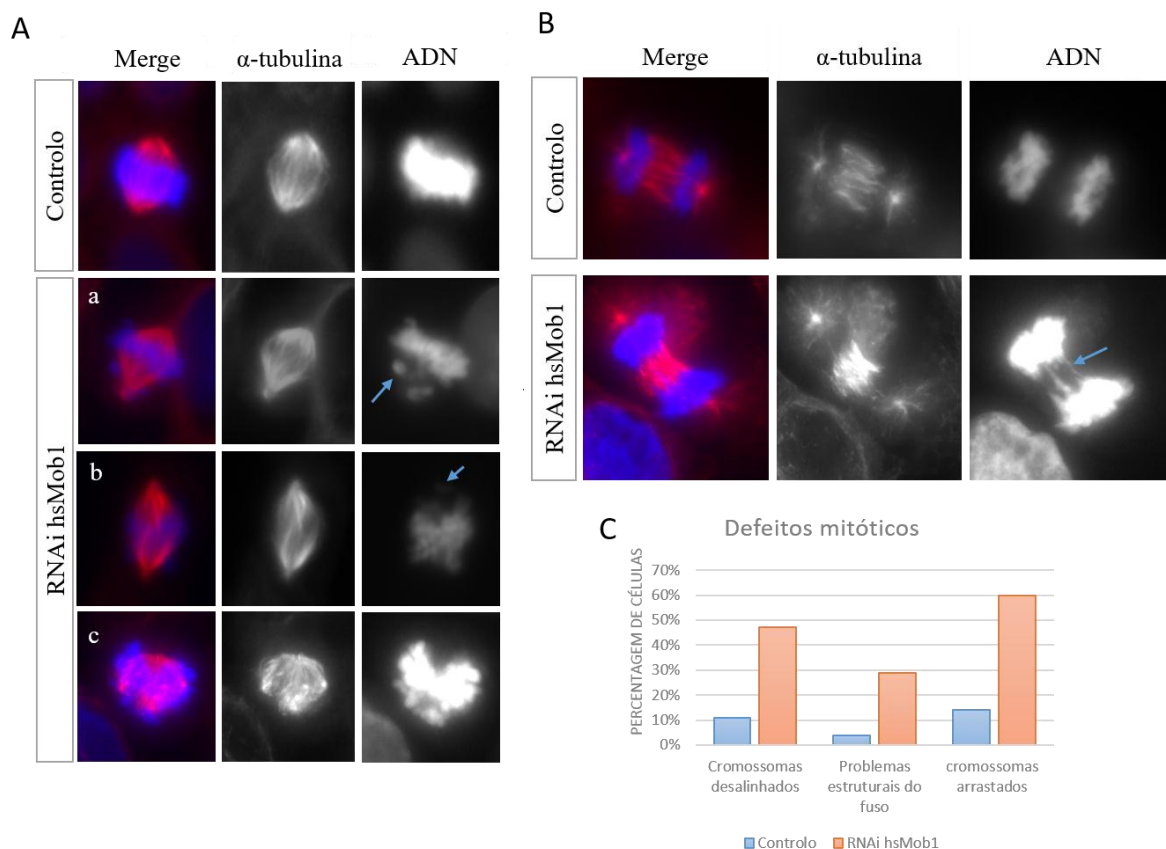


Figura 3.8. RNAi de hsMob1 resulta em defeitos mitóticos. A vermelho está representada a marcação de α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos) e a azul o DNA. As células de RNAi hsMob1 foram tratadas com o oligo 5, que tem como alvo o mRNA do hsMob1 A) No painel superior, está representada uma célula HeLa controlo em metafase, com todos os cromossomas alinhados na placa metafásica. No painel a, pode-se observar uma célula em metafase com cromossomas desalinados (indicado com seta azul). No painel b, pode-se observar uma célula em metafase com problemas estruturais no fuso (fuso “torcido”) e com cromossomas desalinados (indicado com seta azul). No painel c, pode-se observar uma célula em metafase com o fuso colapsado. B) No painel superior, está representada uma célula HeLa controlo em anafase, com os cromatídeos irmãos corretamente segregados para polos opostos. Enquanto no painel inferior, pode-se observar uma célula em anafase que sofreu RNAi de hsMob1, em que os cromatídeos irmãos não foram apropriadamente segregados para polos opostos resultando em cromossomas arrastados (representado com seta azul). C) Gráfico que represente as quantificações dos defeitos mitóticos resultantes do RNAi de hsMob1. Célula com cromossomas desalinados no controlo representa 11% das células em metafase observadas, por outro lado nas células que foram sujeitas a RNAi representa 47%. Cromossomas arrastados no controlo representa 14% das anáfases observadas, enquanto nas células que foram sujeitas a RNAi representam 60%. Por fim, problemas estruturais do fuso mitótico foram observados em 4% das células em prometáfase e metáfase no controlo, em contraste com 29% das prometáfases e metáfases nas células que sofreram RNAi.

Para observar os defeitos a nível centrossomal, as células que sofreram RNAi do hsMob1 foram observadas por microscopia de fluorescência marcando a γ -tubulina que se encontra nos centrossomas. Na figura 3.9, pode-se observar que a marcação de gama-tubulina diminui nas células que sofreram RNAi, não se observando esta diminuição nas células controlo. Foram contadas 60 metafases no RNAi em que 36% apresentavam diminuição da γ -tubulina nos centrossomas.

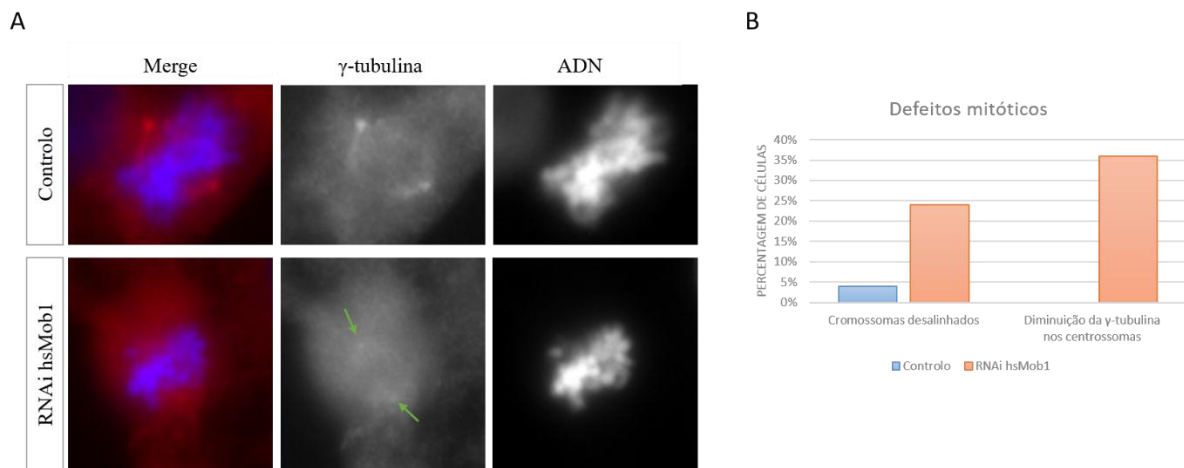


Figura 3.9. RNAi de hsMob1 em células HeLa resulta na diminuição da γ -tubulina nos centrosomas. A) A vermelho está representada a marcação da γ -tubulina (que se localiza nos centrosoma) e a azul o DNA. As células que sofreram RNAi hsMob1 foram tratadas com o oligo 5, que tem como alvo o mRNA do hsMob1. No painel superior, está representada uma célula controlo em que pode observar um sinal forte da γ -tubulina nos centrosomas. No painel inferior, está representada uma célula em metafase que sofreu RNAi em que o sinal da γ -tubulina é claramente mais fraco que no controlo (representado com setas verdes). B) Gráfico que representa a quantificação das células com cromossomas desalinhados e das células com diminuição da marcação da γ -tubulina nos centrosomas. Células com cromossomas desalinhados representam 4% das metafases e representam 24% das células em metafase que sofreram RNAi. A diminuição da marcação da γ -tubulina não foi observada no controlo, e foi observada em 36% das metafases.

Nestas experiências de RNAi de hsMob1 também se observou que o número de anafases era claramente inferior nas células que foram sujeitas a RNAi em relação às células controlo, o que seria de esperar pois resultados preliminares mostram uma paragem em prometáfase

4.3. Efeitos do RNAi do hsMob1 nos microtúbulos, centrosomas e cinetócoros

Através da depleção do hsMob1, observou-se o fenótipo de cromossomas desalinhados. Dado esse fenótipo, duas hipóteses surgiram que poderiam justificar o facto dos cromossomas não se ligarem aos microtúbulos. Uma é que a remoção de hsMob1 afeta os cinetócoros, a outra é que o RNAi de hsMob1 afeta os microtúbulos. Para testar as duas hipóteses começou-se por estudar a estabilidade dos microtúbulos e, através de microscopia de fluorescência observou-se se a localização das proteínas dos cinetócoros era alterada pelo RNAi de hsMob1.

4.3.1. Estabilidade dos microtúbulos

Sendo que a diminuição de hsMob1 resulta em desalinhamento dos cromossomas, e uma possível causa é a estabilidade da ligação cinetócoro-microtúbulo estar reduzida. Decidiu-se testar esta estabilidade, fez-se tratamento de frio às células. O tratamento no frio

destabiliza os microtúbulos dinâmicos, sendo que ligações entre microtúbulos e cinetócoros são mais estáveis e, desta forma mais resistentes à destabilização.

Para começar fez-se uma experiência em que se tratou as células HeLa durante 10 minutos e 15 minutos, para ver quanto tempo os microtúbulos demoram a destabilizar com o tratamento no frio. O que se pode observar ao fim de 10 minutos é que os microtúbulos astrais já não se observam mas os restantes ainda estão presentes (Figura 3.10). Ao fim de 15 minutos notou-se uma diminuição de microtúbulos em relação aos 10 minutos, mais não significativa (Figura 3.10). Sendo que o principal interesse é nos microtúbulos dos cinetócoros era necessário um marcador de cinetócoros para possibilitar a distinção entre os microtúbulos polares e dos cinetócoros. Porém, como uma das hipóteses é que as proteínas do cinetócoro podem estar alteradas pelo RNAi de hsMob1, teve que se escolher uma proteína que já se sabia *a priori* não estar alterada. Para isso, escolheu-se a proteína Aurora B que se localiza nos cinetócoros e que se pensa não ser afetada pelo RNAi da hsMob1 (como se pode observar mais à frente nos resultados).

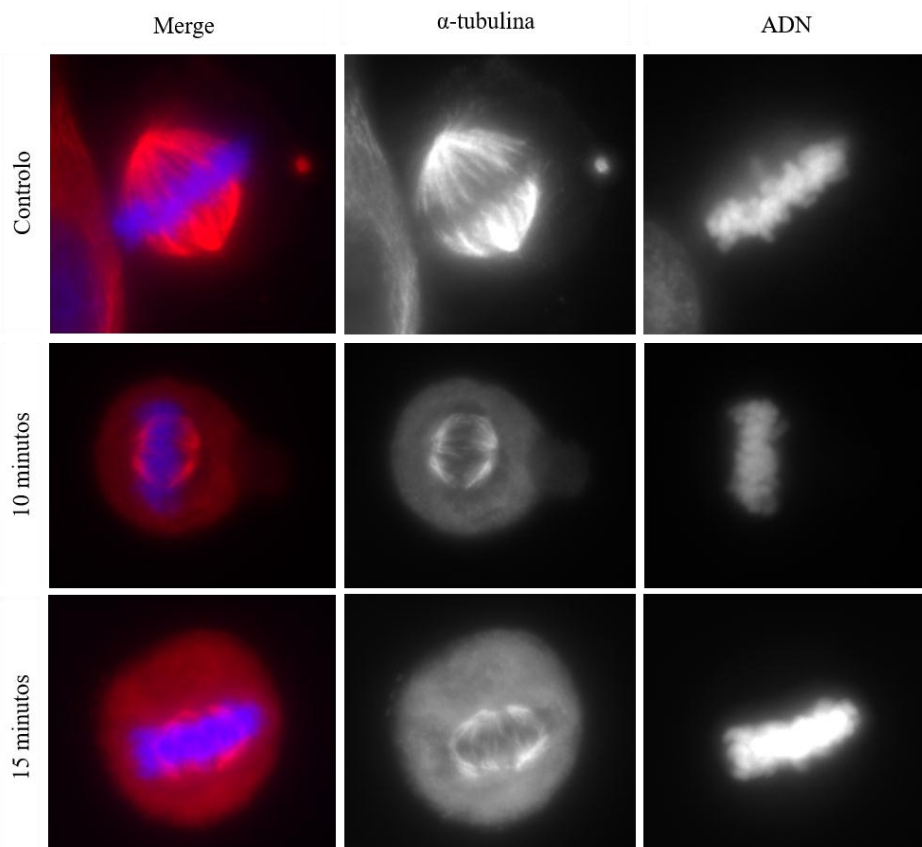


Figura 3.10. Estabilidade dos microtúbulos. O vermelho representa a marcação da α -tubulina (que se localiza nos microtúbulos) e o azul representa o DNA. As células foram tratadas no gelo durante 10 e 15 minutos. Do controlo pode-se observar uma clara diminuição dos microtúbulos, nomeadamente os microtúbulos astrais já não se observam e há diminuição dos microtúbulos polares. De os 10 minutos para os 15 minutos não se observa uma mudança na destabilização dos microtúbulos.

Testou-se a Aurora B como marcador de cinetócoros, para ver se realmente era um marcador de cinetócoros nas condições da nossa experiência. Para isso, tratou-se as células HeLa em gelo durante 15 minutos e 30 minutos. Nesta experiência usou-se o tempo de 30 minutos pois 15 minutos não eram suficientes para destabilizar todos os microtúbulos. O que se pode observar é que com o aumento do tempo de tratamento de gelo a marcação da Aurora B diminuía em relação ao controlo (Figura 3.11). Sendo que nenhum conhecimento prévio previa este resultado fez-se uma pesquisa bibliográfica. Encontra-se publicado que a Aurora B precisa dos microtúbulos para se acumular no centrómero [61]. Conclui-se que a Aurora B que não é um bom marcador para esta experiência pois o tratamento no gelo destabiliza os microtúbulos e a Aurora B necessita deles para se acumular nos centrómeros.

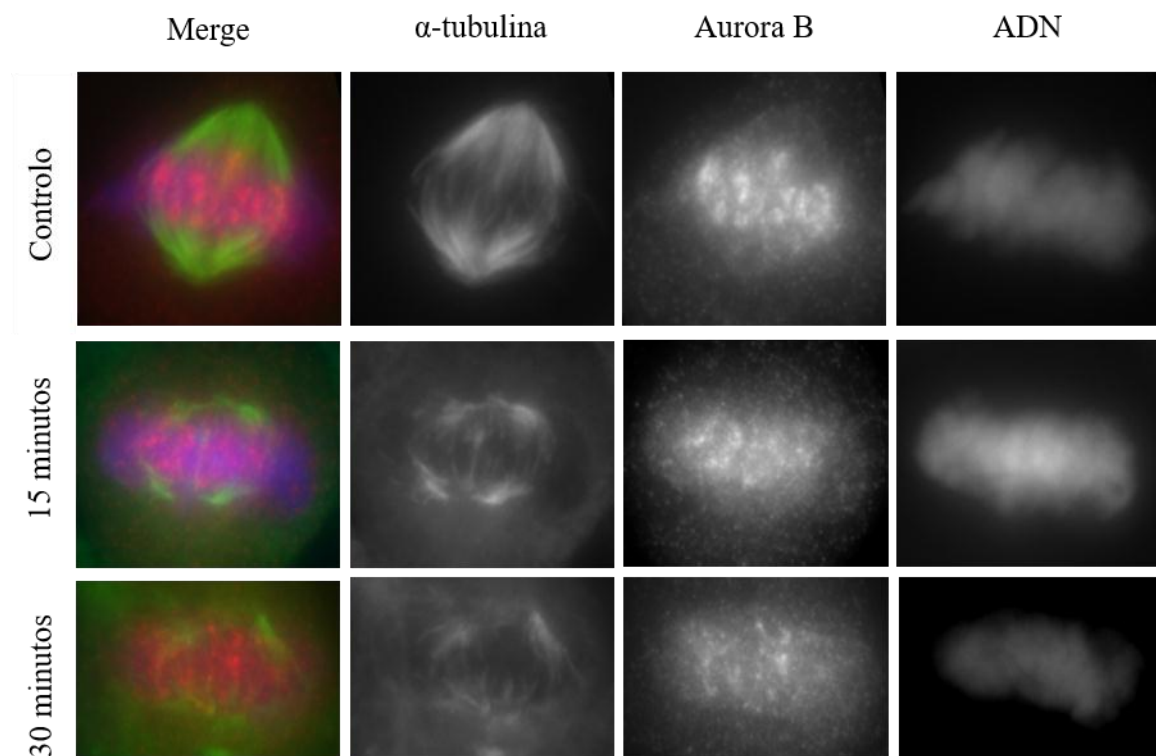


Figura 3.11. A Aurora B diminui nos centrómeros quando os microtúbulos são destabilizados. Células marcadas com Aurora B (vermelho), α -tubulina (verde) e DAPI (azul). Pode observar-se que nas células tratadas no gelo durante 15 e 30 minutos a marcação da Aurora B diminui em relação ao controlo. A marcação diminui com o aumento do tempo que as células são tratadas no gelo, isto é, a marcação de Aurora B nas células que foram tratadas 30 minutos no gelo é menor que nas células que foram tratadas durante 15 minutos.

De seguida, decidiu-se usar o soro CREST como marcador de cinetócoros. O soro CREST foi isolado de pacientes que contraíam a síndrome de CREST (esclerose sistémica cutânea) e, foi o primeiro marcador de centrómeros descoberto. Sendo que a fixação a usar não se encontrava descrita, tentaram-se algumas das fixações descritas para o soro Crest em artigos científicos: fixação com paraformaldeído, metanol/acetona, metanol, acetona. No entanto, não um sinal específico deste anticorpo, não podendo ser usado para a experiência.

4.3.2. Proteínas dos cinetócoros

4.4.1. Aurora B

Um dos fenótipos observados quando se realiza RNAi contra hsMob1 é o desalinhamento de cromossomas resultando a cromossomas arrastados em anafase, não se sabe se os cromossomas se alinham na placa metafásica e depois desalinham-se ou se nunca se alinham. Uma das proteínas que é responsável por garantir que os cromossomas estão ou não ligados é a Aurora B. Esta proteína funciona como um sensor de tensão, detetando quando os cromossomas não estão sob tensão, e está implicada na destabilização das ligações cinetócoros-microtúbulos erradas. A Aurora B tem um papel crítico na correção de erros de ligação cinetócoros-microtúbulos durante a metafase. Aurora B mantém o checkpoint SAC, e este checkpoint inibe o APC/C impedindo a transição metafase-anafase até que todos os cromossomas estejam ligados corretamente aos microtúbulos. Encontra-se descrito que quando se realiza RNAi da proteína AURORA B resulta em cromossomas desalinhados sendo igual ao fenótipo do RNAi da proteína hsMob1[30, 62]. Dadas as funções e características da proteína Aurora B, surgiu a hipótese que a localização desta poderia estar a ser afetada pela depleção de hsMob1.

Para testar esta hipótese fez-se ensaios de RNAi da proteína hsMob1 e observou-se a localização da Aurora B através de imunofluorescência. Usou-se como controlo para esta experiência células HeLa não transfectadas com oligo. O que se pode observar nas imagens de microscopia da figura 3.12 é que a localização da Aurora B não é afetada durante a metafase. Não foi observada a alteração da localização da Aurora B em nenhuma das células que sofreu RNAi de hsMob1.

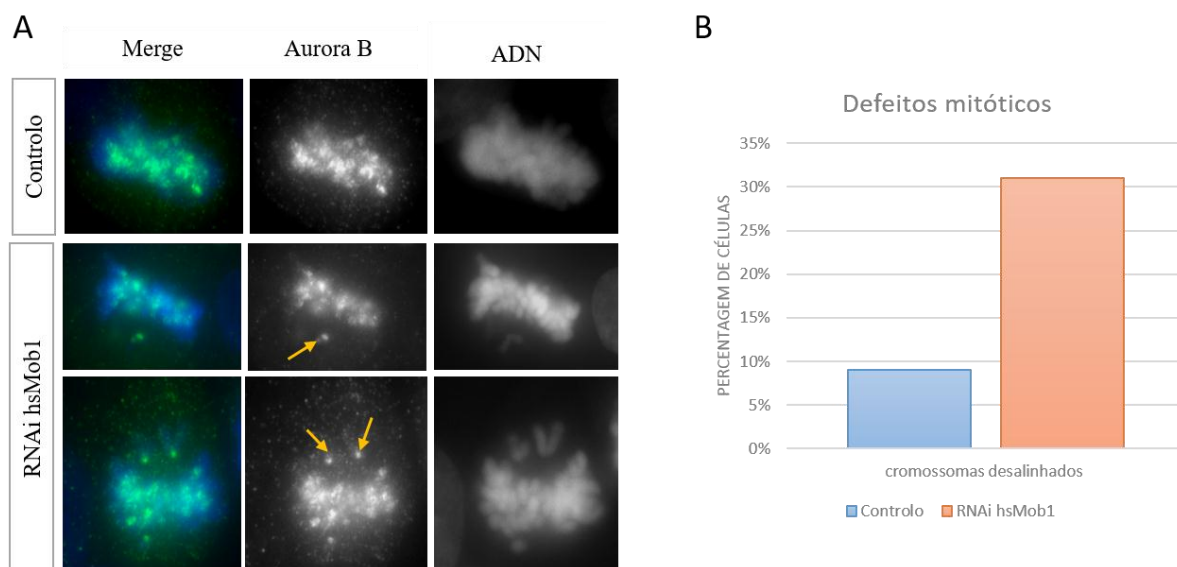


Figura 3.12. RNAi de hsMob1 não altera a localização da proteína Aurora B. A) A verde está representada a marcação da Aurora B (que se localiza nos centrómeros) e a azul o DNA. O RNAi de hsMob1 nas células HeLa foi realizado usando o oligo 5. No painel superior, está representada uma célula controlo em metafase com os cromossomas perfeitamente alinhados na placa metafásica e a Aurora B encontra-se localizada nos centromeros. As duas imagens do painel inferior representam duas células em metafase que sofreram RNAi que apresentam o fenótipo de cromossomas desalinhados em que a localização da Aurora B não se altera incluindo nos cromossomas desalinhados (assinalado com setas amarelas). B) Gráfico representativo da quantificação da percentagem de células com cromossomas desalinhados, sendo 9% das metafases no controlo e 31% das células que sofreram RNAi de hsMob1.

Para se saber se o RNAi funcionou quantificou-se o fenótipo de cromossomas desalinhados, sendo de 31% durante as metafases (n= 62) nas células que sofreram RNAi de hsMob1, comparado com 9% (n=54) das metafases nas células controlo

Deste modo, pensa-se que a diminuição dos níveis de hsMob1 não altera a localização da proteína Aurora B.

4.4.2.PLK1

Quando se realiza do RNAi contra hsMob1 observa-se o desalinhamento dos cromossomas e a diminuição da γ -tubulina nos centrossomas. Dados estes dois fenótipos observados, surgiu a hipótese que a localização da proteína Plk1 nos centrossomas e nos cinetócoros é alterada pela diminuição dos níveis da proteína hsMob1. Esta hipótese surgiu pois a Plk1 está envolvida no recrutamento da γ -tubulina para os centrossomas, e também se encontra envolvida na destabilização das ligações erradas cinetócoros-microtúbulos e na estabilização das ligações microtúbulo-cinetócoros [8, 63]

Para testar esta hipótese fez-se RNAi contra hsMob1 em células HeLa, e através de imunofluorescência observou-se a localização da proteína PLK1. Usou-se como controlo células HeLa não transfectadas com o oligo. Para saber se o RNAi funcionou fez-se a quantificação do fenótipo de cromossomas desalinhados, representando 30% (n=50) das metafases nas células que foram sujeitas a RNAi e 6% das metafases (n=43) das células controlo (Gráfico2). No entanto, a localização da Plk1 não foi afetada (Figura 3.13), nem nos cinetócoros nem nos centrossomas.

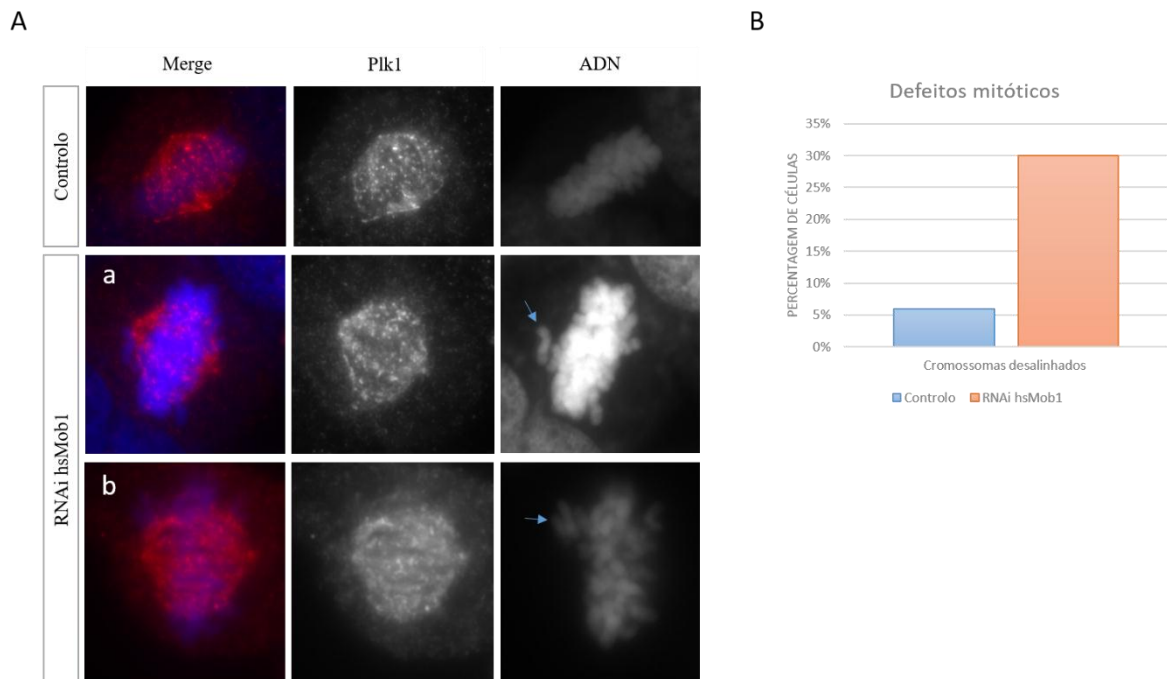


Figura 3.13. RNAi de hsMob1 não altera a localização da proteína PLK1. A) A vermelho está representada a marcação de Plk1 (que se localiza nos cinetócoros e centrossomas) e a azul o DNA. O RNAi de hsMob1 foi feito usando o oligo 5. No painel superior, está representada uma célula controlo em metafase com os cromossomas perfeitamente alinhados na placa metafásica e a PLK1 encontra-se localizada nos cinetócoros e nos centrossomas. As duas imagens do painel a e b representam duas células em metafase que sofreram RNAi que apresentam o fenótipo de cromossomas desalinhados em que a localização da PLK1 não se altera nem nos cinetócoros nem nos centrossomas. B) Gráfico que apresenta a percentagens de células em metafase com cromossomas desalinhados, sendo 6% das metafases no controlo e 30% das metafases que sofreram RNAi.

Deste modo, pensamos que o RNAi de hsMob1 não altera a localização do Plk1.

4.4.3.CENP-C

Resultados preliminares mostram que o RNAi contra hsMob1, através de RNAi, altera a localização da CENP-A. Dado este resultado preliminar a proteína CENP-C despertou o nosso interesse, pois esta proteína liga-se diretamente à CENP-A e foi recentemente descrito que a CENP-C é responsável pela estabilização de CENP-A durante a mitose [19]. Para saber se a localização da CENP-C é alterada como acontece com a CENP-A, fez-se RNAi contra

hsMob1 nas células HeLa seguido de imunofluorescência marcando a proteína CENP-C e corando o DNA com DAPI. Usou-se como controlo células não transfectadas com o oligo. O que se pode observar é que parece haver menos marcação de CENP-C nos cinetócoros (Figura 3.14).

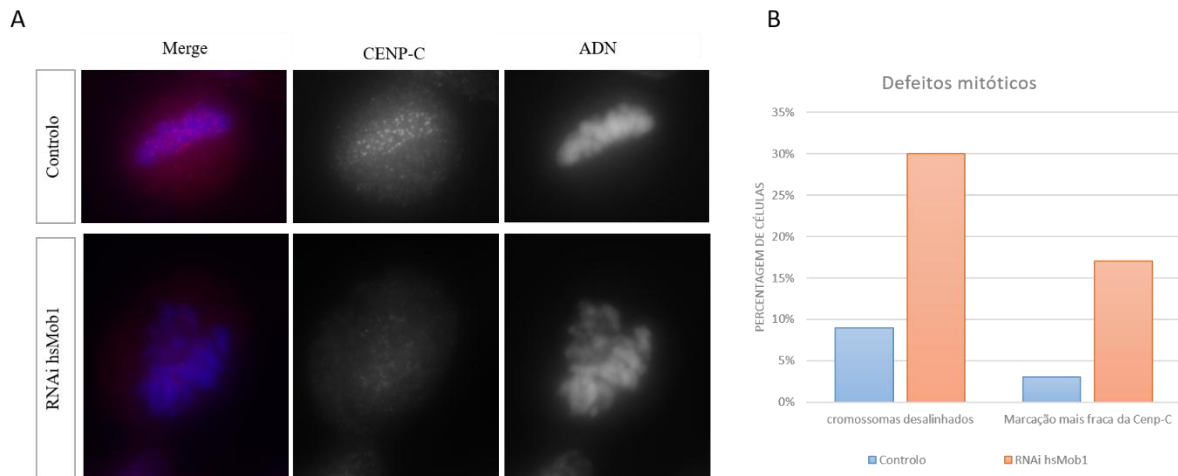


Figura 3.14. RNAi de hsMob1 parece diminuir a localização da proteína CENP-C nos cinetócoros. A) A vermelho está representada a marcação CENP-C (que se localiza nos cinetócoros) e a azul o DNA. As células de RNAi hsMob1 foram tratadas com o oligo 5, que tem como alvo o mRNA do hsMob1. No painel superior, está representada uma célula controlo em metafase com os cromossomas perfeitamente alinhados na placa metafásica e a CENP-C encontra-se localizada nos cinetócoros. No painel B, está representada uma metafase que sofreu RNAi de hsMob1 com cromossomas desalinhados e que apresenta claramente uma marcação mais fraca da proteína CENP-C nos cinetócoros. B) Representação gráfica da quantificação de células que apresentam cromossomas desalinhados e marcação mais fraca da CENP-C nos cinetócoros. No controlo, 9% das metafases apresentam cromossomas desalinhados e nas células que sofreram RNAi representa 30% das metafases. A marcação mais fraca da CENP-C foi observada em 17% das metafases na lamela do RNAi e em 3% no controlo.

A quantificação do fenótipo de cromossomas desalinhados foi feita, representando 30% das metafases (n=90) nas células sujeitas a RNAi e 9% das metafases (n=75) nas células controlo (Gráfico4), para garantir que o RNAi funcionou. Na lamela de RNAi, 17% das metafases apresentavam menos marcação de CENP-C nos cinetócoros em 3% das metafases (Gráfico3). A experiência foi repetida três vezes e observou-se diminuição da Cenp-C tanto nas células controlo como nas células em que se realizou o RNAi. Estes resultados são inconclusivos, pois não se sabe o porque da diminuição de CENP-C nas células controlo.

4. Discussão

A proteína hsMob1 tem vindo a ser estudada no laboratório do professor Doutor Álvaro Tavares. Resultados preliminares, que foram confirmados neste projeto de tese, sugerem que hsMob1 é importante para o alinhamento dos cromossomas e para a estrutura dos centrossomas. Para além disto, resultados preliminares mostram que o RNAi contra hsMob1 resulta numa paragem em prometáfase. Será que o ponto de controlo SAC se encontra ativo e é responsável pela paragem? E esta paragem é devido ao desalinhamento dos cromossomas ou de problemas estruturais dos centrossomas?

Neste projeto de tese, comecei por estudar a localização celular de hsMob1 usando linhas que expressam a proteína de fusão hsMob1-GFP. Observei que a proteína se acumulava nos centrossomas em interfase e em mitose. Isto pode indicar que a proteína é importante para os centrossomas, atuando nos mesmos. Para além de se acumular nos centrossomas, também se observou numa das linhas celulares usadas que a proteína se acumulava nos microtúbulos. Sendo que só foi observada numa das linhas, este resultado carece de confirmação. Dado o fenótipo de cromossomas desalinhados, em conjunto com a diminuição de CENP-A nos centrómeros, supus que esta proteína se localizava nos centrómeros ou cinetócoros. Nas linhas celulares HeLa, transformadas para expressar a proteína de fusão, não se observou tal localização, porém um anticorpo específico anti-hsMob1 deveria ser utilizado para confirmar estes resultados.

Sendo que um dos fenótipos observados quando se realiza o RNAi contra hsMob1 é o desalinhamento dos cromossomas fui avaliar, através de imunofluorescência, se quando se realiza RNAi contra hsMob1 as proteínas envolvidas na correção de erros, como as proteínas Aurora B e a PLK1, apresentavam uma localização diferente da descrita [30, 62]. Observou-se que tanto a Aurora B como a PLK1 não se encontravam alteradas em termos de localização. Isto pode significar que a proteína está a cumprir a sua função, isto é, sente a falta de tensão dos cromossomas desalinhados, e estas ligações são corrigidas, mas não tem força para se manter- A proteína PLK1 também se localiza nos centrossomas, sendo importante para o recrutamento da γ -tubulina e, dado que a γ -tubulina diminui nos centrossomas, poderia ser uma das proteínas afectadas [8]. Porém, a localização da proteína não se encontrava alterada. Sendo que a proteína Plk1 recruta proteínas, e estas é que diretamente participam no

recrutamento da γ -tubulina, a proteína hsMob1 pode ser importante na via do recrutamento abaixo de PLK1.

Como referido anteriormente, resultados preliminares mostram que quando se realiza RNAi contra hsMob1 CENP-A diminui nos centrómeros. A primeira hipótese que surgiu foi que hsMob1 era importante de alguma forma para a localização de CENP-A e, conseqüentemente, para a montagem do cinetócoro. Sabe-se que a proteína CENP-A é a proteína chave de identidade do centrómero, e conseqüentemente para a montagem do cinetócoro, mas encontra-se descrito que os níveis de CENP-A podem descer até um certo nível proteico sem que isto afete a função do cinetócoro [64]. Apesar desta informação, não se ignorou a hipótese de que os cinetócoros poderiam não estar funcionais. Assim sendo fui observar se a localização da proteína CENP-C se encontrava alterada, não tendo obtido resultados conclusivos, pois a marcação desta nos cinetócoros diminuía tanto nas células controlo como nas células que sofreram RNAi. Uma vez que esta marcação sofreu maior diminuição nas células que sofreram RNAi, não era expectável a sua diminuição nas células controlo. Dado isto, suponho que estas observações se possam dever a erro de marcação do anticorpo usado, mas se realmente a proteína hsMob1 for importante para a localização da proteína CENP-C, os resultados sugerem que a estabilidade de CENP-A está a ser afetada [19]. Outra hipótese é que CENP-C interage diretamente com o Mis12 e Ndc80, que são responsáveis pelas ligações robustas entre cinetócoro e microtúbulos, podendo ser a razão dos cromossomas se encontrarem desalinados.

O que nos ajudaria a responder a estas questões seria a técnica Lap-tag, que indicaria quais os parceiros moleculares de hsMob1. Desta forma poderíamos inferir em que vias de sinalização a proteína hsMob1 está envolvida. Para a técnica Lap-Tag, precisava de se purificar a proteína hsMob1, resultado que não atingi. A indução foi realizada e encontra-se documentada nos resultados, porém foi mais fraca do que algumas induções realizadas anteriormente no laboratório. Como achei que a indução era fraca, testei várias concentrações de IPTG e tempos de indução, sendo que a indução mais forte foi a observada nos resultados. Entretanto, induzi uma proteína que já tinha sido obtida previamente no laboratório, e a indução também foi fraca. Assim sendo, assumi que o baixo rendimento da extração não resultou de um problema na clonagem. Isto pode ser explicado por: a indução ter sido fraca demais para se obter uma produção de proteína suficiente para uma extração detetável; Problemas no isolamento do conteúdo proteico levaram à perda da nossa proteína de interesse.

5. Conclusões e perspectivas futuras

5.1. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a proteína hsMob1 tem uma função mitótica. Mais concretamente, a proteína hsMob1 é importante para o alinhamento dos cromossomas, a estrutura do fuso mitótico e a estrutura dos centrossomas. Em relação à estrutura dos centrossomas, a hsMob1 é importante para o recrutamento da γ -tubulina para os centrossomas em mitose.

Em relação à localização da proteína conclui-se que a proteína hsMob1 é centrossomal em interfase e em metafase. Em prófase e anáfase localiza-se nos polos do fuso mitótico, não sendo específica dos centrossomas.

Estudos em que se analisou a localização de outras proteínas nas condições de RNAi contra hsMob1 pode-se concluir que hsMob1 não é importante para a localização da proteína Plk1 e Aurora nos centrómeros, onde estas proteínas estão envolvidas no mecanismo de correção de erros de ligação entre microtúbulos e cinetócoros, mais concretamente na destabilização dessas ligações. Sobre a proteína Plk1 pode-se também concluir que a proteína hsMob1 não é importante para a localização da Plk1 nos centrossomas, sendo a Plk1 importante para o recrutamento da γ -tubulina para os centrossomas. O mesmo não se pode concluir acerca da proteína Cenp-C, já que hsMob1 parece importante para a sua localização.

5.2 Perspetivas futuras

A proteína hsMob1 é uma proteína interessante para se estudar, pois há tantas perguntas por responder sobre a sua função, sendo que a primeira experiência a fazer deveria ser estudar os seus parceiros moleculares.

Outra questão que futuramente deveria ser abordada é a questão da proteína hsMob1 estar sobreexpressa no cancro.

Bibliografia

- [1] Azevedo C. *Biologia Celular e Molecular*. 4ª edição ed. Lidel2005.
- [2] Guertin DA, Trautmann S, McCollum D. Cytokinesis in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66:155-78.
- [3] Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989;246:629-34.
- [4] Santo L, Siu KT, Raje N. Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers. *Semin Oncol*. 2015;42:788-800.
- [5] Tyson JJ, Csikasz-Nagy A, Novak B. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays*. 2002;24:1095-109.
- [6] Schatten H. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:667-86.
- [7] Wiese C, Zheng Y. Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci*. 2006;119:4143-53.
- [8] Haren L, Stearns T, Luders J. Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. *PLoS One*. 2009;4:e5976.
- [9] Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16:611-24.
- [10] Mattison CP, Winey M. The centrosome cycle. *Results Probl Cell Differ*. 2006;42:111-46.
- [11] Vicente JJ, Wordeman L. Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins. *Exp Cell Res*. 2015;334:61-9.
- [12] Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:379-93.
- [13] Compton DA. Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:95-114.
- [14] Vagnarelli P, Ribeiro SA, Earnshaw WC. Centromeres: old tales and new tools. *FEBS Lett*. 2008;582:1950-9.
- [15] Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol*. 1987;104:805-15.
- [16] Panchenko T, Sorensen TC, Woodcock CL, Kan ZY, Wood S, Resch MG, et al. Replacement of histone H3 with CENP-A directs global nucleosome array condensation and loosening of nucleosome superhelical termini. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:16588-93.
- [17] Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, et al. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*. 2009;137:485-97.
- [18] Fukagawa T, Earnshaw WC. The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev Cell*. 2014;30:496-508.
- [19] Falk SJ, Guo LY, Sekulic N, Smoak EM, Mani T, Logsdon GA, et al. Chromosomes. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. *Science*. 2015;348:699-703.
- [20] Cheeseman IM. The kinetochore. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a015826.
- [21] Cheeseman IM, Niessen S, Anderson S, Hyndman F, Yates JR, 3rd, Oegema K, et al. A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev*. 2004;18:2255-68.

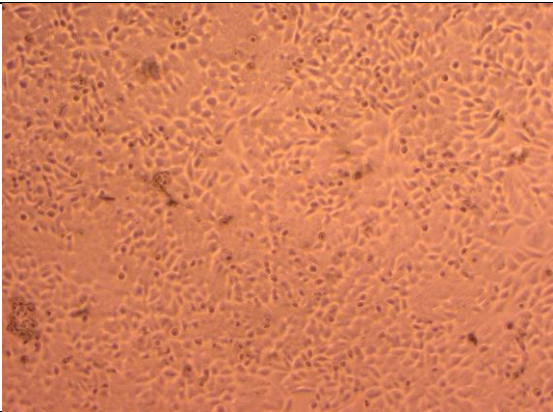
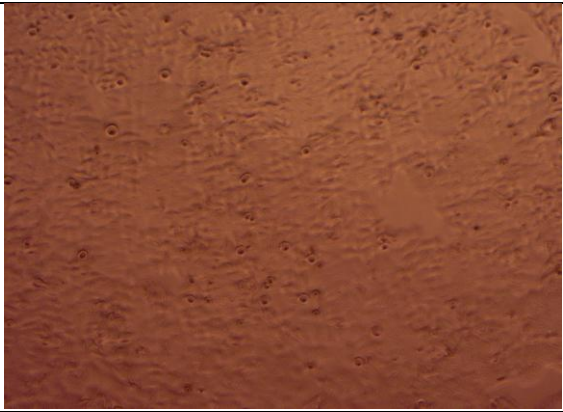
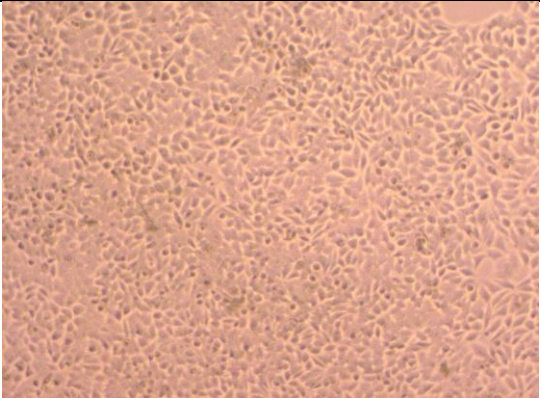
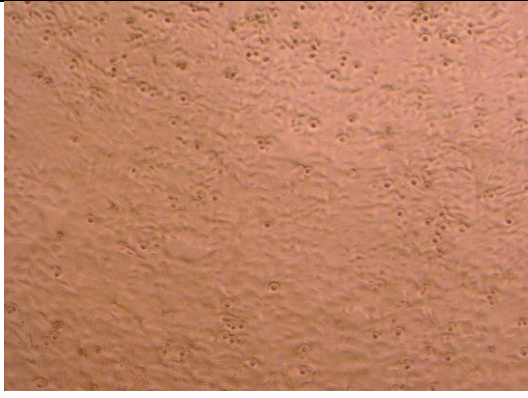
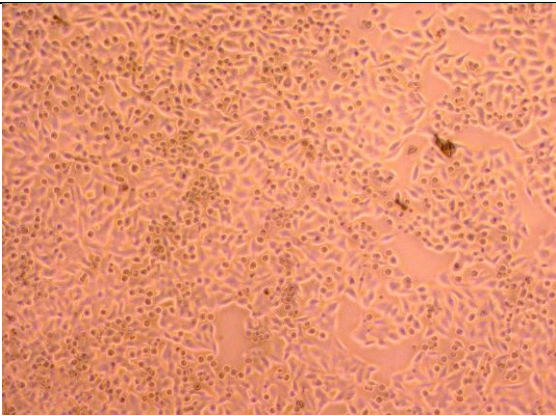
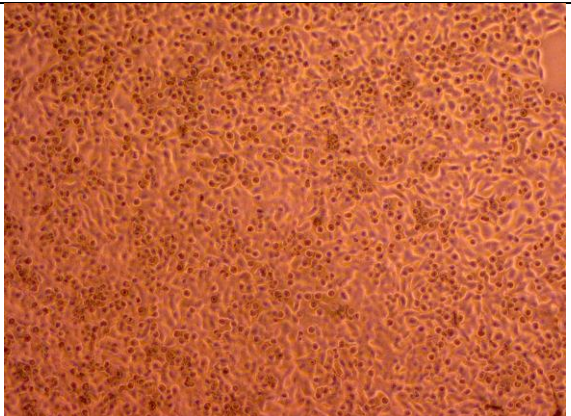
- [22] Desai A, Rybina S, Muller-Reichert T, Shevchenko A, Shevchenko A, Hyman A, et al. KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2003;17:2421-35.
- [23] Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 2004;117:5461-77.
- [24] Kramer ER, Gieffers C, Holzl G, Hengstschlager M, Peters JM. Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol.* 1998;8:1207-10.
- [25] Yu H. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:706-14.
- [26] Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res.* 1999;248:339-49.
- [27] Silva P, Barbosa J, Nascimento AV, Faria J, Reis R, Bousbaa H. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif.* 2011;44:391-400.
- [28] Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol.* 2001;154:925-36.
- [29] Tanaka TU, Rachidi N, Janke C, Pereira G, Galova M, Schiebel E, et al. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell.* 2002;108:317-29.
- [30] Liu D, Lampson MA. Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:976-80.
- [31] Salimian KJ, Ballister ER, Smoak EM, Wood S, Panchenko T, Lampson MA, et al. Feedback control in sensing chromosome biorientation by the Aurora B kinase. *Curr Biol.* 2011;21:1158-65.
- [32] Foley EA, Maldonado M, Kapoor TM. Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1265-71.
- [33] Trinkle-Mulcahy L, Andrews PD, Wickramasinghe S, Sleeman J, Prescott A, Lam YW, et al. Time-lapse imaging reveals dynamic relocalization of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle. *Mol Biol Cell.* 2003;14:107-17.
- [34] Pellman D. Cell biology: aneuploidy and cancer. *Nature.* 2007;446:38-9.
- [35] Bakhoun SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr Biol.* 2014;24:R148-9.
- [36] Thompson SL, Compton DA. Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res.* 2011;19:433-44.
- [37] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
- [38] Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002;111:96-102.
- [39] Hergovich A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cell Signal.* 2011;23:1433-40.
- [40] Vitulo N, Vezzi A, Galla G, Citterio S, Marino G, Ruperti B, et al. Characterization and evolution of the cell cycle-associated mob domain-containing proteins in eukaryotes. *Evol Bioinform Online.* 2007;3:121-58.
- [41] Luca FC, Winey M. MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol Biol Cell.* 1998;9:29-46.
- [42] Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:253-64.

- [43] Chow A, Hao Y, Yang X. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *Int J Cancer*. 2010;126:2079-89.
- [44] Kohler RS, Schmitz D, Cornils H, Hemmings BA, Hergovich A. 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*. 2010;30:4507-20.
- [45] Gomez V, Gundogdu R, Gomez M, Hoa L, Panchal N, O'Driscoll M, et al. Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cell Signal*. 2015;27:326-39.
- [46] Tang F, Zhang L, Xue G, Hynx D, Wang Y, Cron PD, et al. hMOB3 modulates MST1 apoptotic signaling and supports tumor growth in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2014;74:3779-89.
- [47] Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Hu J, Garrett L, et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:1431-6.
- [48] Stavridi ES, Harris KG, Huyen Y, Bothos J, Verwoerd PM, Stayrook SE, et al. Crystal structure of a human Mob1 protein: toward understanding Mob-regulated cell cycle pathways. *Structure*. 2003;11:1163-70.
- [49] Florindo C, Perdigo J, Fesquet D, Schiebel E, Pines J, Tavares AA. Human Mob1 proteins are required for cytokinesis by controlling microtubule stability. *J Cell Sci*. 2012;125:3085-90.
- [50] Shimizu T, Ho LL, Lai ZC. The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in *Drosophila*. *Genetics*. 2008;178:957-65.
- [51] Lai ZC, Wei X, Shimizu T, Ramos E, Rohrbaugh M, Nikolaidis N, et al. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*. 2005;120:675-85.
- [52] Tavares A, Goncalves J, Florindo C, Tavares AA, Soares H. Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J Cell Sci*. 2012;125:516-27.
- [53] Baillat G, Moqrich A, Castets F, Baude A, Bailly Y, Benmerah A, et al. Molecular cloning and characterization of phocein, a protein found from the Golgi complex to dendritic spines. *Mol Biol Cell*. 2001;12:663-73.
- [54] Haeberle AM, Castets F, Bombarde G, Baillat G, Bailly Y. Immunogold localization of phocein in dendritic spines. *J Comp Neurol*. 2006;495:336-50.
- [55] Baillat G, Gaillard S, Castets F, Monneron A. Interactions of phocein with nucleoside-diphosphate kinase, Eps15, and Dynamin I. *J Biol Chem*. 2002;277:18961-6.
- [56] Hwang J, Pallas DC. STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;47:118-48.
- [57] Almeida R. Correlação entre genes MOB e cancro: Universidade do Algarve; 2016.
- [58] Trammell MA, Mahoney NM, Agard DA, Vale RD. Mob4 plays a role in spindle focusing in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Sci*. 2008;121:1284-92.
- [59] Schulte J, Sepp KJ, Jorquera RA, Wu C, Song Y, Hong P, et al. DMob4/Phocein regulates synapse formation, axonal transport, and microtubule organization. *J Neurosci*. 2010;30:5189-203.
- [60] Li Y. The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol Lett*. 2011;33:1487-99.
- [61] Banerjee B, Kestner CA, Stukenberg PT. EB1 enables spindle microtubules to regulate centromeric recruitment of Aurora B. *J Cell Biol*. 2014;204:947-63.
- [62] Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 2003;161:281-94.
- [63] Elowe S, Hummer S, Uldschmid A, Li X, Nigg EA. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev*. 2007;21:2205-19.

[64] Fachinetti D, Folco HD, Nechemia-Arbely Y, Valente LP, Nguyen K, Wong AJ, et al. A two-step mechanism for epigenetic specification of centromere identity and function. *Nat Cell Biol.* 2013;15:1056-66.

Anexos

Anexo 1: Representação de células que foram bloqueadas com timidina e desbloqueadas ao fim de 6, 8 e 10 horas.

6 horas após bloqueio simples	
	
8 horas após bloqueio	
	
10 horas após desbloqueio	
	
Tempo após desbloqueio	Índice mitótico
6horas	10%
8horas	20%
10horas	60%

Anexo 2. Vetor pett2b, vetor usado para a indução da proteína hsMob1 em bactérias BL21. Fornecido pela companhia Addgene.

