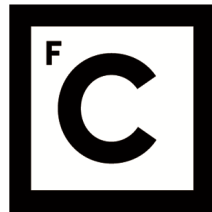


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências  
ULisboa**

## **Estudo da função mitótica de genes da família MOB**

Inês Saramago dos Santos Lousa

**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

Dissertação orientada por:  
Álvaro Tavares ([aatavares@ualg.pt](mailto:aatavares@ualg.pt))  
Rui Artur P. L. Gomes ([ragomes@fc.ul.pt](mailto:ragomes@fc.ul.pt))

2022

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Álvaro Tavares, por me ter aceitado no seu laboratório e pela oportunidade de integrar neste grupo para o desenvolvimento da minha tese. Obrigada pela partilha de sabedoria e por todo o conhecimento que permitiu enriquecer a minha formação científica.

Ao Professor Rui Artur Gomes pela sua disponibilidade e ajuda que me possibilitaram a escrita deste projeto.

À Inês Baião por toda a ajuda disponibilizada no laboratório, pelas dicas e conselhos fundamentais para conseguir realizar este trabalho. Ao Juan que, apesar dos poucos meses em conjunto no laboratório, um obrigado pelos conselhos e pelas palavras de encorajamento diárias.

Um agradecimento especial à minha colega de laboratório e amiga, Daniela Silvestre, por ter estado sempre comigo nos bons e maus momentos, pela companhia e amizade, e pelos momentos de alegria e frustração partilhados.

Não podia deixar de referir o nome dos meus melhores amigos, António e a Matilde, que estiveram lá para mim sempre que precisei. Pelas várias horas em chamada e pelas sessões de filmes que se tornaram tradição. Porque a distância não significa nada quando a amizade significa tudo.

Um grande obrigado à minha amiga Joana, pelas chamadas telefónicas durante horas ao final do dia, pela ajuda e por estar sempre comigo quando mais precisei durante este percurso académico. Obrigada pelos desabafos e pelos incentivos que foram essenciais para mim.

Um especial obrigado à minha família, em particular aos meus pais, pelo constante incentivo e apoio condicional. Por estarem sempre presentes e por não me terem deixado desistir nos momentos menos bons. Obrigada por acreditarem em mim.

## Resumo

Garantir a propagação fiel da informação genética através das gerações é um dos problemas mais fundamentais da biologia celular. MOB4, proteína integrante do complexo proteico STRIPAK, é um dos membros da família de proteínas MOB conhecidas por regular a mitose. Estudos de RNAi previamente desenvolvidos no nosso laboratório mostraram que a supressão de MOB4 promove defeitos mitóticos e um bloqueio no *checkpoint* na transição metafase/anafase em células humanas, caracterizando-o como um novo elemento essencial à correta segregação cromossômica. Este projeto tem como objetivo definir as funções moleculares de MOB4, especialmente o seu papel em mitose e perceber se os erros observados e o bloqueio em mitose se dão devido e exclusivamente ao MOB4 ou por este estar integrado no complexo STRIPAK. No decurso deste trabalho achámos também pertinente estudar a proteína MOB2 e a sua função em mitose.

Começámos por estudar a dinâmica intracelular de MOB4 utilizando duas linhas celulares HeLa pela técnica de Imunofluorescência. Fomos igualmente testar a universalidade da sua função em células diploides tumorais como as HCT116, e não tumorais como as hTERT-RPE-1 através de estudos de RNAi.

Por Imunofluorescência determinámos que MOB4 se localiza no Complexo de Golgi em Interfase. No entanto, não foi observada uma localização mitótica específica. Os resultados obtidos dizem-nos que a sua função parece ser conservada em células HCT116 uma vez que foram observados defeitos após depleção de MOB4, embora não ter sido observado um bloqueio no *checkpoint*. Também foi observado que componentes do complexo STRIPAK não só parecem ser necessários para que o bloqueio seja ultrapassado, como a sua falta promove defeitos mitóticos semelhantes aquando depleção exclusiva do MOB4. Deste modo deduzimos que MOB4 não atua sozinho, mas sim em conjunto com o STRIPAK. A MOB2 possui uma função ao nível do fuso mitótico e promove igualmente um bloqueio no *checkpoint* mitótico.

Palavras-Chave: MOB4, STRIPAK, mitose, transição metafase/anafase

## Abstract

Ensuring the faithful propagation of genetic information across generations is one of the most fundamental problems in cell biology. MOB4, a protein that is part of the STRIPAK protein complex, is one of the members of the MOB protein family known for regulate mitosis. RNAi studies previously developed in our laboratory showed that MOB4 suppression promotes mitotic defects and a *checkpoint* block in the metaphase/anaphase transition in human cells, characterizing it as a new essential element for correct chromosomal segregation. This project aims to define the molecular functions of MOB4, especially its role in mitosis and understand whether the observed errors and the blockage in mitosis are due and exclusively to MOB4 or because it is integrated into the STRIPAK complex. We also found it pertinent to study the MOB2 protein and its role in mitosis.

We started to study the intracellular dynamics of MOB4 using two HeLa cell lines by Immunofluorescence technique. We also tested the universality of its function in diploid tumor cells such as HCT116, and non-tumor cells such as hTERT-RPE-1 by RNAi assays.

By Immunofluorescence we determined that MOB4 is located in the Golgi Complex in Interphase. However, no specific mitotic localization was observed. The results obtained tell us that its function seems to be conserved in HCT116 cells since defects were observed after MOB4 depletion, although a *checkpoint* blockade was not observed. It was also observed that components of the STRIPAK complex not only appear to be necessary for the blockade to be overcome, but its lack promotes mitotic defects similar to exclusive MOB4 depletion. In this way we deduce that MOB4 does not act alone, but in conjunction with STRIPAK. MOB2 has a function at the level of the mitotic spindle and promotes a blockade in the mitotic *checkpoint*.

Key words: MOB4, STRIPAK, mitosis, metaphase/anaphase transition

# Índice

|  |     |
|--|-----|
| Agradecimentos.....  | I   |
| Resumo.....  | II  |
| Abstract .....   | III |
| I. Introdução.....   | 1   |
| 1.1. Ciclo Celular.....  | 1   |
| 1.2. <i>Checkpoint</i> Mitótico .....  | 2   |
| 1.3. Centrômero, Cinetocóro e Centrossomas em mitose.....                                    | 3   |
| 1.4. Proteínas MOB .....   | 3   |
| 1.4.1 MOB2 .....   | 4   |
| 1.4.2 MOB4/Foceína.....  | 4   |
| 1.5. O Complexo STRIPAK.....   | 5   |
| 1.5.1 Interação entre o complexo STRIPAK e a via <i>Hippo</i> .....                          | 6   |
| 1.6. Depleção de hMOB4 induz mitoses aberrantes em células humanas.....                      | 7   |
| 1.7. A importância do estudo da MOB4.....  | 8   |
| II. Objetivos .....  | 8   |
| III. Materiais e Métodos.....  | 8   |
| 3.1. Linhas celulares e cultura de células .....   | 8   |
| 3.2. Imunofluorescência.....   | 9   |
| 3.2.1 Anticorpos Utilizados .....  | 10  |
| 3.2.2 Utilização de Inibidores .....   | 10  |
| 3.3. RNA de interferência (RNAi).....  | 10  |
| 3.3.1 Transfecção de Oligonucleótidos .....  | 10  |
| 3.3.2 Emparelhamento de Oligonucleótidos.....  | 11  |
| 3.3.3 Oligonucleótidos Utilizados.....   | 11  |
| 3.4. Análise de proteínas por SDS-PAGE .....   | 12  |
| 3.4.1 Recolha de células e preparação das amostras.....                                      | 12  |
| 3.4.2 SDS-PAGE .....   | 12  |
| 3.5. <i>Western Blot</i> .....   | 12  |
| 3.5.1 <i>Stripping</i> da Membrana.....  | 13  |
| IV. Resultados .....   | 13  |
| 4.1 Dinâmica intracelular da MOB4.....   | 13  |
| 4.2 Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB4 em diferentes linhas celulares..... | 16  |
| 4.2.1 HCT116.....  | 16  |
| 4.2.2 hTERT RPE-1 .....  | 18  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.3   | Estudo da depleção de vários componentes do complexo STRIPAK.....   | 19 |
| 4.3.1 | A inibição da expressão de proteínas do complexo STRIPAK compromete o <i>checkpoint</i> na transição metafase/anafase ..... | 22 |
| 4.4   | Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB2 em células HeLa .....  | 23 |
| V.    | Discussão e Conclusão .....   | 26 |
| 5.1   | MOB4 e STRIPAK.....   | 26 |
| 5.2   | MOB2 .....  | 28 |
| VI.   | Perspetivas Futuras .....   | 29 |
| 6.1   | MOB4 e STRIPAK.....   | 29 |
| 6.2   | MOB2 .....  | 30 |
| VII.  | Referências Bibliográficas .....  | 30 |
| VIII. | Anexos .....  | 36 |
| 8.1   | Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB4 em diferentes linhas celulares.....                                    | 36 |
| 8.1.1 | HCT116.....   | 36 |
| 8.1.2 | hTERT-RPE1 .....  | 37 |
| 8.2   | Estudo da depleção de vários componentes do complexo STRIPAK .....  | 37 |
| 8.3   | Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB2 em células HeLa .....  | 40 |

## Lista de Figuras

**Figura I. 1. Representação esquemática das várias fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M)..... 1**

**Figura I. 2. Representação esquemática dos principais componentes do complexo STRIPAK em células de mamífero.** MOB4 está representada como Mob3, nome anteriormente atribuído à MOB4/foceína. Adaptado de Hwang, J., & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 47, 118–148..... 6

**Figura I. 3. Depleção de hMOB4 em células HeLa promove defeitos no alinhamento dos cromossomas.** A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a vermelho está representado a marcação com  $\gamma$ -tubulina, responsável pela visualização dos centrossomas. Em (A) é possível observar os cromossomas desalinhamos da placa metafásica e a  $\gamma$ -tubulina dispersa no polo do fuso mitótico. Em (B) observa-se os cromossomas desalinhamos da placa metafásica. Cláudia Florindo, dados não publicados. .... 7

**Figura I. 4. Depleção de hMOB4 em células HeLa promove a deslocação da proteína CENP-A.** Em (A) é possível observar a CENP-A na célula controlo. Em (B) mostra a célula que sofreu RNAi da MOB4 onde se observa uma grande diminuição da CENP-A. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a vermelho está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a verde está representado a marcação da proteína CENP-A, que se localiza nos centrómeros. Cláudia Florindo, dados não publicados..... 7

**Figura IV. 1. Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 (I) e MOB4::GFP (II) em células HeLa em Interfase e em mitose.** Setas amarelas representam a localização da proteína GFP::MOB4 na zona perinuclear, semelhante ao padrão de localização do Complexo de Golgi. 13

**Figura IV. 2. Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 em células HeLa em Interfase (A) e nas várias fases mitóticas (B1-4).** Setas amarelas representam a localização da proteína GFP::MOB4 na região perinuclear. Setas verdes representam a marcação do Complexo de Golgi com Giantina. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e coradas com o marcador de DNA, DAPI. 14

**Figura IV. 3. Localização da proteína de fusão MOB4::GFP em células HeLa em Interfase (A) e nas várias fases mitóticas (B1-4).** Setas amarelas representam a localização da proteína MOB4::GFP na região perinuclear. Setas verdes representam a marcação do Complexo de Golgi com Giantina. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e coradas com o marcador de DNA, DAPI. 14

**Figura IV. 4. Localização da proteína GFP::MOB4 após tratamento com inibidores. I.)** Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 em células HeLa em Interfase e mitose após tratamento com o inibidor de microtúbulos colchicina, (A e B respetivamente) e sem tratamento (C e D respetivamente). Setas azuis representam a co-localização da proteína GFP::MOB4 na região perinuclear com a marcação do Complexo de Golgi com a Giantina. A verde está representada a marcação da proteína GFP::MOB4 e a vermelho está representada a marcação com Giantina,

responsável pela marcação do complexo de Golgi. **II.)** Localização da proteína GFP::MOB4 em células HeLa em mitose após tratamento com o inibidor do proteossoma MG-132 (A) e sem tratamento (B). Localização específica da MOB4 não foi observada. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e incubadas com o marcador de DNA, DAPI. 15

**Figura IV. 5. Representação gráfica dos defeitos mitóticos observados em células HCT116 após depleção do MOB4.** Gráfico correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, controlo negativo (SD II) e controlo não transfetado (S/T)). MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde á supressão da proteína pelo Oligo 19. As percentagens obtidas representam a média aritmética e desvio padrão de duas experiências independentes. Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. No geral, observa-se um ligeiro aumento dos defeitos mitóticos em todas as condições durante as 24, 48 e 96 horas após transfeção, comparativamente aos dois controlos. 16

**Figura IV. 6. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de MOB4 em células HCT116 por RNAi. I.)** Em (A) é observado pela seta amarela fragmentos de DNA fora da placa metafásica, ao qual se designa por desalinhamento cromossómico. Em (B) é observado um fuso monopolar. Em (C) observa-se uma célula sem a disjunção dos polos, com os cromossomas espalhados. Designamos este tipo de fuso como monopolar. Em (D) encontra-se o controlo que se refere a uma metafase normal. **II)** Em (A) é observado uma extensão da cromatina entre os dois núcleos da célula em anafase ao qual dá-se o nome de pontes de DNA. Em (B) encontra-se o controlo que se refere a uma anafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos. 17

**Figura IV. 7. Análise por Western Blot dos níveis de expressão da proteína MOB4 em células hTERT-RPE1 após RNAi.** A análise foi feita 24, 48, 72 e 96 horas após transfeção com o Oligo 5 e o Oligo 19, ambos contra a proteína MOB4 e com o controlo scramble duplex II (SD II). S/T representa as células não transfetadas. Foram utilizados anticorpos contra a proteína MOB4 de 26 kD e contra a  $\gamma$ -Tubulina de 48 kD, como controlo interno. Parece não haver depleção da proteína com ambos os Oligos contra o MOB4. 19

**Figura IV. 8. Defeitos mitóticos observados em células HeLa após depleção de componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Gráfico correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2 e CCM3), do controlo negativo (SD II) e do controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde á supressão da proteína pelo Oligo 19. Observa-se um aumento dos defeitos mitóticos em todas as condições, comparativamente aos dois controlos. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontra-se apresentadas na Tabela VIII. 1. em Anexos. 20

**Figura IV. 9. Defeitos observados em células interfásicas após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Em (A) encontra-se representado pelas setas amarelas porções de DNA no citoplasma ao qual se designa de micronúcleos. Em (B) é observado uma extensão da cromatina entre os dois núcleos das células interfásicas ao qual dá-se o nome de pontes de DNA. Em (C) encontra-se o controlo que se refere a células interfásicas normais. A azul está representada a marcação com DAPI

responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos. 20

**Figura IV. 10. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Na coluna (A) é observado fragmentos de DNA fora da placa metafásica ao qual se designa de desalinhamento cromossômico. Em (B), (C) e (D) são observadas anormalidades no citoesqueleto onde em (B) é observado fusos multipolares com o dobro dos centrossomas, em (C) um fuso monopolar com metade dos centrossomas e em (D) uma má formação do fuso mitótico devido a uma fragmentação dos polos. Em (E) encontra-se o controlo referente a uma célula metafásica normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos. 21

**Figura IV. 11. Defeito observado em células mitóticas em anafase após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Em (A) é observado um atraso na segregação dos cromossomas em anafase resultando numa incorreta segregação cromossômica. Em (B) encontra-se o controlo referente a uma célula em anafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos. 22

**Figura IV. 12. Índice Mitótico e Índice Metafase/Anafase de células HeLa após depleção dos vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Representação gráfica correspondente ao valor percentual do índice mitótico (A) e do índice metafase/anafase (B) para cada condição testada (MOB4, MOB4\*, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2 e CCM3), do controlo negativo (SD II) e do controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase e de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde á supressão da proteína pelo Oligo 19. Observa-se um aumento considerável quer do índice mitótico como do índice metafase/anafase em todas as condições testadas, comparativamente com as duas condições controlo. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada umas das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 3 e 4 em Anexos. 22

**Figura IV. 13. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de MOB2 por RNAi. I.** Em (A) está sinalizado por uma seta amarela um fragmento de DNA fora da placa metafásica, ocorrendo desalinhamento cromossômico. Em (B), a marcação com  $\gamma$ -tubulina mostra-nos os dois centrossomas ainda juntos no início da mitose, em profase, enquanto que no controlo (C), correspondente a uma célula em início de profase, os centrossomas já migraram para os polos da célula. **II.** Em (A) é possível observar fusos mitóticos descentrados da célula, em (B) encontra-se o controlo referente a uma célula em metafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a vermelho está representado a marcação com  $\gamma$ -tubulina, responsável pela visualização dos centrossomas. **III.** Representação gráfica correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas. Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. Foi observado um aumento de defeitos mitóticos após depleção de MOB2 quando comparado com o controlo negativo (SD II) e o controlo não transfetado (S/T). Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada umas das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 9A em Anexos. 24

**Figura IV. 14. Representação gráfica dos principais defeitos observados em células mitóticas após depleção de MOB2 por RNAi em células HeLa.** O defeito predominante foi a não disjunção dos centrossomas no início da mitose (38%), o segundo defeito mais observado foi a existência de fusos mitóticos descentrados da célula (20%) e por último o desalinhamento cromossômico (11%) em metafase. Valores obtidos das contagens realizadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através da microscopia de fluorescência. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 9B em Anexos. 25

**Figura IV. 15. Índice Metafase/Anafase após deleção de MOB2 por RNAi em células HeLa.** Representação gráfica correspondente ao valor do índice metafase/anafase para a condição teste (MOB2), controlo negativo (SD II) e controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. Observa-se um aumento do índice metafase/anafase na condição testada, comparativamente com as duas condições controlo. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 8A em Anexos. 25

## Lista de Tabelas

**Tabela III. 1. Descrição dos anticorpos utilizados e a sua respetiva companhia/referência..... 10**

**Tabela III. 2. Oligonucleótidos utilizados para o silenciamento de genes pela técnica de RNAi.**

Lista da designação dos oligonucleótidos, respetivos genes alvos e companhia/referência utilizados na técnica de RNAi. Sequência do Oligo 5 custom made #1: CCA CCU GAA GGC CAA GAU G dT dT; Oligo 10 custom made #2: CCG ACU UCC AGU UCA AGG A dT dT; Oligo 19 custom made #3: GCA GGG UUA GCA UAA AGG A dT dT..... 11

**Tabela VIII. 1. Defeitos mitóticos observados após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de defeitos mitóticos apresentados no Gráfico da Figura IV.8. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19..... 37

**Tabela VIII. 2. Desalinhamento cromossómico observado após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células mitóticas com desalinhamento cromossómico apresentados no Gráfico da Figura VIII.4B. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19..... 37

**Tabela VIII. 3. Índice Metáfase/Anáfase após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram feitas contagens de células que se encontravam em metáfase e em anáfase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. Valores utilizados para o cálculo do **índice metáfase/anáfase** apresentados no Gráfico da Figura IV.12B. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19. .... 38

**Tabela VIII. 4. Índice Mitótico após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. Valores utilizados para o cálculo do **índice mitótico** apresentados no Gráfico da Figura IV.12A. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19. .... 38

**Tabela VIII. 5. Anormalidades no Fuso mitótico observadas após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram analisadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células mitóticas com anormalidades no fuso mitótico apresentados no Gráfico da Figura VIII.4A. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19..... 38

**Tabela VIII. 6. Micronucleações observadas após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram analisadas um total de aproximadamente 1000 células interfásicas através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células em interfase com micronucleação apresentados no Gráfico da Figura VIII.4C. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19. .... 38

**Tabela VIII. 7. Atraso na segregação cromossómica observado após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.**

Foram analisadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das

percentagens de células mitóticas com atraso na segregação cromossômica apresentados no Gráfico da Figura VIII.4D. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.....39

**Tabela VIII. 8. Índice Metafase/Anafase (A) e Índice Mitótico (B) após RNAi de MOB2.** Para o cálculo do índice metafase/anafase foram feitas contagens de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas e para o cálculo do índice mitótico foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. ....40

**Tabela VIII. 9. Total de defeitos mitóticos (A) e defeitos mitóticos individuais (B) após RNAi de MOB2.** Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para o MOB2. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de defeitos mitóticos apresentados no Gráfico da Figura IV.13.III e Figura IV.14. ....40

## Lista de Abreviaturas

### A

APC/C- do inglês Anaphase Promoting Complex/Cyclosome  
ADB- do inglês Antibody Dilution Buffer

### B

BSA- do inglês Bovine Serum Albumin

### C

CDK- do inglês Cyclin-Dependent Kinases  
CENP-A- do inglês Centromere Protein A  
CDC20- do inglês Cell Division Cycle 20  
CCM3- do inglês Cerebral Cavernous Malformation 3  
CTTNBP2- do inglês Cortactin Binding Protein 2

### D

DNA- do inglês Deoxyribonucleic Acid  
DAPI- do inglês 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DMEM- do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DABCO- do inglês 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane  
dMOB- Proteína MOB de *Drosophila*

### F

FBS- do inglês Fetal Bovine Serum  
FGFR1OP2- do inglês Fibroblast Growth Factor Receptor Oncogene Partner 2

### G

GFP- do inglês Green Fluorescence Protein  
GCKIII- do inglês Germinal Center Kinase III

### H

hMOB- Proteína MOB humana

### L

LATS- do inglês Large Tumor Supressor

### M

MOB- do inglês Mps One Binder  
Mob1p- do inglês Msp One Binder 1p

Mad2- do inglês Mitotic Arrest Deficient  
MTOC- do inglês Microtubule Organizing Center  
MST- do inglês Mammalian Ste20-like Protein Kinase

### N

NDR- do inglês Nuclear Dbf2-Related

### P

PP2A- do inglês Protein Phosphatase 2A  
PP2Aa- Subunidade de ancoragem  
PP2Ac- Subunidade catalítica  
PDCD10- do inglês Programmed Cell Death 10  
PBS- do inglês Phosphate-Buffered Saline  
PEM- Pipes, EGTA e MgCl<sub>2</sub>  
Pen/Strep- Penicilina/Estreptomicina  
PVDF- do inglês Polyvinylidene difluoride

### R

RNA- do inglês Ribonucleic Acid  
RNAi- do inglês RNA interference

### S

SAC- do inglês Spindle Assembly Checkpoint  
STRIPAK- do inglês Striatin-Interacting Phosphatase and Kinase  
SDS- do inglês Sodium Dodecyl Sulfate  
STRN- do inglês Striatin  
SG2NA- do inglês S/G2 Nuclear Antigen  
STRIP1/2- do inglês Striatin-Interacting Proteins 1/2  
STK25- do inglês Serine-Treonine Kinase 25  
SLMAP- do inglês Sarcolemmal Membrane-Associated Protein  
SIKE- do inglês coiled-coil protein Supressor of IκB Kinase- ε  
SAV1- do inglês Salvador Family WW Domain Containing Protein 1  
SD II- do inglês Scramble Duplex II

### Y

YAP/TAZ- do inglês Yes-Associated Protein 1/Transcriptional co-Ativador with PDZ-binding motif

# I. Introdução

A divisão celular é o evento chave para o crescimento e desenvolvimento de qualquer organismo vivo. Em organismos eucariotas, é designado de mitose a um tipo de divisão celular que origina duas células filhas geneticamente idênticas a partir de uma única célula mãe. Para tal, precisa de passar por um processo de várias etapas chamado de ciclo celular.

Devido à sua enorme importância e complexidade, o ciclo celular é um processo altamente regulado assegurando a correta transmissão do material genético e a consequentemente sobrevivência dos organismos vivos. No entanto, falhas nesta regulação podem provocar anormalidades como aneuploidias, que podem levar à letalidade, e o desenvolvimento de cânceros. Deste modo, torna-se fundamental o estudo dos mecanismos envolvidos no ciclo celular para poder compreender de melhor forma como são regulados.

## 1.1. Ciclo Celular

O ciclo celular é o processo universal pelo qual as células se reproduzem, e que está subjacente ao crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos. Durante esse período de tempo, as células devem ser capazes de crescer, duplicar o seu conteúdo genético e celular, segregá-lo corretamente, e por último de se dividir fisicamente dando origem a duas células filhas geneticamente idênticas. O ciclo celular nas células eucarióticas divide-se em 3 fases: Interfase (G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>), a fase mitótica, e a citocinese [1, 2].

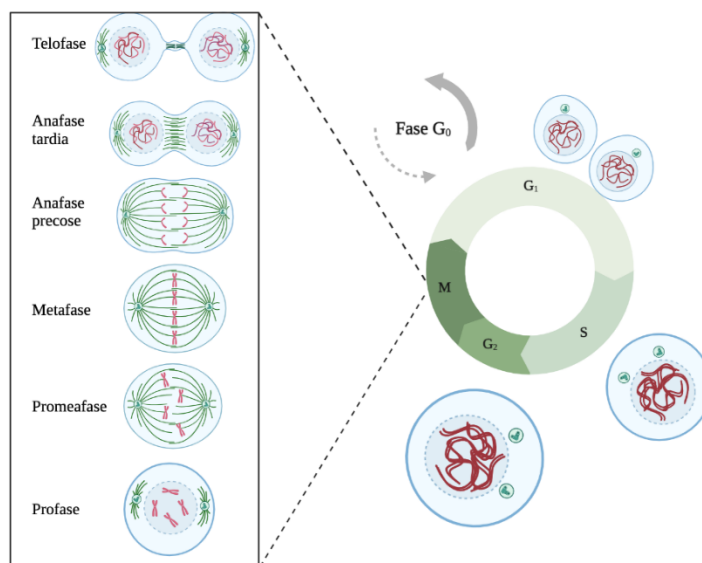


Figura I. 1. Representação esquemática das várias fases do ciclo celular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M).

A fase G<sub>1</sub> (do inglês, *gap 1*) é responsável pelo aumento da transcrição de genes para a síntese de proteínas e organelos essenciais para dar início à divisão celular. As células podem sair do ciclo celular e permanecer num estado quiescente denominado fase G<sub>0</sub> durante um tempo indeterminado e voltar novamente a entrar em G<sub>1</sub>. A fase S é a fase seguinte onde o DNA é duplicado juntamente com o centríolo. Durante a fase G<sub>2</sub> (do inglês *gap 2*) a célula continua a crescer e a sintetizar proteínas preparando-se para o início da mitose [2].

Na fase mitótica, a célula pára de crescer e divide o seu conteúdo genético previamente duplicado na fase S, juntamente com os organelos celulares, em duas células filhas geneticamente semelhantes que possuem o mesmo número de cromossomas. A fase M é extremamente regulada e a sequência de eventos é dividida em fases maioritariamente baseadas no estado de condensação e da posição dos cromossomas

em relação ao fuso mitótico, conhecidas como a profase, prometáfase, metafase, anáfase e telófase. Em cada uma das fases ocorre um conjunto de eventos característicos que as permite distinguir entre si. Em profase ocorre a condensação das fibras de cromatina até serem visíveis cromossomas e dá-se a formação do fuso mitótico a partir da polimerização dos microtúbulos entre os dois centrosomas que migram para os polos opostos da célula. Em prometáfase ocorre a fragmentação do invólucro nuclear, os cromossomas ligam-se aos microtúbulos do fuso mitótico pelos seus cinetocóros e entram em movimento ativo. Em metafase, quando os cromossomas se encontram totalmente alinhados na placa equatorial, dá-se o início da anáfase onde cada cromátídeo é puxado para os polos opostos da célula pelo fuso mitótico ocorrendo segregação cromossómica. A mitose termina com a telófase com a chegada dos cromátídeos aos polos e a sua descondensação, formação do invólucro nuclear e despolarização dos microtúbulos do fuso mitótico (Figura I. 1) [1, 2].

A divisão celular termina com um processo designado de citocinese onde se dá a separação física da membrana celular de modo a formar duas novas células filhas.

## 1.2 *Checkpoint* Mitótico

Todas as etapas do ciclo celular devem ser devidamente coordenadas entre si de modo a que o material genético seja corretamente replicado e segregado. Essa coordenação e regulação é fundamental para a viabilidade celular. Para que tal aconteça, dentro das etapas do ciclo celular existem pontos de controlo (*checkpoints*) responsáveis pela vigilância e avaliação da ordem, integridade e fidelidade dos principais eventos do ciclo [2, 39]. Existem 3 pontos de controlo ao longo do ciclo celular. O ponto de controlo em G1/S garante que a célula está preparada para replicar o seu material genético na fase seguinte (fase S), monitorizando o tamanho e a integridade do genoma. Existem vários fatores internos e externos verificados pela célula nesta fase. Se a célula passar todos esses critérios, segue para a fase de replicação, caso contrário a célula deixa o ciclo celular e entra em fase G0, isto é, entra em quiescência [1, 2].

O segundo ponto de controlo em G2/M assegura que o DNA foi corretamente replicado na fase S. Se erros forem detetados, a célula permanece em G2 até que estes sejam reparados. Se existir impossibilidade de reparação, a célula sai do ciclo celular e entra em apoptose [1, 2].

O terceiro e último ponto de controlo ocorre durante a mitose e é responsável por assegurar a correta formação do fuso mitótico e que todos os cromátídeos irmãos estejam corretamente ligados aos microtúbulos do fuso pelos cinetocóros, durante a transição metafase/anáfase. Este ponto de controlo é designado por M ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*). [2]

O aspeto fundamental da regulação nestes pontos de controlo reside nas proteínas ciclinas e nas CDKs (*Cyclin-dependent kinase*) [1]. Estes formam complexos entre si e as suas oscilações impulsionam a progressão do ciclo celular. No entanto, enquanto a ativação de complexos específicos ciclina-Cdk controlam a progressão através dos pontos de controlo nas transições G1/S e G2/M, a progressão através da transição metafase/anáfase é desencadeada não por fosforilação proteica, mas pela degradação de proteínas, levando a etapas finais da divisão celular. O principal regulador da transição entre metafase e anáfase é o complexo promotor da anáfase APC/C, um membro da família enzimática de ubiquitinas-ligase responsável pela ubiquitinação da securina, que protege as ligações proteicas que mantém os pares de cromátídeos irmãos unidos no início da mitose. Assim, a destruição de securinas em metafase ativa uma protease que separa os cromátídeos irmãos, a separase, clivando as coesinas presentes nos centrómeros e assim desencadeia a anáfase [40].

### 1.3 Centrômero, Cinetocóro e Centrossomas em mitose

Um dos passos mais importantes para o sucesso mitótico é o estabelecimento de ligações adequadas dos cromossomas aos microtúbulos do fuso mitótico responsáveis pelo alinhamento e a segregação cromossômica. As estruturas cromossômicas responsáveis por mediar tal ligação são os cinetocóros, complexos proteicos formados na região centromérica da cromatina em cada cromossoma eucariótico [1]. Além da ligação aos microtúbulos, os cinetocóros são os locais de ativação do *checkpoint* mitótico, que previne o início da anáfase na presença de cinetocóros não ligados [3]. Quando incorretamente ligados ao fuso, os cinetocóros ativam o ponto de controlo SAC, que por sua vez bloqueia a progressão do ciclo celular ao impossibilitar a ativação do complexo APC/C através da expressão de Mad2 que inibe a atividade de CDC20, uma proteína auxiliar a APC/C. Uma vez que todos os cinetocóros se liguem de forma estável ao fuso, o *checkpoint* é inativado, o que alivia o bloqueio do ciclo celular e, assim, permite que a segregação cromossômica e a divisão celular prossigam [1, 41].

Sem centrômero, o cinetocóro não se formaria e as células não poderiam segregar os seus cromossomas. No entanto, as proteínas do cinetocóro localizam-se nos centrômeros antes e durante a mitose para permitir a segregação cromossômica, enquanto as proteínas centroméricas (CENPs) persistem ao longo do ciclo celular. O processo de reconhecimento da posição do centrômero na cromatina varia entre organismos e acredita-se que seja de natureza epigenética. Uma proteína essencial para essa tal marca epigenética é a proteína centromérica A (CENP-A), uma variante de histona H3 encontrada apenas em centrômeros funcionais que é necessária para direcionar a montagem do cinetocóro [4, 5, 6, 19]. A CENP-A é essencial para um centrômero funcional uma vez que a sua mutação ou perda causa uma falha completa na formação tanto do centrômero como cinetocóro [4, 5].

Os centrossomas são o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) em células animais com papéis na regulação da formação do fuso mitótico, separação cromossômica e citocinese [1, 42, 43]. Estes são formados por um par de centríolos que, juntamente com um grande número de proteínas acessórias, tais como a  $\gamma$ -tubulina, formam o material pericentriolar onde ocorre a nucleação dos microtúbulos. Os centrossomas duplicam-se na transição da fase G1/S e permanecem unidos até à transição da fase G2/M. Quando a célula inicia a mitose, os dois centrossomas migram para lados opostos do núcleo e originam os dois polos do fuso mitótico, promovendo a sua bipolaridade e garantindo a separação dos cromossomas [42, 43, 71]. A separação dos centrossomas depende de uma proteína pertencente à família da cinesina-5, a Eg5 [42, 72]. Apesar de ter sido descrito que os centrossomas nem sempre são essenciais para a formação do fuso mitótico [44], centrossomas defeituosos na célula, ou mesmo a sua perda, pode resultar em danos no DNA, ligações incorretas dos cinetocóros e separação incorreta dos cromossomas.

### 1.4 Proteínas MOB

A família das proteínas MOB (*monopolar spindle-one-binder*) é evolutivamente conservada em eucariotas [7, 8]. As MOB são proteínas que atuam como subunidades ativadoras em complexo com cinases essenciais em vias de sinalização com funções centrais na célula como a divisão celular, morfogénese, proliferação e controlo da morte celular [8].

Em 1998, Luca e Winey descreveram a primeira proteína desta família, Mob1p (*Msp one binder 1p*), a partir do estudo de novos substratos da cinase Msp1p em levedura [9]. Foi descoberto que esta proteína não só é essencial para a sobrevivência das células como desempenha um papel central na rede de saída mitótica (MEN) e citocinese em *S. Cerevisiae* [9, 10].

Apenas em 2005 foram iniciados estudos dos genes MOB em organismos multicelulares. Em *Drosophila* foi designado por Mats (*Mob as tumour suppressor*) ao gene MOB1, uma vez que este é um componente da via de sinalização supressora de tumor *Hippo*, [8] essencial para o controlo da

proliferação celular e apoptose [11]. Estudos deste gene demonstraram que a sua perda de função promove mitoses aberrantes e o desenvolvimento de tumores [15], enquanto mutantes nulos para dMOB1 demonstram um fenótipo letal [8,15]. Desde então, vários genes MOB foram identificados noutras espécies, sendo possível a expansão desta família na linhagem eucariota.

Em organismos multicelulares, as proteínas MOB têm sido associadas à família de cinases LATS (*large tumour suppressor*) /NDR (*nuclear Dbf2-related*), que juntamente com o seu parceiro MOB1, desempenham um papel na via de sinalização *Hippo* tanto em *Drosophila* como em mamíferos. Consistente com esta observação, a regulação alterada ou mutações em genes MOB humanos estão associadas a vários tipos de cancro [28].

O número de genes MOB em cada espécie difere dependendo da complexidade do organismo. Em organismos unicelulares, como na levedura, foram encontrados dois genes MOB diferentes, Mob1p e Mob2p [9]. Em organismos multicelulares, como em *Drosophila*, foram encontrados quatro genes homólogos ao gene MOB da levedura que codificam para quatro proteínas [12]. Em Humanos até agora foram identificados sete genes que codificam para sete proteínas, denominadas de hMOB (proteínas MOB humanas): hMOB1A, hMOB1B, hMOB2A, hMOB2B, hMOB2C, hMOB3 e hMOB4. [13].

### 1.4.1 MOB2

Contrariamente aos restantes membros da família MOB, uma fração substancial da hMOB2 é detetada no núcleo [35, 76]. Esta proteína interage com as cinases NDR1/2 através do mesmo domínio de ligação do hMOB1, mas não se associa com as cinases LATS1/2. Mais especificamente, a interação das cinases NDR1/2 com hMOB2 promove o bloqueio da ativação de NDR devido à inibição da sua fosforilação. Foi observado que a depleção de hMOB2 por RNAi resulta num aumento da atividade de NDR, concluindo que esta inibição é maioritariamente causada pela competição entre as proteínas hMOB1 e hMOB2, pela ligação direta ao mesmo domínio conservado das cinases NDR1/2 [8,36]. Por outro lado, a sobreexpressão de hMOB2 afeta negativamente funções biológicas das cinases NDR tais como a progressão apoptótica, duplicação de centróssomas e a regulação da orientação correta do fuso mitótico [36, 38]. Para além disso, outros estudos indicam que a ativação de NDR1 mediada por MST2, Fry e MOB2 é crucial para a fidelidade do alinhamento cromossómico em células animais [45].

hMOB2 também atua independente da ligação a NDR. Estudos revelaram que em condições de crescimento normais, hMOB2 é necessário para prevenir a acumulação de danos de DNA não reparáveis. Em condições de exposição a altos níveis de danos de DNA induzidos exogenamente, hMOB2 promove a sobrevivência celular, a ativação de *checkpoints* do ciclo celular e sinalização de respostas a danos de DNA [20, 37].

Em *Drosophila*, a MOB2 parece localizar-se nos cinetocóros, assumindo um papel de inibidora da anafase, podendo ainda ser necessária para a formação do fuso mitótico e progressão do ciclo celular [46]. Adicionalmente, a MOB2 também tem sido associada a uma função neurológica [47, 48].

Apesar de todas as funcionalidades que a MOB2 aparenta desempenhar em células humanas, existe uma escassez de dados relativamente à sua função em mitose.

### 1.4.2 MOB4/Foceína

De todos os membros da família MOB, MOB4/Foceína é a menos estudada e evolutivamente a mais divergente dos restantes membros [14, 28]. MOB4/Foceína é uma proteína intracelular de 26 kDa descoberta a partir de um *yeast two-hybrid screen* com base na sua interação com membros da família da *striatin*, sendo estas proteínas de suporte multimodulares envolvidas em sinalização e tráfego [23, 24, 25].

Em *Drosophila*, uma análise do *knockout* de dMOB4/foceína *in vivo* demonstrou que nos neurónios o dMOB4 é necessário para a regulação do transporte axonal, desenvolvimento sináptico e para a organização normal da rede de microtúbulos. Além disso foi reportado que dMOB4 é essencial para a viabilidade uma vez que mutantes nulos são letais em fase larval. A letalidade de mutantes dMOB4 pode ser restaurada por hMOB4, indicando uma função conservada ao longo da evolução [26]. Em 2008, foi descrito que MOB4 se localiza nos centrossomas e cinetocóros. As células depletadas de MOB4 apresentavam uma separação defeituosa do centrossoma, fusos anormais com polos desorganizados e fibras do cinetocóro (fibras K) espalhadas. No entanto, não demonstravam uma alteração no índice mitótico, normalmente indicativo de um papel no *checkpoint* do fuso mitótico ou na montagem do cinetocóro [35].

Em humanos, a foceína é maioritariamente conhecida por pertencer ao complexo STRIPAK (*Striatin-interacting phosphatase and kinase*). O STRIPAK é um complexo proteico altamente conservado constituído por várias fosfatases e cinases, sem atividade enzimática, que interagem com membros da família da *striatin* [10]. Apesar de se saber que este complexo está envolvido na regulação de várias vias e processos biológicos essenciais para a célula, a função da proteína MOB4 no complexo ainda é desconhecida.

Para além dos membros da família da *striatin*, foi observado que a foceína interage com proteínas que desempenham papéis no tráfego vesicular e endocitose, e localiza-se em locais de endocitose ativa, sugerindo uma possível função desta proteína nesses mesmos processos [23, 24]. Esta hipótese é suportada pela caracterização *in vivo* de mutantes dMOB4 que aparenta ter as mesmas funções [26].

## 1.5 O Complexo STRIPAK

Tal como referido atrás, o STRIPAK é um complexo proteico que funciona como um conjunto macromolecular que comunica através da interação física com outros complexos de proteínas sinalizadoras para criar redes proteicas dinâmicas maiores [49, 50]. Este complexo está envolvido em inúmeros processos celulares e de desenvolvimento em organismos eucarióticos desde a proliferação celular à apoptose, à polaridade e migração celular, à regulação da montagem e fragmentação do Golgi, regulação do transporte vesicular e do citoesqueleto, neurogénese entre outros processos celulares [49]. Também parecem funcionar na regulação da citocinese com base em vários estudos adicionais [70].

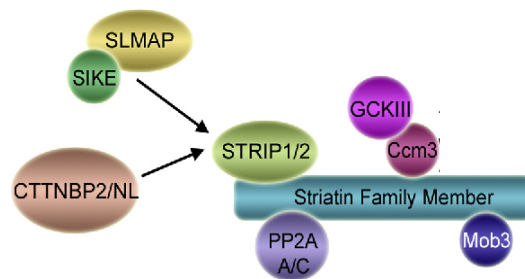
As *striatins*, como já mencionado anteriormente, constituem a principal subunidade fosfatase reguladora do complexo STRIPAK. Estas não possuem atividade catalítica, mas atuam como um *scaffold* central ligando-se diretamente a todas as outras subunidades permitindo a formação de vários complexos proteicos [49, 50, 51]. Análises sucessivas em células animais encontraram parálogos de *striatin*, que foram denominados STRN3 (SG2NA ou *S/G2 nuclear antigen*) e STRN4 (*Zinedin*), enquanto a *striatin* originalmente descrita é referida como STRN1. As *striatins* são subunidades reguladoras da proteína fosfatase PP2A (*protein phosphatase 2A*), um complexo heterotrimérico composto igualmente por uma subunidade catalítica (PP2Ac) e uma subunidade *scaffold* (PP2Aa) [49, 50, 67, 74]. A caracterização bioquímica da PP2A permitiu definir as restantes maiores subunidades do complexo STRIPAK humano, que incluem as STRIP1/2 (*striatin-interacting proteins 1/2*), MOB4/foceína, CCM3 (*cerebral cavernous malformation 3*) ou PDCD10 (*programmed cell inteacting proteins*) e as cinases MST3, MST4 (*mammalian Ste20-like protein kinase 3 e 4*), e STK25 (*serine-threonine kinase 25*) que pertencem à subfamília de cinases GCKIII (*Germinal Center Kinase III*) [49, 50, 73, 75]. GCKs são conhecidos por regular processos chave de desenvolvimento, como a organização do citoesqueleto, ciclo celular e apoptose, sendo que a interação com as fosfatases do complexo STRIPAK inibe a sua atividade [49, 50].

Este complexo central pode ligar-se a proteínas adicionais de maneira mutuamente exclusiva para formar complexos STRIPAK distintos, dependendo do tipo de tecido em que é expresso. Algumas

dessas proteínas são as SLMAP (*sarcolemmal membrane-associated protein*) e as proteínas da família SIKE (*coiled-coil protein supressor of IκB kinase- ε*) tais como a proteína SIKE1 ou FGFR1OP2 (*fibroblast growth factor receptor oncogene partner 2*). Estes são adicionalmente constituídos pelos adaptadores CTTNBP2 (*Cortactin Binding Protein 2*) [49, 50].

O complexo STRIPAK foi localizado conservadamente no invólucro nuclear, onde provavelmente coordena processos celulares e de desenvolvimento conservados [49]. Adicionalmente, estudos revelam que a sua localização para esse organelo depende das subunidades *striatin* e STRIP [52, 53]. Também se sabe que as várias subunidades individuais do complexo foram localizadas em vários locais tais como o invólucro nuclear, o Complexo de Golgi e centrossoma, o que leva à hipótese de que o STRIPAK se liga a diferentes organelos. Essa função de ponte pode facilitar a comunicação e coordenação entre os organelos durante a divisão celular [49, 70].

Nos últimos anos, os membros dos complexos da família das *striatins* têm sido associados a várias condições clínicas. Estes incluem doenças cardíacas, cancro, diabetes, autismo e lesões vasculares cavernosas cerebrais [49, 50, 77]. Embora tenham sido associados a essas condições, os papéis mecanísticos específicos dos complexos STRIPAK na doença ainda precisam ser delineados.



**Figura I. 2. Representação esquemática dos principais componentes do complexo STRIPAK em células de mamífero.** MOB4 está representada como Mob3, nome anteriormente atribuído à MOB4/foceína. Adaptado de Hwang, J., & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 47, 118–148.

### 1.5.1 Interação entre o complexo STRIPAK e a via *Hippo*

A via de sinalização *Hippo* é responsável pelo controlo do crescimento e regeneração de tecidos, pela coordenação dos níveis de apoptose, crescimento, proliferação e diferenciação a nível celular. Deste modo, devido ao papel predominante na célula, a sua desregulação está associada ao aparecimento de várias doenças como a formação de cancros [33].

Esta é uma via complexa, conservada em mamíferos e *Drosophila*, que integra um vasto conjunto de cinases, incluindo as cinases NDR/LATS. Após ativação da via *Hippo* em mamíferos, o complexo MST1/2-SAV1 fosforiza LATS1/2 e esta, em conjunto com a proteína MOB1, inativa o regulador co-transcricional YAP/TAZ (*yes-associated protein 1/ transcriptional co-ativador with PDZ-binding motif*) por fosforilação, inibindo assim as suas atividades nucleares através da sua retenção citoplasmática e/ou degradação. Quando a via *Hippo* está inativa, YAP e TAZ migram para o núcleo e interagem com múltiplos fatores de transcrição para induzir a expressão de genes responsáveis pela proliferação, progressão do ciclo celular e sobrevivência. Deste modo, as cinases da via *Hippo* quando fosforiladas atuam como proteínas supressoras de tumor que regulam negativamente a proto-oncoproteína YAP/TAZ. Nesta via a cinase NDR1/2 desempenha um papel semelhante à LATS1/2 [13, 14, 32].

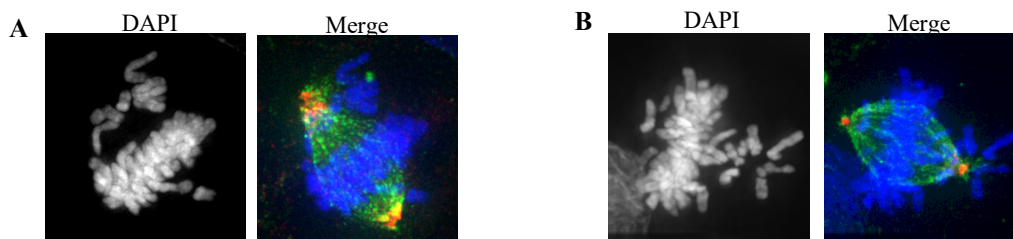
Recentemente foi demonstrado que o complexo STRIPAK atua como um regulador negativo da via *Hippo* ao promover a desfosforilação das cinases MST1/2 pela PP2A, ação esta mediada pela proteína SLMAP, levando à consequente ativação de YAP/TAZ [21, 32, 34]. Apesar da regulação da via *Hippo* pelo MOB4 ou por outros membros ou mecanismos relacionados com o complexo STRIPAK ainda ser

incerta, foi demonstrado que a cinase MST4, pertencente ao grupo de cinases GCKIII e membro do complexo STRIPAK, forma um complexo com a MOB4 que sinergicamente promove a proliferação e migração das células tumorais pancreáticas. Este complexo interfere com a formação do complexo MST1-MOB1 promovendo a atividade de YAP nas células cancerígenas. Assim, o complexo MST4-MOB4 é identificado como um regulador não canônico da via *Hippo* com um papel oncogénico nas células pancreáticas [27]. Deste modo, alterações no complexo STRIPAK resultam na consequente desregulação da via *Hippo* e dos processos biológicos a ela associados.

## 1.6 Depleção de hMOB4 induz mitoses aberrantes em células humanas

O grupo *Cell Cycle and Cancer Biology* foca-se no estudo das proteínas MOB e na sua função no ciclo celular. *Drosophila melanogaster*, *Zebrafish* e células humanas têm sido os principais modelos explorados pelo laboratório para o estudo destas proteínas, em particular da MOB4.

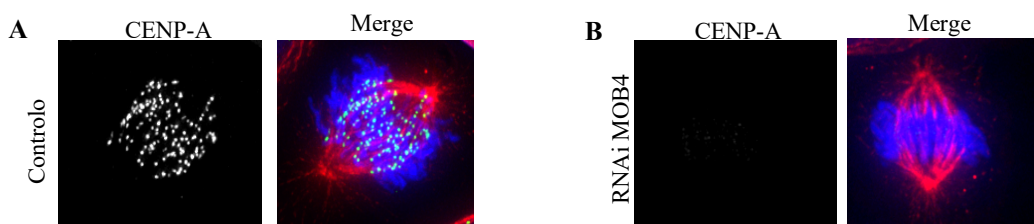
Estudos preliminares da MOB4 em células HeLa realizados no laboratório demonstraram que aquando depleção da proteína, pela técnica de RNAi, observa-se uma falha do alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e uma falha na formação do fuso mitótico (Figura I. 3) (Cláudia Florindo, dados não publicados), defeitos estes idênticos aquando da depleção de proteínas do cinetocóro [29, 30, 31]. Uma posterior análise de células fixadas permitiu determinar em melhor detalhe os principais defeitos observados, que são eles o colapso do fuso mitótico, fuso mitótico malformado e descentrado do plano celular.



**Figura I. 3. Depleção de hMOB4 em células HeLa promove defeitos no alinhamento dos cromossomas.** A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a vermelho está representado a marcação com  $\gamma$ -tubulina, responsável pela visualização dos centrosomas. Em (A) é possível observar os cromossomas desalinhados da placa metafásica e a  $\gamma$ -tubulina dispersa no polo do fuso mitótico. Em (B) observa-se os cromossomas desalinhados da placa metafásica. Cláudia Florindo, dados não publicados.

Também foi realizada uma análise microscópica em tempo real que permitiu concluir que estas células permaneciam bloqueadas em prometáfase prosseguindo para apoptose, indicando a ocorrência da ativação do controlo do *checkpoint* mitótico.

Por outro lado, foi observado que aquando RNAi da MOB4, a proteína CENP-A encontrava-se deslocada dos cinetocóros em metafase (Figura I. 4). Tendo em conta que a CENP-A é uma proteína centromérica essencial para um cinetocóro funcional, surge-nos a hipótese de que a MOB4 possa ser necessária para a correta ligação estável cinetocóro-microtúbulo.



**Figura I. 4. Depleção de hMOB4 em células HeLa promove a deslocação da proteína CENP-A.** Em (A) é possível observar a CENP-A na célula controlo. Em (B) mostra a célula que sofreu RNAi da MOB4 onde se observa uma grande diminuição da CENP-A. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a vermelho está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a verde está representado a marcação da proteína CENP-A, que se localiza nos centrómeros. Cláudia Florindo, dados não publicados.

## 1.7 A importância do estudo da MOB4

A mitose é o processo base para a vida e os seus mecanismos são extremamente regulados e executados com precisão. A falha dessa precisão pode causar prejuízos para a célula e em maior escala para o organismo, como aneuploidias, síndromes, ou o aparecimento de tumores. O facto de a ausência da MOB4 na célula promover a formação de mitoses defeituosas, mostra que esta proteína é essencial para o processo. Deste modo, o seu estudo torna-se de extrema importância para ampliar o nosso conhecimento sobre as vias que regulam o processo mitótico, essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do organismo.

Para além disso, pesquisas no *The Human Protein Atlas* indicam que 88% dos tumores têm níveis de transcrição de MOB4 aumentados, sendo mais elevados em carcinomas colorretais, de mama e hepatocelulares [54]. Curiosamente, de todos os membros da família MOB, MOB4 tem a maior variação de nível de expressão e em mais tipos de cancro, para além de sugerir um papel oncogénico contrariamente aos restantes membros [54]. Estudos paralelos com *Drosophila* foram realizados no laboratório, onde foi descoberto que mutantes MOB4 são letais no estágio larval, e que as larvas desenvolvem tumores melanocíticos (dados não publicados). Deste modo, a MOB4 aparenta ser um possível marcador tumoral e o seu estudo torna-se importante para compreender a sua correlação com a carcinogénese.

## II. Objetivos

A função exata do MOB4 ainda é desconhecida. No entanto, a sua natureza preliminar indica que possui uma função essencial ainda não caracterizada para o sucesso da mitose. Tendo em conta que dados preliminares mostram que a regulação negativa da proteína MOB4 em células HeLa resulta em defeitos mitóticos idênticos aquando da depleção de proteínas do cinetocóro, pretendemos definir as funções moleculares da MOB4, bem como elucidar quanto à universalidade da sua função em mitose. Para além disso, MOB4 foi identificada como um novo alvo essencial, porém não caracterizado, do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anafase. Uma vez que esta proteína pertence ao complexo STRIPAK, estamos também interessados em perceber se o bloqueio do *checkpoint* mitótico e os defeitos mitóticos anteriormente descritos ocorrem como consequência da depleção específica de MOB4, da depleção do complexo STRIPAK como um todo ou um outro componente do complexo STRIPAK. No intuito de alcançar os nossos objetivos, tarefas específicas foram descritas:

- 1) Determinar a dinâmica intracelular da proteína MOB4 em células HeLa;
- 2) Analisar o fenótipo mitótico da MOB4 em diversas linhas celulares;
- 3) Determinar se os defeitos mitóticos e o bloqueio no *checkpoint* são específicos do MOB4 ou atuam em conjunto com o complexo STRIPAK.

Com este estudo pretendemos alargar o conhecimento sobre o desenvolvimento da mitose, pela caracterização de um novo elemento essencial, MOB4, tanto em células de cultura como num organismo vertebrado.

## III. Materiais e Métodos

### 3.1 Linhas celulares e cultura de células

Para a realização deste trabalho foram utilizadas células HeLa, a primeira linhagem celular imortal proveniente de células cancerígenas do colo do útero e de cariótipo aneuploide [78]. As células foram cultivadas em meio *Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 4%

soro fetal bovino (FBS), 1% Glutamina e 1% do antibiótico Penicilina G e antifúngico Streptomicina (Pen/Strep) e mantidas na incubadora numa atmosfera húmida a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. A passagem de células era realizada duas vezes por semana quando a placa atingia 90% de confluência.

O procedimento regia-se em aspirar todo o meio da placa (60 mm) e lavar as células uma vez com PBS 1X. Após lavagem, adicionar Tripsina-EDTA 0,25% 1X e incubar a placa durante 2-3 min, o tempo necessário para que as células perdessem a aderência à mesma. De seguida, adicionar meio DMEM à placa, ressuspender e adicionar o volume pretendido numa nova placa devidamente identificada. Por fim, preencher a nova placa com meio *Advanced* DMEM e mantê-la na incubadora.

Foram utilizadas células HCT116, uma linha celular tumoral diploide isolada do cancro do cólon de um homem adulto. Estas foram cultivadas em meio *McCoy's 5A Medium*, suplementado com 10% FBS e 1% Pen/Strep. Uma vez que estas células possuem uma taxa de proliferação elevada, a passagem de células era realizada três vezes por semana quando a confluência atingia os 80%-90% sendo o procedimento e as condições de cultura iguais às realizadas para as células HeLa.

Também foram utilizadas células hTERT RPE-1, células epiteliais pigmentares da retina imortalizadas não tumorais de cariótipo diploide, cultivadas em meio DMEM/F-12, suplementado com 4% FBS, 1% Glutamina e 1% Pen/Strep. As condições de cultura e passagem de células foram as mesmas realizadas para as células HeLa.

### 3.2 Imunofluorescência

Imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de uma determinada proteína, *in vitro* em qualquer tecido ou tipo de célula. Essa capacidade é alcançada por meio de combinações de anticorpos específicos marcados com fluorocromos [58]. Foi realizado a técnica de imunofluorescência indireta onde primeiramente incubamos o anticorpo primário com alta afinidade para a proteína alvo e de seguida é incubado o anticorpo secundário com alta afinidade para o anticorpo primário. O anticorpo secundário é conjugado com um fluorocromo que é detetável por microscopia de fluorescência.

Foram plaqueadas 0,5 x 10<sup>5</sup> células/mL sobre lamelas em placas de 24 poços. Quando os poços se encontravam 50-60% confluentes, o procedimento de imunofluorescência era iniciado.

O meio de cultura das células foi aspirado e as células foram lavadas durante 2-3 min com PEM 1X (10mM PIPES, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 5mM de EDTA, pH 6.8) previamente aquecido a 37°C ou PEM 1X/30% glicerol quando pretendíamos marcar microtúbulos. De seguida as células foram fixadas com uma solução de Metanol/Acetona (1:1) a -20°C, durante 4 min e durante 2 min especificamente para as células HCT116. Aspirou-se a solução de fixação e procedeu-se a uma lavagem com PEM 1X e a 3 lavagens com PBS 1X, durante 5 minutos cada lavagem. Após fixação, as células eram permeabilizadas com PBS 1X/Triton 0,5% durante 10 min à temperatura ambiente. De seguida, a solução de permeabilização era aspirada e as células eram lavadas 3 vezes em PBS 1X. Após lavagens, segue-se o bloqueio de regiões onde os nossos anticorpos se poderiam ligar inespecificamente. Para tal, incubamos as células com uma solução de bloqueio composta por PBS 1X/Tween20 0.05%, 2% BSA e 2% FBS durante 30 min à temperatura ambiente. De seguida, a solução de bloqueio era aspirada e os poços eram lavados com PBS 1X/Tween20 0,05% durante 5 min. O anticorpo primário foi diluído em ADB (PBS 1X/Tween 0.05% + 1% FBS) e 2/3 da solução era adicionada às células durante 1h em câmara húmida escura, enquanto a restante era adicionada aos 30 min. Fizeram-se novamente 3 lavagens com PBS 1X seguido de uma lavagem com PBS 1X/Tween20 0,05%. De seguida procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário previamente diluído em ADB, durante 30 min em câmara húmida escura. As células eram posteriormente lavadas com PBS 1X e com PBS 1X/Tween20 0,05%. Incubou-se as células com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) a 0,5 µg/mL para a marcação de DNA durante 10 min em câmara húmida escura, seguida de 3 lavagens com PBS 1X. Por último, as lamelas foram preparadas utilizando o meio de montagem Mowiol, suplementado com DABCO 2,4% deixando secar durante a

noite em câmara escura. No dia seguinte as lamelas foram seladas com verniz transparente e visualizadas ao microscópio ZEISS® Axio Imager Z2. As imagens foram obtidas com recurso à camera Zeiss® Axio Cam HRM e posteriormente tratadas com o software Fiji/Image J.

### 3.2.1 Anticorpos Utilizados

Tabela III. 1. Descrição dos anticorpos utilizados e a sua respetiva companhia/referência.

| Anticorpo  | Designação                | Anti-              | Feito em: | Companhia/Referência                              |
|------------|---------------------------|--------------------|-----------|---|
| Primário   | Giantina                  | Giantina           | Rabbit    | BioLegend (Poly19243)                             |
|            | GTU-88                    | $\gamma$ -Tubulina | Mouse     | Sigma #T-6557                                     |
|            | YL1/2                     | $\alpha$ -Tubulina | Rat       | Serotec #MCAP77                                   |
|            | DM1A                      | $\alpha$ -Tubulina | Mouse     | Sigma #T-9026                                     |
|            | 16E2                      | MOB4/focéina       | Mouse     | Milippore #MABS22                                 |
| Secundário | Alexa Fluor 594           | Rabbit             | Goat      | Invitrogen #A11037                                |
|            | Alexa Fluor 488           | Mouse              | Goat      | IgG #A11029                                       |
|            | DyLight 594               | Rat                | Goat      | Jackson Immuno Research Laboratories #112-515-167 |
|            | HRP Peroxidase Conjugated | Mouse              | Goat      | Jackson Immuno Research Laboratories #13-035-003  |

### 3.2.2 Utilização de Inibidores

Para o estudo da dinâmica intracelular de MOB4 em células HeLa, foram utilizados os inibidores de microtúbulos Colchicina e Nocodazole a 5  $\mu$ M e 30  $\mu$ M, respetivamente durante 2 horas antes da fixação das células. Em células HeLa a Colchicina é responsável pela inibição dos microtúbulos pela sua interação com as suas extremidades. A sua utilização promove o bloqueio da mitose, havendo uma acumulação de fusos acromáticos bloqueados em metafase. Já o Nocodazole, a organização do fuso é alterada de maneira semelhante às alterações induzidas pela Colchicina, no entanto o modo de ação é diferente uma vez que este atua principalmente diminuindo a concentração de dímeros de tubulina livres competentes, impedindo a sua ligação às extremidades dos microtúbulos e consequente alongamento [59, 80].

Para além de drogas inibidoras de microtúbulos, foi utilizado MG-132 (Carbobenzoxi-Leu-Leu-leucinal) a 10  $\mu$ M durante 2 horas antes da fixação. Esta droga consiste num aldeído péptido responsável pela inibição de proteossomas [81]. Uma vez que APC/C promove o início da anafase marcando a securina e ciclina B1 para degradação pelo proteossoma, o uso desta droga irá promover o bloqueio no *checkpoint* mitótico em metafase e deste modo a observação de um maior número de células nesta fase mitótica.

## 3.3 RNA de interferência (RNAi)

Com o objetivo de diminuir os níveis de uma determinada proteína na célula para a análise do seu fenótipo, foram realizados ensaios de RNA de interferência (RNAi). Esta técnica consiste no silenciamento de genes pós transcricional pela introdução na célula de siRNA (*small interference RNA*), ou oligonucleótidos (Oligos) de cadeia dupla específicos permitindo que estes se liguem à sua cadeia de mRNA complementar (alvo). A degradação do mRNA leva à subsequente perda de proteína [60, 61].

### 3.3.1 Transfeção de Oligonucleótidos

Para a realização deste ensaio, as células HeLa foram transfetadas com oligos que têm como alvo o mRNA do MOB2 e de vários componentes do complexo STRIPAK tais como STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR10P2, CCM3/PDCD10, inclusivamente o MOB4.

No dia anterior à transfeção foram semeadas  $0,25 \times 10^5$  cells/mL em placas de 24 poços. No dia da transfeção, num tubo Eppendorf (Tubo A) foram adicionados 20  $\mu$ M de oligo, previamente diluído em *Nuclease Free Water*, juntamente com meio Opti-MEM™, que consiste em meio sem soro fetal bovino. Num outro tubo (Tubo B), foram adicionados meio Opti-MEM™ e o reagente de transfeção Liptofectamina™ 2000 (LF2000) e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 min. Após incubação, o conteúdo do Tubo A foi adicionado ao Tubo B e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 20 min, permitindo a formação de complexos lipídicos DNA-LF. Passado o tempo de incubação, o meio de cultura das células foi aspirado e substituído por meio DMEM não suplementado e a mistura do oligo com a LF2000 foi adicionada lentamente a cada poço. As placas foram posteriormente incubadas a 37°C durante 2h30 min. Por fim, após incubação, o meio de cada poço foi substituído por meio novo suplementado e as placas foram mantidas na incubadora durante 48h.

Para as células HCT116 o processo de transfeção foi realizado de igual forma, no entanto devido à elevada taxa de proliferação quando comparada com as células HeLa e ao facto de demorarem mais tempo a aderir ao fundo da placa, as células eram plaqueadas dois dias antes da transfeção com uma densidade de  $0,15 \times 10^5$  cells/mL.

Para as células hTERT RPE-1, as células eram semeadas no dia anterior à transfeção com uma densidade de  $0,35 \times 10^5$  cells/mL. O processo de transfeção foi realizado de igual forma, no entanto a quantidade de reagente de transfeção foi reduzida para metade e o tempo de exposição das células ao meio de transfeção encurtado para 1h30 min.

### 3.3.2 Emparelhamento de Oligonucleótidos

Antes da sua utilização, foi necessário realizar o emparelhamento do Oligo 5 contra a proteína MOB4. Para tal foi misturado 20  $\mu$ M do oligo de cadeia simples e do seu complementar a um Tampão de Emparelhamento, composto por 100 mM de Acetato de Potássio, 30 mM de HEPES-KOH pH 7,4, e 2mM de Acetato de Magnésio. De seguida, a mistura foi incubada a 90°C durante 1 minuto e centrifugada durante 15 segundos. Por último a solução foi deixada a incubar em banho seco a 37°C durante 1 hora, sendo posteriormente pronto a usar ou armazenado a -20°C.

### 3.3.3 Oligonucleótidos Utilizados

**Tabela III. 2. Oligonucleótidos utilizados para o silenciamento de genes pela técnica de RNAi.** Lista da designação dos oligonucleótidos, respetivos genes alvos e companhia/referência utilizados na técnica de RNAi. Sequência do Oligo 5 *custom made* #1: CCA CCU GAA GGC CAA GAU G dT dT; Oligo 10 *custom made* #2: CCG ACU UCC AGU UCA AGG A dT dT; Oligo 19 *custom made* #3: GCA GGG UUA GCA UAA AGG A dT dT

| Designação | Gene alvo  | Companhia/Referência                            |
|------------|--|---|
| Oligo 5    | MOB4/focéina   | Dharmacon/ <i>custom made</i> #1                |
| Oligo 10   | hsMob2(HCCA2, human)                                 | Ambion: <i>Custom made</i> #2 #sRNAiid s37583   |
| Oligo 19   | MOB4/focéina   | Dharmacon/ <i>custom made</i> #3                |
| Oligo 20   | STRN (human) STRIPAK                                 | Dharmacon ON-TARGET plus J-019572-02-0002       |
| Oligo 21   | STRIP1 (FAM40A) (human) STRIPAK                      | Dharmacon J-021516-19-0002                      |
| Oligo 22   | STRN3 (human) STRIPAK                                | Dharmacon J-019145-01-0002                      |
| Oligo 23   | MST4 (human) STRIPAK                                 | Dharmacon ON-TARGET smart pool L-003753-10-0005 |
| Oligo 24   | FGFR1OP2 (human) STRIPAK                             | Dharmacon J-013895-20-0002                      |
| Oligo 25   | CCM3 / PDCD10 (human) STRIPAK                        | Dharmacon J-004436-06-0002                      |
| SD II      | Silencer® Select Negative Control #2 Scramble Duplex | Ambion: 4390847                                 |

## 3.4 Análise de proteínas por SDS-PAGE

### 3.4.1 Recolha de células e preparação das amostras

Para a análise dos extratos proteicos nas células, é necessário a separação das proteínas num gel de poliacrilamida. Para tal, as células de cada poço foram recolhidas para um tubo Eppendorf e centrifugadas na centrifugadora refrigerada a 4°C durante 10 min a 2000 g. De seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com PBS 1X frio e foi novamente centrifugado às mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi armazenado a -20°C.

No dia seguinte, os tubos com o sedimento foram ressuspensionados em tampão de lise RIPA (1,5M NaCl, 0,5M HEPES, 10% SDS, 1M DTT) e deixados em gelo durante aproximadamente 1h para a lise celular ocorrer. Seguidamente, as nossas amostras foram colocadas em banho seco a 95°C durante 5 min de modo a eliminar restos de proteína insolúvel, e centrifugadas à velocidade máxima a 4°C. O sobrenadante foi colocado num outro tubo e o sedimento descartado. Ao nosso sobrenadante foi adicionado *Loading Buffer* 4X, composto por 0,4% azul de bromofenol que dá cor à nossa amostra, 10% SDS e 400 mM  $\beta$ -mercaptoetanol que desnaturam as proteínas e vão carregá-las negativamente e 40% glicerol que dá densidade à nossa amostra fazendo com que esta migre para o fundo do poço do gel.

### 3.4.2 SDS-PAGE

A técnica de SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) permite-nos visualizar a separação de proteínas de acordo com o seu peso molecular em géis de poliacrilamida. Ambos os géis de concentração e de corrida foram preparados de acordo com o descrito em Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). As soluções utilizadas foram 30% acrilamida, 1,5 M Tris a pH 8,8, 1M Tris a pH 6,8, 10% SDS, 10% persulfato de amónio e TEMED. Os géis foram montados e corridos no sistema Mini-PROTEANII (BioRad), em tampão de corrida 1X (25 mM Tris, 0,192 M Glicina, 0,1% SDS pH 8,3). Foram utilizados géis de 15%, com pentes de 10 poços e espaçadores de 0,75 mm. Foi aplicada uma corrente elétrica de 10 mA em cada gel, sendo que quando as bandas chegavam ao gel de corrida, a corrente era aumentada para 25 mA. Como marcador de peso molecular foi utilizado o *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa*.

## 3.5 Western Blot

Após terem sido corridas no gel de poliacrilamida, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF para se tornarem acessíveis à deteção por anticorpos. Uma vez que a membrana é hidrofóbica, começou-se por emergir a membrana em metanol seguida de água destilada, tornando-a hidrofílica, e por fim em tampão de transferência 1X (25 mM Tris e 0,192 M Glicina). Seguidamente foi preparada a cassette onde o gel e a membrana foram colocados entre dois papéis *Whatman* e duas esponjas embebidas em tampão de transferência 1X. Uma vez que a migração da corrente ocorre do ânodo para o cátodo, o gel foi colocado na zona do ânodo e a membrana no cátodo para que as proteínas fossem transferidas do gel para a membrana. As proteínas foram transferidas durante aproximadamente 1h a 60 V ou durante a noite a 25 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio (TBS-0,1%Tween20, 10% leite magro em pó) durante 1h em agitação à temperatura ambiente com o objetivo de evitar que o anticorpo se ligue inespecificamente à membrana. Seguidamente, a membrana foi lavada com uma solução de lavagem (TBS-0,1%Tween20, 1% leite magro em pó) durante aproximadamente 5 min. Após a lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído numa solução de TBS-Tween20 0,1%, BSA 1% e FBS 1% durante 1h no rotador à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Depois, fez-se 3 lavagens da membrana com a solução de lavagem e procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário diluído na mesma solução utilizada para o anticorpo primário durante 1h em rotação. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS-

0,1%Tween20 e a última apenas com TBS 1X. Por fim, a membrana foi incubada durante 1 min com uma mistura (1:1) de duas soluções de ECL (Solução 1: 1M Tris pH 8,5; 250 mM luminol em DMSO; 90 mM ácido p-cumárico em DMSO e H<sub>2</sub>O. Solução 2: 1M 1M Tris pH 8,5; 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E H<sub>2</sub>O) que irá reagir com o HRP acoplado ao anticorpo secundário, produzindo sinal e visualizada no aparelho Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+ System.

### 3.5.1 *Stripping* da Membrana

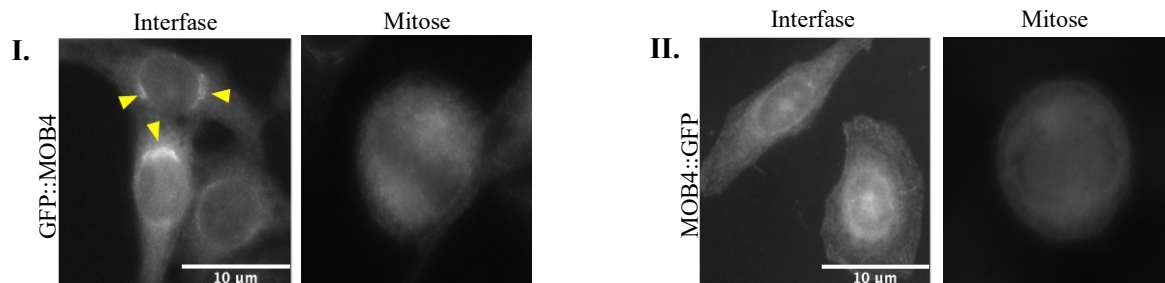
Para obter um *loading control*, foi feito um *stripping* da membrana onde esta foi incubada com uma solução de glicina (glicina 0,2M, 1% SDS) durante 1h em agitação à temperatura ambiente de modo a limpar os anticorpos previamente ligados à membrana. Depois foram feitas 3 lavagens com TBS 1X e rebloquearam-se as membranas com TBS-0,1%Tween, 10% leite magro em pó.

## IV. Resultados

### 4.1 Dinâmica intracelular da MOB4

De modo a ter uma percepção da função da proteína MOB4, foram realizados estudos de dinâmica intracelular. Estudos preliminares de localização intracelular nas células HeLa, por imunofluorescência, demonstraram que a proteína MOB4 encontra-se situada na região perinuclear em Interfase, localização esta semelhante à marcação específica do Complexo de Golgi (Cláudia Florindo, dados não publicados). Em mitose, MOB4 parece estar localizada nos dois polos no fuso mitótico, que se assemelham com a marcação específica dos centrossomas (Cláudia Florindo, dados não publicados). Estes resultados apontam para uma possível função estrutural ou reguladora da MOB4 nestes organelos que ainda não foi desvendada.

Com o objetivo de confirmar e complementar estes estudos, uma vez que não foram realizados em grande detalhe e os resultados obtidos poderão ser artefactos da técnica utilizada, foi estudada a sua dinâmica na célula utilizando duas linhas celulares HeLa que expressam a proteína MOB4 em fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*), que apresentam a designação de CAA2 e CAB13. Estas linhas foram geradas no laboratório e resultam de uma transfecção estável. A linha CAA2 expressa a proteína MOB4 em fusão com GFP no N-terminal (GFP::MOB4) enquanto a linha CAB13 expressa MOB4 em fusão com GFP no C-terminal (MOB4::GFP). Uma vez que uma transfecção estável resulta na introdução de genes estranhos no genoma da célula de uma maneira aleatória, essa inserção poderá alterar o comportamento da proteína de interesse e até mesmo o comportamento da célula, razão pela qual foram estudadas duas linhas celulares com a proteína de fusão situada em diferentes extremidades.

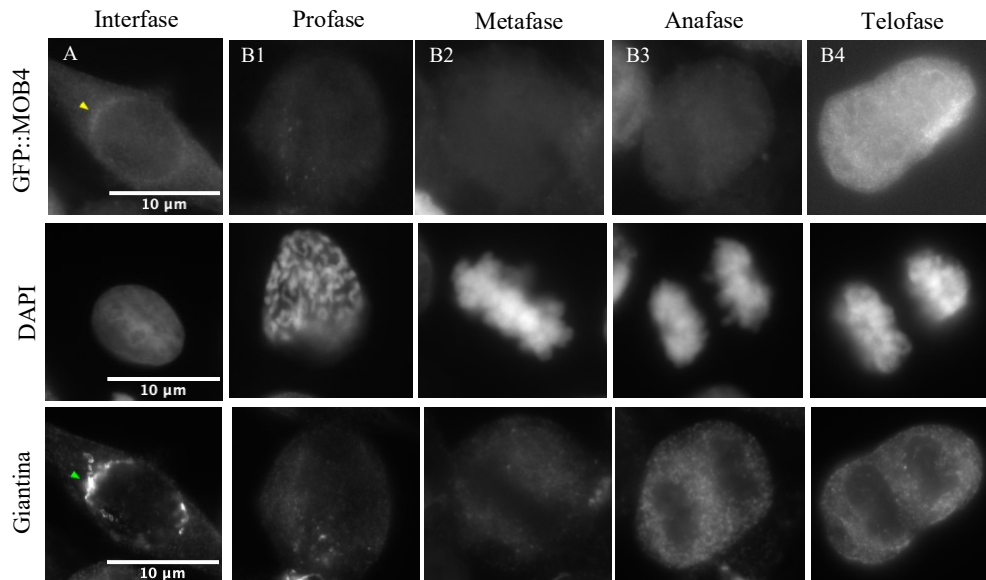


**Figura IV. 1. Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 (I) e MOB4::GFP (II) em células HeLa em Interfase e em mitose.** Setas amarelas representam a localização da proteína GFP::MOB4 na zona perinuclear, semelhante ao padrão de localização do Complexo de Golgi.

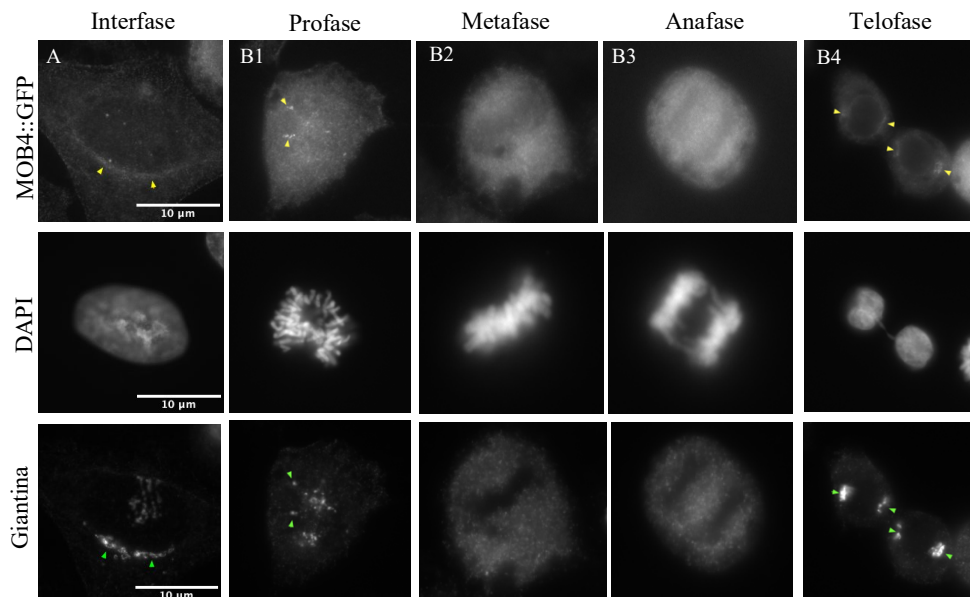
A visualização das linhas celulares no microscópio de fluorescência sugere que em Interfase a proteína de fusão GFP::MOB4 se localiza numa zona perinuclear (Figura IV 1.I.), sugerindo que possa ser indicativo do Complexo de Golgi. No entanto, a proteína de fusão MOB4::GFP encontra-se mais

dispersa em redor do núcleo e mais visível no que sugerem ser os filamentos do citoesqueleto, que mais tarde foi confirmado como sendo os filamentos de actina. (Figura IV.1.II). Já em mitose, nas duas linhas, parece não existir uma localização específica da proteína.

De acordo com estas observações, para confirmar a sua localização no Complexo de Golgi, foi feita uma imunofluorescência das duas linhas celulares com marcação com Giantina, responsável por marcar o Complexo de Golgi. Adicionalmente pretendíamos observar a localização intracelular da proteína nas várias fases mitóticas.



**Figura IV. 2. Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 em células HeLa em Interfase (A) e nas várias fases mitóticas (B1-4).** Setas amarelas representam a localização da proteína GFP::MOB4 na região perinuclear. Setas verdes representam a marcação do Complexo de Golgi com Giantina. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e coradas com o marcador de DNA, DAPI.



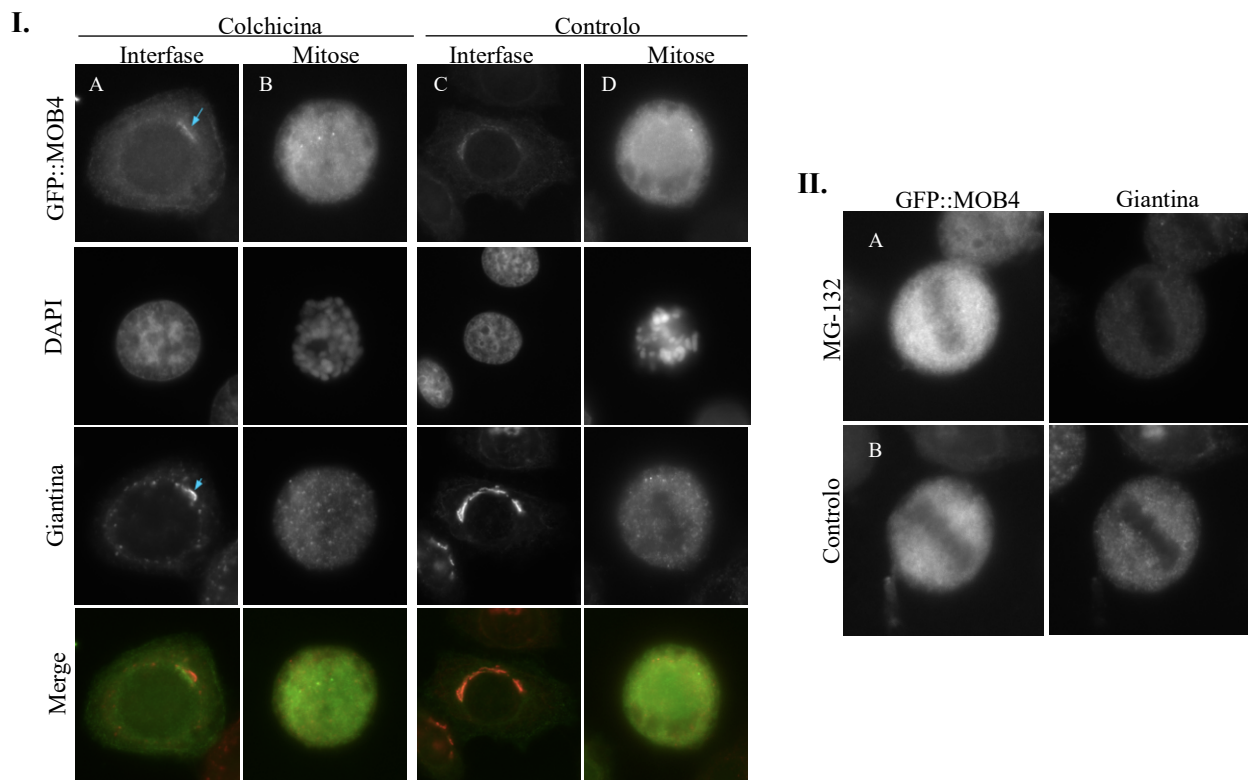
**Figura IV. 3. Localização da proteína de fusão MOB4::GFP em células HeLa em Interfase (A) e nas várias fases mitóticas (B1-4).** Setas amarelas representam a localização da proteína MOB4::GFP na região perinuclear. Setas verdes representam a marcação do Complexo de Golgi com Giantina. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e coradas com o marcador de DNA, DAPI.

Os resultados observados mostram que em Interfase (Figura IV. 2 e IV. 3 coluna A), ambas as proteínas de fusão parecem co-localizar no Complexo de Golgi, como observado pelo mesmo padrão

de localização demonstrado pelas setas verdes e amarelas. No entanto, em mitose, mais uma vez, não foi observada uma localização específica da proteína MOB4 (Figura IV. 2 e IV. 3 colunas B1-B4).

Seguidamente, uma vez que resultados anteriores sugerem que o MOB4 possa ser requerida para a correta ligação cinetocóro-microtúbulo e que em *Drosophila* foi relatado que esta se localiza nos cinetocóros [35], perguntamo-nos se o mesmo se verifica em células humanas. Para além disso, uma vez que o MOB4 aparenta ter localização nos centrossomas, também pretendíamos perceber se a proteína precisará dos microtúbulos para se deslocar para essas estruturas. Para respondermos a tais questões tratámos ambas as linhas com drogas inibidoras de microtúbulos Colchicina e Nocodazole.

Uma vez que o resultado do tratamento com as duas drogas obteve fenótipos muito semelhantes entre as duas linhas, e que já foi comprovado que ambas as proteínas de fusão se localizam no Golgi, irão ser apresentados apenas os resultados obtidos do tratamento com Colchicina na proteína GFP::MOB4.



**Figura IV. 4. Localização da proteína GFP::MOB4 após tratamento com inibidores. I.)** Localização da proteína de fusão GFP::MOB4 em células HeLa em Interfase e mitose após tratamento com o inibidor de microtúbulos colchicina, (A e B respetivamente) e sem tratamento (C e D respetivamente). Setas azuis representam a co-localização da proteína GFP::MOB4 na região perinuclear com a marcação do Complexo de Golgi com a Giantina. A verde está representada a marcação da proteína GFP::MOB4 e a vermelho está representada a marcação com Giantina, responsável pela marcação do complexo de Golgi. **II.)** Localização da proteína GFP::MOB4 em células HeLa em mitose após tratamento com o inibidor do proteossoma MG-132 (A) e sem tratamento (B). Localização específica da MOB4 não foi observada. Células foram fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) e incubadas com o marcador de DNA, DAPI.

As células da linha CAA2 após tratamento com Colchicina em Interfase (Figura IV. 4, I. coluna A) apresentavam uma morfologia arredondada, de menor área citoplasmática e menor dimensão. Também foi observado que a marcação específica do Complexo de Golgi com a Giantina encontra-se dispersa no citoplasma. No entanto, em mitose, não se observa uma marcação específica da MOB4 nos centrossomas nem nos cinetocóros.

Por fim, numa última tentativa de observar a localização da proteína de fusão em mitose, pretendeu-se aumentar o número de fusos mitóticos em metafase. Para tal, as células foram incubadas com o inibidor do proteossoma MG-132 que inibe o Complexo Promotor da Anafase (APC/C). Como mais

uma vez ambas as linhas apresentaram resultados semelhantes, apenas irão ser apresentados os resultados observados com a proteína GFP::MOB4.

Como era espectável, nos resultados obtidos com o tratamento com MG-132 foi observado um maior número de células bloqueadas em metafase, no entanto continuou-se sem se observar uma localização específica da proteína em mitose nas duas linhas (Figura IV. 4, II.).

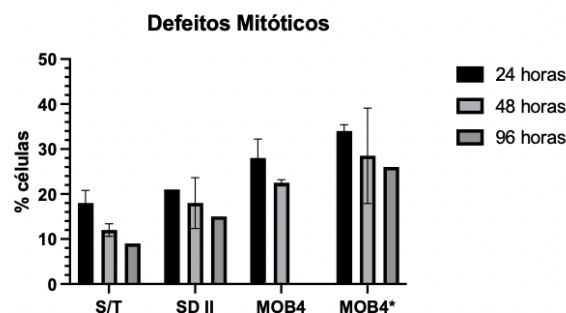
## 4.2 Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB4 em diferentes linhas celulares

Uma vez que dados preliminares do laboratório indicam que a depleção da proteína MOB4 pela técnica de RNAi promove erros no desenvolvimento mitótico em células HeLa, fomos então perceber se esses defeitos seriam específicos do tipo de célula ou se o mesmo aconteceria em células de natureza distinta. Para tal fomos estudar o comportamento mitótico na ausência de MOB4 em dois tipos de linhas celulares diferentes: HCT116, células diploides tumorais que foram isoladas do cólon de um homem adulto [55], e hTERT RPE-1, células diploides não tumorais imortalizadas epiteliais de pigmento da retina [56]. O estudo de MOB4 em três linhas celulares irá elucidar-nos sobre a sua função quer em células aneuploides tumorais como as células HeLa, como em células diploides tumorais como as HCT116 e não tumorais como as hTERT RPE-1, o que nos poderá ajudar a tirar conclusões quanto à sua especificidade ou universalidade da sua função em mitose.

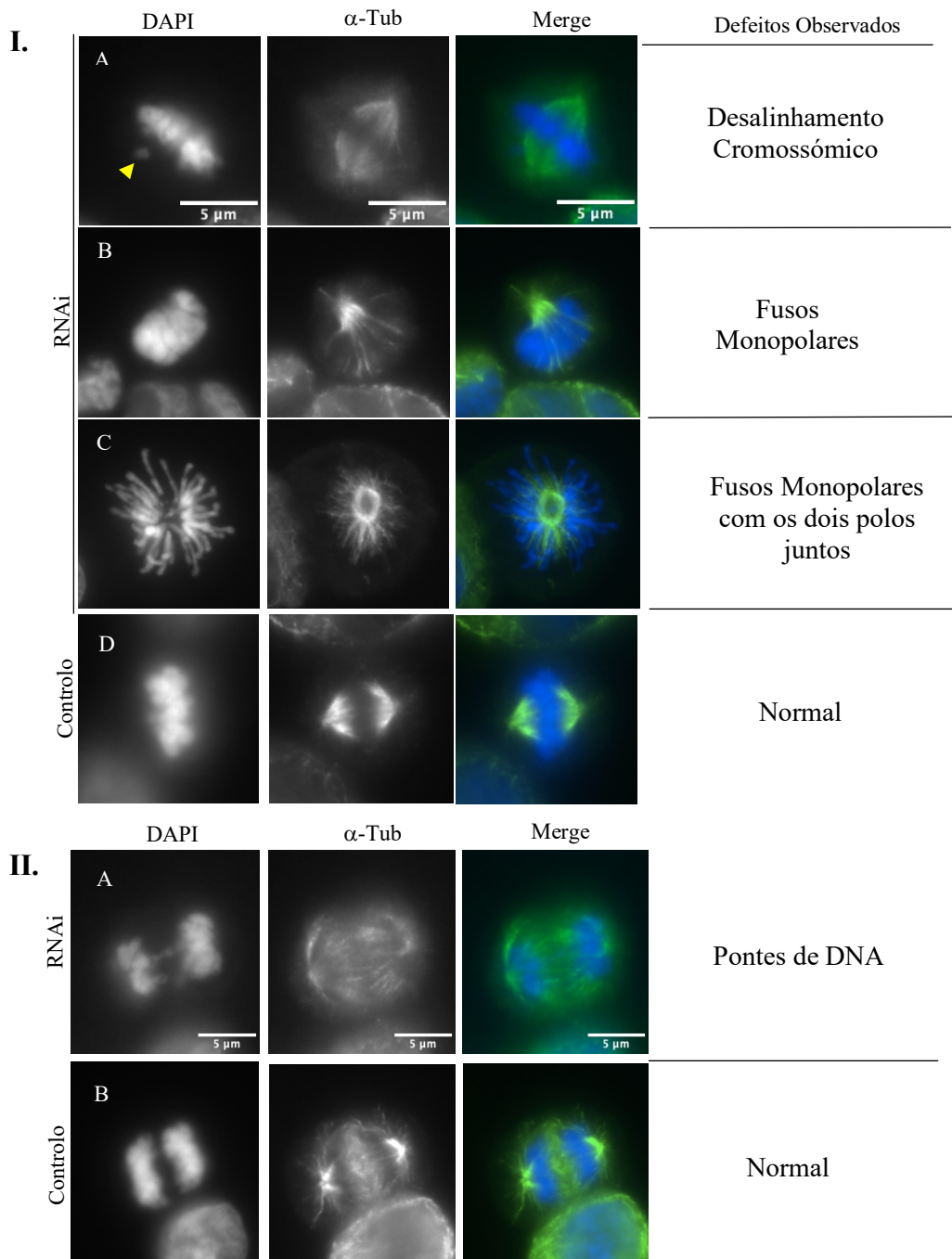
### 4.2.1 HCT116

Ao longo dos anos as células HCT116 têm sido usadas para o estudo de tumorigenicidade sendo alvos de transfeção adequados para a pesquisa de terapia genética. Sendo estas um tipo celular diploide, encontram-se mais perto de representar células humanas comparado com células aneuploides, como é o caso das HeLa.

De forma a estudar o efeito do silenciamento do MOB4 nas células HCT116, foi realizado um RNAi da proteína durante 24, 48 e 96 horas e analisado o seu fenótipo por microscopia de fluorescência. Após a depleção da proteína, foi observado um fenótipo semelhante àquele observado para as células HeLa. No entanto, para ambas as células transfetadas com o oligo neutro SD II como para as células não transfetadas a percentagem de células mitóticas com defeitos foi alta, o que nos faz suspeitar da veracidade dos resultados (Figura IV. 5.). Os principais defeitos observados foram células em metafase com cromossomas desalinhados da placa metafásica, células com fusos monopolares, células com fusos monopolares com a não-disjunção dos dois polos e células com uma cadeia contínua de cromatina que se estende de um polo da anafase ao outro ao qual designamos de pontes de DNA em anafase (Figura IV. 6).



**Figura IV. 5. Representação gráfica dos defeitos mitóticos observados em células HCT116 após depleção do MOB4.** Gráfico correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, controlo negativo (SD II) e controlo não transfetado (S/T)). MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde à supressão da proteína pelo Oligo 19. As percentagens obtidas representam a média aritmética e desvio padrão de duas experiências independentes. Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. No geral, observa-se um ligeiro aumento dos defeitos mitóticos em todas as condições durante as 24, 48 e 96 horas após transfeção, comparativamente aos dois controlos.



**Figura IV. 6. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de MOB4 em células HCT116 por RNAi. I.)** Em (A) é observado pela seta amarela fragmentos de DNA fora da placa metafásica, ao qual se designa por desalinhamento cromossômico. Em (B) é observado um fuso monopolar. Em (C) observa-se uma célula sem a disjunção dos polos, com os cromossomas espalhados. Designamos este tipo de fuso como monopolar. Em (D) encontra-se o controlo que se refere a uma metafase normal. **II)** Em (A) é observado uma extensão da cromatina entre os dois núcleos da célula em anafase ao qual dá-se o nome de pontes de DNA. Em (B) encontra-se o controlo que se refere a uma anafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos.

De acordo com as quantificações realizadas, foi observado um aumento do número de defeitos mitóticos gerais após RNAi do MOB4 com o Oligo 5 e o Oligo 19, 24, 48 e 96 horas após transfeção. No entanto, as células transfetadas com o Oligo 5, 96 horas após transfeção, sofreram morte celular, razão pela qual não foi possível a sua análise. Como não foram feitas repetições desta condição, não foi possível concluir sobre este ponto.

Contudo, nem sempre foram observados aumentos do número de defeitos após depleção do MOB4 com ambos os oligos para cada defeito individual, nem um aumento do número de defeitos com o tempo. Uma das explicações possíveis para a diferença do número de defeitos observados após RNAi da

proteína provém da utilização de dois oligonucleótidos contra diferentes sequências de aminoácidos de MOB4, promovendo uma diferenciação na eficácia na deleção da proteína. Como tal, os resultados poderão ser diferentes, sendo isto uma variabilidade inerente à técnica. A percentagem de alguns dos maiores defeitos observados e que, de grosso modo, apresentam um efeito geral, tais como; a existência de pontes de DNA em anafase, fusos monopulares e com os dois polos juntos e desalinhamento cromossômico em metafase, encontram-se representados em gráficos ilustrativos na Figura VIII. 2 em Anexo. No entanto, no geral, foi observado um aumento dos defeitos mitóticos aquando da depleção do MOB4 em células HCT116.

Com o objetivo de verificar se existe um bloqueio no *checkpoint* mitótico, tal como observado para as células HeLa, foram calculados o índice mitótico e o índice metafase/anafase para cada experiência. O índice mitótico relaciona o número de células em mitose com o total de células contadas e um aumento nesse valor percentual poderá indicar a existência de bloqueios ou atrasos na progressão da mitose. O índice metafase/anafase diz-nos a proporção de células em metafase comparativamente às células em anafase, e um aumento desse valor pode indicar a ocorrência de uma ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anafase. Para o cálculo do índice mitótico, contou-se o número de células mitóticas em cada 1000 células interfásicas observadas. Para o cálculo do índice metafase/anafase foi feita a razão entre o número total de células em metafase sobre o número total de células em anafase. Os dados obtidos dizem-nos que não existe um aumento no índice mitótico com a depleção do MOB4 uma vez que este permanece constante durante as 24, 48 e 96 horas (entre 4 e 5%) (Dados não representados). Relativamente ao índice metafase/anafase foi observado um único aumento durante as 96 horas onde os controlos apresentam um índice de aproximadamente 1,3 e a condição testada com o Oligo 19 de 3,0. No entanto as restantes condições permanecem com um índice metafase/anafase constante (entre 1 e 2) (Dados não representados). Posto que a condição de 96 horas apenas foi realizada uma vez, e nas restantes condições, realizadas duas vezes, não foi observado um aumento no índice mitótico nem no índice metafase/anafase, deduzimos que não ocorre um bloqueio das células HCT116 no *checkpoint* mitótico com a depleção do MOB4, contrariamente ao observado para a células HeLa.

O sucesso dos ensaios de RNAi foi confirmado pela análise dos níveis de expressão da proteína nas células pela técnica de *Western Blot*. Caso a técnica de RNAi tenha sido bem-sucedida, seria esperado não observarmos nenhuma banda ou observarmos uma banda ténue para as amostras que sofreram depleção do MOB4 e uma banda nítida para a mesma proteína nos controlos negativos onde não ocorreu a depleção da proteína. Os resultados para a primeira experiência realizada encontram-se representados na Figura VIII. 1. em Anexo onde as bandas menos nítidas, quando comparadas com as bandas do controlo negativo, confirmam a depleção da proteína. No entanto, na transfeção com o Oligo 19 durante 24 horas observa-se uma banda semelhante às bandas do controlo negativo onde, pelas percentagens de defeitos observadas, parece ter ocorrido depleção. Uma das explicações possíveis poderá ser a ocorrência de uma baixa eficiência de transfeção durante a técnica, que neste caso não foi calculada. No entanto, apesar da baixa eficiência, foi possível a observação de fenótipo por imunofluorescência.

#### 4.2.2 hTERT RPE-1

A linha celular hTERT RPE-1, ou RPE-1, é uma linha celular pigmentar da retina humana imortalizada que retém um cariótipo estável, diploide e tem sido amplamente utilizada para estudar eventos fisiológicos em sistemas de cultura de células humanas [57].

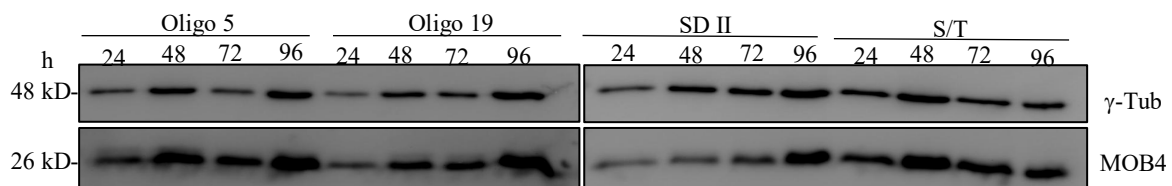
Tal como para as células HCT116, foi realizado um RNAi do MOB4 para as hTERT RPE-1 de modo a verificar se existiria fenótipo defeituoso na ausência da proteína em mitose. No entanto, o protocolo estipulado para a técnica de RNAi não era o mais indicado para esta linha celular, uma vez que era observada muita morte celular durante o procedimento, possivelmente devido á toxicidade provocada pelo reagente de transfeção. Deste modo, tentámos otimizar o protocolo onde reduzimos o

volume do reagente de transfeção para metade e para um tempo de exposição às células menor, resultando na observação de pouca/nenhuma morte celular. Juntamente foi feita uma análise dos níveis de expressão da proteína presente nas células por *Western Blot*, que indicou ter havido depleção da MOB4 com o Oligo 19 (Figura VIII. 3., Anexo).

O passo seguinte consistia na sua análise microscópica onde foram realizados ensaios de Imunofluorescência. No entanto, estas células não só possuem um índice mitótico baixo, como apresentam pouca aderência à lamela de vidro, o que dificultou a sua visualização e análise por microscopia de fluorescência. Para compensar a falta de aderência foram utilizadas lamelas tratadas com Poli-D-Lisina, uma matriz extracelular sintetizada quimicamente e usada para facilitar a adesão celular a superfícies de plástico e vidro. Para aumentar o número de células a entrar em mitose foram realizados vários testes de sincronização de modo a facilitar a visualização de fenótipo. No entanto, ambas as hipóteses não foram bem-sucedidas, uma vez que o sucesso das sincronizações era irregular e as células permaneciam com uma morfologia anormal quando aderidas com Poli-D-Lisina, o que impossibilitava a sua análise por microscopia.

Por estas razões, e com o pouco tempo restante em laboratório, não foi conseguida a análise desta linha por microscopia de fluorescência. No entanto, decidiu-se prosseguir com a análise dos níveis de expressão da proteína presente nas células durante 24, 48, 72 e 96 horas de RNAi.

A análise por *Western Blot* obtida representada na Figura IV. 7 aparenta não ter havido depleção da proteína nas horas analisadas, uma vez que é possível a visualização de uma banda nítida para o MOB4 tanto nos poços com células que sofreram a depleção do MOB4 como nos poços controlo SD II e sem transfeção (S/T). Estes dados dizem-nos que o protocolo de RNAi estipulado pode não ser o mais indicado para a depleção da MOB4 e/ou a proteína pode ser bastante estável nesta linha celular, dificultando a sua depleção na célula. Outra hipótese poderá ser o facto de o RNAi ter funcionado, mas com uma eficiência mais baixa, no entanto como não foi calculada a eficiência de transfeção não podemos concluir quanto a esse ponto.



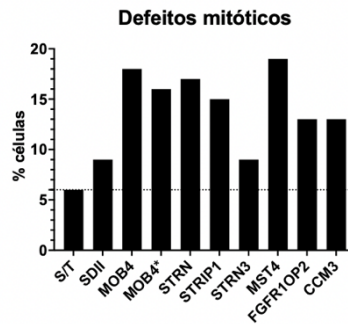
**Figura IV. 7. Análise por *Western Blot* dos níveis de expressão da proteína MOB4 em células hTERT-RPE1 após RNAi.** A análise foi feita 24, 48, 72 e 96 horas após transfeção com o Oligo 5 e o Oligo 19, ambos contra a proteína MOB4 e com o controlo *scramble duplex II* (SD II). S/T representa as células não transfetadas. Foram utilizados anticorpos contra a proteína MOB4 de 26 kD e contra a  $\gamma$ -Tubulina de 48 kD, como controlo interno. Parece não haver depleção da proteína com ambos os Oligos contra o MOB4.

### 4.3 Estudo da depleção de vários componentes do complexo STRIPAK

Um dos objetivos deste projeto residia em perceber se os defeitos observados e o bloqueio no *checkpoint* mitótico nas células HeLa após RNAi do MOB4 acontece como consequência da depleção específica de MOB4, ou da sua interferência com o complexo STRIPAK. Para tal foram realizadas várias experiências de RNAi em células HeLa com o objetivo de silenciar alguns componentes específicos pertencentes ao complexo STRIPAK e analisar o comportamento mitótico da célula após a sua supressão. De todos os constituintes pertencentes ao complexo, os escolhidos foram a STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2, CCM3, e o MOB4.

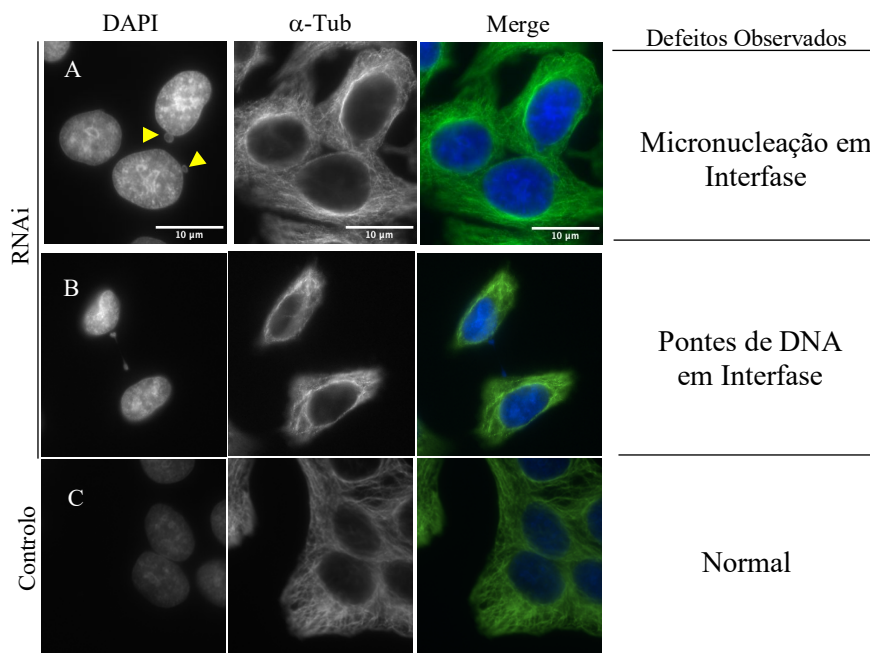
De acordo com as quantificações realizadas, foi observado um aumento geral de defeitos mitóticos após a depleção dos componentes do STRIPAK, quando comparado com os controlos SD II e células não transfetadas (S/T). Na Figura IV. 8. está representada uma ilustração gráfica das quantificações

realizadas para cada um dos componentes e a percentagem de defeitos mitóticos calculada para cada uma delas, onde é notório o seu aumento geral.



**Figura IV. 8. Defeitos mitóticos observados em células HeLa após depleção de componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Gráfico correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2 e CCM3), do controlo negativo (SD II) e do controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde à supressão da proteína pelo Oligo 19. Observa-se um aumento dos defeitos mitóticos em todas as condições, comparativamente aos dois controlos. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontra-se apresentadas na Tabela VIII. 1. em Anexos.

Dentro dos defeitos detetados, verificou-se uma consistência no tipo de erros observados em todas as experiências com a depleção dos vários componentes do complexo, não só em células mitóticas como interfásicas. Em células interfásicas, os principais erros detetados consistiam na existência de micronucleação e de pontes de DNA. Micronucleações consistem em pequenas porções de DNA visíveis no citoplasma da célula que se originam a partir de fragmentos cromossómicos ou cromossomas inteiros que sofrem um atraso durante a anafase em mitose [62] (Figura IV. 9A). Estas correspondem cerca de 3 a 5% das células interfásicas analisadas. As pontes de DNA observadas correspondem a continuidades de DNA entre duas células interfásicas recém-formadas. (Figura IV. 9B)



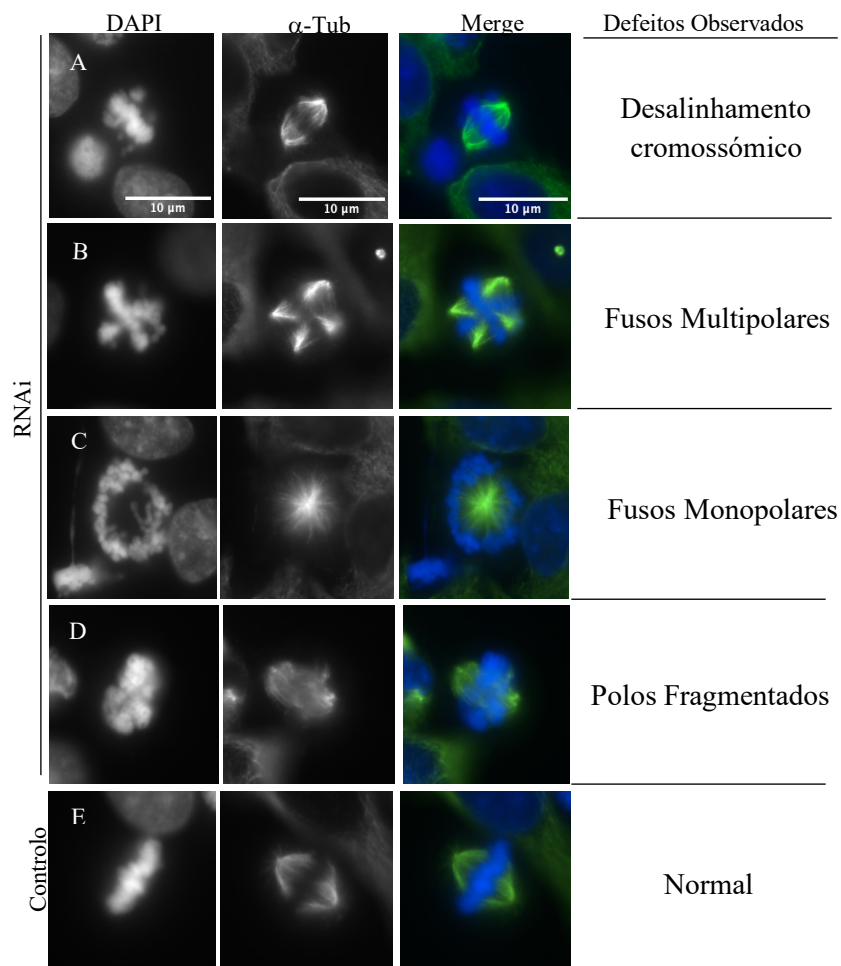
**Figura IV. 9. Defeitos observados em células interfásicas após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Em (A) encontra-se representado pelas setas amarelas porções de DNA no citoplasma ao qual se designa de micronúcleos. Em (B) é observado uma extensão da cromatina entre os dois núcleos das células interfásicas ao qual dá-se o nome de pontes de DNA. Em (C) encontra-se o controlo que se refere a células interfásicas normais. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos.

Em células mitóticas, foram observados defeitos maioritariamente relacionadas com o citoesqueleto, nomeadamente com os centróssomas. Nesta experiência foram observadas células com fusos mono e multipolares. São consideradas células com fusos multipolares todas as células mitóticas que possuam mais do que dois polos no fuso mitótico e células com fusos monopolares a células que apresentem apenas um polo [62].

Outro erro comum encontrado e relacionado com os centróssomas foram células que apresentavam os polos fragmentados. A fragmentação dos polos poderá estar associada à fragmentação dos centróssomas, no entanto, como não foi feita nenhuma marcação com  $\gamma$ -Tubulina, proteína presente e responsável pela visualização dos centróssomas, não podemos concluir que ocorre a sua fragmentação.

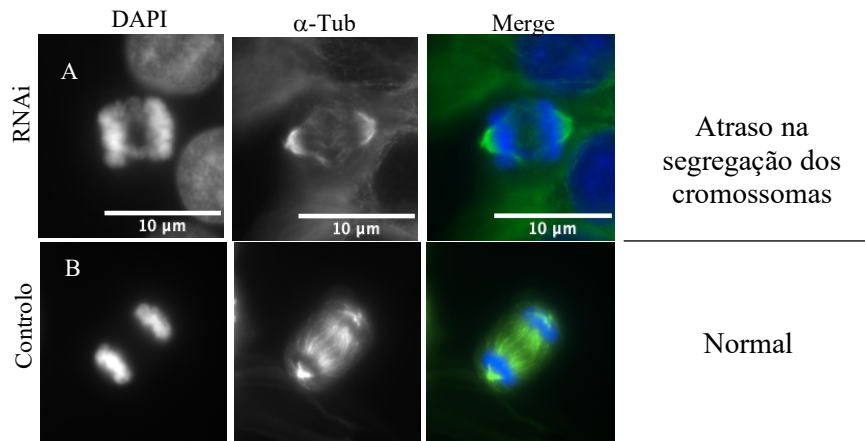
Este tipo de defeitos nos polos na célula é acompanhado muitas vezes por problemas no alinhamento cromossómico. Como observado na Figura IV. 10. é visível uma menor compactação dos cromossomas, tanto nas células que possuem os polos fragmentados, como nas células com fusos mono e multipolares. Estes três defeitos observados são classificados como anomalias do fuso mitótico e constituem cerca de 4 a 9% das células mitóticas analisadas (Figura VIII 4A, Anexo).

Em células metafásicas, os principais defeitos observados foram o desalinhamento cromossómico e representam cerca de 8 a 18% de células metafásicas analisadas (Figura VIII 4B, Anexo).



**Figura IV. 10. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Na coluna (A) é observado fragmentos de DNA fora da placa metafásica ao qual se designa de desalinhamento cromossómico. Em (B), (C) e (D) são observadas anormalidades no citoesqueleto onde em (B) é observado fusos multipolares com o dobro dos centróssomas, em (C) um fuso monopolar com metade dos centróssomas e em (D) uma má formação do fuso mitótico devido a uma fragmentação dos polos. Em (E) encontra-se o controlo referente a uma célula metafásica normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos.

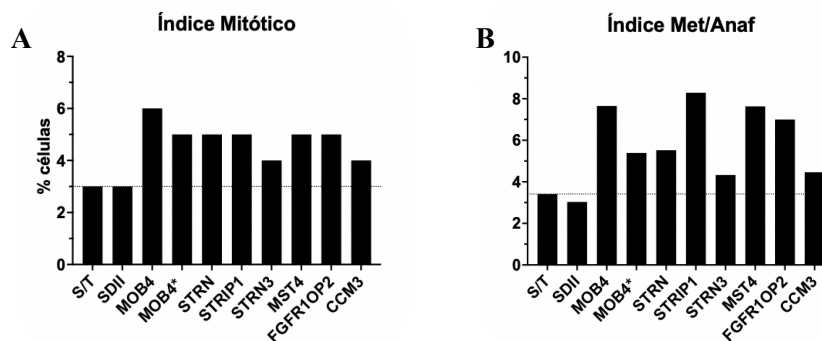
Em células anafásicas, os erros observados consistem, quase na sua totalidade, em erros na segregação dos cromossomas (Figura IV. 11). Considerou-se como um atraso na segregação dos cromossomas em todos os casos em que células pseudoanafásicas apresentavam um ou mais cromossomas mal ou não segregados. Este foi um dos defeitos mais observados em células mitóticas em anafase, com uma percentagem que varia entre os 8 a 26% (Figura VIII 4D, Anexo).



**Figura IV. 11. Defeito observado em células mitóticas em anafase após a depleção de vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Em (A) é observado um atraso na segregação dos cromossomas em anafase resultando numa incorreta segregação cromossômica. Em (B) encontra-se o controlo referente a uma célula em anafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos.

#### 4.3.1 A inibição da expressão de proteínas do complexo STRIPAK compromete o *checkpoint* na transição metafase/anafase

Para perceber se as proteínas do complexo STRIPAK são igualmente responsáveis por um bloqueio na transição metafase/anafase, é necessário fazer o cálculo do índice mitótico e do índice metafase/anafase de cada uma das condições analisada. Para tal, com recurso à microscopia de fluorescência, foi possível identificar e contabilizar o número de células interfásicas e mitóticas, e o número de células normais e com defeitos, em cada fase da mitose.



**Figura IV. 12. Índice Mitótico e Índice Metafase/Anafase de células HeLa após depleção dos vários componentes do complexo STRIPAK por RNAi.** Representação gráfica correspondente ao valor percentual do índice mitótico (A) e do índice metafase/anafase (B) para cada condição testada (MOB4, MOB4\*, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2 e CCM3), do controlo negativo (SD II) e do controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase e de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde á supressão da proteína pelo Oligo 19. Observa-se um aumento considerável quer do índice mitótico como do índice metafase/anafase em todas as condições testadas, comparativamente com as duas condições controlo. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada umas das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 3 e 4 em Anexos.

Enquanto que nas condições controlo as células não transfetadas (S/T) e as células transfetadas com o Oligo neutro (SD II) apresentam um índice mitótico na ordem dos 3%, nas condições teste as células transfetadas com os diferentes oligos para cada componente do complexo STRIPAK observou-se um aumento dos índices mitóticos na ordem dos 4-6%, sendo que o valor mínimo corresponde ao STRN3 e CCM3 e o valor máximo ao MOB4 transfetado com o Oligo 5 (Figura IV. 12A).

Deste modo, de acordo com estes resultados suportados pela análise das várias condições testadas, verifica-se que a depleção de diferentes proteínas que constituem o complexo STRIPAK, por RNAi, resulta num aumento do número de células em mitose. Este resultado sugere a ocorrência de algum tipo de erro durante o desenvolvimento mitótico que obriga a célula a parar o ciclo celular.

Através da razão entre o número total de metafases e o número total de anafases, foi calculado o índice metafase/anafase para as várias condições estando representados no Gráfico B da Figura IV. 12. Nas condições controlo foi calculado um índice metafase/anafase na ordem dos 3,0. Nas condições teste observou-se um aumento do índice metafase/anafase para a ordem dos 4-8, sendo que o valor mais baixo pertence ao STRN3 com um índice de 4,3 e o valor mais alto pertence ao STRIP1 com um valor de 8,3.

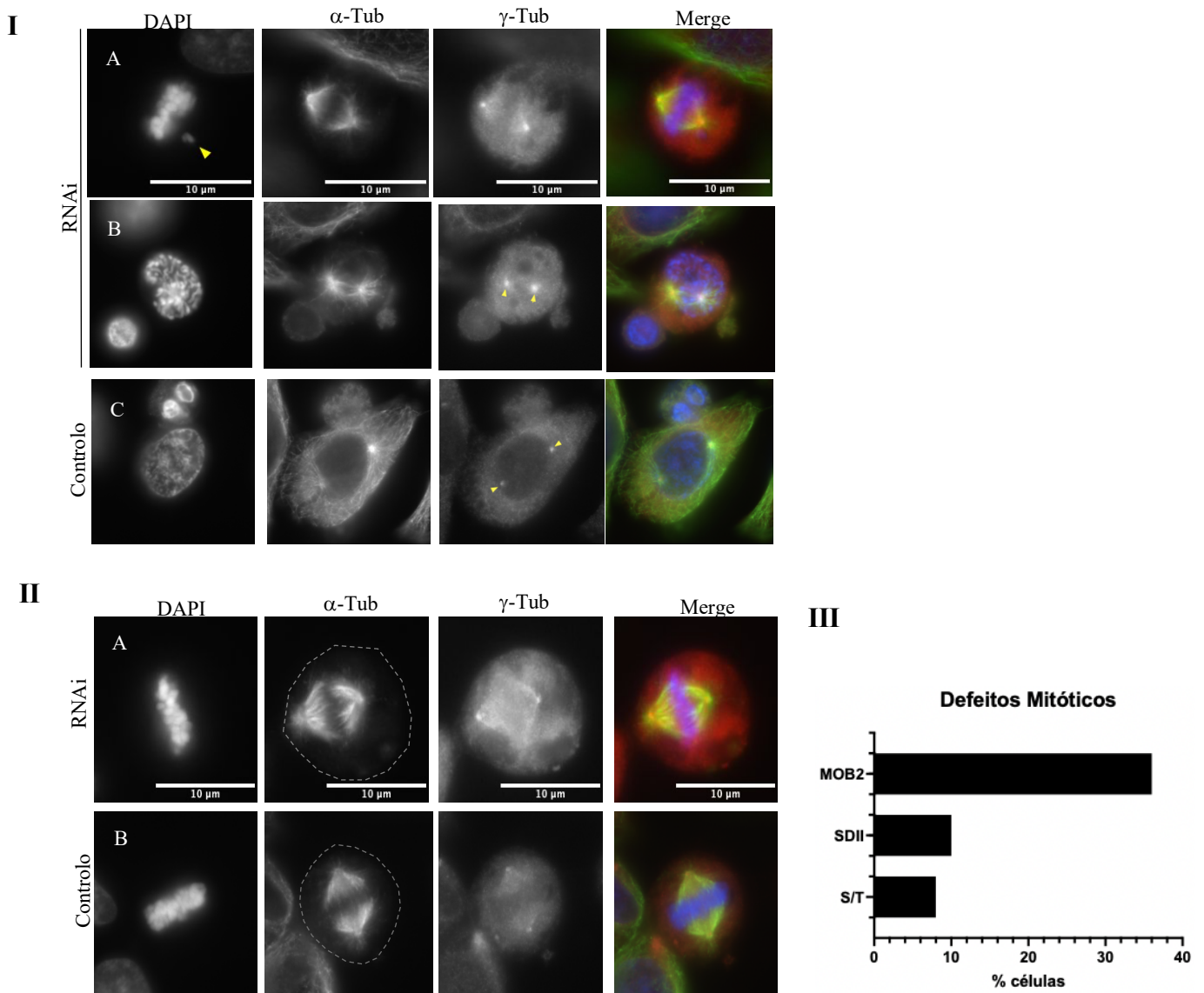
Com estes resultados é possível confirmar que a depleção por RNAi de diferentes proteínas, que constituem o complexo STRIPAK, resulta num aumento do índice metafase/anafase. Este aumento sugere, portanto, a ocorrência da ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anafase. Este erro pode ser o responsável pelo aumento do índice mitótico e está, de algum modo associado ao funcionamento do complexo STRIPAK como um todo e não à ação individual de um dos seus constituintes, especialmente do MOB4.

#### **4.4 Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB2 em células HeLa**

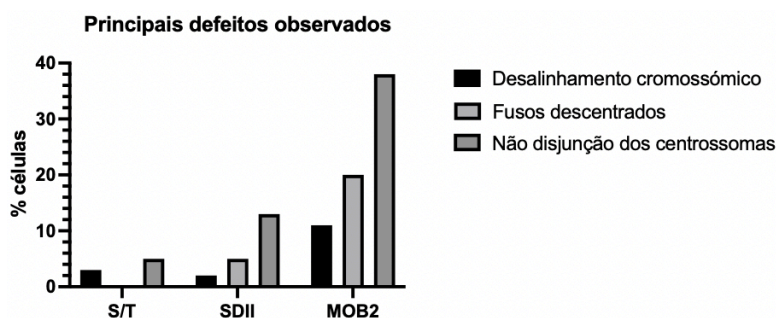
Outro projeto decorrente simultaneamente no laboratório é o estudo da proteína MOB2. No decurso deste trabalho tornou-se interessante, em paralelo com o trabalho inicial, estudar o MOB2 em mitose. Vários estudos referem que a proteína MOB2 interfere com o ciclo celular, estando envolvida na divisão dos centrossomas e apoptose. Estudos preliminares desenvolvidos no laboratório indicam que MOB2 é necessária para a correta execução da mitose em células HeLa, mais especificamente que a depleção desta proteína causa uma falha na montagem do fuso mitótico e que é necessária para a transição metafase/anafase (Cláudia Florindo, dados não publicados). No entanto, estes ensaios precisam de ser confirmados e ampliados. Assim, o objetivo deste trabalho complementar foca-se em descrever a função molecular da MOB2 em mitose e identificar e descrever a existência de fenótipo após deleção da MOB2 em células HeLa.

Para o estudo do MOB2 foi promovida a sua depleção em células HeLa, por RNAi e analisado os seus resultados por microscopia de fluorescência.

Concordante com os resultados preliminares no laboratório, após a depleção da proteína foram observados vários defeitos mitóticos essencialmente ao nível do fuso mitótico (Figura IV. 13. I e II). Num total de 200 células mitóticas analisadas, as células com depleção do MOB2 apresentavam 36% de defeitos mitóticos e as células controlo SD II e sem transfeção apresentavam um total de 10% e 8%, respetivamente (Figura IV. 13 III). Os principais defeitos mitóticos observados em células que sofreram depleção do MOB2 são a não disjunção dos centrossomas no início da mitose (Figura IV. 13. IB), com 38%, o segundo maior defeito encontrado foram os fusos mitóticos descentrados com 20% (Figura IV. 13. II) e por último o desalinhamento cromossómico com 11% (Figura IV. 13. IA). Os dados referidos encontram-se representados no Gráfico da Figura IV. 14. Para além destes defeitos, foram observados outros menos predominantes tais como células monopolares e multipolares em profase e metafase, a existência de pontes de DNA em anafase e telofase, e fusos mais pequenos em metafase.



**Figura IV. 13. Defeitos observados em células mitóticas após a depleção de MOB2 por RNAi.** **I.** Em (A) está sinalizado por uma seta amarela um fragmento de DNA fora da placa metafásica, ocorrendo desalinhamento cromossômico. Em (B), a marcação com  $\gamma$ -tubulina mostra-nos os dois centrosomas ainda juntos no início da mitose, em profase, enquanto que no controle (C), correspondente a uma célula em início de profase, os centrosomas já migraram para os polos da célula. **II.** Em (A) é possível observar fusos mitóticos descentrados da célula, em (B) encontra-se o controle referente a uma célula em metafase normal. A azul está representada a marcação com DAPI responsável pela visualização do DNA, a verde está representada a marcação com  $\alpha$ -tubulina, responsável pela visualização dos microtúbulos, e a vermelho está representado a marcação com  $\gamma$ -tubulina, responsável pela visualização dos centrosomas. **III.** Representação gráfica correspondente aos valores percentuais de células mitóticas defeituosas em cada uma das condições testadas. Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. Foi observado um aumento de defeitos mitóticos após depleção de MOB2 quando comparado com o controle negativo (SD II) e o controle não transfetado (S/T). Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 9A em Anexos.

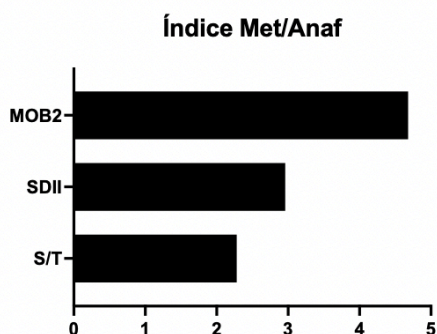


**Figura IV. 14. Representação gráfica dos principais defeitos observados em células mitóticas após depleção de MOB2 por RNAi em células HeLa.** O defeito predominante foi a não disjunção dos centríolos no início da mitose (38%), o segundo defeito mais observado foi a existência de fusos mitóticos descentrados da célula (20%) e por último o desalinhamento cromossômico (11%) em metafase. Valores obtidos das contagens realizadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através da microscopia de fluorescência. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 9B em Anexos.

Para além dos defeitos observados, foram calculados o índice mitótico e o índice metafase/anáfase de cada condição testada com o intuito de perceber se ocorreu a existência de bloqueios ou atrasos na progressão da mitose e a ocorrência de uma ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anáfase.

Nas condições controlo SD II, foi calculado um índice mitótico de 3,2%, e nas células não transfetadas 3,6%. No entanto na condição teste em que as células sofreram depleção do MOB2 foi calculado um índice mitótico de 4,8% (Tabela VIII. 8B, Anexos). Apesar de não ser uma variação muito significativa, este aumento pode indicar a existência de um bloqueio. Para tal foi calculado o índice metafase/anáfase para cada condição.

O índice metafase/anáfase das condições controlo, células sem transfeção e com o SDII, apresentaram um valor de 2,3 e 2,9 respetivamente. No entanto, sobressai a existência de um índice metafase/anáfase superior, de 4,7, em células submetidas à depleção de MOB2, que se encontra representado na Figura IV. 15. Este aumento, como já dito anteriormente, sugere a ocorrência de um bloqueio da célula no *checkpoint* mitótico na transição metafase/anáfase.



**Figura IV. 15. Índice Metafase/Anáfase após depleção de MOB2 por RNAi em células HeLa.** Representação gráfica correspondente ao valor do índice metafase/anáfase para a condição teste (MOB2), controlo negativo (SD II) e controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células que se encontravam em metafase e em anáfase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. Observa-se um aumento do índice metafase/anáfase na condição testada, comparativamente com as duas condições controlo. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas na Tabela VIII. 8A em Anexos.

Em suma, a depleção de MOB2 por RNAi em células HeLa resulta em alterações mitóticas significativas essencialmente ao nível do fuso mitótico, nomeadamente num aumento de fusos descentrados, falhas na separação dos centríolos e alinhamento em metafase. O índice mitótico e o índice metafase/anáfase também se encontram aumentados comparativamente ao controlo, concordante com os dados preliminares, o que revela ser indicativo de um bloqueio do *checkpoint* na transição metafase/anáfase.

## V. Discussão e Conclusão

### 5.1 MOB4 e STRIPAK

Uma das maneiras mais importantes de determinar a função de uma proteína é estudar a sua dinâmica intracelular. Dado que resultados preliminares, realizados pela técnica de imunofluorescência, demonstraram que MOB4 se localiza no Complexo de Golgi em Interfase e nos centrossomas em mitose, o presente estudo utilizando a proteína MOB4 em fusão com uma *tag* (GFP), e a sua posterior confirmação com a marcação com Giantina, mostra que a proteína MOB4 se localiza no Complexo de Golgi em Interfase, confirmando os resultados obtidos anteriormente, sugerindo que este possa apresentar uma função estrutural ou até mesmo esteja envolvido no transporte de vesículas. Foram também utilizadas drogas com o intuito de aumentar o índice mitótico e drogas inibidoras de microtúbulos com o intuito de perceber se MOB4 necessitaria destas estruturas para se deslocar para os centrossomas. No entanto, em mitose não foi observada uma localização específica nos cinetocóros e/ou centrossomas, como descrito em *Drosophila* [35], nem concluído relativamente à sua dependência da deslocação pelos microtúbulos. Tal pode ser explicado devido ao método utilizado para a realização do estudo da dinâmica intracelular da proteína, ou simplesmente por esta não apresentar uma localização específica em mitose. Nesta primeira parte do trabalho verificámos que duas técnicas distintas, a utilização de anticorpos por imunofluorescência e a utilização de uma proteína de fusão MOB4 ligada a GFP, apresentam resultados semelhantes, confirmando, portanto, os primeiros resultados obtidos.

Outra questão fundamental relativamente à MOB4 reside-se quanto à sua universalidade. Uma vez que os dados preliminares foram realizados em células HeLa, um tipo de célula aneuploide tumoral, um aspeto importante relativamente a esta proteína seria perceber se os defeitos mitóticos observados e o bloqueio no *checkpoint* são específicos desta linha celular ou apresenta um papel universal. Para estudar a universalidade da sua função foi analisado o seu efeito em duas linhas celulares distintas, as HCT116, células diploides tumorais, e células hTERT-RPE1, células diploides não tumorais imortalizadas do pigmento da retina pela técnica de RNAi e foi feita a sua análise por microscopia de fluorescência.

Defeitos mitóticos semelhantes àqueles observados em células HeLa foram observados para as células HCT116, mais precisamente o desalinhamento cromossómico em metafase, problemas ao nível do fuso mitótico como fusos monopolares e fusos monopolares sem a disjunção dos polos, e pontes de DNA em anafase. Dado a observação destes fenótipos, podemos inferir que a remoção de MOB4 em células HCT116 poderá afetar de igual maneira a ligação cinetocóros-microtúbulos tal como aparenta afetar nas células HeLa. No entanto, não foi observado um aumento significativo no índice mitótico nem no índice metafase/anafase, indicando a não existência de um bloqueio na transição metafase/anafase. Desta maneira deduzimos que a perda de MOB4 não aparenta promover um bloqueio no *checkpoint* na transição metafase/anafase para as células HCT116 como mostra para as células HeLa. Relativamente às células hTERT-RPE1 apenas foi possível a análise dos níveis de expressão da proteína ao longo do tempo, que nos dizem que, de acordo com o protocolo de RNAi estipulado, não ocorre a depleção da proteína. Este resultado pode ter sido fruto de um protocolo não eficaz para esta linha celular ou devido à grande estabilidade da proteína na célula.

Deste modo, podemos concluir que a proteína MOB4 demonstra apresentar funções semelhantes em mitose tanto em células aneuploides tumorais, tais como as HeLa, como em células diploides tumorais como em HCT116. Ainda que não tenha sido possível a análise da proteína em células não tumorais como as hTERT-RPE-1, concluímos que a ação mitótica da MOB4 não é específica de uma linha celular.

Como mencionado anteriormente, sabe-se que a depleção de MOB4, em células HeLa, provoca defeitos no alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e um bloqueio da célula em prometáfase, prosseguindo posteriormente para apoptose, indicando a ocorrência de um bloqueio da célula no

*checkpoint* mitótico. Com isto, e sabendo que a MOB4 é um membro do complexo STRIPAK, questionou-se se os defeitos observados e o bloqueio no *checkpoint* mitótico serão induzidos pela depleção específica de MOB4, da depleção do complexo STRIPAK como um todo, ou de componentes individuais do complexo STRIPAK. Para respondermos a essa pergunta, foi feito um silenciamento de genes pela técnica de RNAi de sete componentes pertencentes ao complexo STRIPAK, entre eles o MOB4, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR1OP2 e CCM3, e posteriormente por análise de microscopia de fluorescência observou-se os seus defeitos e fez-se o cálculo dos índices mitóticos e metafase/anáfase. Respondendo à primeira questão proposta, foram observados uma variedade de defeitos ao nível da célula, não só em mitose como interfase após a depleção dos componentes do complexo STRIPAK. Os principais defeitos visualizados em células em interfase resumiam-se na presença de micronúcleos e de pontes de DNA entre duas células. Dos dois defeitos, o mais predominante foram as micronucleações. O aumento do número deste defeito após a depleção das proteínas do complexo STRIPAK pode ser indicativo de uma falha no processo mitótico, especificamente na má segregação cromossômica, na quebra cromossômica dicêntrica ou instabilidade cromossômica [62, 63]. Relativamente aos defeitos mitóticos encontrados, foram observadas anomalias quer ao nível da segregação cromossômica como ao nível do fuso mitótico, erros estes semelhantes aos encontradas aquando depleção da MOB4. Entre os defeitos observados, os mais comuns foram o desalinhamento cromossômico em metafase, o atraso na segregação cromossômica em anáfase, e problemas no fuso mitótico nomeadamente células com o fuso monopolar, multipolar e com os polos fragmentados. Todas as células que mostravam defeitos com a depleção dos componentes do complexo STRIPAK apresentavam, em geral, percentagens superiores aos controlos sem a depleção dos componentes, o que aparenta indicar que os defeitos mitóticos observados para a depleção do MOB4 não se devem exclusivamente ao silenciamento da proteína em si, mas sim porque esta está inserida no complexo STRIPAK e é este que aparenta possuir um papel em mitose.

O índice mitótico é um parâmetro indicativo da percentagem de células que se encontra em mitose, numa dada população celular. Foi observado um aumento desse parâmetro nas condições testadas para as várias proteínas do complexo STRIPAK, comparativamente com as condições controlo, em células HeLa. Estes resultados indicam que a depleção das proteínas do complexo STRIPAK induz um aumento do número de células em mitose. Dado este resultado e sabendo que a ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anáfase pode induzir um bloqueio do ciclo celular, fomos perceber se o índice mitótico se encontra aumentado devido ao bloqueio da célula no *checkpoint* mitótico. Para tal foi calculado o índice metafase/anáfase das mesmas amostras.

O índice metafase/anáfase é uma razão utilizada para perceber a proporção de células que se encontram em metafase comparativamente com as que se encontram em anáfase. Foi observado que a depleção das mesmas proteínas induz um aumento do índice metafase/anáfase, comparativamente às células controlo, indicando que existe de facto um aumento no número de células em metafase comparativamente com as células em anáfase e confirmam que o aumento do índice mitótico se deve a um bloqueio no *checkpoint* celular.

Ambos os resultados obtidos quer do índice mitótico quer do índice metafase/anáfase suportam os resultados preliminares e a hipótese de que a depleção de MOB4 é necessária para a correta progressão mitótica, e que erros durante o seu desenvolvimento promovem o retardamento das células em metafase, demonstrando uma ativação do *checkpoint* mitótico. No entanto, verifica-se também que esta não é uma função exclusiva de MOB4, mas sim das várias proteínas que integram e interagem com o complexo STRIPAK. Assim, podemos formular uma nova hipótese que nos diz que os defeitos mitóticos observados e a consequente ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anáfase, provocada por erros no desalinhamento cromossômico em metafase, é uma função específica do complexo STRIPAK e não exclusivamente da proteína MOB4.

Estes resultados são originais, não estando, portanto, descritos que o complexo STRIPAK afeta de alguma maneira o desenvolvimento da mitose. Resultados idênticos foram posteriormente obtidos no nosso laboratório por Inês Baião, comprovando a veracidade dos mesmos.

Como já referido, defeitos em proteínas estruturais ou reguladoras do cinetocóro causam graves defeitos mitóticos no alinhamento cromossômico, na formação estável de ligações cinetocóro-microtúbulo (fibras K), na bi-orientação do cinetocóro e na segregação cromossômica. [66, 69]. No *checkpoint* mitótico, quando existem cinetocóros não ligados, as proteínas detetam a falta de tensão e/ou a falta de fibras K e geram um sinal que atrasa a segregação até que todos os cromossomas estejam alinhados corretamente. Para gerar tensão, o comportamento dinâmico das fibras K deve estar dentro de limites permissíveis, que simultaneamente permitem um nível de estabilidade suficiente para manter as ligações entre os cromossomas e microtúbulos e um grau de instabilidade que permite a correção de erros necessária para a segregação precisa dos cromossomas [68].

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a regulação negativa de vários componentes do complexo STRIPAK, incluindo o MOB4, causam fortes defeitos no alinhamento cromossômico e um bloqueio mitótico na transição metafase/anáfase. O fenótipo observado e a ocorrência do bloqueio poderão estar associados à dinâmica dos microtúbulos, à incapacidade de montar adequadamente os cinetocóros ou a uma alteração na ligação cinetocóro-microtúbulo. Estas hipóteses são apoiadas pela observação de que na ausência de MOB4, a CENP-A não se acumula nos centrómeros, possivelmente promovendo instabilidade na montagem dos cinetocóros. Com isto, resultam de várias perguntas: Qual é o papel molecular do MOB4 e do STRIPAK na estrutura do cinetocóro? Estão envolvidos na manutenção epigenética dos centrómeros? São um regulador chave das vias de sinalização que promovem a transição metafase-anáfase? Sabendo agora o impacto do complexo STRIPAK no desenvolvimento mitótico, a continuação deste estudo poderá ajudar a responder a tais questões.

## 5.2 MOB2

De acordo com os dados não publicados do laboratório, acredita-se que MOB2 esteja envolvido na progressão da mitose. Esses estudos mostraram que após a depleção de MOB2 são observados vários defeitos mitóticos essencialmente ao nível do fuso mitótico. Esta última parte do trabalho foca-se no estudo da proteína MOB2 com o objetivo em descrever a função molecular da MOB2 em mitose, mais especificamente identificar e descrever a existência de fenótipo após deleção da MOB2 em células HeLa. Para tal, começámos por fazer um silenciamento da proteína pela técnica de RNAi e analisámos o seu fenótipo por microscopia de fluorescência.

De acordo com os dados obtidos, de 200 células mitóticas analisadas, 36% possuem defeitos mitóticos após depleção do MOB2, enquanto os controlos apresentavam 8% e 10%. Dentro desses defeitos observados, destacaram-se a não-disjunção dos centrómeros no início da mitose, a existência de fusos mitóticos descentrados da célula e o desalinhamento cromossômico em metafase. Uma vez que a formação do fuso mitótico é iniciada a partir dos centrómeros, ainda que esta não seja uma via exclusiva [44, 64], é então expectável que grande parte das alterações sejam observadas neste. No entanto, também foram observadas alterações em metafase, nomeadamente o desalinhamento dos cromossomas, possivelmente justificadas pelas disfunções identificadas a nível dos centrómeros e fusos mitóticos.

Além disso foi observado que a supressão da MOB2 promove um aumento do índice mitótico e do índice metafase/anáfase, corroborando os dados obtidos nos estudos preliminares. Como já explicado anteriormente, esse aumento pode indicar um bloqueio ou atraso na mitose, compatível com a afirmação de que o MOB2 provoca uma paragem ou atraso na transição entre estas duas fases.

Estas alterações observadas confirmam o fenótipo identificado inicialmente, em que há referência a múltiplos defeitos no fuso mitótico. Assim, a partir destes resultados podemos afirmar que a MOB2 interfere com a dinâmica dos centrossomas. Além disso, verifica-se igualmente a sua influência na formação do fuso mitótico, podendo esta estar relacionada, ou não, com as alterações induzidas na disjunção dos centrossomas durante a mitose e no desalinhamento cromossômico.

Os defeitos mitóticos observados após depleção de proteínas da família MOB dão-nos informações sobre as suas possíveis funções na célula, mostrando que são necessárias para o correto desenvolvimento mitótico. Neste trabalho, um dos defeitos recorrentemente observados foram erros no alinhamento e segregação cromossômica, possivelmente explicados por problemas na estabilidade da ligação cinetocóro-microtúbulo. Erros como este poderão promover o aumento da frequência de ganho ou perda de cromossomas inteiros, a forma mais comum de instabilidade cromossômica em tumores humanos [79]. Deste modo, o estudo das proteínas desta família em mitose vem-se a mostrar de elevada importância para um maior aprofundamento dos conhecimentos, culminando, desta forma, com grandes avanços científicos e, conseqüentemente, com importantes avanços clínicos, úteis à evolução da sociedade.

## VI. Perspetivas Futuras

### 6.1 MOB4 e STRIPAK

Uma vez que não foi possível a continuação do estudo da proteína MOB4 em células HCT116 e hTERT-RPE1, o próximo passo relativamente a esta parte do trabalho seria a repetição das experiências com as células HCT116 de modo a confirmar os resultados obtidos, em particular a análise do índice metafase/anáfase que, neste trabalho, sugeria não haver bloqueio na transição metafase/anáfase e a confirmação dos defeitos observados, dado que os controlos também apresentavam uma percentagem elevada de defeitos. Relativamente às células hTERT-RPE1 o próximo passo seria otimizar o protocolo de RNAi para que seja conseguida a depleção da MOB4 necessária para a análise do seu fenótipo por microscopia de fluorescência. Além disso, é extremamente necessário arranjar uma alternativa para os problemas de fixação e aderência das células à lamela de vidro. Uma das soluções poderá ser os ensaios de microscopia em tempo real observando a dinâmica intracelular da proteína ao longo do processo mitótico. Estes ensaios iriam não só permitir a observação de defeitos em mitose como a existência de bloqueios em *checkpoints*.

Relativamente à análise dos fenótipos mitóticos em células HeLa após depleção de vários componentes do complexo STRIPAK, dado que esta experiência foi realizada apenas uma vez, apesar de posteriormente confirmada, seria essencial garantir a veracidade dos dados obtidos ao repetir as mesmas experiências com as mesmas condições, de modo a adquirir maior robustez estatística. Além do mais, seria interessante testar outras proteínas que pertençam e interajam com o complexo STRIPAK e comparar os resultados obtidos com as proteínas já estudadas. Para garantir o sucesso do silenciamento de genes pela técnica de RNAi nas células HeLa podem realizar-se *Western Blots* para a análise dos níveis de expressão da proteína presente nas células, ou RT-PCRs, para a análise dos níveis de mRNA. Idealmente cada proteína alvo deveria ser tratada com mais do que um oligonucleótido de modo a excluir possíveis efeitos inespecíficos como causa dos defeitos observados. Por último, para testar a hipótese de que a ativação do *checkpoint* mitótico na transição metafase/anáfase é uma função específica do complexo STRIPAK, deverão fazer-se ensaios de microscopia em tempo real em cada proteína analisada e confirmar o bloqueio da célula em mitose através da ativação do *checkpoint* mitótico.

Por último, dado que os resultados preliminares sugerem que o MOB4 parece afetar os cinetocóros através da proteína centromérica CENP-A, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho que nos

mostram que os defeitos mitóticos e o bloqueio na transição metafase/anáfase ocorre devido a falhas no complexo STRIPAK, seria interessante estudar se este complexo afetaria a CENP-A da mesma maneira.

## 6.2 MOB2

Relativamente ao projeto MOB2, dado que a experiência foi apenas realizada uma vez, seria essencial a repetição dos estudos realizados de modo a corroborar os dados obtidos. Para confirmar a depleção da proteína na célula por RNAi, deverá ser realizado *Western Blot* contra a proteína.

Adicionalmente, o próximo passo da experiência seria determinar a função da MOB2 na separação dos centrossomas e perceber se esta é importante para o processo. Uma vez que há uma forte evidência de que a ausência de expressão de MOB2 provoca problemas na separação dos centrossomas, estes resultados permitem-nos especular duas hipóteses: ou a ausência de MOB2 faz com que os centrossomas não se separem, ou há separação dos centrossomas, seguido de um colapso. Para respondermos a tal questão, procederíamos ao tratamento das células com STLC (*S-trityl-L-cysteine*), um inibidor reversível da proteína motora Eg5, essencial para a separação dos centrossomas [65]. A droga tem como efeito bloquear as células em profase, mantendo os dois centrossomas juntos e a sua lavagem permite a migração dos centrossomas para os polos da célula. Desta maneira, se tratarmos as células com esta droga e simultaneamente fizermos o RNAi, conseguiríamos perceber se o fuso mitótico se formaria ou não com a mesma dinâmica. Por outro lado, poderia ser utilizada microscopia em tempo real de modo a seguir a dinâmica dos centrossomas na célula após a depleção da MOB2.

Tendo em conta os dados preliminares também seria essencial estudar a sua dinâmica intracelular durante o ciclo celular utilizando técnicas de imunofluorescência e fluorescência com a proteína de fusão MOB2::GFP e GFP::MOB2, o que nos ajudaria a perceber a sua função na célula.

## VII. Referências Bibliográficas

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- [2] Fior, R., & Zilhão, R. (2019). Molecular and cell biology of Cancer - When Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet. In *Cellular and Molecular Biology of Metals*. 53-60
- [3] Tolić, I. M. (2018). Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. In *European Biophysics Journal* (Vol. 47, Issue 3, pp. 191–203). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1244-4>
- [4] Westhorpe, F. G., & Straight, A. F. (2015). The centromere: Epigenetic control of chromosome segregation during mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015818>
- [5] Carroll, C. W., & Straight, A. F. (2007). Centromeric chromatin gets loaded. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 176, Issue 6, pp. 735–736). <https://doi.org/10.1083/jcb.200702020>
- [6] Jansen, L. E. T., Black, B. E., Foltz, D. R., & Cleveland, D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *Journal of Cell Biology*, 176(6), 795–805. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701066>
- [7] Chow, A., Hao, Y., & Yang, X. (2010). Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *International Journal of Cancer*, 126(9), 2079–2089. <https://doi.org/10.1002/ijc.24878>
- [8] Hergovich, A. (2011). MOB control: Reviewing a conserved family of kinase regulators. In *Cellular Signalling* (Vol. 23, Issue 9, pp. 1433–1440). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.007>
- [9] Luca, F. C., & Winey, M. (1998). MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Molecular biology of the cell*, 9(1), 29–46. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.1.29>

- [10] Moreno, C. S., Lane, W. S., & Pallas, D. C. (2001). A Mammalian Homolog of Yeast MOB1 is Both a Member and a Putative Substrate of Striatin Family-Protein Phosphatase 2A Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24253–24260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102398200>
- [11] Lai, Z. C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbach, M., Nikolaidis, N., Ho, L. L., & Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, 120(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.036>
- [12] He, Y., Emoto, K., Fang, X., Ren, N., Tian, X., Jan, Y. N., & Adler, P. N. (2005). Drosophila Mob family proteins interact with the related tricorned (Trc) and warts (Wts) kinases. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9), 4139–4152. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0018>
- [13] Duhart, J. C., & Rafferty, L. A. (2020). Mob Family Proteins: Regulatory Partners in Hippo and Hippo-Like Intracellular Signaling Pathways. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00161>
- [14] Gundogdu, & Hergovich. (2019). MOB (Mps one Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer. *Cells*, 8(6), 569. <https://doi.org/10.3390/cells8060569>
- [15] Shimizu, T., Ho, L. L., & Lai, Z. C. (2008). The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in Drosophila. *Genetics*, 178(2), 957–965. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081570>
- [16] Florindo, C., Perdigão, J., Fesquet, D., Schiebel, E., Pines, J., & Tavares, A. A. (n.d.). Human Mob1 proteins are required for cytokinesis by controlling microtubule stability. <https://doi.org/10.1242/jcs.097147i>
- [17] Tavares, A., Gonçalves, J., Florindo, C., Tavares, Á. A., & Soares, H. (2012). Mob1: Defining cell polarity for proper cell division. *Journal of Cell Science*, 125(2), 516–527. <https://doi.org/10.1242/jcs.096610>
- [18] Foltz, D. R., Jansen, L. E. T., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R., & Cleveland, D. W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature Cell Biology*, 8(5), 458–469. <https://doi.org/10.1038/ncb1397>
- [19] Kixmoeller, K., Allu, P. K., & Black, B. E. (2020). The centromere comes into focus: from CENP-A nucleosomes to kinetochore connections with the spindle. *Open Biology*, 10(6), 200051. <https://doi.org/10.1098/rsob.200051>
- [20] Gundogdu, R., Erdogan, M. K., Ditsiou, A., Spanswick, V., Garcia-Gomez, J. J., Hartley, J. A., Esashi, F., Hergovich, A., & Gomez, V. (2021). hMOB2 deficiency impairs homologous recombination-mediated DNA repair and sensitises cancer cells to PARP inhibitors. *Cellular Signalling*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110106>
- [21] Sung Jun Bae, Lisheng Ni, Adam Osinski, Diana R Tomchick, Chad A Brautigam, Xuelian Luo (2017) SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK eLife 6:e30278 <https://doi.org/10.7554/eLife.30278>
- [22] Jansen, L. E., Black, B. E., Foltz, D. R., & Cleveland, D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *The Journal of cell biology*, 176(6), 795–805. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701066>
- [23] Bailly, Y. J. R., & Castets, F. (2007). Phocein: A potential actor in vesicular trafficking at Purkinje cell dendritic spines. *Cerebellum*, 6(4), 344–352. <https://doi.org/10.1080/14734220701225912>
- [24] Bailla, G., Gaillard, S., Castet, F., & Monneron, A. (2002). Interactions of phocein with nucleoside-diphosphate kinase, Eps15, and dynamin I. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18961–18966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108818200>
- [25] Baillat, G., Moqrish, A., Castets, F., Baude, A., Bailly, Y., Benmerah, A., & Monneron, A. (2001). Molecular Cloning and Characterization of Phocein, a Protein Found from the Golgi Complex to Dendritic Spines. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).

- [26] Schulte, J., Sepp, K. J., Jorquera, R. A., Wu, C., Song, Y., Hong, P., & Troy Littleton, J. (2010). DMob4/Phocein regulates synapse formation, axonal transport, and microtubule organization. *Journal of Neuroscience*, 30(15), 5189–5203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5823-09.2010>
- [27] Chen, M., Zhang, H., Shi, Z., Li, Y., Zhang, X., Gao, Z., Zhou, L., Ma, J., Xu, Q., Guan, J., Cheng, Y., Jiao, S., & Zhou, Z. (2018). The MST4-MOB4 complex disrupts the MST1-MOB1 complex in the Hippo-YAP pathway and plays a pro-oncogenic role in pancreatic cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 293(37), 14455–14469. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003279>
- [28] Duhart, J. C., & Raftery, L. A. (2020). Mob Family Proteins: Regulatory Partners in Hippo and Hippo-Like Intracellular Signaling Pathways. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00161>
- [29] Wood, K. W., Sakowicz, R., Goldstein, L. S., & Cleveland, D. W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, 91(3), 357–366. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80419-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80419-5)
- [30] Tanudji, M., Shoemaker, J., L'Italien, L., Russell, L., Chin, G., & Schebye, X. M. (2004). Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Molecular Biology of the Cell*, 15(8), 3771–3781. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0482>
- [31] Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F., & Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic *checkpoint*. In *NATURE CELL BIOLOGY* (Vol. 2). [www.nature.com/ncb](http://www.nature.com/ncb)
- [32] Ardestani, A., & Maedler, K. (2020). STRIPAK Is a Regulatory Hub Initiating Hippo Signaling. *Trends in biochemical sciences*, 45(4), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.01.005>
- [33] Hergovich A. (2017) Hippo Signaling in Mitosis: An Updated View in Light of the MEN Pathway. In: Monje-Casas F., Queralt E. (eds) *The Mitotic Exit Network*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1505. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_19)
- [34] Bae, S. J., Ni, L., & Luo, X. (2020). STK25 suppresses hippo signaling by regulating SAV1-STRIPAK antagonism. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.54863>
- [35] Trammell, M. A., Mahoney, N. M., Agard, D. A., & Vale, R. D. (2008). Mob4 plays a role in spindle focusing in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Cell Science*, 121(8), 1284–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.017210>
- [36] Kohler, R. S., Schmitz, D., Cornils, H., Hemmings, B. A., & Hergovich, A. (2010). Differential NDR/LATS Interactions with the Human MOB Family Reveal a Negative Role for Human MOB2 in the Regulation of Human NDR Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 30(18), 4507–4520. <https://doi.org/10.1128/mcb.00150-10>
- [37] Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M., & Hergovich, A. (2015). Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cellular Signalling*, 27(2), 326–339. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.016>
- [38] Delgado, I. L. S., Carmona, B., Nolasco, S., Santos, D., Leitão, A., & Soares, H. (2020). Mob: Pivotal conserved proteins in cytokinesis, cell architecture and tissue homeostasis. In *Biology* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1–35). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology9120413>
- [39] Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by *checkpoints*. *Methods in Molecular Biology*, 1170, 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2)
- [40] Wenzel, E. S., & Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle *checkpoints* and aneuploidy on the path to cancer. In *In Vivo* (Vol. 32, Issue 1, pp. 1–5). International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/invivo.11197>
- [41] Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly *checkpoint*. In *Current Biology* (Vol. 22, Issue 22). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>

- [42] Hoffmann, I. (2021). Centrosomes in mitotic spindle assembly and orientation. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 66, pp. 193–198). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.11.003>
- [43] Schatten, H. (2008). The mammalian centrosome and its functional significance. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 129, Issue 6, pp. 667–686). <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0427-6>
- [44] Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., & Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*, 382(6590), 420–425. <https://doi.org/10.1038/382420a0>
- [45] Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2009). MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Current biology : CB*, 19(8), 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.054>
- [46] Fonseca, C. (2011). Caracterização da função do gene MOB2 de *Drosophila melanogaster* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Algarve, Faro.
- [47] Liu, L.Y.; Lin, C.H.; Fan, S.S. Function of *Drosophila* mob2 in photoreceptor morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 2009, 338, 377–389.
- [48] Campbell, M.; Ganetzky, B. Identification of Mob2, a novel regulator of larval neuromuscular junction morphology, in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2013, 195, 915–926.
- [49] Kück, U., Radchenko, D., & Teichert, I. (2019). STRIPAK, a highly conserved signaling complex, controls multiple eukaryotic cellular and developmental processes and is linked with human diseases. *Biological chemistry*, /j/bchm.ahead-of-print/hsz-2019-0173/hsz-2019-0173.xml. Advance online publication. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0173>
- [50] Hwang, J., & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 47, 118–148. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.021>
- [51] Shi, Z., Jiao, S., & Zhou, Z. (2016). STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. In *Oncogene* (Vol. 35, Issue 35, pp. 4549–4557). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.9>
- [52] Nordzike, S., Zobel, T., Fränzel, B., Wolters, D. A., Kück, U., & Teichert, I. (2015). A fungal sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) homolog plays a fundamental role in development and localizes to the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Eukaryotic cell*, 14(4), 345–358. <https://doi.org/10.1128/EC.00241-14>
- [53] Elramli, N., Karahoda, B., Sarikaya-Bayram, Ö., Frawley, D., Ulas, M., Oakley, C. E., Oakley, B. R., Seiler, S., & Bayram, Ö. (2019). Assembly of a heptameric STRIPAK complex is required for coordination of light-dependent multicellular fungal development with secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS genetics*, 15(3), e1008053. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008053>
- [54] The Human Protein Atlas. MOB4. Consultado em Junho 2022. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115540-MOB4/pathology>
- [55] ATCC. HCT 116. Consultado em Julho 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-247>
- [56] ATCC. hTERT RPE-1. Consultado em Julho 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-4000>
- [57] Naushin L. Hindul, Amarjot Jhita, Daiana G. Oprea, Tasnim Alamgir Hussain, Oksana Gonchar, Miguel Angel Muro Campillo, Laura O'Regan, Masato T. Kanemaki, Andrew M. Fry, Kouji Hirota, Kayoko Tanaka; Construction of a human hTERT RPE-1 cell line with inducible Cre for editing of endogenous genes. *Biol Open* 15 February 2022; 11 (2): bio059056. doi: <https://doi.org/10.1242/bio.059056>
- [58] Im, K., Mareninov, S., Diaz, M., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 299–311. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26)

- [59] Rieder, C. L., Wilson, L., & Matsudaira, P. T. (1998). *Mitosis and Meiosis Part A* (C. L. Rieder, Ed.; Academic Press, Vol. 61).
- [60] Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2006). Insights into the kinetics of siRNAi-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic acids research*, *34*(1), 322–333. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj439>
- [61] Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494–498 (2001). <https://doi.org/10.1038/35078107>
- [62] Gisselsson D. (2008). Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma*, *117*(6), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0169-1>
- [63] Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International journal of molecular sciences*, *21*(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- [64] Forth, S., & Kapoor, T. M. (2017). The mechanics of microtubule networks in cell division. *The Journal of cell biology*, *216*(6), 1525–1531. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612064>
- [65] Skoufias, D. A., DeBonis, S., Saoudi, Y., Lebeau, L., Crevel, I., Cross, R., Wade, R. H., Hackney, D., & Kozielski, F. (2006). S-trityl-L-cysteine is a reversible, tight binding inhibitor of the human kinesin Eg5 that specifically blocks mitotic progression. *The Journal of biological chemistry*, *281*(26), 17559–17569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511735200>
- [66] Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly *checkpoint* in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*(5), 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrm2163>
- [67] Foley, E. A., Maldonado, M., & Kapoor, T. M. (2011). Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nature cell biology*, *13*(10), 1265–1271. <https://doi.org/10.1038/ncb2327>
- [68] Bakhoun, S. F., & Compton, D. A. (2012). Kinetochores and disease: keeping microtubule dynamics in check!. *Current opinion in cell biology*, *24*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.012>
- [69] Tanaka T. U. (2010). Kinetochores-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *The EMBO journal*, *29*(24), 4070–4082. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.294>
- [70] Frost, A., Elgort, M. G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S. R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M. Y., Poser, I., Mann, M., Hyman, A. A., & Weissman, J. S. (2012). Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell*, *149*(6), 1339–1352. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.028>
- [71] Sütterlin, C., & Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of cell biology*, *188*(5), 621–628. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910001>
- [72] Liu, M., Ran, J., & Zhou, J. (2018). Non-canonical functions of the mitotic kinesin Eg5. *Thoracic cancer*, *9*(8), 904–910. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12792>
- [73] Kean, M. J., Ceccarelli, D. F., Goudreault, M., Sanches, M., Tate, S., Larsen, B., Gibson, L. C., Derry, W. B., Scott, I. C., Pelletier, L., Baillie, G. S., Sicheri, F., & Gingras, A. C. (2011). Structure-function analysis of core STRIPAK Proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization. *The Journal of biological chemistry*, *286*(28), 25065–25075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214486>
- [74] Gordon, J., Hwang, J., Carrier, K.J. *et al.* Protein phosphatase 2a (PP2A) binds within the oligomerization domain of striatin and regulates the phosphorylation and activation of the mammalian Ste20-Like kinase Mst3. *BMC Biochem* *12*, 54 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-54>
- [75] Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B., & Gingras, A. C. (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3)

protein. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8(1), 157–171. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800266-MCP200>

[76] Hergovich, A., Kohler, R. S., Schmitz, D., Vichalkovski, A., Cornils, H., & Hemmings, B. A. (2009). The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Current biology : CB*, 19(20), 1692–1702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.020>

[77] Xie, R., Wen, F., & Qin, Y. (2020). The Dysregulation and Prognostic Analysis of STRIPAK Complex Across Cancers. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 625. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00625>

[78] ATTC. HeLa. Consultado em Agosto 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

[79] Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>

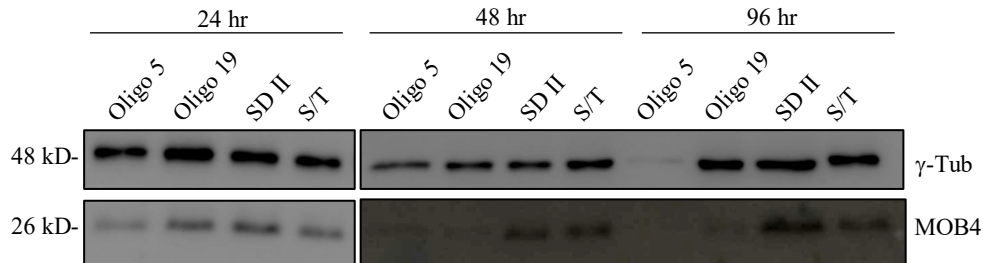
[80] Laisne, M. C., Michallet, S., & Lafanechère, L. (2021). Characterization of microtubule destabilizing drugs: A quantitative cell-based assay that bridges the gap between tubulin based- and cytotoxicity assays. *Cancers*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/cancers13205226>

[81] Han, Y. H., Moon, H. J., You, B. R., & Park, W. H. (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncology reports*, 22(1), 215–221.

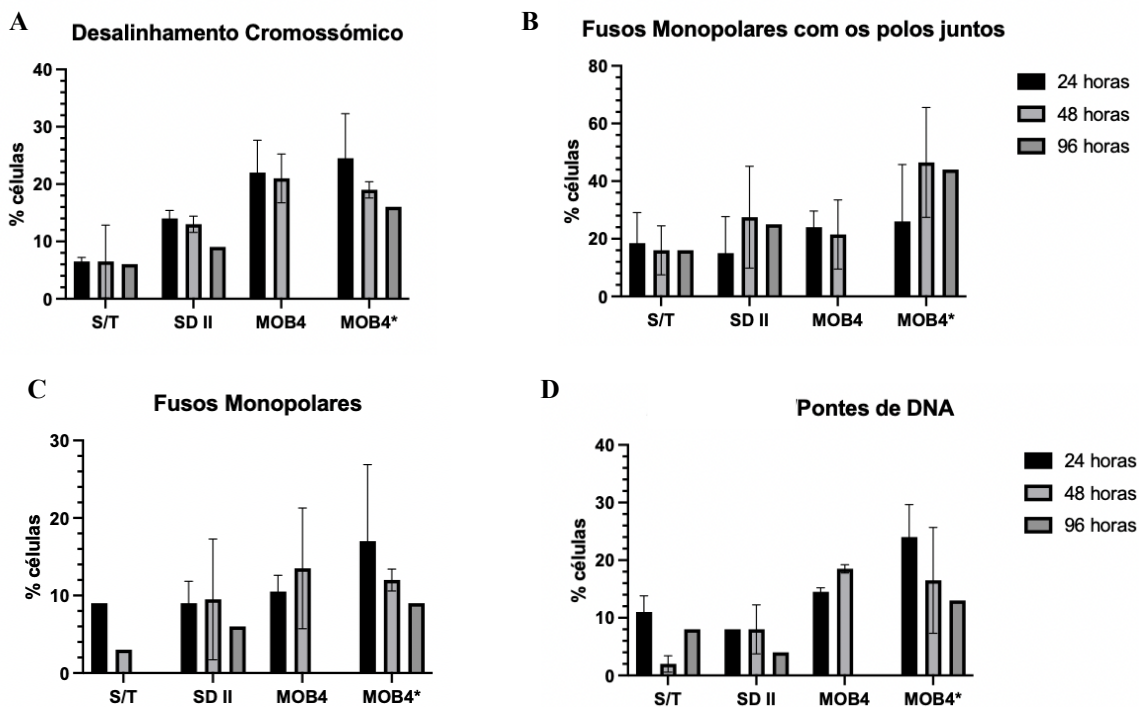
## VIII. Anexos

### 8.1 Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB4 em diferentes linhas celulares

#### 8.1.1 HCT116

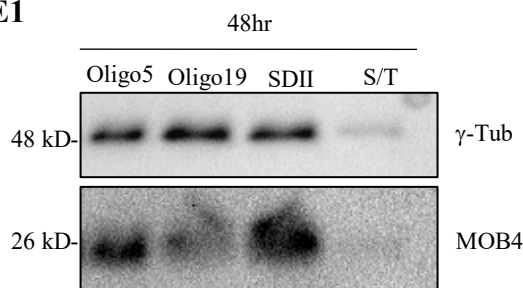


**Figura VIII. 1. Análise por *Western Blot* dos níveis de expressão da proteína MOB4 em células HCT116 após RNAi.** A análise foi feita 24, 48 e 96 horas após transfeção com o Oligo 5 e o Oligo 19, ambos contra a proteína MOB4, e com o controle negativo (SD II). S/T representa as células não transfetadas. Foram utilizados anticorpos contra a proteína MOB4 de 26 kD e contra a  $\gamma$ -Tubulina de 48 kD, como controle interno. De acordo com as bandas para MOB4, parece ter havido depleção da proteína para o RNAi de 48 e 96 horas, no entanto para o RNAi de 24 horas não parece ter ocorrido depleção da proteína quando as células foram transfetadas com o Oligo 19 uma vez que a banda se encontra com tonalidade semelhante aos dos controles negativos.



**Figura VIII. 2. Defeitos mitóticos observados em células HCT116 após depleção de MOB4 por RNAi.** Representação gráfica correspondente aos valores percentuais de células mitóticas que apresentaram desalinhamento cromossômico (A), fusos monopolares com os polos juntos (B), fusos monopolares (C) e pontes de DNA (D) para cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, controle negativo (SD II) e do controle não transfetado (S/T)). MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 19. Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. Nem sempre são observados aumentos de defeitos após depleção do MOB4 com ambos os Oligos, nem um aumento do número de defeitos com o tempo.

### 8.1.2 hTERT-RPE1



**Figura VIII. 3. Análise por Western Blot dos níveis de expressão da proteína MOB4 em células hTERT-RPE1 após RNAi.** A análise foi feita 48 horas após transfeção com o Oligo 5 e o Oligo 19, ambos contra a proteína MOB4 e com o controle negativo (SD II). S/T representa as células não transfetadas. Condições de transfeção de 1  $\mu$ L de LF2000 e mistura de transfeção esteve em contacto com as células durante 1h30m. Foram utilizados anticorpos contra a proteína MOB4 de 26 kD e contra a  $\gamma$ -Tubulina de 48 kD, como controle interno. Pela sua análise parece ter havido depleção da proteína com o Oligo 19 mas não com o Oligo 5.

## 8.2 Estudo da depleção de vários componentes do complexo STRIPAK

**Tabela VIII. 1. Defeitos mitóticos observados após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de defeitos mitóticos apresentados no Gráfico da Figura IV.8. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|                                      | S/T | SDII | MOB4 | MOB4* | STRN | STRIP1 | STRN3 | MST4 | FGFR10P2 | CCM3 |
|--------------------------------------|-----|------|------|-------|------|--------|-------|------|----------|------|
| <b>Total de mitoses com defeitos</b> | 13  | 17   | 38   | 33    | 37   | 33     | 20    | 45   | 28       | 27   |
| <b>Total de mitoses</b>              | 203 | 200  | 210  | 204   | 216  | 215    | 213   | 234  | 219      | 205  |
| <b>Defeitos Mitóticos %</b>          | 6%  | 9%   | 18%  | 16%   | 17%  | 15%    | 9%    | 19%  | 13%      | 13%  |

**Tabela VIII. 2. Desalinhamento cromossômico observado após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células mitóticas com desalinhamento cromossômico apresentados no Gráfico da Figura VIII.4B. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|   | S/T | SDII | MOB4 | MOB4* | STRN | STRIP1 | STRN3 | MST4 | FGFR10P2 | CCM3 |
|---|-----|------|------|-------|------|--------|-------|------|----------|------|
| <b>Total de metafases com desalinhamento cromossômico</b> | 3   | 6    | 24   | 12    | 14   | 12     | 8     | 20   | 17       | 9    |
| <b>Total de metafases</b>                                 | 92  | 94   | 130  | 124   | 116  | 141    | 117   | 145  | 133      | 116  |
| <b>Desalinhamento cromossômico %</b>                      | 3%  | 6%   | 18%  | 10%   | 12%  | 9%     | 7%    | 14%  | 13%      | 8%   |

**Tabela VIII. 3. Índice Metafase/Anafase após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram feitas contagens de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas. Valores utilizados para o cálculo do **índice metafase/anafase** apresentados no Gráfico da Figura IV.12B. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|                         | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB4</i> | <i>MOB4*</i> | <i>STRN</i> | <i>STRIP1</i> | <i>STRN3</i> | <i>MST4</i> | <i>FGFR10P2</i> | <i>CCM3</i> |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>Células metafase</b> | 92         | 94          | 130         | 124          | 116         | 141           | 117          | 145         | 133             | 116         |
| <b>Células anafase</b>  | 27         | 31          | 17          | 23           | 21          | 17            | 27           | 19          | 19              | 26          |
| <b>Índice Met/Anaf</b>  | <b>3,4</b> | <b>3,0</b>  | <b>7,7</b>  | <b>5,4</b>   | <b>5,5</b>  | <b>8,3</b>    | <b>4,3</b>   | <b>7,6</b>  | <b>7,0</b>      | <b>4,5</b>  |

**Tabela VIII. 4. Índice Mitótico após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. Valores utilizados para o cálculo do **índice mitótico** apresentados no Gráfico da Figura IV.12A. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|                          | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB4</i> | <i>MOB4*</i> | <i>STRN</i> | <i>STRIP1</i> | <i>STRN3</i> | <i>MST4</i> | <i>FGFR10P2</i> | <i>CCM3</i> |
|--------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>Células mitóticas</b> | 32         | 32          | 60          | 46           | 50          | 55            | 39           | 51          | 53              | 39          |
| <b>Total de células</b>  | 1053       | 1029        | 1060        | 992          | 1024        | 1040          | 1045         | 1004        | 1032            | 1052        |
| <b>Índice Mitótico</b>   | <b>3%</b>  | <b>3,1%</b> | <b>5,7%</b> | <b>4,6%</b>  | <b>4,9%</b> | <b>5,3%</b>   | <b>3,7%</b>  | <b>5,1%</b> | <b>5,1%</b>     | <b>3,7%</b> |

**Tabela VIII. 5. Anormalidades no Fuso mitótico observadas após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram analisadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células mitóticas com anormalidades no fuso mitótico apresentados no Gráfico da Figura VIII.4A. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

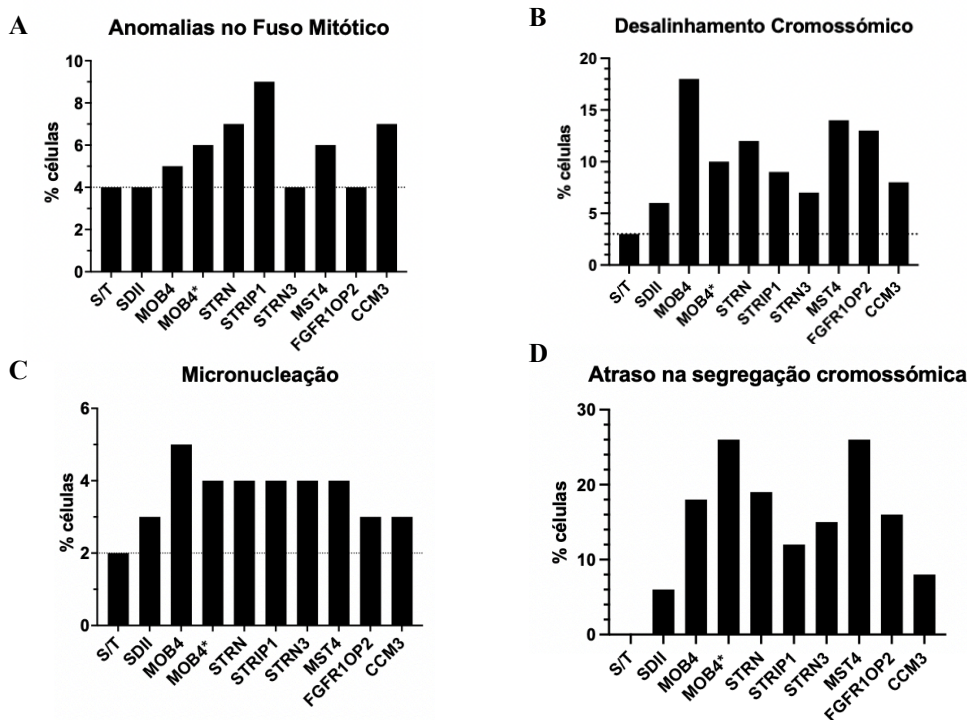
|   | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB4</i> | <i>MOB4*</i> | <i>STRN</i> | <i>STRIP1</i> | <i>STRN3</i> | <i>MST4</i> | <i>FGFR10P2</i> | <i>CCM3</i> |
|---|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>Total de mitoses com anormalidades no Fuso</b> | 8          | 8           | 10          | 13           | 15          | 19            | 8            | 15          | 8               | 15          |
| <b>Total de mitoses</b>                           | 203        | 200         | 210         | 204          | 216         | 215           | 213          | 234         | 219             | 205         |
| <b>Anormalidades no Fuso_%</b>                    | <b>4%</b>  | <b>4%</b>   | <b>5%</b>   | <b>6%</b>    | <b>7%</b>   | <b>9%</b>     | <b>4%</b>    | <b>6%</b>   | <b>4%</b>       | <b>7%</b>   |

**Tabela VIII. 6. Micronucleações observadas após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram analisadas um total de aproximadamente 1000 células interfásicas através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células em interfase com micronucleação apresentados no Gráfico da Figura VIII.4C. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|  | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB4</i> | <i>MOB4*</i> | <i>STRN</i> | <i>STRIP1</i> | <i>STRN3</i> | <i>MST4</i> | <i>FGFR10P2</i> | <i>CCM3</i> |
|--|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>Total de células com micronúcleos</b> | 22         | 26          | 53          | 37           | 42          | 37            | 39           | 40          | 27              | 33          |
| <b>Total de células</b>                  | 1027       | 1004        | 1071        | 1000         | 1032        | 1042          | 1082         | 1076        | 999             | 1065        |
| <b>Micronucleação_%</b>                  | <b>2%</b>  | <b>3%</b>   | <b>5%</b>   | <b>4%</b>    | <b>4%</b>   | <b>4%</b>     | <b>5%</b>    | <b>4%</b>   | <b>3%</b>       | <b>3%</b>   |

**Tabela VIII. 7. Atraso na segregação cromossômica observado após RNAi dos vários componentes do STRIPAK.** Foram analisadas para um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para cada uma das condições testadas. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de células mitóticas com atraso na segregação cromossômica apresentados no Gráfico da Figura VIII.4D. MOB4 para os valores com o Oligo 5 e MOB4\* para os valores com o Oligo 19.

|  | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB4</i> | <i>MOB4*</i> | <i>STRN</i> | <i>STRIP1</i> | <i>STRN3</i> | <i>MST4</i> | <i>FGFR10P2</i> | <i>CCM3</i> |
|--|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>Total de células com atraso</b>         | 0          | 2           | 3           | 6            | 4           | 2             | 4            | 5           | 3               | 1           |
| <b>Total de anafases</b>                   | 27         | 31          | 17          | 23           | 21          | 17            | 27           | 19          | 19              | 26          |
| <b>Atraso na segregação cromossômica %</b> | <b>0%</b>  | <b>6%</b>   | <b>18%</b>  | <b>26%</b>   | <b>19%</b>  | <b>12%</b>    | <b>15%</b>   | <b>26%</b>  | <b>16%</b>      | <b>8%</b>   |



**Figura VIII. 4. Defeitos mitóticos em células HeLa após depleção de componentes do complexo STRIPAK.** Representação gráfica correspondente aos valores percentuais de células mitóticas que apresentarem problemas no fuso mitótico (A), Desalinhamento cromossômico (B), Micronucleação (C) e atraso na segregação cromossômica (D) em cada uma das condições testadas (MOB4, MOB4\*, STRN, STRIP1, STRN3, MST4, FGFR10P2 e CCM3), do controlo negativo (SD II) e do controlo não transfetado (S/T). Foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase. MOB4 corresponde aos valores obtidos pela supressão da proteína pelo Oligo 5 enquanto MOB4\* corresponde á supressão da proteína pelo Oligo 19. Observa-se um aumento dos defeitos mitóticos em todas as condições, comparativamente aos controlos. Os valores obtidos através das contagens efetuadas para cada uma das condições encontram-se apresentadas nas Tabela VIII.2,5,6 e 7.

### 8.3 Análise de fenótipos mitóticos após depleção de MOB2 em células HeLa

**Tabela VIII. 8. Índice Metafase/Anafase (A) e Índice Mitótico (B) após RNAi de MOB2.** Para o cálculo do índice metafase/anafase foram feitas contagens de células que se encontravam em metafase e em anafase num total de aproximadamente 200 células mitóticas e para o cálculo do índice mitótico foram feitas contagens de células mitóticas num total de aproximadamente 1000 células em interfase.

| <b>A</b>                   |            |             |             | <b>B</b>                 |             |             |             |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                            | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB2</i> |                          | <i>S/T</i>  | <i>SDII</i> | <i>MOB2</i> |
| <b>Células em metafase</b> | 89         | 83          | 103         | <b>Células mitóticas</b> | 40          | 35          | 50          |
| <b>Células em anafase</b>  | 39         | 28          | 22          | <b>Total de células</b>  | 1116        | 1102        | 1040        |
| <b>Índice Met/Anaf</b>     | <b>2,3</b> | <b>2,9</b>  | <b>4,7</b>  | <b>Índice Mitótico</b>   | <b>3,6%</b> | <b>3,3%</b> | <b>4,8%</b> |

**Tabela VIII. 9. Total de defeitos mitóticos (A) e defeitos mitóticos individuais (B) após RNAi de MOB2.** Foram analisados um total de aproximadamente 200 mitoses através de microscopia de fluorescência para o MOB2. Valores utilizados para o cálculo das percentagens de defeitos mitóticos apresentados no Gráfico da Figura IV.13.III e Figura IV.14.

| <b>A</b>                             |            |             |             |
|--------------------------------------|------------|-------------|-------------|
|                                      | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB2</i> |
| <b>Total de mitoses com defeitos</b> | 15         | 19          | 73          |
| <b>Total de mitoses</b>              | 198        | 198         | 205         |
| <b>Defeitos mitóticos_%</b>          | <b>8%</b>  | <b>10%</b>  | <b>36%</b>  |

| <b>B</b>                                |            |             |             |
|---|------------|-------------|-------------|
|   | <i>S/T</i> | <i>SDII</i> | <i>MOB2</i> |
| <b>Desalinhamento em metafase</b>       | 3          | 2           | 11          |
| <b>Centrossomas juntos em profase</b>   | 2          | 6           | 18          |
| <b>Fusos descentrados da célula</b>     | 0          | 4           | 21          |
| <b>Desalinhamento em metafase_%</b>     | 3%         | 2%          | 11%         |
| <b>Centrossomas juntos em profase_%</b> | 5%         | 13%         | 38%         |
| <b>Fusos descentrados da célula_%</b>   | 0%         | 5%          | 20%         |