

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Hassan Bousbaa o meu sincero agradecimento pela contagiante motivação, entusiasmo e dedicação em todos os momentos partilhados. Pelos sábios conhecimentos e conselhos transmitidos, pelas conversas estimulantes e condutas. Por me fazer encarar cada etapa com firmeza e ânimo. Por ter acreditado e reconhecido o meu trabalho, pelo enorme apoio e amizade.

À Vanessa Nascimento, por todo o processo de aprendizagem. Pelos conhecimentos, pelo empenho e dedicação. Pela excelente relação pessoal e pela amizade.

À Rita Reis, por muitas vezes me chamar à razão. Pelo olhar crítico e sábio, pela ajuda preciosa e discussões instrutivas. Pela confiança.

À Joana Barbosa pela ajuda gratuita, pelo carinho e pelas palavras reconfortantes.

À Juliana Faria e à Kelly Laurence pelo incentivo constante, pela convivência.

À Cláudia Andrade e à Mariana Valente por todos os momentos. Pela companhia, pelo percurso comum. Pela partilha de emoções e desabafos.

Ao Diogo, pela paciência e compreensão constantes, pelo respeito e partilha. Por me ajudar a relativizar as situações e focar-me no que realmente é importante.

À minha irmã, por me guiar em todas as etapas. Por tornar claras as minhas ideias e decisões. Pelo conforto e amizade.

Ao Eduardo, por me fazer sempre sorrir e relembrar que a vida é feita de momentos.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela perseverança e segurança transmitidas. Por me ajudarem a percorrer o caminho certo, sem questionarem as minhas escolhas. Pelo exemplo de vida e dignidade, pela admiração.

À minha avó, que sempre me compreende, pelo estímulo e palavras sensatas. Por admirar e se orgulhar do meu trabalho. Pelo carinho.

Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), do Instituto Superior de Ciências da Saúde do Norte (ISCS-N) /CESPU pelo acolhimento.

PUBLICAÇÕES

No âmbito do presente trabalho foram publicados dois artigos de revisão, abaixo citados:

P. Silva, J. Barbosa, A. V. Nascimento, J. Faria, R. Reis and H. Bousbaa (2011). **Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint**. *Cell Proliferation* (*in press*).

Joana Barbosa, Ana Vanessa Nascimento, Juliana Faria, **Patricia Silva**, Hassan Bousbaa. **The spindle assembly checkpoint: perspectives in tumorigenesis and cancer therapy**. *Front. Biol.* 2011, 6(2): 147–155

RESUMO

O *checkpoint* mitótico assegura a fidelidade da segregação cromossómica a cada divisão celular. Este mecanismo de controlo inibe a anafase até que todos os cromossomas estabeleçam uma ligação bipolar, através dos seus cinetocoros irmãos, com os microtúbulos provenientes de pólos opostos do fuso mitótico, culminando no seu alinhamento na placa metafásica, fenómeno designado de congressão.

Algumas das proteínas do *checkpoint* mitótico, designadamente Bub1, BubR1 e Bub3, para além da sua função na via de sinalização do *checkpoint*, foram envolvidas na regulação da ligação cinetocoro-microtúbulos. No entanto, fica por esclarecer se esta função é directa ou implica uma relação com as proteínas que medeiam a ligação dos cromossomas aos microtúbulos, nomeadamente com as proteínas motoras dineína e CENP-E. Foi reportada, por sistema *two-hybrid*, uma interacção entre as proteínas Bub3 e dineína. Assim, propusemo-nos a caracterizar, por RNA de interferência em células humanas em cultura, a relação funcional entre as proteínas Bub3 e dineína na ligação cinetocoro-microtúbulos e na congressão.

Os resultados mostram que a depleção, quer da Bub3 quer da dineína, originou placas metafásicas incompletas com vários cromossomas desalinhados, confirmando a importância destas proteínas na congressão. Contudo, a depleção simultânea das duas proteínas resultou na restauração de uma fracção significativa de placas metafásicas com todos os cromossomas alinhados. É sugerida uma relação antagonística entre as proteínas Bub3 e dineína na regulação da ligação cinetocoro-microtúbulos.

ABSTRACT

The spindle assembly checkpoint (SAC) ensures the fidelity of chromosome segregation at each cell division cycle. This surveillance mechanism prevents premature anaphase onset until each chromosome establishes bipolar attachments, through its sister-kinetochores, to microtubules emanating from the opposite poles of the mitotic spindle, and becomes aligned at the metaphase plate, a process known as chromosome congression.

Besides their role in SAC signaling, some checkpoint proteins, namely Bub1, BubR1 and Bub3, were also implicated in the regulation of kinetochore-microtubules attachments. However, whether they mediate kinetochore-microtubule attachments directly or in a functional relationship with the protein machinery that ensures attachment, such as the motor proteins dynein and CENP-E, remains to be elucidated. Bub3 and dynein proteins were previously reported to interact in a yeast two-hybrid system. Therefore, we propose to characterize, by RNA interference (RNAi) in human cell culture, the functional relationship between Bub3 and dynein proteins in kinetochore-microtubule attachment and congression.

Our results showed that RNAi-mediated depletion of either Bub3 or dynein resulted in metaphase plates with misaligned chromosomes, confirming the importance of these proteins in congression. Interestingly, simultaneous depletion of the two proteins restored a significant fraction of metaphase plates with full chromosome alignment. We suggest that Bub3 and dynein have antagonistic effects upon the regulation of kinetochore-microtubule attachment.

ÍNDICE

PARTE I – INTRODUÇÃO

1. Ciclo celular	2
1.1. Interfase.....	2
1.2. Mitose	3
1.3. Regulação	6
2. Pontos de controlo (checkpoints) do ciclo celular	8
3. Checkpoint mitótico	10
3.1. Definição e Função.....	10
3.2. Mecanismo molecular de actuação.....	11
3.3. Silenciamento	14
4. Interação cinetocoros-microtúbulos e Bi-orientação	16
4.1. Fuso mitótico	18
4.2. Cinetocoro	20
4.3. Congressão e alinhamento dos cromossomas	23
4.4. Erros de ligação e mecanismos de correcção	26
5. Objectivos	28

PARTE II – METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1. Cultura Celular	34
1.1. Linha celular e Condições de cultura	34
1.2. Subcultura	34
1.3. Congelamento de linhas celulares	35
1.4. Descongelamento de linhas celulares.....	35
2. Tratamento de lamelas com poli-lisina	35
3. RNA de Interferência e Transfecção	36
4. Verificação da eficácia da transfecção	37
4.1. Imunofluorescência	37
4.2. Western-Blotting	38
4.3. qRT-PCR: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	39
4.3.1. Extracção e Quantificação de RNA total.....	39

4.3.2.	Desenho dos <i>Primers</i>	40
4.3.3.	Síntese de cADN.....	41
4.3.4.	PCR quantitativo em tempo real.....	41
5.	Caracterização do Fenótipo resultante do silenciamento.....	42
5.1.	Imunofluorescência.....	42
5.2.	Determinação do Índice Mitótico.....	43
5.3.	Quantificação de parâmetros mitóticos.....	44
5.4.	Ensaio de Recovery – Avaliação da capacidade de restaurar a placa metafásica.....	45
5.5.	Cold Treatment.....	45
5.6.	Distâncias inter-cinetocoros.....	46
6.	Análise e Tratamento de imagens.....	46
7.	Análise Estatística dos Resultados.....	47

PARTE III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.	Efeito da depleção da proteína Bub3 sobre as interacções cinetocoro-microtúbulos..	51
1.1.	Eficiência da depleção da proteína Bub3.....	51
1.2.	Fenótipo resultante da depleção da proteína Bub3.....	54
1.2.1	As células com depleção da proteína Bub3 indicam um defeito no alinhamento dos cromossomas.....	54
2.	Efeito da depleção da proteína dineína sobre as interacções cinetocoro-microtúbulos.....	58
2.1.	Eficiência da depleção das proteínas dineína e spindly.....	59
2.2.	Caracterização do fenótipo da depleção da proteína dineína.....	62
2.2.1	As células com depleção da proteína dineína apresentam uma paragem em mitose.....	62
2.2.2	As células com depleção da proteína dineína apresentam figuras mitóticas de três categorias.....	64
2.2.3	As proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 não acumulam nos cinetocoros dos cromossomas alinhados após depleção da dineína.....	68
3.	Efeito da depleção simultânea das proteínas Bub3 e dineína sobre as interacções cinetocoro-microtúbulos.....	71
3.1.	Eficiência da depleção conjunta das proteínas Bub3 e dineína.....	71
3.2.	Análise do fenótipo da depleção simultânea de Bub3 e dineína.....	72
3.2.1	Relação de interdependência entre as proteínas Bub3, DHC e Spindly.....	72

3.2.2	A depleção dupla revelou que a acumulação em mitose, observada após depleção individual da dineína, é checkpoint dependente.....	75
3.2.3	A depleção conjunta de Bub3 e dineína restaura a placa metafásica	77
3.2.4	A restauração da placa metafásica no duplo não implica o restabelecimento de ligações cinetocoros-microtúbulos eficientes	79
3.2.5	Natureza da ligação cinetocoro-microtúbulos dos cromossomas desalinhados após depleção individual e simultânea das proteínas Bub3 e dineína	85
PARTE IV – CONCLUSÃO		87
PARTE V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do ciclo celular eucariota.....	2
Figura 2. Representação das diferentes fases da mitose e citocinese.....	5
Figura 3. Actividade dos complexos ciclinas-Cdks nas diferentes fases do ciclo celular.....	7
Figura 4. Localização dos pontos de controlo (<i>checkpoints</i>) no ciclo celular.....	9
Figura 5. Base molecular da sinalização do <i>checkpoint</i> mitótico.....	13
Figura 6. Propagação do sinal inibidor do mecanismo de <i>checkpoint</i> mitótico – Modelo <i>Mad2 Template</i>	14
Figura 7. Complexo KMN: interface de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos.....	18
Figura 8. Arquitectura do fuso mitótico e diferentes tipos de microtúbulos que o compõem, nas células animais.....	20
Figura 9. Estrutura do cinetocoro.....	22
Figura 10. Processo de bi-orientação dos cromossomas durante a prometáfase.....	25
Figura 11. Bi-orientação e erros de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos.....	27
Figura 12. Representação esquemática do desenho experimental delineado.....	33
Figura 13. Representação esquemática do ensaio de recuperação da placa metafásica.....	45
Figura 14. Eficiência da depleção da proteína Bub3, por RNAi.....	54
Figura 15. Fenótipo resultante da depleção da proteína Bub3, por RNAi, em células HeLa.....	58
Figura 16. Eficiência da depleção das proteínas dineína e spindly, por RNAi, em células HeLa.....	62
Figura 17. A depleção da proteína dineína induz uma acumulação de células em mitose.....	64
Figura 18. Caracterização do fenótipo resultante da depleção da proteína dineína, por RNAi, em células HeLa.....	66
Figura 19. Os fusos mitóticos bipolares nas células com depleção da proteína dineína apresentam-se focados.....	67

Figura 20. A depleção da proteína dineína não provoca acumulação das proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 nos cinetocoros dos cromossomas alinhados.....	70
Figura 21. Eficiência da depleção conjunta das proteínas Bub3 e dineína, por RNAi.....	72
Figura 22. A depleção da proteína dineína não interfere com a localização da proteína Bub3 nos cinetocoros.....	73
Figura 23. A depleção de Bub3 interfere com a localização da spindly nos polos mas não com a sua localização nos cinetocoros.....	75
Figura 24. A acumulação em mitose, observada após depleção individual da dineína, é <i>checkpoint</i> dependente.....	76
Figura 25. Fenótipo resultante da depleção conjunta das proteínas Bub3 e dineína.....	78
Figura 26. Fenótipo resultante do ensaio de <i>Cold Treatment</i> , realizado em culturas controlo e após depleção individual e conjunta das proteínas Bub3 e dineína.....	80
Figura 27. Fenótipo resultante do ensaio de <i>Recovery</i> , realizado em culturas controlo e após depleção individual e conjunta das proteínas Bub3 e dineína.....	83
Figura 28. Distâncias inter-cinetocoros nas células com depleção das proteínas Bub3, DHC e Bub3/DHC.....	84
Figura 29. Tipo de ligação cinetocoros-microtúbulos nas células com depleção das proteínas Bub3, DHC e Bub3/DHC.....	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários usados na técnica de imunofluorescência, para comprovação do silenciamento das proteínas Bub3, dineína e spindly.....	38
Tabela 2. Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes GAPDH, Bub3 e DHC.....	41
Tabela 3. Anticorpos primários e secundários usados na técnica de imunofluorescência, para análise do fenótipo resultante do silenciamento das proteínas Bub3, dineína e spindly.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC/C	Complexo promotor da anafase/ciclossoma
ATP	Trifosfato de adenosina
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia-mutated</i>
BSA	Albumina sérica bovina
Bub	<i>Budding uninhibited by benzimidazole</i>
BubR1	<i>Bub1-related protein</i>
bp	Pares de bases
°C	Grau Celsius
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
CAK	Cinases activadoras de CDKs
CCNA	<i>Constitutive centromere-associated protein</i>
Cdc20	<i>Cell division cycle protein 20</i>
Cdc27	<i>Cell division cycle protein 27</i>
Cdh1	Caderina 1
CDKs	Cinases ciclina-dependentes
CENP	Proteína centromérica
CHD	Domínio homólogo de calponina
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CHFR	<i>Forkhead-associated and Ring finger domains</i>
CLASP	<i>CLIP-associating protein</i>
CLIP170	<i>Cytoplasmic linker protein-170</i>
C-Mad2	<i>Closed-Mad2</i>
cm	Centímetros
CPC	<i>Chromosome passenger complex</i>
CTR	Controlo
Dapi	4',6'-diamino-2-fenilindole
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DHC	Cadeia pesada da dineína
DIC	Cadeia intermediária da dineína
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNase	Desoxirribonuclease
EB1	<i>End-binding protein-1</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-2-(2 aminoetil)tetracético
FBS	Soro bovino fetal
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

G/C	Guanina/citosina
GDP	Difosfato de guanidina
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Trifosfato de guanidina
Hepes	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ICIS	<i>Inner centromere-associated kinesin</i>
INCENP	<i>Inner centromere protein</i>
IM	Índice mitótico
KDa	KiloDalton
KMN	<i>KNL-1/Mis12 complex/Ndc80 complex</i>
LIS1	<i>Lisencephaly-1</i>
M	Molar
Mad	<i>Mitotic-arrest deficient</i>
MCAK	<i>Mitotic centromere-associated kinesin</i>
MCC	Complexo do <i>checkpoint</i> mitótico
mg	Miligramas
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPF	Factor promotor de maturação
Mps1	<i>Multipolar spindle-1</i>
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NDGA	<i>Nordihydroguaiaretic acid</i>
NIMA	<i>Never in mitosis A</i>
Noc	Nocodazole
NTC	<i>Non template control</i>
NuMa	<i>Nuclear mitotic apparatus protein</i>
O-Mad2	<i>Open-Mad2</i>
PP1	Proteína fosfatase 1
p50	Dinamitina
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffer saline tween-20</i>
PCM	Material perinuclear
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pipes	<i>Piperazine-N, N-bis(2-ethanesulfonic Acid)</i>
PLK1	<i>Polo-like kinase-1</i>
RanBP2	<i>Ran-binding protein 2</i>
RanGAP	<i>Ran-GTPase-activating protein</i>
Rb	Retinoblastoma

RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNAi	RNA de interferência
rpm	Rotações por minuto
RZZ	<i>Rod (rough deal)–Zw10 (zeste white10)–Zwilch complex</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Ska 1-3	<i>Spindle and kinetochore-associated proteins</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBST	<i>Tris buffer saline tween-20</i>
TEM	Microscopia electrónica de transmissão
Vs	<i>Versus</i>
Zwint	<i>Zw10 interactor</i>

PARTE I.

INTRODUÇÃO

O estudo do ciclo celular e dos mecanismos que promovem a correcta e equitativa divisão do material genético conheceu uma grande expansão ao longo das últimas décadas, dada a sua implicação em processos tão diversos como o crescimento, proliferação, regeneração, senescência e carcinogénese culminando, a cada passo, na descrição de novos intervenientes.

No decorrer da mitose ocorrem erros que se reflectem no aparecimento de células aneuplóides que, ao que indica, favorecem a progressão da tumorigénese. Assim, a compreensão exhaustiva dos fenómenos biológicos e moleculares que caracterizam e se relacionam com a mitose pode constituir o ponto de partida na projecção de terapias direccionadas, sendo continuamente um alvo de investigação activa. Uma pesquisa na Pubmed (*U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health*) para o termo "*mitosis*" indica a existência de 56.585 artigos científicos publicados entre 1909 e 2011, que espelham a investigação desenvolvida na área.

Durante a mitose, a congressão das cromátidas irmãs para a placa metafásica é uma etapa particularmente crítica, pois só quando é efectiva é que se assegura a transição para as fases que se seguem sem alteração do número previsto de cromossomas. Para garantir o sucesso desta etapa, é indispensável a ocorrência de interacções entre diferentes estruturas, promovidas por um número considerável de proteínas ou complexos proteicos. Neste tópico, as interacções estabelecidas entre os microtúbulos e os cinetocoros ganham particular relevância, bem como a funcionalidade de um mecanismo constitutivo designado de *checkpoint* mitótico. A coordenação harmoniosa destes mecanismos é a base para uma divisão mitótica bem sucedida.

A secção que se segue procura contextualizar o trabalho apresentado na presente tese, iniciando-se com uma breve descrição acerca do ciclo celular e das duas grandes etapas que o caracterizam, a interfase e a mitose, bem como a sua regulação e mecanismos de controlo. Seguidamente, serão revistos conceitos e mecanismos relacionados com a progressão da mitose, focando o mecanismo de *checkpoint* mitótico e enaltecendo os aspectos associados às interacções cinetocoros-microtúbulos, citando as proteínas participantes e o modo como interactuam, alvos de estudo do trabalho descrito nos segmentos subsequentes.

1. CICLO CELULAR

O ciclo celular pode definir-se como uma sequência complexa de eventos ordenados e cíclicos de proliferação e divisão celular, capaz de originar duas células-filhas geneticamente idênticas à célula de origem. Constituiu a base da reprodução celular e, de uma forma altamente regulada, assegura a transmissão fidedigna da informação genética crucial à viabilidade e integridade da célula e consequente normal desenvolvimento dos organismos (Nurse, 2000). Genericamente, divide-se em dois eventos fundamentais: a interfase e a mitose (Figura 1). A interfase compreende as fases G1 (pré-sintética), S (síntese de ADN) e G2 (pré-mitótica) e é temporalmente o período mais longo do ciclo no qual as células duplicam o seu conteúdo e se preparam para a divisão. A mitose é a fase mais curta onde ocorre a divisão nuclear e, posteriormente, a divisão citoplasmática ou citocinese (Grzelakowska-Sztabert, 2004; Vermeulen *et al.*, 2003).

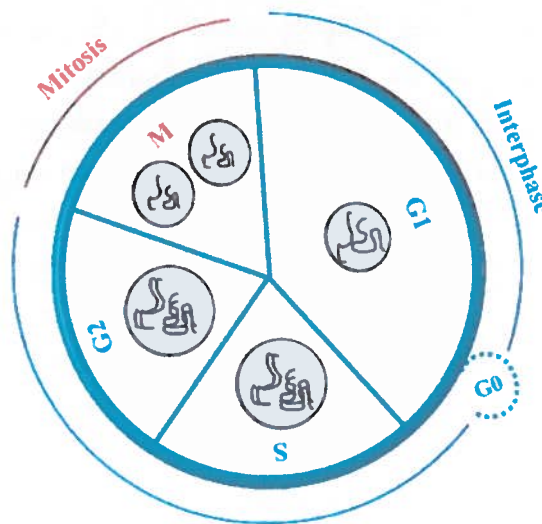


Figura 1. Ilustração do ciclo celular eucariota. O ciclo celular compreende a interfase, com as suas fases G1, S e G2, e a mitose (ou fase M), onde uma única célula origina duas células-filhas individualizadas e geneticamente idênticas à parental. A fase G0 refere-se a um período de quiescência onde a célula pode ingressar após a fase G1.

1.1. INTERFASE

A interfase engloba o período do ciclo celular compreendido entre duas divisões mitóticas consecutivas, onde a célula integra agentes mitogénicos, que potenciam o seu crescimento, e sintetiza proteínas, organelos citoplasmáticos e enzimas necessárias à replicação do ADN, e RNAs (Nurse, 2000). As fases G1 e G2 representam os intervalos

(*Gaps*) no ciclo celular compreendidos entre a síntese de ADN e a mitose. A fase G1 é particularmente crítica, uma vez que a célula assume a decisão que ditará o seu destino: segue para a fase seguinte e prolifera, entra em apoptose ou, ainda, dependendo dos sinais de crescimento e das condições do meio envolvente, pode, temporariamente ou permanentemente, interromper o ciclo celular e ingressar numa fase de quiescência designada de G0 (Van Den Heuvel, 2005) ou de G1 prolongada (Azevedo, 1999). A reentrada e progressão no ciclo dependem da presença de sinais estimulantes que subjuguem a inibição fisiológica da proliferação celular (Kumar *et al.*, 2005).

1.2. MITOSE

O termo mitose foi introduzido, em 1882, pelo cientista Walter Flemming e utilizado, desde então, como termo universal referente à divisão celular (Baker, 1949). É descrito como um fenómeno celular que origina, através de um complexo processo de divisão nuclear e citoplasmática, duas células-filhas individualizadas, com características iguais à célula parental. Desta forma, assegura-se a perpetuação do genoma ao longo das diferentes gerações pós-mitóticas, mantendo-se inalterado o número de cromossomas. Durante a divisão mitótica sucede-se um conjunto de fenómenos biológicos que ocorrem em simultâneo, de forma interligada ou dependente de ocorrências anteriores onde actuam múltiplos factores reguladores (Azevedo, 1999; Kirsch-Volders *et al.*, 1998). Classicamente é subdividida em seis etapas: profase, prometáfase, metafase, anáfase A, anáfase B e telofase (Figura 2) (Kops *et al.*, 2005b; Nigg, 2001). A citocinese, processo de clivagem celular, ocorre no final da mitose e a sua regulação está intimamente ligada com a progressão desta. Embora a organização temporal e espacial destes dois momentos difira entre os animais, as plantas e os fungos, a segregação dos cromossomas requer, invariavelmente, a formação de um fuso mitótico, enquanto a citocinese depende da acção conjunta do fuso, do citoesqueleto de actinmiosina e do córtex celular (Nigg, 2001). Uma correcta segregação, durante a mitose, depende da eficiente execução de dois eventos anteriores decorridos durante a fase S: a replicação do ADN cromossómico, com concomitante estabelecimento das coesinas entre as cromátidas irmãs, e a duplicação dos centrossomas (Nigg, 2001).

O aumento do volume nuclear e o aparecimento da cromatina condensada e organizada sob a forma de longos e finos filamentos, os cromossomas, assinalam o início da profase. Os cromossomas encontram-se irregularmente dispersos no nucleoplasma e são constituídos por duas moléculas de ADN rigorosamente iguais, unidas por uma região de constrição designada de centrómero, onde proteínas específicas se ligam e

formam uma outra estrutura proteica denominada de cinetocoro, local onde futuramente se ligarão os microtúbulos do fuso. O nucléolo inicia a sua dissipação e, gradualmente, vai desaparecendo. Simultaneamente, os centrossomas, que constituem o maior centro organizador de microtúbulos nos mamíferos, localizados na região perinuclear, começam a deslocar-se no citoplasma em direcção aos pólos opostos da célula e iniciam a formação do futuro fuso mitótico. Gradualmente, durante a profase, os cromossomas vão-se encurtando e tornando-se mais espessos e compactos (Azevedo, 1999). A sua condensação é acompanhada por uma extensa fosforilação de numerosas proteínas histónicas e não-histónicas que, associadas a uma molécula de ADN, formam cada cromátida (Nigg, 2001). A prometáfase, a fase ulterior, caracteriza-se pelo início da desintegração e dissipação do invólucro nuclear que ocorre imediatamente após a separação dos centrossomas. É uma consequência da hiperfosforilação da lâmina nuclear, estrutura composta por filamentos intermediários, que mantém o invólucro nuclear estabilizado durante a interfase (Murray, 2004; Nigg, 2001). Durante a prometáfase, os cromossomas continuam o seu encurtamento e espessamento, as cromátidas começam a distinguir-se mais facilmente e os cinetocoros tornam-se visíveis de cada um dos lados do centrómero. Simultaneamente surgem os microtúbulos, que se ligam aos cinetocoros, orientados para os pólos do fuso mitótico. Uma vez completo o desaparecimento do invólucro nuclear e do nucléolo, cada cromossoma inicia o processo de orientação e deslocamento para o plano equatorial, por intermédio de diferentes microtúbulos que, entretanto, se tornam mais evidentes. Inicialmente, a ligação ocorre com um dos cinetocoros e um pólo fazendo com que se assista a uma rápida migração do cromossoma, ficando este mono-orientado. Seguidamente, os microtúbulos emanados do pólo oposto capturam o cinetocoro ainda livre, promovendo a migração do cromossoma para a zona equatorial, originando um cromossoma bi-orientado (Cheeseman e Desai, 2008). A metafase caracteriza-se pela bi-orientação e alinhamento de todos os cromossomas na zona equatorial do fuso. A formação do fuso mitótico é concluída durante a metafase, com os dois centrossomas em pólos opostos e a presença de diferentes tipos de microtúbulos. A transição de metafase para anáfase é a etapa mais dramática da mitose, onde ocorre a ascensão polar de cada uma das cromátidas. O centrómero, que mantinha unidas as duas cromátidas, desorganiza-se e, uma vez puxado pelos microtúbulos, promove a sua deslocação para os pólos. Designa-se a esta etapa anáfase A. Durante a anáfase B, os dois pólos do fuso afastam-se cada vez mais por alongamento da célula, aumentando a distância entre os centrossomas. A telófase caracteriza-se, fundamentalmente, pela reorganização do invólucro nuclear e descondensação progressiva dos cromossomas. Os microtúbulos do fuso despolimerizam e desaparecem e ocorre nucleocinese. Conjuntamente com alterações

na estrutura do citoesqueleto, inicia-se a distribuição equitativa dos organelos celulares pelas duas células-filhas. Finalmente, durante a citocinese, o citoplasma é distribuído devido à acção de filamentos de actina dispostos em feixes e interligados com moléculas de miosina II, que formam um anel contráctil na face interna da membrana plasmática (córTEX celular) (Azevedo, 1999).

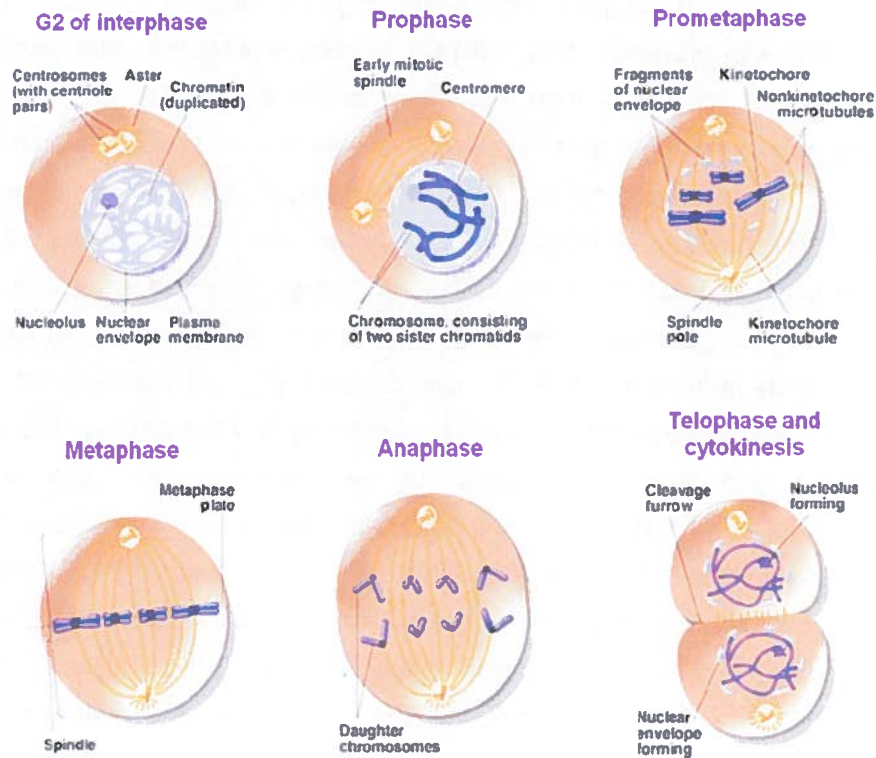


Figura 2. Representação das diferentes fases da mitose e citocinese. A divisão mitótica inicia-se com a profase, onde se assiste à condensação progressiva da cromatina em cromossomas definidos e individualizados, ocorre separação dos centrosomas duplicados em interfase e inicia-se a formação do fuso mitótico. Durante a prometafase ocorre a desintegração do invólucro nuclear e os microtúbulos iniciam o processo dinâmico de captura de cada uma das duas cromátidas irmãs, por intermédio de uma estrutura proteica especializada designada de cinetocoro. A captura de microtúbulos pelos dois cinetocoros e o alinhamento bipolar dos cromossomas numa zona mediana (placa metafásica ou equatorial) resulta da actividade combinada de motores moleculares e da dinâmica exibida pelos microtúbulos. Uma vez completo este processo, fenómeno designado de metafase, a célula reúne as condições requeridas de modo a transitar para a anafase. Durante a anafase A, as cromátidas duplicadas são separadas e na anafase B assiste-se a uma elongação do fuso, a um aumento da separação das cromátidas irmãs, em direcção a polos opostos do fuso, e a invaginações da membrana citoplasmática. No final da telofase, a cromatina descondensa e o invólucro nuclear reorganiza-se enquanto a citocinese é completada, com repartição do citoplasma e do genoma replicado pelas duas células-filhas.

1.3. REGULAÇÃO

As drásticas alterações morfológicas decorridas ao longo das diferentes fases do ciclo celular, que contemplam modificações nucleares e citoplasmáticas, implicam um controlo rigoroso e dirigido no tempo e no espaço, dependente de uma série de proteínas reguladoras chave, as ciclinas e as proteínas cinases ciclina-dependentes (Cdks), que asseguram a coordenação dos diferentes eventos (Figura 3) (Murray, 2004).

As ciclinas são proteínas com múltiplas funções reguladoras, cuja expressão é cíclica durante o ciclo celular. A regulação da concentração de ciclinas, primeiramente por alterações na expressão de genes e, posteriormente, por destruição proteolítica, é um importante determinante no controlo do ciclo celular (Morgan, 2007). Assim, a célula inicia e termina as diferentes etapas do ciclo em associação com a síntese e degradação de ciclinas específicas (Schafer, 1998). As ciclinas podem ser divididas em quatro classes: ciclinas de G1 (D), que contribuem para a entrada no ciclo celular em resposta a factores extracelulares, e as ciclinas de G1/S (E), ciclinas de S (A), ciclinas de G2/M (A e B), directamente implicadas no controlo do ciclo celular (Morgan, 2007; Murray, 2004).

As Cdks são proteínas cinases de serina/treonina que são activadas, parcialmente, por ligação a diferentes subunidades de ciclinas, em pontos particulares do ciclo celular (Schafer, 1998; Schmidt *et al.*, 2005). A activação completa das Cdks requer a fosforilação do seu resíduo treonina 161 pelas cinases activadoras de Cdk (CAK), cuja actividade é constitutiva ao longo do ciclo celular (Mcgowan, 2003; Schafer, 1998). A expressão das Cdks é estável ao longo do ciclo, sendo activadas periodicamente de acordo com os níveis de ciclinas presentes (Vermeulen *et al.*, 2003). Foram descritas várias Cdks nas células animais, sendo as Cdks 1, 2, 4 e 6 as mais activas na regulação do ciclo celular (Morgan, 2007; Vermeulen *et al.*, 2003). O balanço entre a activação e a inactivação das Cdks determina a transição entre as diferentes fases do ciclo celular (Van Den Heuvel, 2005).

Quando as células são estimuladas a entrar no ciclo celular a primeira ciclina a ser expressa é a ciclina D (D1-3) que forma um complexo com as Cdk4 e Cdk6 essencial para a entrada em G1. Este complexo invade o núcleo celular onde fosforila a proteína do retinoblastoma (Rb) e proteínas relacionadas, nomeadamente as proteínas p107 e p130. Consequentemente, a fosforilação da proteína Rb leva à activação de factores de transcrição da família do E2F promovendo a transcrição de proteínas necessárias para as fases G1 e S.

O complexo ciclina E-Cdk2 regula a progressão da fase G1 para a fase S e, consequentemente, a replicação do ADN e de substratos necessários para que a célula efectue a tarefa de duplicar e segregar os conteúdos celulares (Vermeulen *et al.*, 2003).

A ciclina A é expressa imediatamente a seguir à ciclina E, na fronteira G1-S, e em associação com a Cdk2 torna-se imprescindível durante a fase S. Quer o complexo ciclina E-Cdk2 quer o complexo ciclina A-Cdk2 são essenciais para a iniciação e conclusão da replicação do ADN, bem como, para assegurar que este fenómeno ocorra uma única vez em cada ciclo celular. Na fase G2 tardia, a ciclina A forma um complexo com a Cdk1 promovendo o início da mitose, posteriormente regulada pela associação da ciclina B-Cdk1.

A regulação da mitose, em semelhança com a regulação da interfase, depende, predominantemente, de dois mecanismos pós-traducionais: a fosforilação e a proteólise de proteínas. A cinase proeminente neste processo é a Cdk1 embora outras cinases tenham sido descritas como intervenientes nomeadamente, membros da família *Polo-like*, *Aurora* e *NIMA (never in mitosis A)* (Nigg, 2001). A Cdk1 forma um complexo com as ciclinas A e B, designadas de ciclinas mitóticas que controlam o início e progressão da mitose, respectivamente (Sullivan e Morgan, 2007). O complexo ciclina B-Cdk1 foi, inicialmente, designado de factor promotor de maturação (MPF) (Masui e Markert, 1971) e, posteriormente, de factor promotor da mitose.

A activação do complexo ciclina B-Cdk1 está intimamente relacionada com as mudanças morfológicas drásticas que acompanham a mitose, sendo descritos como seus substratos laminas nucleares, proteínas nucleolares, proteínas centrossomais, e a cinesina Eg5 (Mcgowan, 2003).

Os diferentes estádios da mitose são caracterizados pelo rápido e coordenado desaparecimento das ciclinas A e B, sendo a sua destruição imperativa para garantir que as células voltam à interfase antes de iniciar um novo ciclo de replicação do ADN. Esta destruição é assegurada por um complexo designado de complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C), que promove a degradação da ciclina B, pelo proteassoma, com consequente inactivação da Cdk1 determinando a saída da mitose e o início da citocinese (Mcgowan, 2003; Nigg, 2001).

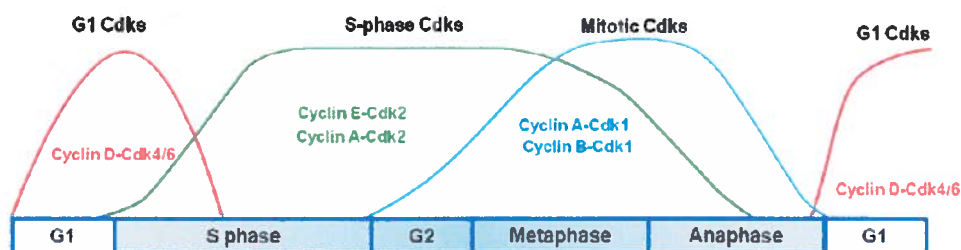


Figura 3. Actividade dos complexos ciclinas-Cdks nas diferentes fases do ciclo celular. A formação de complexos ciclinas-Cdks, em pontos específicos do ciclo celular, é o regulador

universal do ciclo. O complexo ciclina D-Cdk4/6 controla a entrada no ciclo, o complexo ciclina E-Cdk2 inicia o processo de replicação do ADN, o complexo ciclina A-Cdk2 estimula a replicação do ADN, o complexo ciclina A-Cdk1 promove os eventos iniciais da mitose e, finalmente, o complexo ciclina B-Cdk1 é fundamental para a entrada e desenvolvimento da mitose. Adaptado de (Bardin e Amon, 2001).

2. PONTOS DE CONTROLO (*CHECKPOINTS*) DO CICLO CELULAR

À parte a regulação do ciclo celular por intermédio dos complexos ciclina-Cdks existem pontos de controlo que precedem momentos chave do ciclo como a replicação do ADN e a segregação do genoma, monitorizando a transição de uma etapa para a outra (Clarke e Gimenez-Abian, 2000). São mecanismos designados, originalmente, de *checkpoints*, que orquestram o *timing* e a ordem dos eventos críticos que se sucedem, evitando que uma célula passe para a etapa subsequente sem ter concluído com sucesso a anterior (Grzelakowska-Sztabert, 2004; Hartwell e Weinert, 1989; Nigg, 2001). Funcionam como sensores que avaliam o ambiente celular e determinam se a célula apresenta as condições exigidas para avançar no ciclo, particularmente se não detém danos no ADN ou uma replicação incompleta ou, ainda, se não apresenta cromossomas ligados de forma incorrecta aos microtúbulos do fuso mitótico, condições que contribuem para a instabilidade genómica e consequente formação de células aneuplóides, com distribuição desigual do número de cromossomas (Bharadwaj e Yu, 2004; Kops *et al.*, 2005b; Musacchio e Salmon, 2007). Detectada alguma irregularidade a informação é transmitida, via transdução de sinal, do mecanismo sensor para um efector que bloqueia a progressão no ciclo celular, conferindo tempo para a célula reparar o erro (Clarke e Gimenez-Abian, 2000) (Garrett, 2001).

Os *checkpoints* avaliam principalmente a integridade do ADN antes da entrada da célula na fase de S (*checkpoint* de G1/S), durante a fase S (*checkpoint* da fase S), antes da entrada na fase M (*checkpoint* de G2/M) e durante a mitose (*checkpoint* mitótico) (Figura 4).

O *checkpoint* de G1/S induz a paragem da célula, em consequência de danos no ADN, de uma forma dependente do gene supressor tumoral *TP53*. Geralmente, os níveis celulares da proteína p53 são baixos mas a lesão no ADN é reconhecida por duas proteínas cinases, ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) e Chk2 (*checkpoint kinase 2*), que fosforilam a proteína p53 resultando na sua activação. Por sua vez, a p53 estimula a transcrição de diferentes genes incluindo o *p21*, o *Mdm2* e o *Bax*. A indução da proteína *p21*, uma CKI, resulta na inibição de Cdks (especialmente o complexo ciclina E-Cdk2) que, automaticamente, conduz a uma paragem no ciclo celular, evitando a replicação do ADN lesado. Em situações onde a lesão no ADN é severa a proteína p53 induz a morte

celular, pela activação de genes envolvidos na sinalização apoptótica como o gene *Bax*. Existe uma outra via independente da p53 que leva à paragem em G1, S ou G2 em situações de danos no ADN nestas fases. Em função do tipo do dano no ADN, as cinases ATR e ATM ficam activas e, por sua vez, fosforilam as cinases Chk1 Chk2, respectivamente. Estas últimas fosforilam a Cdc25 inibindo-a e impedindo-a de activar as Cdk1 e Cdk2, provocando assim uma paragem em G1, S e G2 (Garrett, 2001) (Clarke e Gimenez-Abian, 2000; Grzelakowska-Sztabert, 2004; Kaufmann e Paules, 1996; Mcgowan, 2003; Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

O *checkpoint* mitótico define-se como um sofisticado mecanismo de vigilância, que actua na transição metafase-anafase e evita a separação antecipada das cromátidas irmãs até que todos os cromossomas estejam devidamente ligados aos microtúbulos e alinhados na placa metafásica (Logarinho *et al.*, 2008). Assegura a fidelidade da segregação cromossómica durante a mitose estando a sua disfunção implicada na tumorigénese (Musacchio e Salmon, 2007). Na secção seguinte, será feita uma descrição mais detalhada deste *checkpoint* uma vez que está relacionado com o presente trabalho. Existe, um outro mecanismo de *checkpoint* que actua durante a mitose, nomeadamente no início da profase, designado de CHFR *checkpoint* (*Forkhead-associated and RING finger domains*). A CHFR é uma ligase de ubiquitina responsável por ubiquitinar proteínas alvo, como as cinases PLK1 e Aurora A, favorecendo a sua degradação pelo proteassoma. Actua por inibição da condensação da cromatina e da desintegração do invólucro nuclear, bem como mantendo o complexo ciclina B-Cdk1 no citoplasma, onde permanece inactivo. Desta forma bloqueia, temporariamente, a progressão para a metafase, em situações de *stress* mitótico, nomeadamente pela introdução de drogas que provocam a despolimerização dos microtúbulos (Chaturvedi *et al.*, 2002; Grzelakowska-Sztabert, 2004; Privette e Petty, 2008).

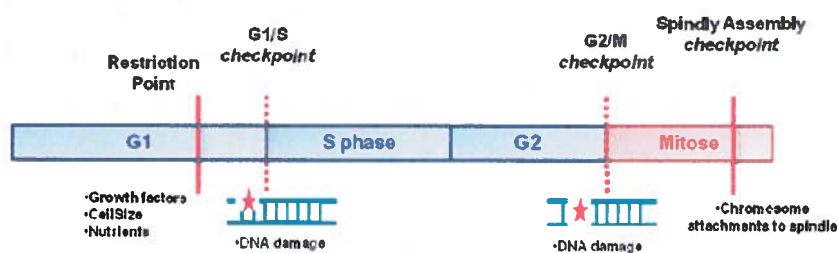


Figura 4. Localização dos pontos de controlo (*checkpoints*) no ciclo celular. O ponto de restrição representa o momento em que a célula decide ou não progredir no ciclo, com base nas condições presentes, pois uma vez transposto este *checkpoint* é impedida de recuar. G1/S e G2/M constituem os *checkpoints* que monitorizam os danos no ADN, actuando antes e depois da replicação. O *checkpoint* mitótico assegura o correcto alinhamento e ligação dos cromossomas aos microtúbulos do fuso antes da segregação.

3. CHECKPOINT MITÓTICO

3.1. DEFINIÇÃO E FUNÇÃO

O *checkpoint* mitótico é um mecanismo de vigilância constitutivo, presente nas células eucariotas em divisão, e caracterizado por ser extremamente sensível a erros de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos. Evita uma segregação incorrecta dos cromossomas promovendo um atraso na transição metafase-anafase até que todos os cromossomas estejam correctamente ligados aos microtúbulos do fuso mitótico, bi-orientados e alinhados na placa metafásica (Musacchio e Salmon, 2007). Consiste numa cascata de sinalização que representa o principal mecanismo de controlo do ciclo celular na mitose, sendo activado imediatamente após a entrada no processo de divisão. A correcta actividade deste mecanismo de controlo é crucial para uma segregação equitativa do material genético entre as duas células-filhas, e para a redução efectiva da taxa de erro durante a mitose. Em contrapartida, o comprometimento da sua função tem sido sugerido como uma possível causa de aneuploidia em diversos tipos de tumores (Thompson *et al.*, 2010; Weaver e Cleveland, 2005). A via molecular envolve a detecção de erros de ligação e a produção de um sinal que inibe a progressão da mitose.

O *checkpoint* mitótico monitoriza o estado da ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos e activa a via de sinalização que previne o início da anafase na presença de ligações incorrectas ou de cinetocoros livres (Chan *et al.*, 2005; Cheeseman e Desai, 2008). No entanto, o que desencadeia o sinal que activa o *checkpoint* mitótico permanece tema de debate (Logarinho *et al.*, 2004; Pinsky e Biggins, 2005). Dois modelos são, actualmente, propostos: i) o modelo da ligação, que estabelece que o *checkpoint* mitótico é sensível ao nível de ocupação dos cinetocoros pelos microtúbulos e ii) o modelo da tensão, que defende que o *checkpoint* mitótico detecta a ausência de tensão existente entre os cinetocoros irmãos. Ensaio experimentais parecem apoiar ambos os modelos (Silva *et al.*, 2011). A tensão, aplicada artificialmente com recurso a microagulhas no último cromossoma a ligar-se aos microtúbulos, alivia o atraso na anafase e induz o término da divisão, em espermatozóides (Li e Nicklas, 1995), defendendo o modelo da tensão. Estudos em levedura, que exibem cinetocoros ligados mas com ausência de tensão, demonstram que a tensão é necessária para silenciar o *checkpoint* mitótico, uma vez que nestas condições este mecanismo permanece activo (Stern e Murray, 2001). Células HeLa tratadas com baixas doses de vinblastina, um despolimerizador dos microtúbulos que reduz a tensão exercida entre os cinetocoros irmãos sem afectar a ligação aos microtúbulos, ficam paradas em mitose indicando que o estabelecimento de ligações entre cinetocoros-microtúbulos não é suficiente para silenciar a actividade do

checkpoint mitótico (Skoufias *et al.*, 2001). Por outro lado, a ablação a laser, em células PtK, do último cinetocoro de um cromossoma mono-orientado provoca a entrada em anafase, dado a favor do modelo de ligação (Rieder *et al.*, 1995). Adicionalmente, o facto da proteína Mad2 ser depletada dos cinetocoros ligados, um sinal de inactivação do *checkpoint* mitótico, indica que este mecanismo é silenciado pela ligação cinetocoro-microtúbulos e não pela tensão existente. Todavia, a análise individual destes dois modelos revela-se uma tarefa crítica devido à interdependência entre o conceito de ligação e de tensão. Na verdade, a tensão é necessária para promover ligações estáveis entre os cinetocoros e os microtúbulos (King e Nicklas, 2000), enquanto a ocupação dos cinetocoros pelos microtúbulos fornece a força necessária para gerar tensão entre os cinetocoros irmãos (Zhou *et al.*, 2002). Neste sentido, foi proposta a hipótese da existência de um “*checkpoint* particionado”. Neste modelo, o sinal inibidor da anafase pode ser produzido por moléculas de sinalização específicas que diferenciam a ausência de tensão ou de ligação (Gorbsky e Ricketts, 1993; Logarinho *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 1998). A proteína Mad2 está amplamente presente em cinetocoros não ligados a microtúbulos e pode, em associação com a Mad1, ser uma das moléculas de sinalização do estado de ligação dos cinetocoros (Waters *et al.*, 1998). A tensão entre os cinetocoros pode ser monitorizada pela localização das proteínas BubR1 e Bub1, juntamente com fosfoepítomos, ainda não identificados, reconhecidos pelo anticorpo 3F3/2 (Gorbsky e Ricketts, 1993; Logarinho *et al.*, 2004).

3.2. MECANISMO MOLECULAR DE ACTUAÇÃO

As proteínas intervenientes na via molecular do *checkpoint* mitótico podem ser divididas em dois grupos: i) as proteínas que constituem os “verdadeiros” (“*core*”) componentes deste mecanismo de controlo e que incluem as proteínas Bub1, BubR1, Bub3, Mad1, Mad2 e Mps1 e ii) as proteínas associadas à ligação, à regulação do complexo APC/C, aos mecanismos de correcção e de silenciamento do *checkpoint* mitótico que monitorizam, juntamente com as primeiras, as ligações estabelecidas e a progressão no ciclo celular (Cheeseman e Desai, 2008). A distinção entre estes dois grupos de proteínas foi, recentemente, exposta num artigo de opinião (Khodjakov e Rieder, 2009).

Os verdadeiros componentes do *checkpoint* mitótico foram, inicialmente, identificados em levedura e os homólogos destas proteínas têm sido identificados nos organismos superiores, incluindo nos mamíferos (Cheeseman e Desai, 2008; Musacchio e Salmon, 2007). Estudos funcionais das proteínas enunciadas, com recurso a mutantes,

injecção de anticorpos ou com RNA de interferência demonstraram um comprometimento da actividade do *checkpoint* mitótico, assistindo-se a uma incorrecta segregação cromossómica, à existência de aneuploidia e a uma evasão à paragem em mitose, na presença de drogas que afectam os microtúbulos, como o nocodazole e o taxol (Bharadwaj e Yu, 2004).

O complexo APC/C é o alvo final do *checkpoint mitótico*. É uma ligase de ubiquitina E3 que promove a degradação de vários reguladores do ciclo celular, encaminhando-os para serem degradados na subunidade 26S do proteossoma. A securina é o regulador chave do início da anafase e um dos principais substratos do APC/C. A sua destruição induz a libertação da proteína separase que, por sua vez, degrada as coesinas que mantêm as cromátidas irmãs unidas, possibilitando a sua deslocação em direcção aos pólos opostos do fuso mitótico. Juntamente com a degradação da securina, a ciclina B é, também, degradada promovendo a saída da mitose por inactivação da Cdk1 (Musacchio e Salmon, 2007).

A actividade do complexo APC/C é regulada pelas proteínas acessórias Cdc20 e Cdh1, que interagem com substratos específicos e os apresentam ao APC/C para serem ubiquitinados e, posteriormente, degradados (May e Hardwick, 2006).

Na presença de cinetocoros livres, as proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 formam o complexo do *checkpoint* mitótico (MCC) (Mccurdy *et al.*), um sinal de “espera” que se difunde através do citosol e inibe a proteína Cdc20, um activador do complexo APC/C (Kramer *et al.*, 1998; Sudakin *et al.*, 2001). Prevenindo a degradação da proteína securina e da ciclina B, pelo complexo APC/C, as coesinas entre as cromátidas irmãs são mantidas e a saída da mitose é inibida, respectivamente (Figura 5).

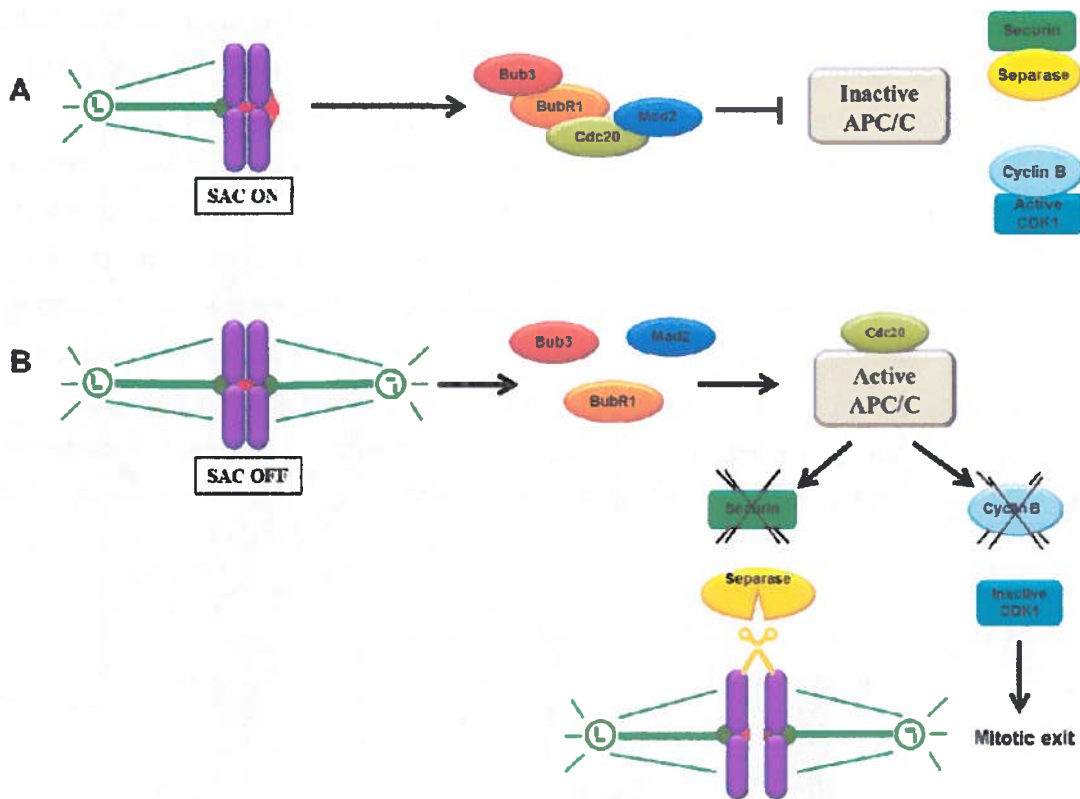


Figura 5. Base molecular da sinalização do checkpoint mitótico. (A) O checkpoint mitótico é activado pela presença de cinetocoros livres (círculo a vermelho). Os cinetocoros livres recrutam as proteínas do checkpoint mitótico para gerar o complexo MCC, que difunde um sinal inibidor constituído pelas proteínas Mad2, BubR1 e Bub3. Por sequestração da Cdc20, o MCC mantém o APC/C inactivo, evitando a degradação da securina e da ciclina B, resultando na paragem do ciclo celular. (B) Quando os cinetocoros estão alinhados, o MCC desagrega-se e a Cdc20 é libertada, activando o APC/C que, por sua vez, leva à degradação da securina e da ciclina B. A degradação da securina provoca a activação da separase que cliva as coesinas entre as cromátidas irmãs, levando à sua separação. A degradação da ciclina B diminui a actividade da Cdk1, resultando na saída da mitose.

Um modelo associado à proteína Mad2, designado de “*Mad2-Template*” foi proposto como o mecanismo que propaga o sinal inibidor, proveniente dos cinetocoros, para o citosol (De Antoni *et al.*, 2005). De acordo com este modelo, a proteína Mad2 pode adoptar duas conformações: *open Mad2* (O-Mad2) e *closed Mad2* (C-Mad2) (De Antoni *et al.*, 2005; Luo e Yu, 2008; Skinner *et al.*, 2008). A C-Mad2 constitutivamente ligada à Mad1 serve como receptor, nos cinetocoros livres, para a Mad2 citosólica, transformando-a em C-Mad2 ligada à Cdc20. O complexo C-Mad2/Cdc20 deixa o cinetocoro e actua como um equivalente estrutural da Mad2/Mad1 que converte mais O-Mad2 em C-Mad2/Cdc20, no citosol, levando a uma amplificação do sinal (Figura 6) (De Antoni *et al.*, 2005; Yu, 2006). Este modelo inicia-se cedo, na desintegração do invólucro nuclear, quando o nível do complexo MCC não é, ainda, suficiente para impedir a

anafase. Quando o último cromossoma está bi-orientado, o sinal inibidor deixa de ser produzido e a proteína Cdc20 é libertada de forma a activar o complexo APC, que induz a ubiquitinação da securina e da ciclina B e a sua degradação no proteossoma.

A fosforilação e desfosforilação de proteínas apresentam, provavelmente, um dos papéis mais preponderantes na tradução e amplificação do sinal gerado pelo *checkpoint* mitótico. No entanto, a actividade cinase de proteínas do *checkpoint* como a Bub1, BubR1 e Mps1, na sinalização do *checkpoint* mitótico tem sido controversa. Resultados contraditórios têm sido descritos relativamente ao envolvimento destas proteínas, provavelmente devido a variabilidade dos diferentes ensaios realizados para aceder à resposta do *checkpoint* mitótico ou à depleção ineficiente de proteínas endógenas (Bolanos-Garcia e Blundell, 2010; Zich e Hardwick, 2010).

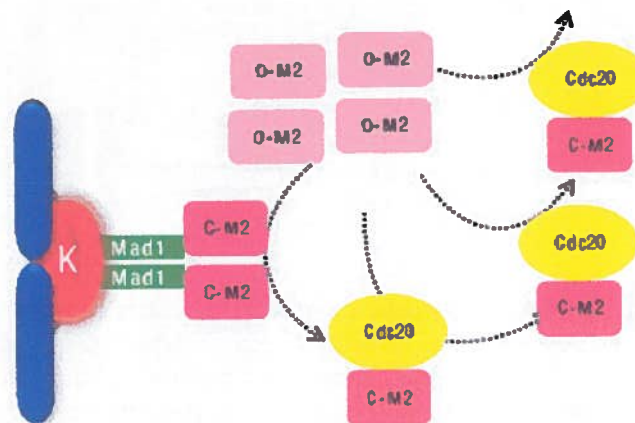


Figura 6. Propagação do sinal inibidor do mecanismo de *checkpoint* mitótico – Modelo *Mad2 Template*. De acordo com este modelo, a conformação *closed*-Mad2 (C-M2) ligada à Mad1 serve de receptor nos cinetocoros livres à forma citosólica *open*-Mad2 (O-M2) para transformar esta última em C-M2 ligada à Cdc20. O complexo Mad2/Cdc20 actua como um equivalente estrutural da Mad1/Mad2 para converter mais Mad2 em Cdc20 ligada à C-M2 no citosol, levando à amplificação do sinal.

3.3. SILENCIAMENTO

O silenciamento do mecanismo de *checkpoint* mitótico implica evitar a produção do sinal inibidor da anafase, após o estabelecimento de ligações estáveis entre os cinetocoros e os microtúbulos, pressupondo a existência de um elo regulador entre o fenómeno de bi-orientação e o mecanismo de silenciamento. Vários modelos têm sido propostos (Fuller e Stukenberg, 2009; Vanoosthuysen e Hardwick, 2009b). O primeiro modelo propõe que a produção do sinal do MCC é interrompida pela depleção dos

componentes do *checkpoint* mitótico, dos cinetocoros ligados, de um modo dependente da proteína dineína (Howell *et al.*, 2001). Após estabelecimento de uma ligação estável cinetocoros-microtúbulos, a proteína dineína transporta activamente, ao longo dos microtúbulos, as proteínas do *checkpoint* mitótico como a Mad2 e o BubR1, dos cinetocoros em direcção aos pólos do fuso. Corroborando este mecanismo, as células ficam retidas em mitose com elevados níveis de Mad2, após depleção da cadeia leve intermediária 1 da proteína dineína (LIC1) ou após microinjecção de anticorpos 70.1 anti-dineína ou p50 (Howell *et al.*, 2001; Sivaram *et al.*, 2009). Recentemente, e utilizando um ensaio com *Nordihydroguaiaretic Acid* (NDGA) para estimular o transporte, via dineína/dinactina, das proteínas mitóticas para os pólos, foi descrito que as proteínas hMad1, hZwisch, hRod, hMad2, hCENP-E, hMps1, hSpindly, hCdc27 e a ciclina-B eram transportadas dos cinetocoros em direcção aos pólos, por este complexo, ao contrário das proteínas hBubR1 e hBub1 (Famulski *et al.*, 2011).

O complexo dineína/dinactina contribui, também, para a inactivação do *checkpoint* mitótico por remoção das proteínas ZW10 e Rod dos cinetocoros, observando-se que a depleção destas duas proteínas, por inibição com anticorpos (Chan *et al.*, 2000) ou por mutações proteicas (Basto *et al.*, 2000), interrompe o mecanismo do *checkpoint* mitótico. Além disso, foi descrito que em embriões de *Drosophila*, com mutações na proteína dineína, as células ficam bloqueadas em metafase com elevadas concentrações da proteína ZW10 nos cinetocoros (Wojcik *et al.*, 2001). Uma outra possibilidade para o silenciamento do *checkpoint* por intermédio do complexo dineína/dinactina defende a contribuição deste complexo na tensão existente entre os cinetocoros em cromossomas alinhados, uma vez que a sua depleção induz a uma redução da tensão por diminuição da força produzida ao nível dos cinetocoros ou por ruptura dos locais de ligação dos microtúbulos, nos pólos (Gordon *et al.*, 2001).

Um outro mecanismo de silenciamento descrito é a inibição exercida pela proteína p31^{comet} sobre a proteína Mad2, impedindo-a de inibir a ligação do complexo APC/C^{Cdc20}, em células de mamíferos (Xia *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007a). Por ligação à interface de dimerização da proteína Mad2, a proteína p31^{comet} evita a activação da Mad2 e, consequentemente, promove a dissociação do complexo Mad2/Cdc20 (Yang *et al.*, 2007a). De facto, células HeLa que recuperam do bloqueio induzido pelo nocodazole apresentam um atraso em mitose sob condições de baixa expressão da proteína p31^{comet}. Assim, a sobreexpressão da proteína p31^{comet} revoga o atraso em mitose, dependente do *checkpoint* mitótico, em células HeLa tratadas com drogas ou fármacos que interferem com a dinâmica dos microtúbulos (Yang *et al.*, 2007a). Adicionalmente, a fosforilação da proteína Mad2 foi descrita como inibidora da sua interacção com o complexo APC/C^{Cdc20} ou com a proteína Mad1, sugerindo a sua implicação no silenciamento do *checkpoint*

mitótico (Wassmann *et al.*, 2003). Embora o mecanismo de regulação pelo qual a proteína Mad2 se torna fosforilada e silencia o *checkpoint* mitótico, após ligação dos cinetocoros, permaneça desconhecido, é possível que a forma fosforilada da Mad2 facilite a sua ligação pela proteína p31^{comet} e a torne competente para ser transportada, do cinetocoro, via dineína. Recentemente, um mecanismo alternativo mediado pela proteína fosfatase 1 (PP1) foi proposto em levedura (Vanoosthuysse e Hardwick, 2009a). Independentemente da sua função directa na correcção das ligações impróprias cinetocoros-microtúbulos, talvez a proteína PP1 promova o silenciamento do *checkpoint* mitótico invertendo a fosforilação de substratos da cinase Aurora B, nos cinetocoros. A identidade destes substratos é desconhecida e, ainda, é necessário ser comprovado se, nos mamíferos, a isoforma PP1 γ também opera num mecanismo de silenciamento semelhante.

4. INTERACÇÃO CINETOCOROS-MICROTÚBULOS E BI-ORIENTAÇÃO

De forma a garantir a estabilidade genética, as células necessitam de segregar correctamente os cromossomas replicados, durante a mitose. Este processo de segregação cromossómica é dependente das interacções dinâmicas estabelecidas entre os cinetocoros e os microtúbulos do fuso mitótico, durante a prometáfase (Cheeseman e Desai, 2008; Tanaka e Desai, 2008). Inicialmente, os cinetocoros capturam os microtúbulos que, por sua vez, conectam as cromátidas irmãs de todos os cromossomas aos pólos opostos do fuso mitótico antes de se iniciar a anáfase (Tanaka e Desai, 2008). Esta ligação deve ser suficientemente robusta para suportar as forças exercidas durante a anáfase e, em simultâneo, ser suficientemente dinâmica para permitir os fenómenos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos. Adicionalmente, espera-se que responda de forma eficiente a mecanismos reguladores que promovem o alinhamento e congressão dos cromossomas na placa metafásica. Várias proteínas localizadas nos cinetocoros e com actividades associadas aos microtúbulos poderiam ser sugeridas como participantes na formação do local de ligação para os microtúbulos. Contudo, a sua contribuição para a fidelidade da segregação não mostrou ser significativa (Przewlaka e Glover, 2009). Várias abordagens experimentais, em diferentes organismos, permitiram identificar componentes do cinetocoro que interagem com os microtúbulos como o complexo Dam1, as proteínas CLASP, CLIP-170, EB1, a proteína motora dineína e as cinesinas CENP-E, Kin1 e Kip3. No entanto, enquanto estas proteínas são importantes ao contribuírem para o movimento dos cromossomas, a sua inibição ou depleção, *in vivo*, indicava que nenhuma delas seria essencial para o estabelecimento primário de ligações estáveis entre os cinetocoros e os microtúbulos (Cheeseman *et al.*, 2001; Howell *et al.*,

2001; Maiato *et al.*, 2005; Sanchez-Perez *et al.*, 2005). Por outro lado, diferentes estudos vieram demonstrar que as extremidades (+) dos microtúbulos se ligam aos cinetocoros por intermédio de um complexo proteico denominado de KMN (Figura 7), um constituinte crucial da lâmina externa do cinetocoro, essencial no estabelecimento de ligações perpendiculares (*end-on*) cinetocoro-microtúbulos que garantem a segregação cromossómica. Este núcleo estrutural é composto pela proteína KNL-1 (Blinkin/Spc105 nos humanos e em levedura, respectivamente) e por dois subcomplexos, o Mis12, constituído por quatro proteínas, designadamente Mis12/Nnf1/Nsl1/Dsn1, e o complexo Ndc80 igualmente composto por quatro proteínas Ndc80 (Hec1 nos mamíferos) /Nuf2/Spc24/Spc25. A sua composição é conservada em diferentes espécies (Cheeseman e Desai, 2008). A remoção de qualquer um dos componentes do complexo KMN demonstrou provocar a ruptura do local de ligação dos microtúbulos do fuso (Deluca *et al.*, 2005; Kline *et al.*, 2006). Uma análise funcional do complexo Ndc80, em vários organismos, demonstrou tratar-se do complexo essencial e preponderante nas interacções estabelecidas entre os cinetocoros e os microtúbulos. Este complexo forma uma estrutura em haste, compreendendo duas cabeças globulares em cada extremidade, separadas por uma longa região *coiled-coil*. Uma das extremidades da haste, composta pelas subunidades Hec1/Ndc80 e Nuf2, localiza-se na região externa do cinetocoro e liga-se, directamente, aos microtúbulos. A outra extremidade, constituída pelas subunidades Sp24 e Sp25, é necessária para a ligação ao complexo Mis12 e à proteína KNL-1, em levedura. Nos vertebrados, quer o complexo Mis12 quer o complexo CCNA (*Constitutive Centromere-Associated Network*) influenciam a localização, no cinetocoro, do complexo Ndc80 (Cheeseman e Desai, 2008). Este complexo apresenta pouca afinidade para se ligar aos microtúbulos, isoladamente, mas ao associar-se ao complexo Mis12 e à proteína KNL-1 a afinidade é sinergicamente aumentada. O facto da ligação ocorrer por intermédio da subunidade Hec1/Ndc80 que contém um domínio homólogo de calponina (CHD) aumenta a sua afinidade para os microtúbulos, *in vitro*. Todavia, se é necessário nas células e como a porção da haste e este domínio cooperam são questões que permanecem sem resposta exacta. Mutações pontuais existentes no domínio da calponina implicam uma falha no alinhamento dos cromossomas (Sundin *et al.*, 2011; Tooley *et al.*, 2011).

Actualmente, é consensual que a peça fundamental na maquinaria das ligações cinetocoros-microtúbulos é o complexo KMN, necessário para o posterior recrutamento e libertação dos componentes do *checkpoint* mitótico (ver mais à frente) para e do cinetocoro, e que a Aurora B fosforila componentes proteicos deste complexo para regular a afinidade de ligação para os microtúbulos (Civril e Musacchio, 2008). Após depleção do complexo Ndc80, os cinetocoros das células dos vertebrados são incapazes

de recrutar, para o cinetocoro, um vasto número de proteínas, nomeadamente as proteínas Zwint1, Rod, ZW10, dineína, dinactina, Mad1 e Mad2 (Miller *et al.*, 2008) e a inibição da sua função resulta na perda da ligação perpendicular estabelecida entre os cinetocoros e os microtúbulos, bem como dos movimentos dos cromossomas associados à despolimerização dos microtúbulos (Emanuele *et al.*, 2007).

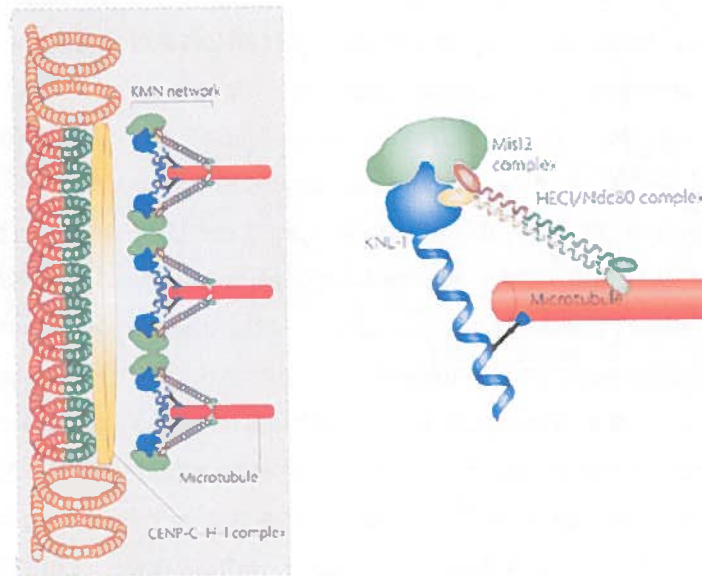


Figura 7. Complexo KMN: interface de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos. Os componentes do complexo KMN (KNL-1, complexo Mis12 e complexo Ndc80) são conservados em todo o reino eucariota. A associação entre o complexo Mis12 e a proteína KNL-1 gera um local de ligação para o complexo Ndc80. Quer o complexo Ndc80 quer a proteína KNL-1 ligam-se, directamente, aos microtúbulos (Ruchaud *et al.*, 2007b).

4.1. FUSO MITÓTICO

A arquitectura do fuso mitótico constituiu um dos principais factores mediadores da interacção cinetocoros-microtúbulos.

O primeiro passo na formação do fuso é separar as conexões existentes entre os dois centrossomas, que se começam a separar, e a matriz de microtúbulos existente entre eles para formar os pólos do fuso (Stearns, 2001). Cada centrossoma é constituído por dois centríolos, estruturas cilíndricas formadas por nove tripletos de microtúbulos, posicionados ortogonalmente e envolvidos por uma matriz electrodensa designada de material perinuclear (PCM). Este é formado por várias proteínas como componentes reguladores e moléculas que medeiam o processo de nucleação dos microtúbulos, algumas associadas de forma permanente aos centrossomas como a γ -tubulina, γ -TuRC

e a centrina. O centrossoma actua como um centro organizador dos microtúbulos (MTOC), funcionando como um ponto de ancoragem e de estabilização, a partir do qual estes elementos do citoesqueleto originam o futuro fuso mitótico (Schatten, 2008).

Os microtúbulos, estruturas tubulares com cerca de 25 nm de diâmetro, são um dos constituintes filamentosos do citoesqueleto das células e os componentes estruturais do fuso mitótico. São formados por um heterodímero constituído por subunidades de α e β tubulina, originando uma estrutura cilíndrica de cerca de 13 protofilamentos alinhados longitudinalmente (Cassimeris e Skibbens, 2003; Santaguida e Musacchio, 2009). Em cada protofilamento, os dímeros formados por α - e β -tubulina apresentam uma orientação fixa, para a extremidade positiva (+) e negativa (-) respectivamente, conferindo-lhe polaridade estrutural e funcional (Cheeseman e Desai, 2008; Santaguida e Musacchio, 2009). As proteínas motoras são capazes de reconhecer esta polaridade, determinando a direcção do transporte (Hirokawa, 1998; Mallik e Gross, 2004).

Os microtúbulos que compõem o fuso mitótico são organizados numa estrutura simétrica e fusiforme e, dependendo da posição das suas extremidades (+), podem dividir-se em três classes: microtúbulos cinetocorianos, interpolares e astrais (Figura 8) (Kirsch-Volders *et al.*, 1998). Os microtúbulos cinetocorianos ligam os cromossomas aos pólos do fuso, por ligação lateral ou perpendicular ao cinetocoro (Hayden *et al.*, 1990; Rieder e Alexander, 1990). Formam um feixe, morfologicamente distinto, denominado de *K-fiber* (fibra cinetocoriana) que permite o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e, posteriormente, a segregação das cromátidas irmãs para originar as duas células-filhas (Rieder e Salmon, 1998). Os microtúbulos interpolares estendem-se desde os pólos do fuso até à zona mediana onde formam um sistema interdigital que conecta os dois pólos (Mastronarde *et al.*, 1993). Os microtúbulos astrais provêm dos pólos do fuso e irradiam-se para o citoplasma com as extremidades (+) interagindo com o córtex celular. Estas interacções são importantes para a orientação do fuso mitótico e para a citocinese (Khodjakov e Rieder, 2001).

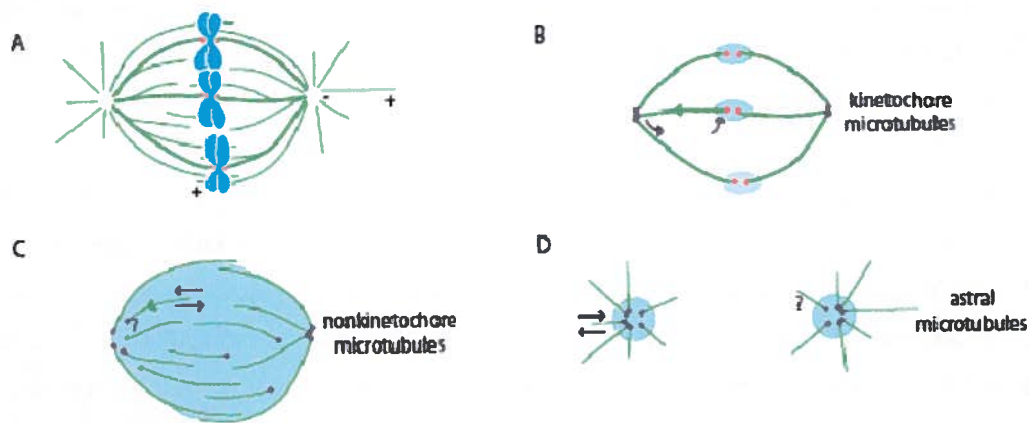


Figura 8. Arquitetura do fuso mitótico e diferentes tipos de microtúbulos que o compõem, nas células animais. A: arquitetura do fuso mitótico - microtúbulos (verde), cromossomas (azul), cinetocoros (vermelho); B-D: três classes de microtúbulos com diferentes localizações (círculos pretos), dinâmicas (setas) e zonas de nucleação (azul). B: microtúbulos cinetocorianos que continuamente deslizam em direcção aos pólos (seta verde), polimerizam no cinetocoro e despolimerizam nos pólos. Formam largos feixes e apresentam um tempo médio de vida mais longo que as restantes duas classes de microtúbulos; C: microtúbulos não cinetocorianos ou interpolares nucleados por toda a parte do fuso mitótico; D: microtúbulos astrais nucleados a partir dos centrosomas, não deslizam e apresentam extremidades (+) dinâmicas e extremidades (-) fixas (Dumont e Mitchison, 2009).

4.2. CINETOCORO

Estudos ultra-estruturais realizados em microscopia electrónica de transmissão (TEM) permitiram distinguir, na região centromérica dos cromossomas, a estrutura proteica a que se designou de cinetocoro, cuja função chave é constituir a interface das ligações estabelecidas entre os microtúbulos do fuso e os cromossomas. Actualmente, estão identificadas cerca de oitenta proteínas nos humanos e, embora existam diferenças entre os vários organismos estudados, a sua composição e organização é conservada em todos os eucariotas. A ultra-estrutura do cinetocoro, dos vertebrados, revelou a existência de uma organização trilaminar estratificada, situada em locais opostos à heterocromatina centromérica dos cromossomas mitóticos, adquirida após a desintegração do invólucro nuclear (Figura 9) (Brinkley e Stubblefield, 1966). A heterocromatina centromérica é constituída pelo complexo CPC (*Chromosome passenger complex*), que inclui as proteínas Aurora B/Ipl1, Borealina, Survivina e INCENP, envolvidas na correcção de ligações impróprias instituídas entre os cinetocoros e os microtúbulos, a proteína CENP-B, a cinesina MCAK (*Mitotic centromere-associated kinesin*) e o factor ICIS (*Inner centromere KinI stimulator*) (Maiato et al., 2004a).

A camada mais profunda do cinetocoro, e imediatamente adjacente ao centrômero, designa-se de lâmina interna e consiste numa estrutura cromatínica contendo nucleossomas e uma isoforma especializada da histona H3 (CENP-A), proteínas auxiliares constitutivas, que compõem o complexo CCAN (*Constitutive centromeric-associated network*) e sequências altamente repetitivas de ADN satélite. A composição e organização deste ADN permanecem um dos aspectos menos compreendidos do cinetocoro animal. A proteína CENP-A é necessária para o recrutamento das proteínas da lâmina interna, CENP-C, CENP-H e CENP-I/Mis6 e, sabe-se, que é das primeiras proteínas a ligar-se durante a estruturação do cinetocoro (Maiato *et al.*, 2004a).

A lâmina externa é constituída, principalmente, por proteínas e, nos vertebrados, contém cerca de vinte locais de ligação para as extremidades (+) dos microtúbulos cinetocorianos. A região ultraperiférica do cinetocoro forma uma coroa fibrosa visualizada, por microscopia electrónica convencional, geralmente, apenas na ausência de microtúbulos. É composta por uma rede dinâmica de componentes efectivos e transitórios envolvidos no *checkpoint* mitótico e na regulação da ligação e comportamento dos microtúbulos (Chan *et al.*, 2005; Maiato *et al.*, 2004a).

A nível molecular, a composição do cinetocoro em vários organismos estudados, anuncia a existência de um número surpreendente de proteínas, levando à dificuldade em descrever, de uma forma linear simples, os dados obtidos até então. No entanto, evidências moleculares apoiam a existência de uma ordem temporal para o seu surgimento no cinetocoro que reflecte, de certa forma, uma relação hierárquica entre elas. Algumas proteínas, como a CENP-F, uma proteína da lâmina externa, surge entre a fase G2 tardia e o início da prófase, enquanto outras como a CENP-E e a dineína, não surgem até se assistir à quebra do invólucro nuclear (Chan *et al.*, 2005).

A identificação de múltiplos subcomplexos conservados incentivou à procura das suas funções e das contribuições para diferentes processos, como a monitorização das ligações estabelecidas entre os cinetocoros e os microtúbulos que previnam a entrada em anafase na presença de cinetocoros livres e assegurem a fidelidade da segregação cromossómica, a própria estruturação do cinetocoro e a ligação dos microtúbulos, incluindo a formação de um núcleo de ligação (Cheeseman e Desai, 2008).

As proteínas que compõem o cinetocoro podem ser agrupadas tendo em conta se a sua concentração permanece constante ou varia durante a mitose e se o seu *turnover* varia rápida ou lentamente nos seus locais de ligação ao cinetocoro. As proteínas que permanecem num nível constante desde a profase até à anafase B incluem os elementos constitutivos da lâmina interna como as proteínas CENP-A, CENP-C, CENP-H e CENP-I que estão ligados à cromatina associada ao cinetocoro, durante todo o ciclo celular, e os

componentes estáveis da lâmina externa, como o complexo Ndc80, as proteínas KNL, MIS e a CENP-F. Os componentes dinâmicos, que alteram a sua concentração no decurso da mitose, incluem os motores moleculares como a CENP-E (Yen *et al.*, 1992) e a dineína/dinactina (Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990) e as proteínas intervenientes no *checkpoint* mitótico (Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Bub3, Cdc20). Estas proteínas estão fortemente presentes nos cinetocoros, aquando da ausência de microtúbulos e reduzem, significativamente, a sua localização particularmente, na presença de ligações estáveis entre os cinetocoros e os microtúbulos (Hoffman *et al.*, 2001). Contrariamente ao facto de algumas proteínas serem depletadas dos cinetocoros quando estes estão associados aos microtúbulos (Hoffman *et al.*, 2001), outros componentes como EB1, APC e proteínas da família Ran (RanGap1 e RanBP2) só se localizam quando a ligação cinetocoro-microtúbulos ocorre (Maiato *et al.*, 2004a; Salina *et al.*, 2003; Tirnauer *et al.*, 2002).

As funções do cinetocoro incluem a ligação dos cromossomas aos microtúbulos do fuso, a activação da via de sinalização (*checkpoint* mitótico) que atrasa a progressão ao longo do ciclo celular quando alguma anomalia é detectada e contribuiu para potenciar o movimento dos cromossomas no fuso mitótico (Maiato *et al.*, 2004a).

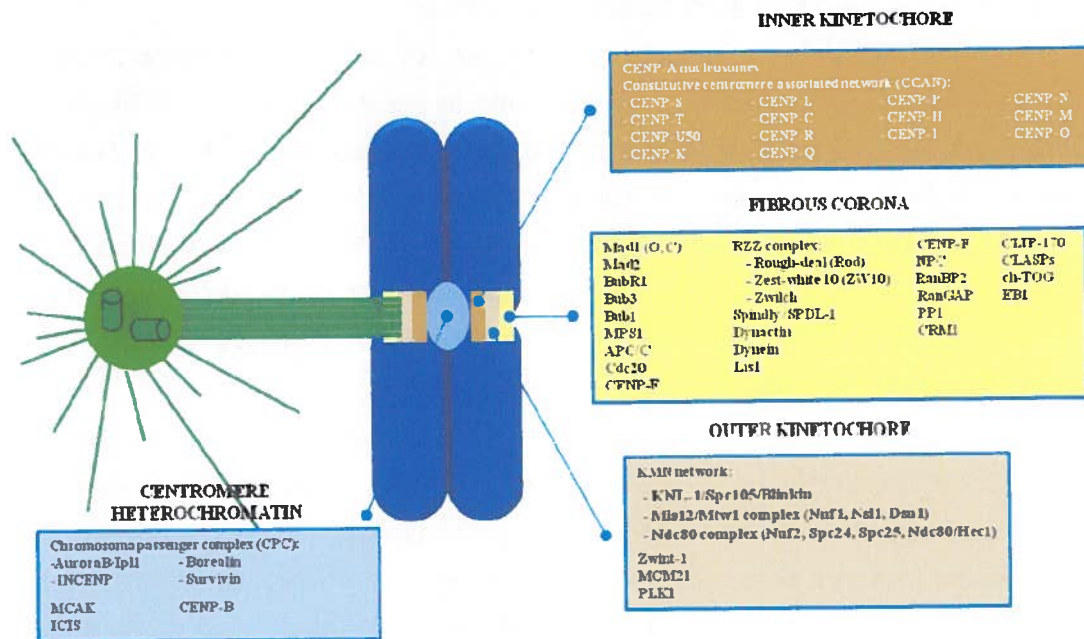


Figura 9. Estrutura do cinetocoro. O cinetocoro, nas células animais, apresenta-se como uma estrutura trilaminar constituída por uma lâmina interna, uma lâmina externa e uma coroa fibrosa. Cada uma das camadas contempla um determinado número de proteínas agrupadas de acordo com a sua função. CENP: centromere protein; INCENP: inner centromere protein; CPC: chromosome passenger complex; MCAK: mitotic centromere-associated kinesin; NPC: nuclear pore complex; APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome; RZZ: Rod (rough deal)–Zw10 (zeste white10)–Zwilch complex; Ska1-3: spindle and kinetochore-associated proteins; Bub1-BubR1-Bub3: budding uninhibited by benzimidazole; Mad1-Mad2: mitotic-arrest deficient; Cdc20:

cell division cycle 20; CLASP: CLIP-associating protein; CLIP170: cytoplasmic linker protein-170; EB1: end-binding protein-1; LIS1: lissencephaly-1; Mps1: multipolar spindle-1; PLK1: polo-like kinase-1; RanBP2: Ran-binding protein 2; RanGAP: Ran-GTPase-activating protein; Zwint: Zw10 interactor.

4.3. CONGRESSÃO E ALINHAMENTO DOS CROMOSSOMAS

A segregação das cromátidas irmãs, durante a mitose, depende, fundamentalmente, de forças geradas pelos microtúbulos que se ligam aos cinetocoros e a sua fidelidade resulta da execução ordenada de um processo sequencial (Figura 10). Inicialmente os cinetocoros interagem com a superfície lateral de um microtúbulo proveniente de um dos pólos do fuso mitótico, com consequente transporte polar do cinetocoro. A ligação lateral, até então estabelecida, é convertida numa ligação perpendicular (*end-on*), com o cinetocoro ligado às extremidades (+) dos microtúbulos cinetocorianos. Segue-se o momento em que os cinetocoros irmãos se ligam aos microtúbulos dos pólos opostos, assistindo-se ao processo de bi-orientação dos cromossomas (Tanaka, 2010). Ao modelo amplamente aceite para explicar as interações estabelecidas entre os cinetocoros e os microtúbulos foi atribuída a designação de “*Search and Capture*” (Kirschner e Mitchison, 1986). Nas células dos metazoários, como os centrosomas se localizam fora do núcleo durante a interfase, os microtúbulos só conseguem interagir com os cinetocoros após a ruptura do invólucro nuclear, no início da mitose (Tanaka, 2010). Dada a desintegração do invólucro nuclear, que marca a transição da profase para a prometáfase, os cromossomas ficam livres no citoplasma tornando-se, agora, acessíveis aos microtúbulos do fuso mitótico. Estes, por sua vez, sondam o citoplasma em várias direcções, através de episódios de polimerização e despolimerização de forma a capturar os cromossomas. Esta característica exibida pelos microtúbulos designa-se de instabilidade dinâmica e define-se, num nível simples de descrição, como um mecanismo alternado de dois estados reversíveis dos microtúbulos – crescimento e retracção. Quando a transição ocorre no sentido do crescimento para a retracção designa-se de catástrofe e, o contrário, de “*rescue*”. Este processo é dependente do consumo de energia, que provém da hidrólise de uma molécula de GTP associada a cada dímero de tubulina (Cheeseman e Desai, 2008; Dumont e Mitchison, 2009; Gatlin e Bloom, 2010; Holy e Leibler, 1994; Mitchison e Kirschner, 1984). Apesar dos monómeros de tubulina apresentarem a mesma estrutura geral e os dois se ligarem a uma molécula de GTP, o α -tubulina liga-se de uma forma irreversível e não é capaz de hidrolisá-la, enquanto o β -tubulina a hidrolisa a GDP (Downing e Nogales, 1998). Comparativamente a outras GTPases, a tubulina, mediante

hidrólise de GTP, é capaz de alterar a sua conformação e, conseqüentemente, a afinidade para os microtúbulos, sendo que a configuração GTP apresenta maior afinidade relativamente à GDP. Durante o processo de polimerização, o GTP proveniente da β -tubulina que compõe o heterodímero é hidrolisado e convertido a GDP, originando microtúbulos menos instáveis, que rapidamente despolimerizam. No entanto, a presença de uma capa de GTP-tubulina associada à extremidade (+) dos microtúbulos garante estabilidade suficiente do protofilamento, que permita o crescimento (Dumont e Mitchison, 2009; Gatlin e Bloom, 2010; Howard e Hyman, 2009).

Um único microtúbulo proveniente do centrossoma é suficiente para iniciar o alinhamento dos cromossomas despoletando um rápido movimento, em direcção aos pólos, dos cromossomas mono-orientados, após a interacção lateral inicial do cinetocoro com a superfície do microtúbulo (Maiato *et al.*, 2004a; Rieder e Alexander, 1990). A superfície lateral dos microtúbulos providencia uma maior área de contacto, comparativamente com as suas extremidades, contribuindo de uma forma mais efectiva para um primeiro encontro com os cinetocoros (Tanaka, 2010). A proteína CENP-E, associada ao cinetocoro desde a prometáfase até à anáfase, foi descrita como interveniente no encontro inicial dos cinetocoros com os microtúbulos (Cooke *et al.*, 1997). O movimento em direcção aos pólos é, particularmente, importante quando os cinetocoros estão afastados do fuso mitótico sendo, provavelmente, desencadeado pela actividade motora da dineína citoplasmática (Sharp *et al.*, 2000; Vaisberg *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996; Vorozhko *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007b). A dineína citoplasmática desempenha várias funções durante a mitose, sendo recrutada para o cinetocoro através do complexo RZZ [constituído pelas proteínas Rough-deal (ROD), Zeste-white 10 (ZW10), e Zwilch], via a proteína spindly (Barisic *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2009; Gassmann *et al.*, 2008; Griffis *et al.*, 2007; Karess, 2005; Starr *et al.*, 1998). Isoladamente, a dineína apresenta uma capacidade motora diminuta e, como tal, liga-se a outras proteínas acessórias como o complexo dinactina que activa e potencia a sua função, *in vivo*, como motor molecular (Bader e Vaughan, 2010; King e Schroer, 2000). A sobreexpressão de uma subunidade do complexo dinactina, a dinamitina (p50), provoca ruptura da integridade da dinactina e, é usada para inactivar a proteína dineína (Burkhardt *et al.*, 1997; Echeverri *et al.*, 1996). A proteína spindly foi descrita, por Griffis *et al.*, como necessária ao recrutamento da dineína para o cinetocoro, sendo que a sua depleção provoca um fenótipo severo de má segregação cromossómica (Chan *et al.*, 2009; Griffis *et al.*, 2007). Até então, as análises funcionais acerca da dineína cinetocoriana eram realizadas mediante depleção dos componentes do complexo RZZ (Civril e Musacchio, 2008).

Quando a proximidade dos cromossomas ao centróssoma é considerável, onde a densidade de microtúbulos é muito superior, a ligação lateral pré-estabelecida é convertida numa ligação perpendicular tipicamente denominada de "end-on", onde a extremidade (+) dos microtúbulos está directamente inserida no cinetocoro (Odde, 2005; Przewloka e Glover, 2009). Em *C. elegans*, o complexo RZZ e a proteína spindly/SPDL-1 foram referenciados como necessários para esta conversão (Gassmann *et al.*, 2008). Também um complexo formado por três proteínas, Ska1, Ska2 e Ska3, foi descrito, em células de vertebrados, como interveniente no estabelecimento de ligações perpendiculares cinetocoros-microtúbulos (Gaitanos *et al.*, 2009; Guimaraes e Deluca, 2009; Hanisch *et al.*, 2006). As forças de ejeção polares, forçam os cromossomas mono-orientados a mover-se em direcção à zona equatorial do fuso, um fenómeno designado de congressão cromossómica (Kops *et al.*). Além deste mecanismo, os cromossomas mono-orientados, em células de metazoários, podem ser transportados para a zona equatorial, deslizando ao longo dos microtúbulos ligados a cromossomas já bi-orientados, por intermédio da proteína CENP-E (Kapoor *et al.*, 2006).

Um modelo proposto por Khodjakov *et al.*, descreve um mecanismo alternativo para o estabelecimento da ligação bipolar onde os microtúbulos são nucleados a partir dos cinetocoros, capturados e puxados para a região centrossómica por intermédio de interacções com os microtúbulos do fuso mitótico (Khodjakov *et al.*, 2003; Kitamura *et al.*, 2010; Maiato *et al.*, 2004b).

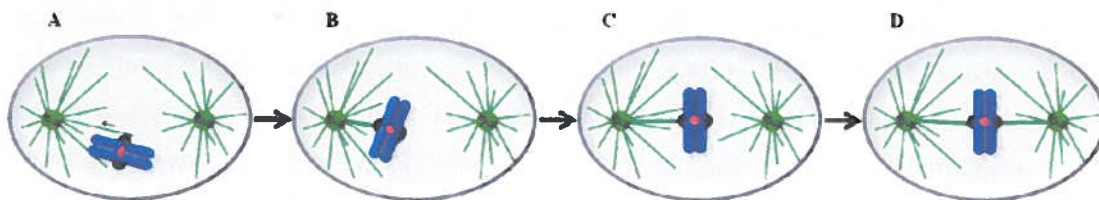


Figura 10. Processo de bi-orientação dos cromossomas durante a prometáfase. Após a desintegração do invólucro nuclear, o cinetocoro é capturado pela superfície lateral do microtúbulo proveniente de um dos pólos do fuso mitótico (A) resultando no transporte do cromossoma em direcção a esse pólo (seta). A elevada densidade de microtúbulos perto do pólo contribuiu para a maturação da ligação lateral, inicialmente estabelecida, numa ligação do tipo "end-on", com os cinetocoros ligados à extremidade (+) dos microtúbulos (B). As forças de ejeção polares e/ou o deslizamento ao longo dos microtúbulos já ligados ao cinetocoro do cromossoma bi-orientado conduz o cromossoma mono-orientado em direcção à placa metafásica (C), resultando na sua bi-orientação (D).

4.4. ERROS DE LIGAÇÃO E MECANISMOS DE CORRECÇÃO

Na metafase, os cromossomas encontram-se bi-orientados, com cada cinetocoro irmão ligado, exclusivamente, aos microtúbulos que provêm de pólos opostos do fuso mitótico. Esta configuração, designada de ligação anfitélica, é a única que garante uma correcta segregação das cromátidas-irmãs entre as duas células filhas, durante a anafase (Tanaka, 2005; Tanaka, 2008). Contudo, durante a transição de prometafase para metafase, alguns cromossomas podem atrasar-se na ligação aos microtúbulos ou ligar-se de forma incorrecta (Cheeseman e Desai, 2008). Este facto, aliado à natureza estocástica das interações entre os cinetocoros e os microtúbulos, ao posicionamento dos cromossomas após a desintegração do invólucro nuclear, bem como à geometria dos cinetocoros irmãos relativamente aos microtúbulos, faz deste um processo propenso a erros de ligação, existindo três possibilidades de conexões incorrectas: a ligação monotélica, a sintélica e a merotélica (Figura 11) (Chan *et al.*, 2005; Tanaka, 2008).

A ligação monotélica ocorre quando um dos cinetocoros está ligado aos microtúbulos de um dos pólos do fuso mitótico, enquanto o outro permanece livre. É frequente no início da mitose e, geralmente, trata-se de uma configuração normal no início da prometafase. A ligação sintélica tem lugar, embora raramente, quando os dois cinetocoros irmãos estão ligados aos microtúbulos provenientes do mesmo pólo. Quer a ligação monotélica quer a sintélica activam o mecanismo de *checkpoint* mitótico, devido à reduzida tensão existente entre os cinetocoros irmãos e são, geralmente, corrigidos e convertidos numa configuração anfitélica. Quando um dos cinetocoros está ligado aos microtúbulos dos dois pólos do fuso, designa-se à ligação estabelecida de merotélica e acontece, com frequência, no início da prometafase. Este tipo de ligação não interfere com o alinhamento dos cromossomas durante a prometafase e nem sempre é detectada pelo *checkpoint* mitótico. Contudo, raramente causam má segregação cromossómica pois, geralmente, são corrigidas antes do início da anafase através de um mecanismo dependente da actividade da proteína cinase Aurora B (Kelly e Funabiki, 2009; Tanaka, 2005; Tanaka, 2008).

A tensão exercida entre os cinetocoros irmãos contribui para a detecção e correcção das ligações sintélicas e merotélicas. Numa ligação anfitélica, os cinetocoros irmãos estão sob tensão, resultante das forças exercidas sobre os microtúbulos do fuso em direcções opostas. Nicklas *et al.*, sugeriram que a tensão mecânica ao nível dos cinetocoros aumenta a ocupação dos locais de ligação aos microtúbulos, contribuindo para o estabelecimento de ligações cinetocoro-microtúbulos estáveis (King e Nicklas, 2000; Nicklas *et al.*, 1995). É amplamente aceite que a tensão é o sinal que distingue diferentes estados de ligação dos cinetocoros irmãos e que a cinase Aurora B (Ipl1 em

levedura) actua como sensor de tensão corrigindo as ligações incorrectas ao destabilizá-las (Kelly e Funabiki, 2009; Liu e Lampson, 2009). Localizada no centrómero, regula as interacções cinetocoros-microtúbulos através da fosforilação do complexo Ndc80 e da cinesina MCAK (Ruchaud *et al.*, 2007a). Um modelo de separação espacial foi proposto para tentar explicar de que forma a tensão medeia a correcção de ligações incorrectas pela Aurora B (Tanaka *et al.*, 2002). A baixa tensão experimentada pelos cinetocoros ligados de forma sintética aos microtúbulos e a tensão desequilibrada resultante de uma ligação merotética localizam os cinetocoros perto de um pico da actividade cinase da Aurora B, que liberta os microtúbulos como consequência da fosforilação do complexo Ndc80 e da cinase MCAK. A fosforilação do complexo Ndc80 diminui a sua afinidade para os microtúbulos, enquanto a fosforilação da cinase MCAK catalisa a despolimerização das extremidades dos microtúbulos (Cheeseman *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2004). A destabilização selectiva das ligações incorrectas providencia uma nova oportunidade para a bi-orientação. Esta condição aumenta a distância entre os cinetocoros e o centrómero, devido às forças opostas exercidas pelos microtúbulos do fuso. Consequentemente, a Aurora B torna-se, especialmente, separada dos seus substratos e as ligações são estabilizadas. No modelo de separação espacial, uma fosfatase constitutivamente activa, como a PP1 (proteína fosfatase 1) desfosforila os substratos da cinase Aurora B, permitindo uma rápida re-ligação (Liu e Lampson, 2009). Outros modelos são possíveis para os mecanismos pelos quais a proteína Aurora B regula as ligações cinetocoros-microtúbulos, sublinhando a necessidade de clarificar a natureza molecular do processo através do qual as ligações incorrectas são detectadas e corrigidas (Kelly e Funabiki, 2009; Liu e Lampson, 2009).

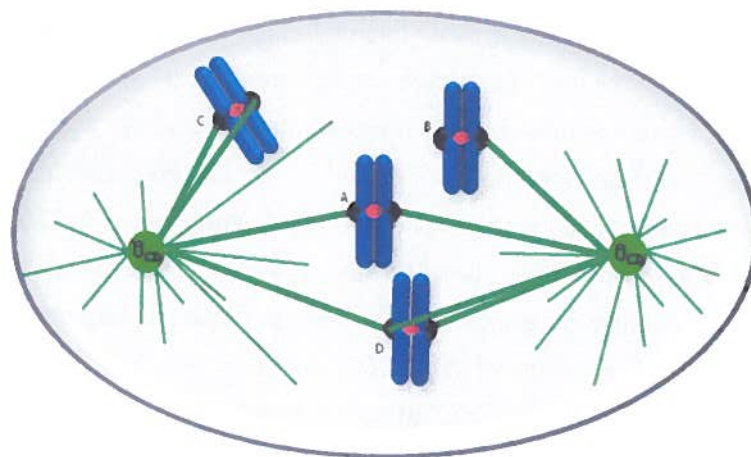


Figura 11. Bi-orientação e erros de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos. (A) Numa ligação anafitética, os cinetocoros irmãos estão correctamente ligados aos microtúbulos provenientes dos pólos opostos do fuso mitótico, levando à bi-orientação dos cromossomas. (B)

Numa ligação do tipo sintética, os cromossomas encontram-se mono-orientados, com os dois cinetocoros irmãos ligados aos microtúbulos emanados do mesmo pólo. (D) Numa ligação merotética, um dos cinetocoros irmãos está ligado, simultaneamente, aos microtúbulos provenientes dos dois pólos, estando o cromossoma incorrectamente bi-orientado.

5. OBJECTIVOS

O presente trabalho tem como objectivos estudar: 1) o papel da dineína na ligação cinetocoro-microtúbulos e na congressão dos cromossomas, recorrendo à depleção directa da dineína, por RNAi, e à sua deslocalização do cinetocoro por depleção da proteína spindly e 2) a relação funcional entre a dineína e as proteínas do *checkpoint* mitótico, especificamente a proteína Bub3, na regulação das interacções cinetocoro-microtúbulos.

A dineína citoplasmática é uma proteína motora com direcção à extremidade menos dos microtúbulos. A nível estrutural, é constituída por duas cadeias pesadas (DHC), com actividade motora, e várias subunidades não catalíticas designadamente, cadeias intermediárias (DIC), leves intermediárias e cadeias leves (Kardon e Vale, 2009; Liang *et al.*, 2007). Está envolvida em funções celulares que implicam movimento dependente dos microtúbulos como, por exemplo, na mitose, migração celular e transporte de organelos e de proteínas (Hirokawa *et al.*, 1998; Karki e Holzbaur, 1999; Vallee *et al.*, 2004). É uma das várias proteínas motoras essenciais para a mitose nas células animais. Durante a mitose, a dineína encontra-se localizada nos pólos do fuso mitótico e no córtex celular, envolvida na formação do fuso e a sua orientação, respectivamente (Busson *et al.*, 1998; O'connell e Wang, 2000; Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990). Uma fracção da dineína localiza-se nos cinetocoros livres e desloca-se para os pólos após a ligação destes aos microtúbulos. Esta dineína cinetocoriana está implicada nas fases iniciais da bi-orientação, mediando a ligação tangencial dos microtúbulos aos cromossomas durante a prometáfase e no transporte destes aos pólos, promovendo assim as ligações *end-on*. Tem sido sugerido um papel directo da dineína no estabelecimento das ligações *end-on* (Li *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007b). No entanto, os estudos que sugeriram esta função da dineína cinetocoriana basearam-se na deslocalização da dineína do cinetocoro, através da depleção das proteínas associadas (Chan *et al.*, 2000; Gassmann *et al.*, 2008; Griffis *et al.*, 2007; Kops *et al.*, 2005a; Stehman *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007b) ou na inibição da sua actividade (Howell *et al.*, 2001). No entanto, fica por esclarecer se tal função se verifica na ausência da dineína, justificando assim o primeiro objectivo deste trabalho.

Adicionalmente à sua função na sinalização do *checkpoint* mitótico, algumas proteínas participam na promoção e/ou manutenção das ligações bipolares entre os

cinetocoros e os microtúbulos. Destacam-se as proteínas Bub3, Bub1 e BubR1 que formam parte do complexo MCC, descrito anteriormente. Ditchfield *et al.* foram os primeiros a descrever a existência de uma dupla função para a proteína BubR1, no mecanismo de *checkpoint* mitótico e nas interações cinetocoros-microtúbulos (Ditchfield *et al.*, 2003). Com recurso ao RNA de interferência verificaram que a cultura transfectada com siRNAs contra a proteína BubR1 exibia prometáfases com cromossomas posicionados ao longo do comprimento do fuso mitótico em vez de alinhados na placa metafásica. Subsequentemente, num estudo em *Xenopus*, foi demonstrada a interacção da proteína BubR1 com duas proteínas associadas às extremidades (+) dos microtúbulos – APC e EB1 – providenciando uma possível ligação para a formação das ligações estáveis cinetocoros-microtúbulos (Zhang *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram que a perda da proteína Bub1 compromete a formação das ligações *end-on* levando a uma acumulação das ligações laterais entre os cinetocoros e os microtúbulos (Gillett *et al.*, 2004; Meraldi e Sorger, 2005). Igualmente com recurso à técnica de RNA de interferência, foi demonstrado que a depleção da proteína Bub3 compromete o alinhamento, na placa equatorial, de uma fracção significativa de cromossomas e que o fenótipo observado se deve ao incorrecto estabelecimento das ligações cinetocoros-microtúbulos (Logarinho *et al.*, 2008). Em semelhança com as proteínas BubR1 e Bub1, a proteína Bub3 demonstrava, assim, ter uma participação activa na promoção das ligações correctas cinetocoros-microtúbulos além do seu papel na sinalização do *checkpoint* mitótico. O mesmo estudo demonstrou a importância das proteínas Bub3 e Bub1 no estabelecimento das ligações perpendiculares e da proteína BubR1 na sua manutenção e estabilidade (Logarinho e Bousbaa, 2008; Logarinho *et al.*, 2008).

Todavia, é provável que o papel das proteínas do *checkpoint* mitótico na ligação cinetocoro-microtúbulos, em vez de ser directo, envolva uma relação funcional com as proteínas da maquinaria da ligação. Assim, o segundo objectivo do trabalho visa elucidar este aspecto, incidindo na relação funcional entre as proteínas Bub3 e dineína. O facto de ter sido descrita a existência de uma interacção entre a proteína dineína, especificamente uma cadeia leve (DYNLT3), e a proteína Bub3 e de ambas proteínas estarem envolvidas nas interações cinetocoros-microtúbulos (Lo *et al.*, 2007), orientou a nossa escolha destas proteínas. Pretende-se, então, proceder a uma análise compreensiva da relação funcional na ligação cinetocoro-microtúbulos entre a Bub3 e a dineína, através da caracterização do fenótipo resultante da depleção, individual e em simultâneo, das duas proteínas, no contexto da depleção da dineína por RNAi e no contexto da sua deslocalização do cinetocoro por depleção da proteína spindly.

PARTE II.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

De forma a responder aos objectivos inicialmente propostos foi delineado um desenho experimental abaixo representado.

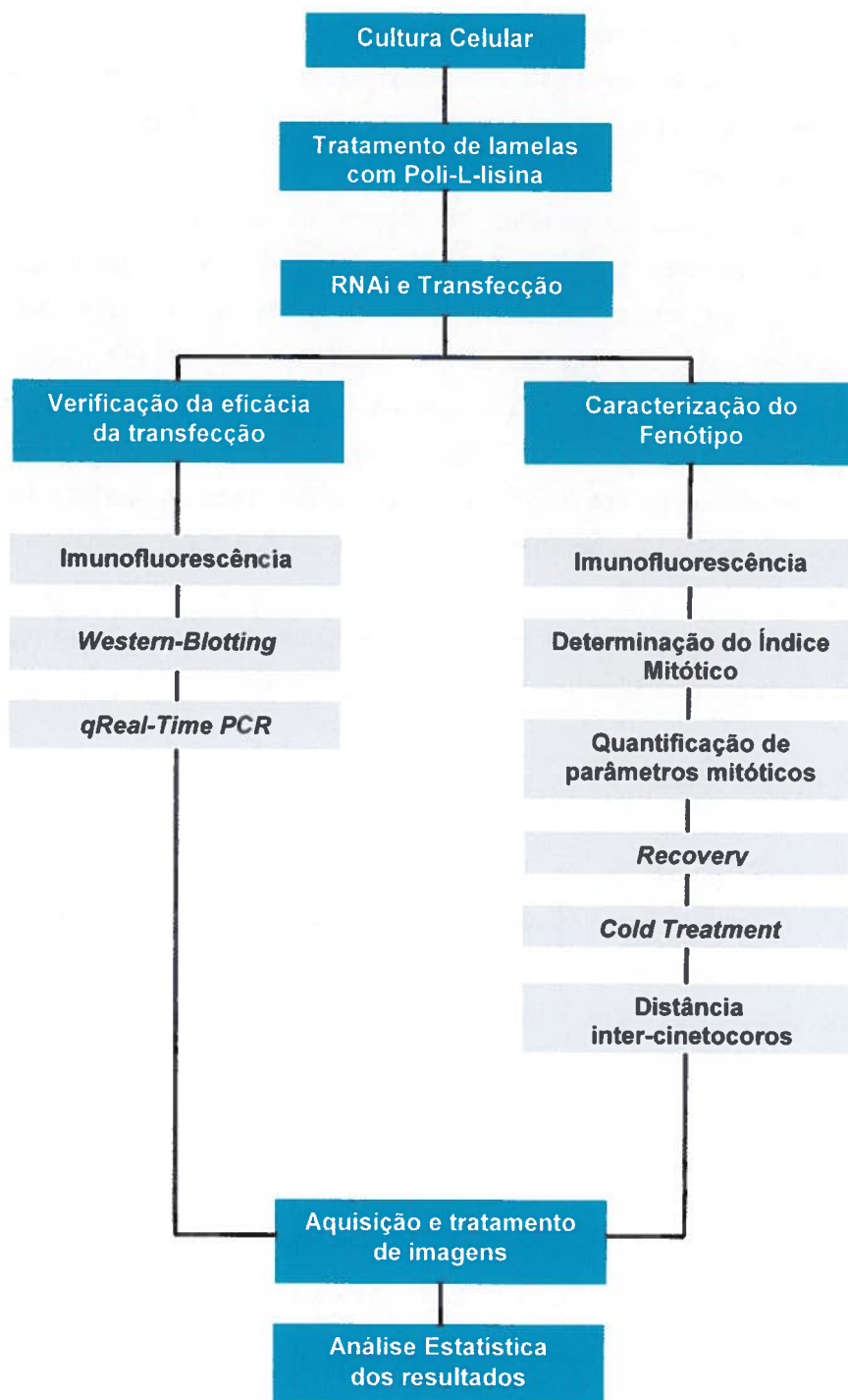


Figura 12. Representação esquemática do desenho experimental delineado.

1. CULTURA CELULAR

1.1. LINHA CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

Utilizou-se, para o presente estudo, a linha celular HeLa derivada do carcinoma do cólo do útero (Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto). Recorreu-se, também, a uma linha estável de HeLa que expressa a GFP-Bub3 (Centro de Investigação em Ciências da Saúde/CESPU).

A linha celular HeLa foi crescida em frascos de cultura de 25 cm² (Orange Scientific) em meio Dulbecco's Modified Eagle Médium, DMEM, contendo Glutamina (PAA, The Cell Culture Company) e suplementado com 10% (v/v) de Soro Bovino Fetal (FBS) e 1% (v/v) de antibiótico-antimicótico – 100U/mL de Penicilina-G, 100mg/mL de Estreptomicina (GIBCO, Invitrogen). Adicionalmente, a linha estável de HeLa GFP-Bub3, foi suplementada com 50 mg/mL de G418 (GIBCO, Invitrogen). As células foram mantidas, em monocamada e em crescimento exponencial, numa incubadora (Hera Cell Incubator, Heraeus), a uma temperatura constante de 37°C e numa atmosfera húmida, com 5% de CO₂.

Todos os procedimentos que envolveram manipulação celular foram realizados numa Câmara de Segurança Biológica Nível II (Telstar, Bio-II-A/P).

1.2. SUBCULTURA

A subcultura possibilitou a manutenção do crescimento celular de forma exponencial e favorável, sem que as células atinjam uma confluência que inviabilizasse a sua utilização em procedimentos experimentais, em condições ótimas. Foi realizado semanalmente, duas a três vezes, quando as células apresentavam uma confluência na ordem dos 80%.

Após observação do estado da cultura celular, ao microscópio invertido (Olympus, CK X 41), removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada de células, aderentes à base do frasco, com uma solução isosmótica salina – PBS (147 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 0,5 mM KH₂PO₄; 3,2 mM Na₂HPO₄ e 5,5 mM Glucose; pH 7,4). Incubou-se com 0,25% (m/v) de Tripsina-EDTA 1x (GIBCO, Invitrogen), durante, aproximadamente, 2-5 minutos, a 37°C. Observou-se, ao microscópio, o completo destacamento das células e interrompeu-se a acção enzimática da Tripsina com a adição de meio completo DMEM. Retirou-se 30 µl da suspensão celular e adicionou-se 30 µl do corante de exclusão 0,4% (v/v) Trypan Blue (Sigma). Procedeu-se à contagem das células numa câmara de

Neubauer e determinou-se a densidade celular. A densidade celular é calculada pela divisão entre o número de células contadas e o número de quadrantes, multiplicada pelo factor de diluição (2) e pela constante de conversão (10^4). Num novo frasco de cultura de 25 cm^2 , colocou-se 5 mL de meio completo DMEM e a quantidade de células necessária para uma concentração final de $0,08 \times 10^6$ células/mL (4 dias) ou $0,16 \times 10^6$ células/mL (3 dias).

Todas as soluções utilizadas foram previamente aquecidas, num banho-maria, a 37°C (Precistern).

1.3. CONGELAMENTO DE LINHAS CELULARES

Procedeu-se ao destacamento das células, do modo acima descrito, e centrifugou-se a suspensão celular obtida a 1000 rpm, durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em meio de congelação – meio DMEM com 10% (v/v) de DMSO (Invitrogen). Transferiu-se a suspensão para um criotubo e colocou-se em Isopropanol durante, aproximadamente, 6 horas, a -80°C para um arrefecimento gradual ($1^\circ\text{C}/\text{minuto}$). Armazenou-se o criotubo em azoto líquido.

1.4. DESCONGELAMENTO DE LINHAS CELULARES

Aqueceu-se, rapidamente, o criotubo em banho-maria a 37°C . Transferiu-se, cuidadosamente, a suspensão celular descongelada para um frasco de cultura de 25 cm^2 contendo meio completo DMEM pré-aquecido. Incubou-se, no mínimo, durante 6 horas, e renovou-se o meio de cultura.

2. TRATAMENTO DE LAMELAS COM POLI-L-LISINA

A finalidade deste procedimento foi promover a aderência das células ao vidro, evitando uma perda significativa de células, especialmente mitóticas, nos procedimentos experimentais subsequentes.

Colocaram-se lamelas $22 \times 22\text{ mm}$ num gobelé contendo uma solução de HCl 1M e deixou-se a incubar, durante 16 horas, a 56°C . Arrefeceu-se a solução, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Lavaram-se as lamelas com água destilada (5 vezes) e, seguidamente, com água bidestilada (5 vezes). Mergulhou-se as lamelas em Etanol a 100% (reutilizável para um passo subsequente), retirou-se da solução e limpou-se, em

papel, uma de cada vez. Dividiram-se as lamelas por caixas de Petri e verteu-se, de forma a cobri-las totalmente, uma solução a 500 μ g/mL de Poli-L-Lisina (Sigma). Colocou-se numa incubadora, com agitação rotativa, durante 1 hora. Recolheu-se a solução de Poli-L-Lisina e procedeu-se à lavagem das lamelas em água destilada e bidestilada (5 vezes cada). Mergulhou-se as lamelas, novamente, em Etanol a 100% (reservado anteriormente). Retirou-se da solução e limpou-se, delicadamente, cada uma das lamelas. Distribuiu-se por caixas de Petri secas, selou-se com parafilme e guardaram-se as caixas devidamente identificadas.

3. RNA DE INTERFERÊNCIA E TRANSFEÇÃO

A técnica de RNA de interferência (RNAi) foi utilizada para possibilitar a depleção, das proteínas Bub3, dineína e spindly. Para tal, recorreu-se à utilização de oligonucleótidos específicos de RNA (siRNAs), com cerca de 20-25 nucleótidos, dirigidos contra a sequência de mRNA do gene alvo. Os oligonucleótidos empregues, siBub3, siDHC e siSpindly, foram obtidos comercialmente (SantaCruz Biotechnology) e optimizadas as concentrações a utilizar de cada um de forma a potencializar a eficácia do silenciamento génico.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (Orange Scientific), contendo lamelas de 22x22 mm tratadas com Poli-L-Lisina, com uma densidade de 0,045x10⁶ células/poço e em meio DMEM sem antibiótico. A transfecção foi realizada 24 horas após as células terem sido plaqueadas, apresentando uma confluência entre 30-50%.

Seguindo as instruções do fabricante, preparou-se uma mistura de meio Opti-MEM I (GIBCO) com Oligofectamina (Invitrogen) para o número de poços a transfectar, tendo em conta que por poço a quantidade a adicionar é de 15 μ l e de 3 μ l, respectivamente. Deixou-se actuar, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, promovendo a formação de micelas lipídicas que possibilitam a internalização dos siRNAs nas células. Prepararam-se tubos correspondentes aos siBub3, siDHC, siBub3/siDHC e siSpindly e em cada um colocou-se a quantidade necessária de Opti-MEM I (184,4 μ l por poço a transfectar), de siRNA (6,7 nM de siBub3/poço, 13,3 nM de siDHC/poço e 13,3 nM de siSpindly/poço) e da mistura preparada anteriormente (Opti-MEM I e Oligofectamina) e deixou-se incubar durante 20 minutos. Adicionou-se, então, o *cocktail* de transfecção aos respectivos poços e passadas 24 horas substituiu-se o meio de transfecção por meio DMEM completo. Os resultados da transfecção foram avaliados 72 horas mais tarde.

O Opti-MEM I, o meio de transfecção e o meio DMEM completo foram aquecidos a 37°C antes da sua utilização e os siRNAs foram mantidos no gelo ao longo do procedimento.

4. VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DA TRANSFECCÃO

Para avaliar a eficácia do silenciamento das proteínas Bub3, dineína e spindly, 72 horas após se ter efectuado a transfecção, recorreu-se a três métodos distintos, imunofluorescência, *Western-Blotting* e *qReal-Time PCR*.

4.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA

De acordo com a marcação a realizar foram adoptados dois métodos de fixação diferentes. Para comprovar a depleção da proteína dineína as células foram fixadas em Metanol a -20°C e, para verificar o silenciamento das proteínas Bub3 e spindly fixadas com 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x).

Na fixação com Metanol a -20°C recolheu-se, inicialmente, o meio de cultura dos diferentes poços e substituiu-se por Metanol a -20°C, durante 45 minutos. Rehidratou-se com uma solução TBST (0,15 M NaCl; 0,02 M Tris-Cl; 0,1% (v/v) Triton X-100), três vezes, 5 minutos. Seguiu-se o bloqueio com 2% (v/v) de BSA em TBST (1x), durante 10 minutos. Incubou-se com o anticorpo primário respectivo (Tabela 1), diluído em solução de bloqueio, durante 90 minutos. Lavou-se, três vezes, durante 5 minutos em TBST (1x) e incubou-se com o anticorpo secundário (Tabela 1), 60 minutos. Efectuou-se, novamente três lavagens em TBST (1x) e montou-se as lamelas, sobre lâminas de vidro, com 6-8 µl de Vectashield (Vector) contendo 0,5 µg/ml de DAPI (Sigma).

Na fixação com 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x), recolheu-se o meio de cultura dos diferentes poços e substituiu-se por 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x), preparado de fresco, durante 12 minutos. Lavou-se, três vezes, com PBS (1x), durante 5 minutos cada. Procedeu-se à extracção utilizando-se uma solução de 0,2% (v/v) de Triton X-100 em PBS (1x) durante 7 minutos, à temperatura ambiente e lavou-se em PBS (1x), três vezes, durante 5 minutos. Procedeu-se ao bloqueio das reacções inespecíficas com 10% (v/v) de FBS numa solução salina de PBST 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,4 mM K₃HPO₄, 1 mM NaHPO₄, 0,05% de Tween20, pH 7.2), durante 30 minutos. Sem lavar, incubou-se com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em 5% (v/v) de FBS em PBST (1x), durante 60 minutos. Seguiram-se três lavagens, de 5 minutos cada, em PBST (1x) e incubou-se com os anticorpos secundários (Tabela 1),

novamente, durante uma hora. Lavaram-se as lamelas duas vezes durante 5 minutos cada, em PBST (1x) e uma última vez em PBS (1x). Procedeu-se à montagem das lamelas, como descrito acima.

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários usados na técnica de imunofluorescência, para comprovação do silenciamento das proteínas Bub3, dineína e spindly. Os anticorpos *Human anti-CREST* e *Mouse anti-DIC* foram utilizados na fixação com Metanol a -20°C e os restantes anticorpos na fixação com 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x).

	Anticorpos	Diluição	Empresa
Primários	Human anti-CREST	1:1500	Oferta E. Bronze, IBMC, Porto, Portugal
	Mouse anti-DIC	1:1000	Sigma
	Mouse anti-BUBR1	1:600	Chemicon
	Rabbit anti- α -tubulina	1:100	Abcam
	Mouse anti-spindly	1:600	Sigma
Secundários	Alexa 568, anti-human	1:1500	Molecular Probes
	Alexa 488, anti-mouse		
	Alexa 568, anti-mouse		
	Alexa 568, anti-rabbit		
	Alexa 488, anti-rabbit		

4.2. WESTERN-BLOTTING

Esta técnica foi utilizada para comprovar depleção da proteína Bub3, na linha estável de HeLa que expressava GFP-Bub3.

A primeira etapa consistiu na preparação e quantificação de extractos proteicos. Inicialmente recolheu-se o meio de cultura para um tubo *falcon* de 15 mL e lavaram-se as células controlo e transfectadas com PBS, seguindo-se o destacamento com tripsina. Procedeu-se a uma centrifugação da suspensão celular obtida, a 4000 rpm, durante 5 minutos numa centrífuga refrigerada a 4°C (Biofuge Primo R, Heraeus). Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 150 μ l de tampão de lise (50 mM Tris-Cl, pH7,5; 300 mM NaCl; 0,5% (v/v) Triton-X 100; 1 mM EDTA; inibidores de proteases). Submeteu-se a suspensão celular a uma passagem continuada através de uma seringa, para promover a lise e incubou-se, no gelo, durante 20 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Uma porção do sobrenadante foi utilizada para a

quantificação, subsequente, das proteínas e o restante armazenado a -80°C para os ensaios de *Western-Blotting*. A quantificação das proteínas foi efectuada com recurso ao kit *BCA™ Protein Assay* (Pierce Biotechnology, Inc.), segundo instruções do fabricante. O reagente de trabalho foi preparado misturando 50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B.

Para os ensaios de *Western-Blotting* utilizou-se 20 μg dos extractos proteicos ressuspensos em tampão de amostra (6x: 2% (m/v) SDS; 80 mM Tris pH 6,8; 10% (v/v) Glicerol; 0,002% (m/v) Azul Bromofenol), contendo inibidores de proteases (*Sigma cocktail*).

Os extractos celulares foram corridos, num aparelho electroforético *Mini-Protean® 3* (BioRad) num gel de gradiente com 6-10% de acrilamida e transferidos, seguidamente, para uma membrana de nitrocelulose (Whatman), embebido em tampão de transferência (192 mM Glicina; 25 mM Tris-Base; 20% (v/v) Metanol; pH 8,3) num sistema de *blotting semidry* (Hoefer). A membrana foi bloqueada em TBST (50 mM Tris, pH 8,0; 150 nM NaCl; 0,05% Tween-20) com 5% (m/v) de leite em pó magro, à temperatura ambiente e com agitação suave. Seguiu-se a incubação com os anticorpos primários *mouse anti-Bub3* (1:750, BD Biosciences) e *rabbit anti- α -tubulina* (1:1500, Abcam), diluídos em TBST com 1% (m/v) de leite em pó magro, durante 60 minutos, à temperatura ambiente e com agitação suave. Depois de lavada, durante 10 minutos, com TBST com 1% (m/v) de leite em pó magro incubou-se a membrana com os anticorpos secundários conjugados com *horseradish peroxidase* (*anti-mouse* 1:1500, Vector e *anti-rabbit* 1:1500, Sigma). Lavou-se a membrana duas vezes em TBST com 1% (m/v) de leite em pó magro, durante 5 minutos cada e uma vez em TBS (50 mM Tris, pH 8,0; 150 nM NaCl). As proteínas foram detectadas por ECL (100 mM Tris pH 8,5; 90 mM Ácido Comárico; 100 mM Luminol; 0,5% (v/v) H_2O_2) e reveladas em filmes Kodak (Sigma), num revelador automático.

4.3. *qRT-PCR: QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION*

O *qReal-Time PCR* foi utilizado para avaliar a depleção das proteínas Bub3 e dineína, ao nível do mRNA.

4.3.1. **Extracção e Quantificação de RNA total**

Para evitar a degradação do RNA devido à acção enzimática das RNAses, todo o material utilizado durante o procedimento de extracção foi previamente tratado com água 0,01% (v/v) DEPC autoclavada, pulverizado com uma solução de 0,1 M NaOH e 1mM EDTA e a área de trabalho com uma solução de 0,5 M NaOH, periodicamente.

Retirou-se o meio de cultura dos poços onde haviam crescido as células e adicionou-se, rapidamente, 500 µl (1ml por cm²) do reagente PureZOL (BioRad). Deixou-se a incubar, 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a promover a lise das células e simultaneamente a dissociação completa dos complexos proteicos nucleares. Adicionou-se 100 µl de Clorofórmio e agitou-se, vigorosamente, durante 15 segundos. Deixou-se a incubar, 5 minutos à temperatura ambiente, com agitação periódica. Centrifugou-se a 12000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. Nesta etapa eram visíveis três fases distintas (a fase aquosa, a interfase e a fase orgânica), recolhendo-se a fase superior (aquosa) para um novo tubo livre de RNAses, sem perturbar a interfase. À fase recolhida adicionou-se 250 µl de Álcool Isopropílico, homogeneizou-se cuidadosamente e deixou-se repousar durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Realizou-se nova centrifugação a 12000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Observou-se a presença de um sedimento correspondente ao RNA isolado e, após descartar o sobrenadante, lavou-se com 500 µl de Etanol a 75%. Centrifugou-se, uma última vez, a 7500 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento durante, sensivelmente, 5 minutos. Finalmente solubilizou-se o sedimento em 20 µl de água livre de RNAses. O RNA isolado foi dividido em alíquotas e armazenado a -80°C.

A determinação da concentração do RNA (ng/µl) extraído foi efectuada por medição da densidade óptica, a 260 nm, utilizando o espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Para aferir acerca da integridade do RNA obtido, avaliou-se a razão da absorvância medida a 260 e 280 nm, correram-se as diferentes amostras num gel a 1% (m/v) de Agarose em TAE (1x) e observou-se no transiluminador (BioRad).

4.3.2. Desenho dos *Primers*

Os *primers* foram desenhados recorrendo a programas bioinformáticos específicos – *Beacon Designer* versão 7.2 e *PerlPrimer* versão 1.1.14 (Tabela 2) e sintetizados pela empresa STABvida (Oeiras, Portugal).

A escolha dos *primers* (*Forward* e *Reverse*) a utilizar para a amplificação dos genes pretendidos – GAPDH, Bub3 e DHC é um parâmetro crucial para se obter a máxima eficiência de reacção. Assim, seleccionaram-se os *primers* tendo em conta as seguintes características: tamanho compreendido entre 18-25 bases, a quantidade de guaninas e citosinas (G/C) entre os 45-55%, as temperaturas de fusão dos pares de *primers* o mais próxima possível e compreendida entre 50°C e 70°C, o tamanho dos fragmentos a amplificar de 80-200bp e, ainda, a preferência por *primers* que se

localizassem na junção de exões (Marshall, 2004) de modo a evitar a amplificação do ADN genómico.

Os *primers* foram diluídos para uma concentração final de 10 μ M e para cada par realizou-se um PCR utilizando como *template* o RNA total extraído de células HeLa, com a finalidade de confirmar a especificidade e temperatura de emparelhamento dos *primers*, bem como a ausência de amplificação de ADN genómico.

Tabela 2. Sequência oligonucleotídica dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes GAPDH, Bub3 e DHC.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleótidos
GAPDH	Forward	5'-ACAGTCCAGCCGCATCTTC-3'
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Bub3	Forward	5'-GTGTTGGTGTGGGACTTACG-3'
	Reverse	5'-GCTTAATACATAACCCTGCTTG-3'
DHC	Forward	5'-CGTTAATTGGGTTGTTTCTGAG-3'
	Reverse	5'-TCCACACTTCTCTTATCTGCT-3'

4.3.3. Síntese de cADN

A síntese de cADN, a partir dos RNAs totais extraídos, foi realizada com recurso ao kit *iScript cADN Synthesis Kit* (BioRad). A mistura de reacção foi constituída por 4 μ l de *iScriptT Reaction Mix 5x*, 1 μ l de *iScriptT Reverse Transcriptase*, 1 μ g de RNA e H₂O *Nuclease Free*, de modo a perfazer um volume total de 20 μ l. O programa de PCR seleccionado compreendeu 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. Terminada a síntese de cADN as amostras foram armazenadas a -20°C.

Os cuidados necessários durante a preparação da reacção de síntese foram os mesmos empregues durante a extracção do RNA.

4.3.4. PCR quantitativo em tempo real

As reacções para o PCR quantitativo em tempo real foram preparadas de acordo com o kit *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (BioRad), utilizando-se um volume final de 25 μ l. O cADN sintetizado foi diluído numa proporção de 1:10 e procedeu-se à amplificação utilizando-se o aparelho *iQ Thermal Cycler* (BioRad). Foi efectuada uma análise em triplicado para cada gene (Bub3, DHC e GAPDH), sendo realizada uma reacção como

controlo negativo de amplificação para cada *primer* (*Non Template Control* - NTC), onde o cADN foi substituído por água. O gene GAPDH foi utilizado como gene de referência (*housekeeping gene*) na normalização dos níveis de expressão dos restantes genes, visto ser um gene expresso constitutivamente de igual modo em todas as células independentemente das condições experimentais. A normalização dos níveis de expressão de cada um dos genes permitiu obter os valores de ΔC_T para os genes Bub3 e DHC com base no *software* do aparelho.

$$\Delta C_T = [C_T \text{ gene X}] - [C_T \text{ gene de referência}]$$

Através da utilização do mesmo *software* foi calculada a diferença de expressão entre a situação controlo e a situação de silenciamento, sendo esse parâmetro definido por $\Delta(\Delta C_T)$.

$$\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T \text{ condição experimental} - \Delta C_T \text{ condição controlo}$$

No final do programa de PCR foi obtida a curva de fusão, pelo próprio aparelho, que permitiu a avaliação da existência de produtos de PCR inespecíficos. No caso de ter ocorrido amplificação apenas dos produtos específicos de PCR será visualizado um único pico no gráfico de fusão.

Posteriormente realizou-se uma electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR com o objectivo de se avaliar a existência de um único produto de amplificação.

5. CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO RESULTANTE DO SILENCIAMENTO

5.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Em semelhança com o descrito na secção da verificação da eficácia da transfecção, o método de fixação utilizado diferiu consoante a marcação pretendida. Utilizou-se a fixação com 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x), procedimento já descrito, e com 4% (v/v) de Formaldeído em PHEM (1x).

Recolheu-se o meio de cultura dos diferentes poços e substitui-se por PHEM 1x (240 mM de Pipes; 100 mM de Hepes pH 7.0; 40 mM de EGTA; 16 mM MgSO₄). Seguiu-se a extracção utilizando-se uma solução de 0,5% (v/v) de Triton X-100 em PHEM (1x). Deixou-se actuar durante 3 minutos, à temperatura ambiente e removeu-se a solução. Imediatamente a seguir foi colocado nos poços a solução de fixação de 4% (v/v) de

Formaldeído em PHEM (1x), durante 20 minutos. Efectuou-se uma lavagem em PBS (147 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 0,5 mM KH₂PO₄; 3,2 mM Na₂HPO₄ e 5,5 mM Glucose; pH 7,4) e bloqueou-se com 10% (v/v) de FBS em PBST (1x). O restante procedimento foi igual ao já descrito anteriormente. Os anticorpos utilizados estão enumerados na tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários usados na técnica de imunofluorescência, para análise do fenótipo resultante do silenciamento das proteínas Bub3, dineína e spindly. Os anticorpos *Human anti-CREST*, *Mouse/Rabbit anti- α -tubulina* e *Mouse anti- γ -tubulina* foram utilizados na fixação com % (v/v) de Formaldeído em PHEM (1x) e os restantes anticorpos na fixação com 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x).

	Anticorpos	Diluição	Empresa
Primários	Human anti-CREST	1:1500	Oferta E. Bronze, IBMC, Porto, Portugal
	Mouse anti- α -tubulina	1:2500	Sigma
	Mouse anti- γ -tubulina	1:1500	Sigma
	Mouse anti-BUBR1	1:600	Chemicon
	Mouse anti-spindly	1:600	Sigma
	Rabbit anti- α -tubulina	1:100	Abcam
	Mouse anti-Mad2	1:200	Sigma
Secundários	Alexa 488, anti-rabbit	1:1500	Molecular Probes
	Alexa 488, anti-mouse		
	Alexa 568, anti-mouse		
	Alexa 568, anti-human		

5.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO

O índice mitótico (IM) foi determinado pela razão entre o número de células mitóticas e o número total de células (interfásicas e mitóticas) presentes na cultura. A contagem das células foi efectuada por dois métodos, em contraste de fase e em lâminas, após se efectuarem citospins das células.

Para o primeiro método, as células foram cultivadas em poços individuais, sem lamela, a uma densidade de $0,03 \times 10^6$ células/poço e em meio DMEM completo. Após 24 horas realizou-se a transfecção e às 48 horas adicionou-se aos poços correspondentes $0,5 \mu\text{M}$ de nocodazole (Sigma), excepto aos poços controlo. Deixou-se a incubar durante

16 horas, na incubadora a 37°C, e procedeu-se às contagens no microscópio invertido de contraste de fase.

Para a realização dos citospins, as células foram cultivadas em poços individuais a uma densidade de $0,045 \times 10^6$ células/poço e em meio DMEM completo. Procedeu-se à tripsinização das células e diluiu-se em meio DMEM completo. Homogeneizou-se, delicadamente, e retirou-se uma pequena porção da suspensão para contagem na câmara de Neubauer. Para cada condição, efectuaram-se os cálculos de modo a obter-se uma densidade uniforme de $0,07 \times 10^6$ células/lâmina. Montaram-se as lâminas e os filtros nos citoclips e colocou-se no tambor da citocentrífuga. Colocou-se a quantidade de células calculada e uma gota de 3% BSA, de forma a evitar o descolamento das células. As células foram citocentrifugadas a 1000 rpm, durante 5 minutos e mergulhadas, imediatamente, na solução fixadora – 3,7% (v/v) de Formaldeído em PHEM (1x), por 12 minutos. Terminado o tempo de fixação foram transferidas para uma solução de extracção – 0,5% (v/v) Triton X-100 em PBS (1x), durante 5 minutos. Este passo foi realizado mais duas vezes. Lavou-se com PBS (1x), três vezes, durante cinco minutos e montou-se em 6-8 µl de Vectashield contendo 0,5 µg/ml de DAPI (Sigma). Procedeu-se à contagem das células mitóticas e interfásicas presentes, em cinco campos aleatórios correspondentes a cada uma das condições experimentais, de três experiências independentes.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS MITÓTICOS

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo lamelas de 22x22 mm tratadas com Poli-L-Lisina, com uma densidade de $0,045 \times 10^6$ células/poço e em meio DMEM completo. 72 após a transfecção, adicionou-se aos poços correspondentes 10 µM de MG-132 (Sigma) com a finalidade de inibir a subunidade 26S do proteassoma. Deixou-se a incubar durante 90 minutos, na incubadora a 37°C. Terminado o tempo de incubação realizou-se a imunofluorescência com fixação em 4% (v/v) de Formaldeído em PHEM (1x).

Os parâmetros mitóticos a quantificar foram: o número de prometafases, metafases completas, metafases com cromossomas desalinhados (pseudometafases) e metafases desorganizadas, de três experiências independentes, com e sem adição de MG-132 (Sigma).

5.4. ENSAIO DE RECOVERY – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RESTAURAR A PLACA METAFÁSICA

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo lamelas de 22x22 mm tratadas com Poli-L-Lisina, com uma densidade de $0,045 \times 10^6$ células/poço e em meio DMEM completo. 72 horas após a transfecção adicionou-se aos poços correspondentes 10 μ M de MG-132 e, passados 60 minutos, 1 μ M de nocodazole. A acção do nocodazole foi revertida, após 60 minutos de incubação, por lavagem com meio DMEM completo e incubou-se, novamente, com MG-132 (Figura 12). Finalizado o tempo de incubação realizou-se a Imunofluorescência, sendo as células fixadas em 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x) e marcadas com os anticorpos primários *human* anti-CREST (1:1500; Oferta E. Bronze, IBMC, Porto, Portugal) e *mouse* anti- α -tubulina (1:2500, Sigma) e com os anticorpos secundários Alexa 568, anti-human e Alexa 488, anti-rabbit (1:1500, Molecular Probes).

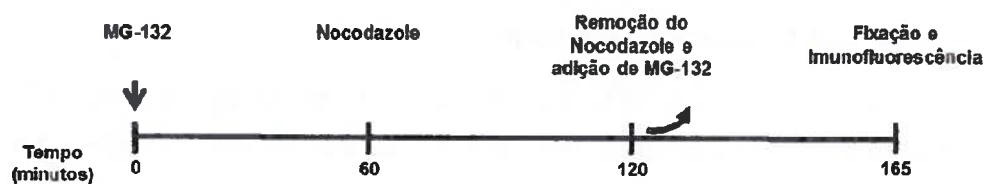


Figura 13. Representação esquemática do ensaio de recuperação da placa metafásica.

5.5. COLD TREATMENT

As células foram cultivadas em placas de 6 poços, contendo lamelas de 22x22 mm tratadas com Poli-L-Lisina, com uma densidade de $0,045 \times 10^6$ células/poço e em meio DMEM completo. 72 após a transfecção, a placa foi colocada sobre o gelo (*shock* térmico), durante 10 min. Prosseguiu-se com a imunofluorescência, com fixação em 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x). A marcação utilizada foi a mesma do ensaio do *Recovery*.

5.6. DISTÂNCIAS INTER-CINETOCOROS

Com o objectivo de comparar as distâncias inter-cinetocoros nas células transfectadas com siDHC, siBub3 e siBub3/siDHC, comparativamente às células controlo, procedeu-se à imunofluorescência, com fixação em 2% (m/v) de Paraformaldeído em PBS (1x), após incubação de 60 minutos com MG-132. Para evidenciar os cinetocoros recorreu-se à marcação com o anticorpo primário *mouse* anti-HEC1 (1:750, Abcam) e os microtúbulos com *rabbit* anti- α -tubulina (1:100, Abcam). Os anticorpos secundários utilizados foram: o Alexa 568, anti-*mouse* e o Alexa 488, anti-*rabbit* (1:1500, Molecular Probes). A medição das distâncias inter-cinetocoros foi realizada com recurso ao *software* AxioVision 4.8.2, sendo que as medições foram realizadas, regularmente, do centro de um cinetocoro ao outro. Para cada condição foram contabilizadas as distâncias referentes a 10 pares de cinetocoros irmãos, em cinco células seleccionadas aleatoriamente.

6. ANÁLISE E TRATAMENTO DE IMAGENS

As imagens de fluorescência foram adquiridas num microscópio confocal Spinning Disc AxioObserver Z.1 SD (Carl Zeiss, Germany) acoplado a uma câmara AxioCam MR3, deconvulsionadas com recurso ao *software* AxioVision 4.8.2, projectadas utilizando o *software* ImageJ versão 1.44 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e processadas no programa PhotoShop CS5 (Adobe Microsystems, CA). A maior parte das imagens foi adquirida utilizando a objectiva apocromática 63x, excepto para o ensaio do *Recovery* e na medição das distâncias inter-cinetocoros, onde se recorreu à objectiva de 100x. Para cada imagem, foram apresentados planos representativos, adquiridos com *Z-stacks*, com espaçamento de 0,4 μ m, que demonstram o máximo da intensidade de projecção. Nas figura 28 e 29 que representam as distâncias inter-cinetocoros e a natureza das ligações estabelecidas após depleção individual e simultânea das proteínas Bub3 e dineína os *insets* representam projecções de 2-4 *stacks*. As imagens de contraste de fase foram adquiridas com a objectiva de 10x, num microscópio de fluorescência Nikon TE 2000U, equipado com uma câmara digital DXM1200F e controlado pelo *software* Nikon ACT-1 (Melville, NY).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados recorrendo-se à probabilidade associada ao teste *t-Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

PARTE III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objectivo de analisar a relação funcional das proteínas Bub3 e dineína nas interações cinetocoro-microtúbulos, procedeu-se à depleção simultânea das duas proteínas. Numa primeira etapa, analisou-se o fenótipo resultante da depleção individual de cada uma e, numa segunda etapa, comparou-se este fenótipo com o da depleção dupla. Assim, começou-se por descrever o fenótipo da depleção individual de Bub3 e da dineína antes de se proceder à análise da depleção simultânea das duas proteínas. A análise de fenótipo incidiu particularmente sobre a ligação cinetocoro-microtúbulos.

1. EFEITO DA DEPLEÇÃO DA PROTEÍNA BUB3 SOBRE AS INTERACÇÕES CINETOCORO-MICROTÚBULOS

1.1. EFICIÊNCIA DA DEPLEÇÃO DA PROTEÍNA BUB3

Antes de se proceder à análise do fenótipo resultante da depleção, por RNAi, da proteína Bub3, a eficiência do silenciamento foi comprovada, ao nível da proteína, por imunofluorescência e por *Western Blotting* e, ao nível do mRNA, por *qReal-Time PCR*.

72 horas após a transfecção de células HeLa com siRNAs dirigidos contra a proteína Bub3, foi realizada a técnica de imunofluorescência, recorrendo à utilização de anticorpos específicos, que possibilitassem a detecção e a localização da proteína nas células controlo e transfectadas. Contudo, como o anticorpo dirigido contra a proteína Bub3 não funcionava em imunofluorescência, utilizou-se um anticorpo anti-BubR1, uma vez que a proteína BubR1 se localiza nos cinetocoros de forma dependente da proteína Bub3 e, portanto, é espectável que a ausência de Bub3 se reflecta, igualmente, na ausência de BubR1 (Logarinho e Bousbaa, 2008). Por observação ao microscópio de fluorescência das células HeLa controlo, verificou-se que a proteína BubR1 localiza-se nos cinetocoros durante a prometáfase e diminui consideravelmente em células em metafase, de acordo com o descrito na literatura (Logarinho e Bousbaa, 2008). Nas células transfectadas com os oligonucleotídeos siBub3, e conforme esperado, não se observa marcação para a proteína BubR1, quer durante a prometáfase, quer durante a metafase, mesmo com cromossomas desalinhados, indicando a ausência da proteína Bub3 (Figura 14, A).

Uma outra abordagem foi realizada com vista a verificar a ausência da proteína Bub3, recorrendo a uma linha estável de HeLa que expressa a GFP-Bub3. Verificou-se em células controlo que a proteína GFP-Bub3 apresentava o mesmo padrão de localização da proteína Bub3 endógena, observando-se a presença de elevados níveis

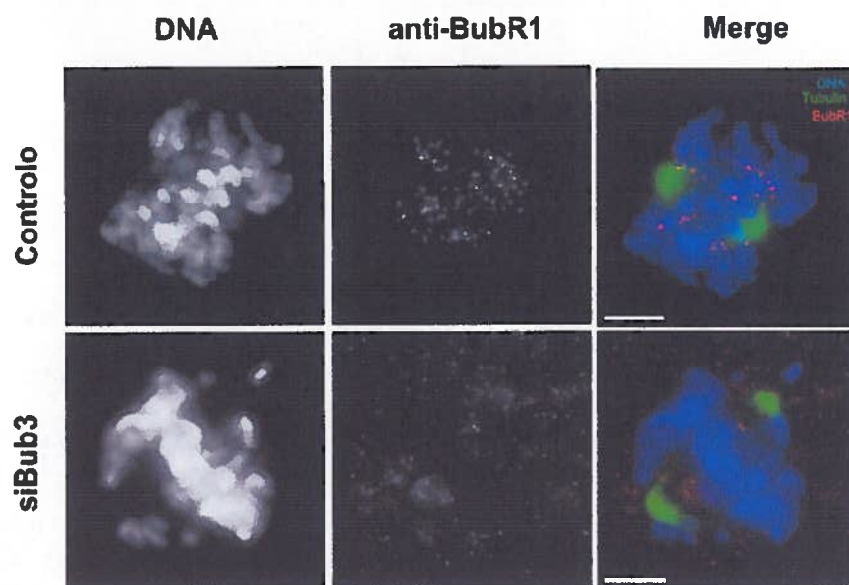
da proteína associada aos cinetocoros em prometáfase e em cromossomas desalinhados e de níveis reduzidos nos cinetocoros até à conclusão da anáfase (Martinez-Exposito *et al.*, 1999). Por comparação com a situação controlo, é perceptível a diminuição da intensidade da proteína Bub3, após a transfecção com siRNAs dirigidos contra a proteína, indicando a depleção da proteína (Figura 14, B).

O nível de expressão da proteína GFP-Bub3 foi, também, analisado pela técnica de *Western Blotting*, com recurso a extractos proteicos isolados 72 horas após a transfecção. A membrana, com as proteínas transferidas, foi marcada com anticorpos anti-Bub3 e anti- α -tubulina. A tubulina foi utilizada como controlo da quantidade de amostra e possibilitou comparar as bandas obtidas nas células controlo e após RNAi de Bub3. Pela análise dos *blots* obtidos confirmou-se a presença de duas bandas, nas células não transfectadas, correspondentes à proteína Bub3 endógena (37 KDa) e à proteína GFP-Bub3 (68 KDa). Nas células transfectadas, as duas bandas estavam ausentes (Figura 14, C).

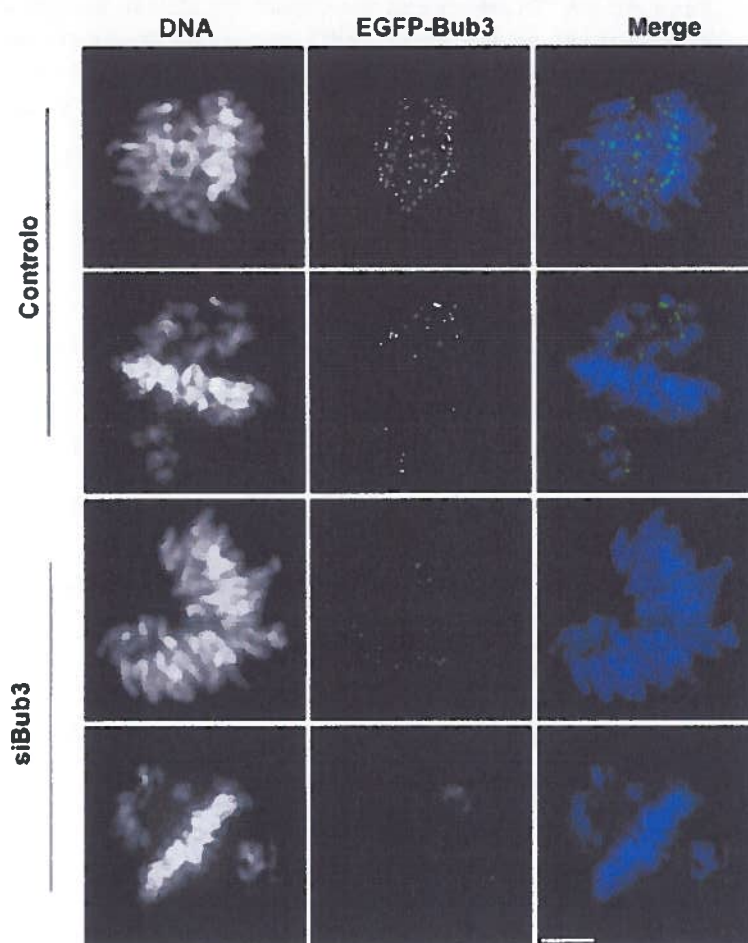
Com o intuito de averiguar o silenciamento de Bub3 ao nível de mRNA, recorreu-se à técnica quantitativa de *Real-Time PCR*, a partir de RNA total extraído de culturas assíncronas. Verificou-se, assim, que os níveis de expressão do gene que codifica a proteína Bub3 eram indetectáveis comparativamente ao controlo, garantindo a eficácia da transfecção (Figura 14, D). O gene que codifica a proteína GAPDH, uma vez que é expresso constitutivamente em todas as células (gene *housekeeping*), foi utilizado como *loading control* da reacção, possibilitando a eliminação de eventuais diferenças inerentes à quantidade da amostra utilizada.

Em conclusão, os resultados obtidos nos diferentes ensaios comprovam a eficácia da depleção da proteína Bub3.

A.



B.



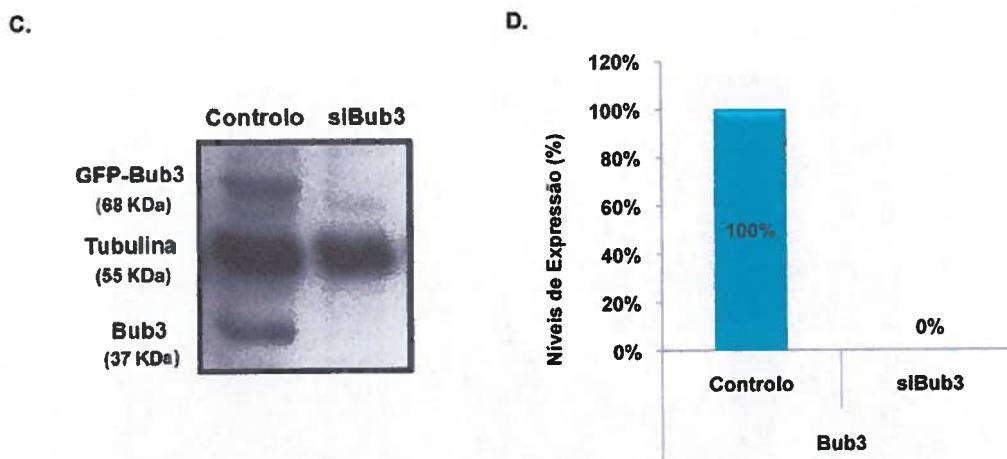


Figura 14. Eficiência da depleção da proteína Bub3, por RNAi. (A) Imagens de imunofluorescência, de células HeLa em prometáfase, marcadas com os anticorpos anti-BubR1 (vermelho) e anti- α -tubulina (verde), demonstrando a ausência da proteína Bub3 nos cinetocoros após RNAi. (B) Imagens de imunofluorescência, de células HeLa GFP-Bub3 em prometáfase, na situação controlo e após depleção, por RNAi, da proteína Bub3, evidenciando uma diminuição acentuada da intensidade da fluorescência da proteína GFP-Bub3 nos cinetocoros. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. (C) *Imunoblots* dos extractos proteicos isolados antes e após a transfecção de células da linha estável HeLa GFP-Bub3, demonstrando a repressão da proteína Bub3, com a α -tubulina actuando como *loading control*. (D) Níveis de expressão relativa do mRNA de Bub3 obtidos por *qReal-Time PCR*, nas culturas controlo e após RNAi (siBub3). Os valores obtidos foram normalizados com os níveis de expressão do gene GAPDH.

1.2. FENÓTIPO RESULTANTE DA DEPLEÇÃO DA PROTEÍNA BUB3

Garantida a eficácia do silenciamento da proteína Bub3 observou-se, por imunofluorescência, o fenótipo resultante da depleção, utilizando os anticorpos anti- α -tubulina para marcar os microtúbulos e anti-CREST ou anti-Hec1 para marcar os cinetocoros.

1.2.1 As células com depleção da proteína Bub3 indicam um defeito no alinhamento dos cromossomas

As células transfectadas com siBub3 exibem um fenótipo típico de desalinhamento com a presença de uma placa metafásica inacabada, com um ou vários cromossomas desalinhados (Figura 15, A). Assiste-se a saídas prematuras da mitose, resultantes da ausência da proteína Bub3 e da função por esta desempenhada no mecanismo de *checkpoint* mitótico, com conseqüente má segregação cromossómica durante a anáfase, observando-se pontes de cromatina (Figura 15, B). Os núcleos das

células interfásicas são disformes, relativamente às células controlo que apresentavam núcleos de tamanho e forma regulares. O papel da proteína Bub3 no mecanismo de *checkpoint* mitótico foi confirmado pela incapacidade das células acumularem em mitose quando incubadas com nocodazole, facto observado após determinação do índice mitótico (IM), em contraste de fase (Figura 15, C). Sem adição de nocodazole, o IM observado na cultura não transfectada (10%) espelha uma situação de regularidade do ciclo de uma célula eucariota, uma vez que a divisão mitótica representa, a nível temporal, o período mais curto do ciclo celular, fazendo com que as células permaneçam a maior parte do tempo em interfase. Relativamente às células com depleção da proteína Bub3 verificou-se que o valor do IM (5%) correspondia a metade do valor obtido nas células controlo (10%) o que é concordante com as saídas prematuras da mitose observadas na imunofluorescência. Após a adição do fármaco observou-se um aumento acentuado do IM (62%), nas células controlo, reflectindo a acumulação das células em mitose e confirmando a eficácia do *checkpoint* mitótico nas células HeLa, apesar da sua origem ser tumoral. Em contrapartida, nas células siBub3 o IM (30%) continuava a corresponder a, sensivelmente, metade do valor obtido nas células controlo (62%) (Figura 15, C). O nocodazole é um fármaco que despolimeriza, de forma reversível, os microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico bipolar, a captura dos cinetocoros e, conseqüentemente, o processo de alinhamento na placa metafásica, activando o mecanismo de *checkpoint* mitótico. Assim, a célula é impedida de avançar no ciclo celular, obrigando a uma acumulação das células em prometáfase. Todavia, na ausência da proteína Bub3, um dos componentes e efectores do MCC, o *checkpoint* mitótico permanece inactivo e a célula progride no ciclo celular, independentemente das condições necessárias a esta progressão estarem satisfeitas. Esta descrição reflecte-se no valor do IM, nas células siBub3, comparativamente ao controlo.

Os resultados obtidos são consistentes com o papel descrito para a proteína Bub3 na regulação das interacções cinetocoro-microtúbulos e no *checkpoint* mitótico (Logarinho *et al.*, 2008). Estes dados confirmam a depleção específica da proteína Bub3.

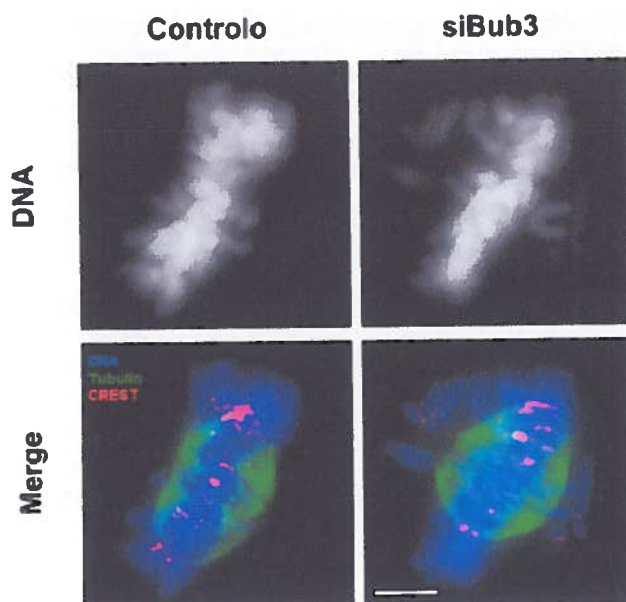
De forma a caracterizar a natureza do fenótipo observado nas células siBub3 procedeu-se à contagem de parâmetros mitóticos, especificamente do número de células em prometáfase e em metafase. Comparativamente ao controlo, verificou-se que em células com depleção da proteína Bub3 assiste-se a um aumento de prometáfases ($76 \pm 1,5\%$ vs $58 \pm 1,0\%$) e a uma diminuição de metafases completas ($24 \pm 1,5\%$ vs $42 \pm 1,0\%$). Todavia, como a depleção de proteínas do *checkpoint* causa saídas prematuras da mitose, as células foram incubadas com um inibidor do proteossoma, o MG-132, atrasando assim o início da anáfase. Desta forma, é possível avaliar os efeitos da depleção da proteína Bub3 no alinhamento dos cromossomas, independentemente da

função que exerce na actividade do *checkpoint* mitótico. Nas células controlo sujeitas à acção do MG-132 verificou-se que a maioria se encontra em metafase ($91\pm 0,7\%$), com todos os cromossomas alinhados na placa equatorial e, apenas, uma percentagem substimável em prometafase ($9\pm 0,7\%$) (Figura 15, D). Este resultado permite confirmar a eficiência da droga. Relativamente às células transfectadas com siRNA de Bub3 e comparando com a situação controlo, o número de metafases completas é claramente inferior ($38\pm 1,5\%$), indicando um defeito no alinhamento dos cromossomas, sendo prevalente o número de células com cromossomas desalinhados, designadas de pseudometafases ($62\pm 1,5\%$) (Figura 15, D).

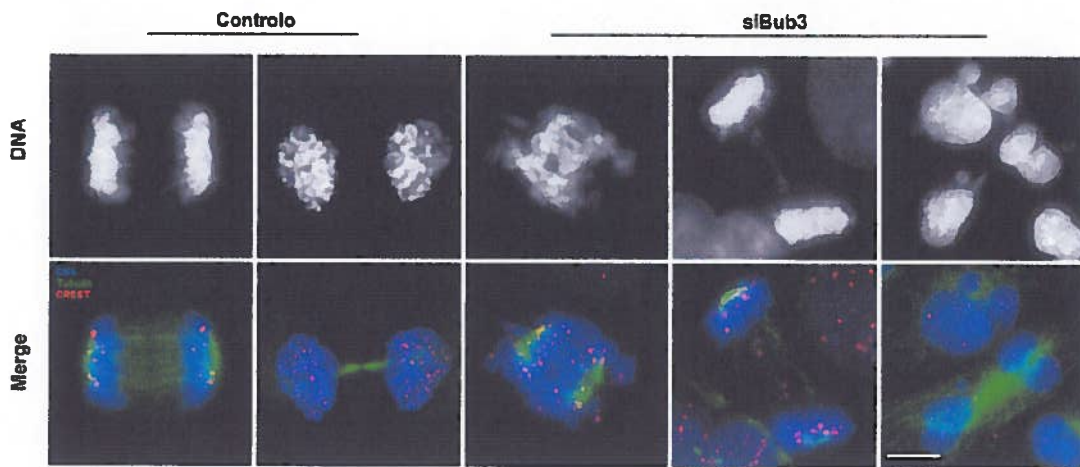
Em conclusão, a depleção da proteína Bub3 compromete, significativamente, o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica, confirmando o seu papel nas interacções cinetocoros-microtúbulos.

Uma melhor caracterização do fenótipo do desalinhamento dos cromossomas e da natureza das ligações cinetocoro-microtúbulos, observado após silenciamento da proteína Bub3, será descrita na secção de caracterização do fenótipo do silenciamento duplo.

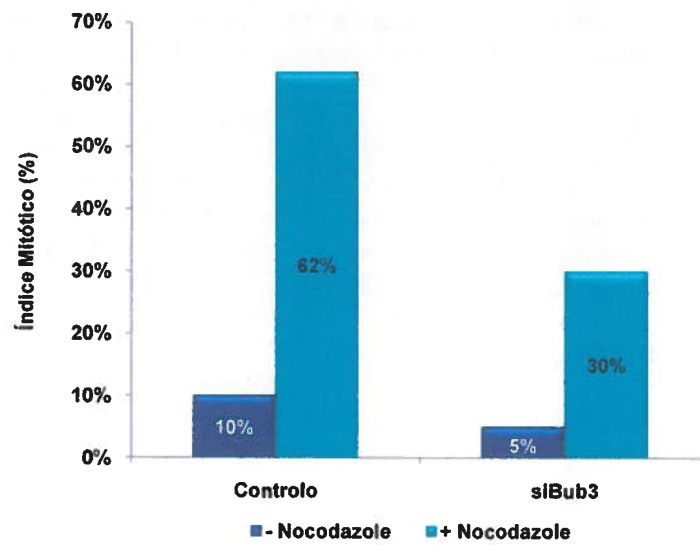
A.



B.



C.



D.

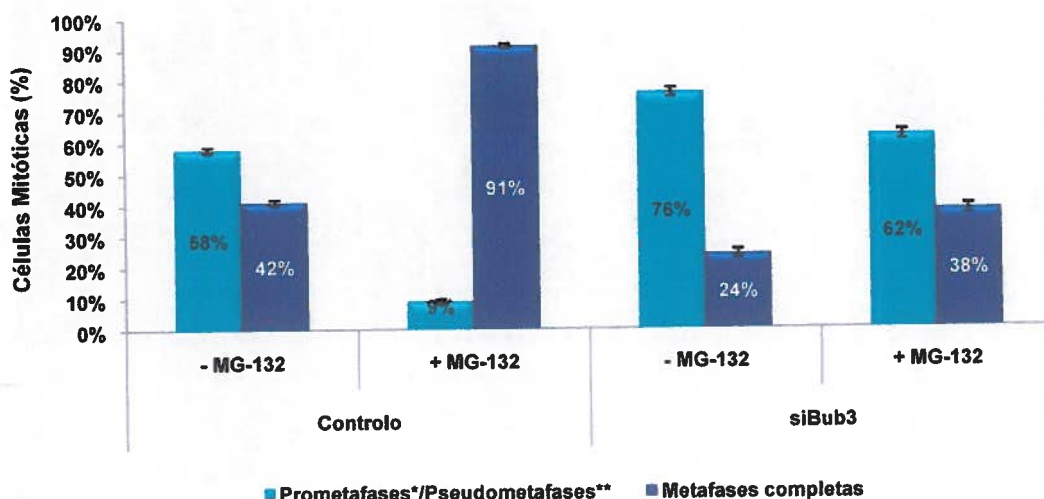


Figura 15. Fenótipo resultante da depleção da proteína Bub3, por RNAi, em células HeLa. Imagens de imunofluorescência, de células marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde) e anti-CREST (vermelho) mostrando a existência de figuras mitóticas com cromossomas desalinhados (A) e a presença de uma má segregação cromossômica durante a anafase e de saídas prematuras da mitose (B) nas células siBub3 em comparação com as células controle. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. (C) Índice mitótico, nas culturas controle e transfectada com siBub3, antes e após 16 horas de incubação com nocodazole. Os valores obtidos reflectem uma menor acumulação de células em mitose nas culturas siBub3 tratadas com nocodazole, comparativamente à cultura controle. O total de células mitóticas e interfásicas quantificado foi: n=3289 no controle, n=3737 no controle + nocodazole, n=4327 no siBub3 e n=3547 no siBub3 + nocodazole. (D) Proporção das prometafases e metafases nas culturas controle e das prometafases/pseudometafases e metafases nas culturas siBub3, revelando a predominância do fenótipo de desalinhamento após RNAi de Bub3 e a sua persistência mesmo após incubação com MG-132. As percentagens obtidas representam a média aritmética \pm desvio padrão de três experiências independentes. O total de células mitóticas quantificado corresponde a um n=683 no controle, n=994 no controle + Mg-132, n=684 no siBub3 e n=1071 no siBub3 + Mg-132.

2. EFEITO DA DEPLEÇÃO DA PROTEÍNA DINEÍNA SOBRE AS INTERACÇÕES CINETOCORO-MICROTÚBULOS

Para a análise do fenótipo resultante da depleção da proteína dineína do cinetocoro, recorreu-se a duas abordagens distintas: depleção directa da dineína através de oligonucleótidos siRNAs dirigidos contra a cadeia pesada da dineína (*Dynein Heavy*

Chain, DHC) e deslocalização da dineína do cinetocoro através da depleção por RNAi da proteína spindly necessária para a sua localização no cinetocoro. A análise do fenótipo incidiu, particularmente, sobre a ligação cinetocoro-microtúbulos.

2.1. EFICIÊNCIA DA DEPLEÇÃO DAS PROTEÍNAS DINEÍNA E SPINDLY

A eficiência do silenciamento foi comprovada, ao nível da proteína, por imunofluorescência e, ao nível de mRNA, por *qReal-Time PCR*.

Por imunofluorescência, verificou-se a ausência da proteína dineína, nas culturas transfectadas com siDHC (siRNAs contra a cadeia pesada da dineína), utilizando um anticorpo dirigido contra uma das subunidades que formam o complexo proteico – a cadeia intermediária (anti-DIC), embora os siRNAs utilizados sejam dirigidos contra a cadeia pesada da proteína. A cadeia pesada da dineína citoplasmática é uma ATPase, que contém o domínio motor (Vallee *et al.*, 2004), o qual se liga directamente aos microtúbulos (King, 2000). A região N-terminal contém locais de dimerização e de ligação para as subunidades acessórias (Tynan *et al.*, 2000). A depleção da cadeia pesada da dineína resulta, conseqüentemente, na perda da cadeia intermediária, como observado previamente (Grigoriev *et al.*, 2007; Tanenbaum *et al.*, 2008), revelando-se uma forma efectiva na validação da eficácia do RNAi por imunofluorescência.

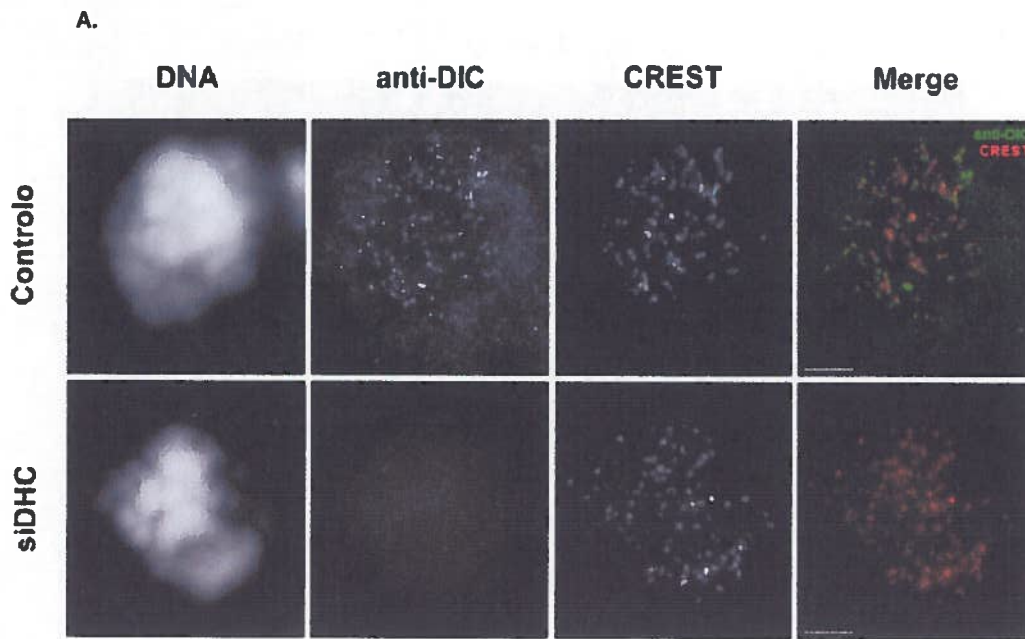
Para verificar a depleção da proteína, por imunofluorescência, 48 horas após a transfecção adicionou-se 1 μ M de nocodazole à cultura e às 72 horas fixaram-se as células. O objectivo da adição do fármaco foi despolimerizar os microtúbulos e, conseqüentemente, promover um enriquecimento da proteína nos cinetocoros, permitindo uma melhor visualização da marcação. Normalmente, a proteína dineína localiza-se 55 vezes mais nos cinetocoros de células tratadas com nocodazole comparativamente com o controlo (Hoffman *et al.*, 2001). Para visualizar os cinetocoros, utilizou-se como marcador o anticorpo anti-CREST. Desta forma, verificou-se que a proteína dineína localiza-se nos cinetocoros em células controlo mas não em células transfectadas com siDHC, comprovando-se a depleção da proteína (Figura 16, A).

Em semelhança com o procedimento efectuado para confirmar os resultados obtidos na imunofluorescência para a proteína Bub3, recorreu-se à técnica quantitativa de *Real-Time PCR*, a partir de RNA total extraído de culturas assíncronas, transfectadas com siDHC, de modo a verificar-se a quantidade relativa dos mRNAs. Verificou-se que os níveis de expressão da dineína nas células transfectadas baixaram para 25% dos níveis controlo (Figura 16, B), revelando um nível de silenciamento de 75%. Os 25% de expressão, ainda presentes, corresponderiam à presença na cultura siDHC de células pouco e/ou não transfectadas.

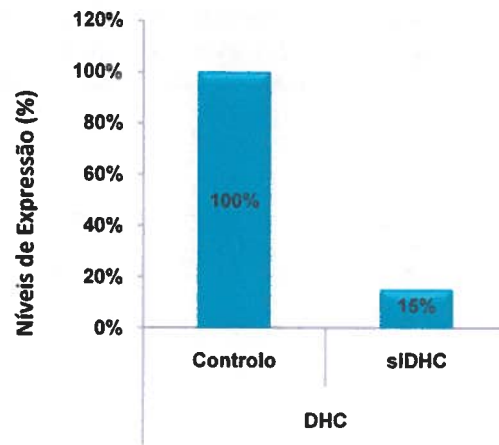
Até à data, a confirmação da depleção da proteína dineína, por *Western Blotting*, não foi possível devido, em parte, ao elevado peso molecular da cadeia pesada da proteína (DHC) correspondente a, aproximadamente, 400 KDa.

Quanto à verificação da depleção da proteína spindly, por imunofluorescência, utilizou-se um anticorpo anti-spindly. Verificou-se que a proteína se localiza nos cinetocoros livres e nos pólos, em prometáfase, sendo fracamente detectada nestas estruturas nas células em metafase, concordante com a literatura (Gassmann *et al.*, 2010). Contrariamente e, conforme esperado, nas células transfectadas não se observa marcação da proteína spindly em nenhuma das fases, indicando a sua depleção (Figura 16, C). Nas células transfectadas, observou-se vários cromossomas desalinhados consistente com papel descrito para a proteína spindly na ligação cinetocoro-microtúbulos, comprovando assim a especificidade da depleção. No entanto, obteve-se uma baixa eficiência de transfecção (número de células transfectadas) com os oligonucleotídeos siSpindly testados. Por conseguinte, não foi possível realizar a caracterização do fenótipo resultante da deslocalização da dineína do cinetocoro, como consequência da depleção de spindly. Esta análise será concretizada, futuramente, com recurso a novos oligonucleotídeos.

Em conclusão, o silenciamento da proteína dineína por RNAi revelou-se efectivo, demonstrando uma boa eficiência de depleção, quando comprovado por imunofluorescência e por *qReal-Time PCR*. Em contrapartida, a depleção da proteína spindly não foi eficiente com os siRNAs utilizados, inviabilizando uma tentativa subsequente de caracterização do fenótipo.



B.



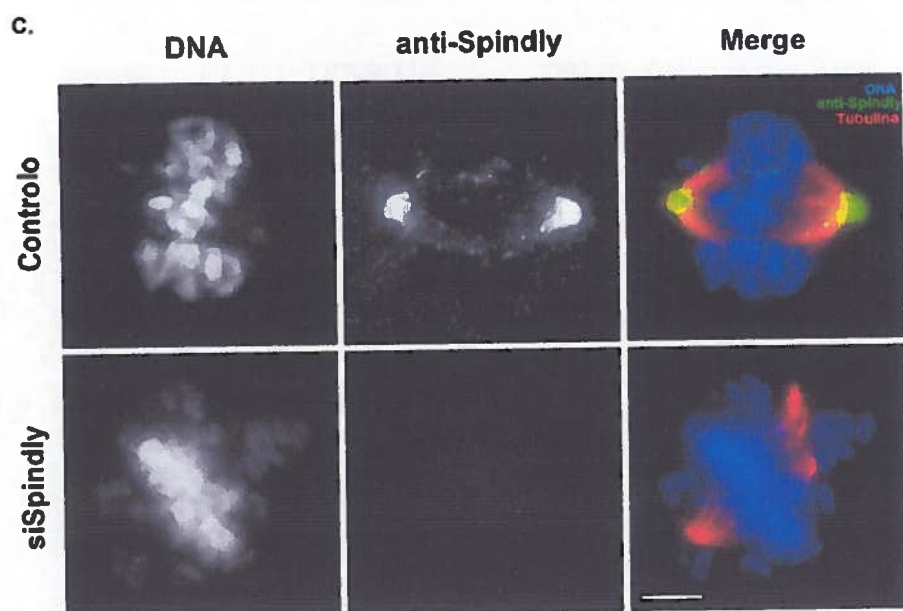


Figura 16. Eficiência da depleção das proteínas dineína e spindly, por RNAi, em células HeLa. (A) Imagens de imunofluorescência, de células tratadas com 1 μ M de nocodazole, marcadas com os anticorpos anti-DIC (verde) e anti-CREST (vermelho), demonstrando a ausência da proteína dineína nos cinetocoros após RNAi. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. **(B)** Níveis de expressão relativa do mRNA de dineína obtidos por *qReal-Time PCR*, em situação controlo e após RNAi de dineína (siDHC). Os valores obtidos foram normalizados com os níveis de expressão do gene GAPDH. **(C)** Imagens de imunofluorescência, de células em prometáfase, marcadas com os anticorpos anti-spindly (verde) e anti- α -tubulina (vermelho), demonstrando a ausência da proteína spindly nos pólos e cinetocoros após RNAi. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA DEPLEÇÃO DA PROTEÍNA DINEÍNA

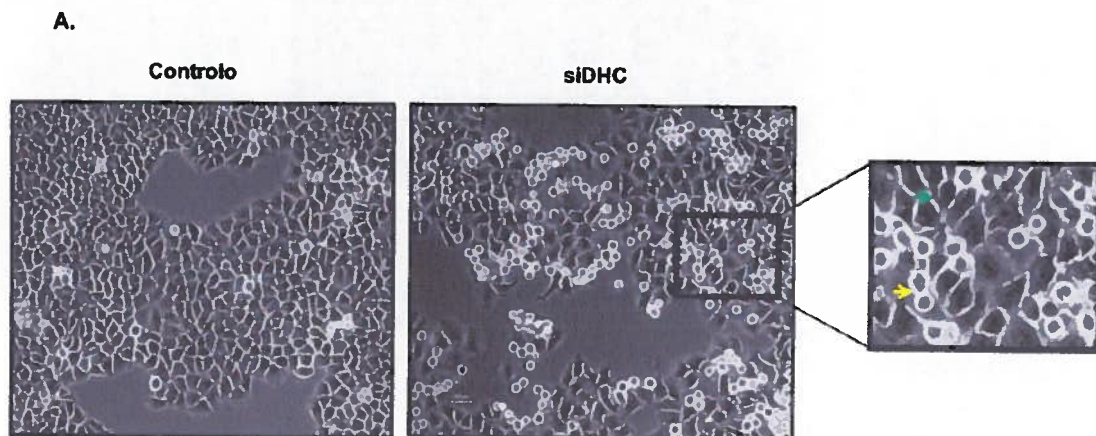
Nesta secção, pretendeu-se caracterizar o fenótipo resultante da depleção directa da proteína dineína comparando-o com o fenótipo relatado em estudos anteriores em que a dineína foi deslocada do cinetocoro por depleção das proteínas associadas.

2.2.1 As células com depleção da proteína dineína apresentam uma paragem em mitose

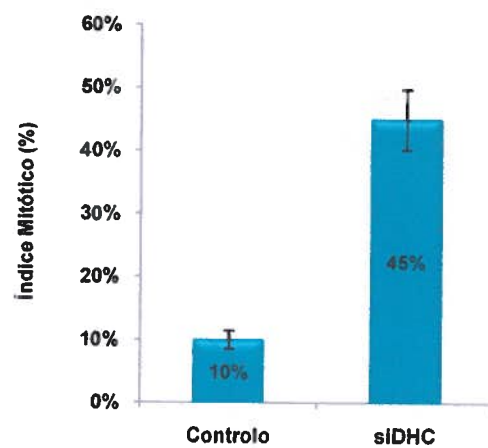
Após 72 horas de transfecção com siDHC verificou-se, por observação em microscopia de contraste de fase, uma acumulação de células em mitose, comparativamente com a cultura controlo (Figura 17, A). Procedeu-se, então, à contagem do índice mitótico. Por comparação com a cultura controlo que apresentava um IM de

10±1,4%, verificou-se um aumento considerável do IM nas células transfectadas com siDHC (45±4,8%) (Figura 17, B), justificando a primeira observação. Os resultados obtidos são consistentes com estudos prévios que sugeriam um atraso na progressão da mitose (Echeverri, Paschal et al. 1996; Wojcik, Basto et al. 2001).

O marcado aumento das células mitóticas após RNAi de dineína poderia dever-se à activação do mecanismo de *checkpoint* mitótico nestas células. De facto, observou-se um escasso número de células em anafase e a presença de muitas células mortas com vários pequenos núcleos, sugerindo morte celular por apoptose (Figura 17, C).



B.



C.

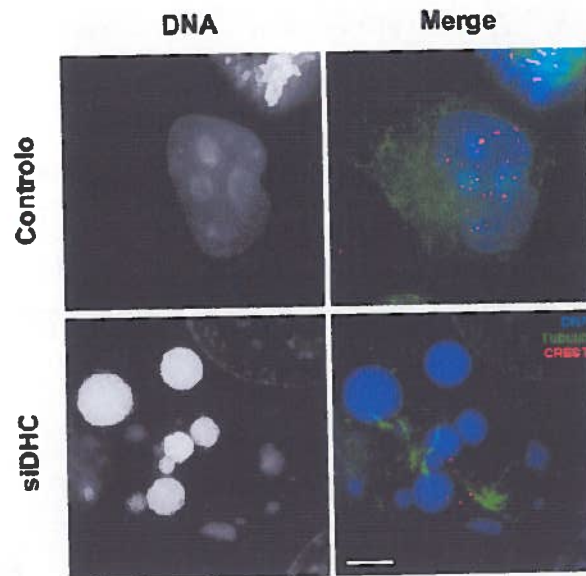


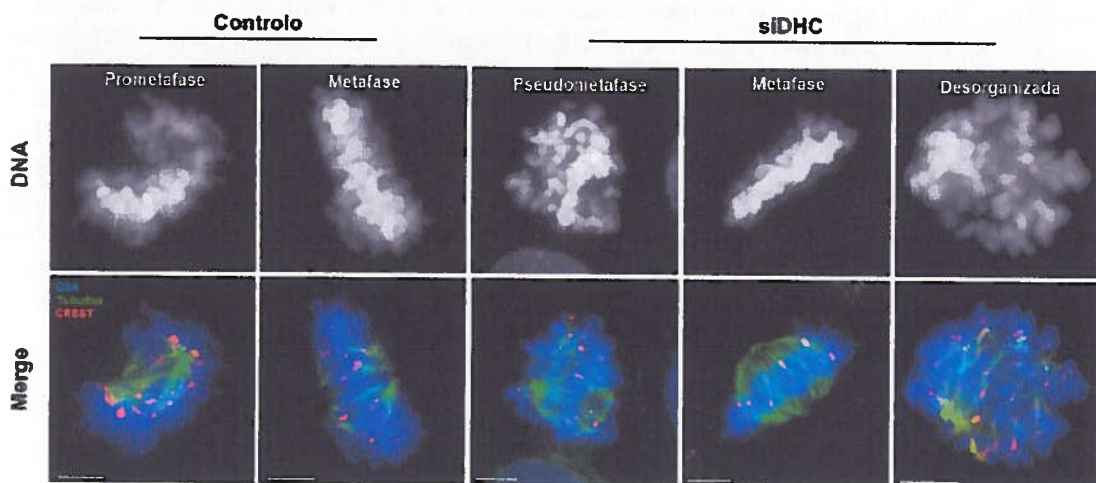
Figura 17. A depleção da proteína dineína induz uma acumulação de células em mitose. (A) Imagens de microscopia de contraste de fase, de uma cultura de células HeLa, evidenciando um aumento considerável de células mitóticas, após a depleção da proteína dineína, comparativamente com o controlo. A seta a verde assinala as células interfásicas, de aspecto estrelado, e a amarela, as células mitóticas de configuração redonda. **(B)** Índice mitótico, nas culturas controlo e transfetada com siDHC, confirmando a acumulação de células mitóticas após depleção da dineína. O total de células mitóticas e interfásicas quantificado foi: $n = 10060$ no controlo, $n = 6693$ no siDHC. **(C)** Imagens de imunofluorescência do núcleo interfásico de células controlo e do núcleo representativo das várias células mortas observadas após siDHC e cujo aspecto sugere morte celular por apoptose. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CREST (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μm .

2.2.2 As células com depleção da proteína dineína apresentam figuras mitóticas de três categorias

Verificado o aumento do IM em células siDHC questionou-se em que fase da mitose estariam as células observadas na cultura. Para tal, procedeu-se à marcação destas com os anticorpos anti- α -tubulina, para visualizar os microtúbulos do fuso mitótico, e anti-CREST para visualizar os cinetocoros. Assim, deparamo-nos com a presença de células mitóticas correspondentes, predominantemente, a três categorias: metafases completas, com os cromossomas todos alinhados na placa equatorial; metafases incompletas, que designamos por pseudometafases, com cromossomas desalinhados; e figuras mitóticas desorganizadas, geralmente circulares, cuja classificação era ambígua (Figura 18, A). Seguidamente procedeu-se à contagem das células pertencentes a cada uma das três categorias mencionadas (Figura 18, B). Verificou-se que as metafases ditas completas eram o fenótipo menos frequente ($6 \pm 1,1\%$), sendo que a maioria das células

exibia uma placa metafásica com cromossomas desalinhados ($37\pm 7,2\%$) ou se apresentavam sob a forma de figuras desorganizadas ($57\pm 7,0\%$). Este resultado reflecte-se no papel sugerido para a dineína na congressão e na formação e organização do fuso mitótico (Li *et al.*, 2007). Não sabemos, ainda, se estas três categorias representam fenótipos distintos ou reflectem fases intermédias do mesmo fenótipo. Esta questão poderá ser esclarecida com recurso ao *Time-Lapse*, permitindo o acompanhamento da célula *in vivo* durante as subfases da divisão celular, uma vez que se trata de um processo contínuo e dinâmico, interrompido com a necessidade de fixação para se realizar a imunofluorescência. Todavia, estas figuras mitóticas desorganizadas podem ser o resultado das oscilações que os cromossomas mono-orientados experienciam no sentido de proximidade e de afastamento relativamente ao pólo do fuso a que estão conectados até o cinetocoro livre capturar os microtúbulos do pólo oposto. Este movimento polar é desencadeado pela proteína dineína e, uma vez comprometido, inibe o movimento, em direcção aos pólos, dos cromossomas fora do fuso (Li *et al.*, 2007).

A.



B.

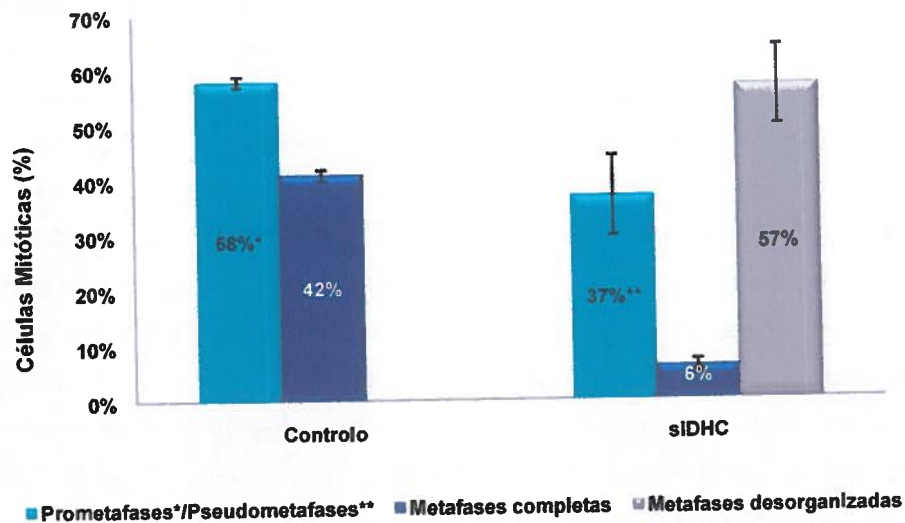


Figura 18. Caracterização do fenótipo resultante da depleção da proteína dineína, por RNAi, em células HeLa. (A) Imagens de imunofluorescência, de células controlo e siDHC, marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde) e anti-CREST (vermelho) mostrando as figuras mitóticas de metafases, de metafases com cromossomas desalinhados (Pseudometáfases) e de metafases desorganizadas, observadas nas culturas siDHC. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. **(B)** Quantificação da fracção de células mitóticas, após silenciamento da proteína dineína, pertencentes às três categorias demonstradas na figura A. Os valores obtidos indicam que o fenótipo menos frequente corresponde a metafases alinhadas, seguido das metafases com cromossomas desalinhados e, com maior frequência, a presença de figuras desorganizadas. As percentagens obtidas representam a média aritmética \pm desvio padrão de três experiências independentes. O total de células mitóticas quantificado corresponde a um n=683 no controlo e n=1719 no siDHC.

Além da inactivação da proteína dineína comprometer a congressão dos cromossomas, uma aparente desvantagem é que também resulta em anomalias do fuso mitótico, como verificado. Assim, e de forma a diminuir a influência da configuração do fuso no comportamento dos cromossomas, optou-se por analisar as ligações cinetocoro-microtúbulos apenas nas células que apresentavam fusos bipolares, em semelhança com o efectuado num estudo prévio (Li *et al.*, 2007). Esta análise será descrita na secção da análise do fenótipo da depleção dupla. No entanto, e uma vez que foi reportado que a inactivação da dineína interfere com a focagem dos pólos do fuso mitótico, o que poderia influenciar o alinhamento dos cromossomas, fomos averiguar se tal se verifica nas figuras mitóticas com fuso bipolar em células com depleção de dineína. Para tal, marcou-se os pólos com um anticorpo anti- γ -tubulina. Por observação das células marcadas com anti- γ -tubulina, verificou-se que, após depleção da dineína, as figuras mitóticas com fusos

bipolares, ao contrário das figuras mitóticas com fuso desorganizado, apresentam fusos focados (Figura 19).

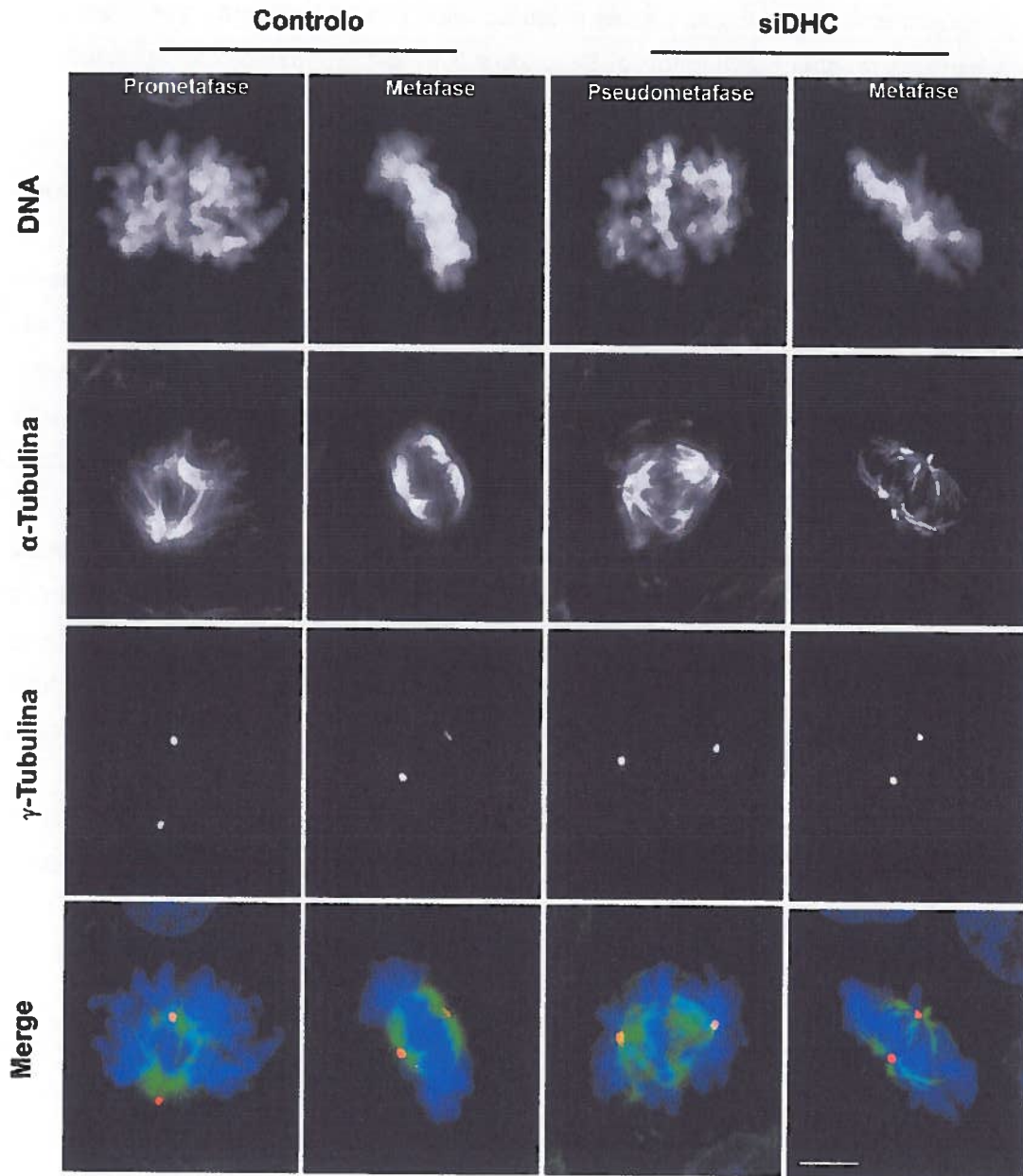


Figura 19. Os fusos mitóticos bipolares nas células com depleção da proteína dineína apresentam-se focados. Imagens de imunofluorescência, de células controlo e siDHC, marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde) e anti- γ -tubulina (vermelho). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m.

2.2.3 As proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 não acumulam nos cinetocoros dos cromossomas alinhados após depleção da dineína

O marcado aumento das células mitóticas após RNAi de dineína poderia dever-se ao mecanismo de *checkpoint* mitótico. Segundo a literatura, por inibição da actividade da proteína dineína, algumas proteínas do *checkpoint* mitótico permanecem retidas nos cinetocoros, mesmo em cinetocoros ligados de forma bipolar aos microtúbulos, uma vez que dependem do transporte efectuado por esta para se moverem em direcção aos pólos da célula (Famulski *et al.*, 2011; Howell *et al.*, 2001). O complexo dineína/dinactina foi implicado na remoção das proteínas do SAC do cinetocoro e, paralelamente, proposto como um importante interveniente no silenciamento do *checkpoint* mitótico (Griffis *et al.*, 2007; Howell *et al.*, 2001; Sivaram *et al.*, 2009; Whyte *et al.*, 2008). Estudos experimentais realizados por Howell *et al.*, sugerem que o complexo formado pela dineína/dinactina é responsável pelo transporte, ao longo dos microtúbulos e em direcção aos pólos, das proteínas da camada externa do cinetocoro, nomeadamente, das proteínas Mad2, BubR1 e CENP-E (Howell *et al.*, 2001). Contrariamente, um ensaio realizado por Famulski *et al.*, com *Nordihydroguaiaretic Ácid* (NDGA) indicava que a proteína BubR1 era removida dos cinetocoros de um modo independente da proteína dineína (Famulski *et al.*, 2011). Os resultados obtidos relativamente à proteína Mad2 eram concordantes, embora indicassem a presença de alguns cinetocoros com marcação de Mad2.

O papel da dineína no silenciamento do *checkpoint* mitótico poderia justificar a actividade permanente do *checkpoint* mitótico com, consequente, bloqueio das células em mitose após inibição da dineína.

Neste sentido e de forma a verificar a interferência da proteína dineína na remoção de proteínas específicas do *checkpoint* mitótico do cinetocoro, transfectamos células HeLa GFP-Bub3 com siDHC e, por imunofluorescência, observamos a presença ou ausência de marcação para as proteínas Mad2, BubR1 e Bub3. Os resultados foram analisados na presença e ausência de nocodazole. O nocodazole foi utilizado com o objectivo de garantir que nenhuma das proteínas estudadas, Mad2, BubR1 e Bub3, dependia da dineína para se localizar no cinetocoro e desta forma, avaliar unicamente se a sua remoção do cinetocoro dependia do transporte, via microtúbulos, pela proteína dineína. Sabendo que a despolimerização dos microtúbulos, com nocodazole, evita a redistribuição das proteínas da camada externa do cinetocoro para os pólos, uma vez que este processo é dependente dos microtúbulos do fuso mitótico (Howell *et al.*, 2001), seria de esperar que todas as proteínas se localizassem nos cinetocoros na presença do fármaco, na eventualidade de não dependerem da dineína para a sua localização. Este

facto foi verificado para cada uma das proteínas estudadas, visto as proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 se localizarem nos cinetocoros após depleção da proteína dineína (Figura 20). Sem adição de nocodazole observamos a presença de marcação apenas em alguns cinetocoros, como indicado pelos autores acima referenciados (Figura 20). Todavia, sugerimos que, provavelmente corresponderão a cromossomas que não estão ligados e por isso apresentam marcação, uma vez que a proteína Mad2 é considerada um marcador da ligação cinetocoro-microtúbulos. O mesmo acontece para a marcação com BubR1, considerado um marcador de tensão. Como a ligação não é funcional a tensão, também, será afectada e vice-versa. Deste modo, os nossos resultados indicam que, na ausência da dineína, as proteínas do *checkpoint* mitótico não ficam concentradas nos cinetocoros dos cromossomas alinhados, persistindo apenas nos cromossomas desalinhados/não ligados. Não colocando em causa a função da dineína no silenciamento do *checkpoint* através da remoção (*streaming*) das proteínas do *checkpoint* a partir dos cinetocoros metafásicos, os nossos resultados não contrariam, de facto, o relatado por estudos anteriores. Nestes estudos, foi descrito que após inibição da dineína cinetocoriana, as proteínas do *checkpoint* mitótico acumulam nalguns ou em vários cinetocoros mas não em todos os cinetocoros como seria expectável. Assim, é provável que os cinetocoros que retinham as proteínas do *checkpoint* naqueles estudos sejam, de facto, cinetocoros sem ligação aos microtúbulos ou sem tensão.

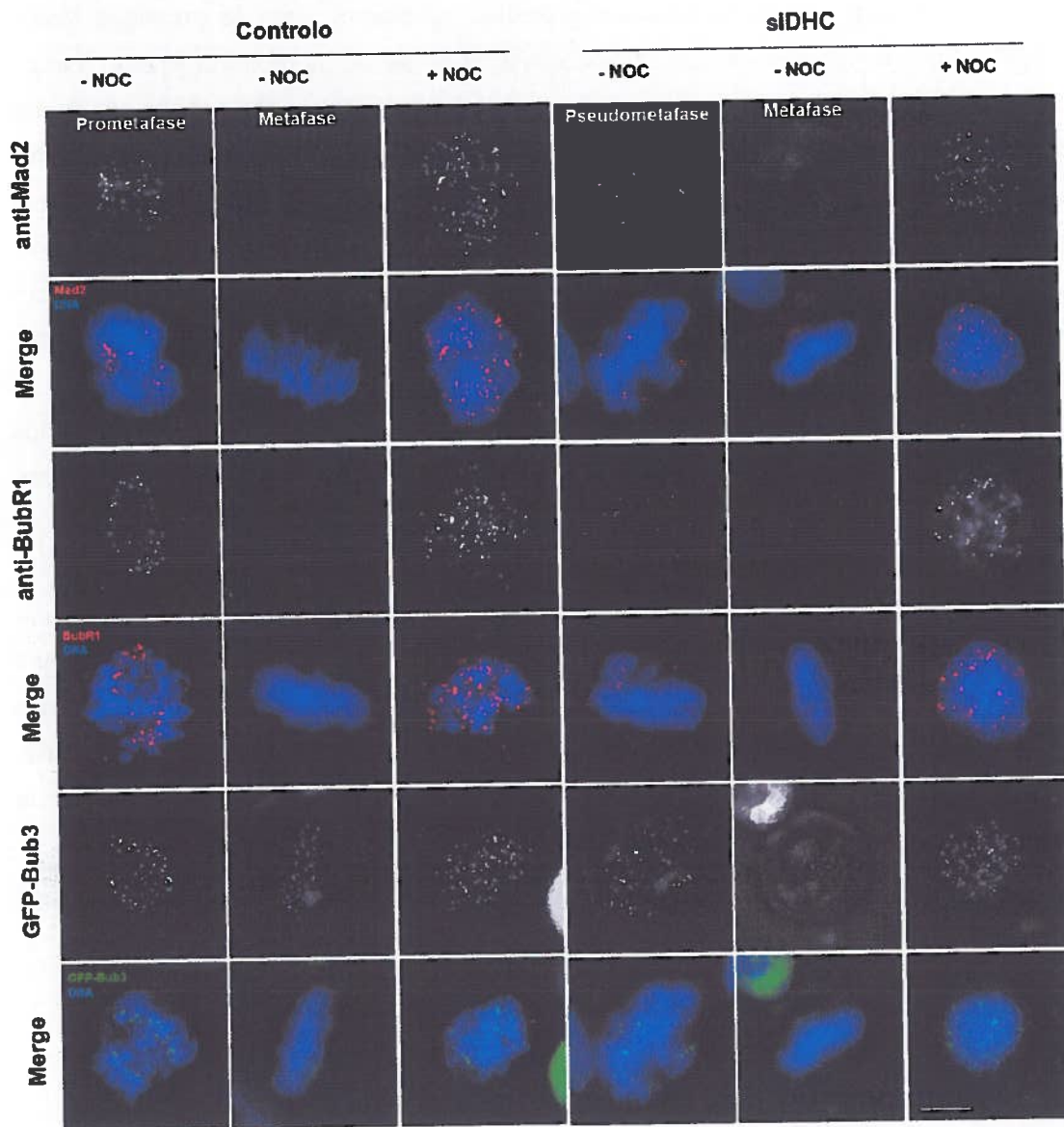
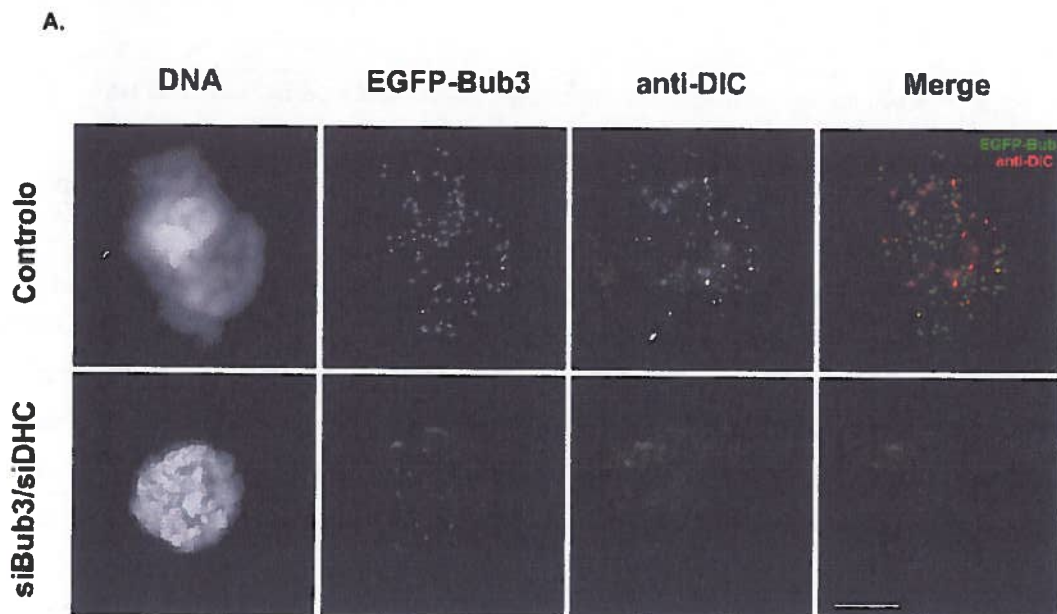


Figura 20. A depleção da proteína dineína não provoca acumulação das proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 nos cinetocoros dos cromossomas alinhados. Imagens de imunofluorescência de células HeLa GFP-Bub3 controlo e siDHC, antes e após a incubação com nocodazole. As células foram marcadas com os anticorpos anti-Mad2 ou anti-BubR1. O ADN (azul) foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m.

3. EFEITO DA DEPLEÇÃO SIMULTÂNEA DAS PROTEÍNAS BUB3 E DINEÍNA SOBRE AS INTERACÇÕES CINETOCORO-MICROTÚBULOS

3.1. EFICIÊNCIA DA DEPLEÇÃO CONJUNTA DAS PROTEÍNAS BUB3 E DINEÍNA

Em semelhança ao procedimento efectuado para as duas proteínas isoladamente, comprovou-se a depleção simultânea das duas, por imunofluorescência e por *qReal-Time PCR*. Como referido anteriormente o anticorpo anti-Bub3 não funcionava em imunofluorescência e como tal utilizou-se a linha celular HeLa GFP-Bub3 transfectada com siRNAs contra as proteínas Bub3 e dineína. Assim, na imunofluorescência utilizou-se, apenas, o anticorpo anti-DIC para aceder à presença da proteína dineína uma vez que as células já expressavam a proteína GFP-Bub3. Por observação das células controlo verificou-se a presença de marcação de Bub3 e dineína nos cinetocoros enquanto que, nas células transfectadas, assiste-se a níveis apenas detectáveis de Bub3 nos cinetocoros e à ausência da proteína dineína, garantindo a eficácia da depleção conjunta (Figura 21, A). Por *qReal-Time PCR* verificou-se que na cultura transfectada os níveis de expressão de Bub3 e de dineína correspondiam a 0% e 25%, respectivamente (Figura 21, B).



B.

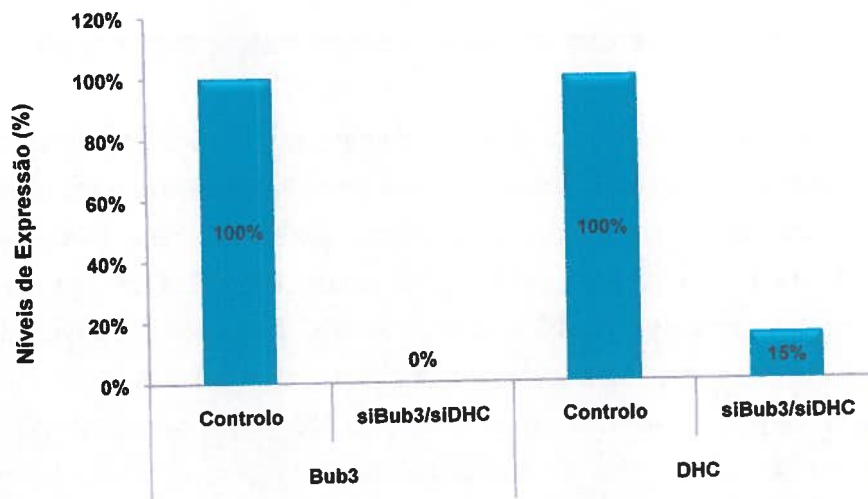


Figura 21. Eficiência da depleção conjunta das proteínas Bub3 e dineína, por RNAi. (A) Imagens de imunofluorescência, de células tratadas com 1 μ M de nocodazole, marcadas com o anticorpo anti-DIC (vermelho) demonstrando a depleção das proteínas dineína e GFP-Bub3 nos cinetocoros após RNAi. O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. (B) Níveis de expressão relativa dos mRNAs de dineína e Bub3, antes e após silenciamento simultâneo, obtidos por *qReal-Time PCR*. Os valores obtidos foram normalizados com os níveis de expressão do gene GAPDH.

3.2. ANÁLISE DO FENÓTIPO DA DEPLEÇÃO SIMULTÂNEA DE BUB3 E DINEÍNA

3.2.1 Relação de interdependência entre as proteínas Bub3, DHC e Spindly

Antes de se partir para a análise do fenótipo da depleção dupla das proteínas Bub3 e dineína, era necessário verificar se a localização de uma das proteínas interferia com a localização da outra. Isto é, verificar se o fenótipo de desalinhamento característico da depleção da proteína Bub3 se devia exclusivamente à ausência desta proteína ou se seria uma consequência da deslocalização da proteína dineína do cinetocoro e se o desalinhamento observado em células siDHC se devia à ausência da proteína dineína ou se devia à deslocalização da proteína Bub3 do cinetocoro.

Para aceder a este propósito, fomos analisar a relação de interdependência na localização no cinetocoro das proteínas Bub3 e dineína, depletando uma e verificando o efeito sobre a localização cinetocoriana da outra.

Recorrendo a células HeLa GFP-Bub3 e marcando com um anticorpo anti-DIC, verificou-se que, na ausência da dineína, a proteína Bub3 continua a localizar-se normalmente nos cinetocoros (Figura 22).

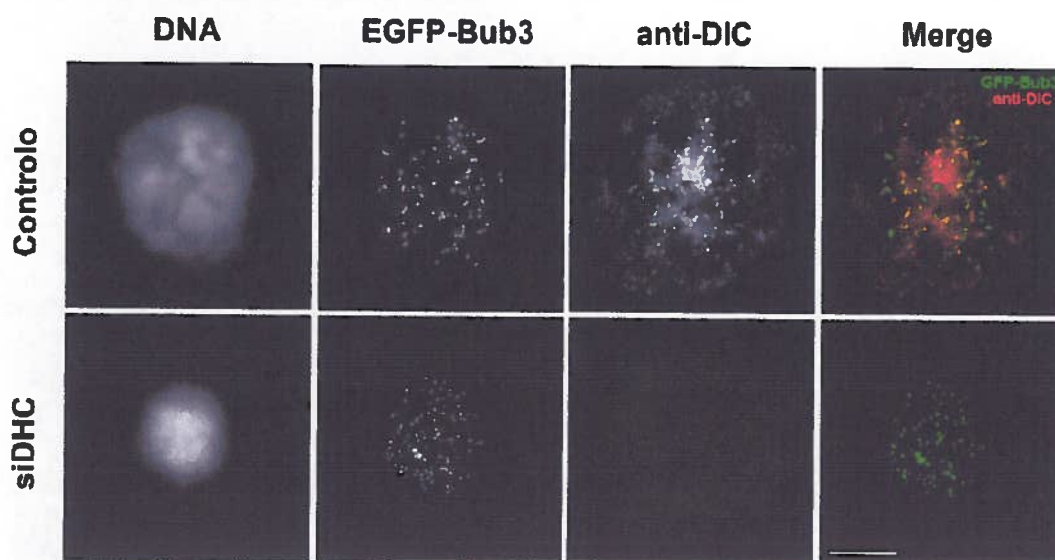
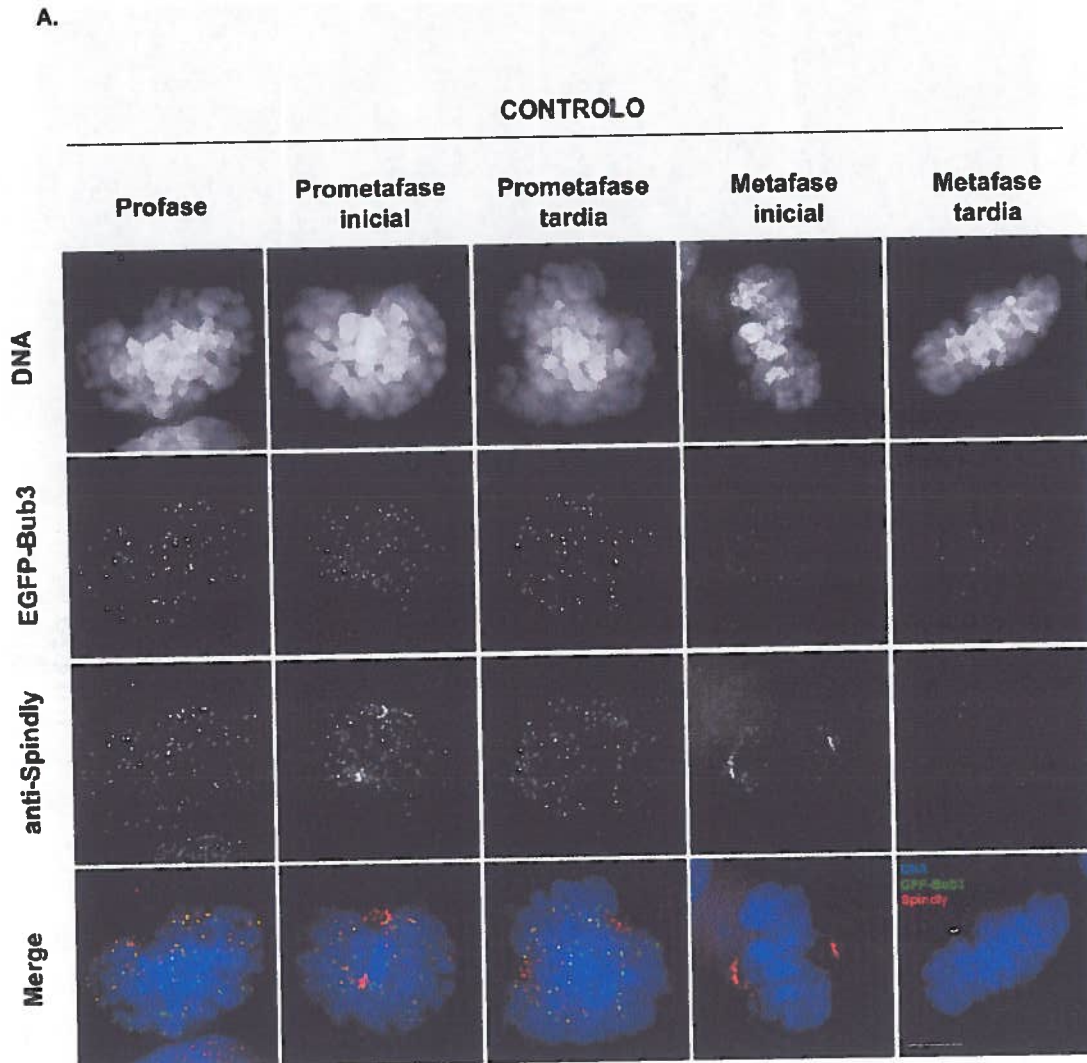


Figura 22. A depleção da proteína dineína não interfere com a localização da proteína Bub3 nos cinetocoros. Imagens de imunofluorescência de células HeLa GFP-Bub3 controlo e siDHC. As células foram marcadas com os anticorpos anti-DIC (vermelho) e o ADN com Dapi. Barra = 5 µm.

Devido a dificuldades técnicas com a utilização do anticorpo anti-DIC, até à data, não foi possível aceder ao facto da proteína Bub3 poder ser necessária para a localização da proteína dineína no cinetocoro. Assim, como alternativa plausível, fomos verificar se a Bub3 é necessária para a localização cinetocoriana da spindly, uma proteína requerida para a localização da dineína no cinetocoro. Durante a mitose, a proteína spindly localiza-se nos cinetocoros no início da prometáfase e é transportada pela dineína para os pólos do fuso mitótico antes da metafase. Uma vez completo o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica, a marcação nos pólos deixa de ser visível sugerindo que a proteína se difunde no citosol após se movimentar para os pólos (Figura 23, A) (Chan *et al.*, 2009, Gassmann *et al.*, 2010). Após RNAi de Bub3, verificou-se que a proteína Bub3 interfere com a localização/migração da proteína spindly para os pólos do fuso mitótico, mas não com a sua localização nos cinetocoros (Figura 23, B). Este resultado sugere, embora indirectamente, que a depleção da Bub3 não interfere com a localização da dineína no cinetocoro. A interferência com a migração da spindly

para os pólos sugere um possível envolvimento da Bub3 na regulação da função da dineína no transporte de spindly para os pólos.

Em conclusão, não existe uma relação de interdependência na localização no cinetocoro entre as proteínas Bub3 e dineína.



B.

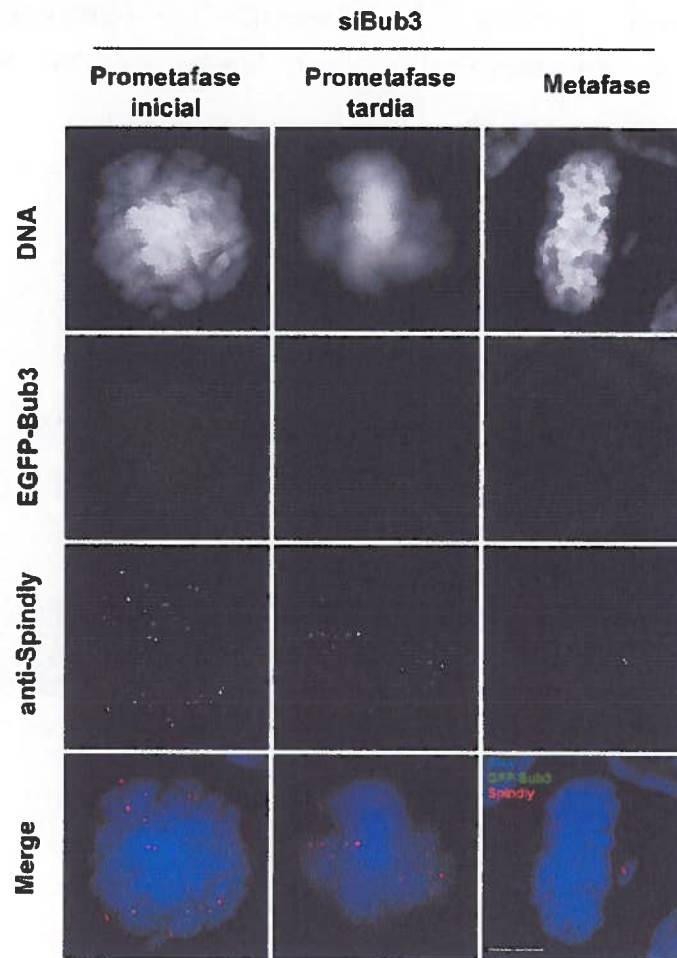


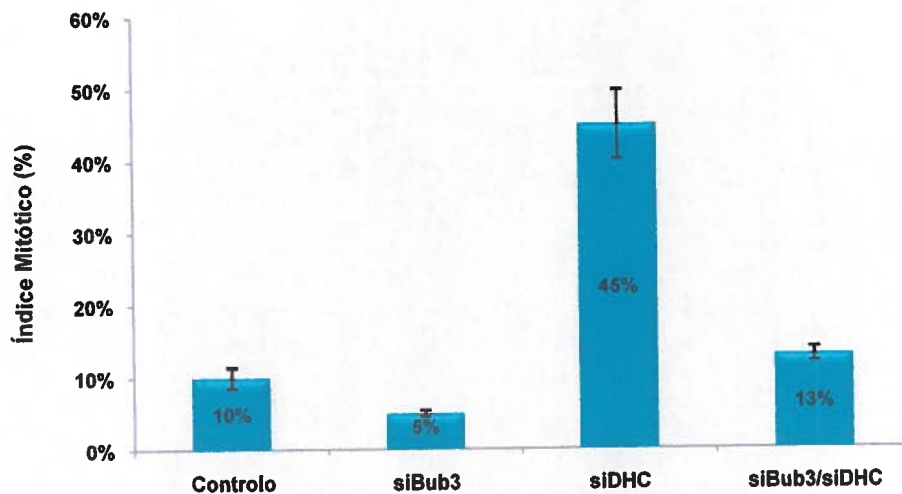
Figura 23. A depleção de Bub3 interfere com a localização da spindly nos polos mas não com a sua localização nos cinetocoros. (A) Padrão de localização da proteína spindly nas diferentes fases da mitose. As células foram marcadas com um anticorpo anti-spindly (vermelho). (B) Células siBub3 marcadas com anticorpo anti-spindly (vermelho), demonstrando que a proteína Bub3 interfere com a localização/migração da proteína spindly para os pólos do fuso mitótico, mas não com a sua localização nos cinetocoros. O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m

3.2.2 A depleção dupla revelou que a acumulação em mitose, observada após depleção individual da dineína, é *checkpoint* dependente

Em semelhança com o procedimento efectuado para as proteínas dineína e Bub3 isoladamente, procedemos à contagem do IM numa cultura transfectada com siBub3 e siDHC em simultâneo. Assim, comparando os valores obtidos verificou-se uma diminuição drástica das células mitóticas, após depleção dupla, comparativamente ao RNAi de dineína (13 \pm 1,0% vs 45 \pm 4,8%) (Figura 24, A). Esta observação, aliada à

presença de núcleos anormais reflectindo as saídas prematuras da mitose (Figura 24, B), indica que a paragem em mitose das células siDHC é *checkpoint* dependente, confirmando o sugerido anteriormente pela análise do fenótipo após RNAi de dineína.

A.



B.

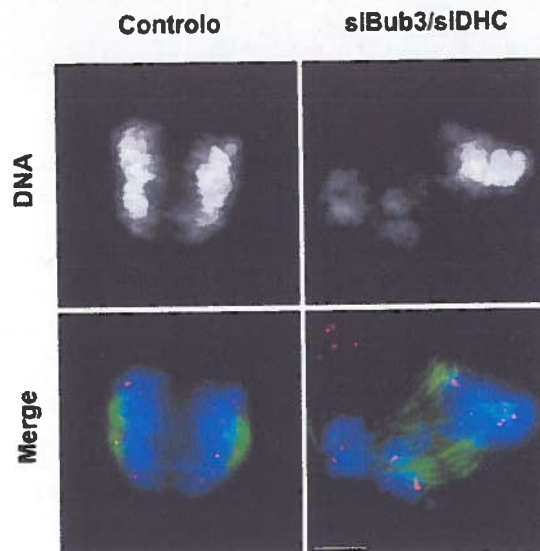


Figura 24. A acumulação em mitose, observada após depleção individual da dineína, é *checkpoint* dependente. (A) Índice mitótico, nas culturas controlo e transfetada com siBub3, siDHC e siBub3/siDHC. As percentagens obtidas reflectem uma notável diminuição das células mitóticas presentes, comparativamente ao RNAi de dineína. Os valores apresentados representam a média aritmética \pm desvio padrão de três experiências independentes. O total de células mitóticas e interfásicas quantificado foi: $n = 10060$ no controlo, $n = 6693$ no siDHC, $n = 12231$ no siBub3 e $n = 10994$ no siBub3/siDHC (B) As células siBub3/siDHC apresentam núcleos anormais,

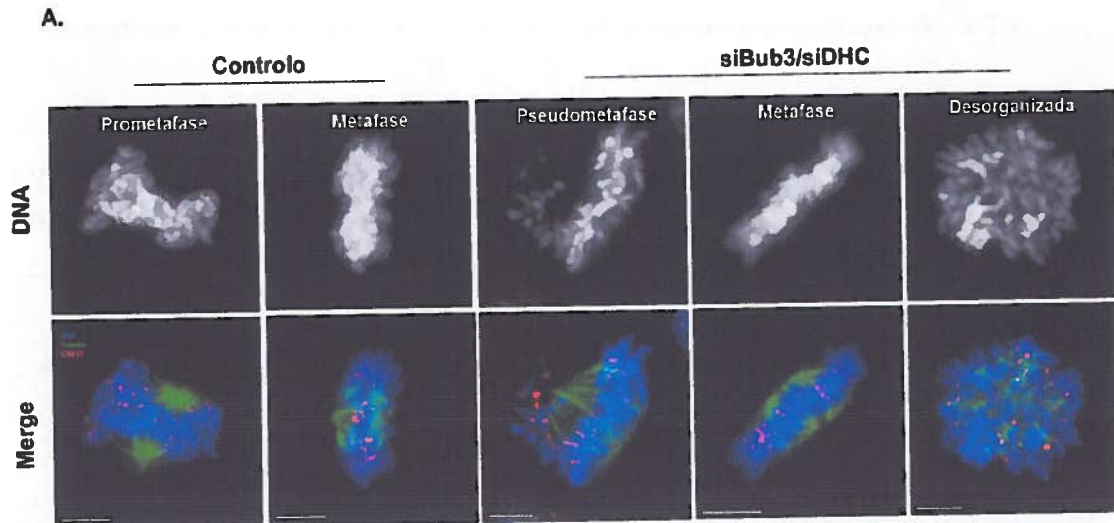
reflectindo as saídas prematuras da mitose, indicando que a paragem em mitose das células siDHC é *checkpoint* dependente. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CREST (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m

3.2.3 A depleção conjunta de Bub3 e dineína restaura a placa metafásica

Para além das saídas prematuras da mitose, as figuras mitóticas observadas nas culturas com depleção dupla lembravam as encontradas após depleção individual da dineína: metafases completas, pseudometafases e figuras desorganizadas (Figura 25, A). Contudo, notou-se um aumento de metafases completas e uma diminuição de prometafases/pseudometafases nas culturas com depleção dupla comparativamente às culturas com depleção individual da dineína e da Bub3. Este fenótipo foi confirmado após quantificação destas figuras mitóticas recorrendo-se ao uso do inibidor de proteossoma MG-132 para impedir as saídas prematuras da mitose devido à inactivação do *checkpoint* mitótico. Os resultados indicam uma diminuição significativa da percentagem de prometafases/pseudometafases no duplo comparativamente à cultura siBub3 mas não significativa comparativamente à cultura siDHC (Figura 25, B). Por outro lado, verificou-se um aumento significativo da percentagem de metafases completas no duplo comparativamente à depleção individual de Bub3 ou de dineína. Apesar de existir uma tendência de conversão de prometafases/pseudometafases em metafases completas durante o tempo de incubação com MG-132, esta tendência ficou aquém do nível de correcção observado no controlo. Por exemplo, no controlo, verificou-se uma diminuição de 49% nas prometafases antes e depois de incubação com MG-132 (Figura 25, B). Esta diminuição foi de 17,4% só no duplo e é estatisticamente significativa comparativamente ao controlo. Verificou-se o mesmo em relação às metafases completas: um aumento de 49% no controlo e de 23,3% só no duplo. Estes dados indicam um efeito de restauração parcial das metafases, sugerindo um resgate das ligações cinetocoro-microtúbulos após depleção simultânea de Bub3 e de dineína.

Uma vez que a depleção, quer de Bub3 quer de dineína, resulta em metafases com cromossomas desalinhados, era expectável que a depleção dupla destas proteínas resultasse numa resposta cumulativa com agravamento do número de metafases com desalinhados. Pelo contrário, os resultados indicam uma restauração do alinhamento dos cromossomas, sugerindo a existência de uma relação antagonística entre as proteínas Bub3 e dineína, na regulação da ligação cinetocoros-microtúbulos. Possivelmente, os cromossomas desalinhados provocados pelo RNAi de Bub3 seriam induzidos pela acção da dineína que, directa ou indirectamente, destabilizaria a ligação cinetocoros-

microtúbulos ou, de algum modo, alteraria a dinâmica da extremidade (+) dos microtúbulos, numa tentativa de correcção das ligações incorrectas.



B.

	Prometafases			Metafases		
	-MG	+MG	Diferença	-MG	+MG	Diferença
Controlo	57,7 ± 1,0%	8,7 ± 1,0%	49,0%	42,3 ± 1,0%	91,3 ± 1,0%	49,0%
siBub3	76,1 ± 1,5%	61,7 ± 1,5%	14,4%*	23,9±1,5%	38,3±1,5%	14,4%*
siDHC	86,2±7,2%	58,0±4,6%	0,01%*	13,8±1,1%	42,0±3,1%	20,3%*
siDuplo	62,8±7,2%	32,1±1,8% ^a	17,4%*	37,2±1,8%	67,9±8,1% ^b	23,3%*

Figura 25. Fenótipo resultante da depleção conjunta das proteínas Bub3 e dineína. (A) Imagens de imunofluorescência de células controlo e siBub3/siDHC, marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde) e anti-CREST (vermelho) mostrando a existência das mesmas figuras mitóticas que as das células transfectadas com siDHC. O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. **(B)** Quantificação das prometafases/pseudometafases e metafases antes e após incubação com MG-132. As percentagens obtidas representam a média aritmética \pm desvio padrão de três experiências independentes. ^a Estatisticamente significativo comparado com siBub3 mas não significativo comparado com siDHC; ^b Estatisticamente significativo comparado com siBub3 ou com siDHC; (*) Estatisticamente significativo comparado com controlo. O total de células mitóticas quantificado corresponde a um n=683 no controlo, n=994 no controlo + MG-132, n=684 no siBub3, n=1071 no siBub3 + MG-132, n=1719 no siDHC, n=1363 no siDHC + MG-132, n=1075 no siBub3/siDHC e n=1018 no siBub3/siDHC + MG-132

3.2.4 A restauração da placa metafásica no duplo não implica o restabelecimento de ligações cinetocoros-microtúbulos eficientes

A restauração das metafases completas verificada após depleção dupla de Bub3 e de dineína implicaria uma progressão das células para anáfase mas não foi possível verificar este facto uma vez que as células duplamente depletadas, de qualquer modo, saem da mitose como resultado da inactivação do *checkpoint*. Em contrapartida, procedeu-se à análise da eficiência e natureza das ligações cinetocoros-microtúbulos nas células com depleção dupla, recorrendo a três ensaios: (i) *Cold Treatment*, (ii) *Recovery* e (iii) medição da distância entre cinetocoros irmãos.

O ensaio de *cold treatment* permite testar a estabilidade das ligações, uma vez que só as ligações cinetocoro-microtúbulos (*K-fibers*) estáveis resistem ao tratamento com o frio após incubação das células a 4°C (Brinkley e Cartwright, 1975; Mitchison *et al.*, 1986; Salmon *et al.*, 1976); (Rieder, 1981). Assim, após este tratamento, verificou-se que nas células HeLa controlo, todos os cinetocoros tinham fibras de microtúbulos ligados, indicando a presença de ligações estáveis (Figura 26). Nas células siBub3, observou-se uma diminuição do número de microtúbulos cinetocorianos e a presença de vários cinetocoros não ligados, indicando instabilidade de ligação (Figura 26). Este resultado é concordante com observações prévias (Logarinho *et al.*, 2008). Relativamente às células com siDHC, observou-se a presença de várias fibras de microtúbulos ainda ligados aos cinetocoros e alguns cinetocoros sem microtúbulos ligados (Figura 26), contrariamente ao observado por Varma *et al.*, que relatou a ausência de fibras cinetocorianas após o *cold treatment* (Varma *et al.*, 2008). Nas células com depleção dupla das proteínas Bub3 e dineína verificou-se um ligeiro aumento das fibras cinetocorianas presentes, comparativamente ao observado na depleção individual, embora ainda se afastem do observado nas células controlo.

Este resultado indica que a estabilidade das ligações cinetocoro-microtúbulos está, apenas, ligeiramente afectada após depleção da dineína ou após depleção dupla da dineína e Bub3. Assim, no nosso estudo, as ligações cinetocoro-microtúbulos estariam suficientemente estáveis, após depleção dupla, para poderem restaurar as placas metafásicas observadas.

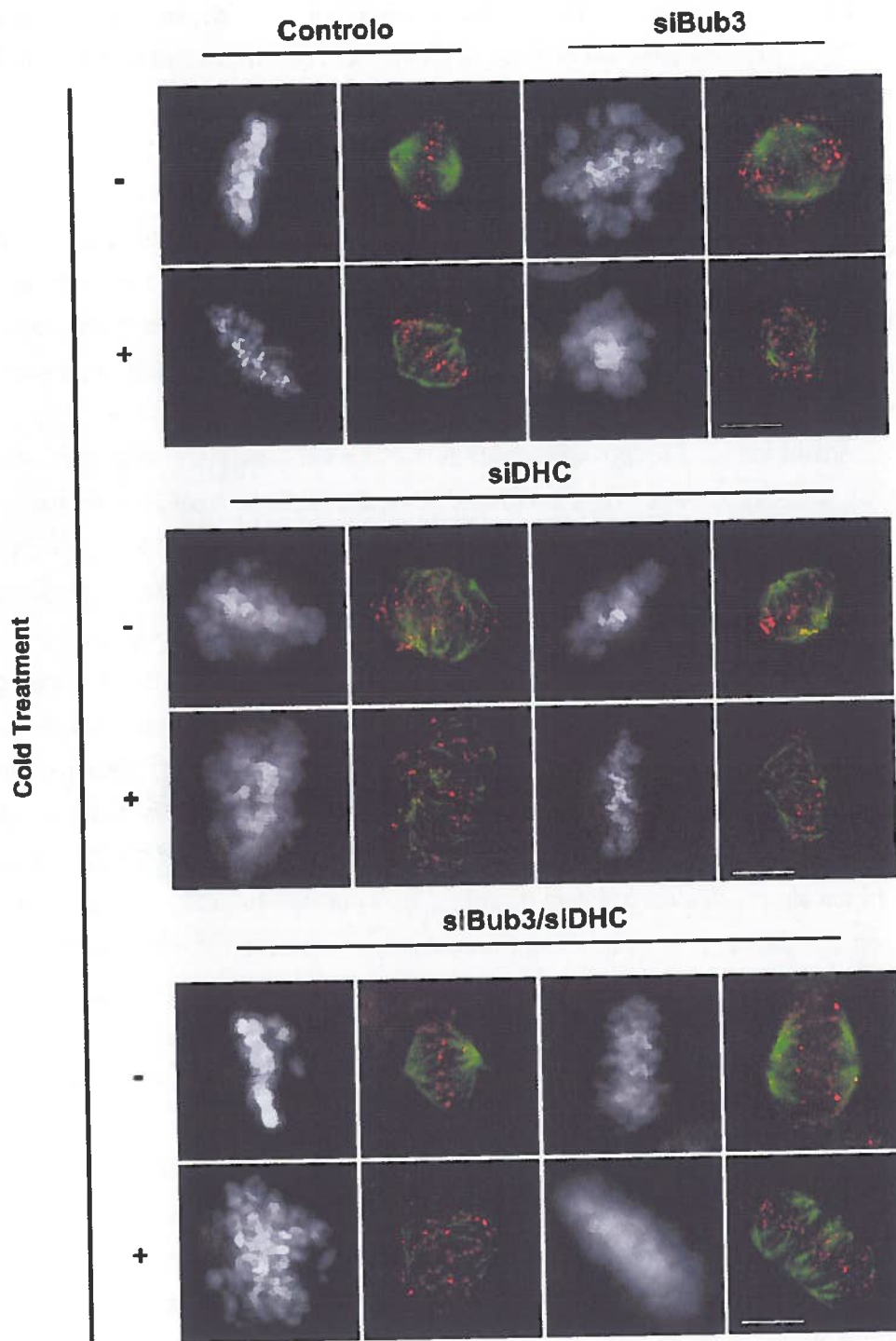
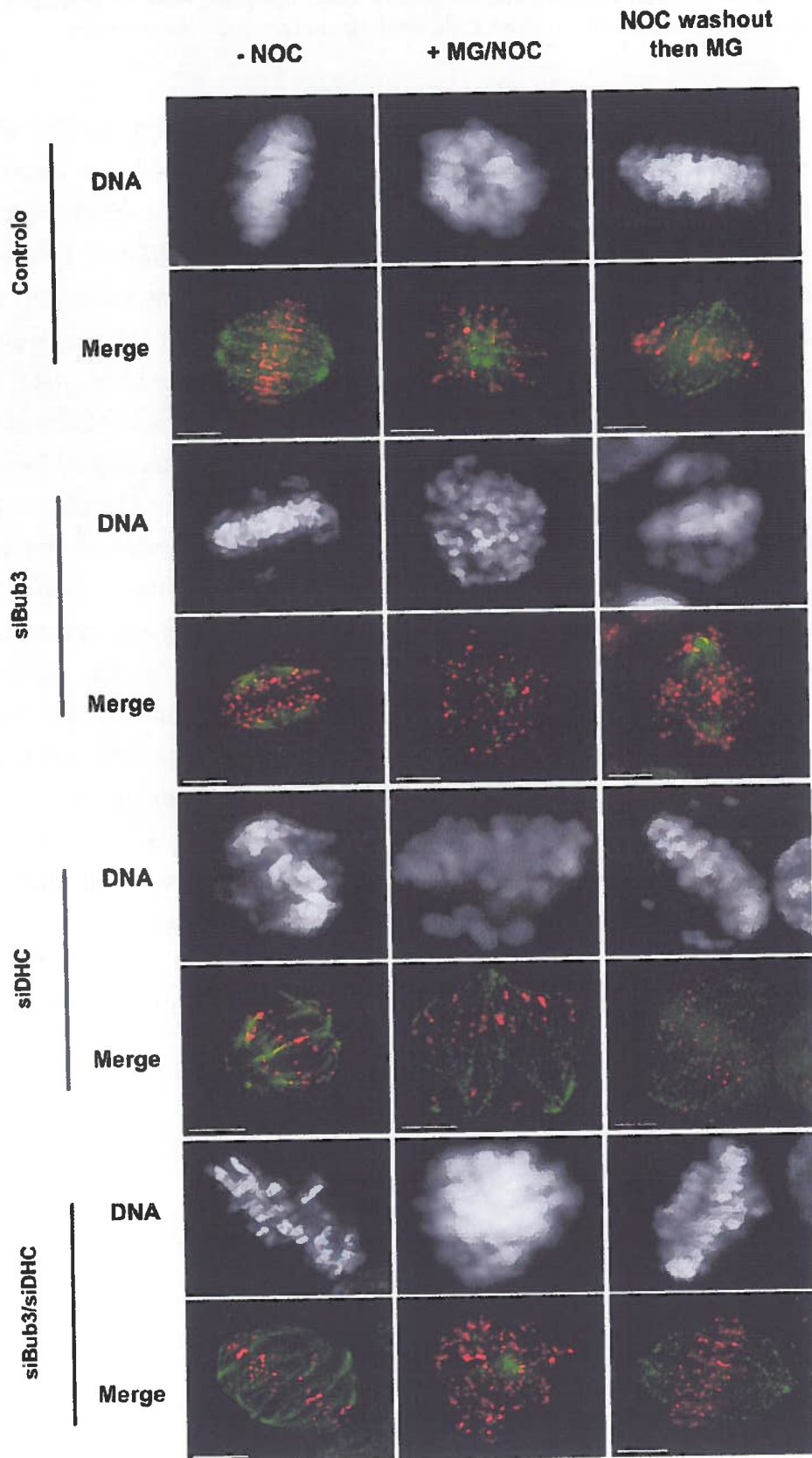


Figura 26. Fenótipo resultante do ensaio de *Cold Treatment*, realizado em culturas controlo e após depleção individual e conjunta das proteínas Bub3 e dineína. Imagens de imunofluorescência evidenciando, após incubação das células a 4°C, a presença de ligações estáveis no controlo, com todos os cinetocoros ligados; a diminuição do número de microtúbulos cinetocorianos e a presença de cinetocoros não ligados nas células siBub3, indicando a instabilidade das ligações; e a presença de cinetocoros ainda ligados, nas células siDHC e alguns cinetocoros livres, sugerindo um comprometimento parcial da estabilidade das ligações. Na depleção dupla das duas proteínas o aumento, embora ligeiro, de microtúbulos cinetocorianos

comparativamente à depleção individual sugere a presença de ligações suficientemente estáveis, justificando a placa metafásica observada. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CREST (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m

De modo a avaliar a capacidade das ligações cinetocoro-microtúbulos, nas células com depleção dupla, em restabelecer a placa metafásica, recorreu-se ao ensaio de *recovery*. Neste ensaio, as células HeLa controlo e transfectadas com siRNAs de Bub3, dineína e do duplo foram previamente incubadas com 10 μ M de MG-132, durante 60 minutos, para enriquecer as culturas em placas metafásicas, seguida de incubação com 1 μ M de nocodazole, igualmente de 60 minutos, para provocar a disrupção destas placas formadas. De seguida, o nocodazole foi removido do meio e substituído por novo meio contendo MG-132 e deixou-se as células nesta solução durante 45 minutos. Durante este tempo, as células gozaram da oportunidade de recuperar a placa metafásica. Passado este tempo, a maioria das células mitóticas controlo (90%) apresentava fusos bipolares e placas metafásicas completas com todos os cromossomas alinhados, indicando restabelecimento de ligações cinetocoro-microtúbulos eficientes. No entanto, apenas 12% de células mitóticas após RNAi de Bub3 e 30% após RNAi de dineína conseguiram restabelecer uma placa metafásica completa; nas restantes células mitóticas, apesar de terem restabelecido um fuso bipolar, as placas metafásicas ainda exibiam vários cromossomas desalinhados, indicando a ineficiência das ligações cinetocoro-microtúbulos (Figura 27, A e B). Nesta situação apesar da presença do fuso mitótico bipolar, os cromossomas não conseguem alinhar na placa metafásica, resultado consistente com o facto das ligações cinetocoro-microtúbulos não serem eficientes. Relativamente às células com depleção conjunta das duas proteínas, verificou-se uma recuperação significativa das placas metafásicas, 52%, (Figura 27, A e B), por comparação com o silenciamento individual de cada uma, resultado consistente com a restauração das metafases completas acima descrita.

A.



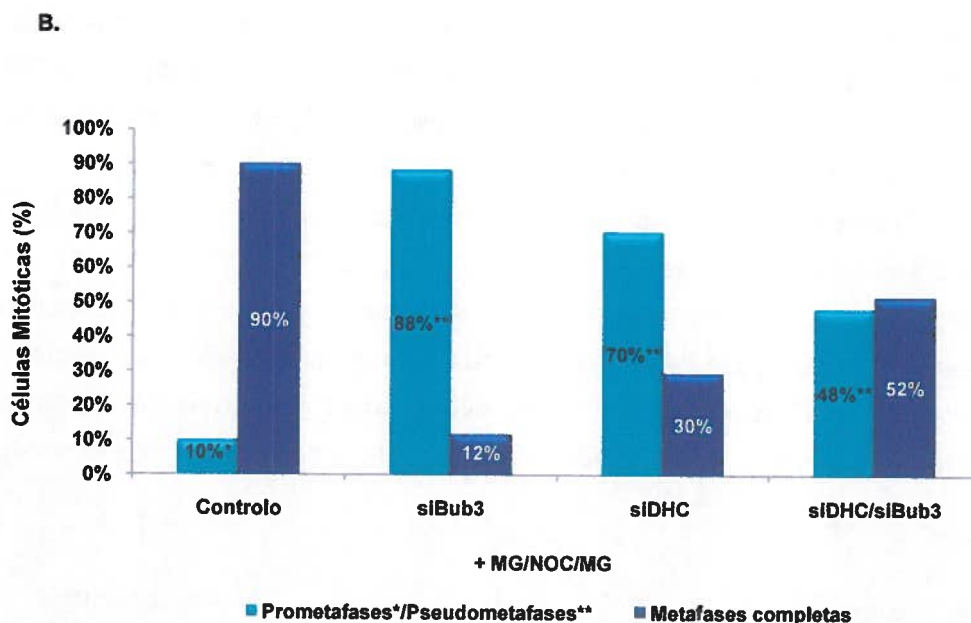


Figura 27. Fenótipo resultante do ensaio de *Recovery*, realizado em culturas controlo e após depleção individual e conjunta das proteínas Bub3 e dineína. (A) Imagens de imunofluorescência, mostrando a presença de uma placa metafásica completa na cultura controlo, após *recovery*, a presença de metafases com cromossomas desalinhados nas culturas com siBub3 e siDHC e nas células com depleção dupla observa-se a existência de placas metafásicas completas. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CREST (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m. (B) Quantificação da fracção de células mitóticas, após o *recovery*, evidenciando uma recuperação considerável de placas metafásicas em células com depleção dupla das proteínas Bub3 e dineína, comparativamente ao verificado após a depleção individual.

Por último, determinou-se a distância inter-cinetocoriana dos cromossomas alinhados. Este parâmetro permite avaliar as forças de tensão exercidas pelas fibras de microtúbulos sobre os cinetocoros e, portanto, a eficiência das ligações bipolares. Assim, procedeu-se à medição das distâncias entre pares de cinetocoros irmãos, evidenciados pela marcação com um anticorpo anti-Hec1 e anti- α -tubulina, após incubação das células com MG-132 durante 60 minutos.

As imagens de imunofluorescência mostram uma diminuição perceptível da distância entre os cinetocoros irmãos dos cromossomas alinhados nas células após depleção de Bub3 ou de dineína, comparativamente ao controlo (Figura 28).

Após quantificação, verificou-se que a distância entre os pares de cinetocoros irmãos nas células siBub3 é significativamente inferior à distância medida nas células controlo ($1,39 \pm 0,09 \mu$ m vs $2,08 \pm 0,37 \mu$ m, $p=0,12$). O mesmo resultado foi obtido nas células siDHC ($1,56 \pm 0,10 \mu$ m vs $2,08 \pm 0,37 \mu$ m, $p=0,035$). Estes resultados confirmam o que foi descrito noutros estudos (Gordon *et al.*, 2001; Logarinho *et al.*, 2008). Todavia,

quando comparadas as distâncias intercinetocorianas entre o duplo e controlo, verificou-se que apesar da diferença dos valores obtidos não ser estatisticamente significativa ($1,66 \pm 0,19 \mu\text{m}$ vs $2,08 \pm 0,37 \mu\text{m}$, $p=0,091$), as distancias no duplo foram maioritariamente inferiores aos valores controlo. Assim, nas células com silenciamento duplo, não se verificou uma restauração total da distância inter-cinetocoros, indicando que as ligações estabelecidas não são suficientemente eficientes para gerar tensão (Figura 28).

Em conclusão, os três ensaios permitiram verificar que as ligações cinetocoro-microtúbulos nas metafases de células com depleção dupla de Bub3 e de dineína não são completamente restabelecidas, sendo suficientemente estáveis para permitir o alinhamento dos cromossomas mas não suficientemente robustas para gerar tensão.

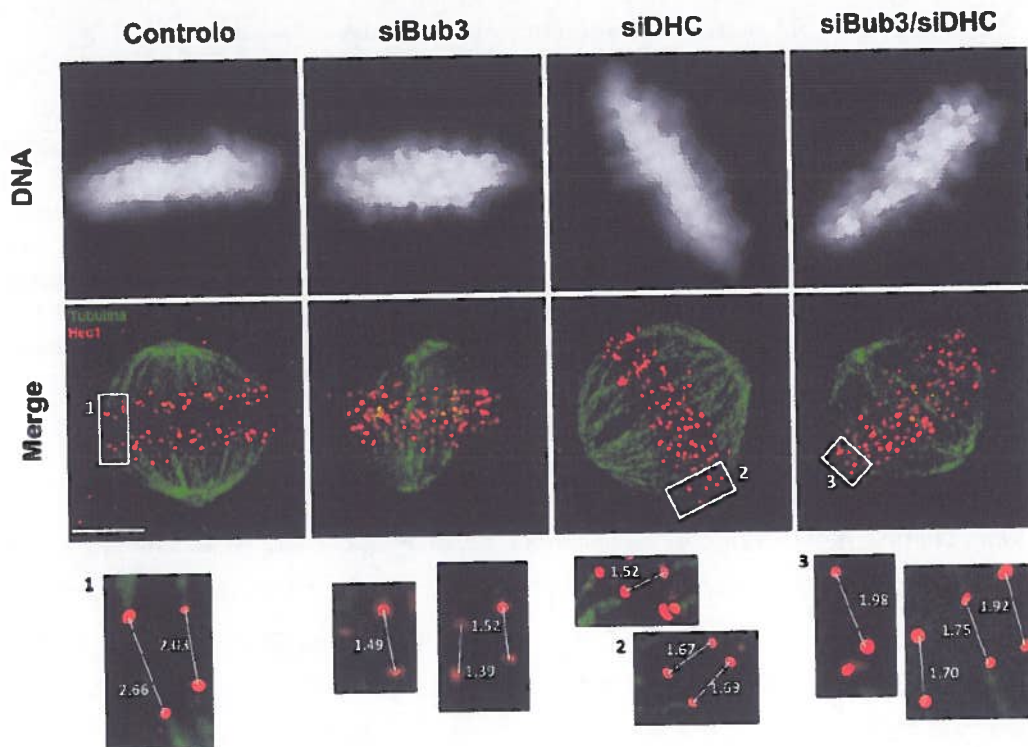


Figura 28. Distâncias inter-cinetocoros nas células com depleção das proteínas Bub3, DHC e Bub3/DHC. Imagens de imunofluorescência, mostrando uma diminuição perceptível da distância entre os cinetocoros irmãos dos cromossomas alinhados nas células após depleção de Bub3 ou de dineína e após depleção simultânea das duas proteínas, comparativamente com o controlo. Os *insets* mostram o valor das distâncias entre pares de cinetocoros, representativos de cada condição, adquiridos com 2-6 *sticks*. As células foram marcadas com os anticorpos anti-Hec1 (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μm .

3.2.5 Natureza da ligação cinetocoro-microtúbulos dos cromossomas desalinhados após depleção individual e simultânea das proteínas Bub3 e dineína

De forma a avaliar o tipo de ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos dos cromossomas desalinhados, após RNAi, procedeu-se à marcação das células com anticorpos anti-HEC1 e anti- α -tubulina. Em células com depleção da proteína dineína verificou-se a existência, maioritária, de cinetocoros mono-orientados e a presença de cinetocoros livres. De considerar o facto dos cromossomas desalinhados estarem posicionados fora do eixo central do fuso mitótico (Figura 29). Relativamente às ligações estabelecidas nas células com siBub3 verificou-se a presença, igualmente, de cinetocoros mono-orientados e de cinetocoros livres e, ainda, a existência de ligações laterais. Os cromossomas desalinhados encontravam-se localizados perto dos pólos, afastados do eixo do fuso mitótico (Figura 29). Na depleção conjunta das duas proteínas observou-se uma alteração relativamente à posição dos cromossomas desalinhados que, aqui, se localizam próximo da placa metafásica formada, sugerindo uma correcção no alinhamento dos cromossomas relativamente ao eixo (Figura 29). Esta correcção poderá dever-se à estabilização das ligações, após depleção dupla de Bub3 e de dineína, que conseguiram colocar os cromossomas na região central do eixo do fuso. Devido à densidade dos microtúbulos nesta região central do fuso mitótico, não foi possível determinar a natureza destas ligações.

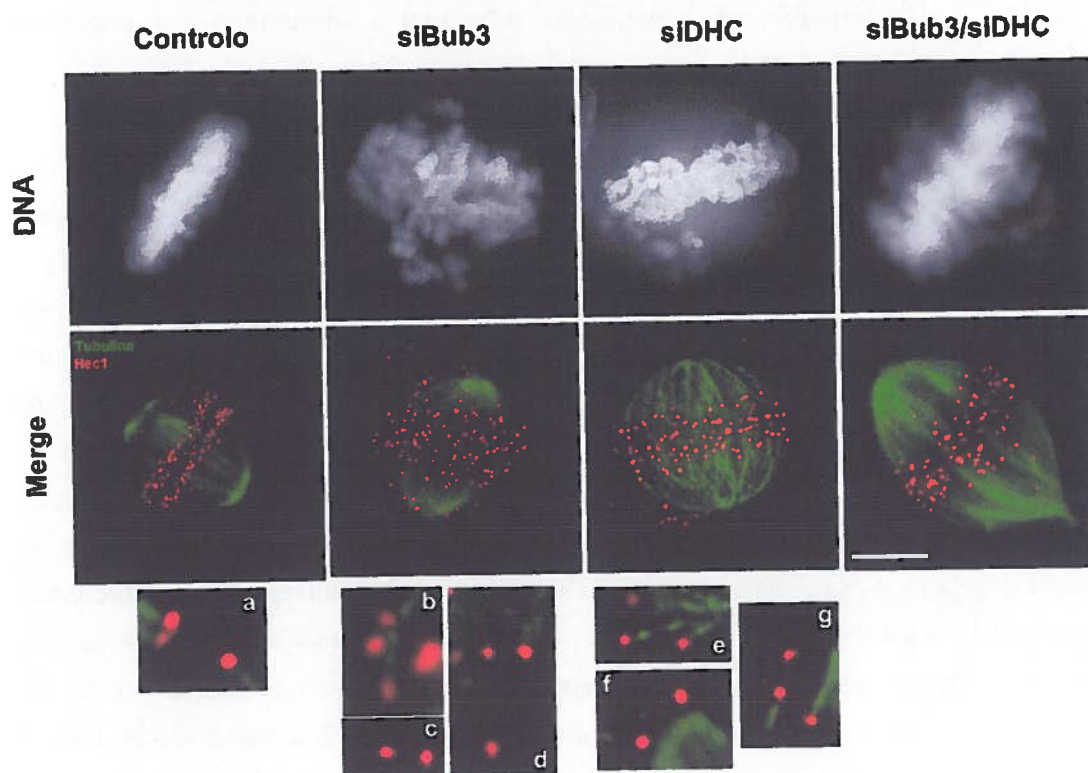


Figura 29. Tipo de ligação cinetocoros-microtúbulos nas células com depleção das proteínas Bub3, DHC e Bub3/DHC. Imagens de imunofluorescência, mostrando cinetocoros com ligação bipolar nas células controlo (a); cinetocoros com ligação lateral (b), cinetocoros livres (c) e mono-orientados (d) nas células siBub3 e a presença de cinetocoros mono-orientados (e, g) e cinetocoros livres (f) nas células siDHC. Nas células com depleção dupla, a densa rede de microtúbulos impossibilita a caracterização das ligações. A ampliação corresponde a imagens adquiridas entre 2-6 *stacks*, que permitissem uma melhor visualização da ligação. As células foram marcadas com os anticorpos anti-Hec1 (vermelho) e anti- α -tubulina (verde). O ADN foi corado com Dapi. Barra = 5 μ m.

PARTE IV.

CONCLUSÃO

Neste trabalho propusemo-nos a caracterizar o fenótipo da depleção directa da dineína e estudar a relação funcional entre a proteína do *checkpoint* mitótico Bub3 e a proteína motora dineína, na regulação cinetocoros-microtúbulos, recorrendo à depleção por RNAi de ambas as proteínas, individualmente ou em conjunto. Da análise do fenótipo resultante destas experiências da depleção foi possível verificar que:

A depleção da proteína dineína resultou em defeitos na congressão e em cromossomas mono-orientados ou não ligados, com consequente desalinhamento. Fenótipo, em tudo, semelhante ao descrito nos estudos da sua deslocalização dos cinetocoros por depleção das proteínas requeridas para a sua localização no cinetocoro. No entanto, ao contrário do descrito por estes estudos, a ausência de dineína não resulta numa retenção das proteínas do *checkpoint* nos cinetocoros alinhados mas, só nos desalinhados.

A depleção da proteína Bub3 resultou num fenótipo semelhante, ao da depleção da dineína em termos de congressão e alinhamento dos cromossomas, confirmando estudos anteriores. Foi possível, pela primeira vez, verificar que a proteína Bub3 é necessária para a migração para os pólos da proteína spindly, sugerindo um possível envolvimento da Bub3 na regulação da função da dineína neste transporte, uma vez que é a dineína que assegura o transporte da proteína spindly para os pólos.

A depleção simultânea das proteínas Bub3 e dineína resultou numa restauração das placas metafásicas comparativamente à depleção individual destas proteínas, sugerindo uma relação antagonística entre as duas na regulação da ligação cinetocoros-microtúbulos. As ligações cinetocoros-microtúbulos, após depleção dupla, apesar de permitir a restauração das placas metafásicas não são completamente funcionais.

PARTE V.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, Carlos. (1999). *Biologia Celular E Molecular*. 3ª edição, Lidel-Edições Técnicas.
- Bader, J. R. e Vaughan, K. T. (2010). Dynein at the Kinetochore: Timing, Interactions and Functions. *Semin Cell Dev Biol*. **21**: 269-275.
- Baker, J. R. (1949). The Cell-Theory; a Restatement, History, and Critique. *Q J Microsc Sci*. **90**: 87-108.
- Bardin, A. J. e Amon, A. (2001). Men and Sin: What's the Difference? *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**: 815-826.
- Barisic, M., Sohm, B., Mikolcevic, P., Wandke, C., Rauch, V., Ringer, T., Hess, M., Bonn, G. e Geley, S. (2010). Spindly/Ccdc99 Is Required for Efficient Chromosome Congression and Mitotic Checkpoint Regulation. *Mol Biol Cell*. **21**: 1968-1981.
- Basto, R., Gomes, R. e Karess, R. E. (2000). Rough Deal and Zw10 Are Required for the Metaphase Checkpoint in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. **2**: 939-943.
- Bharadwaj, R. e Yu, H. (2004). The Spindle Checkpoint, Aneuploidy, and Cancer. *Oncogene*. **23**: 2016-2027.
- Bolanos-Garcia, V. M. e Blundell, T. L. (2010). Bub1 and Bubr1: Multifaceted Kinases of the Cell Cycle. *Trends Biochem Sci*.
- Brinkley, B. R. e Cartwright, J., Jr. (1975). Cold-Labile and Cold-Stable Microtubules in the Mitotic Spindle of Mammalian Cells. *Ann N Y Acad Sci*. **253**: 428-439.
- Brinkley, B. R. e Stubblefield, E. (1966). The Fine Structure of the Kinetochore of a Mammalian Cell in Vitro. *Chromosoma*. **19**: 28-43.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T. e Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the Dynamitin (P50) Subunit of the Dynactin Complex Disrupts Dynein-Dependent Maintenance of Membrane Organelle Distribution. *J Cell Biol*. **139**: 469-484.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. e De Mey, J. R. (1998). Dynein and Dynactin Are Localized to Astral Microtubules and at Cortical Sites in Mitotic Epithelial Cells. *Curr Biol*. **8**: 541-544.
- Cassimeris, L. e Skibbens, R. V. (2003). Regulated Assembly of the Mitotic Spindle: A Perspective from Two Ends. *Curr Issues Mol Biol*. **5**: 99-112.
- Chan, G. K., Jablonski, S. A., Starr, D. A., Goldberg, M. L. e Yen, T. J. (2000). Human Zw10 and Rod Are Mitotic Checkpoint Proteins That Bind to Kinetochores. *Nat Cell Biol*. **2**: 944-947.
- Chan, G. K., Liu, S. T. e Yen, T. J. (2005). Kinetochore Structure and Function. *Trends Cell Biol*. **15**: 589-598.
- Chan, Y. W., Fava, L. L., Uldschmid, A., Schmitz, M. H., Gerlich, D. W., Nigg, E. A. e Santamaria, A. (2009). Mitotic Control of Kinetochore-Associated Dynein and Spindle Orientation by Human Spindly. *J Cell Biol*. **185**: 859-874.
- Chaturvedi, P., Sudakin, V., Bobiak, M. L., Fisher, P. W., Mattern, M. R., Jablonski, S. A., Hurle, M. R., Zhu, Y., Yen, T. J. e Zhou, B. B. (2002). Chfr Regulates a Mitotic Stress Pathway through Its Ring-Finger Domain with Ubiquitin Ligase Activity. *Cancer Res*. **62**: 1797-1801.
- Cheeseman, I. M., Brew, C., Wolyniak, M., Desai, A., Anderson, S., Muster, N., Yates, J. R., Huffaker, T. C., Drubin, D. G. e Barnes, G. (2001). Implication of a Novel Multiprotein Dam1p Complex in Outer Kinetochore Function. *J Cell Biol*. **155**: 1137-1145.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. e Desai, A. (2006). The Conserved Kmn Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell*. **127**: 983-997.
- Cheeseman, I. M. e Desai, A. (2008). Molecular Architecture of the Kinetochore-Microtubule Interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**: 33-46.
- Civril, F. e Musacchio, A. (2008). Spindly Attachments. *Genes Dev*. **22**: 2302-2307.
- Clarke, D. J. e Gimenez-Abian, J. F. (2000). Checkpoints Controlling Mitosis. *Bioessays*. **22**: 351-363.
- Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J. e Earnshaw, W. C. (1997). Localization of Cenp-E in the Fibrous Corona and Outer Plate of Mammalian Kinetochores from Prometaphase through Anaphase. *Chromosoma*. **106**: 446-455.

- De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D. e Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 Complex as a Template for Mad2 Activation in the Spindle Assembly Checkpoint. *Curr Biol.* **15**: 214-225.
- Deluca, J. G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J. M., Salmon, E. D. e Mcewen, B. F. (2005). Hec1 and Nuf2 Are Core Components of the Kinetochore Outer Plate Essential for Organizing Microtubule Attachment Sites. *Mol Biol Cell.* **16**: 519-531.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. e Taylor, S. S. (2003). Aurora B Couples Chromosome Alignment with Anaphase by Targeting Bubr1, Mad2, and Cenp-E to Kinetochores. *J Cell Biol.* **161**: 267-280.
- Downing, K. H. e Nogales, E. (1998). Tubulin Structure: Insights into Microtubule Properties and Functions. *Curr Opin Struct Biol.* **8**: 785-791.
- Dumont, S. e Mitchison, T. J. (2009). Force and Length in the Mitotic Spindle. *Curr Biol.* **19**: R749-761.
- Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T. e Vallee, R. B. (1996). Molecular Characterization of the 50-Kd Subunit of Dynactin Reveals Function for the Complex in Chromosome Alignment and Spindle Organization During Mitosis. *J Cell Biol.* **132**: 617-633.
- Emanuele, M., Burke, D. J. e Stukenberg, P. T. (2007). A Hec of a Microtubule Attachment. *Nat Struct Mol Biol.* **14**: 11-13.
- Famulski, J. K., Vos, L. J., Rattner, J. B. e Chan, G. K. (2011). Dynein/Dynactin-Mediated Transport of Kinetochore Components Off Kinetochores and onto Spindle Poles Induced by Nordihydroguaiaretic Acid. *PLoS One.* **6**: e16494.
- Fuller, B. G. e Stukenberg, P. T. (2009). Cell Division: Righting the Check. *Curr Biol.* **19**: R550-553.
- Gaitanos, T. N., Santamaria, A., Jeyaprakash, A. A., Wang, B., Conti, E. e Nigg, E. A. (2009). Stable Kinetochore-Microtubule Interactions Depend on the Ska Complex and Its New Component Ska3/C13orf3. *EMBO J.* **28**: 1442-1452.
- Gassmann, R., Essex, A., Hu, J. S., Maddox, P. S., Motegi, F., Sugimoto, A., O'rourke, S. M., Bowerman, B., Mcleod, I., Yates, J. R., 3rd, Oegema, K., Cheeseman, I. M. e Desai, A. (2008). A New Mechanism Controlling Kinetochore-Microtubule Interactions Revealed by Comparison of Two Dynein-Targeting Components: Spdl-1 and the Rod/Zw1ch/Zw10 Complex. *Genes Dev.* **22**: 2385-2399.
- Gassmann, R., Holland, A. J., Varma, D., Wan, X., Civril, F., Cleveland, D. W., Oegema, K., Salmon, E. D. e Desai, A. (2010). Removal of Spindly from Microtubule-Attached Kinetochores Controls Spindle Checkpoint Silencing in Human Cells. *Genes Dev.* **24**: 957-971.
- Gatlin, J. C. e Bloom, K. (2010). Microtubule Motors in Eukaryotic Spindle Assembly and Maintenance. *Semin Cell Dev Biol.* **21**: 248-254.
- Gillett, E. S., Espelin, C. W. e Sorger, P. K. (2004). Spindle Checkpoint Proteins and Chromosome-Microtubule Attachment in Budding Yeast. *J Cell Biol.* **164**: 535-546.
- Gorbsky, G. J. e Ricketts, W. A. (1993). Differential Expression of a Phosphoepitope at the Kinetochores of Moving Chromosomes. *J Cell Biol.* **122**: 1311-1321.
- Gordon, M. B., Howard, L. e Compton, D. A. (2001). Chromosome Movement in Mitosis Requires Microtubule Anchorage at Spindle Poles. *J Cell Biol.* **152**: 425-434.
- Griffis, E. R., Stuurman, N. e Vale, R. D. (2007). Spindly, a Novel Protein Essential for Silencing the Spindle Assembly Checkpoint, Recruits Dynein to the Kinetochore. *J Cell Biol.* **177**: 1005-1015.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P. S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I. V., Grosveld, F., Hoogenraad, C. C. e Akhmanova, A. (2007). Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers. *Dev Cell.* **13**: 305-314.
- Grzelakowska-Sztabert, B. (2004). Cell Cycle Checkpoints – Molecular Background. *Folia Morphol (Warsz)* **63**: 1-3.

Parte V – Referências Bibliográficas

- Guimaraes, G. J. e Deluca, J. G. (2009). Connecting with Ska, a Key Complex at the Kinetochores-Microtubule Interface. *EMBO J.* **28**: 1375-1377.
- Hanisich, A., Sillje, H. H. e Nigg, E. A. (2006). Timely Anaphase Onset Requires a Novel Spindle and Kinetochores Complex Comprising Ska1 and Ska2. *EMBO J.* **25**: 5504-5515.
- Hartwell, L. H. e Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science.* **246**: 629-634.
- Hayden, J. H., Bowser, S. S. e Rieder, C. L. (1990). Kinetochores Capture Astral Microtubules During Chromosome Attachment to the Mitotic Spindle: Direct Visualization in Live Newt Lung Cells. *J Cell Biol.* **111**: 1039-1045.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science.* **279**: 519-526.
- Hirokawa, N., Noda, Y. e Okada, Y. (1998). Kinesin and Dynein Superfamily Proteins in Organelle Transport and Cell Division. *Curr Opin Cell Biol.* **10**: 60-73.
- Hoffman, D. B., Pearson, C. G., Yen, T. J., Howell, B. J. e Salmon, E. D. (2001). Microtubule-Dependent Changes in Assembly of Microtubule Motor Proteins and Mitotic Spindle Checkpoint Proteins at Ptk1 Kinetochores. *Mol Biol Cell.* **12**: 1995-2009.
- Holy, T. E. e Leibler, S. (1994). Dynamic Instability of Microtubules as an Efficient Way to Search in Space. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 5682-5685.
- Howard, J. e Hyman, A. A. (2009). Growth, Fluctuation and Switching at Microtubule Plus Ends. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**: 569-574.
- Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L. e Salmon, E. D. (2001). Cytoplasmic Dynein/Dynactin Drives Kinetochores Protein Transport to the Spindle Poles and Has a Role in Mitotic Spindle Checkpoint Inactivation. *J Cell Biol.* **155**: 1159-1172.
- Kapoor, T. M., Lampson, M. A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E. D., McEwen, B. F. e Khodjakov, A. (2006). Chromosomes Can Congress to the Metaphase Plate before Biorientation. *Science.* **311**: 388-391.
- Kardon, J. R. e Vale, R. D. (2009). Regulators of the Cytoplasmic Dynein Motor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**: 854-865.
- Karess, R. (2005). Rod-Zw10-Zwilch: A Key Player in the Spindle Checkpoint. *Trends Cell Biol.* **15**: 386-392.
- Karki, S. e Holzbaur, E. L. (1999). Cytoplasmic Dynein and Dynactin in Cell Division and Intracellular Transport. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 45-53.
- Kaufmann, W. K. e Paules, R. S. (1996). DNA Damage and Cell Cycle Checkpoints. *FASEB J.* **10**: 238-247.
- Kelly, A. E. e Funabiki, H. (2009). Correcting Aberrant Kinetochores Microtubule Attachments: An Aurora B-Centric View. *Curr Opin Cell Biol.* **21**: 51-58.
- Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M. B., Compton, D. A. e Kapoor, T. M. (2003). Minus-End Capture of Preformed Kinetochores Fibers Contributes to Spindle Morphogenesis. *J Cell Biol.* **160**: 671-683.
- Khodjakov, A. e Rieder, C. L. (2001). Centrosomes Enhance the Fidelity of Cytokinesis in Vertebrates and Are Required for Cell Cycle Progression. *J Cell Biol.* **153**: 237-242.
- Khodjakov, A. e Rieder, C. L. (2009). The Nature of Cell-Cycle Checkpoints: Facts and Fallacies. *J Biol.* **8**: 88.
- King, J. M. e Nicklas, R. B. (2000). Tension on Chromosomes Increases the Number of Kinetochores Microtubules but Only within Limits. *J Cell Sci.* **113 Pt 21**: 3815-3823.
- King, S. J. e Schroer, T. A. (2000). Dynactin Increases the Processivity of the Cytoplasmic Dynein Motor. *Nat Cell Biol.* **2**: 20-24.
- King, S. M. (2000). Aaa Domains and Organization of the Dynein Motor Unit. *J Cell Sci.* **113 (Pt 14)**: 2521-2526.

Parte V – Referências Bibliográficas

- Kirsch-Volders, M., Cundari, E. e Verdoodt, B. (1998). Towards a Unifying Model for the Metaphase/Anaphase Transition. *Mutagenesis*. **13**: 321-335.
- Kirschner, M. e Mitchison, T. (1986). Beyond Self-Assembly: From Microtubules to Morphogenesis. *Cell*. **45**: 329-342.
- Kitamura, E., Tanaka, K., Komoto, S., Kitamura, Y., Antony, C. e Tanaka, T. U. (2010). Kinetochores Generate Microtubules with Distal Plus Ends: Their Roles and Limited Lifetime in Mitosis. *Dev Cell*. **18**: 248-259.
- Kline, S. L., Cheeseman, I. M., Hori, T., Fukagawa, T. e Desai, A. (2006). The Human Mis12 Complex Is Required for Kinetochores Assembly and Proper Chromosome Segregation. *J Cell Biol*. **173**: 9-17.
- Kops, G. J., Kim, Y., Weaver, B. A., Mao, Y., Mcleod, I., Yates, J. R., 3rd, Tagaya, M. e Cleveland, D. W. (2005a). Zw10 Links Mitotic Checkpoint Signaling to the Structural Kinetochores. *J Cell Biol*. **169**: 49-60.
- Kops, G. J., Saurin, A. T. e Meraldi, P. Finding the Middle Ground: How Kinetochores Power Chromosome Congression. *Cell Mol Life Sci*. **67**: 2145-2161.
- Kops, G. J., Weaver, B. A. e Cleveland, D. W. (2005b). On the Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint. *Nat Rev Cancer*. **5**: 773-785.
- Kramer, E. R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M. e Peters, J. M. (1998). Activation of the Human Anaphase-Promoting Complex by Proteins of the Cdc20/Fizzy Family. *Curr Biol*. **8**: 1207-1210.
- Kumar, Abbas e Fausto. (2005). *Robbins & Cotran Bases Patológicas Das Doenças*. 7ª edição, Elsevier Editora Ltda.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E. e Stukenberg, P. T. (2004). Aurora B Phosphorylates Centromeric Mcak and Regulates Its Localization and Microtubule Depolymerization Activity. *Curr Biol*. **14**: 273-286.
- Li, X. e Nicklas, R. B. (1995). Mitotic Forces Control a Cell-Cycle Checkpoint. *Nature*. **373**: 630-632.
- Li, Y., Yu, W., Liang, Y. e Zhu, X. (2007). Kinetochores Dynein Generates a Poleward Pulling Force to Facilitate Congression and Full Chromosome Alignment. *Cell Res*. **17**: 701-712.
- Liang, Y., Yu, W., Li, Y., Yu, L., Zhang, Q., Wang, F., Yang, Z., Du, J., Huang, Q., Yao, X. e Zhu, X. (2007). Nudel Modulates Kinetochores Association and Function of Cytoplasmic Dynein in M Phase. *Mol Biol Cell*. **18**: 2656-2666.
- Liu, D. e Lampson, M. A. (2009). Regulation of Kinetochores-Microtubule Attachments by Aurora B Kinase. *Biochem Soc Trans*. **37**: 976-980.
- Lo, K. W., Kogoy, J. M. e Pfister, K. K. (2007). The Dynl1 Light Chain Directly Links Cytoplasmic Dynein to a Spindle Checkpoint Protein, Bub3. *J Biol Chem*. **282**: 11205-11212.
- Logarinho, E. e Bousbaa, H. (2008). Kinetochores-Microtubule Interactions "in Check" by Bub1, Bub3 and Bub3: The Dual Task of Attaching and Signaling. *Cell Cycle*. **7**: 1763-1768.
- Logarinho, E., Bousbaa, H., Dias, J. M., Lopes, C., Amorim, I., Antunes-Martins, A. e Sunkel, C. E. (2004). Different Spindle Checkpoint Proteins Monitor Microtubule Attachment and Tension at Kinetochores in Drosophila Cells. *J Cell Sci*. **117**: 1757-1771.
- Logarinho, E., Resende, T., Torres, C. e Bousbaa, H. (2008). The Human Spindle Assembly Checkpoint Protein Bub3 Is Required for the Establishment of Efficient Kinetochores-Microtubule Attachments. *Mol Biol Cell*. **19**: 1798-1813.
- Luo, X. e Yu, H. (2008). Protein Metamorphosis: The Two-State Behavior of Mad2. *Structure*. **16**: 1616-1625.
- Maiato, H., Deluca, J., Salmon, E. D. e Earnshaw, W. C. (2004a). The Dynamic Kinetochores-Microtubule Interface. *J Cell Sci*. **117**: 5461-5477.
- Maiato, H., Khodjakov, A. e Rieder, C. L. (2005). Drosophila Clasp Is Required for the Incorporation of Microtubule Subunits into Fluxing Kinetochores Fibres. *Nat Cell Biol*. **7**: 42-47.
- Maiato, H., Rieder, C. L. e Khodjakov, A. (2004b). Kinetochores-Driven Formation of Kinetochores Fibers Contributes to Spindle Assembly During Animal Mitosis. *J Cell Biol*. **167**: 831-840.

- Mallik, R. e Gross, S. P. (2004). Molecular Motors: Strategies to Get Along. *Curr Biol.* **14**: R971-982.
- Martinez-Exposito, M. J., Kaplan, K. B., Copeland, J. e Sorger, P. K. (1999). Retention of the Bub3 Checkpoint Protein on Lagging Chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 8493-8498.
- Mastrorarde, D. N., McDonald, K. L., Ding, R. e Mcintosh, J. R. (1993). Interpolar Spindle Microtubules in Ptk Cells. *J Cell Biol.* **123**: 1475-1489.
- Masui, Y. e Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior During Meiotic Maturation of Frog Oocytes. *J Exp Zool.* **177**: 129-145.
- May, K. M. e Hardwick, K. G. (2006). The Spindle Checkpoint. *J Cell Sci.* **119**: 4139-4142.
- Mccurdy, J. D., Mcelroy, J. S., Kopsell, D. A., Sams, C. E. e Sorochan, J. C. (2008). Effects of Mesotrione on Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne* L.) Carotenoid Concentrations under Varying Environmental Conditions. *J Agric Food Chem.* **56**: 9133-9139.
- Mcgowan, C. H. (2003). Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle. *Prog Cell Cycle Res.* **5**: 1-4.
- Meraldi, P. e Sorger, P. K. (2005). A Dual Role for Bub1 in the Spindle Checkpoint and Chromosome Congression. *EMBO J.* **24**: 1621-1633.
- Miller, S. A., Johnson, M. L. e Stukenberg, P. T. (2008). Kinetochores Attachments Require an Interaction between Unstructured Tails on Microtubules and Ndc80(Hec1). *Curr Biol.* **18**: 1785-1791.
- Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E. e Kirschner, M. (1986). Sites of Microtubule Assembly and Disassembly in the Mitotic Spindle. *Cell.* **45**: 515-527.
- Mitchison, T. e Kirschner, M. (1984). Dynamic Instability of Microtubule Growth. *Nature.* **312**: 237-242.
- Morgan, David O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* edição, Primers in Biology.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell.* **116**: 221-234.
- Musacchio, A. e Salmon, E. D. (2007). The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 379-393.
- Nicklas, R. B., Ward, S. C. e Gorbsky, G. J. (1995). Kinetochores Chemistry Is Sensitive to Tension and May Link Mitotic Forces to a Cell Cycle Checkpoint. *J Cell Biol.* **130**: 929-939.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic Kinases as Regulators of Cell Division and Its Checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 21-32.
- Nurse, P. (2000). A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond. *Cell.* **100**: 71-78.
- O'connell, C. B. e Wang, Y. L. (2000). Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dynein-Dependent Fashion. *Mol Biol Cell.* **11**: 1765-1774.
- Odde, D. J. (2005). Chromosome Capture: Take Me to Your Kinetochores. *Curr Biol.* **15**: R328-330.
- Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E. e Mcintosh, J. R. (1990). Cytoplasmic Dynein Is Localized to Kinetochores During Mitosis. *Nature.* **345**: 263-265.
- Pinsky, B. A. e Biggins, S. (2005). The Spindle Checkpoint: Tension Versus Attachment. *Trends Cell Biol.* **15**: 486-493.
- Privette, L. M. e Petty, E. M. (2008). Chfr: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. *Transl Oncol.* **1**: 57-64.
- Przewioka, M. R. e Glover, D. M. (2009). The Kinetochores and the Centromere: A Working Long Distance Relationship. *Annu Rev Genet.* **43**: 439-465.
- Rieder, C. L. (1981). The Structure of the Cold-Stable Kinetochores Fiber in Metaphase Ptk1 Cells. *Chromosoma.* **84**: 145-158.
- Rieder, C. L. e Alexander, S. P. (1990). Kinetochores Are Transported Poleward Along a Single Astral Microtubule During Chromosome Attachment to the Spindle in Newt Lung Cells. *J Cell Biol.* **110**: 81-95.

Parte V – Referências Bibliográficas

- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. e Sluder, G. (1995). The Checkpoint Delaying Anaphase in Response to Chromosome Monoorientation Is Mediated by an Inhibitory Signal Produced by Unattached Kinetochores. *J Cell Biol.* **130**: 941-948.
- Rieder, C. L. e Salmon, E. D. (1998). The Vertebrate Cell Kinetochores and Its Roles During Mitosis. *Trends Cell Biol.* **8**: 310-318.
- Ruchaud, S., Carmena, M. e Earnshaw, W. C. (2007a). The Chromosomal Passenger Complex: One for All and All for One. *Cell.* **131**: 230-231.
- Ruchaud, S., Carmena, M. e Earnshaw, W. C. (2007b). Chromosomal Passengers: Conducting Cell Division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 798-812.
- Salina, D., Enarson, P., Rattner, J. B. e Burke, B. (2003). Nup358 Integrates Nuclear Envelope Breakdown with Kinetochores Assembly. *J Cell Biol.* **162**: 991-1001.
- Salmon, E. D., Goode, D., Mangel, T. K. e Bonar, D. B. (1976). Pressure-Induced Depolymerization of Spindle Microtubules. Iii. Differential Stability in Hela Cells. *J Cell Biol.* **69**: 443-454.
- Sanchez-Perez, I., Renwick, S. J., Crawley, K., Karig, I., Buck, V., Meadows, J. C., Franco-Sanchez, A., Fleig, U., Toda, T. e Millar, J. B. (2005). The Dash Complex and Klp5/Klp6 Kinesin Coordinate Bipolar Chromosome Attachment in Fission Yeast. *EMBO J.* **24**: 2931-2943.
- Santaguida, S. e Musacchio, A. (2009). The Life and Miracles of Kinetochores. *EMBO J.* **28**: 2511-2531.
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* **35**: 461-478.
- Schatten, H. (2008). The Mammalian Centrosome and Its Functional Significance. *Histochem Cell Biol.* **129**: 667-686.
- Schmidt, D. J., Rose, D. J., Saxton, W. M. e Strome, S. (2005). Functional Analysis of Cytoplasmic Dynein Heavy Chain in *Caenorhabditis Elegans* with Fast-Acting Temperature-Sensitive Mutations. *Mol Biol Cell.* **16**: 1200-1212.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C. e Scholey, J. M. (2000). Cytoplasmic Dynein Is Required for Poleward Chromosome Movement During Mitosis in *Drosophila* Embryos. *Nat Cell Biol.* **2**: 922-930.
- Sivaram, M. V., Wadzinski, T. L., Redick, S. D., Manna, T. e Doxsey, S. J. (2009). Dynein Light Intermediate Chain 1 Is Required for Progress through the Spindle Assembly Checkpoint. *EMBO J.* **28**: 902-914.
- Skinner, J. J., Wood, S., Shorter, J., Englander, S. W. e Black, B. E. (2008). The Mad2 Partial Unfolding Model: Regulating Mitosis through Mad2 Conformational Switching. *J Cell Biol.* **183**: 761-768.
- Skoufias, D. A., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Wilson, L. e Margolis, R. L. (2001). Mammalian Mad2 and Bub1/Bub3 Recognize Distinct Spindle-Attachment and Kinetochores-Tension Checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 4492-4497.
- Starr, D. A., Williams, B. C., Hays, T. S. e Goldberg, M. L. (1998). Zw10 Helps Recruit Dynactin and Dynein to the Kinetochores. *J Cell Biol.* **142**: 763-774.
- Stearns, T. (2001). Centrosome Duplication. A Centriolar Pas De Deux. *Cell.* **105**: 417-420.
- Stehman, S. A., Chen, Y., Mckenney, R. J. e Vallee, R. B. (2007). Nudc and Nudel Are Required for Mitotic Progression and Are Involved in Dynein Recruitment to Kinetochores. *J Cell Biol.* **178**: 583-594.
- Stern, B. M. e Murray, A. W. (2001). Lack of Tension at Kinetochores Activates the Spindle Checkpoint in Budding Yeast. *Curr Biol.* **11**: 1462-1467.
- Steuer, E. R., Wordeman, L., Schroer, T. A. e Sheetz, M. P. (1990). Localization of Cytoplasmic Dynein to Mitotic Spindles and Kinetochores. *Nature.* **345**: 266-268.
- Sudakin, V., Chan, G. K. e Yen, T. J. (2001). Checkpoint Inhibition of the Apc/C in Hela Cells Is Mediated by a Complex of Bub1, Bub3, Cdc20, and Mad2. *J Cell Biol.* **154**: 925-936.
- Sullivan, M. e Morgan, D. O. (2007). Finishing Mitosis, One Step at a Time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 894-903.

Parte V – Referências Bibliográficas

- Sundin, L. J., Guimaraes, G. J. e Deluca, J. G. (2011). The Ndc80 Complex Proteins Nuf2 and Hec1 Make Distinct Contributions to Kinetochores-Microtubule Attachment in Mitosis. *Mol Biol Cell*. **22**: 759-768.
- Tanaka, T. U. (2005). Chromosome Bi-Orientation on the Mitotic Spindle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **360**: 581-589.
- Tanaka, T. U. (2008). Bi-Orienting Chromosomes: Acrobatics on the Mitotic Spindle. *Chromosoma*. **117**: 521-533.
- Tanaka, T. U. (2010). Kinetochores-Microtubule Interactions: Steps Towards Bi-Orientation. *EMBO J*. **29**: 4070-4082.
- Tanaka, T. U. e Desai, A. (2008). Kinetochores-Microtubule Interactions: The Means to the End. *Curr Opin Cell Biol*. **20**: 53-63.
- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J. e Nasmyth, K. (2002). Evidence That the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-Incnp) Complex Promotes Chromosome Bi-Orientation by Altering Kinetochores-Spindle Pole Connections. *Cell*. **108**: 317-329.
- Tanenbaum, M. E., Macurek, L., Galjart, N. e Medema, R. H. (2008). Dynein, Lis1 and Clip-170 Counteract Eg5-Dependent Centrosome Separation During Bipolar Spindle Assembly. *EMBO J*. **27**: 3235-3245.
- Thompson, S. L., Bakhoum, S. F. e Compton, D. A. (2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. *Curr Biol*. **20**: R285-295.
- Tirnauer, J. S., Canman, J. C., Salmon, E. D. e Mitchison, T. J. (2002). Ebp1 Targets to Kinetochores with Attached, Polymerizing Microtubules. *Mol Biol Cell*. **13**: 4308-4316.
- Tooley, J. G., Miller, S. A. e Stukenberg, P. T. (2011). The Ndc80 Complex Uses a Tripartite Attachment Point to Couple Microtubule Depolymerization to Chromosome Movement. *Mol Biol Cell*. **22**: 1217-1226.
- Tynan, S. H., Gee, M. A. e Vallee, R. B. (2000). Distinct but Overlapping Sites within the Cytoplasmic Dynein Heavy Chain for Dimerization and for Intermediate Chain and Light Intermediate Chain Binding. *J Biol Chem*. **275**: 32769-32774.
- Vaisberg, E. A., Koonce, M. P. e McIntosh, J. R. (1993). Cytoplasmic Dynein Plays a Role in Mammalian Mitotic Spindle Formation. *J Cell Biol*. **123**: 849-858.
- Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. e Barnhart, L. E. (2004). Dynein: An Ancient Motor Protein Involved in Multiple Modes of Transport. *J Neurobiol*. **58**: 189-200.
- Van Den Heuvel, S. (2005). Cell-Cycle Regulation. *WormBook*. 1-16.
- Vanoosthuysen, V. e Hardwick, K. G. (2009a). A Novel Protein Phosphatase 1-Dependent Spindle Checkpoint Silencing Mechanism. *Curr Biol*. **19**: 1176-1181.
- Vanoosthuysen, V. e Hardwick, K. G. (2009b). Overcoming Inhibition in the Spindle Checkpoint. *Genes Dev*. **23**: 2799-2805.
- Varma, D., Monzo, P., Stehman, S. A. e Vallee, R. B. (2008). Direct Role of Dynein Motor in Stable Kinetochores-Microtubule Attachment, Orientation, and Alignment. *J Cell Biol*. **182**: 1045-1054.
- Vaughan, K. T., Mikami, A., Paschal, B. M., Holzbaumer, E. L., Hughes, S. M., Echeverri, C. J., Moore, K. J., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. e Vallee, R. B. (1996). Multiple Mouse Chromosomal Loci for Dynein-Based Motility. *Genomics*. **36**: 29-38.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. e Berneman, Z. N. (2003). The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif*. **36**: 131-149.
- Vorozhko, V. V., Emanuele, M. J., Kallio, M. J., Stukenberg, P. T. e Gorbsky, G. J. (2008). Multiple Mechanisms of Chromosome Movement in Vertebrate Cells Mediated through the Ndc80 Complex and Dynein/Dynactin. *Chromosoma*. **117**: 169-179.
- Wassmann, K., Liberal, V. e Benezra, R. (2003). Mad2 Phosphorylation Regulates Its Association with Mad1 and the Apc/C. *EMBO J*. **22**: 797-806.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W. e Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to Kinetochores Depends on Microtubule Attachment, Not Tension. *J Cell Biol*. **141**: 1181-1191.

Parte V – Referências Bibliográficas

- Weaver, B. A. e Cleveland, D. W. (2005). Decoding the Links between Mitosis, Cancer, and Chemotherapy: The Mitotic Checkpoint, Adaptation, and Cell Death. *Cancer Cell*. **8**: 7-12.
- Whyte, J., Bader, J. R., Tauhata, S. B., Raycroft, M., Hornick, J., Pfister, K. K., Lane, W. S., Chan, G. K., Hinchcliffe, E. H., Vaughan, P. S. e Vaughan, K. T. (2008). Phosphorylation Regulates Targeting of Cytoplasmic Dynein to Kinetochores During Mitosis. *J Cell Biol*. **183**: 819-834.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaerou, F., Karess, R. e Hays, T. (2001). Kinetochores Dynein: Its Dynamics and Role in the Transport of the Rough Deal Checkpoint Protein. *Nat Cell Biol*. **3**: 1001-1007.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T. e Yu, H. (2004). Conformation-Specific Binding of P31(Comet) Antagonizes the Function of Mad2 in the Spindle Checkpoint. *EMBO J*. **23**: 3133-3143.
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H. e Luo, X. (2007a). P31comet Blocks Mad2 Activation through Structural Mimicry. *Cell*. **131**: 744-755.
- Yang, Z., Tulu, U. S., Wadsworth, P. e Rieder, C. L. (2007b). Kinetochores Dynein Is Required for Chromosome Motion and Congression Independent of the Spindle Checkpoint. *Curr Biol*. **17**: 973-980.
- Yen, T. J., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I. e Cleveland, D. W. (1992). Cenp-E Is a Putative Kinetochores Motor That Accumulates Just before Mitosis. *Nature*. **359**: 536-539.
- Yu, H. (2006). Structural Activation of Mad2 in the Mitotic Spindle Checkpoint: The Two-State Mad2 Model Versus the Mad2 Template Model. *J Cell Biol*. **173**: 153-157.
- Zhang, J., Ahmad, S. e Mao, Y. (2007). Bubr1 and Apc/Eb1 Cooperate to Maintain Metaphase Chromosome Alignment. *J Cell Biol*. **178**: 773-784.
- Zhou, J., Yao, J. e Joshi, H. C. (2002). Attachment and Tension in the Spindle Assembly Checkpoint. *J Cell Sci*. **115**: 3547-3555.
- Zich, J. e Hardwick, K. G. (2010). Getting Down to the Phosphorylated 'Nuts and Bolts' of Spindle Checkpoint Signalling. *Trends Biochem Sci*. **35**: 18-27.