

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Ciências**  
**ULisboa**

**Funções celulares da proteína centrossomal humana  
TBCCD1: proteínas interatuantes e papel na dinâmica dos  
microtúbulos**

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialidade em Bioquímica

Carolina Santos Fernandes Lasbarrères Camelo

Dissertação orientada por:  
Maria Helena Antunes Soares e Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho

2015

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, ao Departamento de Química e Bioquímica e ao Centro de Química e Bioquímica por me terem acolhido enquanto aluna da licenciatura e do mestrado em Bioquímica.

Quero agradecer à minha orientadora Helena Soares por, antes de mais, ter aceite ser minha orientadora durante este último ano. Obrigada por todo o apoio, pelas brincadeiras e pelas piadas que me ajudaram a não deprimir (ainda mais...) com os PCR's e com os fungos (!) e, acima de tudo, obrigada por tudo o que me transmitiu durante este ano e que me fez crescer enquanto pessoa crítica.

Quero também agradecer à minha orientadora professora Susana Marinho por me ter aceitado neste grupo quando ainda era aluna do 3º ano da licenciatura. Obrigada pelo apoio e por ter contribuído para o meu conhecimento e aprendizagem científica.

Quero também agradecer à professora Luísa Cyrne por todo o apoio que me tem dado nos últimos anos, em especial neste último. Obrigada por toda ajuda, no laboratório e fora dele.

Ao João Gonçalves, um especial obrigado por ter sido incansável durante este ano, por toda a ajuda com as células, com os protocolos e com as dúvidas que foram surgindo. I also want to thank a lot to Étienne Coyaud and Ryan Raught for all of the mass spectrometry work.

Ao professor Gonçalo Costa obrigada por todas as dicas com o trabalho de espectrometria de massa e pelo apoio.

Aos professores do grupo de Biologia Redox, Carla Real e Fernando Antunes, e aos meus colegas de grupo, Filipe Vilas-Boas, Ana Isabel e Bruno Carmona, por todo o apoio ao longo deste ano e por me ajudarem a ultrapassar os problemas que foram surgindo. Um obrigado especial ao “grupo das leveduras”, Filipe Ferreira, Ana Rita Neves, Daniel Inácio, Joana Mateus, Inês Martins e Catarina Antunes pela amizade, pelas brincadeiras e pela palhaçada sem fim.

Um grande obrigado a todos os membros do G2, Andreia, Rita, Rafa e Catarina, por todas as brincadeiras, todos os trabalhos e toda a amizade que me ajudou a concluir mais esta etapa. À Susana (“*the princess*”), ao Tiago (“*rich boy*”), ao Fadhil e à Ana Isabel (“*monhé*”), muito obrigada pela amizade e pelo apoio.

Ao Zé, obrigada por seres a pessoa mais paciente que eu conheço, porque de outra forma não me aturavas há tantos anos. Obrigada por tudo!

Por fim, obrigada à minha família, em especial aos meus pais, por me apoiarem sempre. À Cláudia, muito obrigada por todo o apoio e por achar sempre que estou a

“fazer bonequinhos” em vez de trabalhar. Aos meus irmãos, Miguel e Cristina, um grande obrigado por me “melgarem” a toda a hora!

Obrigada a todos por estarem sempre presentes para aturarem o meu mau-humor e as minhas “pancadas”!

## Resumo

A proteína humana centrossomal TBCCD1 está envolvida na ligação do centrossoma ao núcleo. A diminuição dos níveis do TBCCD1 causa a quebra do eixo de polaridade intrínseca “Núcleo-Centrossoma-Complexo de Golgi” em consequência da anormal localização do centrossoma na periferia da célula a qual é acompanhada por uma desorganização do complexo de Golgi. Recentemente, foram identificadas variantes de *splicing* alternativo desta proteína que se localizam exclusivamente no citoplasma.

Neste trabalho pretendeu-se esclarecer as funções da proteína TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2, através i) do estudo do efeito da depleção da TBCCD1 na dinâmica dos microtúbulos e no citoesqueleto de actina e ii) da identificação das suas proteínas interatuantes, recorrendo ao método de BioID.

Apesar de a TBCCD1 ter um domínio que a associa com a actina e interagir com várias proteínas que têm como funções polimerizar os filamentos de actina, em particular nas junções célula-célula e de adesão, não foi possível identificar nenhuma relação clara entre a TBCCD1 e os filamentos de actina nas células depletadas de TBCCD1.

Este trabalho permitiu concluir que a TBCCD1 tem um papel importante na estabilização dos microtúbulos em células hTERT-RPE-1, em particular de uma subpopulação de microtúbulos que rodeia o núcleo e que se localiza preferencialmente do lado do centrossoma. Esta subpopulação de microtúbulos regula parcialmente o posicionamento do centrossoma em relação ao núcleo nestas células. Observou-se ainda que a depleção da TBCCD1 causa a dispersão da proteína centrossomal CEP170, que se associa a esta subpopulação de microtúbulos, e fica dispersa no citoplasma das células depletadas de TBCCD1.

Neste trabalho foi também possível estabelecer o interatoma da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2. Assim, observou-se que a TBCCD1 interatua com proteínas com distintas funções celulares, estando principalmente envolvida na dinâmica dos microtúbulos, com a integridade do centrossoma e na polaridade celular, particularmente no estabelecimento e manutenção das junções celulares. A análise do interatoma, conjuntamente com os resultados obtidos no estudo da dinâmica dos microtúbulos, sugere que a TBCCD1 seja uma proteína adaptadora que promove a interação entre diferentes proteínas. A TBCCD1 variante 2, por outro lado, interage sobretudo com *chaperones* moleculares, proteínas mitocondriais e centroméricas. Embora à primeira vista estas interações possam parecer não estar relacionadas, uma análise mais detalhada mostra que a TBCCD1 variante 2 poderá estar envolvida na

montagem e organização de estruturas complexas como os cinetocoros e a organização do genoma mitocondrial através da interação direta com os diferentes componentes ou através da interação com *chaperones* moleculares.

**Palavras-chave:** TBCCD1, microtúbulos, centrossoma, actina, interatoma

## Abstract

The human centrosomal protein TBCCD is involved in the connection between the centrosome and the nucleus. Lower TBCCD1 levels lead to a disruption of the intrinsic cell polarity axis “Nucleus-Centrosome-Golgi Apparatus” due to an abnormal localization of the centrosome in the cell periphery, which is accompanied by the fragmentation of the Golgi apparatus. Recently, TBCCD1 splicing variants that localize exclusively in the cytoplasm have been identified.

In this work we aimed at clarifying what are the cellular functions of TBCCD1 and TBCCD1 variant 2 by i) studying the effect of TBCCD1 depletion in the microtubule network and actin cytoskeletons dynamics and ii) identifying their interacting proteins using the BioID method.

Although TBCCD1 has a domain able to associate this protein with actin and TBCCD1 interacts with several proteins that have a role in actin polymerization, particularly in cell-cell and adhesion junctions, it was not possible to identify a clear relationship between TBCCD1 and the actin filaments in TBCCD1-depleted cells.

This work allowed us to conclude that TBCCD1 has an important role in microtubule stabilization in hTERT-RPE-1 cells, in particular in a microtubule subpopulation surrounding the nucleus which is localized preferentially near the centrosome. This microtubule subpopulation partially regulates the centrosome-nucleus positioning. We also observed that TBCCD1 depletion causes cytoplasmic dispersion of the centrosomal protein CEP170, which is associated with this microtubule subpopulation.

In this work we also established the TBCCD1 and TBCCD1 variant 2 interactomes. TBCCD1 interacts with several proteins with distinct functions, mainly involved in microtubule dynamics, centrosome integrity and cell polarity, and also in the establishment and maintenance of cell junctions. Both the interactome analysis and the results obtained with the microtubule dynamic studies suggest that TBCCD1 may function as a promoter of the interaction between distinct proteins. TBCCD1 variant 2, in other hand, interacts mainly with molecular chaperones and mitochondrial and centromeric proteins. Although it may seem that these interactions are not related with which other, a more detailed analysis shows that TBCCD1 variant 2 protein can be involved in the assembly and organization of complex structures, such as the kinetochores and the organization of the mitochondrial genome either through the direct interaction with the different components or through the interaction with molecular chaperones.

**Key-words:** TBCCD1, microtubules, centrosome, actin, interactome

## Lista de abreviaturas

Arp2/3 - proteínas relacionadas com a actina 2 e 3  
ATP – adenosina trifosfacto  
ATPase – enzima que catalisa a hidrólise de ATP  
Bisacrilamida – N,N'-metileno-bisacrilamida  
BSA – albumina do soro de bovino  
CAP - cyclase-associated proteins  
CARP – *domain in CAPs*  
CCT - *cytosolic chaperonin-containing TCP1*  
CEP170 – proteína centrossomal de 170 kDa  
Cin2 – *chromosome instability 2*  
CLASPs – *cytoplasmic linker protein-associated proteins*  
CLIP – *cytoplasmic linker proteins*  
CTCF - *corrected total cell fluorescence*  
DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole  
DMEM – *dulbecco's modified Eagle's medium*  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DNase – desoxirribonuclease  
dNTPs – 5'-trifosfacto de desoxinucleótido  
ECL – quimioluminescência potenciada (de *Enhanced chemiluminescence*)  
FBS – soro fetal bovino  
GAP – *GTPase activating proteins*  
GCPs – *gamma-tubulin complex proteins*  
GDP – adenosina difosfacto  
GDP – guanosina difosfacto  
GFP – proteína verde fluorescente (de green fluorescent protein)  
GTP – guanosina trifosfacto  
GTPase - enzima que catalisa a hidrólise de GTP  
HDAC6 – *histone deacetylase family number 6*  
IFT – transporte *intraflagelar*  
INM – membrana interna nuclear  
KASH – de Klarsicht, ANC-1 e Syne-1  
LB – meio Luria Bertani ou *Lysogeny Broth*  
LINC – *linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton*



MAP – proteína associada aos microtúbulos  
MOZART - *mitotic-spindle organizing protein associated with a ring of  $\gamma$ -tubulin*  
MTOC – centro organizador de microtúbulos  
NAD –dinucleótido de nicotinamida e adenina  
NDPk – *nucleoside diphosphate kinase*  
NPF – fator promotor da nucleação  
ONM – membrana externa nuclear  
PBS – solução tampão fosfacto-salino  
PCM – matriz pericentriolar  
PCR – *polymerase chain reaction*  
PFA - paraformaldeído  
Pi – fosfato inorgânico  
RNA – ácido ribonucleico  
RP2 – *retinitis pigmentosa protein*  
SAINT – *Significance Analysis of INTeractome*  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
siRNA – pequeno RNA interferente (de *short interfering RNA*)  
Sirt1 – *sirtuin type 1*  
Sirt2 – *sirtuin type 2*  
SUN – de Sud1 e Unc-48  
TAN – *transmembrane actin-associated nuclear lines*  
TBCA – cofator da tubulina A  
TBCB – cofator da tubulina B  
TBCC – cofator da tubulina C  
TBCCD1 – *TBCC-domain containing protein 1*  
TBCD – cofator da tubulina D  
TBCE – cofator da tubulina E  
TEMED – N, N, N, N-tetrametiletilenodiamina  
TMBCPs – *tandem monomer binding proteins*  
Triton X-100 – iso-octifenoxipolietoxietanol  
TTL – *tubulin tyrosine ligase*  
TTLL – *tubulin tyrosine ligase like family*  
Tween 20 – polioxietileno(sorbitan)monolaurato  
 $\gamma$ -TuRC –  *$\gamma$ -tubulin-containing ring complex*  
 $\gamma$ -TuSC –  *$\gamma$ -tubulin small complex*

## ÍNDICE

Resumo .....	i
Abstract .....	iii
Lista de abreviaturas.....	v
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. O citoesqueleto .....	1
1.1. Os filamentos de actina.....	2
1.1.1. Arquiteturas das fibras de actina .....	4
1.1.1.1. Redes ramificadas de actina .....	6
1.1.1.2. Redes intercruzadas de actina.....	6
1.1.1.3. Redes de actina paralelas.....	7
1.1.1.4. Fibras de actina antiparalelas .....	7
1.1.1.5. Fragmentação das fibras de actina .....	8
1.2. Microtúbulos .....	10
1.2.1. Regulação da dinâmica e funções dos microtúbulos .....	14
1.2.1.1. Nucleação dos microtúbulos .....	14
1.2.1.2. Isotipos de tubulina .....	16
1.2.1.3. Modificações pós-traducionais .....	16
1.2.1.4. Proteínas associadas aos microtúbulos e proteínas motoras.....	18
1.3. Interação microtúbulos – actina .....	19
2. O centróssoma das células animais .....	20
2.1. Posição do centróssoma vs núcleo.....	23
3. A proteína centróssomal TBCCD1 .....	27
3.1. Proteínas semelhantes à TBCCD1: TBCC e RP2 .....	29
II. OBJETIVOS.....	32
III. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
1. Estirpes bacterianas e condições de cultura.....	33
1.1. Preparação de células <i>E. coli</i> competentes.....	33
2. Clonagem de fragmentos de DNA em vetores de expressão .....	34
2.1. Amplificação das sequências do gene <i>tbccd1</i> e correspondentes à variante 2 .....	34
2.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	35
2.3. Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição.....	36

2.4. Ligação dos produtos de PCR ao vetor de expressão pcDNA5 <i>Flag</i> /FRT/TO-BirA*	36
2.5. Transformação de células competentes	37
2.6. Protocolo de <i>cracking</i>	37
2.7. Produção de DNA plasmídico em pequena escala	37
2.8. Sequenciação	38
2.9. Produção de DNA plasmídico em grande escala	38
3. Células e condições de cultura celulares	39
3.1. Linha celular HEK293 Flp-In/T-REx (Sistema Flp-In T-REx)	39
3.2. Estabelecimento das linhas celulares HEK 293 Flp-In/T-REx <i>Flag</i> -BirA*-TBCCD1, 293 Flp-In/T-REx <i>Flag</i> -BirA*-TBCCD1 variante 2, HEK 293 Flp-In/T-REx <i>Flag</i> -BirA*	40
3.3. Linha celular hTERT-RPE-1	41
4. Transfeção de células de mamífero	42
4.1. Transfeção das células HEK293T Flp-In/T-Rex	42
4.2. Transfeção das células RPE	42
4.3. Transfeção de células RPE com pequenos RNAs interferentes	43
5. Método Bio-ID	44
5.1. Extração proteica (Método BioID)	45
5.2. Determinação da concentração proteica	45
5.3. Imunoprecipitação com streptavidina	45
5.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE)	46
5.5. Coloração com “Coomassie Brilliant Blue”	47
5.6. Coloração com nitrato de prata	48
5.7. Eletrotransferência de proteínas para a membrana de celulose	48
5.8. <i>Western-Blot</i>	49
6. Análise dos resultados de espectrometria de massa	50
7. Experiências com taxol	50
8. Experiências com Nocadazole	51
9. Experiências com citocalasina D	51
10. Microscopia de Fluorescência	51
11. Análise estatística	53
V. RESULTADOS	54
1. Estudo das proteínas TBCCD1 e TBCCD1 variante 2: proteínas interatuantes	54
2. As funções da proteína centrossomal TBCCD1	74
2.1. Relação funcional entre a proteína TBCCD1 e o citoesqueleto de actina	75

2.2. TBCCD1, uma proteína reguladora da dinâmica dos microtúbulos? .....	86
VI. DISCUSSÃO .....	107
1. Estudo das proteínas interatuantes da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2 – a abordagem utilizada .....	107
2. As funções da proteína centrossomal TBCCD1 .....	108
VII. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS .....	120
VIII. REFERÊNCIAS .....	122
IX. ANEXOS .....	129
1. Proteínas candidatas a interatuantes pelo método de BioID .....	130
1.1. Proteínas interatuantes da TBCCD1 .....	130
1.2. Proteínas interatuantes da TBCCD1 variante 2 .....	134
2. Análise da direccionalidade dos filamentos de actina .....	135

## Índice de figuras

Figura 1. Componentes do citoesqueleto: microtúbulos, filamentos intermédios e filamentos de actina.....	1
Figura 2. Cinética de polimerização do filamento de actina.....	3
Figura 3. Redes de actina numa célula em migração.....	5
Figura 4. Diferentes organizações das fibras de actina e a sua descrição .....	9
Figura 5. Estrutura dos microtúbulos .....	11
Figura 6. Representação esquemática da via de <i>folding</i> da tubulina.....	12
Figura 7. Dinâmica de polimerização, despolimerização e recuperação dos microtúbulos .....	14
Figura 8. Complexos de $\gamma$ -tubulina e modelo de molde.....	16
Figura 9. O centrossoma das células animais.....	21
Figura 10. Organização da matriz pericentriolar em centrossomas humanos .....	22
Figura 11. Posicionamentos do centrossoma e do núcleo .....	27
Figura 12. Proteínas com os domínios funcionais CARP e TBCC.....	28
Figura 13. A depleção da proteína TBCCD1 em células RPE causa a perda da associação núcleo-centrossoma.....	29
Figura 14. Sistema Flp-In/T-REx.....	41
Figura 15. Modelo para a aplicação do método de BioID.....	55
Figura 16. Esquema da clonagem das sequências TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 no vetor pCDNA5- <i>Flag</i> /FRT/TO-BirA* e das proteínas resultantes da sua expressão. ....	56
Figura 17. Estudo para a otimização da indução da proteína <i>Flag</i> -BirA*-TBCCD1 pela tetraciclina e a sua localização celular. ....	60
Figura 18. Indução da expressão das proteínas <i>Flag</i> -BirA*, <i>Flag</i> -BirA* TBCCD1 e <i>Flag</i> -BirA* TBCCD1 variante 2 pela tetraciclina. ....	61
Figura 19. Análise da indução das proteínas com tetraciclina por <i>western-blot</i> .....	63
Figura 20. Análise do padrão de proteínas biotiniladas obtido por <i>western-blot</i> .....	64
Figura 21. Análise por SDS-PAGE do padrão de proteínas biotiniladas obtidas por imunoprecipitação com streptavidina, seguida de uma coloração com nitrato de prata .....	65
Figura 22. Análise por SDS-PAGE do padrão de proteínas solúveis e insolúveis biotiniladas por imunoprecipitação com streptavidina, seguida de uma coloração com nitrato de prata.....	67
Figura 23. Possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1 .....	72
Figura 24. Possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1 variante 2.....	73
Figura 25. Efeito da depleção da proteína TBCCD1 no citoesqueleto de actina em células HTERT-RPE-1 centrina-GFP .....	77
Figura 26. Otimização da dose e tempo de exposição à citocalasina D.....	80
Figura 27. Análise do fenótipo de afastamento do centrossoma-núcleo em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP tratadas com citocalasina D .....	81
Figura 28. A repolimerização da actina no contexto da depleção da TBCCD1.....	83
Figura 29. A localização da proteína TBCCD1 no centrossoma não é efectada pela despolimerização do citoesqueleto de actina.....	85
Figura 30. Otimização da dose de taxol usada para estabilizar os microtúbulos, em células HTERT-RPE-1 .....	88

Figura 31. O taxol induz a reversão do fenótipo de afastamento entre o centróssoma e o núcleo causado pela depleção da TBCCD1.....	90
Figura 32. Representação dos domínios funcionais da proteína associada aos microtúbulos CEP170. ....	92
Figura 33. A depleção da proteína TBCCD1 causa a dispersão da proteína CEP170 comparativamente com as células HTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo. ....	95
Figura 34. A depleção da proteína TBCCD1 afeta o padrão de localização da proteína CEP170 observado em células HTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo. ....	97
Figura 35. A depleção da proteína TBCCD1 causa a diminuição dos níveis de CEP170 em células HTERT-RPE-1 .....	98
Figura 36. Padrão de localização da CEP170 relativamente aos microtúbulos, em células HTERT-RPE-1. ....	100
Figura 37. Análise do padrão de localização da CEP170 em células HTERT-RPE-1 centrina-GFP tratadas com nocodazole. ....	101
Figura 38. Padrão de localização da CEP170 com os microtúbulos modificados pós-traducionalmente por acetilação, em células HTERT-RPE-1 .....	103
Figura 39. Análise do afastamento do centróssoma do núcleo em células hTERT-RPE-1 causado pela depleção da proteína TBCCD1 no contexto da sobreexpressão da proteína CEP170 .....	106
Figura 40. Hipóteses explicativas para o afastamento do centróssoma em relação ao núcleo causado pela depleção do TBCCD1 em células HTERT-RPE-1.....	112

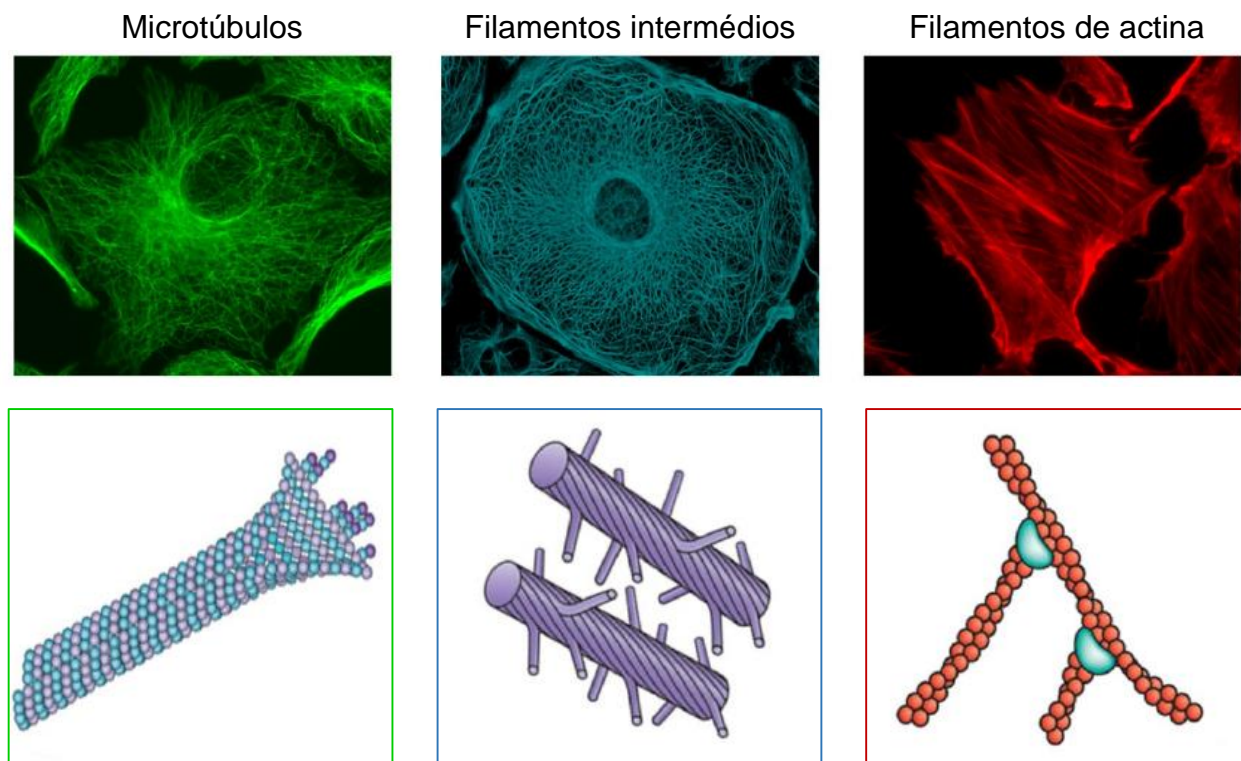
## Índice de quadros

Quadro 1. Condições utilizadas nas reações de amplificação por PCR. ....	35
Quadro 2. Sequências de <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes <i>tbccd1</i> e <i>tbccd1</i> variante 2. ....	35
Quadro 3. Sequências de pequenos RNAs interferentes .....	44
Quadro 4. Componentes do gel resolvente .....	47
Quadro 5. Componentes do gel resolvente .....	47
Quadro 6. Anticorpos e proteínas conjugadas utilizados em <i>western-blot</i> .....	49
Quadro 7. Anticorpos e corantes utilizados em microscopia de fluorescência.....	52
Quadro 8. Possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1 .....	68
Quadro 9. Possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1 variante 2 .....	70

# I. INTRODUÇÃO

## 1. O citoesqueleto

O citoesqueleto das células eucariotas consiste numa rede dinâmica de proteínas reguladoras e três tipos de filamentos: os microtúbulos, os filamentos intermédios e os filamentos de actina (Figura 1). Esta rede tem como funções regular a forma da célula, organizar espacialmente os organelos celulares e estabelecer uma ligação, quer física quer bioquímica, entre o meio intracelular e o meio extracelular. O citoesqueleto tem ainda a capacidade de integrar a atividade dos diversos organelos celulares e de constituir uma plataforma com um fluxo constante de proteínas, promovendo assim o estabelecimento de interações entre estas e outras proteínas, substratos e cofactores (Fischer and Fowler, 2015; Fletcher and Mullins, 2010).



**Figura 1. Componentes do citoesqueleto: microtúbulos, filamentos intermédios e filamentos de actina** (Adaptado de Fletcher & Mullins, 2010). Citoesqueleto de microtúbulos de células Vero (linha celular de macaco verde africano) marcado com um anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina. Filamentos intermédios (queratina) de células Ptk2 (linha celular de rim de rato canguru). (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/yfp/yfphyq/stains/yfpcy2keratinptk2cells.html>. 10 de Agosto de 2015). Filamentos de actina de células HTERT-RPE-1. Representação esquemática dos três componentes do citoesqueleto: microtúbulos, filamentos intermédios e filamentos de actina.

Os filamentos intermédios são constituídos por proteínas filamentosas e sem capacidade catalítica, entre elas as queratinas, a vimentina e as laminas, por exemplo. Os filamentos intermédios formam polímeros apolares, que se podem cruzar entre si e alguns podem ainda estabelecer interações com os microtúbulos ou os filamentos de actina (Fischer and Fowler, 2015). Na maioria das células, os filamentos intermédios formam redes no citosol, com exceção das laminas. Estas proteínas são constituintes do invólucro nuclear, contribuindo para a forma e estabilidade do núcleo das células eucariotas. Durante a divisão celular sofrem fosforilação, o que desencadeia a desorganização do invólucro nuclear no início da mitose/meiose (Fletcher and Mullins, 2010)

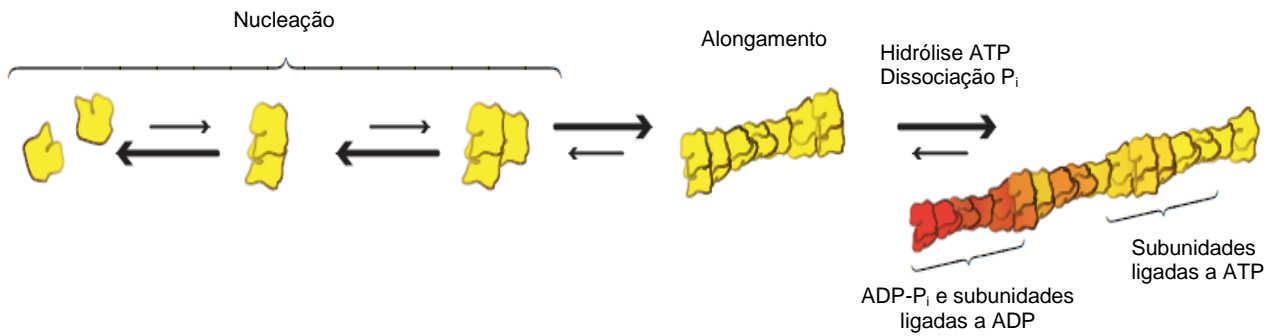
Pelo contrário, os microtúbulos e os filamentos de actina são constituídos por monómeros de proteínas globulares, o heterodímero de tubulina e a actina, respetivamente. São muito dinâmicos, com capacidade de polimerizar e despolimerizar rapidamente. Esta característica confere-lhes uma grande capacidade de adaptação e, conseqüentemente, de resposta ao stresse (Huber et al., 2015). Estes dois tipos de filamentos serão mais explorados nos capítulos seguintes.

### **1.1. Os filamentos de actina**

Os filamentos de actina são constituídos por monómeros de actina, uma proteína globular de 42 kDa. Esta proteína, quando se associa ao cofactor  $Mg^{2+}$ , sofre uma alteração conformacional, tornando-se capaz de se ligar ao ATP. Nesta forma é capaz de polimerizar filamentos polares, que se associam entre si de modo a formar duplas hélices. Estes filamentos podem adquirir diferentes organizações nas células, atuando como elementos mecânicos com capacidade de induzir alterações na forma e no movimento das células (Blanchoin et al., 2014; De La Cruz and Gardel, 2015).

A cinética da polimerização da actina é limitada pelo passo de nucleação, que é termodinamicamente desfavorável. Depois da formação de dímeros/trímeros de actina, o filamento é polimerizado rapidamente de modo dependente da concentração de monómeros de actina livres. Os monómeros de actina livres têm capacidade de ligação ao ATP. Após a polimerização dos monómeros na extremidade do filamento, ocorre hidrólise de ATP a ADP e Pi (Figura 2) (Blanchoin et al., 2014; De La Cruz and Gardel, 2015).





**Figura 2. Cinética de polimerização do filamento de actina** (Adaptado de Blanchoin *et al.*, 2014). A polimerização dos filamentos de actina a partir de uma *pool* de monómeros de actina ocorre em duas fases. O passo termodinamicamente limitante é a nucleação, ou seja, a formação de dímeros e trímeros de actina. Esta fase é seguida por uma de polimerização rápida na extremidade mais dinâmica, com consequente hidrólise de ATP e liberação de fosfato inorgânico ( $P_i$ ).

Os filamentos de actina são polares e têm extremidades com dinâmicas de polimerização diferentes: a extremidade *barbed*, mais dinâmica e com uma velocidade de polimerização cerca de 10 vezes superior à da extremidade *pointed*, que tem um alongamento mais lento. Durante a alteração da forma da célula, a actina sofre uma constante reorganização, de forma a permitir que as células se adaptem ao microambiente. Um dos mecanismos para a remodelação da actina consiste no “*treadmilling array*”. Neste modelo, em que não há variação do tamanho dos filamentos, a polimerização da actina numa extremidade é acompanhada pela remodelação da outra extremidade, de modo a que exista sempre uma *pool* de monómeros de actina livres e prontos a polimerizar (Blanchoin *et al.*, 2014; De La Cruz and Gardel, 2015).

Como referido anteriormente, a nucleação da actina é um processo cineticamente desfavorável. Por esse motivo, é necessário regular e promover a formação dos dímeros/trímeros de actina, o que é feito pelos fatores de nucleação. Existem três famílias principais: o complexo de proteínas relacionadas com a actina 2 e 3 (Arp2/3), os TMBPs (*tandem monomer binding proteins*) e as forminas. O complexo Arp2/3 é estruturalmente semelhante a monómeros de actina e promove, em conjunto com fatores promotores da nucleação (NPFs) como os WASP/N-WASP, WAVE, WASH, entre outros, a nucleação de novos filamentos de actina a partir da parede de filamentos já formados. Após a nucleação, o complexo Arp2/3 permanece associado à extremidade *pointed* e não afeta a nucleação da outra extremidade. Os TMBPs ligam-se a 3 monómeros de actina, estabilizando-os. À semelhança do complexo Arp2/3 ligam-se à extremidade *pointed*, no entanto, alguns dos TMBPs regulam a polimerização da extremidade *barbed*. Por fim, as forminas estabilizam os trímeros de actina e, ao

contrário dos outros fatores, mantêm-se associadas às extremidades *barbed*, regulando a sua dinâmica (Skau and Waterman, 2015).

Outras proteínas, nomeadamente a profilina, atuam no sentido oposto, impedindo a polimerização. Esta proteína liga-se aos monómeros de actina, inibindo a formação espontânea de dímeros/trímeros. Os monómeros complexados com profilina só podem ser novamente utilizados para a polimerização se esta for catalisada por fatores de nucleação, como por exemplo, o complexo Arp2/3 e as forminas. Assim, a presença de profilina nas extremidades *pointed* permite aumentar a taxa de polimerização nas extremidades *barbed*, inibindo o alongamento na outra extremidade, e controlando a direção do crescimento dos filamentos e o tipo de arquitetura que adquirem (Blanchoin et al., 2014).

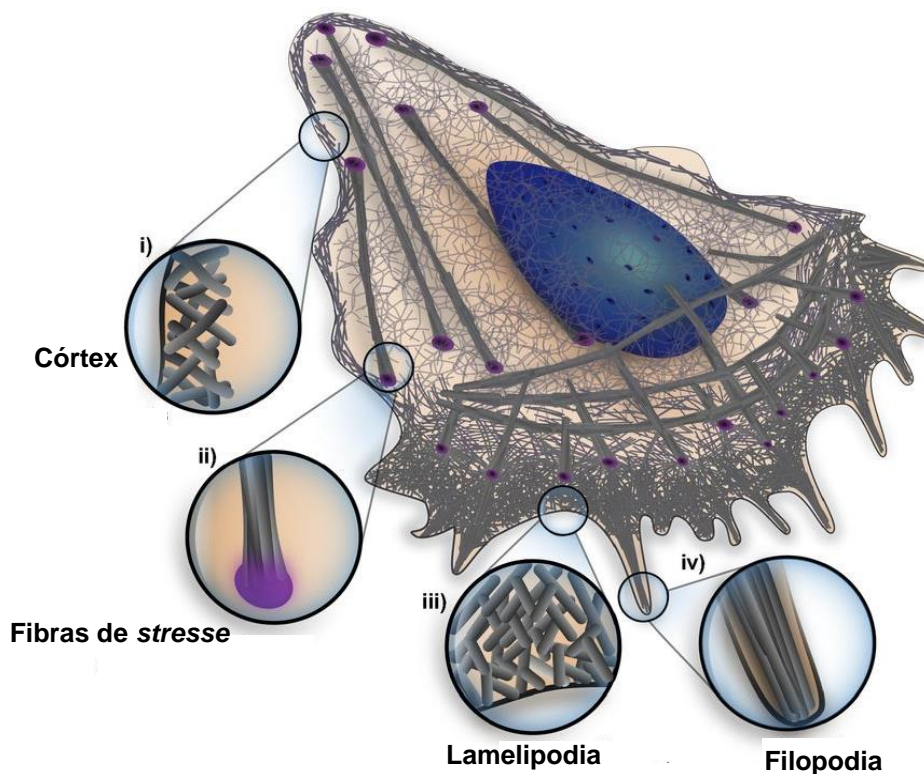
### 1.1.1. Arquiteturas das fibras de actina

Nas células as redes de actina organizam-se em estruturas complexas com arquiteturas diversas, desempenhando várias funções, nomeadamente na migração. O movimento resulta de distensões sucessivas da frente da célula que, de seguida, adere ao substrato, acompanhadas pela contração da parte posterior da célula. Durante este processo, os filamentos de actina sofrem, de forma especializada, uma constante remodelação e organizam-se em diferentes tipos de redes que sustentam as funções das várias zonas da célula. Assim, podem distinguir-se diferentes regiões celulares que diferem nas suas funções e, conseqüentemente, no tipo de arquitetura que os filamentos de actina locais adquirem: o lamelipodia, o filopodia, as fibras de stresse, os arcos transversos e o córtex da célula.

O lamelipodia localiza-se na frente do movimento (*leading edge*) e consiste numa rede dinâmica de filamentos de actina com polarização direcionada que contrai e distende, permitindo que a célula se movimente (Figura 3). Outra estrutura de actina característica das células é o filopodia, que se assemelha a “dedos” que invaginam a partir do citoplasma das células (Figura 3). Estas estruturas são constituídas pelas integrinas, proteínas que se ligam à matriz extracelular e, por isso, têm a capacidade de funcionar como sensores do microambiente. As zonas contrácteis são formadas pelas fibras de stresse, que ligam o citoesqueleto à matriz extracelular nos pontos de adesão (*focal adhesion*), e pelo córtex da célula e os arcos transversos, que são constituídos por filamentos lineares de actina que atravessam a célula. Tanto o córtex como os arcos

transversos têm como funções assegurar a integridade mecânica e a manutenção/alteração da forma da célula (Figura 3).

Para além destas redes, os filamentos de actina são também constituintes das junções aderentes, que consistem em complexos proteicos dinâmicos que estabelecem interações intercelulares. Estas complexas estruturas são formadas pelas caderinas, proteínas transmembranares que se ligam diretamente ao domínio extracelular das caderinas das células adjacentes. No interior de cada célula, o domínio intracelular das caderinas liga-se às cateninas, proteínas que se ligam aos filamentos de actina. No entanto, ainda não foi possível esclarecer qual a organização das redes de actina nestes locais da célula. Recentemente foi também observada a existência de *blebs*, que consistem em protusões da membrana plasmática na direção do movimento e cuja formação é dependente da actina, por mecanismos ainda desconhecidos. Também ainda não é conhecida qual a estrutura da rede de actina nestes pontos (Blanchoin et al., 2014; Pantaloni et al., 2001; Skau and Waterman, 2015).



**Figura 3. Redes de actina numa célula em migração** (Adaptado de Blanchoin et al., 2014). Representação esquemática de algumas das diferentes arquiteturas que as redes de actina adotam nas células: i) o córtex, ii) as fibras contrácteis de *stress*, iii) o lamelipodia e iv) o filopodia. A azul está representado o núcleo. As imagens ampliadas evidenciam os tipos de estruturas presentes em cada uma das arquiteturas.

Como referido, os filamentos de actina formam redes com arquiteturas muito diversas e que são sustentadas por vários arranjos das fibras de actina. Estes arranjos podem ser agrupados em: fibras de actina ramificadas, inter cruzadas, paralelas e antiparalelas (Figura 4). De seguida, serão abordadas brevemente as várias arquiteturas e arranjos dos filamentos de actina e quais as principais proteínas envolvidas.

#### 1.1.1.1. Redes ramificadas de actina

Este tipo de arquitetura está envolvido na alteração da forma da célula e na geração de movimento, existindo principalmente na lamelipodia (no *leading edge*), nas junções aderentes e nos locais de endocitose mediados pela clatrina (Skau and Waterman, 2015). Este tipo de filamentos é ainda necessário para o posicionamento do fuso acromático e para a mobilidade de vírus e bactérias no citoplasma da célula do hospedeiro.

A polimerização destes filamentos é iniciada pelo complexo Arp2/3, que atua em conjunto com fatores promotores da nucleação, num filamento pré-existente, como descrito anteriormente. Para a formação de fibras ramificadas é ainda necessária a presença de proteínas *capping*, que atuam em conjunto com o complexo Arp2/3, impedindo a alongamento das extremidades *barbed* (Figura 4A). Na sua ausência, há um crescimento ilimitado dos filamentos de actina, alterando o tipo de arquitetura.

O grau de ramificação da fibra é importante para as propriedades mecânicas da fibra e, conseqüentemente, para a sua função. Este parâmetro é controlado pela concentração local de monómeros de actina, pela atividade do complexo Arp2/3 e pela concentração de proteínas *capping* (Figura 4A) (Blanchoin et al., 2014).

#### 1.1.1.2. Redes inter cruzadas de actina

As fibras de actina inter cruzadas estão envolvidas na regulação da forma da célula e da integridade mecânica da célula, estando presentes no córtex da célula e no lamellipodia. Segundo Blanchoin *et al.* (2014), estas fibras englobam todos os tipos de filamentos de actina que estão interligados por proteínas que estabelecem ligações cruzadas entre vários filamentos, exceto o complexo Arp2/3. As proteínas que fazem estas ligações não afetam a polimerização da actina, ligando-se apenas a filamentos já

polimerizados. A ligação destas proteínas promove a elasticidade dos filamentos de actina.

O tipo de proteína que estabelece as ligações cruzadas condiciona a distância entre os filamentos, formando-se redes mais ou menos compactas (Figura 4B). Por exemplo, proteínas como a fimbrina ou a fascina causam um empacotamento dos filamentos, formando-se fibras com uma distância inter-filamentos muito pequena. Outras proteínas, como a filamina ou a  $\alpha$ -actinina, formam fibras com grandes distâncias entre os filamentos de actina.

#### 1.1.1.3. Redes de actina paralelas

As fibras de actina paralelas constituem os filopodia e são formadas por filamentos de actina orientados com as extremidades *barbed* na mesma direção, em geral, para a membrana plasmática (Figura 4C). Estes filamentos estão inter-ligados por proteínas como a fimbrina, a fascina e a  $\alpha$ -actinina, que os mantêm próximos uns dos outros. O complexo proteico Ena/VASP também se associa a este tipo de filamentos, contribuindo para o aumento da rigidez.

A formação deste tipo de fibras não está totalmente elucidada, sendo atualmente aceites dois mecanismos não-exclusivos: o primeiro, dependente do complexo Arp2/3 e o segundo, dependente de proteínas de alongamento que atuam nas extremidades *barbed*. No primeiro, admite-se que a polimerização se inicia pelo mesmo mecanismo que nas fibras ramificadas mas, na ausência de proteínas *capping*, a polimerização não cessa, formando-se filamentos compridos e que se organizam paralelamente através de interações eletrostáticas e da ligação de proteínas, que estabelecem ligações cruzadas entre os filamentos. No segundo mecanismo, o alongamento é feita pelas proteínas forminas, que se ligam às extremidades *barbed* e promovem a polimerização dos filamentos, como descrito em 1.1.1.

#### 1.1.1.4. Fibras de actina antiparalelas

As fibras de actina antiparalelas estão associadas à contração induzida por miosina e são, por isso, importantes no processo de citocinese e no estabelecimento de adesões célula-célula e célula-matriz, sendo constituintes das fibras de stresse (Figura 4D). Consistem em filamentos antiparalelos estabilizados pela interação com proteínas

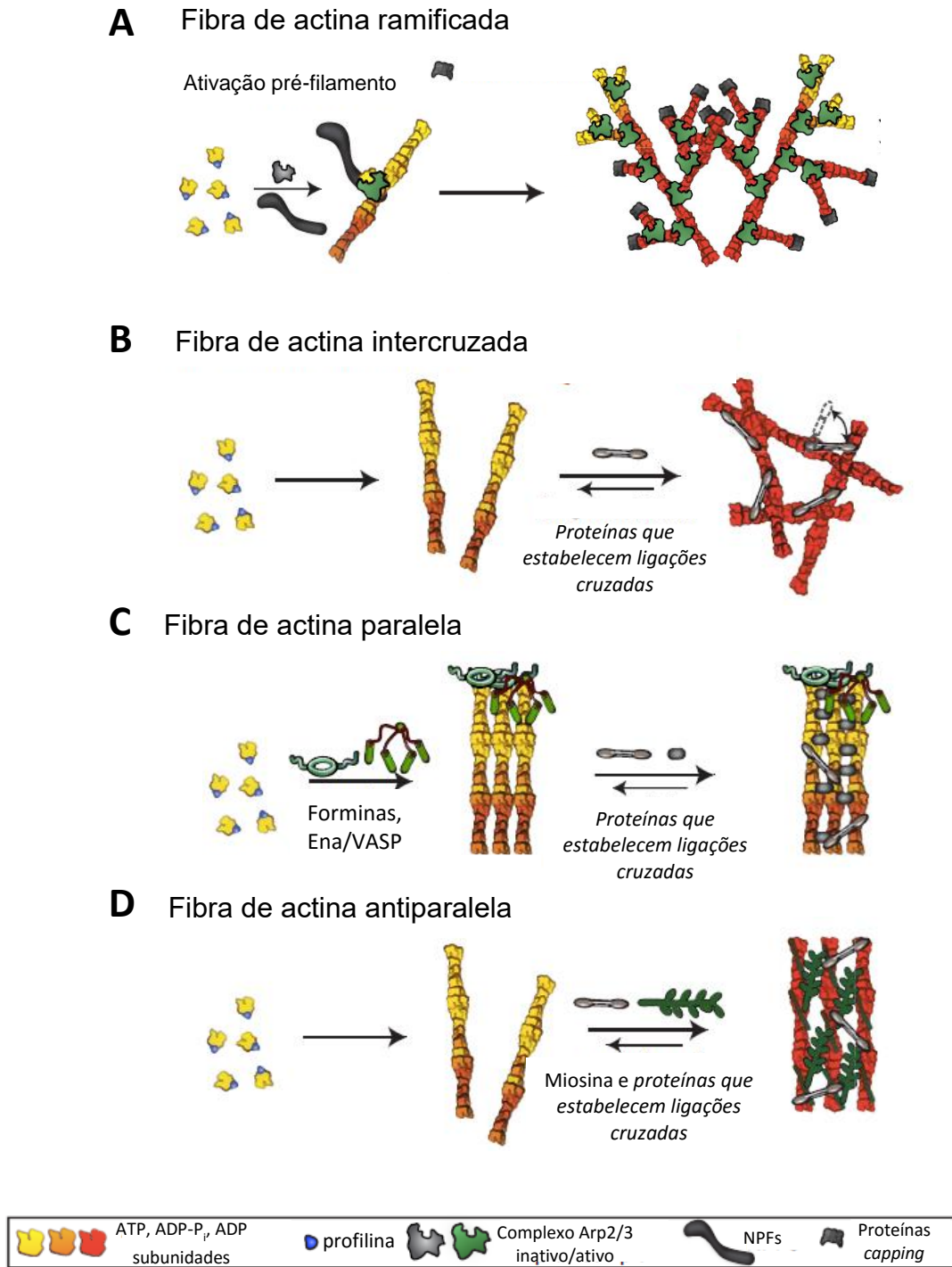
como a fimbrina e a  $\alpha$ -actinina. Na ausência destas proteínas, a contração da fibra é mais acentuada e ocorre perda de interação com a miosina. A velocidade de contração deste tipo de fibras é muito superior à das outras, sendo por isso tão importante em eventos como a citocinese.

#### 1.1.1.5. Fragmentação das fibras de actina

Para além da polimerização, a fragmentação dos filamentos de actina também perturba a sua arquitetura. Dois fatores proteicos estão envolvidos neste processo: o ADF/cofilina e a miosina.

O ADF/cofilina é um fator de despolimerização que atua fragmentando e hidrolisando os filamentos de actina. Este fator liga-se com maior afinidade a subunidades de actina ligadas a ADP e promove a hidrólise de ATP a ADP e  $P_i$ . A eficiência de fragmentação do fator ADF/cofilina depende do seu grau de saturação nos filamentos de actina. Assim, a ligação, até um determinado nível, desta proteína torna os filamentos de actina mais flexíveis. No entanto, quando a sua concentração aumenta acima de um determinado nível há um aumento do stresse local e os filamentos são clivados. Em fibras de actina ramificadas, o ADF/cofilina promove a dissociação do complexo Arp2/3 que se localiza nas zonas de ramificação, promovendo assim a quebra dos filamentos.

A miosina fragmenta os filamentos dobrando-os até ao seu limite. A ação destas proteínas é específica do tipo de fibra: estas proteínas são capazes de reorganizar as fibras de actina ramificadas, formando fibras antiparalelas, com maior capacidade de contração, no entanto, não afetam as fibras de actina com filamentos paralelos.



**Figura 4. Diferentes organizações das fibras de actina e a sua descrição** (Adaptado de Blanchoin *et al.*, 2014). A - Fibra de actina ramificada. Os fatores de nucleação ativado, NPFs, e o complexo Arp2/3 formam uma fibra ramificada a partir de um filamento pré-existente. Na presença de proteínas *capping* as ramificações são curtas; B – Fibras de actina inter cruzada, organizadas por proteínas que estabelecem ligações cruzadas entre os filamentos, controlando a elasticidade das fibras; C – Fibras de actina paralela, ligadas por proteínas que empacotam os filamentos, como as forminas e o complexo Ena/VASP; D – Fibras de actina antiparalela ligada por miosina, funcionando como uma unidade contráctil.

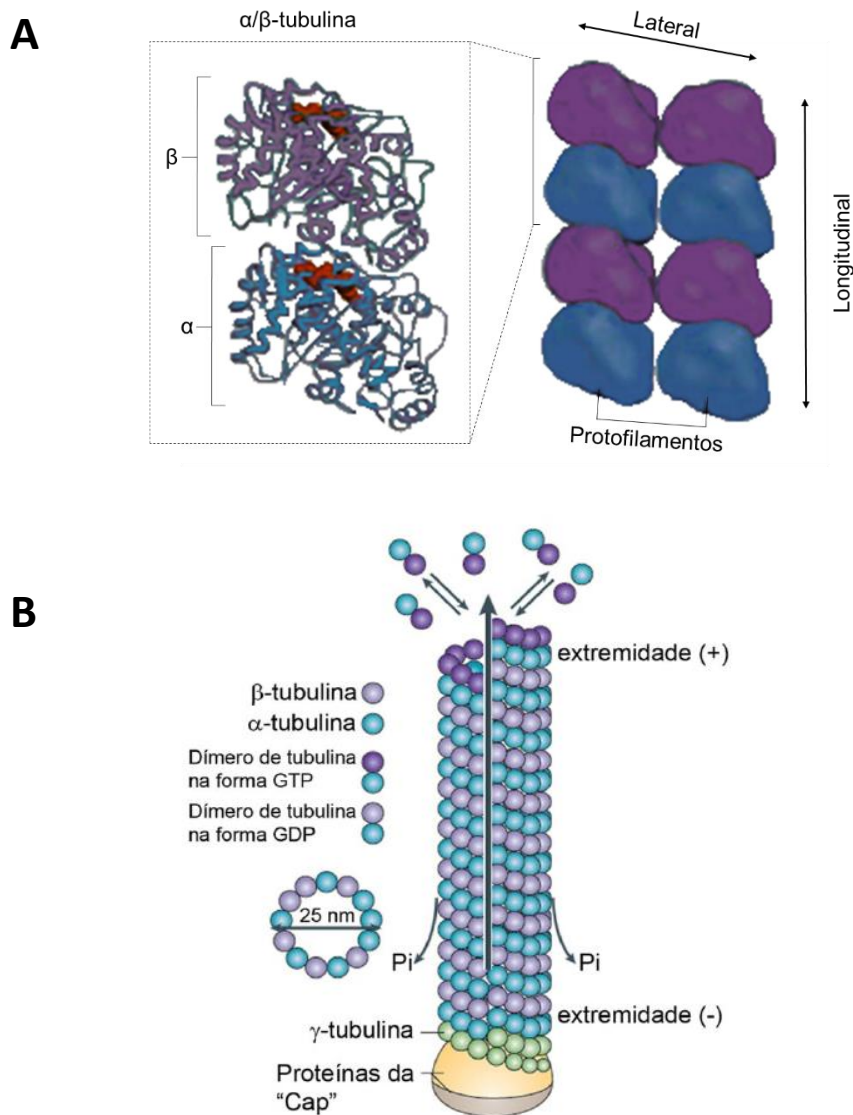
## 1.2. Microtúbulos

Os microtúbulos são os filamentos mais robustos do citoesqueleto. Devido às suas características, funcionam como “carris” no transporte intracelular, permitindo a difusão de organelos, proteínas e outros componentes celulares. Durante a divisão celular, os microtúbulos formam o fuso mitótico que, em geral, permite uma segregação perfeita dos cromossomas pelas duas células-filha. São ainda constituintes dos cílios e *flagelos* e estão envolvidos na manutenção da forma e no estabelecimento da polaridade da célula (Fletcher and Mullins, 2010; Kollman et al., 2011).

Os microtúbulos são constituídos por heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, que interagem entre si através de interações não covalentes, dispondo-se topo a topo, de modo a formar polímeros lineares, designados por protofilamentos. Na maioria das células de mamífero, 13 protofilamentos associam-se estabelecendo interações laterais e longitudinais, formando uma estrutura que, ao fechar sobre si própria, forma um filamento oco, com cerca de 25 nm de diâmetro, designado por microtúbulo (Figura 5.A). Os dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina dispõem-se sempre na mesma orientação nos protofilamentos e, por sua vez, estes dispõem-se paralelamente uns aos outros, o que faz com que os microtúbulos sejam estruturas polares. Assim sendo, os microtúbulos apresentam duas extremidades: a que expõe o monómero de  $\beta$ -tubulina, que polimeriza mais rapidamente (também designada por extremidade (+)), e a extremidade de  $\alpha$ -tubulina, que cresce mais lentamente (extremidade (-)) (Figura 5.B) (Kollman et al., 2011).

Os monómeros de  $\alpha$ - e de  $\beta$ -tubulina são ambos constituídos por três domínios funcionais: o domínio N-terminal, responsável pela ligação ao GTP; um domínio intermédio, onde se ligam agentes antimitóticos, e o domínio C-terminal, formado por locais de interação com outras proteínas. Quando o heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina é formado, a região N-terminal da  $\alpha$ -tubulina fica inacessível por ficar “escondida” na interface com a  $\beta$ -tubulina (Figura 5A). Por esse motivo, apesar de as duas subunidades se ligarem ao GTP (apenas nesta situação têm capacidade de polimerizar), apenas a subunidade  $\beta$ -tubulina têm atividade de GTPase, ou seja, tem capacidade de catalisar a hidrólise deste nucleótido a GDP e a um grupo fosfato enquanto a  $\alpha$ -tubulina permanece ligada ao GTP.

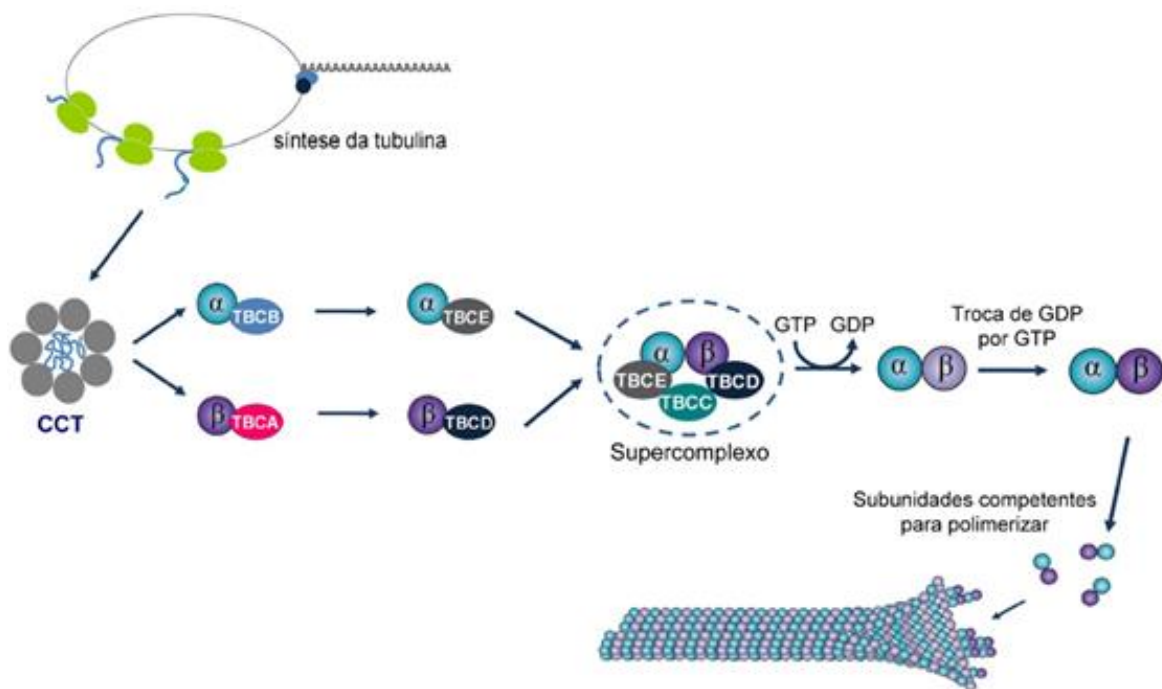




**Figura 5. Estrutura dos microtúbulos** (Adaptado de Kollman et al., 2011 e Gonçalves, 2010). A – representação esquemática da estrutura do heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, evidenciando as associações laterais e longitudinais; B – representação esquemática do microtúbulo, com evidência na sua polaridade intrínseca que resulta da associação dos heterodímeros de tubulina para formar um protofilamento.

Para serem capazes de se ligar ao GTP e poderem formar filamentos, os heterodímeros de tubulina têm de adquirir a sua conformação nativa através da sua via de aquisição da estrutura tridimensional nativa - *folding*, que depende de vários *chaperones* e cofatores da tubulina (TBCE-E). Resumidamente, a tubulina recém-sintetizada interage com o complexo CCT (*cytosolic chaperonin-containing TCP1*), que

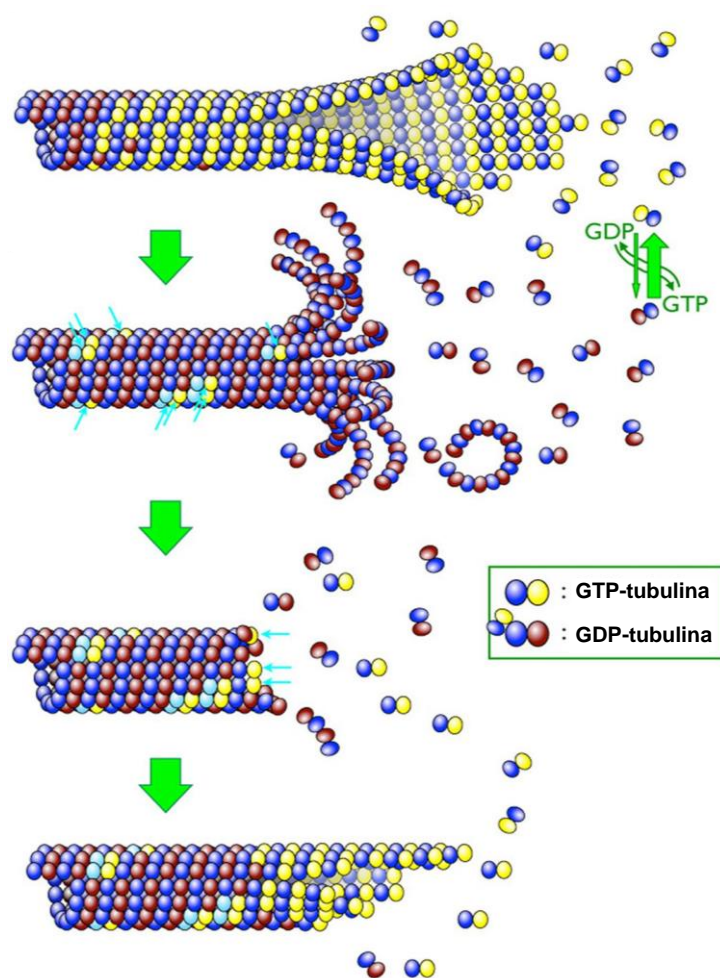
assiste ao seu *folding* através de um processo dependente da hidrólise de ATP. A tubulina liberta-se do complexo CCT num estado de *folding* intermédio e segue duas vias distintas: a  $\alpha$ -tubulina interage com o fator TBCB e a  $\beta$ -tubulina com o fator TBCE. De seguida, a  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina ligam-se aos fatores TBCE e TBCD, respetivamente. Os dois complexos proteicos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina interagem entre si, formando um supercomplexo, ao qual se liga o fator TBCC, o que promove a hidrólise de GTP pela  $\beta$ -tubulina e a consequente libertação do heterodímero de tubulina na sua forma nativa ligada ao GDP. Após a troca do GDP por GTP, os heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina ficam na sua forma competente para polimerizarem microtúbulos. Estes fatores estão também envolvidos no processo de controlo de qualidade e de reciclagem dos heterodímeros de tubulina (Goncalves et al., 2010b; Lopez-Fanarraga et al., 2001; Szolajska and Chroboczek, 2011).



**Figura 6. Representação esquemática da via de *folding* da tubulina** (Adaptado de Lopez-Fanarraga, 2001). Após ser sintetizada a tubulina interage com o complexo CCT que assiste ao seu *folding* e a liberta numa conformação próxima da nativa. A  $\alpha$ -tubulina interage com o cofator TBCB e a  $\beta$ -tubulina com o TBCE e, de seguida, com os cofatores TBCE e TBCD, respetivamente. Forma-se então um supercomplexo de  $\alpha$ -tubulina/TBCE/ $\beta$ -tubulina/TBCD ao qual se liga o cofator TBCC, que promove a hidrólise de GTP a GDP e a libertação do heterodímero na sua conformação nativa ligada a GDP. Após a troca de GDP por GTP o heterodímero está pronto a polimerizar.

Observou-se que os microtúbulos alteram, de forma estocástica e independente da concentração de tubulina livre, entre fases de polimerização (crescimento) e despolimerização (encurtamento). Este comportamento é designado por instabilidade dinâmica. A transição da fase de polimerização para despolimerização designa-se por catástrofe e a transição oposta por recuperação (Brouhard, 2015).

A instabilidade dinâmica deve-se à capacidade de ligação e hidrólise do GTP pelas subunidades de  $\beta$ -tubulina. A reação de hidrólise de GTP a GDP e Pi ocorre pouco após a polimerização, o que significa que quando a polimerização ocorre a uma velocidade elevada se forma uma *cap* de GTP-tubulina na extremidade (+) dos microtúbulos. A hidrólise de GTP a GDP afeta a estrutura do polímero: enquanto os polímeros ligados a GTP são lineares, os polímeros associados a moléculas de GDP curvam ligeiramente. As interações laterais entre as moléculas de GTP-tubulina permitem que o filamento se mantenha linear, contrariando a sua tendência de curvar. Quando ocorre a reação de hidrólise e os microtúbulos perdem a sua *cap* de GTP-tubulina, a GDP-tubulina relaxa para a sua conformação curvada, o que causa a perda de interações laterais entre os protofilamentos. Assim, os microtúbulos perdem a sua estrutura linear, despolimerizando rapidamente (Figura 7) (Horio and Murata, 2014).



**Figura 7. Dinâmica de polimerização, despolimerização e recuperação dos microtúbulos** (Adaptado de Horio and Murata, 2014). Enquanto são incorporados dímeros de tubulina associados a GTP, o filamento cresce. As moléculas de GTP são rapidamente hidrolisadas e a maioria das subunidades de tubulina fica associada a GDP, ocorrendo despolimerização. Algumas subunidades permanecem na forma tubulina-GDP (assinalado com setas a azul). Após a despolimerização os microtúbulos entram em fase de recuperação.

Os microtúbulos apresentam outro comportamento dinâmico, designado por *treadmilling* e que consiste no fluxo de subunidades da extremidade (+) para a extremidade (-), com manutenção do tamanho do filamento. Este comportamento deve-se a diferentes concentrações críticas de subunidades nas duas extremidades do microtúbulo e ao facto de a extremidade (-) poder estar livre na célula (Margolis and Wilson, 1998; Nogales, 2001).

### 1.2.1. Regulação da dinâmica e funções dos microtúbulos

A dinâmica dos microtúbulos permite-lhes responder eficazmente a alterações, pois permite a reorganização rápida da rede de microtúbulos, o que é crucial para as funções biológicas. A regulação destes processos depende da nucleação dos microtúbulos mas também de outros fatores, tais como: a existência de diferentes isotipos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, as modificações pós-traducionais da tubulina, a presença de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs, de *microtubule-associated proteins*) e de proteínas motoras, que controlam o crescimento, a despolimerização, a taxa de catástrofes, entre outros (Janke, 2014; Kollman et al., 2011; Nogales, 2001; Zhu and Kaverina, 2013).

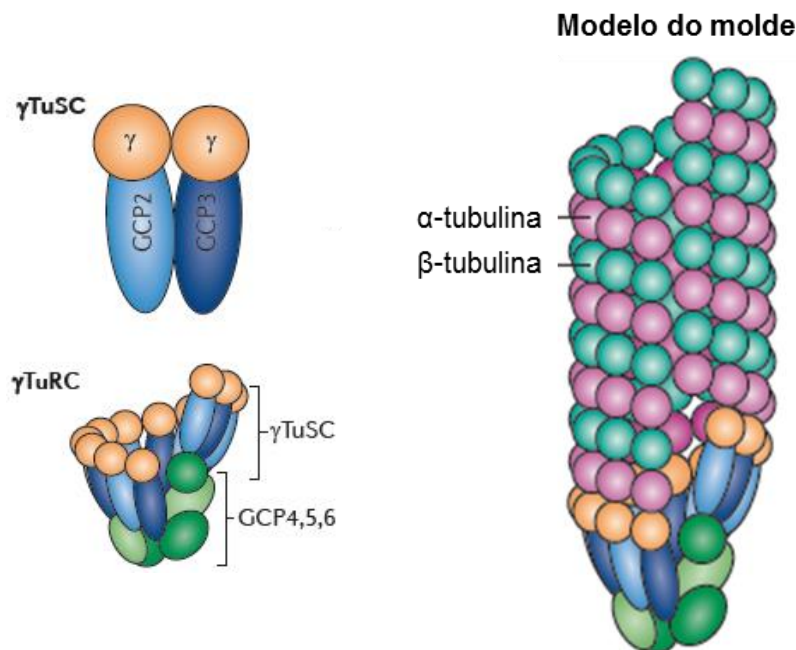
#### 1.2.1.1. Nucleação dos microtúbulos

De modo semelhante à actina, a nucleação espontânea de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina livres é cineticamente desfavorável, devido ao primeiro passo de formação do oligómero. Assim, a nucleação ocorre a partir de um local de nucleação específico, os centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). O principal MTOC das células animais é o centróssoma e nos fungos é o corpo polar do fuso, no entanto,

existem outras estruturas, como o complexo de Golgi, os cinetocoros, o corpo mediano e os próprios microtúbulos que apresentam capacidade de nucleação dos microtúbulos (Kollman et al., 2011; Zhu and Kaverina, 2013).

Para ocorrer nucleação dos microtúbulos é essencial a presença de  $\gamma$ -tubulina, um homólogo da  $\alpha$ - e da  $\beta$ -tubulina, que se liga às extremidades (-) dos microtúbulos. Esta proteína forma um complexo com as proteínas da família GCPs (*gamma-tubulin complex proteins*), formando uma estrutura em forma de anel, designada por  $\gamma$ -TuRC (*gamma-tubulin-containing ring complex*). Cada  $\gamma$ -TuRC é formado por múltiplas cópias do complexo  $\gamma$ -TuSC (*gamma-tubulin small complex*), que por sua vez é constituído por 2 cópias de  $\gamma$ -tubulina e uma de GCP2 e de GCP3 e ainda por GCP4, GCP5 e GCP6 (Figura 8). Duas proteínas sem homologia com a família GCP, e que estão relacionadas com o recrutamento dos  $\gamma$ -TuRCs para os MTOCs, foram também identificadas nestes complexos proteicos: MOZART1 e MOZART2 (*mitotic-spindle organizing protein associated with a ring of gamma-tubulin*) (Kollman et al., 2011; Luders and Stearns, 2007).

A nucleação dos microtúbulos ocorre, de acordo com evidências recentes, segundo o modelo do molde. Neste modelo, a  $\gamma$ -tubulina nos complexos  $\gamma$ -TuRCs associa-se lateralmente, dispondo-se na forma de anel, e serve como molde para a associação longitudinal dos heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina (Figura 8) (Kollman et al., 2011)



**Figura 8. Complexos de  $\gamma$ -tubulina e modelo de molde** (Adaptado de Kollman et al., 2011). A – Os complexos  $\gamma$ -TuSC consistem em 2 cópias de  $\gamma$ -tubulina associadas às proteínas GCP2 GCP3. Nos eucariotas, múltiplos  $\gamma$ -TuSC associam-se com as proteínas GCP4, GCP5 e GCP6, formando o complexo  $\gamma$ -TuRC; B – O modelo do molde sugere que o complexo  $\gamma$ -TuRC funciona como um molde em que a  $\gamma$ -tubulina estabelece interações longitudinais e laterais com os dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina.

#### 1.2.1.2. Isotipos de tubulina

Nos vertebrados, a  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina são codificadas por famílias multigênicas, que contêm entre 6 a 7 genes que codificam para os diferentes isotipos de tubulina. Estes isotipos apresentam alterações muito subtis nas suas sequências, diferindo essencialmente na região C-terminal. Os isotipos de tubulina podem copolimerizar livremente, formando microtúbulos heterogêneos, com propriedades únicas. A abundância relativa de cada isotipo no polímero confere-lhe, por exemplo, diferentes propriedades dinâmicas, tais como diferentes taxas de polimerização. Sabe-se ainda que a expressão de alguns isotipos de tubulina é específica de células e tecidos especializados e que altera ao longo do desenvolvimento (Janke, 2014).

A região C-terminal da tubulina é rica em resíduos de aminoácidos ácidos, sendo o principal alvo de modificações pós-traducionais e a parte responsável pela interação com várias proteínas. As diferenças nas propriedades dos microtúbulos podem ser, por isso, explicadas não só pelas propriedades intrínsecas de cada isotipo e da formação de heterodímeros com diferentes conformações, como também por apresentarem diferentes afinidades para proteínas estabilizadoras/desestabilizadoras dos microtúbulos. Por outro lado, diferentes isotipos de tubulina podem sofrer diferentes modificações pós-traducionais (Janke, 2014).

#### 1.2.1.3. Modificações pós-traducionais

As subunidades de tubulina são muito suscetíveis a modificações pós-traducionais, que alteram a dinâmica dos microtúbulos. Algumas das modificações descritas são: a acetilação, a tirosinação/destirosinação, a fosforilação, a poliglutamilação, a poliglicilação, a palmitoilação e a poliaminação (Janke, 2014; Yu et al., 2015). Na maioria dos casos, estas alterações pós-traducionais ocorrem nos

heterodímeros polimerizados, não sendo tão comuns quando estes se encontram nas suas formas monoméricas. Estas modificações pós-traducionais alteram a dinâmica dos microtúbulos mas também as interações com as MAPs e as proteínas motoras, uma vez que modulam os domínios de ligação. Serão abordadas, de seguida, algumas das modificações pós-traducionais da tubulina.

A acetilação da  $\alpha$ -tubulina está presente em microtúbulos estáveis. No entanto, esta modificação não causa alteração da estrutura do polímero e, até ao momento, não foi encontrada nenhuma evidência de que tenha uma função direta de estabilização dos microtúbulos (Janke, 2014). A desacetilação é catalisada pelos enzimas HDAC6 (*histone deacetylase family number 6*) e Sirt2 (*sirtuin type 2*) enquanto a acetilação é catalisada pelo enzima acetiltransferase  $\alpha$ -Tat1 (Janke, 2014; Skoge et al., 2014).

A maioria dos genes da  $\alpha$ -tubulina codificam para um resíduo de tirosina, na região C-terminal, que pode ser removido e novamente adicionado. A destirosinação é encontrada, principalmente, em microtúbulos estáveis e foi recentemente observado que esta modificação protege os microtúbulos da despolimerização por proteínas desestabilizadoras e motoras, aumentando a longevidade dos polímeros (Sirajuddin et al., 2014; Yu et al., 2015). O enzima que catalisa a tirosinação ainda não foi identificado, no entanto, o enzima responsável pela reação reversa, designado por TTL (*tubulin tyrosine ligase*) está bem caracterizado e sabe-se que não é específico, mas que atua preferencialmente numa subpopulação de microtúbulos.

A poliglutamilação ocorre quando se formam cadeias secundárias de glutamato a partir dos grupos  $\gamma$ -carboxilos dos resíduos de glutamato da cadeia principal de resíduos de aminoácidos da tubulina. Esta modificação pós-traducional está presente nos centríolos das células animais e nos axonemas dos cílios e *flagelos*, em microtúbulos de células neuronais e no fuso mitótico (Yoon et al., 2006). Os enzimas que catalisam a poliglutamilação pertencem à família das TTLL (*tubulin tyrosine ligase like family*) e também já foram identificados os deglutamilases, responsáveis por catalisar a reação reversa (Janke et al., 2005). Diferenças subtis desta modificação são observadas em diversos microtúbulos em diferentes tipos de células e, apesar da sua função ainda não estar elucidada, esta modificação pode estar envolvida na especialização e especificidade das funções dos microtúbulos (Janke, 2014).

A poliglicilação consiste na adição de resíduos de glicina às cadeias laterais de resíduos de glutamato na região C-terminal da  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina. Esta modificação pós-traducional só foi observada nos cílios e *flagelos*, podendo desempenhar uma função na estabilização dos microtúbulos do axonema. Em geral, os locais de glicilação são comuns aos da poliglutamilação e os enzimas que catalisam esta reação também pertencem à mesma família (Wloga et al., 2009; Yu et al., 2015).

#### 1.2.1.4. Proteínas associadas aos microtúbulos e proteínas motoras

Um grande número de MAPs interage com os microtúbulos, regulando a sua dinâmica, estabilidade e nucleação. Existem várias classes destas proteínas, entre elas: proteínas estabilizadoras dos microtúbulos, destabilizadoras, associadas às extremidades (+) e proteínas motoras.

As proteínas estabilizadoras dos microtúbulos, convencionalmente, têm vários locais de ligação à tubulina e, através do estabelecimento de ligações cruzadas entre várias subunidades, estabilizam as suas interações. Assim, as MAPs estabilizam os microtúbulos suprimindo a dissociação dos dímeros. Algumas MAPs, tais como a XMAP215 e proteínas homólogas, promovem a nucleação dos microtúbulos e aumentam a velocidade de adição de dímeros. Outras MAPs, como a MAP65/Ase1/PRC1, contribuem para a formação de feixes estáveis de microtúbulos, designados por *feixes*, estabelecendo ligações cruzadas entre microtúbulos antiparalelos.

Um grupo específico de MAPs, designadas por *+tips*, engloba várias proteínas que se associam especificamente às extremidades (+) dos microtúbulos, regulando a sua dinâmica, direção de crescimento e interação com componentes do córtex da célula (Mohan and John, 2015). Dentro desta classe as primeiras proteínas a serem identificadas foram as CLASPs (*cytoplasmic linker protein-associated proteins*), que promovem os eventos de recuperação. Outros exemplos de proteínas desta classe são a EB1, que estabiliza a conformação tubular dos microtúbulos, e as CLIP (*cytoplasmic linker proteins*) que se associam aos microtúbulos em crescimento e promovem a sua recuperação após eventos de catástrofe (Horio and Murata, 2014).

As proteínas desestabilizadoras, dos microtúbulos apresentam vários modos de atuação. Algumas favorecem os eventos de catástrofe, promovendo a hidrólise do GTP e a conseqüente perda da *cap*, ou a hidrólise dos microtúbulos, criando fragmentos com extremidades sem *cap*. Por exemplo, a proteína catanina, que tem atividade de ATPase, localiza-se no centrossoma e catalisa a hidrólise dos polímeros na extremidade (-). Existem ainda proteínas desestabilizadoras, como por exemplo a cinesina-13, que provocam alterações da conformação da tubulina, destabilizando a estrutura do microtúbulo (Horio and Murata, 2014; Nogales, 2001).

Existem ainda proteínas motoras, que se ligam aos microtúbulos, movendo-se ao longo dos protofilamentos usando a energia libertada durante a hidrólise do ATP. Estas proteínas têm como função ligar e transportar cargas para destinos específicos da célula, usando os microtúbulos como “carris”. São exemplos as cinesinas que, na sua maioria, se movem em direção à extremidade (+) e as dineínas, que se movem no



sentido da extremidade (-) e têm um papel importante na geração de movimento pelo cílio/*flagelo* e na sua montagem e manutenção da estrutura (Rosenbaum and Witman, 2002).

### 1.3. Interação microtúbulos – actina

As funções do citoesqueleto não resultam apenas da soma dos seus componentes individuais. Nas células, os filamentos intermédios, de actina e os microtúbulos interagem entre si, formando uma rede complexa que mantém a organização espacial da célula e, por consequência, o seu correto funcionamento. Os três componentes interagem entre si indiretamente, através de vias de sinalização e regulação génica, e diretamente, através de interações físicas por ligação direta, por proteínas que estabelecem ligações cruzadas entre vários filamentos e por efeitos não específicos (Huber et al., 2015). De seguida, exemplos de interações entre os microtúbulos e a actina serão abordados de modo sumário.

Diversos processos celulares, como a divisão, a migração, o tráfego intracelular de vesículas e organelos e o desenvolvimento neuronal, dependem das interações que se estabelecem entre os filamentos de actina e os microtúbulos. Várias proteínas que estabelecem ligações cruzadas entre vários filamentos podem estabelecer uma ligação física entre estas duas redes e diversas moléculas de sinalização e complexos proteicos estabelecem interações dinâmicas. As MAPs estão envolvidas na interação entre os dois filamentos, nomeadamente as famílias de MAP1, 2, 4 e a proteína *tau*. A proteína *tau* contribui para a co-localização de microtúbulos e filamentos de actina e o crescimento direcionado de microtúbulos a partir de filamentos de actina. As proteínas *+tips* estão também envolvidas nas interações entre as extremidades (+) dos microtúbulos e os filamentos de actina do córtex das células, assim como algumas proteínas motoras (Elie et al., 2015; Mohan and John, 2015).

A migração celular resulta de processos cíclicos de progressão da frente da célula (*leading edge*) e de contração da parte de trás da célula, que são regulados pelos microtúbulos e filamentos de actina. Durante este processo, a dinâmica dos filamentos de actina afeta a rede de microtúbulos, que assim sofrem um aumento da taxa de polarização no sentido do *leading edge*. A polimerização da extremidade (+) dos microtúbulos no *leading edge* ativa o GTPase Rac1 que promove a polimerização de filamentos de actina nesta zona. A despolimerização dos microtúbulos, por sua vez, ativa localmente o GTPase Rho-A, que causa a contração das redes de actina e a

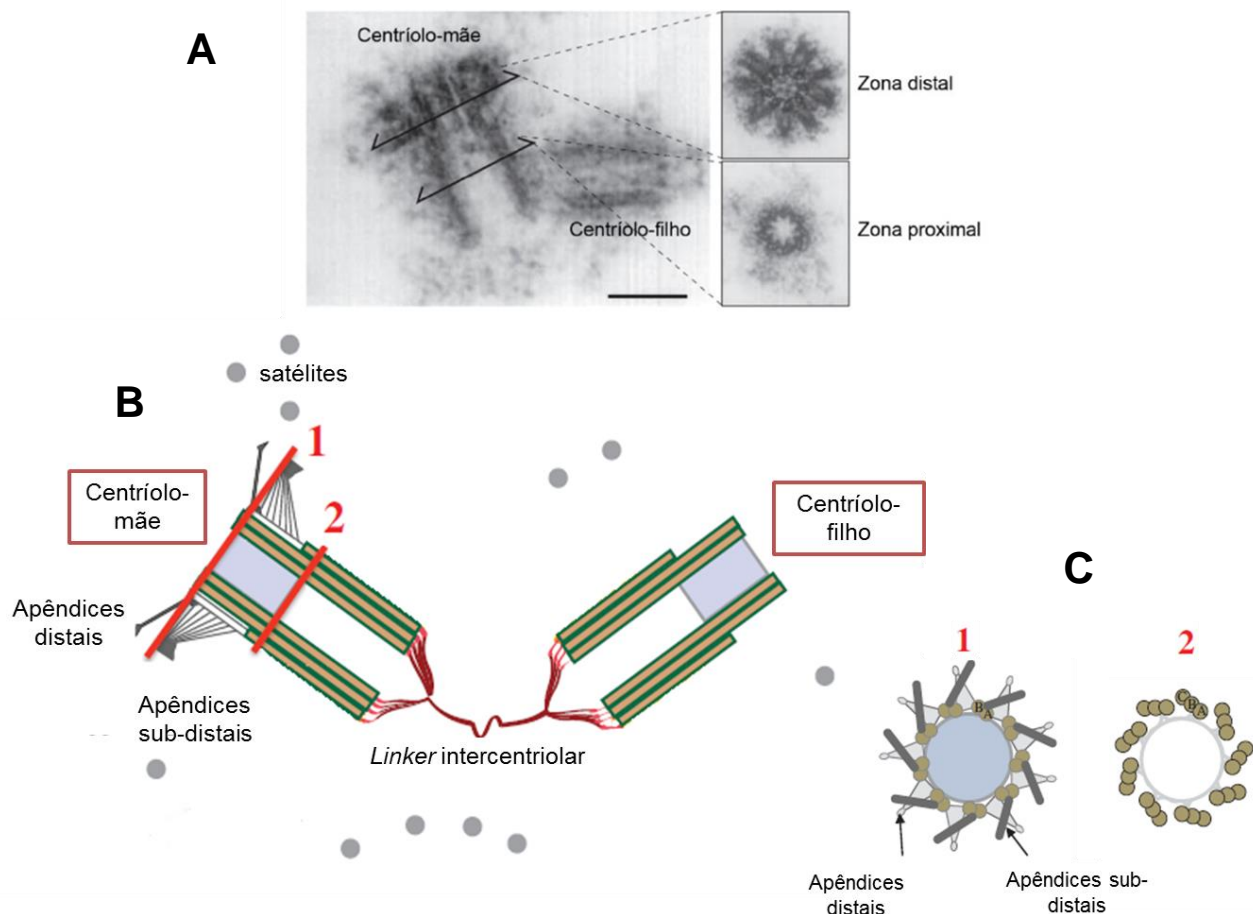
formação de feixes, causando a contração da célula na direção da migração (Waterman-Storer and Salmon, 1999).

## **2. O centrossoma das células animais**

O centrossoma é o principal centro organizador dos microtúbulos das células animais. Nas células em interfase, localiza-se perto do núcleo, onde organiza a rede de microtúbulos, participando na manutenção da forma da célula, no estabelecimento de polaridade, no movimento da célula, no transporte intracelular e na organização espacial dos organelos. Nas células em divisão, duplica e migra para polos opostos da célula, estabelecendo a formação do fuso mitótico/meiótico. Forma ainda o corpo basal, necessário para a formação de cílios primários (Luders and Stearns, 2007; Nigg and Raff, 2009).

O centrossoma das células animais é formado por dois componentes principais: dois centríolos, dispostos ortogonalmente entre si, rodeados por uma matriz proteica, designada por matriz pericentriolar. Os centríolos são constituídos por nove tripletos de microtúbulos, que se dispõem radialmente, formando um cilindro com um diâmetro de 250 nm e um comprimento de 500 nm, aproximadamente. Cada tripleto é constituído por um microtúbulo completo, com 13 protofilamentos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina e dois microtúbulos com apenas 10 protofilamentos (Figura 9A). Por serem constituídos por microtúbulos, os centríolos são intrinsecamente polares. As extremidades (-) dos microtúbulos estão voltadas para a zona proximal dos centríolos e as extremidades (+) para a zona distal. Os microtúbulos que constituem o centrossoma são particularmente resistentes à despolimerização, devido às modificações pós-traducionais que sofrem, nomeadamente a poliglutaminação (ver em I.1.2.1.3) (Bettencourt-Dias and Glover, 2007; Winey and O'Toole, 2014).

Durante a divisão celular, o centrossoma duplica, os centríolos separam-se e cada um serve de molde para a síntese do novo centríolo. Desta forma, em todas as células existe um centríolo mais antigo, o centríolo-mãe, e um mais novo, designado por centríolo-filho. Os dois centríolos não são totalmente equivalentes, uma vez que o centríolo-mãe está associado a apêndices distais, que nucleiam o cílio primário quando o centrossoma funciona como corpo basal, e sub-distais, responsáveis por organizar o citoesqueleto de microtúbulos nas células em interfase (Figura 9B) (Bornens and Gonczy, 2014; Hinchcliffe, 2014; Nigg and Stearns, 2011).



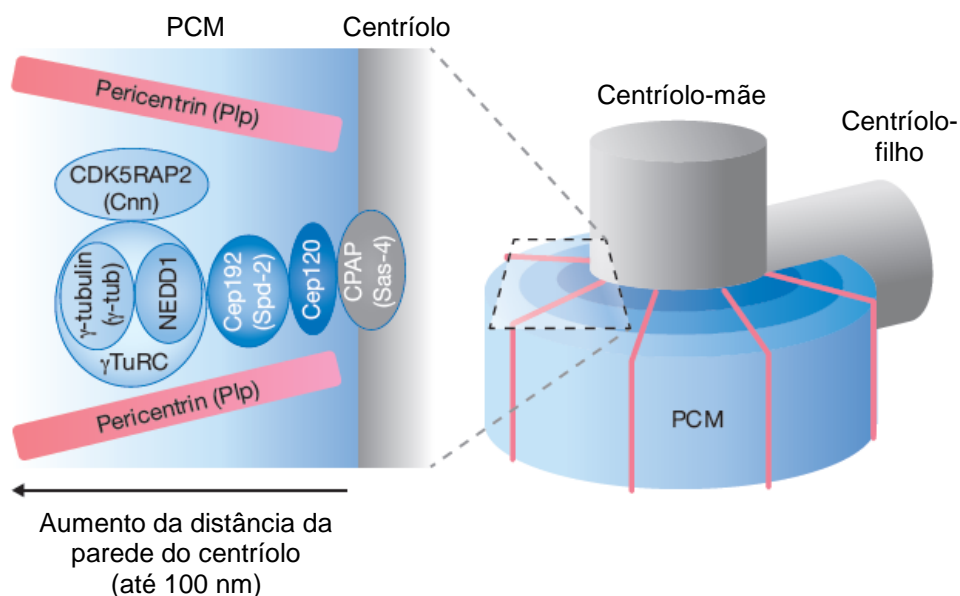
**Figura 9. O centrossoma das células animais** (Adaptado de Bettencourt-Dias and Glover, 2007 e Bornes and Gönczy, 2014). A – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um centrossoma, evidenciando-se as diferenças entre as zonas proximal, onde se encontram os apêndices, e distal do centríolo-mãe. B – Representação longitudinal de um par de centríolos de células humanas. As linhas designadas por 1 e 2 representam cortes transversais mostradas em C. A região a cinzento na zona distal representa o lúmen da região onde se concentra a centrina. Por simplicidade, a matriz pericentriolar não está representada. C – Seções transversais do centríolo-mãe, vistas da zona proximal das regiões 1 e 2. A região 1 representa a parte distal com os microtúbulos assinalados com A e B. A região 2 representa a parte central do centríolo-mãe, com o tripleto de microtúbulos.

A matriz pericentriolar (PCM) é constituída por centenas de proteínas e está envolvida nos processos celulares que envolvem o centrossoma. Entre outras funções, é responsável pela nucleação dos microtúbulos, permitindo que os centrossomas funcionem como MTOCs, pois engloba os complexos de  $\gamma$ -TuRC, que se localizam na PCM. A PCM está organizada em domínios concêntricos, dispostos preferencialmente em torno do centríolo-mãe. Cada domínio é constituído por proteínas específicas, dispostas numa simetria radial concêntrica (Figura 10) (Luders, 2012).

Uma das primeiras proteínas identificadas na PCM foi a pericentrina, responsável pela organização do fuso mitótico. A maioria das proteínas localizadas na PCM partilha o motivo *coiled-coil*, que consiste em duas  $\alpha$ -hélices enroladas, e que se sabe ser um domínio de interação proteína-proteína.

No início da divisão celular, várias proteínas são fosforiladas e recrutadas para a matriz pericentriolar, promovendo a expansão da PCM devido à formação de uma camada externa em torno da existente em interfase. No final da mitose, a PCM é desmontada por um mecanismo ainda desconhecido, que se pensa estar associado à desfosforilação destas proteínas. Este processo pode ser promovido por vários fatores, como por exemplo, pelas forças exercidas pelos microtúbulos no córtex que, ao “puxarem” os centrossomas, poderão tornar a PCM mais acessível aos fosfatases.

Estas evidências sustentam a ideia de que o centrossoma é mais do que um centro nucleador dos microtúbulos, funcionando como uma plataforma dinâmica que integra e promove a interação entre proteínas, substratos e cofatores.



**Figura 10. Organização da matriz pericentriolar em centrossomas humanos** (Adaptado de Luders, 2012). Durante a interfase, as proteínas da PCM são organizadas em camadas concêntricas dispostas em torno do centríolo-mãe. As proteínas envolvidas na nucleação dos microtúbulos (incluindo os complexos de  $\gamma$ -TuRC e CDK5RAP2) encontram-se nas camadas exteriores enquanto os componentes da PCM como a CEP120 e a CEP192 se localizam junto à parede do centríolo-mãe, que está decorado pela proteína CPAP. Algumas proteínas como a pericentrina dispõem-se radialmente ao longo da PCM.

Na proximidade do centrossoma, foram observados agregados esféricos, com diâmetros entre 70 a 100 nm, aproximadamente, designados por satélites centriolares (Figura 9B). Em células ciliadas, os satélites localizam-se também em torno do corpo basal. Estas estruturas só estão presentes em células em interfase e desaparecem gradualmente quando a célula inicia a mitose. Apesar de os satélites terem sido observados em todos os tipos de células estudados, o seu tamanho, a sua composição molecular, abundância e localização variam consideravelmente consoante o tipo de célula (Tollenaere et al., 2015).

Os satélites são constituídos por várias proteínas essenciais na ciliogénese, na organização dos microtúbulos, na manutenção do fuso mitótico, na duplicação do centrossoma, entre outros. Podem regular a concentração proteica no centrossoma e no corpo basal, pelo transporte mediado pelos microtúbulos e pela dineína ou por reterem proteínas centrossomais, regulando assim as funções deste organelo (Tollenaere et al., 2015).

## **2.1. Posição do centrossoma vs núcleo**

Nas células animais em interfase, o centrossoma é mantido no centro, próximo do núcleo (entre 1 a 2  $\mu\text{m}$ ) e movimenta-se de forma coordenada com este. Esta associação entre o núcleo e o centrossoma pode facilitar alguns processos celulares, como a ligação dos cromossomas aos microtúbulos, quando ocorre a desorganização do invólucro nuclear durante a divisão celular, ou ser um ponto de referência para a localização dos cromossomas nos núcleos das células em interfase. Durante a divisão celular, os centrossomas recém-duplicados migram para os polos opostos das células, onde definem o plano da divisão e formam o fuso acromático. Em coordenação com fatores externos à célula definem assim se a divisão é simétrica ou assimétrica (Burakov and Nadezhdina, 2013).

Em células polarizadas ou em determinados eventos, o centrossoma estabelece com o núcleo um eixo de polarização, que tem impacto nas funções das células. Em células diferenciadas do epitélio, por exemplo, o centrossoma localiza-se perto da superfície apical, longe do núcleo, estabelecendo um eixo de polaridade (Dupin and Etienne-Manneville, 2011; Elric and Etienne-Manneville, 2014). A associação entre o centrossoma e o núcleo pode ainda facilitar a migração celular, durante a qual o centrossomas e localiza maioritariamente à frente do núcleo no sentido do

deslocamento, e nucleia uma rede de microtúbulos que promove a migração de proteínas para o *leading edge* (Chang et al., 2013).

A interação entre o núcleo e o centróssoma ainda não está totalmente elucidada, não sendo conhecidos todos os fatores que promovem esta associação nem que funções poderá ter no funcionamento das células. Sabe-se que esta interação pode ser explicada com base nas forças exercidas pelo citoesqueleto e proteínas da célula mas também existem evidências de proteínas que estabelecem uma ligação física entre os dois organelos. Existem também fatores do microambiente celular que condicionam esta interação, como a existência de constrições geométricas devidas às interações que se estabelecem entre as células e entre estas e o substrato (*in vivo*, a matriz extracelular).

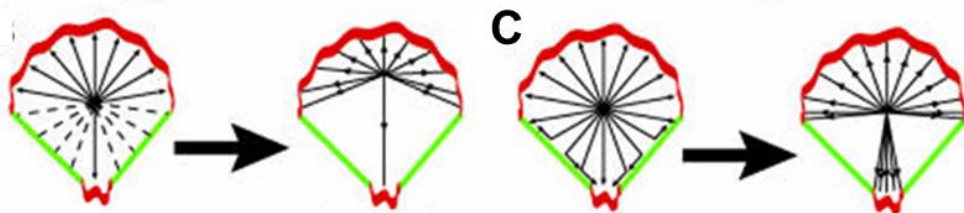
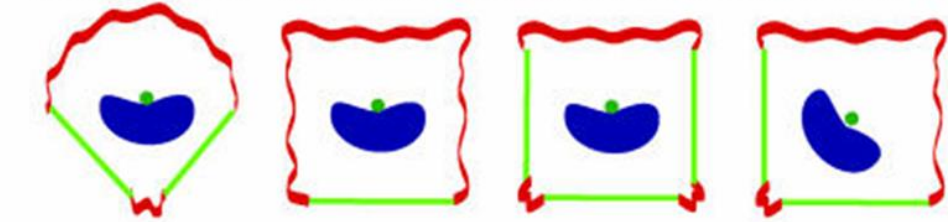
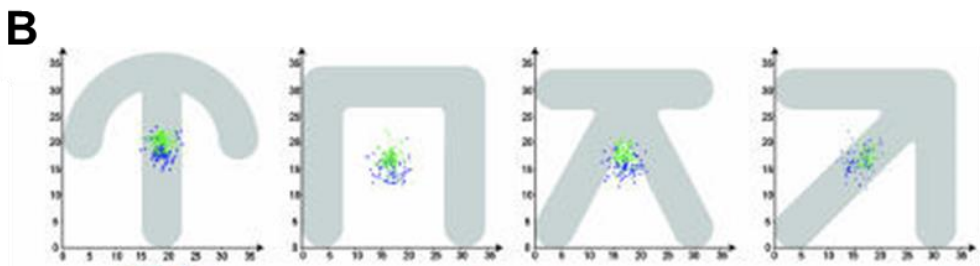
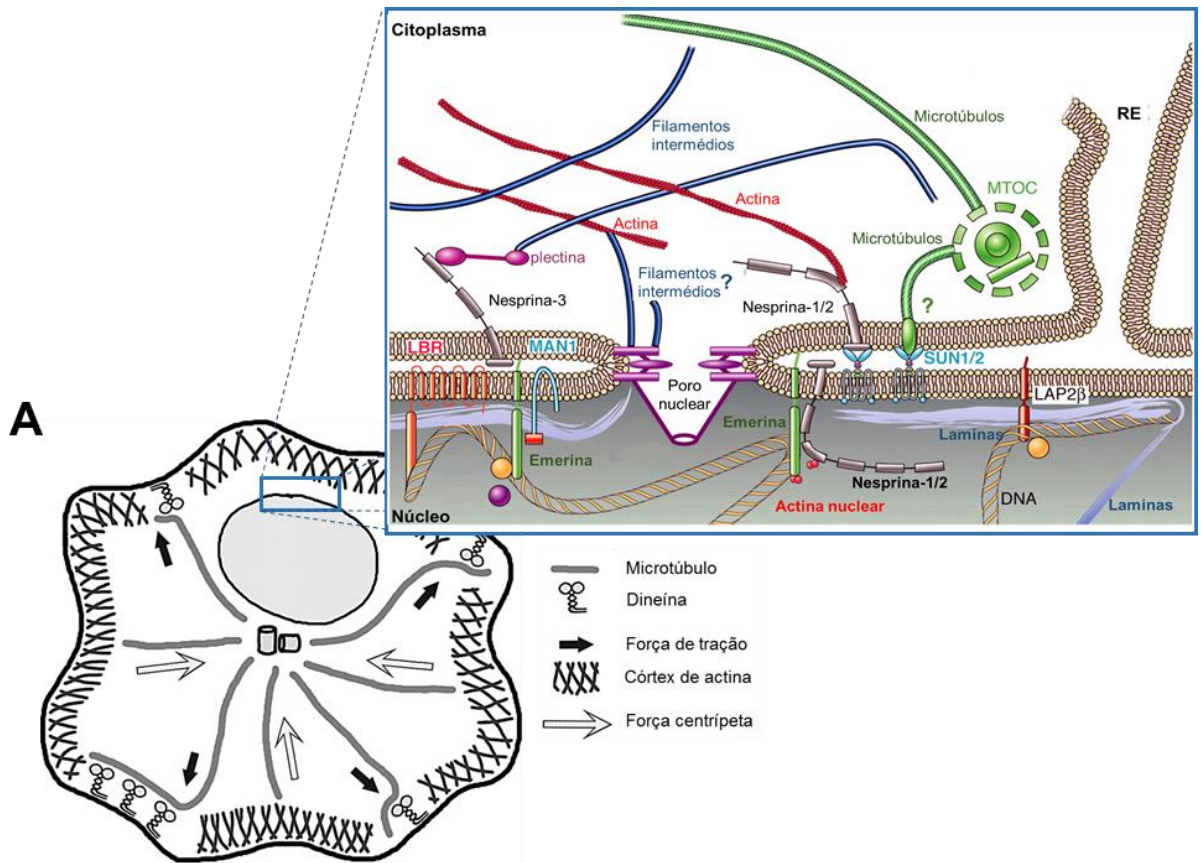
A posição entre o núcleo e o centróssoma é regulada pelo balanço entre as forças que “puxam” e “empurram” os dois organelos. Em células em interfase, o centróssoma organiza uma rede radial de microtúbulos, com uma distribuição semelhante em todas as direções. O balanço da polimerização/despolimerização dos microtúbulos leva a que sejam exercidas forças de “empurram” o centróssoma em todas as direções, acabando por promover a sua localização no centro da célula. Algumas proteínas associadas ao córtex das células, como a dineína, “puxam” os microtúbulos, contribuindo para este posicionamento (Figura 11A) (Broers et al., 2006; Burakov et al., 2003; Burakov and Nadezhdina, 2013; Kwon et al., 2015; Laan et al., 2012; Manneville and Etienne-Manneville, 2006; Walczak et al., 2010). A inibição parcial da dineína e a alteração da dinâmica dos microtúbulos (por despolimerização ou estabilização) provocam, em algumas linhas celulares, o aumento da distância entre o núcleo e o centróssoma. A dineína liga-se ainda à proteína Par3 nos contatos célula-célula, regulando localmente a dinâmica dos microtúbulos e contribuindo para o posicionamento do centróssoma no centro da célula (Schmoranzler et al., 2009). Por outro lado, foi observado que o núcleo também interage com estas proteínas, movendo-se ao longo dos microtúbulos de forma dependente da dineína e das cinesinas, nos zigotos e embriões de animais e nas células precursoras neuronais (Burakov et al., 2003; Burakov and Nadezhdina, 2013).

Os filamentos de actina também participam na regulação do posicionamento do núcleo e do centróssoma no centro da célula, exercendo forças centrípetas dependentes da contração da miosina (Figura 11A) (Burakov et al., 2003). Foi observado que a centrifugação de células sem citoesqueleto de actina (previamente tratadas com o agente despolarizante citocalasina *B*) causa a separação dos núcleos e centróssomas, ao contrário do que sucede nas células não-tratadas, o que sugere que a rede de filamentos de actina contribui para a interação entre o núcleo e o centróssoma (Burakov and Nadezhdina, 2013). Paralelamente, a actina e a proteína Arp2/3 foram identificadas

na matriz pericentriolar de células em interfase (Hubert et al., 2011) e a desorganização dos filamentos de actina inibe a separação dos centrossomas duplicados durante a divisão celular (Burakov and Nadezhdina, 2013).

Existem ainda proteínas que estabelecem uma ligação física entre o centrossoma e o núcleo, nomeadamente o complexo proteico LINC (de *linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton*), constituído pelas proteínas KASH (de Klarsicht, ANC-1 e Syne-1) e SUN (de Sud1 e Unc-48). As proteínas com o domínio SUN, localizadas na membrana interna nuclear, recrutam proteínas com o domínio KASH, que se localizam na membrana externa do núcleo e interagem diretamente com o citoesqueleto (Broers et al., 2006; Burakov and Nadezhdina, 2013; Luxton and Starr, 2014; Meinke and Schirmer, 2015). O complexo LINC, nomeadamente as proteínas com o domínio KASH nesprina-1 e 2, está também associado às linhas TAN (*transmembrane actin-associated nuclear lines*). Estas linhas consistem em feixes de actina paralelos e alinhados ao longo do eixo de migração. Pensa-se que estas linhas de actina TAN possam transmitir a força gerada por outras redes de actina da célula a proteínas do invólucro nuclear, que assim respondem à força aplicada e reorientam a posição do núcleo (Figura 11A) (Skau and Waterman, 2015). Algumas proteínas com o domínio KASH, como a nesprina-3, interagem ainda com filamentos intermédios, evidenciando assim que estes também contribuem para o posicionamento do centrossoma e do núcleo (Dupin and Etienne-Manneville, 2011). Outra proteína do invólucro nuclear, a emerina, que se localiza na membrana interna do núcleo, interage com os microtúbulos e com os filamentos de actina (Chang et al., 2013; Dupin and Etienne-Manneville, 2011).

As posições do núcleo e do centrossoma dependem ainda de constrangimentos geométricos do substrato onde as células estão aderentes *in vitro*, o que será uma aproximação dos constrangimentos espaciais nos tecidos *in vivo*. As células interagem através de várias proteínas, nomeadamente as caderinas, com a matriz extracelular e com outras proteínas, o que lhes impõe certas restrições geométricas. *In vitro*, quando as células são cultivadas em placas com padrões geométricos de substrato (fibronectina) a forma da célula e, conseqüentemente, o citoesqueleto são condicionados pela restrição a que estão sujeitas. Como o citoesqueleto é afetado, estes constrangimentos condicionam também as estruturas de adesão e o posicionamento dos organelos. Desta forma, foi observado que o posicionamento do centrossoma e do núcleo relativamente ao centro da célula variam consoante o padrão em que a célula cresce (Figura 11B e C). (Dupin et al., 2009; They et al., 2006; Vignaud et al., 2012).



Estabilização assimétrica dos microtúbulos

Tensão gerada por o centrossoma não estar centrado

Rearranjo dos microtúbulos

Tensão equilibrada; centrossoma centrado



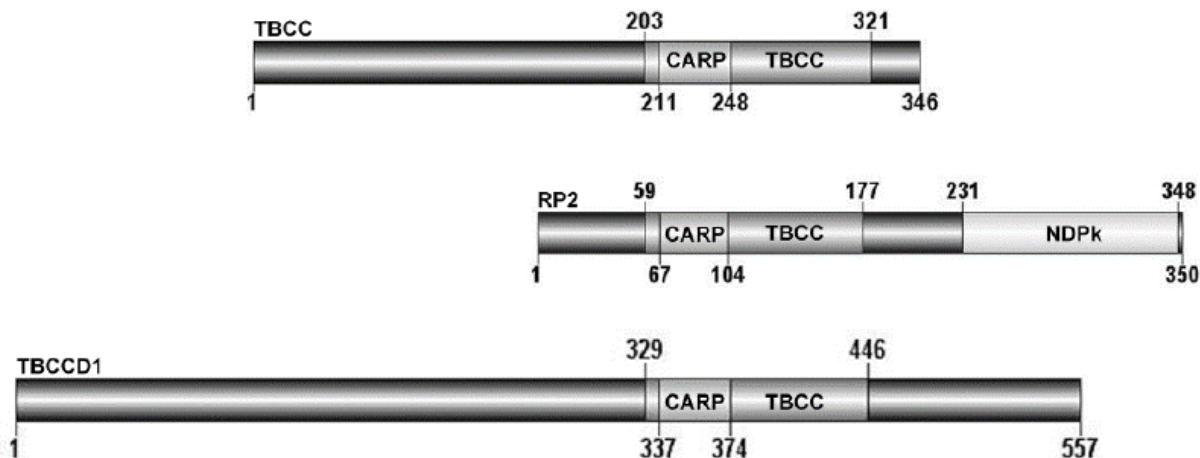
**Figura 11. Posicionamentos do centróssoma e do núcleo** (Adaptado de Burakov et al., 2003, Burakov et al., 2013 e Thèry et al., 2006, Broers et al., 2006). A – Forças envolvidas no posicionamento do centróssoma. As forças de tração (setas a preto) são aplicadas aos microtúbulos no córtex da célula pela dineína atuam de modo a posicionar o centróssoma no centro da célula. A força centrípeta (setas a branco) gerada pela actina e a dinâmica dos microtúbulos “empurram” o centróssoma para o centro. Está destacado (retângulo a azul) um esquema da ligação física entre o núcleo e o centróssoma baseado nas proteínas SUN e KASH B – Posição do centróssoma e do núcleo em células cultivadas em placas com padrões geométricos de fibronectina. (Em cima) Os centróssomas estão dispostos aproximadamente no centro das células enquanto o núcleo não está centrado, dispondo-se em relação às zonas não aderentes e contrácteis (marcadas a verde). (Em baixo) Modelo de estabilização seletiva. A dinâmica da actina no córtex da célula (a vermelho) estabiliza os microtúbulos. Os microtúbulos que estão em contacto com as zonas aderentes (setas) são mais estáveis do que os que não estão (linhas a pontilhado). Esta estabilização seletiva induz uma tensão que conduz à descentralização do centróssoma. C – Os microtúbulos reajustam-se em resposta à tensão gerada, crescendo em direção às zonas não aderentes da célula sem sofrerem *capping*. A ausência de microtúbulos *capped* nas zonas não aderentes é compensada pelo aumento do *capping* nas zonas aderentes. A redistribuição dos microtúbulos centraliza o centróssoma.

### 3. A proteína centróssomal TBCCD1

A proteína humana TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein*) é codificada por um gene que se localiza no cromossoma 3 (3q27.3) e possui 8 exões. Esta proteína é constituída por 557 resíduos de aminoácidos, tendo uma massa molecular de  $\approx 64$  kDa, e tem um carácter fortemente hidrófobo, com um  $pI$  de 8,87. Esta proteína foi caracterizada em células humanas pelo nosso grupo, na alga *Chlamydomonas reinhardtii* e em *Trypanosoma brucei* (Andre et al., 2013; Feldman and Marshall, 2009; Gonçalves, 2010).

Nas células humanas, a TBCCD1 tem uma localização centróssomal e uma *pool* citoplasmática, durante todo o ciclo celular. No final da mitose, a TBCCD1 é recrutado para a zona mediana e, conseqüentemente, para o corpo mediano, a partir da *pool* citoplasmática. A proteína TBCCD1 foi também identificada na matriz pericentriolar e no corpo basal dos cílios primários e motores (Feldman and Marshall, 2009; Gonçalves et al., 2010a).

Esta proteína possui dois domínios funcionais: um domínio TBCC e um domínio CARP. Estes dois domínios são partilhados com as proteínas TBCC e RP2 que podem, por isso, ser funcionalmente semelhantes à TBCCD1 (Figura 12). Estas duas proteínas serão posteriormente abordadas com maior detalhe.



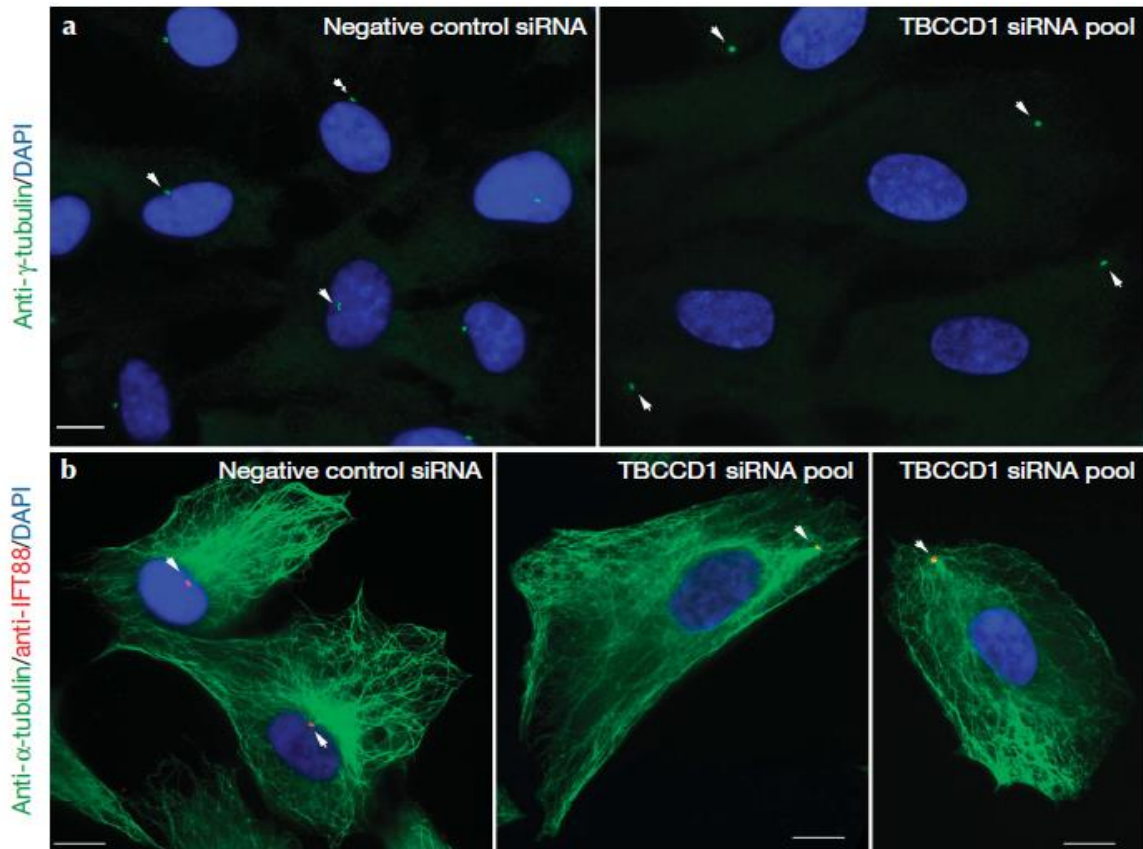
**Figura 12. Proteínas com os domínios funcionais CARP e TBCC** (Adaptado de Gonçalves, 2010). Representação esquemática dos domínios funcionais das proteínas humanas TBCC, RP2 e TBCCD1.

Foram identificadas duas variantes da proteína TBCCD1, que resultam de processos de *splicing* alternativo, e têm uma localização citoplasmática. Estes transcritos alternativos resultam da existência de um exão alternativo que codifica para a região N-terminal da proteína. No entanto, ainda não é claro quais as funções das proteínas codificadas pelos transcritos alternativos (Câmara, 2013).

A localização da TBCCD1 é independente dos microtúbulos, pois foi observado que a despolimerização dos microtúbulos com o agente nocadozole não afeta a sua localização. Já foi também observado que é a sequência N-terminal, mais concretamente os primeiros 20 resíduos de aminoácidos, que determinam a sua localização centrossomal (Pereira, 2011).

Por outro lado, foi observado que a depleção da proteína TBCCD1 altera significativamente a posição do centrossoma em relação ao núcleo. Em estudos de siRNAs específicos para a TBCCD1 em células do epitélio pigmentado da retina (hTERT-RPE-1) observou-se que há um aumento significativo (aproximadamente 60%) de células em que o centrossoma dista mais de 2  $\mu\text{m}$  do núcleo (Figura 13). No entanto, apesar desta perda de ligação núcleo – centrossoma, estes mantêm a capacidade de nucleação dos microtúbulos, o que indica que a sua posição junto ao núcleo não é essencial para a capacidade de nucleação assim como a presença da proteína TBCCD1. A depleção desta proteína causa ainda a fragmentação do complexo de Golgi,

um atraso no ciclo celular, um aumento do tamanho da célula e deficiência na migração orientada (Goncalves et al., 2010a).



**Figura 13. A depleção da proteína TBCCD1 em células RPE causa a perda da associação núcleo-centrossoma** (Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2010). A – Células controlo e células TBCCD1-depletadas marcadas por imunofluorescência com anti-g-tubulina (a) e anti-γ-tubulina e IFT88 (b). As setas apontam para os centrosomas. A barra de escala corresponde a 5 μm.

### 3.1. Proteínas semelhantes à TBCCD1: TBCC e RP2

O TBCC e a RP2 são proteínas que partilham domínios funcionais com a proteína TBCCD1, como referido anteriormente. Pensa-se por isso que a proteína TBCCD1 possa, pelo menos em parte, partilhar funções com estas duas proteínas.

O TBCC foi identificado como estando envolvido na via de *folding* da tubulina. Esta proteína liga-se ao supercomplexo constituído pelo TBCE, ligado à α-tubulina, e pelo TBCE, ligado à β-tubulina atuando como GAP (*GTPase activating proteins*) em

conjunto com o TBCD, ou seja, promove a hidrólise do GTP, essencial para a libertação do dímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina na forma GDP (ver I.1.2, Figura 6). Assim, permite que os dímeros atinjam a sua estrutura nativa e possam vir a ser incorporados nos microtúbulos. Sabe-se ainda que a deleção do gene homólogo em levedura, *cin2*, causa uma hipersensibilidade à despolimerização dos microtúbulos e que, por outro lado, a sobre-expressão desta proteína diminui a dinâmica dos microtúbulos e provoca um atraso no ciclo celular.

A sequência do domínio TBCC é caracterizada por um resíduo de arginina conservado e que se pensa ser crucial para a função deste domínio no processo de *fold*ing da tubulina. No entanto, a TBCCD1 não possui este resíduo na sua sequência, o que pode indicar não partilharem totalmente as mesmas funções. Do mesmo modo, a TBCCD1 não faz reversão do fenótipo do gene *cin2* (gene de levedura homólogo a TBCC), o que também indica que não desempenha totalmente as mesmas funções que a TBCC, ou seja, este domínio pode também estar associado a outras funções que ainda não foram descritas.

A TBCC possui ainda o domínio CARP, tal como a TBCCD1 e a proteína RP2 (Figura 12). O domínio CARP encontra-se também presente nas proteínas CAP (*cyclase-associated proteins*), que se ligam a monómeros de actina, estando envolvidas na polimerização dos filamentos de actina. No entanto, ainda não foi possível identificar nenhuma ligação entre a TBCCD1 e o citoesqueleto de actina.

A proteína RP2 (*retinitis pigmentosa protein*) partilha os domínios funcionais do TBCC e da TBCCD1. O gene que codifica para esta proteína foi implicado na retinite pigmentosa, uma doença associada ao cromossoma X caracterizada pela degeneração grave da retina até à cegueira. Esta proteína tem uma localização citoplasmática e membranar, cuja proporção nos dois locais depende do tipo de célula. Esta proteína também consegue reverter parcialmente o fenótipo de deleção do gene *cin2* em levedura, o que indica que tem função de GTPase à semelhança da proteína TBCC. No entanto, não consegue substituir a TBCC na via de *fold*ing da tubulina (Bartolini et al., 2002). Esta proteína possui ainda um domínio NDPK (*nucleoside diphosphate kinase*) (Figura 12) que está descrito como responsável a transferência de grupos fosforilo do ATP. No entanto, apesar de possuir este domínio, a RP2 não possui esta função, pensando-se que esteja envolvida na reparação de danos de DNA (Yoon et al., 2006).

Em suma, a proteína TBCCD1 parece ter um papel fundamental na integridade funcional e estruturas das células, pois a sua depleção causa a alteração do normal funcionamento das células. Esta proteína localiza-se no centrossoma, o principal centro nucleador de microtúbulos e uma plataforma que promove múltiplas interações entre proteínas, cofatores e substratos, permitindo, por exemplo, reduzir o ruído na transmissão de sinais. O centrossoma encontra-se localizado no centro da célula, associado ao núcleo por mecanismos ainda não completamente elucidados, mas que têm um papel fundamental na organização dos organelos celulares, no estabelecimento da polaridade, na diferenciação celular e outros processos. O estudo do citoesqueleto e da sua regulação é, por isso, fundamental para compreender melhor o funcionamento das células.

## II. OBJETIVOS

Este trabalho insere-se no objetivo global do grupo de investigação onde foi desenvolvido e que consiste na identificação das funções biológicas da proteína centrossomal TBCCD1. Esta proteína, caracterizada pela primeira vez em células humanas por este grupo, partilha os domínios funcionais TBCC e CARP com as proteínas TBCC e RP2 (Gonçalves, 2010). No entanto, ainda não foi observada nenhuma relação entre as funções destas proteínas e as da TBCCD1. Sabe-se ainda que existem variantes de *splicing* alternativo do gene que codifica para a proteína TBCCD1, que diferem na sua localização citoplasmática e, possivelmente, nas suas funções (Câmara, 2013).

A proteína TBCCD1 parece ter uma função importante no posicionamento do centrossoma relativamente ao núcleo, pois foi observado que a sua depleção causa um afastamento significativo entre os dois. Esta proteína parece também estar envolvida na organização espacial dos organelos, nomeadamente do complexo de Golgi, que sofre fragmentação na ausência da proteína. A depleção da TBCCD1 causa ainda um aumento do tamanho das células, um atraso na migração e na divisão celular. Estes resultados evidenciam a importância desta proteína no normal funcionamento das células. No entanto, os mecanismos subjacentes a esta proteína e as vias em que intervém ainda não foram identificadas e, por isso, o seu papel nas funções normais das células permanece ainda por elucidar.

Assim, de forma a tentar compreender as funções da proteína TBCCD1 e as vias em que intervém, este trabalho teve como objetivos:

- Identificar as proteínas interatuantes com a TBCCD1 e com uma das variantes de *splicing* alternativo, através do método de BiLD;
- Estudar o impacto da estabilização dos microtúbulos no fenótipo causado pela depleção da proteína TBCCD1;
- Observar possíveis interações entre a proteína TBCCD1 e o citoesqueleto de actina devido à presença do domínio CARP, através da análise de fenótipos do citoesqueleto de actina em células sujeitas à depleção da TBCCD1 e de alterações na localização desta proteína em células com citoesqueleto de actina despolimerizado.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Estirpes bacterianas e condições de cultura

Neste trabalho, para a produção de DNA foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* JM109 (*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB<sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15] hsdR17(rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>)*).

A estirpe foi cultivada em meio de cultura LB *Broth* líquido (Nzytech, Lisboa, Portugal, 10 g/L peptona, 10 g/L NaCl e 5 g/L extrato de levedura), suplementado com o antibiótico necessário (tetraciclina 100 µg/mL ou kanamicina 50 µg/mL), a 37°C com agitação. Para crescer as células em placa foi utilizado LB suplementado com agar a 1,5 % (m/v).

De forma a conservar as células por longos períodos de tempo, estas foram congeladas quando estavam na fase exponencial em meio LB suplementado com glicerol a 15 % (v/v).

##### 1.1. Preparação de células *E. coli* competentes

De modo a tornar as células *E. coli* competentes para poderem ser transformadas com DNA plasmídico, colocou-se uma pré-cultura a crescer em meio LB líquido durante a noite a 37 °C com agitação permanente. Na manhã seguinte, preparou-se uma cultura com absorvência de 0,075 a 600 nm ( $Abs_{600}$ ). A cultura foi incubada nas mesmas condições até atingir a fase exponencial ( $Abs_{600} = 0,03$ ). Nesta fase, as células foram recolhidas por centrifugação a 7000 rpm durante 2 minutos a 4 °C (Sigma St. Louis, EUA, 4K10, Rotor nº 12254). Todas as etapas seguintes foram feitas à temperatura de 4 °C. As células foram ressuspensas gentilmente em metade do volume inicial da cultura celular numa solução de  $MgCl_2$  0,1 M e novamente centrifugadas nas mesmas condições. De seguida, as células foram ressuspensas gentilmente em metade do volume inicial da cultura de células numa solução de  $CaCl_2$  0,1 M e incubadas durante 20 minutos em gelo. Procedeu-se a uma nova centrifugação nas condições acima descritas e as células foram ressuspensas em 1/50 do volume inicial numa solução de  $CaCl_2$  0,1 M com glicerol 5 % (v/v). As células foram alíquotadas (alíquotas de 50 µL), congeladas rapidamente em azoto líquido e guardadas a -80 °C até serem utilizadas na transformação com DNA plasmídico.

## 2. Clonagem de fragmentos de DNA em vetores de expressão

Para clonar as sequências de interesse em vetores de expressão foi utilizada sempre a mesma estratégia. As sequências a clonar foram obtidas pela técnica de PCR (*Polimerization Chain Reaction*) com *taq* polimerases com capacidade de *proof-reading*. As sequências dos *primers* utilizados foram desenhadas de forma a incluir locais de reconhecimento dos enzimas de restrição *NotI* e *AscI*. Assim, após a amplificação e extração do DNA, os fragmentos foram hidrolisados com estes enzimas, assim como o plasmídeo de inserção pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA\**, de forma a ficarem com extremidades compatíveis. Após a hidrólise procedeu-se à ligação dos fragmentos com o vetor, na proporção de 3:1. As reações de ligação foram utilizadas para transformar células *E.coli* competentes. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido com o antibiótico de resistência adequado, de forma a se selecionarem apenas os recombinantes. Após a análise de quais os clones positivos pelo método de *cracking* (ver secção III.2.6) e por hidrólise foi escolhido um dos clones para sequenciar. As técnicas utilizadas nesta estratégia serão, de seguida, explicadas em maior detalhe.

### 2.1. Amplificação das sequências do gene *tbccd1* e correspondentes à variante 2

As sequências codificantes dos genes humanos TBCCD1 e *tbccd1* variante 2 foram amplificadas por PCR, a partir do plasmídeo pIC111, no qual tinham sido previamente clonadas as sequências codificantes para a proteína *tbccd1* e variante 2 ligadas à proteína GFP (Câmara, 2013; Gonçalves, 2010). As reações de PCR foram feitas com um volume final de 20 µL. Foi utilizado um enzima *taq* polimerase de DNA *proof-reading* (Nzytech, Lisboa, Portugal) e nucleótidos (Fermentas, Paisley, UK). As condições das reações de PCR foram iguais para a TBCCD1 e para a variante 2 e estão descritas no quadro 1. O ciclo desnaturação – hibridação – alongamento foi repetido 44 vezes. Para as reações de PCR foram utilizados os termocicladores Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e Peltier Thermal Cyclers – 100 (MJ Research, California, EUA).

Os *primers* (Stabvida, Caparica, Portugal) foram desenhados de modo a terem os locais de reconhecimento dos enzimas de restrição *NotI* e *AscI*, de modo a ser possível hidrolisar as extremidades do fragmento amplificado (Quadro 2). Desta forma, após a hidrólise, o fragmento fica com extremidades compatíveis com as do vetor, que



é também hidrolisado com os mesmos enzimas, o que após emparelhamento permitirá a reação de ligação.

**Quadro 1. Condições utilizadas nas reações de amplificação por PCR.**

	Iniciação	Desnaturação	Hibridação	Alongamento	Alongamento final
Temperatura (°C)	95	95	63	72	72
Tempo (min)	3	1	1	2,5	2,5

**Quadro 2. Sequências de primers utilizados na amplificação dos genes *tbccd1* e *tbccd1* variante 2.**

Primer	Sequência
TBCCD1 <i>Forward</i>	TTGGCGCGCCTATGGATCAGTCCAGAGTTCTC
TBCCD1 <i>Reverse</i>	ATAAGAATGCGGCCGCTTATCCAGCTGCTTGTTTGGGA
TBCCD1 variante 2 <i>Forward</i>	TTGGCGCGCCTATGACAGACCGACTTAAGTTTCG
TBCCD1 variante 2 <i>Reverse</i> (igual a TBCCD1 <i>Reverse</i> )	ATAAGAATGCGGCCGCTTATCCAGCTGCTTGTTTGGGA

## 2.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose de 1 % (m/v) preparados em tampão TAE 1x (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) com 1 % (v/v) de GreenSafe (Nzytech, Lisboa, Portugal), no sistema da BioRad (Califórnia, EUA), usando uma fonte de tensão BioRad PAC200 (Califórnia, EUA). Antes da aplicação das amostras no gel (10,0 x 6,5 cm), foi adicionado o volume adequado de tampão de amostra (Ficoll 400 a 2,5 % (m/v), EDTA a 16 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,2 % (m/v) em TAE 1x) a cada amostra. A migração eletroforética foi feita no mesmo tampão, em geral, a 100 V, durante aproximadamente 1 hora, até o corante atingir a base do gel. Sempre que necessário utilizou-se um marcador de massa molecular de DNA (NZYLadder III; Nzytech, Lisboa Portugal), de forma a confirmar o tamanho dos fragmentos analisados.

As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas e fotografadas num transiluminador (UV) Kodak EDAS 290. Quando necessário as bandas de interesse foram cortadas a partir dos géis de agarose e foram purificadas recorrendo a *kits* de extração de DNA de gel da QUIAGEN, de acordo com as instruções dos fabricantes. Para quantificação da quantidade de DNA extraído foi utilizado o espectrofotómetro Nanodrop (ND-100 spectrophotometer, *software* ND-100 V3.1.2, Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA).

### **2.3. Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição**

Após a amplificação das sequências, os produtos obtidos foram hidrolisados com os enzimas de restrição *NotI* e *AscI* (*New England Biolabs*, Massachusetts, EUA). O vetor de clonagem foi também hidrolisado com os mesmos enzimas. Desta forma, o fragmento e o vetor ficaram com extremidades compatíveis, o que facilita a sua ligação. Cada reação de hidrólise foi feita a 37 °C, durante a noite, num volume total de 30 µL, no qual se adicionou 1 µL de cada enzima de restrição (*NotI* - 10 U/µL; *AscI* - 10 U/µL) e 3 µL do tampão de reação 10x recomendado pelo fabricante dos enzimas.

Após a reação de hidrólise os enzimas foram inativados. Para tal, os produtos de hidrólise foram incubados a 65 °C durante 20 minutos e, em seguida, deixou-se lentamente atingir a temperatura ambiente.

### **2.4. Ligação dos produtos de PCR ao vetor de expressão pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA*\***

De modo a impedir a religação do vetor de clonagem hidrolisado, antes de se proceder à sua ligação com os fragmentos amplificados, o vetor foi desfosforilado. Para tal, adicionou-se 1 µL do enzima fosfatase alcalino (*New England Biolabs*, Massachusetts, EUA) e o volume adequado de tampão (*New England Biolabs*, Massachusetts, EUA). A mistura foi incubada 15 minutos a 37 °C e, de seguida, 15 minutos a 65 °C com o objetivo de inativar o enzima.

A reação de ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor de clonagem foi feita utilizando uma proporção de 3:1 de fragmento:vetor. A quantidade a adicionar de cada foi calculada tendo em conta o tamanho dos produtos e do vetor. Cada reação foi feita num volume total de 15 µL, tendo-se adicionado o enzima DNA ligase (1 U/µL;

Invitrogen, Paisley, UK) e tampão de ligação, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram feitas a 37 °C durante 2 horas e prosseguiram durante a noite a 4 °C.

## **2.5. Transformação de células competentes**

Para cada transformação foram utilizados 50 µL de células *E. coli* competentes, às quais se adicionou o DNA plasmídico (em geral, 100 ng) ou o resultado das reações de ligação de um vetor com um fragmento (em geral, 10 µL). As células foram incubadas com o DNA durante 20 minutos no gelo e, de seguida, foram submetidas a um choque térmico de 42 °C durante 90 segundos seguidos por 2 minutos no gelo. Posteriormente, adicionou-se 600 µL de meio líquido LB e incubou-se durante 1 hora a 37 °C com agitação. As células foram recolhidas por centrifugação a 7000 rpm durante 1 minuto (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha, *Centrifuge* 5415D). Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 20 µL e plaqueadas em LB sólido suplementado com os antibióticos para os quais o vetor possui um marcador de resistência, de modo a seleccionar os clones positivos.

## **2.6. Protocolo de *cracking***

Para a deteção dos clones positivos utilizou-se o método de *cracking* que consiste em lisar parte de uma colónia de células bacterianas transformadas em 20 µL do tampão de *cracking* (NaOH 50 mM, SDS 0,5 % (m/v), EDTA 5 mM) a 55 °C durante 30 minutos. De seguida, os lisados foram agitados com auxílio de um vórtex na velocidade máxima durante 1 minuto com o objetivo de degradar o DNA genómico. Por fim, a cada lisado foi adicionado o volume apropriado de tampão de amostra (Sigma, St. Louis, EUA) e foram analisados num gel de agarose de 1 % (m/v) por comparação com o vetor vazio (controlo). Como os vetores em que houve inserção do fragmento de interesse têm um tamanho superior ao vetor controlo, migram menos e por isso é possível a sua distinção desta forma.

## **2.7. Produção de DNA plasmídico em pequena escala**

Para a produção de DNA plasmídico em pequena escala foram seleccionadas as colónias positivas pelo método de *cracking* e para cada uma foi lançada uma pré-cultura

de 5 mL em meio LB líquido suplementado com os antibióticos de seleção, que cresceu durante a noite (entre 12 a 16 horas), a 37 °C e com agitação. No dia seguinte, procedeu-se à recolha das células por centrifugação (6800 g durante 3 min; *Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha, *Centrifuge 5415D*) e à extração do DNA plasmídico, recorrendo-se para tal ao *kit* de extração QIAprep Spin Miniprep da Quiagen de acordo com as instruções do fabricante. Para alguns plasmídeos, foi utilizado o *kit* de extração Wizard Plus SV *Minipreps* da Promega, tendo-se seguido as instruções do fabricante.

Este DNA foi utilizado para confirmar, por hidrólise com os enzimas de restrições adequados, os resultados obtidos pelo método de *cracking*, ou seja a inserção correta do fragmento esperado no vetor de clonagem. O resultado da hidrólise foi analisado por eletroforese num gel de agarose de modo a confirmar que o tamanho dos fragmentos obtidos corresponde ao vetor ligado ao fragmento amplificado.

## **2.8. Sequenciação**

De forma a confirmar que não existem erros na sequência do gene de interesse, introduzidos pela amplificação realizada por PCR, após a clonagem, sequenciou-se o fragmento clonado. Para tal, prepararam-se tubos *ependorf* com 1 µg do plasmídeo a sequenciar e 30 ng dos *primers* escolhidos (um por tubo). Os tubos foram enviados para a empresa STABVIDA, onde foi feita a sequenciação. Os resultados da sequenciação foram analisados com o *software* Chromas Lite Version 2.1.1.

## **2.9. Produção de DNA plasmídico em grande escala**

Para a produção de DNA plasmídico em grande escala foi lançada uma pré-cultura de 5 mL em meio LB líquido suplementado com os antibióticos de seleção, que cresceu durante o dia (entre 8 a 10 horas), a 37 °C e com agitação. Ao final do dia, inoculou-se uma cultura de 50 mL, a partir da pré-cultura, que ficou a crescer durante a noite, nas mesmas condições. No dia seguinte, procedeu-se à recolha das células por centrifugação (Sigma, St. Louis, EUA, 4K10, Rotor nº 12254) e à extração do DNA plasmídico, com o *kit* de extração Plasmid Midi Kit (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3. Células e condições de cultura celulares

Neste estudo foram utilizadas as linhas celulares humanas HEK293 Flp-In/T-REx, HEK293 Flp-In/T-Rex *Flag-BirA\**-TBCCD1, HEK293 Flp-In/T-Rex *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2, HEK293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\**, hTERT-RPE-1, hTERT-RPE-1 centrina-GFP e hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP.

As linhas celulares foram manuseadas numa câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206 e foram mantidas numa estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, com 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> e com atmosfera húmida (humidade relativa de 80 % (v/v)). De forma a visualizar e contar as células foi utilizado um microscópio invertido de contraste de fase Olympus CK40. As células foram passadas a cada 2 ou 3 dias, dependendo da sua confluência, de modo a serem mantidas em crescimento exponencial e em monocamadas subconfluentes.

Como as células crescem aderentes à superfície da placa de cultura, para passar as células foi necessário, depois de 2 lavagens com tampão de fosfatos (PBS 1x; Invitrogen, Paisley, UK), adicionar tripsina 0,05 % (v/v) (Invitrogen, Paisley, UK) e incubar a 37 °C durante 3 minutos. Desta forma, as ligações das células à placa (que substitui a matriz) são quebradas e as células ficam em suspensão, o que permitiu a sua passagem e contagem (quando necessário). A reação foi parada por adição de meio de cultura e as células foram diluídas em meio de cultura e cultivadas numa placa nova.

Para os ensaios experimentais, em que foi necessário ter um número exato de células na placa, foi necessário contar as células. Para tal, foi utilizado o marcador vital azul de tripano (Sigma, St. Louis, EUA), que cora a azul as células mortas. As células vivas foram contadas num hemacitómetro.

#### 3.1. Linha celular HEK293 Flp-In/T-REx (Sistema Flp-In T-REx)

HEK293 Flp-In/T-Rex é uma linha derivada da linha celular HEK293T (gentilmente cedida pelo Dr. Pelletier, *Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute Mount Sinai Hospital*, Toronto, Canadá), de epitélio de rim embrionário humano. Estas células possuem um único local FRT (*Flippase Recombination Target*) no seu genoma, que facilita a recombinação e inserção do gene de interesse. O local FRT foi inserido a seguir ao ATG de iniciação do gene de resistência ao antibiótico zeocina, o que torna esta linha resistente a este antibiótico. Estas células expressam constitutivamente o repressor da tetraciclina, o que permite a expressão indutível dos genes de interesse (que possuem um local promotor da tetraciclina), que são introduzidos nos locais FRT. O local de

expressão do repressor da tetraciclina está associado ao gene de resistência ao antibiótico blastomicina, que pode ser por isso utilizado como marcador de seleção.

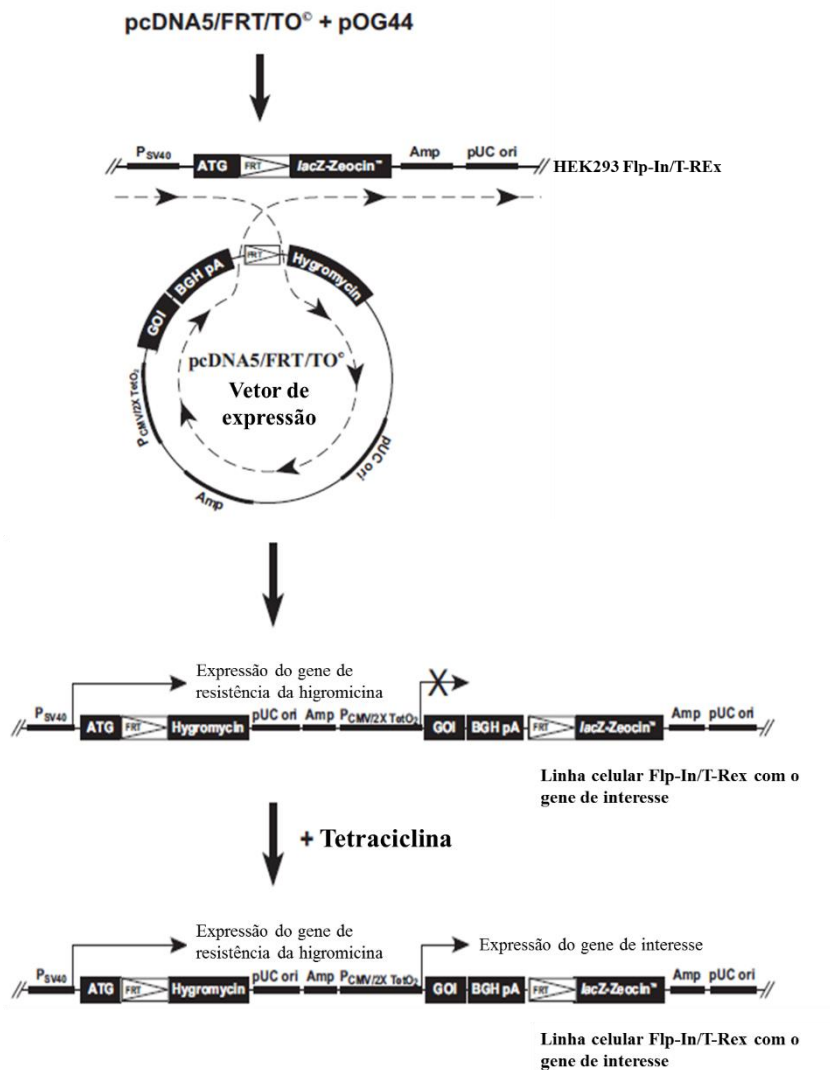
Esta linha foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagles's medium (DMEM) com Glutamax (GIBCO™ Invitrogen, Paisley, UK), suplementado com soro fetal bovino (Invitrogen, Paisley, UK) e com os antibióticos de seleção zeocina (Invitrogen, Paisley, UK) e Blastomicina (Thermo Scientific, Paisley, UK).

### **3.2. Estabelecimento das linhas celulares HEK 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\**-TBCCD1, 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2, HEK 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\****

Para estabelecer linhas celulares estáveis utilizando o sistema Flp-In/T-Rex, o primeiro passo foi clonar os genes de interesse (*tbccd1* e *tbccd1* variante 2) no vetor de expressão pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA\** (IX.1) contendo o gene de fusão *Flag-BirA\**. Desta forma, expressão dos genes de interesse é assim regulada pelo promotor do citomegalovírus híbrido humano (CMV) / TetO<sub>2</sub>, que é regulado pela tetraciclina. Este vetor possui também um gene de resistência ao antibiótico higromicina, com um local FRT na região codificante 5', e sem promotor e codão de iniciação ATG.

Após a clonagem, o plasmídeo pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA\** contendo o gene de interesse foi cotransfetado com o plasmídeo pOG44, que possui o gene do recombinase flipase. Para a criação da linha HEK 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\** não foi necessário fazer clonagem e procedeu-se apenas à cotransfecção. O enzima flipase é um recombinase que promove a recombinação homóloga entre os locais FRT do genoma das células HEK293 Flp-In/T-REx e do vetor de expressão pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA\** (ver III.4.1). A inserção do vetor pcDNA5 *Flag/FRT/TO-BirA\** no local FRT do genoma, coloca o gene de resistência da higromicina sobre controlo do promotor SV40 e na mesma grelha de leitura do codão de iniciação ATG do gene de resistência à zeocina, substituindo a sua expressão (Figura 14).

Estas linhas celulares foram cultivadas em meio de cultura DMEM com Glutamax (Invitrogen, Paisley, UK), suplementado com soro fetal bovino (Invitrogen, Paisley, UK) e com os antibióticos de seleção blastomicina (Thermo Scientific, Paisley, UK) e higromicina (Invitrogen, Paisley, UK).



**Figura 14. Sistema Flp-In/T-REx.** Adaptado de Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> Coe Kit (Life Technologies) Catálogo K6500-01.

### 3.3. Linha celular hTERT-RPE-1

hTERT-RPE-1 é uma linha celular do epitélio da retina imortalizada pela expressão da proteína telomerase humana. A linha hTERT-RPE-1 centrina-GFP expressa de forma estável a proteína de fusão centrina 1-GFP (gentilmente cedida pelo Dr. A. Khodjakov, *Jonsson-Rowland Science Center, USA*). A linha hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP expressa de forma constitutiva a proteína de fusão TBCCD1-GFP (Gonçalves, 2010).

Estas linhas celulares foram cultivadas com meio de cultura DMEM/F12 com Glutamax (GIBCO™ Invitrogen Paisley, UK), suplementado com 10 % de soro fetal bovino e com 0,04 % (v/v) de bicarbonato de sódio 7,5 % (Invitrogen, Paisley, UK).

## **4. Transfeção de células de mamífero**

### **4.1. Transfeção das células HEK293T Flp-In/T-Rex**

As células HEK293T Flp-In/T-Rex foram semeadas em placas de 6 poços ( $6 \times 10^5$  células por poço). As células foram transfetadas usando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley, UK), segundo as instruções do fabricante. Assim, por poço, 2,5 µL de Lipofectamine 2000 foram diluídos em 100 µL de Optimem (Invitrogen, Paisley, UK) e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Paralelamente, 200 ng do plasmídeo pcDNA5 com o gene de interesse e 2 µg do vetor pOG44 foram diluídos em 100 µL de Optimem. De seguida, misturou-se a Lipofectamine 2000 com o DNA plasmídico e incubou-se 20 minutos à temperatura ambiente, de forma a formar complexos DNA:agente lipídico. O meio de cultura foi, entretanto, substituído por meio sem FBS, uma vez que este inibe o processo de transfeção. Por fim, a mistura DNA:agente lipídico foi adicionada às células e incubou-se na estufa durante 2,5 horas. Para terminar o processo, substituiu-se o meio por meio com soro.

No dia seguinte, as células foram transferidas para uma caixa de 100 mm com meio DMEM com os antibióticos de seleção higromicina e blasticidina de modo a selecionar as células em que houve inserção do gene de interesse no genoma. A cada 3 ou 4 dias, o meio foi cuidadosamente aspirado e adicionou-se meio fresco suplementado com os antibióticos de seleção até se observar a formação de colónias de células suficientemente grandes para serem expandidas e congeladas.

### **4.2. Transfeção das células RPE**

Com o objetivo de analisar se a proteína CEP170 era capaz de reverter total ou parcialmente o fenótipo de depleção da TBCCD1 nas células humanas hTERT-RPE-1, procedeu-se à transfeção destas células com o plasmídeo pDEST 5' GFP, no qual foi previamente clonada a sequência codificante da proteína CEP170 em fusão com a proteína GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Pelletier, *Lunenfeld-Tanenbaum Research*



*Institute Mount Sinai Hospital*, Toronto, Canadá), Para tal, as células foram plaqueadas com uma confluência de  $5 \times 10^3$  e foram sujeitas aos siRNAs específicos para a TBCCD1 (ver o protocolo em III.4.3). No 4º dia após as células terem sido plaqueadas procedeu-se então à transfeção com o plasmídeo de interesse, com o agente de transfeção Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Paisley, UK).

Por cada poço de uma caixa de 24 poços, diluiu-se 1  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine 3000 e 1  $\mu\text{L}$  do reagente P3000 em 25  $\mu\text{L}$  de Optimem (Invitrogen, Paisley, UK). Paralelamente, diluiu-se 2  $\mu\text{L}$  DNA plasmídico a 250 ng/ $\mu\text{L}$  (ou seja, por poço utilizou-se 500 ng de DNA) em 25  $\mu\text{L}$  de Optimem. Deixou-se incubar 5 minutos e juntou-se o DNA plasmídico à mistura de Lipofectamine 3000 e reagente P3000. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de mistura Lipofectamine 3000:siRNA.

As células foram fixadas 24 horas após a transfeção para serem posteriormente tratadas para a análise por imunofluorescência.

#### **4.3. Transfeção de células RPE com pequenos RNAs interferentes**

As células hTERT-RPE-1, hTERT-RPE-1 centrina-GFP e hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP foram plaqueadas com uma confluência  $1 \times 10^4$ . No dia seguinte, as células foram transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1, com o agente de transfeção Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Paisley, UK). Para silenciar a expressão do gene *tbccd1* foi utilizada uma mistura de 4 siRNAs (Dharmacon e Ambion, Quadro 3) a uma concentração final de 300 nM no volume final de transfeção. A mistura dos 4 siRNAs não permite distinguir a proteína TBCCD1 das variantes de *splicing* alternativo que ainda não tinham sido identificadas, pelo que diminui os níveis das 3 proteínas.

Por poço de uma caixa de 24 poços, 0,75  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine 3000 (Invitrogen) foram diluídos em 25  $\mu\text{L}$  de Optimem (Invitrogen, Paisley, UK). Paralelamente, a mistura de siRNAs (20  $\mu\text{M}$ ) foi diluída em 25  $\mu\text{L}$  de Optimem para a concentração final indicada. Deixou-se incubar 5 minutos e juntou-se os siRNAs específicos para a TBCCD1 à Lipofectamine 3000. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Durante este tempo, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro. No fim, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de mistura Lipofectamine 3000:siRNA. Ao fim de 6,5 horas de transfeção o meio foi novamente substituído por meio de cultura com soro.

As células foram fixadas 24 horas após a última transfeção com siRNAs para serem posteriormente tratadas para a análise por imunofluorescência.

**Quadro 3. Sequências de pequenos RNAs interferentes**

siRNA	Fabricante
5'-GUGGCUUUACUUCGAAAUA-3'	Dharmacon
5'-GAGCUAAGAUUGCUUGUAA-3'	Ambion
5'-GAUUCAUCGUUGCAACGAA-3'	Ambion
5'-CCUUGUGAAUUCUAUGUAU-3'	Ambion

## 5. Método Bio-ID

Com o objetivo de identificar as proteínas que interagem com a TBCCD1 e com a variante 2 foi utilizado o método BioID (Roux et al., 2012). Este método baseia-se na fusão da proteína de interesse com uma forma mutante e inespecífica do ligase de biotina de *E. coli*, o BirA\*. Este enzima, na sua forma *wild-type* (*wt*), liga-se à molécula bioAMP (biotinil-5'-AMP, que resulta da associação entre biotina e ATP) e catalisa a biotilação de um resíduo de lisina de uma sequência específica de alguns carboxilases. Esta modificação pós-traducional, que consiste na adição de moléculas de biotina, é pouco comum nas células de mamífero, o que a torna passível de ser utilizada neste estudo. A forma mutada do enzima, pelo contrário, é muito inespecífica, apresentando uma afinidade cerca de 2 vezes inferior à da forma *wt*. Assim, o bioAMP reage rapidamente com aminas primárias, uma vez que facilmente perde afinidade para o centro ativo do enzima, permitindo que o BirA\* catalise as biotilação de proteínas indiferenciadamente, de um modo dependente da distância de proximidade (Roux et al., 2012).

Este método foi utilizado neste trabalho com o objetivo de identificar, *in vivo*, as proteínas que interagem com a proteína TBCCD1 canónica e com a variante 2. Para tal, foi estabelecida uma linha HEK 293T que expressa constitutivamente e de modo indutível a proteína de interesse ligada à proteína BirA\*. A expressão das proteínas de fusão foi induzida por adição de tetraciclina, a uma concentração final de 1 µg/mL, e biotina, a uma concentração final de 50 µM. Ao fim de 24 horas de incubação a 37 °C, as células foram tratadas para posteriormente serem analisadas por microscopia de imunofluorescência ou foram preparados extratos proteicos de modo a purificar e analisar o padrão de proteínas biotinizadas e o sucesso do procedimento.

### 5.1. Extração proteica (Método BioID)

As células HEK 293 Flp-In/T-REx, HEK 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\**-TBCCD1, *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 e *Flag-BirA\** foram cultivadas em placas de 100 mm até 60-80 % de confluência. Para a preparação em grande escala (para análise por espectrometria de massa) foram utilizadas 8 placas de 100 mm (aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  células/placa). As células foram tratadas com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina e 50  $\mu\text{M}$  de biotina. Após 24 horas de incubação, removeu-se o meio e as células foram raspadas em PBS 1x frio. As células foram recolhidas por centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos (*Hettich Rotofix 32*, Rotor nº 1619). Este procedimento foi repetido 4 vezes. O sedimento obtido na última lavagem foi congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2. Determinação da concentração proteica

Os níveis de proteínas presentes nos extratos foram quantificados pelo método de Bradford, utilizando como referência a albumina do soro bovino (BSA), em placas de 96 poços. De modo a quantificar as amostras proteicas, foi necessário fazer uma curva de calibração utilizando concentrações finais de BSA entre 0 e 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Antes de serem analisados, os extratos proteicos foram diluídos 1% (v/v). Adicionou-se a cada poço 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford. Após a incubação da mistura durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorvência a 595 nm no espectrofotômetro Tecan Sunrise (*software RdrOle4*), utilizando como branco uma amostra em que não houve adição de BSA.

A absorvência a 595 nm das amostras foi comparada com a curva de BSA, a partir da qual se calculou a concentração proteica do extrato.

### 5.3. Imunoprecipitação com streptavidina

Para a imunoprecipitação com streptavidina, uma proteína com uma elevada afinidade para a biotina e que, por isso, se liga às proteínas biotinizadas permitindo a sua precipitação, utilizaram-se 5 placas de 100 mm com uma confluência entre 80 a 100 % (aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  células/placa). As células HEK 293 Flp-In/T-REx *Flag-BirA\**-TBCCD1, *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 e *Flag-BirA\** foram induzidas e preparadas como descrito em III.5.1. O sedimento obtido após a última lavagem foi pesado e congelado 5 a 10 minutos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os sedimentos foram descongelados

rapidamente em água à temperatura ambiente e foram ressuspensos em tampão RIPA modificado (1 % NP-40; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 0,1 % SDS; 0,5 % de desoxicolato de sódio e inibidores de proteases). As células foram incubadas neste tampão durante 1 hora, a 4 °C com rotação suave. Adicionou-se 1 µL de nucleases (250U/µL; *Pierce™ Universal Nuclease for Cell Lysis*) e os extratos foram sujeitos a sonicação até não se observarem partículas em suspensão (4 a 5 vezes durante 30 segundos, em ciclos de 70 % de amplitude). Os extratos celulares foram centrifugados durante 40 minutos, a 12000 rpm e a 4 °C (Sigma, St. Louis, EUA, 4K10, Rotor nº 12167).

A imunoprecipitação foi feita utilizando as Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen, Paisley, UK). Antes da incubação com os extratos proteicos foi necessário preparar as *beads*. Para tal, estas foram ressuspensas (com auxílio do vórtex, durante 30 segundos) e transferiram-se 100 µL para um tubo eppendorf. As *beads* foram lavadas com PBS Tween 0,01 % (v/v) durante 5 minutos à temperatura ambiente e em agitação. Com auxílio de um ímã, formou-se um sedimento com as *beads*. Este passo foi repetido mais 4 vezes. No final, as *beads* foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1x.

Os extratos foram incubados com as *beads* durante a noite, a 4 °C com agitação suave. Retirou-se uma alíquota dos extratos (antes da incubação) para analisar por SDS-PAGE. Após incubação, as *beads* foram lavadas, durante 5 minutos, 6 vezes com PBS Tween 0,01 % (v/v) e 2 vezes com PBS 1x. No final, as proteínas foram eluídas com tampão de amostra durante 5 minutos a 98 °C.

#### **5.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE)**

A separação de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) foi feita utilizando um sistema vertical e descontínuo, constituído por dois tipos de géis: um gel concentrador de 5 % (v/v) (acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (m/m)) (Quadro 4) e um gel subposto a este, o gel resolvente de 10 % (v/v) (Quadro 5). Os géis foram preparados com as dimensões 7 x 8 x 0,15 cm (mini-géis Bio-Rad).

Adicionou-se às amostras proteicas o volume adequado de tampão de *amostra* [Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 4 % (m/v), Azul de bromofenol 0,2 % (m/v), glicerol 20 % (v/v), 2-β-mercaptoetanol 200 mM]. As amostras foram fervidas durante 5 minutos a 95 °C e aplicadas no gel. Aplicou-se 10-15 µL de um marcador de massa molecular. A separação eletroforética foi feita a 20 mA/gel, até o azul de bromofenol atingir ou sair da base dos géis, em tampão de corrida [Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % (m/v),

pH 8,3]. No final da eletroforese, os géis foram retirados e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou corados com azul de *Coomassie* ou nitrato de prata.

**Quadro 4. Componentes do gel resolvente**

Componentes do gel resolvente	Volume utilizado (para um volume final de 10 mL)
Acrilamida 30 % (m/v) : Bisacrilamida 0,8 % (m/v)	3,3 mL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,9	2,5 mL
SDS 20 % (m/v)	50 µL
Água bidestilada	4,13 mL
Persulfato de amónio 10 % (m/v)	5 µL
N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina (TEMED)	50 µL

**Quadro 5. Componentes do gel resolvente**

Componentes do gel de concentração	Volume utilizado (para um volume final de 5 mL)
Acrilamida 30 % (m/v) : Bisacrilamida 0,8 % (m/v)	850 µL
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	313 µL
Água bidestilada	3,8 mL
Persulfato de amónio 10 % (m/v)	5 µL
TEMED	50 µL

### 5.5. Coloração com “Coomassie Brilliant Blue”

Para se detetarem as proteínas nos géis de acrilamida foi utilizada, por vezes, a coloração com “Coomassie Brilliant Blue”. Desta forma, após a eletroforese, o gel de acrilamida foi corado com a solução corante de *Coomassie Brilliant Blue*, uma solução aquosa contendo *Coomassie Brilliant Blue* 0,25 % (m/v), metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v), durante aproximadamente 20 minutos, com agitação suave, à temperatura ambiente. O gel foi posteriormente lavado com uma solução descorante forte [metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) em água] e, de seguida, com uma solução descorante fraca [metanol 10 % (v/v), ácido acético 7 % (v/v) em água], até se visualizarem as bandas correspondentes às proteínas.

## 5.6. Coloração com nitrato de prata

Quando a quantidade de proteína aplicada era inferior à sensibilidade do *Coomassie Brillante Blue*, os géis foram corados com nitrato de prata usando o *kit Pierce Silver Stain* (Thermo Scientific, Paisley, UK), de acordo com o protocolo do fornecedor.

Assim, resumidamente, no final da eletroforese os géis foram lavados 2 vezes, durante 5 minutos, com água. O gel foi fixado com solução de fixação (30 % etanol, 10 % ácido acético) durante 15 minutos. Repetiu-se 1 vez a fixação. O gel foi lavado em 10% etanol durante 5 minutos. Repetiu-se a lavagem 1 vez. De seguida, o gel foi lavado 2 vezes, durante 5 minutos em água. O gel foi incubado em solução de sensibilização [1:500 (v/v) *Silver stain sensitizer*: água] durante 1 minuto e, de seguida, foi lavado 2 vezes, durante 1 minuto, com água. Incubou-se o gel durante 30 minutos em solução de coloração [1:50 (v/v) *Silver stain enhancer*: *Silver stain*]. O gel foi rapidamente (20 segundos) lavado com água e foi incubado com solução de desenvolvimento [1:50 (v/v) *Silver stain enhancer*: *Silver Stain Developer*] até as bandas aparecerem e até se atingir a relação desejada entre o sinal da proteína e o *background*. Neste ponto, a solução foi substituída por solução stop [5 % (v/v) ácido acético].

## 5.7. Eletrotransferência de proteínas para a membrana de celulose

As proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Schleicher & Schuell) por eletrotransferência *semi-dry*. Para tal, o gel de poliacrilamida foi equilibrado em tampão de transferência [Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % (v/v), SDS 0,0375 % (v/v), pH 9,2] durante 30 a 45 minutos à temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi hidratada em tampão de transferência durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente.

A transferência foi feita durante 75 minutos a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> (BioRad, Califórnia, EUA, *Trans-Blot 5D Semy-dry Transfer Cell*). No final, a eficiência da transferência foi analisada corando as membranas de nitrocelulose com uma solução de Ponceau S (para uma solução de 10 x concentrada: 2 g Ponceau S, 30 g ácido tricloroacético, 30 g de ácido sulfosalicílico, para um volume final de 100 mL). Após a coloração, as membranas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de solução corante, antes de se proceder para a imunodeteção.

## 5.8. Western-Blot

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas numa solução de leite magro em PBS a 5 % (v/v) durante 30 minutos ou, no caso das experiências com streptavidina, com uma solução de BSA em PBS 1x a 2,5 % (m/v) (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM), durante a noite. Após o bloqueio, as membranas foram coradas com os anticorpos primários ou com streptavidina conjugada com o enzima peroxidase de rábano (HRP) (diluídos em solução de bloqueio), com agitação durante 1 hora à temperatura ambiente (Quadro 6). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com uma solução de PBS-Tween-20 0,1 % (v/v) 3 vezes durante 10 minutos. No caso da incubação com a streptavidina, a membrana foi lavada apenas com PBS 1x.

Nas membranas incubadas com o anticorpo primário, após as lavagens, foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado conjugado com o HRP (diluído em solução de bloqueio), durante 1 hora à temperatura ambiente (Quadro 6). As membranas foram lavadas 3 vezes, durante 10 minutos, com PBS 1x.

A detecção foi feita com os reagentes de detecção ECL (Pierce). Após incubação das membranas durante 1 a 3 minutos, foram observadas por quimiluminescência no aparelho Image Quant Las 500 (GE Healthcare). Em alguns casos, as membranas foram expostas a chapas fotográficas (Kodak). Após o tempo de exposição apropriado, as chapas foram mergulhadas em reagente revelador (Kodak) até à visualização das bandas e, de seguida, lavadas brevemente em água e colocadas em reagente fixador (Kodak), durante 15 minutos.

**Quadro 6. Anticorpos e proteínas conjugadas utilizados em *western-blot***

Reagentes	Animal em que foi produzido	Diluição	Fabricante
<b>Anticorpos Primários</b>			
Anti-actina	Coelho	1:100	Sigma
Anti- $\gamma$ -tubulina (clone GTU-88)	Murganho	1:1000	Sigma
Anti-CEP170	Coelho	1:1000	Gentilmente cedido por Dr. Nigg (University of Basel, Basel, Suíça)
Anti-Flag M2	Murganho	1:1000	Sigma

<b>Anticorpos Secundários</b>			
Anti-murganho	Cabra	1:2000	Jackson ImmunoResearch
Anti-coelho	Cabra	1:2000	Zymed
<b>Conjugados com HRP</b>			
Streptavidina	—	1:10 000	Life Technologies

## 6. Análise dos resultados de espectrometria de massa

As células HEK 293 Flp-In/T-REx *flag*-BirA\*-TBCCD1, *flag*-BirA\*-TBCCD1 variante 2 e *flag*-BirA\* foram plaqueadas e induzidas com tetraciclina e biotina, como descrito em III.5.1. Os sedimentos foram também preparados como descrito em III.5.1. Foram preparados dois replicados independentes de cada linha celular. Os sedimentos foram guardados a – 80 °C até serem enviados para o laboratório do Dr. Raught, de espectrometria de massa, no Canadá, onde foram processados.

Os resultados obtidos foram analisados com recurso ao *software* SAINT (*Significance Analysis of INteractome*). Estes *software* compara os péptidos obtidos num conjunto de controlos, que incluem células não transfetadas e células que expressam a proteína *flag*-BirA\*, com as amostras, neste caso as células que expressam as proteínas *flag*-BirA\*-TBCCD1 e *flag*-BirA\*-TBCCD1 variante 2. Para cada possível interatuante é atribuído um grau de confiança, que varia de 0 a 1, e que é uma medida da probabilidade de serem verdadeiras proteínas interagentes (Choi et al., 2011).

## 7. Experiências com taxol

Com o objetivo de estudar o posicionamento do centróssoma relativamente ao núcleo, as células silenciadas para o gene *tbccd1* foram tratadas com 0,1 e 0,2 nM de Paclitaxel (taxol; Sigma, St. Louis, EUA) diluído em DMSO (Sigma, St. Louis, EUA), um agente estabilizador de microtúbulos, durante 24 horas a 37 °C. No final do período de incubação, as células foram fixadas para serem analisadas, posteriormente, por microscopia de imunofluorescência.



## **8. Experiências com Nocadazole**

Para estudar a alteração da localização da proteína CEP170 nas células hTERT-RPE-1 em células silenciadas para o gene *tbccd1* foi utilizado o agente despolimerizante nocadazole (Sigma, St. Louis, EUA). As células foram tratadas com 30  $\mu$ M do agente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), durante 15 e 30 minutos, em gelo. No final do período de incubação as células foram fixadas e analisadas por microscopia de imunofluorescência.

## **9. Experiências com citocalasina D**

Para se avaliar se a despolimerização dos filamentos de actina e se a sua polimerização era afetada pela presença da proteína TBCCD1, as células foram tratadas com o agente despolimerizador citocalasina D (Sigma, St. Louis, EUA), a uma concentração final de 50 e 100 nM em DMSO (Sigma, St. Louis, EUA), durante 10 minutos a 37 °C.

Para os ensaios de repolimerização dos filamentos de actina, ao fim de 10 minutos de incubação com o agente de despolimerização, mudou-se o meio de cultura das células para meio sem citocalasina D. As células foram fixadas com vários tempos de recuperação para depois serem analisadas por imunofluorescência.

## **10. Microscopia de Fluorescência**

Para a imunofluorescência, as células hTERT-RPE-1 e HEK 293TRex foram cultivadas aderentes a lamelas de vidro, em placas de 24 poços. Como as células HEK 293TRex não aderem bem ao vidro foi necessário fazer o revestimento das lamelas com poli-L-Lisina (Sigma, St. Louis, EUA) durante 20 minutos, com agitação, à temperatura ambiente.

O meio de cultura foi aspirado e as células aderentes às lamelas foram lavadas com PBS 1x. Quando os estudos envolviam a observação do centróssoma ou dos microtúbulos, as células foram fixadas e permeabilizadas com metanol (previamente colocado a -20 °C), durante 10 minutos a -20 °C. No caso das experiências feitas para análise da actina, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) em PBS 1x a 3,7 % (m/v), durante 10 minutos à temperatura ambiente e, de seguida, foram

permeabilizadas com Triton X-100 0,1 % (v/v) em PBS 1x, durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Independentemente do método utilizado na fixação e permeabilização, as células foram posteriormente lavadas 3 vezes durante 5 minutos com 500 µL de PBS 1x. Após as lavagens, as células foram guardadas no frigorífico a 4 °C.

O bloqueio das células foi feito com BSA (Calbiochem) 3 % (m/v) em PBS 1x durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, fez-se a incubação com 30 µL de anticorpo primário (Quadro 7) ou com o corante faloidina-rodamina, diluídos em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS 1x durante 5 minutos. Após a lavagem, procedeu-se à incubação com 30 µL de anticorpo secundário (Quadro 7), diluídos em solução de bloqueio. Após a incubação, foram repetidas as lavagens 3 vezes durante 5 minutos com PBS 1x. Por fim, foi feita a marcação do DNA com DAPI (1 µg/mL) em água, durante 3 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas 3 vezes durante 5 minutos com PBS 1x.

As lamelas foram montadas numa lâmina de vidro sobre uma gota de meio de montagem Vectashield H-100 (Vector Laboratories, Inc).

Após o processamento das células, as lamelas foram observadas num microscópio de fluorescência *Olympus BX14* e as fotografias foram obtidas com recurso a uma câmara fotográfica *Olympus Digital Camera Camedia C-4040 ZOOM*, através do programa *Cam2Com* (sabsik.com). O processamento das imagens foi feito com o *software* ImageJ Fiji (NIH, USA).

**Quadro 7. Anticorpos e corantes utilizados em microscopia de fluorescência**

Reagentes	Animal em que foi produzido	Diluição	Fabricante
<b>Anticorpos primários</b>			
Anti- $\gamma$ -tubulina (clone GTU-88)	Murganho	1:200	Sigma
Anti-golgina 97	Murganho	1:200	Molecular Probes
Anti-pericentrina	Coelho	1:200	Abcam
Anti-Flag M2	Murganho	1:200	Sigma
Anti- $\alpha$ -tubulina (clone DM1A)	Murganho	1:100	Sigma

Anti-tubulina acetilada (clone 6-11B-1)	Murganho	1:100	Abcam
Anti-tubulina poliglutamilada	Murganho	1:150	Gentilmente cedido por Dr. Janke (Institute Curie, Orsay, França)
Anti-CEP170	Coelho	1:100	Gentilmente cedido por Dr. Nigg (University of Bazel, Bazel, Suíça)

#### Anticorpos secundários

Anti-murganho Alexa 488	Cabra	1:500	Molecular Probes
Anti-murganho Alexa 594	Cabra	1:500	Molecular Probes
Anti-Coelho Alexa 594	Cabra	1:500	Thermo Scientific
Anti-Coelho Alexa 488	Cabra	1:500	Thermo Scientific
Anti-Coelho Cy05 Alexa	Cabra	1:500	Thermo Scientific

#### Corantes

Faloidina – rodamina	—	1:500	Thermo Scientific
Streptavidina conjugada com Alexa 594	—	1: 500	Life Technologies

## 11. Análise estatística

Para a análise estatística e validação dos resultados experimentais, a comparação de resultados entre dois grupos distintos foi realizada através do teste *t* de *Student* bilateral, assumindo variâncias diferentes entre os grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos sempre que se obteve um valor de  $p < 0,05$ .

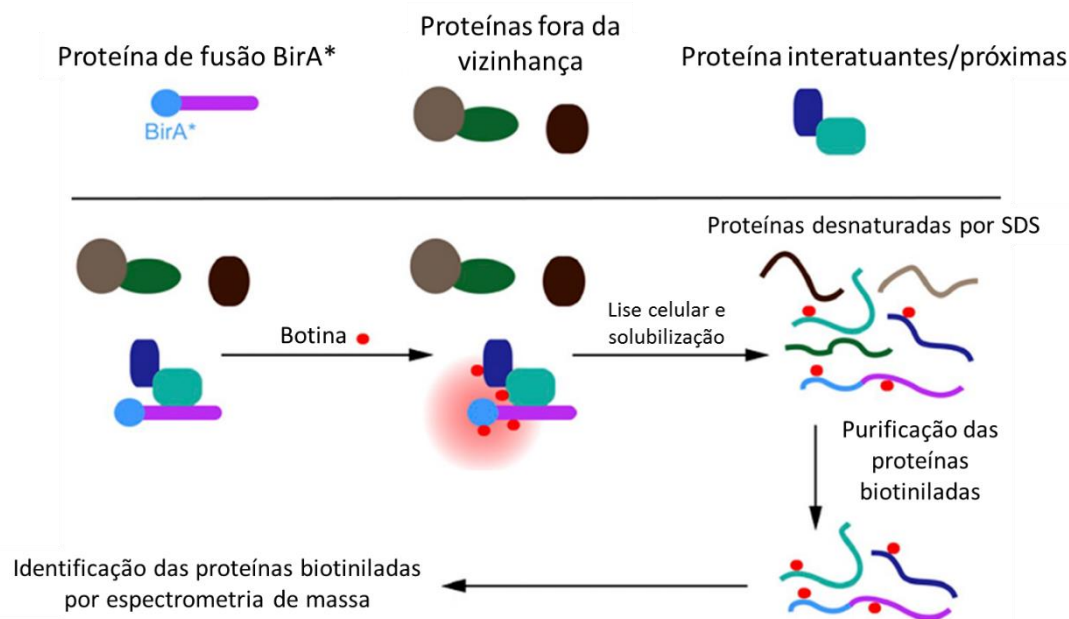
Quando se comparou duas condições com um grupo controle, como por exemplo, nas experiências em células depletadas de TBCCD1 expostas a diferentes concentrações de taxol, foi utilizado o teste *one-way* ANOVA com *Tukey's post-hoc*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando se obteve um valor de  $p < 0,05$ .

## V. RESULTADOS

### 1. Estudo das proteínas TBCCD1 e TBCCD1 variante 2: proteínas interatuantes

De modo a perceber quais as funções das proteínas TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 (obtida por *splicing* alternativo) pretendeu-se identificar quais as proteínas com que interatuam. Para estudar o interatoma destas duas proteínas optou-se pelo método de BioID, que se baseia na identificação de proteínas vizinhas e potencialmente interactuantes recorrendo-se ao uso de um ligase de biotina com actividade enzimática promíscua (BirA) de *Escherichia coli* em fusão com a proteína de interesse. O BirA catalisa a biotinilação do carboxilase acetil-coA e atua como repressor da transcrição do operão da biotina. A biotinilação ocorre em dois passos: inicialmente, a biotina reage com o ATP, formando-se biotinil-5'-AMP (bioAMP) que se liga ao centro activo do BirA e reage com um resíduo específico de lisina da proteína-alvo, presente na sequência de reconhecimento do BirA. Como o BirA é muito específico foi necessário mutar o gene que condifica para este enzima, de modo a torná-lo menos seletivo no reconhecimento dos seus alvos (Roux et al., 2012). Para tal, foram desenhados vários mutantes e um deles, em que o resíduo de arginina da posição 118 da proteína foi substituído por um de glicina (R118G, designado por BirA\*), apresentou uma afinidade para o bioAMP cerca de duas ordens de grandeza inferior à proteína *wt*. Depois de formado, o bioAMP reage rapidamente com aminas primárias, biotinilando as proteínas de modo inespecífico. Foi ainda observado que o BirA\* catalisa a biotinilação das proteínas-alvo de modo dependente da distância (Choi-Rhee et al., 2004; Cronan, 2005; Roux et al., 2012).

Logo que se possua o gene que codifica para a proteína de interesse em fusão com o gene que codifica para o BirA\*, o plasmídeo recombinante é inserido nas células de mamífero onde o BirA\*, depois de traduzido, catalisa a biotinilação das proteínas que interactuam com a proteína de interesse. As proteínas biotiniladas podem ser, posteriormente, purificadas e identificadas com recurso, por exemplo, à espectrometria de massa (ver Fig. 15). Como esta modificação pós-traducional não é muito comum nas células, é relativamente fácil identificar quais as proteínas que realmente interatuam com a proteína de interesse.



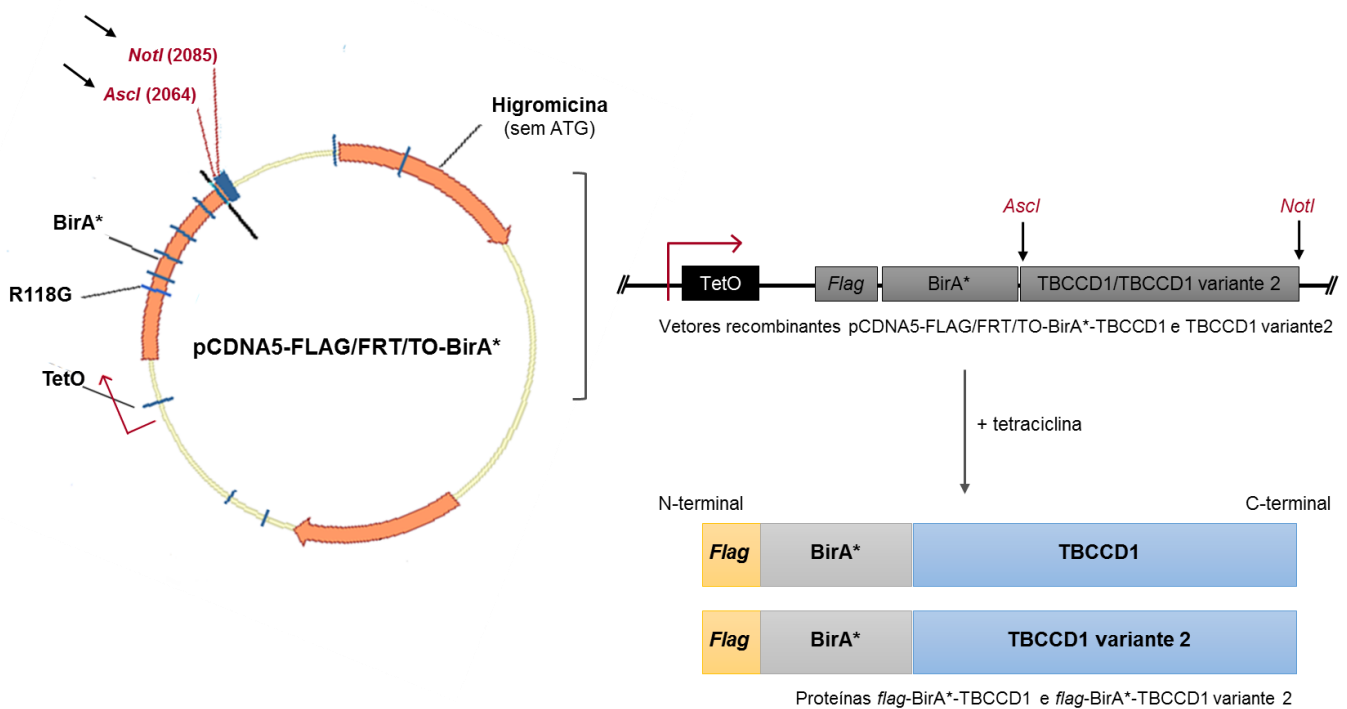
**Figura 15. Modelo para a aplicação do método de Bioid** (Adaptado de Roux et al., 2012).

A expressão nas células de uma proteína de fusão com o ligase de biotina com atividade enzimática promíscua (BirA\*) leva à biotilação seletiva das proteínas que estão na sua proximidade e, portanto, com quem a proteína de interesse interage. Após a lise celular e a desnaturação das proteínas, estas são purificadas por cromatografia de afinidade para a biotina. As proteínas candidatas podem ser analisadas por espectrometria de massa e/ou por imunoprecipitação.

Neste trabalho pretendeu-se estudar as proteínas interatuantes da proteína centrossomal TBCCD1 e a variante 2, através deste método, como referido anteriormente. Para tal, foi necessário amplificar e clonar a sequência codificante da TBCCD1 e da variante 2 num vetor de clonagem (consultar III.2). Escolheu-se o vetor pCDNA5 FRT/TO-BirA\*, pois permite clonar os genes de interesse sob o controlo de um promotor regulado por tetraciclina e, assim, tornar a expressão das proteínas indutível (consultar IX.1). Este vetor possui ainda um local FRT (*Flp Recombinase Target*), que permite a recombinação das sequências de interesse com o local FRT inserido artificialmente no genoma das células da linha humana HEK 293T. O referido vetor possui ainda uma sequência que confere resistência ao antibiótico higromicina e que permite selecionar as células após a transfeção (consultar III.3.1). Assim, foi possível introduzir as sequências de interesse no genoma das células, sob controlo de um promotor indutível.

Assim sendo, as sequências codificantes das proteínas TBCCD1 e variante 2 foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor pCDNA5 FRT/TO-BirA\* de modo a que

os respectivos ATG ficassem na mesma grelha de leitura que os polipéptidos *flag* e o da proteína BirA\*. Assim, as 2 proteínas foram clonadas com recurso à introdução nos *primers* utilizados nas reações de PCR dos locais de conhecimento dos enzimas de restrição *Ascl* e *NotI*, de forma a que a *flag* e o BirA\* ficassem na N-terminal da proteína (Figura 16; consultar III.2.4). Após ter sido obtido este vetor recombinante, confirmou-se por sequenciação se a sequência clonada não tinha nenhuma mutação introduzida durante a amplificação dos fragmentos e se as zonas de ligação das sequências ao vetor estavam corretas (consultar III.2.8).



**Figura 16. Esquema da clonagem das sequências TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 no vetor pCDNA5-Flag/FRT/TO-BirA\* e das proteínas resultantes da sua expressão.**

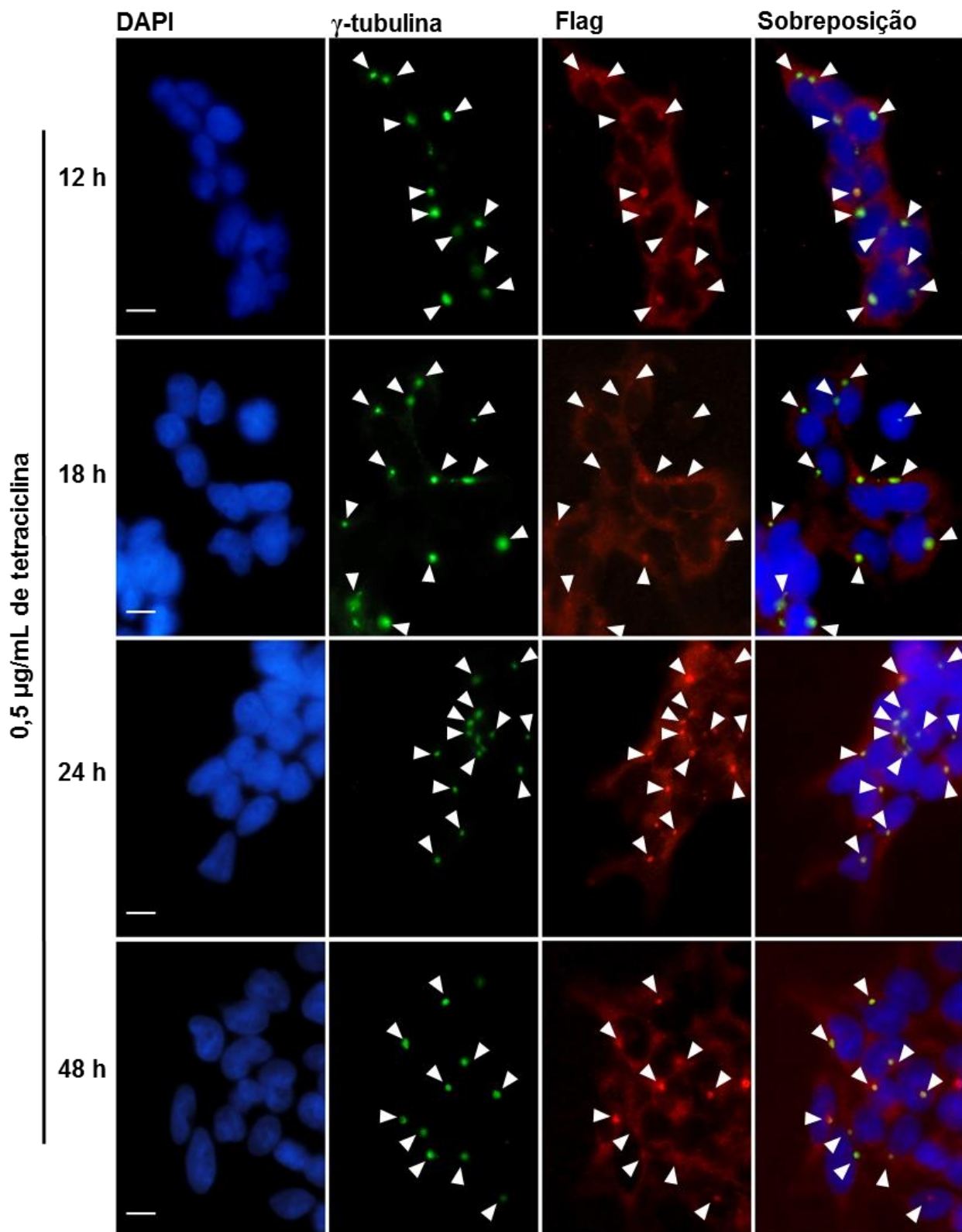
Representação do vetor pCDNA5-Flag/FRT/TO-BirA\* na sua forma circular e linear, com evidência para o promotor indutível com tetraciclina (TetO) e o início da transcrição (seta a vermelho), a mutação na sequência do enzima BirA\* (R118G) e a localização deste enzima no plasmídeo (BirA\*). As sequências codificantes da TBCCD1 e da variante 2 foram clonadas com os enzimas de restrição *Ascl* e *NotI* (a vermelho), nos locais indicados com setas a preto, e de modo a que o ATG ficasse na grelha de leitura da *flag* e do BirA\*. Este vetor possui ainda uma sequência que confere resistência à higromicina. As sequências codificantes para a TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 (a azul) foram clonadas de modo a que a *flag* (a amarelo) e o BirA\* (a cinzento) ficassem na extremidade N-terminal da proteína.

Este vetor foi então utilizado para transfetar células HEK239 Flp-In TRex que já possuíam no seu genoma um local FRT, o qual permite a recombinação com o plasmídeo pcDNA5 FRT/TO-BirA\*, introduzindo a sequência *flag*-BirA\*-TBCCD1 e *flag*-BirA\* TBCCD1 variante 2 no genoma das células (Figura 14 e consultar III.3.1). Para que se promovesse a recombinação entre os dois locais FRT, as células foram co-transfetadas com um plasmídeo (poG44) com a sequência codificante do flipase, um enzima que catalisa a recombinação. Após transfeção as células recombinantes foram selecionadas com a resistência ao antibiótico higromicina até se obter a linha celular (consultar III.4.1). Neste trabalho foram criadas 3 linhas celulares: uma linha controle, em que as células foram transfetadas com um vetor recombinante contendo apenas a sequência da proteína *flag*-BirA\*, e de modo semelhante, duas linhas distintas que foram transfetadas com vetores recombinantes contendo as sequências codificantes para as proteínas *flag*-BirA\*-TBCCD1 e *flag*-BirA\*-TBCCD1 variante 2. Após a obtenção das 3 linhas celulares, foi necessário confirmar a integridade do sistema. Para tal, foi necessário observar se as células expressavam as proteínas em estudo de modo indutível e se estas tinham uma localização correta nas células. Para este fim, recorreu-se quer à técnica de *western-blot*, quer à de microscopia de imunofluorescência (consultar III.5.8 e III.10).

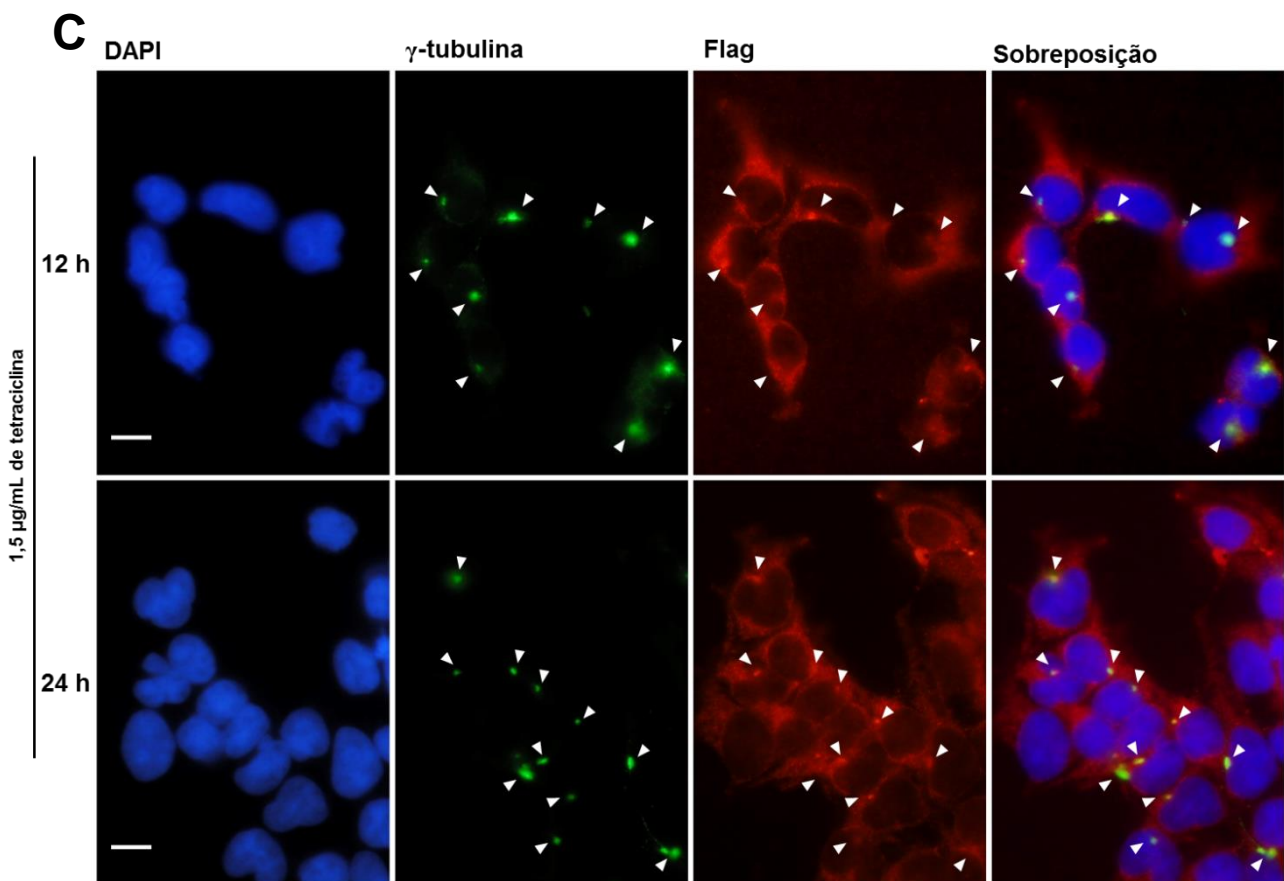
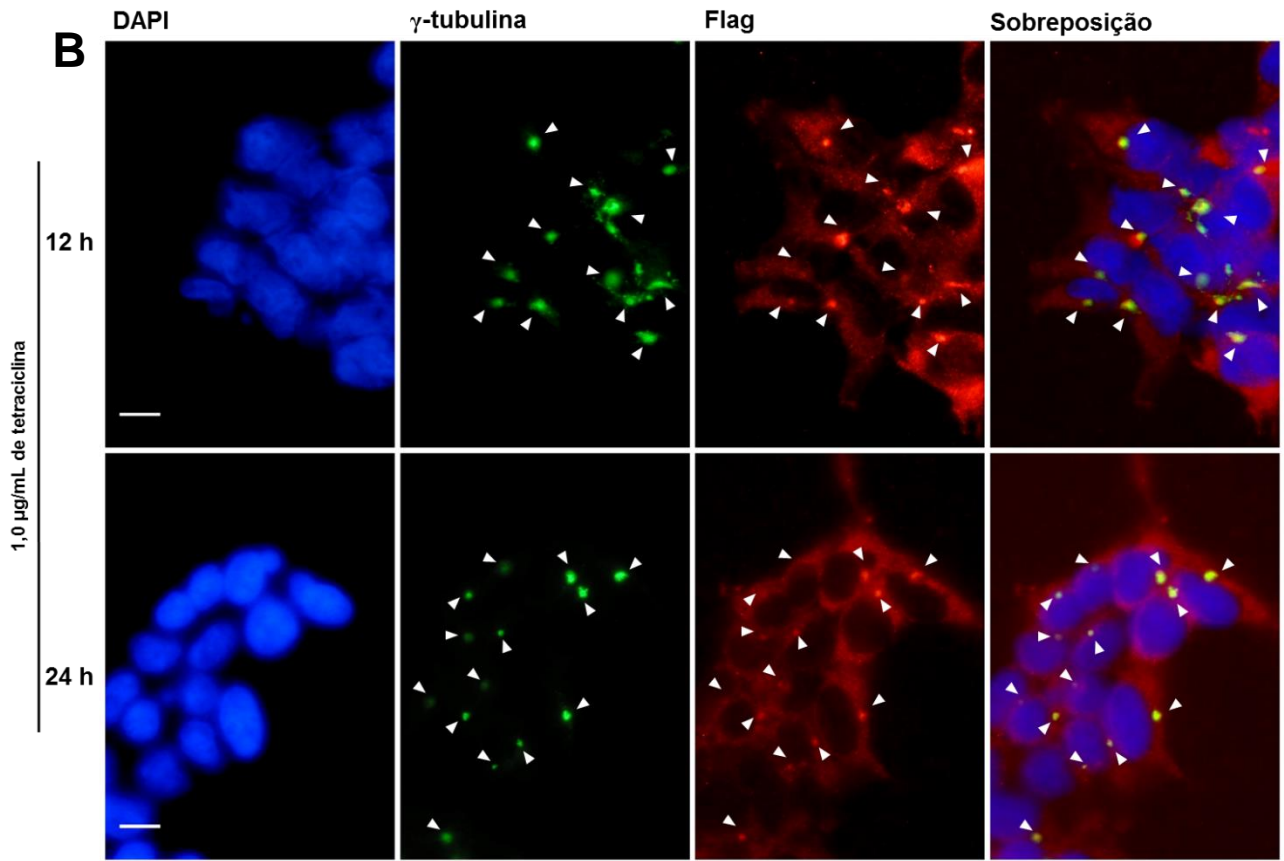
De modo a visualizar a expressão das proteínas associadas ao BirA\* por microscopia de imunofluorescência foi necessário otimizar as condições de indução para não se ter níveis muito elevados de proteína, que poderiam levar a erros quanto à sua localização. Assim, procedeu-se à indução da proteína *flag*-BirA\*-TBCCD1 com 0,5; 1 e 1,5 µg/mL de tetraciclina (consultar III.3.1), durante vários períodos de tempo: 12, 18, 24 e 48 horas (Figura 17). Como se pode observar na Figura 17, como esperado, a expressão da proteína *flag*-BirA\*-TBCCD1 foi induzida pela tetraciclina administrada, sendo a sua quantidade nas células, avaliada pela intensidade do seu sinal de fluorescência, tanto maior quanto maior a dose utilizada de tetraciclina. Observou-se também que esta proteína se localiza no centróssoma e tem igualmente uma localização citoplasmática, o que está de acordo com o que está descrito para a proteína TBCCD1 endógena detetada utilizando um anticorpo policlonal específico (Gonçalves, 2010). Estas observações indicam que o sistema está funcional na linha celular criada e a localização da proteína de fusão não é alterada pela sua sobreexpressão em fusão com ao BirA\* e o *flag*. No entanto, observou-se que elevados níveis desta proteína mascararam a sua presença no centróssoma, pois causam uma marcação muito forte do citoplasma das células que, por vezes, não permite distinguir claramente o centróssoma (Figura 17). Concluiu-se, assim que a melhor condição experimental de indução com tetraciclina da proteína *flag*-BirA\*-TBCCD1 nestas células, para o uso da

técnica de microscopia de imunofluorescência, seria uma concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina e um tempo de indução de 18 horas (Figura 17).

**A**



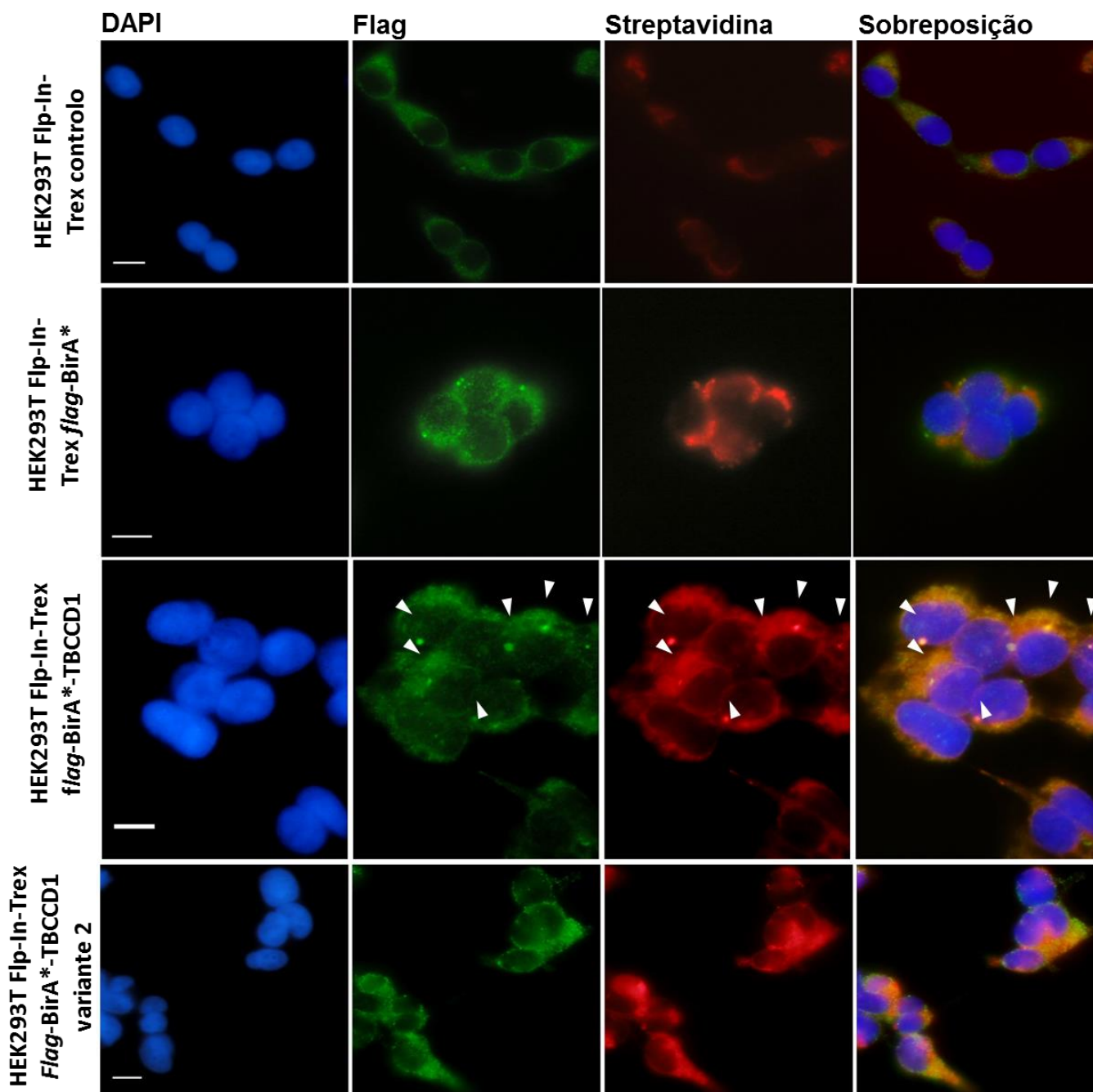




**Figura 17. Estudo para a otimização da indução da proteína *Flag-BirA\*-TBCCD1* pela tetraciclina e a sua localização celular.** A – Imagens representativas das células HEK293 Flp/In TRex *Flag-BirA\*-TBCCD1* induzidas com 0,5 µg/mL de tetraciclina durante 12 h, 18 h, 24 h e 48 h. B – Imagens representativas das células HEK293 Flp/In TRex *Flag-BirA\*-TBCCD1* induzidas com 1,0 µg/mL de tetraciclina durante 12 h e 24 h. C – Imagens representativas das células HEK293 Flp/In TRex *Flag-BirA\*-TBCCD1* induzidas com 1,5 µg/mL de tetraciclina durante 12 h e 24 h. As células foram em seguida processadas para microscopia de fluorescência e imunomarcadas com o anticorpo contra a  $\gamma$ -tubulina e um anticorpo contra a *flag*. O DNA foi marcado com DAPI. As cabeças de setas indicam o centrôssoma. As barras de escala correspondem a 10 µm.

Desta forma, decidiu-se realizar a indução da expressão das proteínas *flag-BirA\**, *flag-BirA\*-TBCCD1* e *flag-BirA\*-TBCCD1-variante 2* durante 18 h com uma dose de 0,5 µg/mL de tetraciclina, quando se tratava de uma preparação para análise em microscopia de imunofluorescência. Como se pode observar da Figura 18, as proteínas *flag-BirA\** e a *flag-BirA\*-TBCCD1-variante2* têm uma localização citoplasmática, tal como esperado (Câmara, 2013; Peneda, resultados não publicados). Nestas condições, a proteína *flag-BirA\*-TBCCD1*, como referido anteriormente, tem uma localização centrôssomal e uma *pool* citoplasmática (Figura 17 e 18).

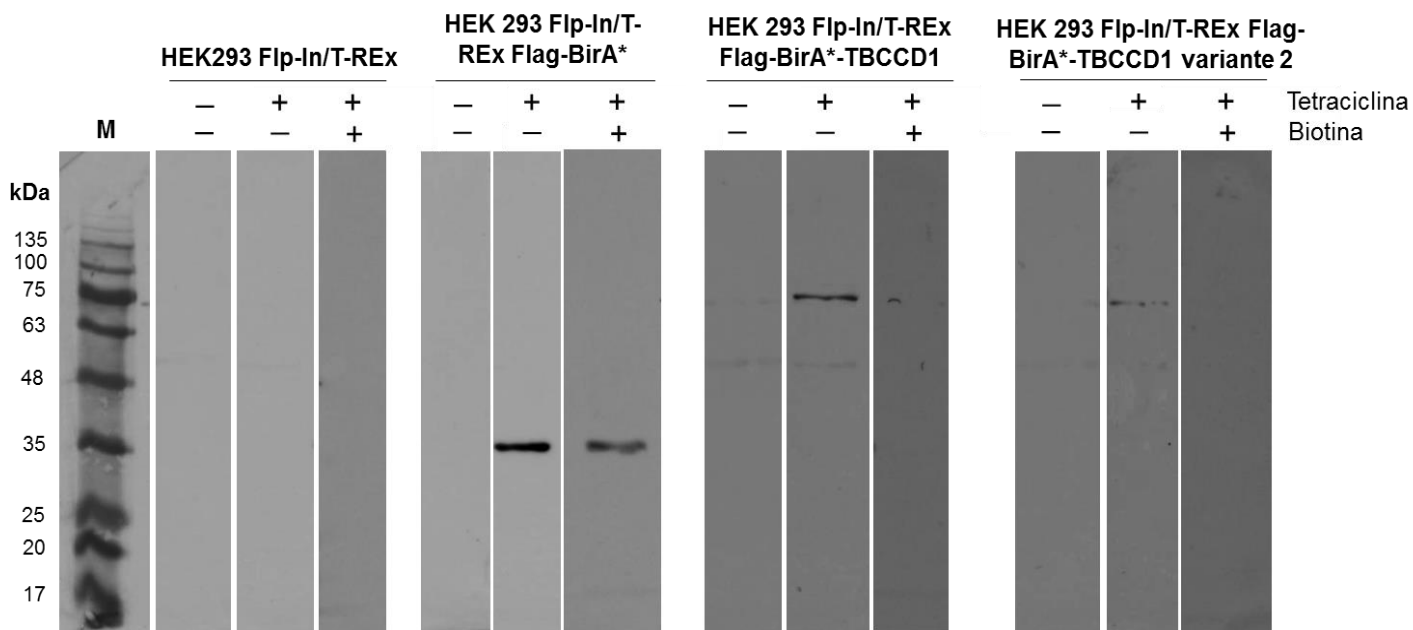
De modo a garantir que estava a ocorrer biotinylação, a expressão das proteínas de interesse foi induzida e as células foram marcadas com streptavidina conjugada com um fluorocromo que emite na gama do vermelho (*Alexa Fluor dye 594*). Como se observa na Figura 18, a região em que se observam proteínas biotiniladas (a vermelho) corresponde essencialmente à região da célula onde se deteta a marcação utilizando o anticorpo contra a *flag* (a verde). Este resultado permite mais uma vez observar que o sistema é funcional e que a biotinylação ocorre e é seletiva.



**Figura 18. Indução da expressão das proteínas *Flag-BirA\**, *Flag-BirA\** TBCCD1 e *Flag-BirA\** TBCCD1 variante 2 pela tetraciclina.** Imagens representativas das células HEK293 Flp/In TRex controle, *Flag-BirA\**, *Flag-BirA\**-TBCCD1 e *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2, induzidas com 0,5 µg/mL de tetraciclina durante 18 h. As células foram em seguida processadas para microscopia de fluorescência e imunomarcadas com o anticorpo contra a *flag* e com a proteína streptavidina conjugada com um fluorocromo que emite no vermelho. O DNA foi marcado com DAPI. As cabeças de setas indicam centrosoma. As barras de escala correspondem a 10 µm.

Os resultados obtidos por microscopia de imunofluorescência foram paralelamente comprovados por *western-blot*. Para tal, foram preparados extratos proteicos totais de células HEK293T Flp-In-TRex, *flag-BirA\**, *flag-BirA\*-TBCCD1* e *flag-BirA\*-TBCCD1* variante 2, induzidas com 1 µg/mL de tetraciclina durante 24 horas (consultar III.5.1) que foram analisados por SDS-PAGE seguido de *western-blot*. Apesar de se ter otimizado a indução com tetraciclina para microscopia de fluorescência, para preparação dos extratos proteicos utilizou-se sempre uma dose maior de tetraciclina (1,0 µg/mL) e durante 24 horas para permitir que as células produzissem maiores níveis das proteínas e, por outro lado, como a TBCCD1 se localiza no corpo mediano na fase final da mitose, é importante que ocorram divisões celulares após a indução.

Como controlo negativo foram utilizados os extractos totais obtidos a partir das células 293T Flp/In TRex. Foi possível observar que a adição de tetraciclina induz a expressão das proteínas *flag-BirA\**, *flag-BirA\*-TBCCD1-BirA\** e *flag-BirA\*-TBCCD1* variante 2, pois podem-se observar bandas com massas moleculares correspondentes a estas proteínas nas faixas em que se adicionou tetraciclina (Figura 19). Observou-se ainda que estas proteínas não são detetadas nas faixas correspondentes às células não induzidas, como esperado. Este resultado confirma que este sistema é indutível, havendo indução da expressão das proteínas de interesse apenas na presença de tetraciclina. Por outro lado, não se observaram bandas nas faixas correspondentes às células tratadas com tetraciclina e com biotina, ao contrário do que seria esperado. Este resultado pode ser explicado por o BirA\* ter capacidade de catalisar a biotilação de um dos resíduos lisina (DYKDDDDK) do *flag*, o que impedirá o seu reconhecimento pelo anticorpo anti-*flag* quando ligado à proteína TBCCD1 e à TBCCD1 variante 2 mas não quando apenas ligado ao BirA\*. Como as proteínas em fusão com a TBCCD1 e com a TBCCD1 variante 2 são maiores, a sua conformação pode ser diferente da proteína *flag-BirA\** e, por isso, nesse caso, o BirA\* pode ficar próximo dos resíduos de lisina do *flag*, biotinilando-os.



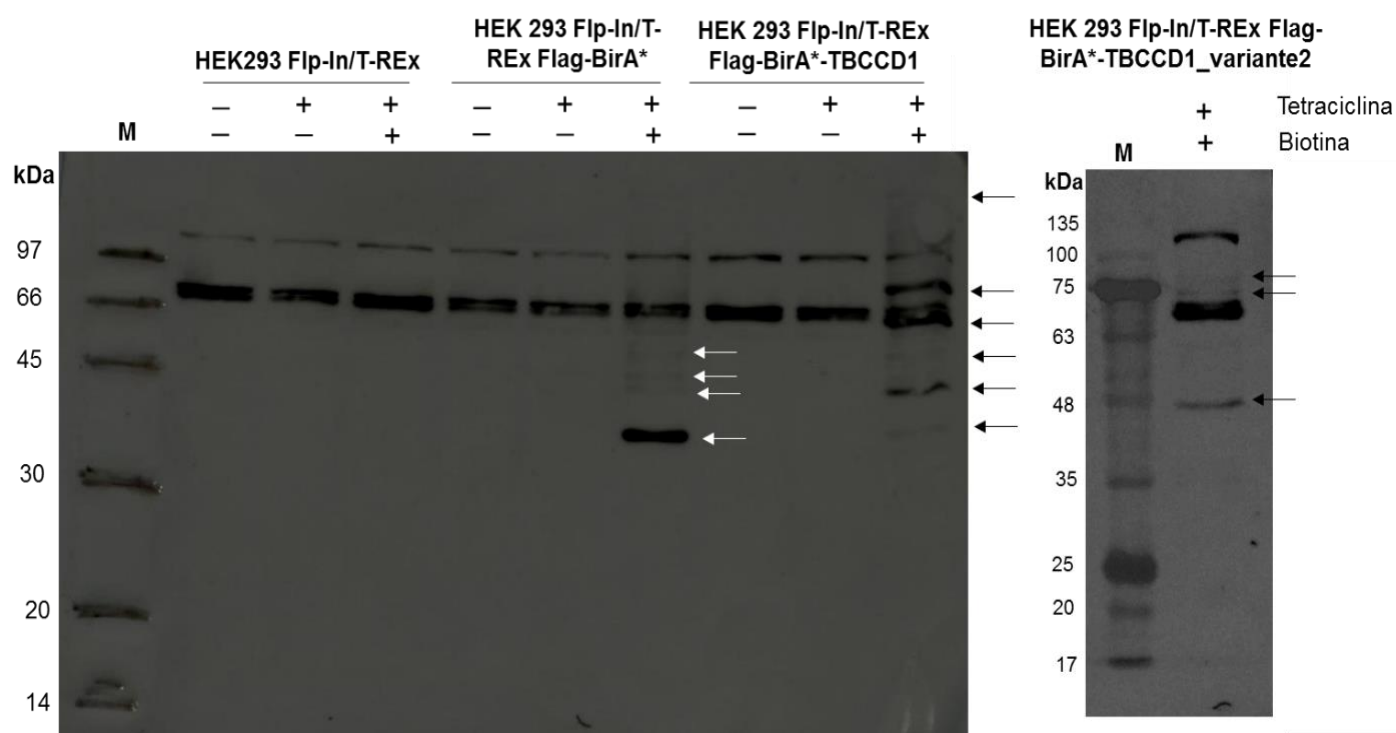
**Figura 19. Análise da indução das proteínas com tetraciclina por western-blot.**

Foram preparados extratos proteicos totais das células HEK293 FIp-In/T-REx, *flag*-BirA\*, *flag*-BirA\*-TBCCD1 e *flag*-BirA\*-TBCCD1 variante 2 ( $6 \times 10^5$  células, aproximadamente) não induzidas, induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL durante 24 h e induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL e biotina 50  $\mu$ M, durante 24 h. Aplicou-se 20  $\mu$ L do extrato proteico num gel SDS-PAGE de 10 % e analisou-se por *western-blot*. Utilizou-se o anticorpo anti-*flag* M2 para mostrar que a expressão das proteínas de interesse era induzida pela tetraciclina. M – marcador de massa molecular. Os resultados foram obtidos em 2 experiências independentes, apenas se mostrando os de uma das experiências.

Do mesmo modo prepararam-se extratos proteicos totais das células HEK293T FIp-In-TREx, *flag*-BirA\*, *flag*-BirA\*-TBCCD1 e *flag*-BirA\*-TBCCD1 variante 2. As membranas de *western-blot* foram incubadas com a proteína streptavidina conjugada com HRP, de modo a visualizar o padrão de proteínas biotiniladas nas várias amostras (Figura 20).

Nas faixas correspondentes às células em que não se adicionou tetraciclina nem biotina e em que só se adicionou biotina observam-se apenas 2 bandas inespecíficas, que estão presentes em todas as amostras. Nas faixas correspondentes às células induzidas com tetraciclina e biotina, observa-se que um padrão de proteínas biotiniladas nas faixas correspondentes às células 293T *flag*-BirA\*-TBCCD1 e 293T *flag*-BirA\*-TBCCD1-variante 2 distinto do encontrado nos extractos proteicos das células controlo

HEK 293 Flp-In/T-Rex *Flag-BirA\** e HEK 293 Flp-In/T-Rex (em que apenas se observam as 2 bandas inespecíficas) (Figura 20).



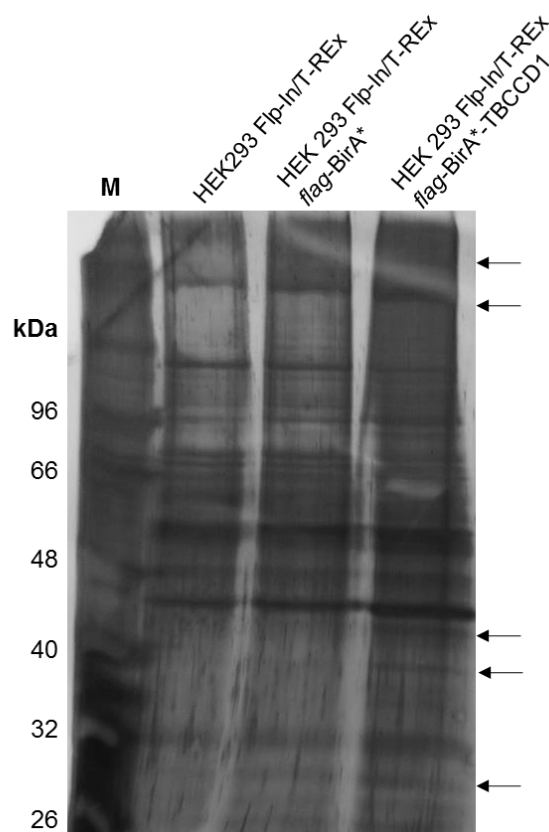
**Figura 20. Análise do padrão de proteínas biotiniladas obtido por *western-blot*.**

Foram preparados extratos proteicos totais das células HEK293 Flp-In/T-REx, *flag-BirA\**, *flag-BirA\**-TBCCD1 e *flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 ( $6 \times 10^5$  células, aproximadamente) não induzidas, induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL, durante 24 h, e induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL e biotina 50  $\mu$ M, durante 24 h. Aplicou-se 10  $\mu$ L do extrato proteico num gel SDS-PAGE de 10 % e analisou-se por *western-blot*. Utilizou-se streptavidina associada ao HRP para detetar as proteínas biotiniladas nos extractos proteicos analisados. M- marcador de massa molecular. As setas indicam o padrão de bandas diferentes entre as bandas correspondentes às células HEK293 Flp-In/T-REx *flag-BirA\**, *flag-BirA\**-TBCCD1 e *flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 induzidas com tetraciclina e com biotina. Os resultados foram obtidos em 2 experiências independentes, apenas se mostrando os de uma das experiências.

De modo a poder-se determinar com maior rigor qual o padrão de proteínas biotiniladas em cada amostra proteica, depois de se ter induzido as células HEK293T Flp-In-TREx, *flag-BirA\**, *flag-BirA\**-TBCCD1 e *flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 com tetraciclina e biotina durante 24 h e após a extração proteica, procedeu-se à imunoprecipitação com streptavidina ligada às Dynabeads M-280 (consultar III.5.3). A streptavidina liga-se com elevada afinidade às proteínas biotiniladas e, por isso, permite

separá-las das restantes proteínas celulares, o que torna as diferenças entre os padrões de bandas das várias amostras mais evidentes.

Os resultados da imunoprecipitação estão apresentados na Figura 21. Observaram-se várias bandas na amostra proteica obtida a partir das células *flag*-BirA\*-TBCCD1, que estão ausentes nos extractos obtidos das células controlo HEK293T Flp-In-TREx e *flag*-BirA\*, e que correspondem a bons candidatos a serem proteínas interagentes da proteína TBCCD1 (Figura 21; setas a preto).

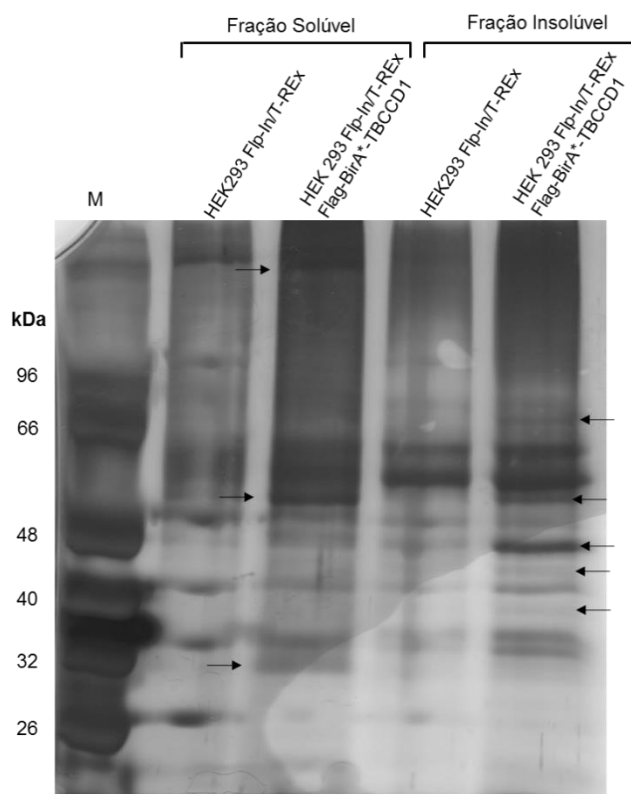


**Figura 21. Análise por SDS-PAGE do padrão de proteínas biotinizadas obtidas por imunoprecipitação com streptavidina, seguida de uma coloração com nitrato de prata.** Foram preparados extratos proteicos totais das células HEK293 Flp-In/T-REx, *flag*-BirA\* e *flag*-BirA\*-TBCCD1 induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL e biotina 50  $\mu$ M, durante 24 h. As proteínas foram incubadas precipitadas com streptavidina ligada às Dynabeads M-280, durante a noite. Depois de várias lavagens, as proteínas foram eluídas a partir da streptavidina ligada às *beads* e analisadas num gel SDS-PAGE 10 %. De seguida, o gel foi corado com nitrato de prata. As setas indicam as bandas correspondentes a proteínas observadas apenas na amostra obtida a partir das células HEK 293 Flp-In/T-REx *flag*-BirA\*-TBCCD1 e ausentes nas faixas correspondentes às células controlo. M- marcador de massa molecular.

Um dos problemas mais comuns na preparação de extratos proteicos totais é o fato do centróssoma ficar associado ao núcleo na fração insolúvel, o que dificulta a análise das proteínas centróssomais e nucleares em estado nativo pois os agentes utilizados na solubilização da fração insolúvel causam a desnaturação das proteínas. Como a TBCCD1 é uma proteína centróssomal é provável que alguns dos seus interatuantes se localizem também no centróssoma. Por este motivo, pensou-se que a comparação dos padrões de bandas das proteínas biotinizadas nas células HEK 293 Flp-In/T-REx *flag-BirA\**-TBCCD1 relativamente ao das células controlo (HEK293 Flp-In/T-Rex e *flag-BirA\**) seria facilitado se se procedesse a um fracionamento simples dos extractos proteicos onde se separasse a fracção solúvel da insolúvel. Para este fim, depois de as células serem lisadas, procedeu-se a uma centrifugação em que se separou o sobrenadante constituído pelas proteínas solúveis, e o sedimento, formado pelo centróssoma, núcleo, membranas, entre outros. O sedimento foi tratado como descrito em III.5.1, tendo-se adicionado nucleases, seguido de sonicação. De seguida, procedeu-se à imunoprecipitação com a streptavidina ligada às Dynabeads M-280 das proteínas da frações solúvel e insolúvel separadamente.

Como se observa na Figura 22, este procedimento permitiu uma análise mais evidente das diferenças entre o padrão de proteínas biotinizadas nas células que expressam a proteína *flag-BirA\**-TBCCD1 relativamente ao controlo (células HEK 293T Flp/In T-REx). Ou seja, o fracionamento realizado permitiu obter extractos proteicos mais enriquecidos nas proteínas candidatas a interagirem com a TBCCD1. Esta análise foi feita apenas para a proteína TBCCD1, pois só esta é centróssomal e, por isso, só neste caso existe o problema de as proteínas interatuantes ficarem na fração insolúvel e serem de difícil análise.





**Figura 22. Análise por SDS-PAGE do padrão de proteínas solúveis e insolúveis biotiniladas por imunoprecipitação com streptavidina, seguida de uma coloração com nitrato de prata.** Foram preparados extratos proteicos das células HEK293 Flp-In/T-REx e *Flag-BirA\**-TBCCD1 induzidas com tetraciclina a 1 mg/mL e biotina 50 µM, durante 24 h. Após a lise das células, o extrato foi centrifugado e foram separadas as frações solúveis e insolúveis. A fração solúvel foi incubada com tampão RIPA e nucleases e, posteriormente, foi sujeita a sonicação. De seguida, as proteínas das duas frações foram incubadas separadamente com a streptavidina ligada às Dynabeads M280, durante a noite. Depois de várias lavagens, as proteínas foram eluídas a partir da streptavidina ligada às *beads* e analisadas num gel SDS-PAGE 10 %. De seguida, o gel foi corado com nitrato de prata. M – marcador de massa molecular. As setas indicam as bandas correspondentes a proteínas observadas apenas nas amostras das frações solúveis e insolúveis obtida a partir das células HEK 293 Flp-In/T-REx *flag-BirA\**-TBCCD1 e ausentes nas faixas correspondentes às células controlo HEK 293 Flp-In/T-REx *flag-BirA\**.

Desta forma, foi confirmado que as linhas celulares estabelecidas eram indutíveis e que o sistema do BirA\* estava a funcionar, como esperado. Após terem sido realizados os testes de confirmação, foram cultivadas em larga escala (aproximadamente  $1,2 \times 10^8$  células) e em duplicado, células HEK293 Flp-In/T-REx *flag-BirA\**, *flag-BirA\**-TBCCD1 e *flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2. A expressão das proteínas *Flag-BirA\**, *Flag-BirA\**-TBCCD1 e *Flag-BirA\**-TBCCD1 variante 2 foi induzida com

tetraciclina e biotina, como descrito anteriormente, e foram preparados os sedimentos das células. Estes sedimentos foram congelados a -80 °C e posteriormente enviados para o laboratório do Dr. Ryan Raught, na *Toronto Medical Discovery Tower*, no Canadá, para serem processados e as proteínas analisadas por espectrometria de massa.

As proteínas foram extraídas e imunoprecipitadas com streptavidina pelo Dr Étienne Coyaud e, posteriormente, processadas por espectrometria de massa. Do perfil de péptidos obtidos foi identificado um elevado número de proteínas, que se encontram listadas no *Raw Material*, que não foi disponibilizado em anexo devido ao elevado número de proteínas identificadas, mas que poderá ser disponibilizado posteriormente. Das proteínas encontradas pela análise de espectrometria de massa, as proteínas interatuantes mais prováveis foram selecionadas utilizando o *software* SAINT (*Significance Analysis of INTERactome*). Este *software* compara as amostras com o perfil de péptidos obtido para um conjunto de controlos de células HEK 293T não transfectadas, de modo a ter em conta a biotinação endógena que ocorre nas células em condições fisiológicas, e de células que expressam a proteína *flag-BirA\**, de modo a eliminar a biotinação inespecífica. Os resultados foram obtidos a partir de 2 replicados biológicos e dois replicados técnicos (ou seja, cada replicado foi analisado duas vezes). O *software* SAINT atribui um grau de confiança que varia entre 0 e 1 (valor SAINT) para todas as proteínas encontradas na análise, sendo selecionadas as que apresentam um grau de confiança superior a 0,8 (consultar IX.2) (Choi et al., 2011). As possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1 e da variante 2 encontram-se listadas nos Quadro 8 e Quadro 9, respetivamente.

**Quadro 8. Possíveis proteínas interatuantes da TBCCD1**

<b>Símbolo</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>SAINT</b>
<b>AKAP11</b>	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 11</i>	<b>1,00</b>
<b>ANKRD28</b>	<i>ankyrin repeat domain 28</i>	<b>1,00</b>
<b>ANKRD52</b>	<i>ankyrin repeat domain 52</i>	<b>0,85</b>
<b>APC</b>	<i>adenomatous polyposis coli</i>	<b>1,00</b>
<b>ARHGEF10</b>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10</i>	<b>0,94</b>
<b>AZI1</b>	<i>centrosomal protein 131kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>BCR</b>	<i>breakpoint cluster region</i>	<b>0,92</b>
<b>C19orf55</b>	<i>proline and serine rich 3</i>	<b>1,00</b>
<b>C2CD3</b>	<i>C2 calcium-dependent domain containing 3</i>	<b>1,00</b>
<b>CCDC138</b>	<i>coiled-coil domain containing 138</i>	<b>1,00</b>
<b>CCDC14</b>	<i>coiled-coil domain containing 14</i>	<b>1,00</b>
<b>CCDC18</b>	<i>coiled-coil domain containing 18</i>	<b>0,85</b>

<b>CCDC66</b>	<i>coiled-coil domain containing 66</i>	<b>0,94</b>
<b>CCDC77</b>	<i>coiled-coil domain containing 77</i>	<b>0,93</b>
<b>CENPJ</b>	<i>centromere protein J</i>	<b>0,98</b>
<b>CEP152</b>	<i>centrosomal protein 152kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>CEP192</b>	<i>centrosomal protein 192kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>CEP350</b>	<i>centrosomal protein 350kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>CEP72</b>	<i>centrosomal protein 72kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>CEP97</b>	<i>centrosomal protein 97kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>CNTROB</b>	<i>centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein</i>	<b>0,98</b>
<b>CSPP1</b>	<i>centrosome and spindle pole associated protein 1</i>	<b>1,00</b>
<b>DDX20</b>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20</i>	<b>0,88</b>
<b>DLG5</b>	<i>discs, large homolog 5 (Drosophila)</i>	<b>1,00</b>
<b>DST</b>	<i>Dystonin</i>	<b>1,00</b>
<b>DVL1</b>	<i>dishevelled segment polarity protein 1</i>	<b>1,00</b>
<b>DVL2</b>	<i>dishevelled segment polarity protein 2</i>	<b>1,00</b>
<b>DYRK1A</b>	<i>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>	<b>0,89</b>
<b>FAM13A</b>	<i>family with sequence similarity 13, member A</i>	<b>1,00</b>
<b>FAM13B</b>	<i>family with sequence similarity 13, member B</i>	<b>1,00</b>
<b>FAM171A1</b>	<i>family with sequence similarity 171, member A1</i>	<b>1,00</b>
<b>FAM190B</b>	<i>coiled-coil serine-rich protein 2</i>	<b>1,00</b>
<b>FARP2</b>	<i>FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2</i>	<b>1,00</b>
<b>GEMIN4</b>	<i>gem (nuclear organelle) associated protein 4</i>	<b>1,00</b>
<b>GPRASP2</b>	<i>G protein-coupled receptor associated sorting protein 2</i>	<b>0,94</b>
<b>HAUS3</b>	<i>HAUS augmin-like complex, subunit 3</i>	<b>0,88</b>
<b>INADL</b>	<i>InaD-like (Drosophila)</i>	<b>0,93</b>
<b>KIAA0196</b>	<i>KIAA0196</i>	<b>1,00</b>
<b>KIAA0753</b>	<i>KIAA0753</i>	<b>1,00</b>
<b>KIAA0913</b>	<i>zinc finger, SWIM-type containing 8</i>	<b>1,00</b>
<b>KIAA1009</b>	<i>centrosomal protein 162kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>KIAA1033</b>	<i>KIAA1033</i>	<b>0,99</b>
<b>KIDINS220</b>	<i>kinase D-interacting substrate, 220kDa</i>	<b>1,00</b>
<b>KIF14</b>	<i>kinesin family member 14</i>	<b>0,94</b>
<b>KIF23</b>	<i>kinesin family member 23</i>	<b>1,00</b>
<b>LRRC49</b>	<i>leucine rich repeat containing 49</i>	<b>0,90</b>
<b>LZTS2</b>	<i>leucine zipper, putative tumor suppressor 2</i>	<b>1,00</b>
<b>MED4</b>	<i>mediator complex subunit 4</i>	<b>1,00</b>
<b>MIA3</b>	<i>melanoma inhibitory activity family, member 3</i>	<b>1,00</b>
<b>MPHOSPH9</b>	<i>M-phase phosphoprotein 9</i>	<b>1,00</b>
<b>MTMR3</b>	<i>myotubularin related protein 3</i>	<b>0,93</b>
<b>NAV1</b>	<i>neuron navigator 1</i>	<b>0,98</b>
<b>NFATC3</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3</i>	<b>1,00</b>
<b>NFATC4</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4</i>	<b>1,00</b>
<b>OFD1</b>	<i>oral-facial-digital syndrome 1</i>	<b>1,00</b>
<b>PCM1</b>	<i>pericentriolar material 1</i>	<b>1,00</b>
<b>PCNT</b>	<i>Pericentrin</i>	<b>1,00</b>

<b>PIBF1</b>	<i>progesterone immunomodulatory binding factor 1</i>	<b>1,00</b>
<b>PLEKHA7</b>	<i>pleckstrin homology domain containing, family A member 7</i>	<b>0,99</b>
<b>PPFIA1</b>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1</i>	<b>0,94</b>
<b>PPFIBP1</b>	<i>PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)</i>	<b>0,92</b>
<b>PPP2R3B</b>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta</i>	<b>1,00</b>
<b>PTBP2</b>	<i>polypyrimidine tract binding protein 2</i>	<b>0,99</b>
<b>RACGAP1</b>	<i>Rac GTPase activating protein 1</i>	<b>1,00</b>
<b>RASAL2</b>	<i>RAS protein activator like 2</i>	<b>0,95</b>
<b>RPGRIP1L</b>	<i>RPGRIP1-like</i>	<b>1,00</b>
<b>RRP1</b>	<i>ribosomal RNA processing 1</i>	<b>0,81</b>
<b>SDCCAG3</b>	<i>serologically defined colon cancer antigen 3</i>	<b>1,00</b>
<b>SIPA1L1</b>	<i>signal-induced proliferation-associated 1 like 1</i>	<b>0,90</b>
<b>SIPA1L2</b>	<i>signal-induced proliferation-associated 1 like 2</i>	<b>0,99</b>
<b>SIRT1</b>	<i>sirtuin 1</i>	<b>0,99</b>
<b>SPATA24</b>	<i>spermatogenesis associated 24</i>	<b>1,00</b>
<b>SSBP1</b>	<i>single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial</i>	<b>1,00</b>
<b>SSX2IP</b>	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein</i>	<b>1,00</b>
<b>SZT2</b>	<i>seizure threshold 2 homolog (mouse)</i>	<b>0,95</b>
<b>VANGL1</b>	<i>VANGL planar cell polarity protein 1</i>	<b>1,00</b>
<b>VANGL2</b>	<i>VANGL planar cell polarity protein 2</i>	<b>1,00</b>
<b>WASH1</b>	<i>WAS protein family homolog 1</i>	<b>0,89</b>
<b>WDR37</b>	<i>WD repeat domain 37</i>	<b>0,85</b>
<b>WDR67</b>	<i>TBC1 domain family, member 31</i>	<b>1,00</b>
<b>WRAP73</b>	<i>WD repeat containing, antisense to TP73</i>	<b>0,91</b>
<b>XPR1</b>	<i>xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1</i>	<b>0,99</b>

#### Quadro 9. Possíveis proteínas interagentes da TBCCD1 variante 2

<b>Símbolo</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>SAINT</b>
<b>AIP</b>	<i>aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>	<b>0,97</b>
<b>ALDH7A1</b>	<i>aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1</i>	<b>0,96</b>
<b>BAG2</b>	<i>BCL2-associated athanogene 2</i>	<b>0,91</b>
<b>C19orf55</b>	<i>proline and serine rich 3</i>	<b>0,99</b>
<b>CENPH</b>	<i>centromere protein H</i>	<b>1,00</b>
<b>CENPI</b>	<i>centromere protein I</i>	<b>1,00</b>
<b>CENPK</b>	<i>centromere protein K</i>	<b>1,00</b>
<b>CENPM</b>	<i>centromere protein M</i>	<b>0,99</b>
<b>KIAA1279</b>	<i>KIF1 binding protein</i>	<b>0,87</b>
<b>NUDCD3</b>	<i>NudC domain containing 3</i>	<b>1,00</b>
<b>PPP2R3B</b>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta</i>	<b>1,00</b>
<b>SIRT2</b>	<i>sirtuin 2</i>	<b>1,00</b>

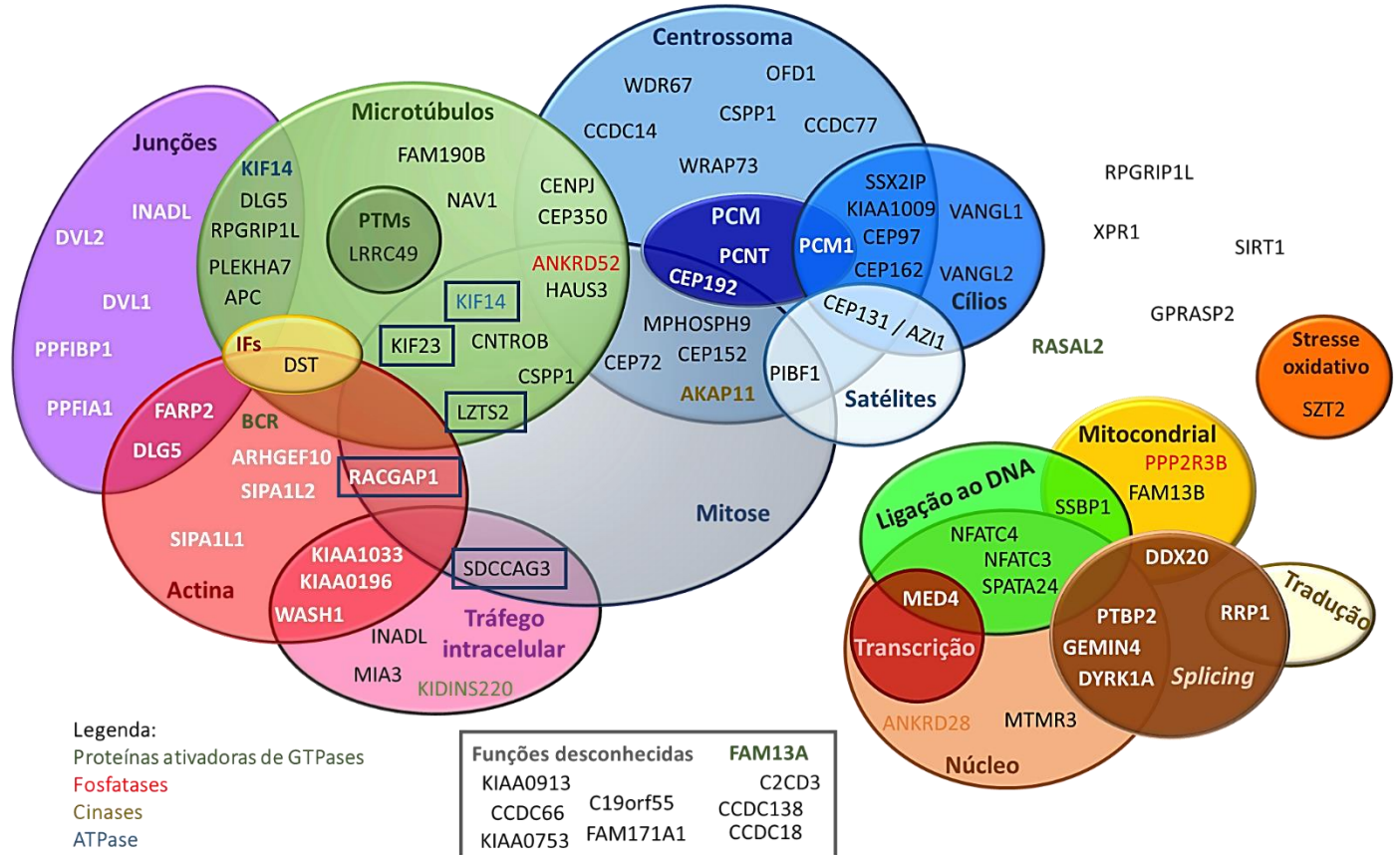
<b>SPAG1</b>	<i>sperm associated antigen 1</i>	<b>0,98</b>
<b>SSBP1</b>	<i>single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial</i>	<b>0,89</b>
<b>ST13</b>	<i>suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)</i>	<b>1,00</b>
<b>TARS2</b>	<i>threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)</i>	<b>0,93</b>
<b>TLCD2</b>	<i>TLC domain containing 2</i>	<b>1,00</b>
<b>TTC4</b>	<i>tetratricopeptide repeat domain 4</i>	<b>0,99</b>
<b>UMPS</b>	<i>uridine monophosphate synthetase</i>	<b>0,85</b>

Analisando os quadros 8 e 9 observa-se que a TBCCD1 interatua com um número mais elevado de proteínas (82 proteínas) que a TBCCD1 variante 2 (19 proteínas). De modo a perceber em que funções celulares e vias de sinalização e metabólicas estavam envolvidas as proteínas candidatas a interagir com a TBCCD1 e a variante 2, procedeu-se à pesquisa não exaustiva de quais as funções de cada uma. Desta forma, foi possível organizar as proteínas candidatas em diversas funções e, assim, ter um conjunto de pistas para as funções da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2. Esta análise foi feita recorrendo às bases de dados de anotação de proteínas e genes, como por exemplo, a Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) e a Phanter ([pantherdb.org](http://pantherdb.org)). Assim sendo, esta análise terá de ser confirmada com recurso a artigos sobre as várias proteínas interatuantes encontradas.

Esta análise permitiu concluir que a proteína centrossomal TBCCD1 tem funções função mais relacionadas com o centrossoma, com os microtúbulos e com os filamentos de actina, tendo também um papel importante nas junções celulares, provavelmente, através do citoesqueleto. Esta proteína está envolvida numa grande variedade de funções celulares, o que parece sugerir que pode funcionar como uma plataforma de interações entre proteínas, interagindo com estas principalmente através do citoesqueleto. A TBCCD1 parece também estar envolvida na polaridade celular, visto que se associa a várias proteínas associadas ao estabelecimento da polaridade das células epiteliais e que participam nas junções célula-célula e célula-matriz, e na integridade do centrossoma, interagindo com várias proteínas que controlam a distância entre os centríolos e que recrutam proteínas para a matriz pericentriolar.

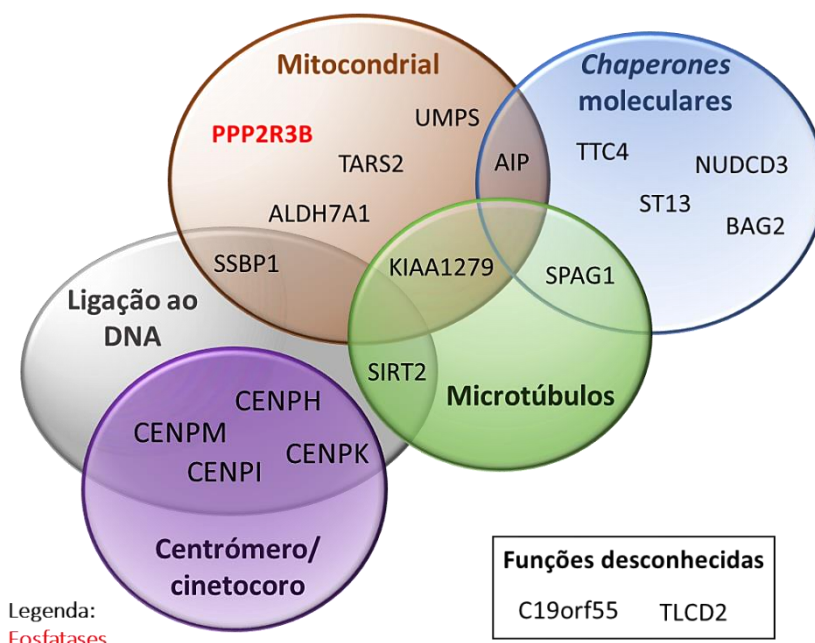
É também de salientar que, na mitose, a TBCCD1 se associa a várias proteínas que se localizam na zona mediana e, posteriormente, no corpo mediano e muitas destas estão também relacionadas com o processo de citocinese como, por exemplo, as proteínas CSPP1, HAUS3, KIF14, LZTS2. É ainda de salientar a proteína RACGAP1, que está envolvida na formação do anel contrátil de miosina e promove a ligação do corpo mediano à membrana celular. Este resultado está de acordo com o esperado,

uma vez que foi observado que durante a divisão celular a TBCCD1 é recrutada para a zona mediana e, posteriormente, para o corpo mediano a partir da sua *pool* citoplasmática (Gonçalves, 2010; Goncalves et al., 2010a).



**Figura 23. Possíveis proteínas interagentes da TBCCD1.** As proteínas foram organizadas de acordo com a sua localização nas células em diversas categorias: microtúbulos, junções, centrossoma, satélites, cílios, matriz pericentriolar (PCM), filamentos intermédios (IFs), actina, tráfego intracelular, mitose, mitocôndrio, ligação ao DNA, núcleo, transcrição tradução, *splicing* e ainda stresse oxidativo. Para algumas das proteínas candidatas não foi possível colocá-las em nenhum dos grupos, tendo permanecido isoladas. As proteínas cuja função é desconhecida foram agrupadas num único grupo. Algumas das proteínas identificadas são GAPs (letra vermelha), fosfatases (letra laranja), cinases (letra verde) e ATPases (letra azul). As proteínas que estão envolvidas na mitose e estão assinaladas com um retângulo a azul são importantes na regulação da citocinese. Algumas proteínas que podem ser englobadas em mais do que um grupo estão repetidas de modo a poderem ser incluídas nos mesmos. A análise das funções das proteínas foi feita recorrendo às bases de dados de anotação de proteínas e genes.

Foi feito o mesmo tipo de análise para a proteína TBCCD1 variante 2, que parece ter função de interação com *chaperones* moleculares, que pode ser explicada por ter um domínio TBCC e partilhar essa função com a TBCC e a RP2 (Figura 24).



**Figura 24. Possíveis proteínas interagentes da TBCCD1 variante 2.** As proteínas foram organizadas de acordo com a sua função/localização nas células em cinco categorias: ligação ao DNA (a cinzento), mitocondrial (castanho), centrômeros (roxo), microtúbulos (a verde) e *chaperones* moleculares (azul). As proteínas fosfatases foram assinaladas a laranja. As proteínas cuja função é desconhecida foram também agrupadas. A análise das funções das proteínas foi feita recorrendo às bases de dados de anotação de proteínas e genes.

A análise da caracterização das proteínas interagentes acima executada é ainda preliminar e necessita de aprofundamento. Esta análise mais detalhada relativamente à função de cada uma das proteínas identificadas irá permitir selecionar um grupo promissor que irão, numa primeira abordagem, ser confirmadas por imunoprecipitações. Nestas análises usar-se-á o anticorpo anti-*flag* e um anticorpo contra a proteína candidata interagente ou proceder-se-á à sobreexpressão da proteína candidata conjugada com uma *tag* nas células e de seguida usar-se-á um anticorpo contra a *tag* na imunoprecipitação. Poderão também ser feitos estudos de co-

localizações e ainda analisar se a depleção de uma das proteínas nas células, por exemplo, da TBCCD1, causa alguma alteração nos níveis e/ou localização intracelular das proteínas interatuantes.

## **2. As funções da proteína centrossomal TBCCD1**

Durante a realização deste trabalho, e enquanto decorriam as experiências que levaram à identificação das proteínas interactuantes acima descritas, levou-se a cabo um conjunto de experiências paralelas de modo a elucidar os fenótipos observados pela depleção da TBCCD1. De fato, a depleção da TBCCD1 tem um profundo impacto na polaridade das células e no seu normal funcionamento. Na ausência desta proteína, em células hTERT-RPE-1, observou-se um afastamento significativo entre o centrossoma e o núcleo e a desorganização do complexo de Golgi. Observou-se ainda que as células depletadas de TBCCD1 são maiores e mais lentas que as células controlo, ocorre a desorganização do complexo de Golgi, há um atraso/paragem no ciclo celular e as células são menos eficientes na montagem de cílios primários (Gonçalves, 2010). A mistura de siRNAs utilizada no trabalho realizado por Gonçalves et. al. (2010) não permite distinguir os mRNAs que codificam para a TBCCD1 dos que codificam para as variantes de *splicing*, como explicado em III.4.3, que ainda não tinham sido identificadas quando se estabeleceu o protocolo de depleção da TBCCD1 por Gonçalves et. al. (2010). Assim sendo, o fenótipo observado pode dever-se também à depleção da TBCCD1 variante 2. No entanto, pela análise das proteínas interatuantes da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2, os fenótipos observados em células hTERT-RPE-1 parecem dever-se mais à depleção da primeira do que da variante 2. Assim, ao longo de todo o trabalho será sempre apenas referida a TBCCD1, o que será posteriormente discutido em maior detalhe em VI.2.

O afastamento do centrossoma em relação ao núcleo devido à depleção da TBCCD1 pode ser explicado por várias hipóteses: i) a proteína TBCCD1 estabiliza uma subpopulação de microtúbulos que regula o posicionamento do núcleo vs centrossoma, ii) a TBCCD1 pode estabelecer uma ligação física entre o centrossoma e o núcleo e na sua ausência esta ligação é perdida, ou iii) a distância entre o núcleo e o centrossoma pode ser regulada por um balanço de forças exercidas pelos microtúbulos no córtex e no centro das células e pelos filamentos de actina, que é desregulado pela depleção da proteína TBCCD1.



Estas hipóteses estão de acordo com os modelos descritos na literatura para o posicionamento e associação entre o centrossoma e o núcleo. De fato, sabe-se que existem várias proteínas, como a emerina e as proteínas do complexo SUN e KASH, que estabelecem uma ligação física entre o centrossoma e o núcleo (Burakov and Nadezhdina, 2013; Chang et al., 2013; Meinke and Schirmer, 2015). Sabe-se também que a alteração da dinâmica dos microtúbulos, por exemplo, através da despolimerização com o agente nocadazole, causa o afastamento entre o centrossoma e o núcleo (Burakov and Nadezhdina, 2013). Apesar de não existir nenhuma evidência de que a despolimerização/estabilização do citoesqueleto de actina causa o afastamento do núcleo, sabe-se que a alteração da rede de microtúbulos afeta a dinâmica dos filamentos de actina, e vice-versa, principalmente no córtex da célula e na região perinuclear (Burakov and Nadezhdina, 2013). Algumas proteínas, como a emerina, ligam os filamentos de actina nucleares à rede de microtúbulos do citoplasma (Chang et al., 2013). Assim, pensa-se que o citoesqueleto de actina tem, pelo menos de forma indireta, um papel na posição relativa entre o centrossoma e o núcleo.

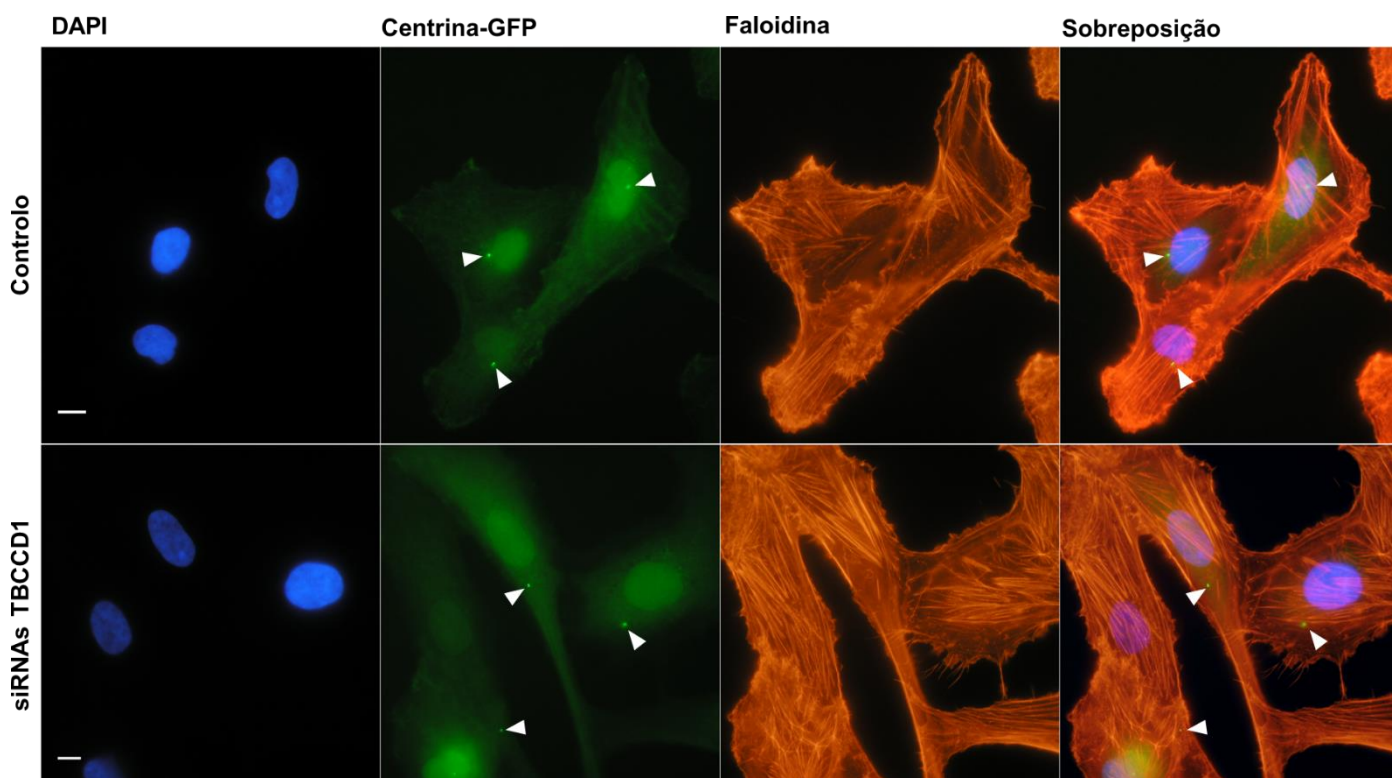
## **2.1. Relação funcional entre a proteína TBCCD1 e o citoesqueleto de actina**

A proteína centrossomal TBCCD1 tem, na sua sequência, dois domínios funcionais: o domínio TBCC, presente também na proteína TBCC, que está envolvida na via de *folding* da tubulina, e o domínio CARP, relacionado com o citoesqueleto de actina. Como referido anteriormente, este domínio é partilhado com as proteínas CAP e pensa-se que esteja envolvido na polimerização dos filamentos de actina. Por outro lado, apesar de a actina não ter sido identificada como proteína interatuante da TBCCD1 ou da TBCCD1 variante 2, algumas das potenciais proteínas interagentes estão relacionadas com o citoesqueleto de actina, entre elas as proteínas SIPAL1 e 2, a BCR e a ARHGEF10. Pensa-se que a dinâmica do citoesqueleto, principalmente em associação com os microtúbulos contribui para a posição relativa do centrossoma e do núcleo (Broers et al., 2006; Burakov et al., 2003; Burakov and Nadezhdina, 2013). Assim, é esperado que a função da proteína TBCCD1 esteja, de alguma forma, relacionada com o citoesqueleto de actina.

De forma a tentar identificar uma relação funcional entre a TBCCD1 e o citoesqueleto de actina começou por se tentar investigar se em células depletadas de

TBCCD1 havia uma organização do citoesqueleto de actina diferente das células controlo.

Observou-se que o citoesqueleto de actina das células hTERT-RPE-1 é muito complexo, sendo constituído por inúmeros filamentos que se cruzam entre si, com variadas direções (Figura 25). Por outro lado, a redução dos níveis da proteína TBCCD1 não causou um efeito facilmente observável na organização do citoesqueleto de actina, pois não foi possível detetar nenhuma diferença entre as células depletadas de TBCCD1 e as células controlo (Figura 25). Este resultado, no entanto, não implica a não existência de uma relação entre os dois. A rede de filamentos de actina é muito complexa e a alteração a nível da célula provocada pela depleção da proteína TBCCD1 pode ser subtil e, por isso, pode não ser possível observá-la com base numa análise deste tipo. Por outro lado, a maioria das proteínas interatuantes do TBCCD1 e que estão relacionadas com o citoesqueleto de actina estão também associadas às junções célula-células e à adesão ao substrato. Assim sendo, poderá ser promissor fazer esta análise mas marcando as junções de modo a perceber se a sua integridade está comprometida. Algumas das proteínas interatuantes estão também relacionadas com o processo de citocinese e, por isso, poderá ser interessante analisar as células durante a divisão celular, principalmente durante a citocinese.



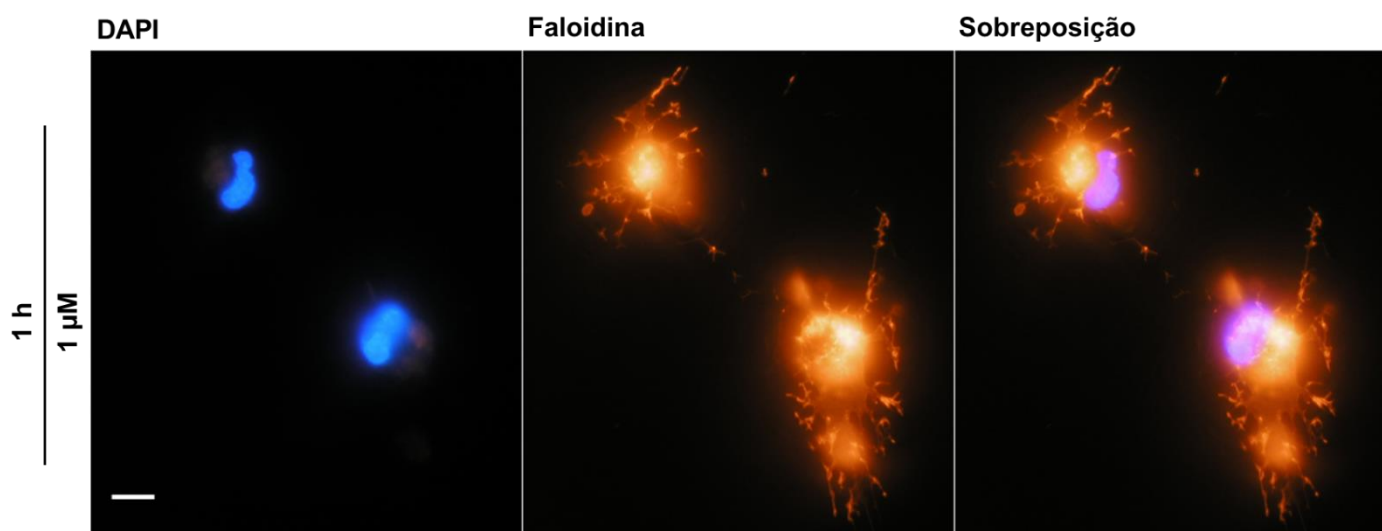
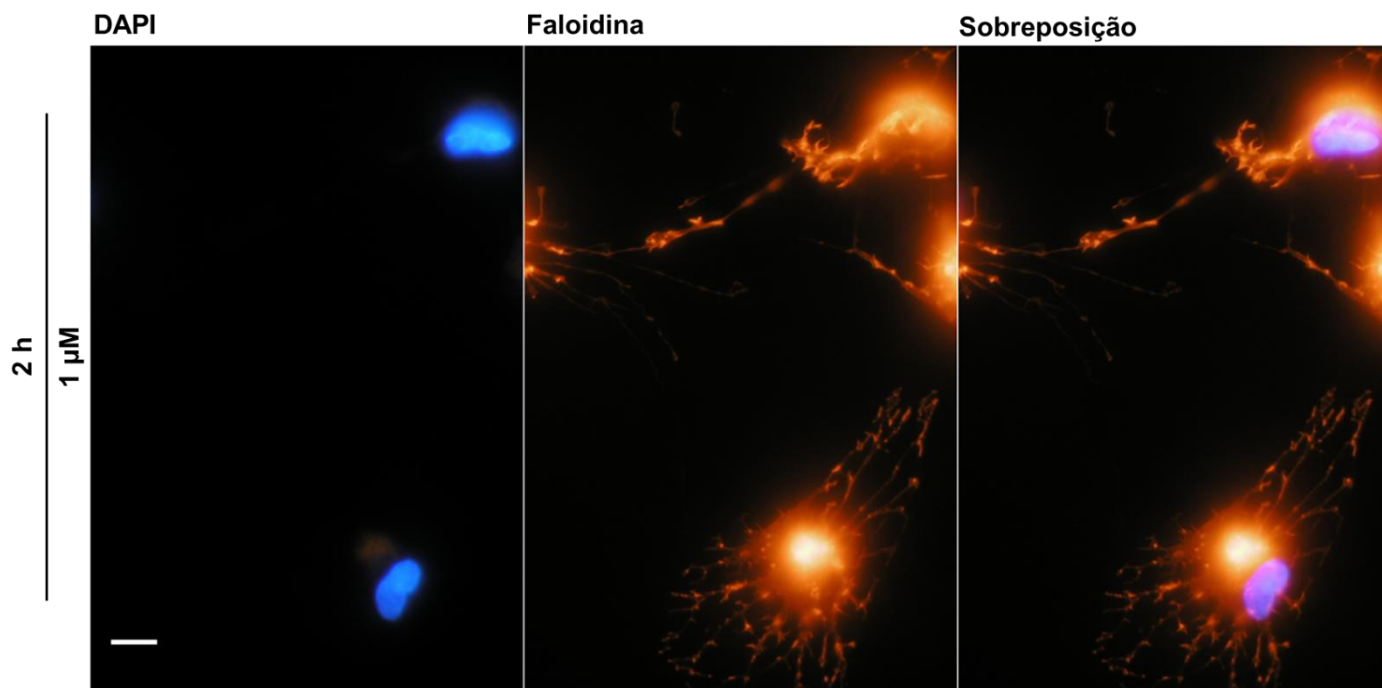
**Figura 25. Efeito da depleção da proteína TBCCD1 no citoesqueleto de actina em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP.** Imagens representativas de células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo e de células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de fluorescência, tendo sido fixadas com paraformaldeído e marcadas com o anticorpo contra a pericentrina e o corante faloidina, que marca os filamentos de actina. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

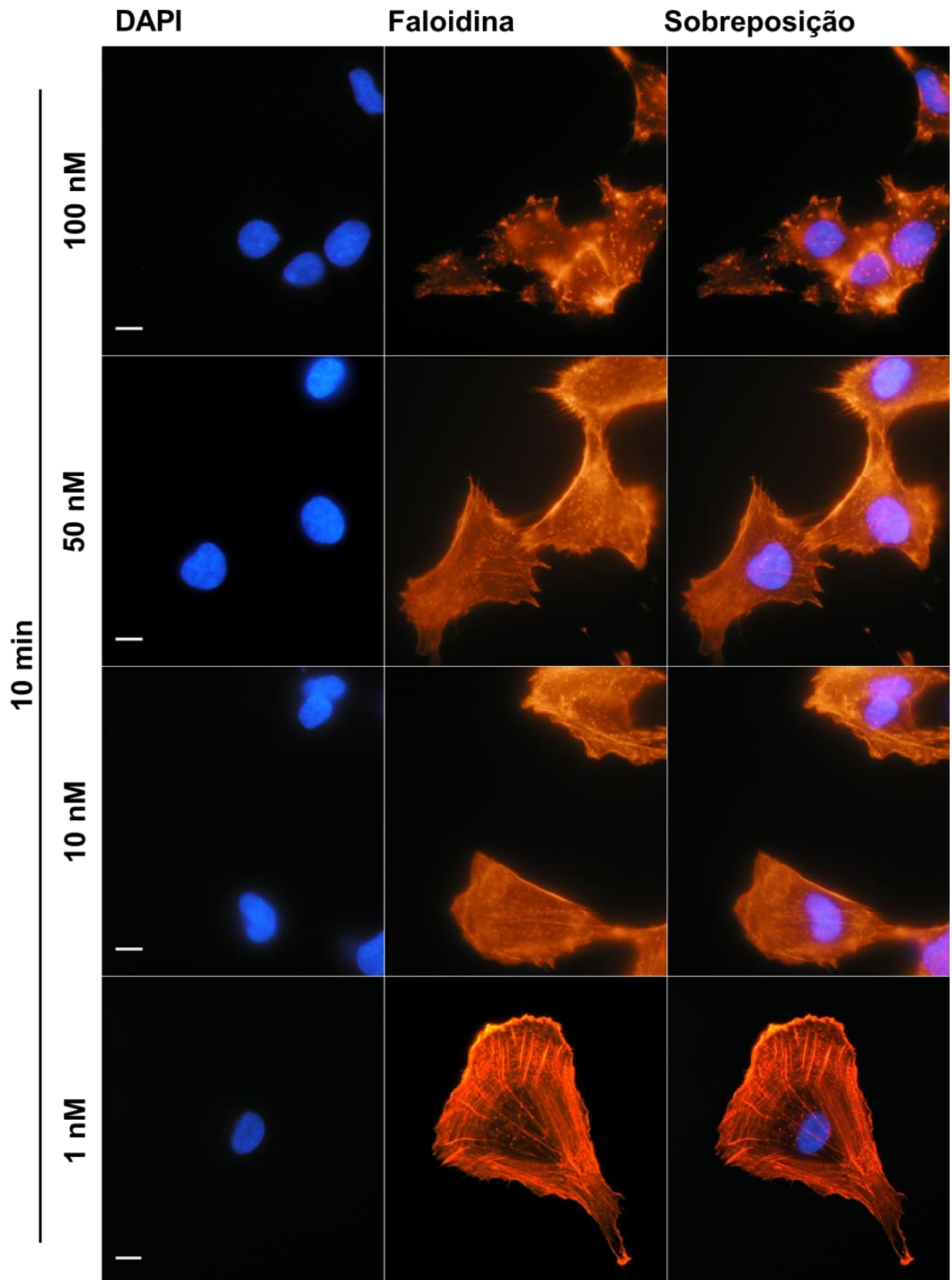
Como não foi possível retirar conclusões acerca do efeito da depleção do TBCCD1 no citoesqueleto de actina com a abordagem descrita, foram analisadas as orientações dos filamentos de actina com o objetivo de perceber se sofriam alguma alteração quando as células eram transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. Para tal, as células foram alinhadas em relação ao seu *leading edge* e procedeu-se a análise da direccionalidade das fibras de actina com recurso ao *software* ImageJ Fiji. Foi analisado um pequeno número de células de cada população, no entanto, os resultados foram inconclusivos pelo que não se prosseguiu com esta análise. Apesar de ser necessário analisar um maior número de células, a depleção da proteína TBCCD1 não parece afetar a orientação das fibras de actina que, em geral, se dispõe sempre paralelamente ao *leading edge* (consultar IX.3).

Como não foi possível observar se a depleção de TBCCD1 tem algum efeito no citoesqueleto de actina, pensou-se que teria interesse testar a hipótese de a despolimerização dos filamentos de actina ter algum impacto no fenótipo de afastamento do centróssoma-núcleo em células hTERT-RPE-1. Sabe-se que a posição do centróssoma é regulada não só pela dinâmica dos microtúbulos como também pela rede de filamentos de actina e, por isso, a polimerização/despolimerização poderia ser importante no fenótipo de afastamento do centróssoma-núcleo causado pela depleção da TBCCD1. Para tal, recorreu-se ao agente despolimerizante citocalasina D, que promove a despolimerização dos filamentos de actina. Tal como para o agente taxol foi necessário otimizar as concentrações de citocalasina D e os tempos de incubação ideais para a experiência. Assim, as células hTERT-RPE-1 foram expostas a citocalasina D durante 1 h e 2 h a 1  $\mu$ M e durante 10 min a 100, 50, 10 e 1 nM (Figura 26). Observou-se que as células tratadas com as doses mais elevadas e durante mais tempo perdem a sua forma e morfologia fisiológicas e que há também alteração da morfologia dos núcleos

As melhores condições testadas foram as doses de 50 e 100 nM durante 10 minutos a 37 °C que foram, por isso, utilizadas nas experiências seguintes. Estas

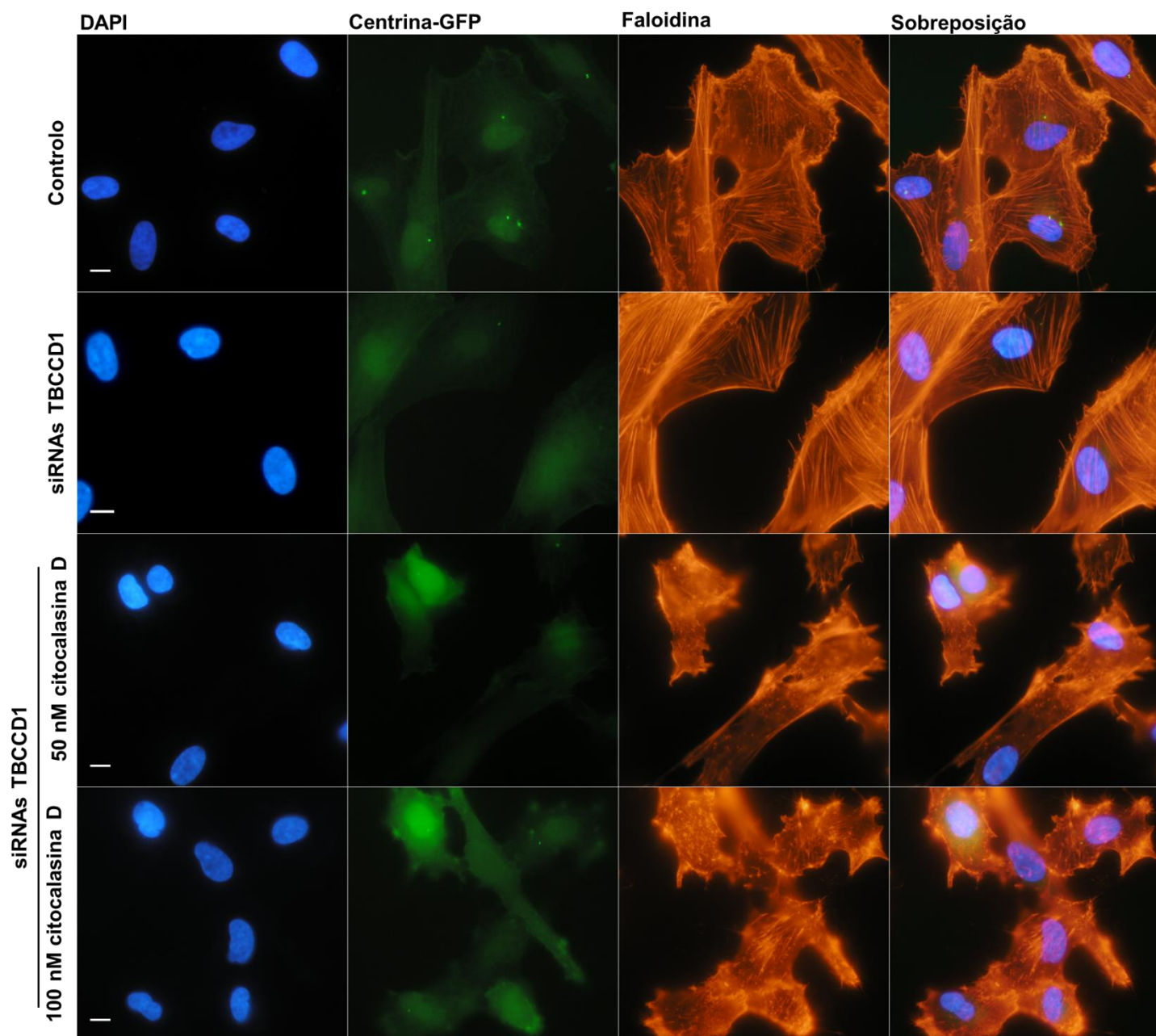
condições permitem depolimerizar quase toda a rede de filamentos de actina sem, no entanto, alterar a morfologia dos núcleos nem, de forma significativa, a forma da célula.





**Figura 26. Otimização da dose e tempo de exposição à citocalasina D.** Imagens representativas de células hTERT-RPE-1 expostas a 1  $\mu\text{m}$  de citocalasina D, durante 1 h e durante 2 h e células tratadas com 1 nM, 10 nM, 50 nM e 100 nM, durante 10 min. As células foram tratadas para serem analisadas por microscopia de fluorescência e marcadas com o corante faloidina (a laranja). O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu\text{m}$ .

Assim, depois de terem sido otimizadas as doses de citocalasina D e os tempos de exposição, as células foram sujeitas a siRNAs específicos para a TBCCD1 e procedeu-se à despolimerização do citoesqueleto de actina. No entanto, com a despolimerização dos filamentos de actina, apesar de não ser extrema, o citoplasma das células retrai e estas diminuem de tamanho. Este facto tornou impossível analisar o fenótipo de afastamento do centróssoma em relação ao núcleo, pois o centróssoma fica sempre junto ao núcleo devido à diminuição do tamanho da célula (Figura 27). Assim, não seria possível analisar se a reversão do fenótipo se deveu à despolimerização do citoesqueleto de actina ou à redução do tamanho da célula, pelo que não se procedeu com esta análise.

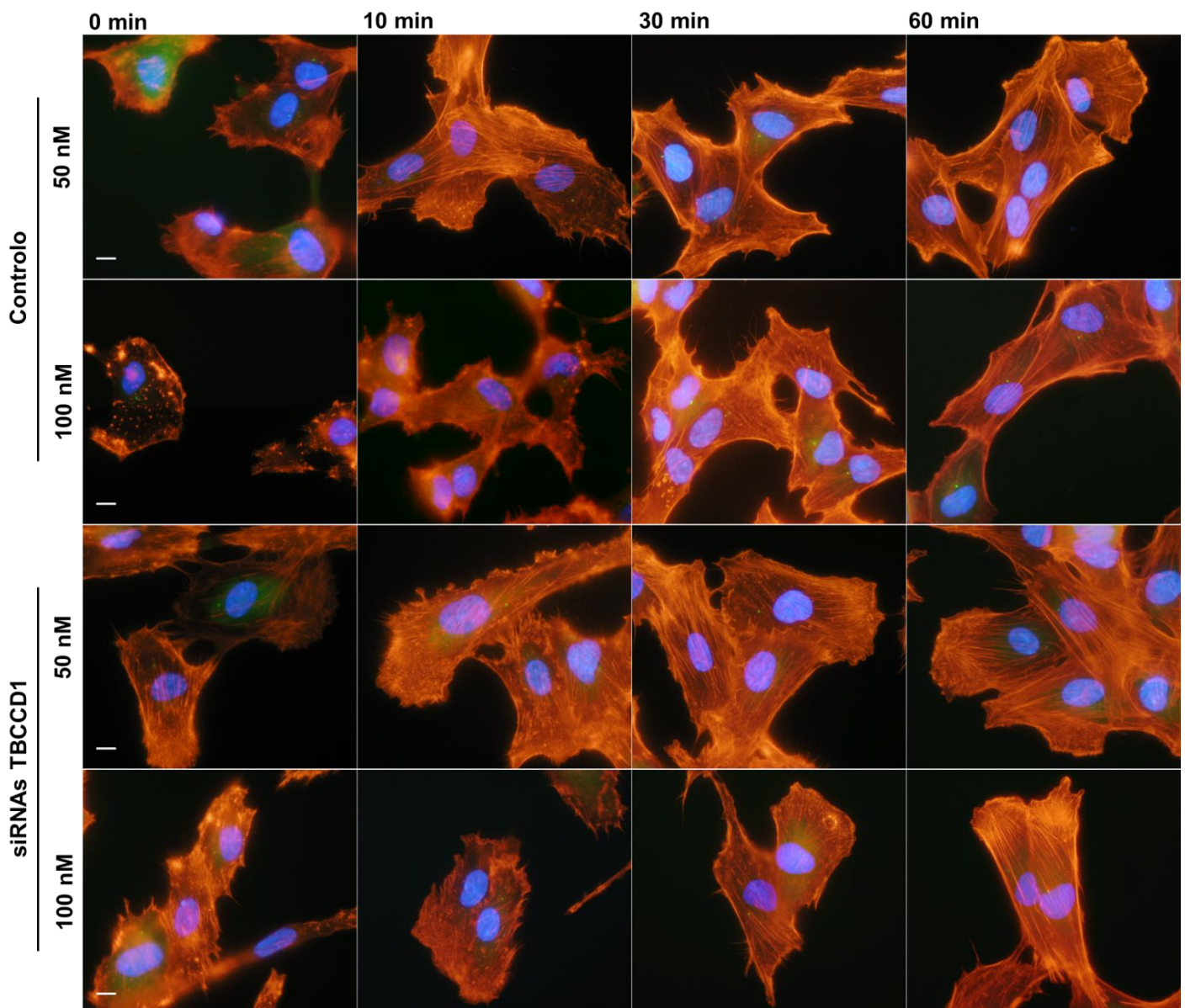


**Figura 27. Análise do fenótipo de afastamento do centrissoma-núcleo em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP tratadas com citocalasina D.** Imagens representativas de células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo, transfetadas com siRNAs e, posteriormente, expostas a 50 e 100 nM de citocalasina, durante 10 min a 37 °C. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de fluorescência e marcadas com o corante faloidina (a laranja). O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10 µm. Os resultados foram obtidos em 2 experiências independentes.

Como não foi possível analisar o fenótipo causado pela depleção da TBCCD1 quando se procedeu à despolimerização dos filamentos de actina, procedeu-se à recuperação dos mesmos para observar se a depleção da proteína TBCCD1 teria algum impacto na forma como as células recuperam o seu citoesqueleto de actina, após despolimerização. Assim, as células depletadas de TBCCD1 foram sujeitas durante 10 minutos a 50 e 100 nM do agente despolimerizante citocalasina D. De seguida, o meio de cultura foi mudado para meio sem citocalasina D e as células foram fixadas a vários tempos de recuperação do citoesqueleto de actina (0, 10, 30 e 60 minutos) (Figura 28).

Observou-se que as células inciam rapidamente a repolimerização do citoesqueleto de actina após a remoção da citocalasina D do meio de cultura, e ao fim de 10 min já foi possível observar um maior número de filamentos de actina comparativamente às células que não houve recuperação dos filamentos. No entanto, a rede de actina demora mais tempo (cerca de 60 min) a repolimerizar totalmente e a organizar-se de modo semelhante às células controlo (Figura 28). Observou-se ainda que as células depletadas de TBCCD1 mantêm a capacidade de repolimerizar o seu citoesqueleto de actina no mesmo intervalo de tempo que as células controlo. Este resultado indica que a TBCCD1 não parece estar envolvida na polimerização ou na recuperação dos filamentos de actina (Figura 28). Por outro lado, nos tempos de recuperação mais longos (de 30 e 60 min) as células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 parecerem ter um citoesqueleto de actina mais denso e com um maior número de filamentos de actina do que as células controlo. No entanto, será necessário observar um maior número de células e proceder à quantificação do número de filamentos de actina de modo a confirmar a existência deste fenótipo.

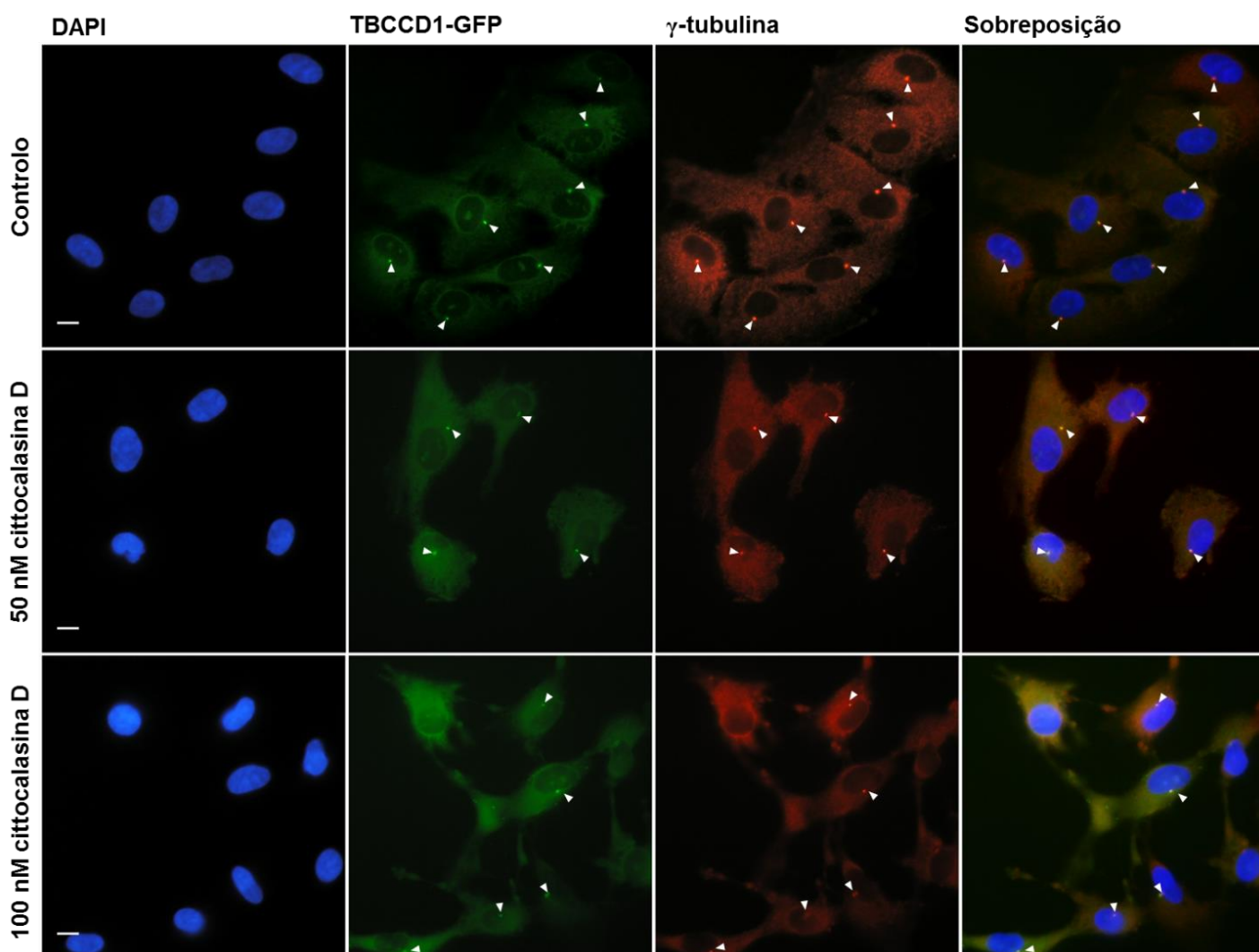




**Figura 28. A repolimerização da actina no contexto da depleção da TBCCD1.** Imagens representativas de células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo sujeitas a 50 nM (A) e 100 nM de citocalasina e células transfetadas com siRNAs contra a TBCCD1 sujeitas a 50 e 100 nM de citocalasina, durante 10 min a 37 °C. Ao fim deste período, mudou-se o meio de cultura para remover a citocalasina D e deixou-se repolimerizar o citoesqueleto de actina durante 0, 10, 30 e 60 minutos. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de fluorescência e foram marcadas com o corante faloidina (a vermelho). O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu$ m. Os resultados foram obtidos em 2 experiências independentes.

Como não se conseguiu identificar nenhuma relação entre a depleção da proteína TBCCD1 e o citoesqueleto de actina através da manipulação do último, tentou-se uma outra abordagem. Assim, utilizando células hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP, em que a TBCCD1 é expressa constitutivamente em fusão com a proteína GFP, procedeu-se à despolimerização do citoesqueleto de actina com citocalasina D e observou-se se a localização da TBCCD1 era afetada (Figura 29).

Observou-se que, tal como nas células controlo, a TBCCD1 se localiza no centróssoma das células com o citoesqueleto de actina despolimerizado. Este resultado indica que a despolimerização do citoesqueleto de actina não tem impacto na localização celular desta proteína (Figura 29). Assim, a TBCCD1 mantém a sua localização centróssomal em células sujeitas a 50 e a 100 nM de citocalasina D (em 100% das células), o que indica que a sua localização não é dependente do citoesqueleto de actina. Do mesmo modo, já tinha sido observado que a TBCCD1 se localiza no centróssoma das células hTERT-RPE-1 com a rede de microtúbulos despolimerizada por ação do nocodazole (Gonçalves, 2010). Assim, pode concluir-se que a localização desta proteína no centróssoma não depende do citoesqueleto de actina nem de microtúbulos. Nas experiências de despolimerização dos filamentos de actina não foi possível observar nenhuma célula na fase final da mitose e, por isso, não se pode concluir se a localização da TBCCD1 no corpo mediano é ou não afetada.



**Figura 29. A localização da proteína TBCCD1 no centróssoma não é afectada pela despolimerização do citoesqueleto de actina.** Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP controlo, tratadas com 50 nM e com 100 nM de citocalasina D. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e foram marcadas com um anticorpo contra a  $\gamma$ -tubulina. O DNA foi marcado com DAPI. Os resultados foram obtidos em 2 experiências independentes. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

O conjunto de experiências apresentadas e analisada neste subcapítulo dos Resultados não permitiram observar nenhuma relação funcional entre a proteína centróssoma TBCCD1 e o citoesqueleto de actina. No entanto, o domínio CARP presente na sequência da TBCCD1 e da variante 2 e o fato de alguns dos interatuantes da primeira serem proteínas relacionadas com o citoesqueleto de actina, sugere que

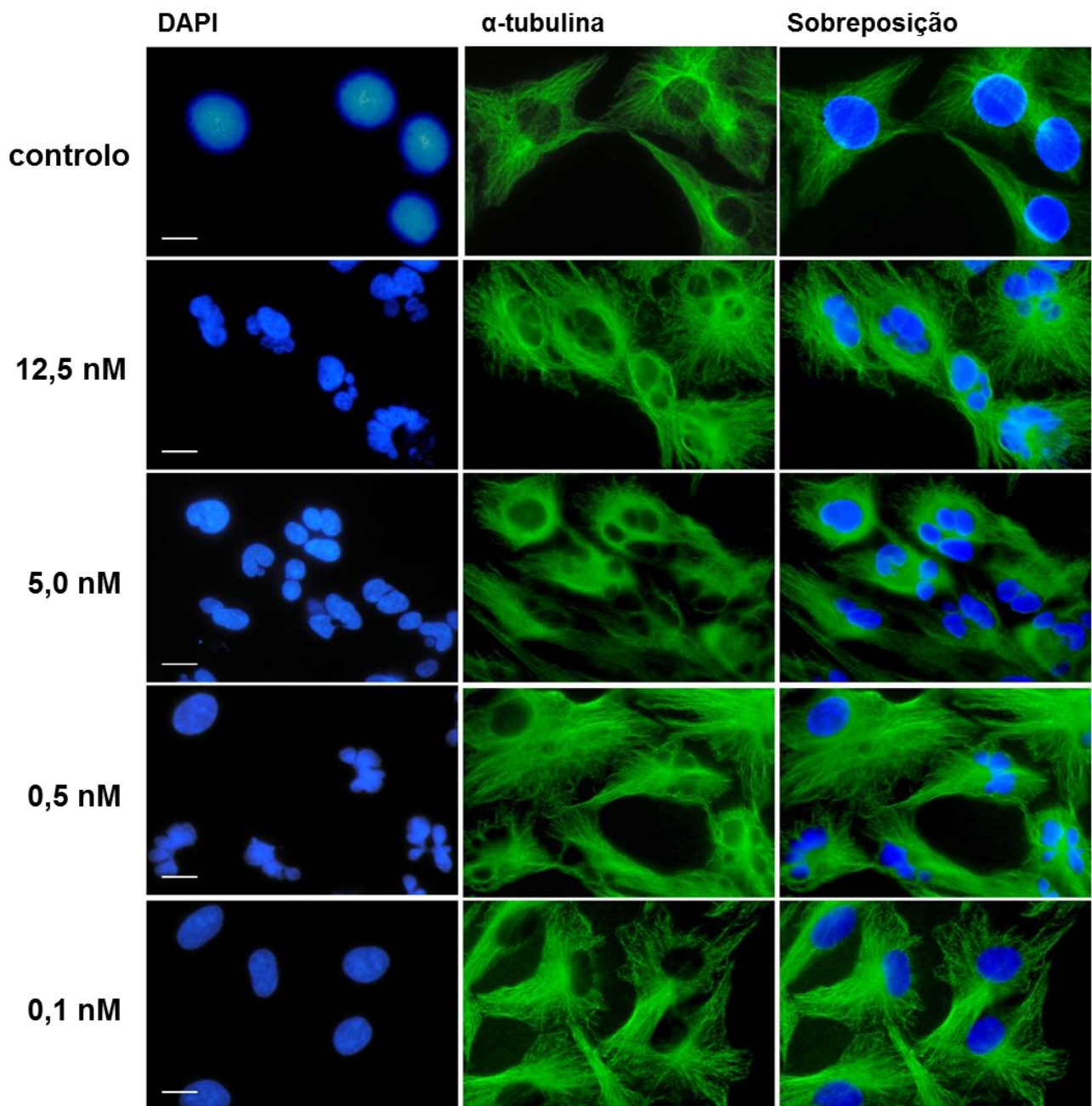
esta proteína possa ter algum papel no citoesqueleto de actina. No entanto, esta relação pode ser específica o tipo de célula e ainda não ter sido observada ou por não se ter utilizado a linha celular em que esta interação é mais importante e, por isso, é mais afetada quando as células são depletadas de TBCCD1. Alternativamente, a quantidade de proteína que permanece na célula após a transfeção com os siRNAs específicos para a TBCCD1 poderá ser suficiente para manter a integridade do citoesqueleto de actina impedindo a observação de um fenótipo. Por outro lado, pode não estar a ser feita a análise mais correta ou ser necessário estimular o citoesqueleto de actina de outra forma, por exemplo, através de ensaios de fecho de ferida ou por sobreexpressão ou depleção de agentes remodeladores da actina, como proteínas da família dos GTPases Rho ou da subfamília Rac (Sadok and Marshall, 2014), para ser possível observar algum fenótipo.

## **2.2. TBCCD1, uma proteína reguladora da dinâmica dos microtúbulos?**

Com o objetivo de averiguar qual o papel da proteína TBCCD1 no afastamento do centróssoma e do núcleo, decidiu-se testar a hipótese de as posições relativas do centróssoma e do núcleo se deverem, pelo menos em parte à dinâmica dos microtúbulos. Assim, as células depletadas de TBCCD1 foram tratadas com paclitaxel (taxol), um agente estabilizador de microtúbulos que se liga a subunidade  $\beta$ -tubulina e promove a polimerização, impedindo a despolimerização (Horwitz, 1994). Na presença de taxol, a rede de microtúbulos é remodelada e formam-se feixes estáveis de microtúbulos que afetam o normal funcionamento das células. As células tratadas com taxol ficam deformadas e não conseguem estabelecer um fuso mitótico funcional, ficando bloqueadas em G2/M (Horwitz, 1994).

Neste estudo teve-se como objetivo estabilizar a rede de microtúbulos, mas afetando o menor possível as funções normais das células. Para tal, foi necessário otimizar a concentração de taxol a ser utilizada. Começou-se por utilizar uma dose de taxol de 12,5 nM, que pode ser considerada baixa relativamente às usadas na literatura. No entanto, como se observa na Figura 30, esta dose de taxol ainda é suficientemente elevada para, nas células hTERT-RPE-1, provocar a formação de feixes de microtúbulos e comprometer a morfologia dos núcleos, que ficaram fragmentados e bilobados. Assim, diminuiu-se progressivamente a dose até se observar que a morfologia dos

núcleos era mantida mas que o taxol estava ainda a exercer efeito na rede de microtúbulos. Observou-se que com a diminuição da dose de taxol os núcleos das células hTERT-RPE-1 ficam progressivamente morfologicamente mais semelhantes ao controlo (Figura 30). As concentrações em que se observou que a morfologia dos núcleos não era afetada mas em que ainda havia estabilização dos microtúbulos foram as de 0,1 e 0,2 nM de taxol e, por isso, estas foram as doses escolhidas para os restantes estudos.



**Figura 30. Otimização da dose de taxol usada para estabilizar os microtúbulos, em células hTERT-RPE-1.** Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 controlo sujeitas a 12,5 nM, a 5 nM, a 0,5 nM e a 0,1 nM de taxol. As células foram sujeitas às várias doses de taxol durante 24 h e, posteriormente, processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e marcadas com o anticorpo contra a  $\alpha$ -tubulina (a verde). O DNA foi marcado com DAPI. Evidencia-se a alteração de morfologia dos núcleos (cabeças de setas). A barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

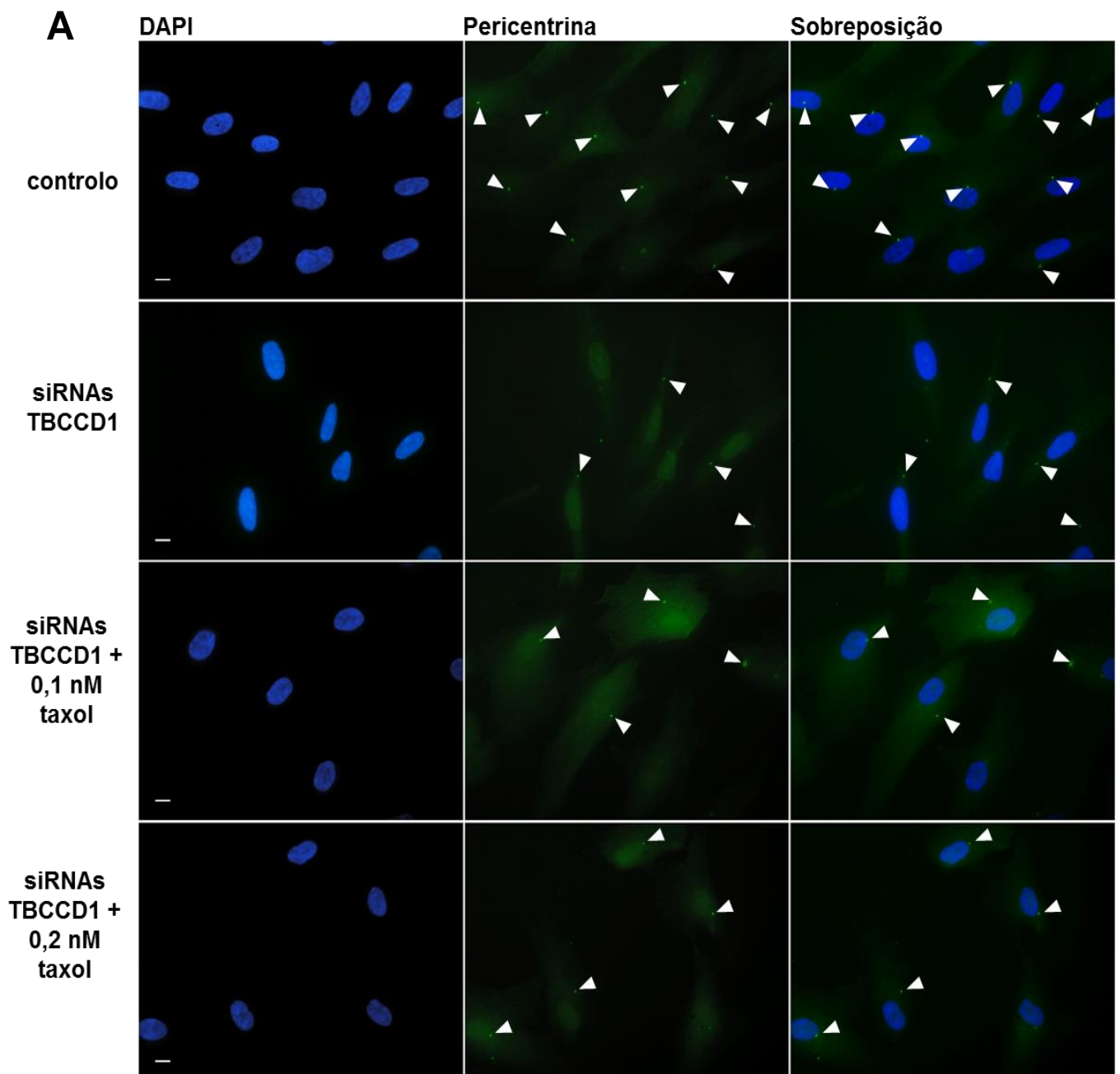
Os núcleos das células hTERT-RPE-1 tratadas com taxol ficaram fragmentados e bilobados (Figura 30), no entanto, quando tratados com citocalasina D para despolimerizar os filamentos de actina, os núcleos comprimiram. A alteração da dinâmica dos dois tipos de filamentos do citoesqueleto afetam de modo distinto os núcleos das células e, por isso, parecem ter um papel diferente na morfologia dos núcleos (Figura 26).

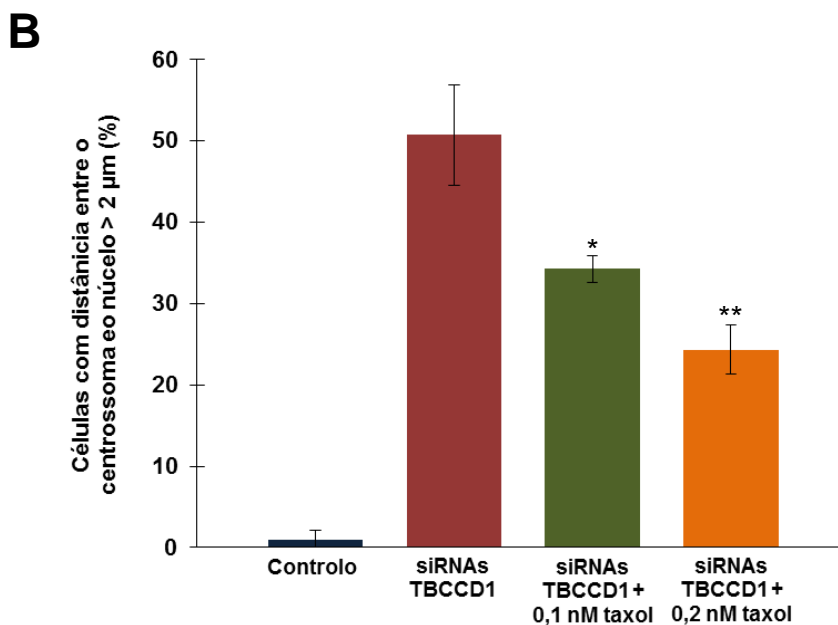
Com o objetivo de estudar o efeito da estabilização dos microtúbulos no fenótipo de afastamento do centrossoma causado pela depleção da proteína TBCCD1, as células hTERT-RPE-1 foram transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 e, posteriormente, foram tratadas com 0,1 e 0,2 nM de taxol durante 24 horas (Figura 31). Como referido anteriormente (Figura 30), estas concentrações de taxol causam a estabilização parcial dos microtúbulos mas não a formação de feixes nem comprometem a integridade morfológica dos núcleos.

Observou-se que, notavelmente, as concentrações de taxol utilizadas permitiram reverter parcialmente o fenótipo de afastamento do centrossoma, causado pela depleção da proteína TBCCD1 (Figura 31). De facto, a quantificação dos resultados mostra que em 50,7 % das células depletadas de TBCCD1 os centrossomas, identificados através da marcação com um anticorpo específico para a pericentrina, e o núcleo distam de mais de 2  $\mu$ m, enquanto que nas células depletadas de TBCCD1 e tratadas com taxol a percentagem decresce para 34,2 %, quando tratadas com 0,1 nM de taxol, e para 24,5 %, quando tratadas com 0,2 nM (Figura 31). A distância centrossoma-núcleo foi calculada com o *software* ImageJ Fiji, tendo-se traçado uma linha desde o centro do núcleo até ao centrossoma, de acordo com o descrito em Gonçalves et al, 2010.

Este resultado indica que o afastamento entre o centrossoma e o núcleo causado pela depleção da TBCCD1 se deve, pelo menos em parte, à destabilização dos microtúbulos, que foi compensada quando as células foram tratadas com um fármaco estabilizador dos mesmos, neste caso o taxol. A estabilização dos microtúbulos induzida pelo taxol reposicionou o centrossoma e o núcleo no centro das células hTERT-RPE-1.

Fazendo um paralelo para as condições celulares fisiológicas, estes resultados sugerem que a proteína TBCCD1 poderá desempenhar um papel na estabilização dos microtúbulos, contribuindo para o correto posicionamento do núcleo e do centróssoma. A depleção desta proteína parece causar a destabilização dos microtúbulos, provocando o afastamento entre o centróssoma e o núcleo, que foi compensada pela adição de taxol nestas experiências.





**Figura 31. O taxol induz a reversão do fenótipo de afastamento entre o centróssoma e o núcleo causado pela depleção da TBCCD1.** A – Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 controlo, nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 e nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 e sujeitas a 0,1 ou 0,2 nM de taxol. As células foram sujeitas às várias doses de taxol durante 24 h e, posteriormente, foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e marcadas com os anticorpos que reconhecem a pericentrina (marcador do centróssoma, a verde). Os núcleos foram marcados com DAPI. As cabeças de seta indicam os centróssomas. A barra de escala representa 10 μm. B – Representação da quantificação efetuada nas células controlo, nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 e nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 e sujeitas a 0,1 ou 0,2 nM de taxol para determinar a percentagem de células com uma distância entre o núcleo e o centróssoma superior a 2 μm. Os resultados apresentados correspondem a medições efetuadas em 3 experiências independentes, tendo-se contado um total de 481 células controlo, 373 células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1, 216 células transfetadas com siRNAs e tratadas com 0,1 nM de taxol e 405 células transfetadas com siRNAs e tratadas com 0,2 nM de taxol. O teste *one-way* ANOVA com *Tukey's post-hoc* para os 3 grupos em estudo (siRNA TBCCD1 vs siRNAs TBCCD1 + 0,1 nM taxol vs siRNAs TBCCD1 + 0,2 nM taxol) resultou em  $p < 0,01$ . \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

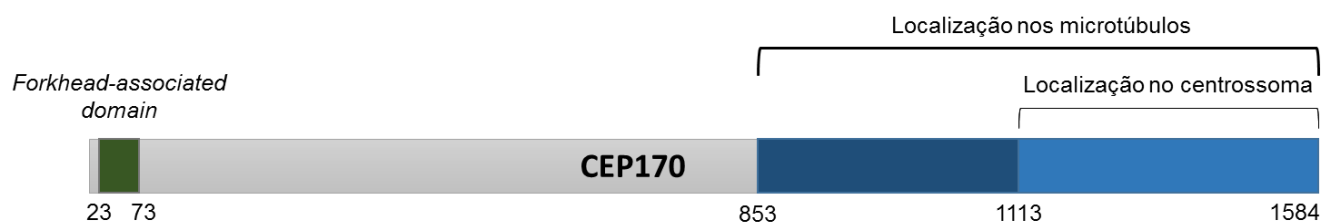
Assim, estes resultados sugerem fortemente que o TBCCD1 deverá ter um papel na regulação da dinâmica dos microtúbulos ou participar numa via envolvida na regulação da dinâmica destes polímeros, nomeadamente através da sua modificação pós-traducional ou através da regulação das proteínas a que associam, e no modo como eles interagem com o córtex da célula.



### 2.3. CEP170: uma proteína estabilizadora dos microtúbulos

Foi feita uma revisão da literatura com o objetivo de encontrar proteínas, nomeadamente proteínas associadas aos microtúbulos, que estabilizassem os microtúbulos, quer através de modificações pós-traducionais quer através da formação de feixes. Entre as proteínas descritas na literatura com estas funções, destacou-se a proteína centrossomal de 170 kDa, CEP170. Foi descrito que esta proteína se associa aos microtúbulos e que, quando sobreexpressa, promove a formação de feixes de microtúbulos, um fenótipo semelhante ao do taxol. A transfeção de células UO2S com o mutante C-terminal da CEP170, responsável pela ligação da proteína aos microtúbulos, provoca o afastamento do centrossoma em relação ao núcleo (Guarguaglini et al., 2005). A proteína CEP170 tem, na sua sequência, 3 domínios funcionais (Figura 32). Na região N-terminal, é formada pelo domínio FHA (forkhead-associated domain), cuja função se pensa ser estar relacionada com o reconhecimento de resíduos de serina e treonina passíveis de ser fosforilados/desfosforilados, estando presente em diversos cinases e fosfatases (Durocher and Jackson, 2002; Hofmann and Bucher, 1995; Li et al., 2000; Li et al., 2002) e, na região C-terminal, tem dois domínios funcionais, um associado à ligação aos microtúbulos e o outro à sua localização centrossomal (Guarguaglini et al., 2005). A sequência desta proteína contém ainda vários locais possíveis de sofrerem fosforilação. Esta proteína tem ainda 2 variantes resultantes de splicing alternativo.

Além de se ligar aos microtúbulos, a CEP170 localiza-se no centrossoma, onde se associa aos apêndices subdistais, localizando-se apenas no centríolo-mãe em células em interfase (Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012). Mais recentemente, foi também descrito que a bactéria *Chlamydia trachomatis*, um parasita intracelular, manipula a rede de microtúbulos da célula hospedeira, de modo a promover a sua entrada para o interior das células, através do recrutamento da proteína CEP170, que altera a rede de microtúbulos de modo a permitir a entrada e a replicação da bactéria nas células do hospedeiro (Dumoux et al., 2015).

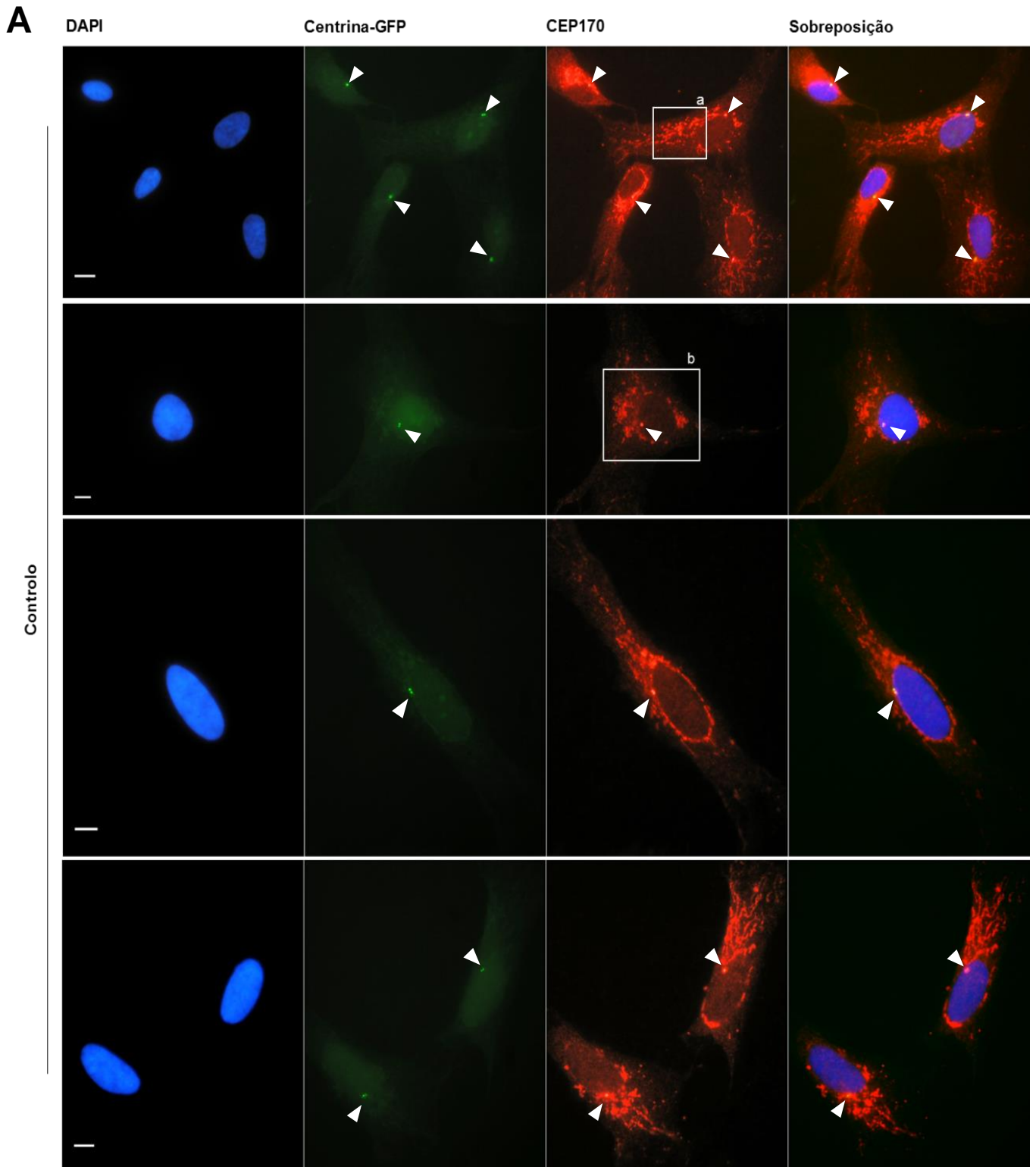


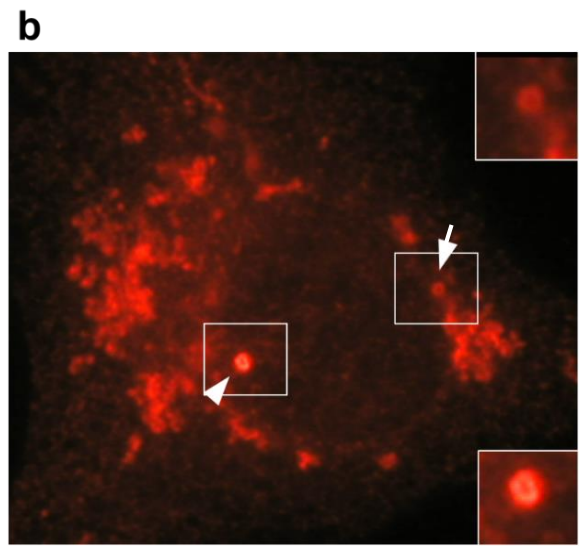
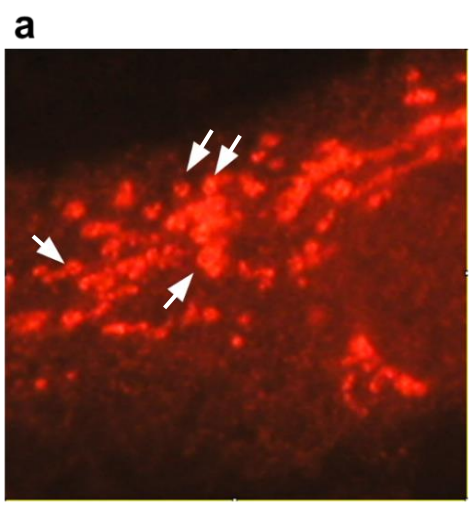
**Figura 32. Representação dos domínios funcionais da proteína associada aos microtúbulos CEP170.** A CEP170 possui 3 domínios funcionais: o FHA (*forkhead-associated domain*), entre os resíduos de aminoácidos 23 e 73, o domínio de localização nos microtúbulos, entre os resíduos 853 e 1584 e de localização no centróssoma, entre os resíduos 1113 e 1584.

Como referido anteriormente, a sobreexpressão da proteína CEP170 estabiliza os microtúbulos, causando a formação de feixes, à semelhança do taxol. Por outro lado, a sua depleção também leva ao afastamento entre o centróssoma e o núcleo, à semelhança da ausência da proteína TBCCD1 (Guarguaglini et al., 2005). Apesar de não parecer interagir diretamente com a TBCCD1 (Quadro 8), a proteína foi identificada na análise de espectrometria de massa, estando listada no *Raw Material*. Por outro lado, esta proteína parece estar também envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos, pelo que decidimos investigar se a depleção da TBCCD1 afetava a localização da proteína CEP170 nas células hTERT-RPE-1.

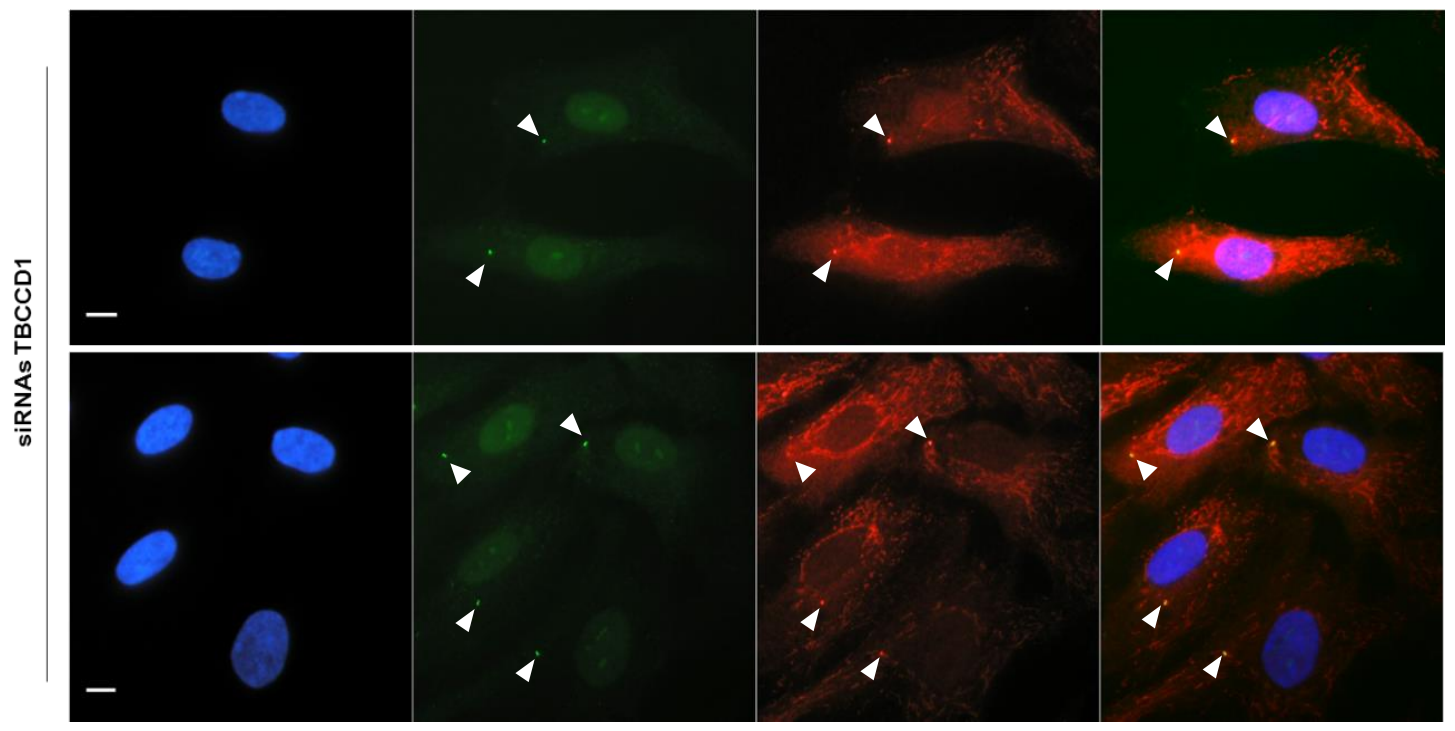
Por microscopia de imunofluorescência, observou-se que esta proteína se localiza no centróssoma das células hTERT-RPE-1 e, nas células controlo, se dispõe segundo um padrão bem definido, concentrando-se à volta do núcleo, maioritariamente do lado do centróssoma (Figura 33). Quando as células estão polarizadas e se identifica um possível *leading edge*, esta proteína localiza-se preferencialmente no sentido do *leading edge*, segundo o eixo núcleo-centróssoma (Figura 33). Observou-se ainda que esta proteína se dispõe em anéis no citoplasma das células, numa estrutura que lembra a da CEP170 associada aos apêndices subdistais do centríolo-mãe. Apesar de estar descrita como monomérica, esta proteína parece oligomerizar e formar estruturas em forma de anéis no citoplasma (Figura 33.B), que são mais abundantes quando esta se encontra em sobreexpressão mediana.

Com o objetivo de se identificar alguma interação funcional entre a TBCCD1 e a CEP170, procedeu-se à análise da localização desta proteína em células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. Observou-se que, quando se procede à depleção da proteína TBCCD1, o padrão da distribuição da CEP170 no citoplasma é dramaticamente afetado, desorganizando-se. De facto, em células depletadas de TBCCD1, a CEP170 encontra-se dispersa por todo o citoplasma, perdendo a sua localização preferencial no eixo núcleo-centróssoma (Figura 34). Esta proteína parece seguir os microtúbulos, quer em células hTERT-RPE-1 controlo quer em células depletadas de TBCCD1 e, nas últimas, parece seguir o centróssoma quando este não se localiza junto ao núcleo (Figura 33 e Figura 34).





**B**

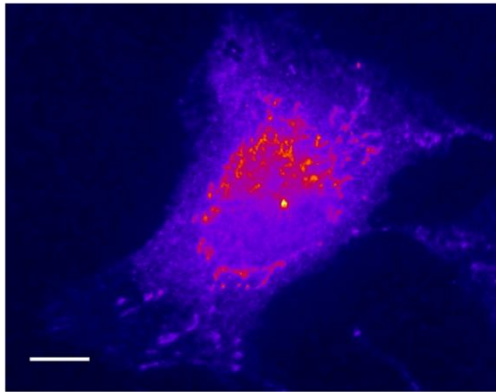


**Figura 33. A depleção da proteína TBCCD1 causa a dispersão da proteína CEP170 comparativamente com as células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo.** A – Imagens representativas da localização da proteína CEP170 em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo. Esta proteína localiza-se em torno do núcleo, preferencialmente junto ao centróssoma. Nas células controlo onde se identifica um possível *leading edge*, a CEP170 localiza-se na direção criada pelo eixo núcleo-centrússoma, no sentido do *leading edge*. a – Ampliação da zona delimitada (retângulo a branco) na primeira linha de imagens e assinalada com a letra a. b - Ampliação da zona delimitada (retângulo a branco) na segunda linha de imagens e assinalada com a letra b. A CEP170 associa-se aos apêndices sudistais do centríolo-mãe (indicado pela cabeça de seta), dispondo-se num círculo à volta do centrússoma. Esta proteína parece também dispor-se em anéis no citoplasma (indicado pelas setas), semelhantes ao modo como se associa e dispõe no centríolo-mãe. B – Imagens representativas da localização da proteína CEP170 em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. A depleção desta proteína causa a dispersão da CEP170 no citoplasma das células hTERT-RPE-1 centrina-GFP, perdendo a sua localização preferencial em torno do núcleo e do centrússoma e na direção do *leading edge*. As células hTERT-RPE-1 foram processadas para serem analisadas por imunofluorescência e foram marcadas com o anticorpo contra a CEP170 (a vermelho). O DNA foi marcado com DAPI. As setas indicam o centrússoma. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

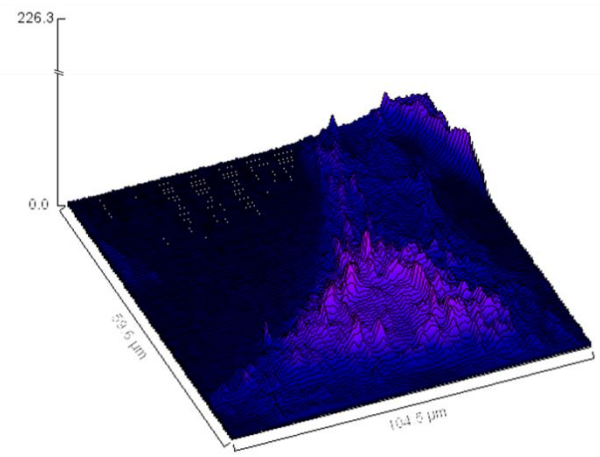
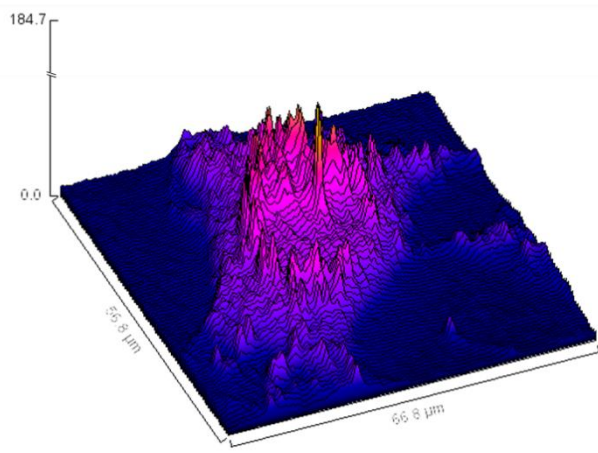
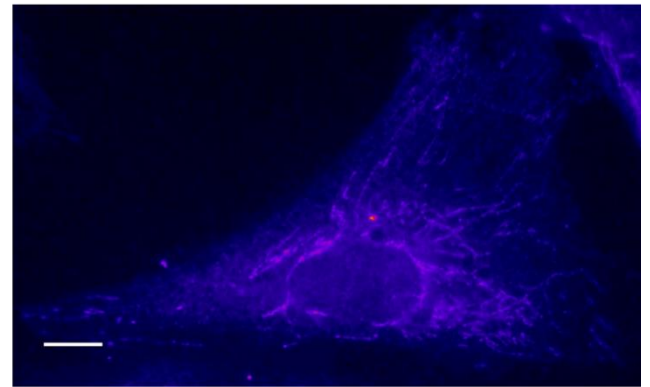
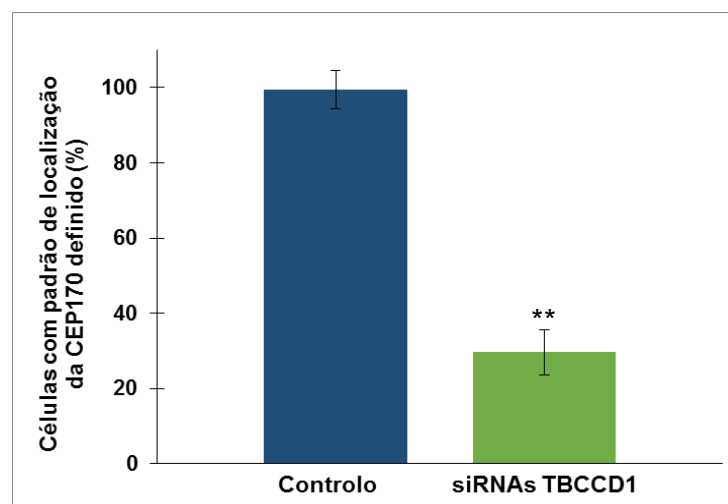
De forma a quantificar o fenótipo de dispersão da proteína CEP170 no citoplasma de células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 (Figura 33), tentou-se perceber qual o melhor método para definir a localização da CEP170 em células controlo. Para tal, procedeu-se a observação da localização da CEP170 em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo, tendo-se concluído que esta proteína se localiza, em 96,7 % das células, em torno do núcleo, preferencialmente do lado do centrússoma. Posteriormente, as células hTERT-RPE-1 centrina-GFP depletadas de TBCCD1 foram comparadas com as células controlo tendo em conta esta localização da CEP170 num padrão em torno do núcleo e do centrússoma. Observou-se que em apenas 29,6 % das células depletadas de TBCCD1 a CEP170 se dispõe segundo um padrão semelhante ao das células controlo, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Figura 34). Assim, conclui-se que a depleção de TBCCD1 causa a perda do padrão de localização preferencial da CEP170 em torno do núcleo e do centrússoma, em células hTERT-RPE-1.

**A**

Controlo



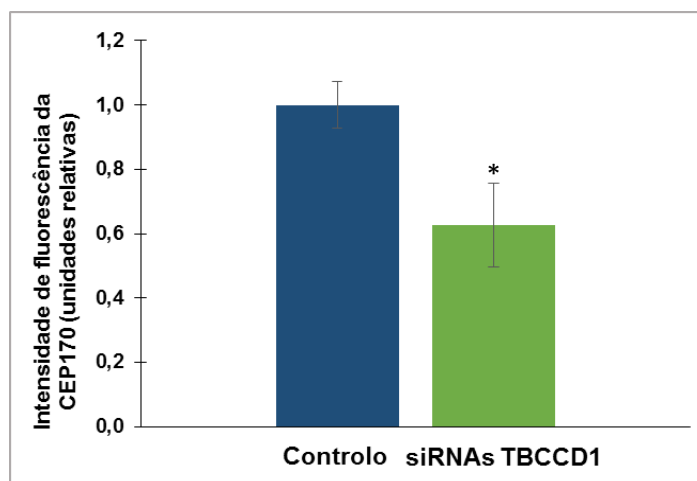
siRNAs TBCCD1

**B**

**Figura 34. A depleção da proteína TBCCD1 afeta o padrão de localização da proteína CEP170 observado em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP controlo.** A - Imagens representativas das células controlo (à esquerda) e sujeitas a siRNAs específicos para a proteína TBCCD1 (à direita). As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e marcadas com o anticorpo contra a CEP170 (a vermelho). Posteriormente, as imagens das células foram coloridas artificialmente com o *software* ImageJ, de modo a evidenciar as zonas com maior intensidade de pixéis (a vermelho) e que correspondem às zonas com maior intensidade de CEP170. As imagens em 3D das células foram também obtidas recorrendo ao *software* ImageJ Fiji. A barra de escala representa 10  $\mu$ m. B – Representação da quantificação em percentagem de células controlo e transfetadas com siRNAs com um padrão de localização da CEP170 definido. Os resultados apresentados correspondem a medições efectuadas em 3 experiências independentes, tendo-se contado um total de 399 células controlo e 272 células sujeitas a siRNA. \*  $p < 0,001$ .

Pela análise da localização da CEP170 nas células depletadas de TBCCD1 (Figura 33 e 34) observou-se que esta, para além de estar dispersa no citoplasma, tinha uma menor intensidade de fluorescência, o que poderia indicar que a ausência de TBCCD1 levava à diminuição dos níveis celulares de CEP170. De modo a averiguar se esta diminuição era consequência da dispersão da CEP170 no citoplasma ou se os seus níveis eram inferiores nas células depletadas, mediu-se a intensidade de fluorescência das células individualizadas com recurso ao *software* ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012). Para tal, as células foram cuidadosamente circundadas e foi medida a intensidade de fluorescência da célula e do *background*. Estes valores foram subtraídos e o resultado, que corresponde à intensidade “real” da célula, foi dividido pelo desvio de intensidades da célula, isto é, o desvio entre as intensidades máxima e mínima medidas na célula. Obteve-se assim a fluorescência total corrigida da célula (*corrected total cell fluorescence*, CTCF) (Burgess et al., 2010; McCloy et al., 2014).

Observou-se que a intensidade total de fluorescência corrigida das células depletadas de TBCCD1 era cerca de 1,6 vezes inferior à das células controlo (Figura 35). Este resultado sugere que a depleção de TBCCD1 causa uma diminuição dos níveis de CEP170 em células hTERT-RPE-1. Esta diminuição parece ser uma consequência indireta da depleção da TBCCD1, pois esta proteína não foi identificada como sendo uma proteína interatuante da TBCCD1 (Quadro 8). No entanto, este resultado tem ainda de ser confirmado por *western-blot* para ser conclusivo.



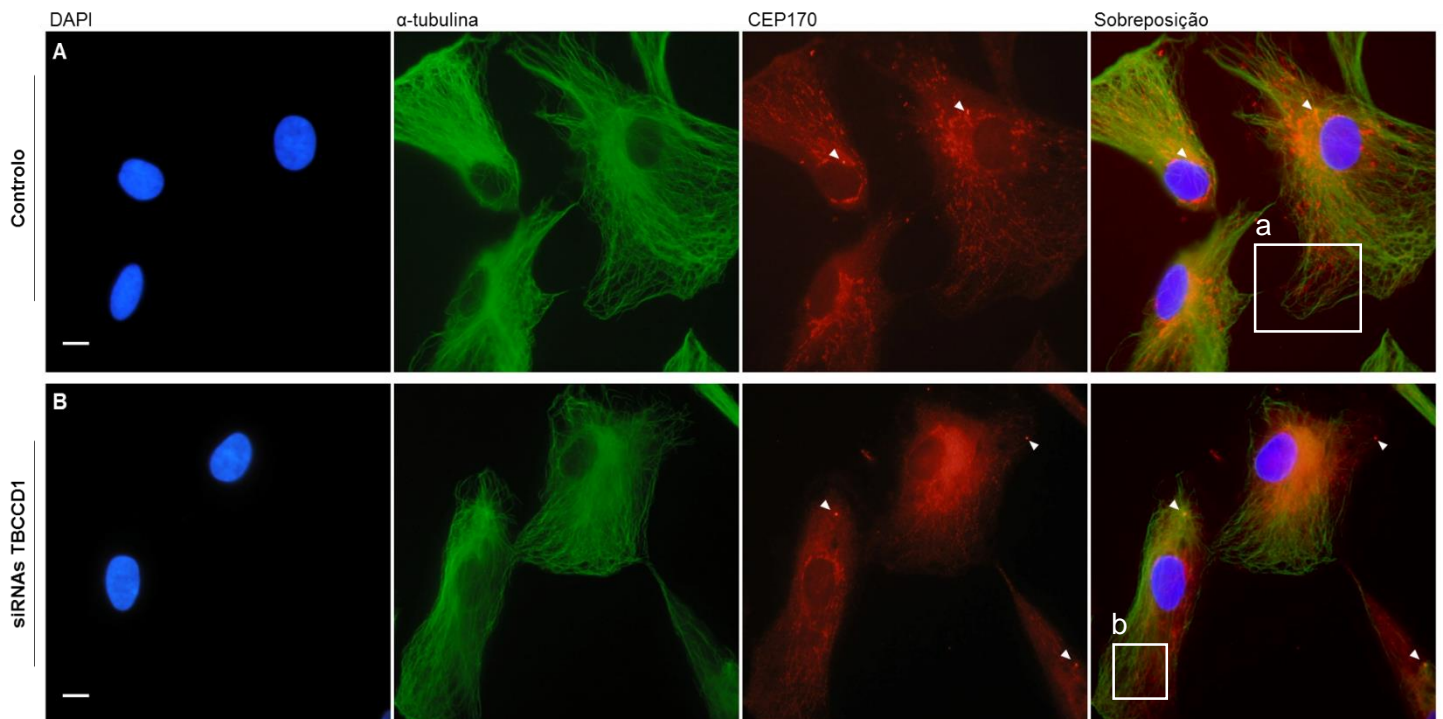
**Figura 35. A depleção da proteína TBCCD1 causa a diminuição dos níveis de CEP170 em células hTERT-RPE-1.** Representação da quantificação da intensidade de fluorescência total corrigida (CTCF) das células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 relativamente às células controlo. As células hTERT-RPE-1 foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e marcadas com o anticorpo contra a CEP170. Posteriormente, as células foram marcadas com recurso ao *software* ImageJ Fiji e foi medida a sua intensidade de fluorescência e a do *background*. Estes valores foram subtraídos e o resultado foi dividido pelo desvio de intensidades máximas e mínimas de cada célula, de modo a obter o valor de CTCF. Os resultados apresentados correspondem a medições efectuadas em 3 experiências independentes, tendo-se contado um total de 342 células controlo e 288 células sujeitas a siRNAs específicos para a TBCCD1. \*  $p < 0,05$ .

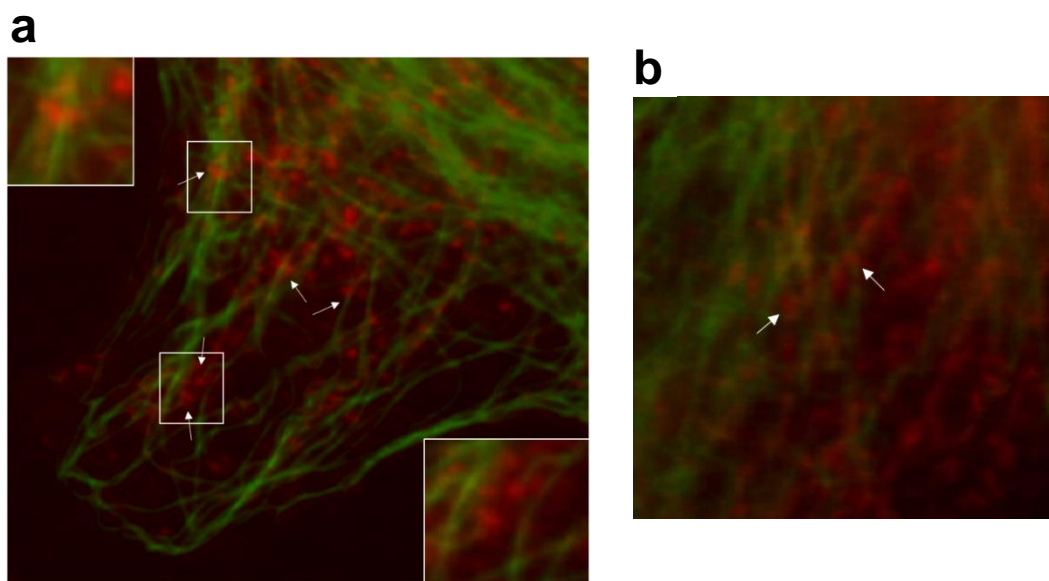
Os resultados obtidos permitem concluir que a depleção da TBCCD1 afeta a distribuição da CEP170 na célula e, provavelmente, também os seu níveis. Este fenótipo parece ser causado por uma interação indireta, como referido anteriormente. Pela análise do padrão de localização da proteína CEP170 em células controlo pode-se observar que a distribuição desta proteína se assemelha à distribuição dos microtúbulos na célula, que se localizam essencialmente na região à volta do núcleo e do centróssoma. Foi já descrito que esta proteína se associa com os microtúbulos em células U2OS (células humanas de osteossarcoma) e que a sua depleção nestas células e em células HeLa causa a alteração da rede de microtúbulos (Guarguaglini et al., 2005), o que sugere que a CEP170 também se associe aos microtúbulos em células hTERT-RPE-1. Assim sendo, a depleção da TBCCD1 pode causar uma alteração na rede de microtúbulos, o que também é sugerido pelos resultados com o taxol, provocando, indiretamente, a dispersão e diminuição da proteína CEP170.



De forma a observar se a CEP170 também se associa com os microtúbulos em células hTERT-RPE-1, foi analisada a sua distribuição em células normais e depletadas de TBCCD1 marcadas também com um anticorpo contra a  $\alpha$ -tubulina. Como se observa na Figura 36, a proteína CEP170 (marcada a vermelho) está associada com os microtúbulos, visualizados através de um anticorpo contra a  $\alpha$ -tubulina (marcada a verde) em algumas zonas da célula, preferencialmente junto ao centróssoma e ao núcleo. A CEP170 parece seguir alguns microtúbulos de espessura reduzida (possivelmente, apenas um microtúbulo) e dispor-se em torno de alguns microtúbulos, numa estrutura em forma de anéis, como se observa na Figura 33 a e b. Esta estrutura parece dispor-se em torno de vários microtúbulos, sugerindo que talvez seja através desta associação que a CEP170 promove a estabilização dos microtúbulos e formação de feixes (Figura 36 a e b).

Quando as células foram transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 observou-se que a proteína CEP170 perde a sua localização preferencial, como referido anteriormente, no entanto, não é claro se perde a sua associação com os microtúbulos (Figura 36 b).



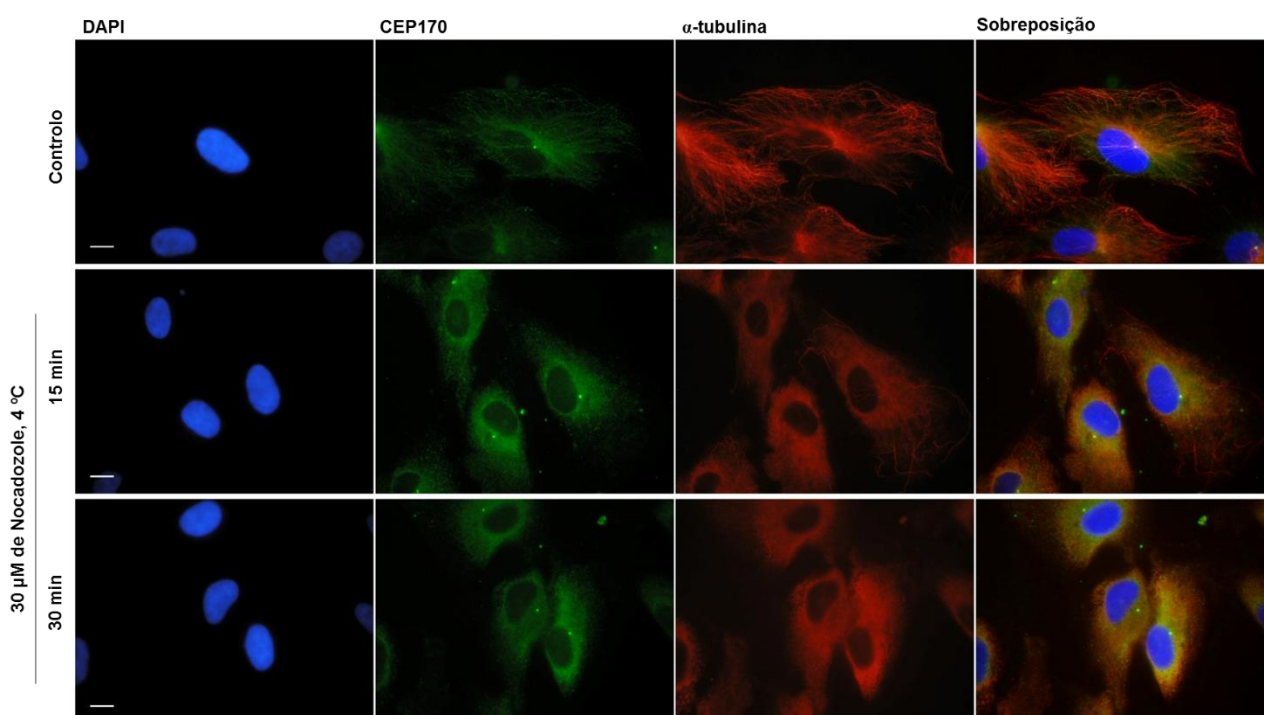


**Figura 36. Padrão de localização da CEP170 relativamente aos microtúbulos, em células hTERT-RPE-1.** Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 controlo e das células transfetadas com siRNAs contra a TBCCD1. As cabeças de setas indicam a CEP170 no centrosoma. a – Ampliação da zona delimitada (retângulo branco) com a letra a nas células controlo. b - Ampliação da zona delimitada (retângulo branco) com a letra b nas células tranfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. Nas duas ampliações destaca-se a associação entre a CEP170 e os microtúbulos (assinalado com setas). As células foram processadas para serem analisadas por imunofluorescência e foram marcadas com os anticorpos contra a  $\alpha$ -tubulina (a verde) e a CEP170 (a vermelho). O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

Por outro lado, as células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 parecem ter uma organização diferente dos microtúbulos. Ao contrário das células controlo, em que a rede de microtúbulos está dispersa de forma aproximadamente semelhante por todo o citoplasma, nas células depletadas de siRNAs, os microtúbulos parecem dispor-se preferencialmente de um lado das células. Os resultados anteriores sugerem que a TBCCD1 afeta a dinâmica dos microtúbulos podendo, dessa forma, alterar a sua organização espacial na célula. No entanto, será necessário analisar um maior número de células e quantificar este fenótipo de modo a perceber qual o papel da TBCCD1 na organização da rede de microtúbulos.

De forma a perceber se a localização da CEP170 nas células hTERT-RPE-1 depende dos microtúbulos e para confirmar que esta proteína interage com a  $\alpha$ -tubulina,

trataram-se as células com 30  $\mu\text{M}$  do agente despolimerizante de microtúbulos nocadozole durante 15 e 30 minutos em gelo. Quando as células foram expostas a nocadozole os microtúbulos sofreram despolimerização e formou-se uma *pool* citoplasmática de  $\alpha$ -tubulina (Figura 37). Observou-se que a proteína CEP170 também perdeu o seu padrão de localização nas células, ficando dispersa no citoplasma, tal como acontece com a  $\alpha$ -tubulina. Este resultado demonstra que a proteína CEP170 interage com os microtúbulos, perdendo o seu padrão quando as células são expostas a nocadozole.

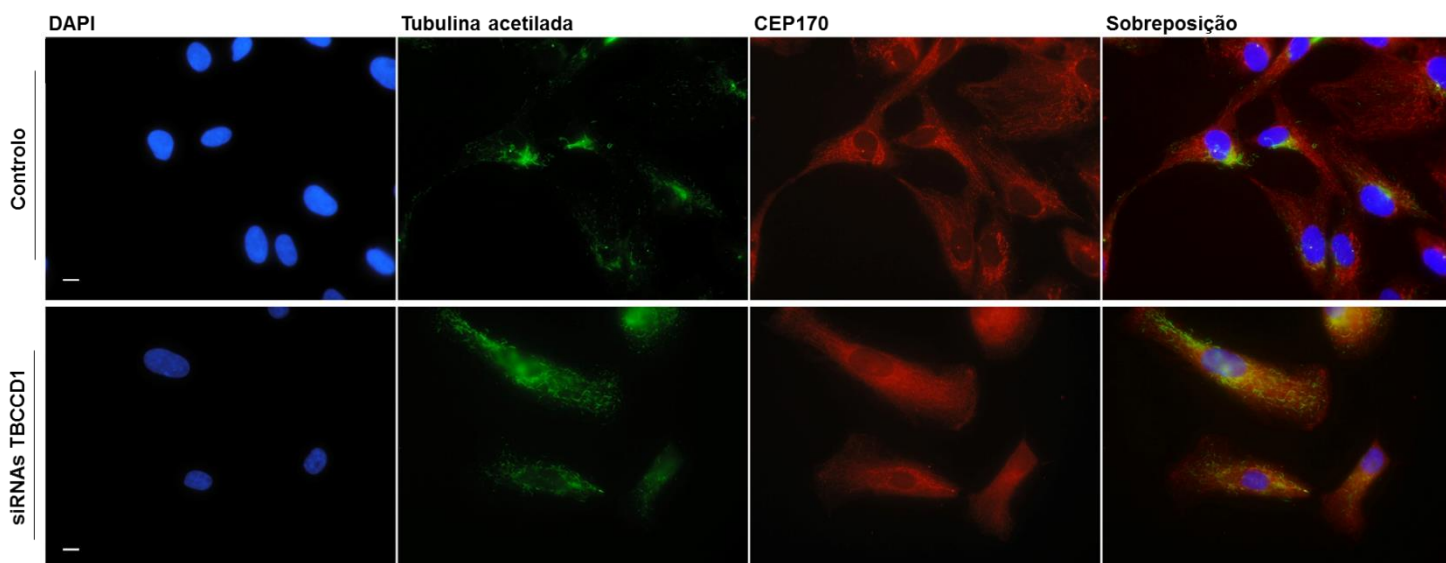


**Figura 37. Análise do padrão de localização da CEP170 em células hTERT-RPE-1 centrina-GFP tratadas com nocadozole.** Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 expressando constitutivamente a centrina controlo e das células sujeitas a 30  $\mu\text{M}$  de nocadozole, a 4  $^{\circ}\text{C}$ , durante 15 e 30 min. De seguida foram processadas para microscopia de imunofluorescência tendo sido fixadas com metanol e marcadas com os anticorpos específicos para a CEP170 (a verde) e a  $\alpha$ -tubulina (a vermelho). O DNA foi corado com DAPI. É possível ver o cenrossoma marcado a verde através da localização da centrina-GFP. A barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

Tal como foi descrito para as células HeLa e U2OS (Guarguaglini et al., 2005), também em células hTERT-RPE-1 se observou que a proteína CEP170 se associa aos microtúbulos, preferencialmente aos que se dispõem em torno do núcleo e junto ao centróssoma, ou seja, está associada a uma subpopulação de microtúbulos. Estes resultados indicam que, de algum modo, esta subpopulação de microtúbulos têm de ser distinta da restante rede de microtúbulos, o que leva a CEP170 a associar-se apenas a estes e não a todos os filamentos. Uma das hipóteses seria a de que estes microtúbulos distintos estejam modificados pós-traducionalmente, que os distingue dos restantes. Pensa-se que a acetilação dos microtúbulos causa a sua estabilização e, por outro lado, a CEP170 estabiliza os microtúbulos. Assim, de modo a testar a hipótese de que esta subpopulação à qual a CEP170 se associa corresponde a microtúbulos acetilados, repetiu-se a experiência feita com a  $\alpha$ -tubulina mas utilizando um anticorpo contra a tubulina acetilada.

Como se observa na Figura 38, a CEP170 não co-localizou com a tubulina acetilada. Nas células controlo a tubulina acetilada está concentrada em torno do centróssoma, tal como a CEP170, no entanto, a CEP170 não se localiza apenas na região onde se encontra a tubulina acetilada, o que sugere que esta proteína não se associa a esta subpopulação de microtúbulos.

Nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 parece haver uma dispersão da tubulina acetilada. Enquanto que nas células controlo esta subpopulação de microtúbulos acetilados se localiza maioritariamente em torno o centróssoma, no centro da célula, nas células depletadas de TBCCD1 estes microtúbulos parecem estar dispersos por todo o citoplasma (Figura 38). Esta alteração na distribuição dos microtúbulos acetilados causada pela depleção da TBCCD1 pode ser explicada por a TBCCD1 alterar indiretamente a dinâmica da rede de microtúbulos, por exemplo através do desacetilase Sirt1, que é uma das proteínas com que interage (Quadro 8). Em resposta a esta alteração da dinâmica da rede microtúbulos, poderá ocorrer uma modificação do padrão de microtúbulos acetilados, sendo provavelmente o resultado de uma tentativa de reajustar o balanço de forças exercidas pelos microtúbulos na periferia da célula e que se encontra desregulada devido ao posicionamento do centróssoma fora do centro da célula. No entanto, será necessário analisar um maior número de células e quantificar este fenótipo.



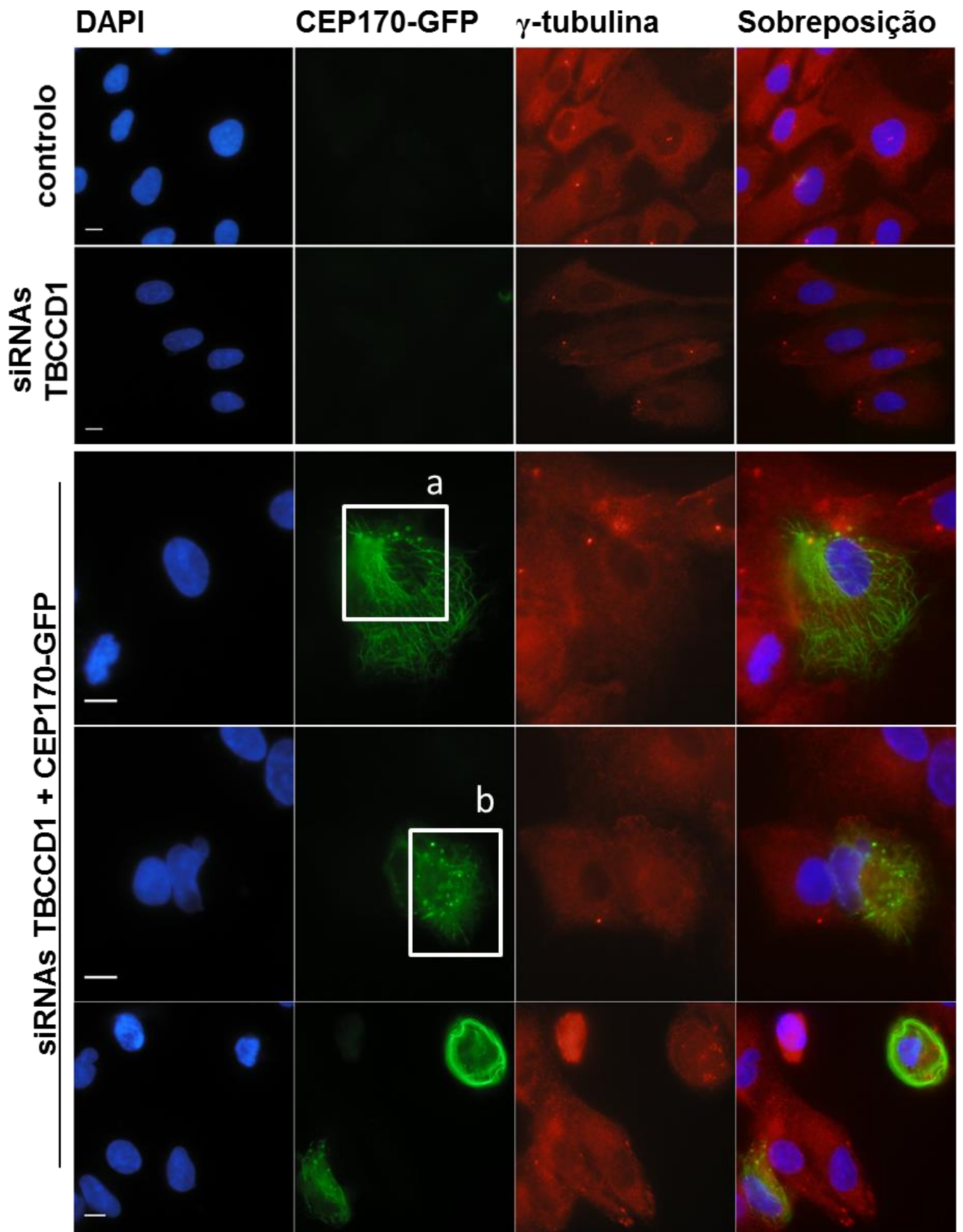
**Figura 38. Padrão de localização da CEP170 com os microtúbulos modificados pós-traducionalmente por acetilação, em células hTERT-RPE-1.** A - Imagens representativas das células hTERT-RPE-1 controlo e das células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e foram marcadas com os anticorpos contra a tubulina acetilada (a verde) e a CEP170 (a vermelho). O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

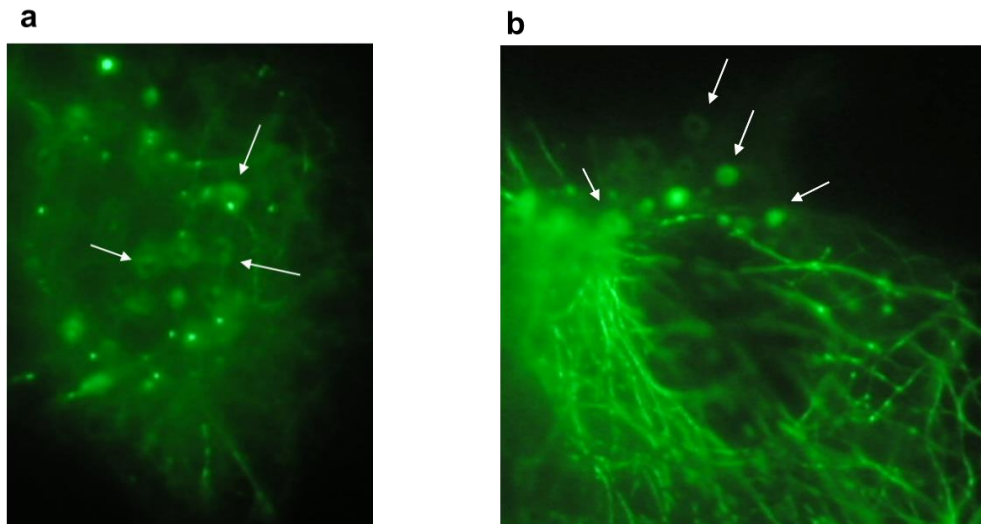
Como referido anteriormente, a sobreexpressão da proteína CEP170 estabiliza os microtúbulos, induzindo a formação de feixes, à semelhança do taxol (Guarguaglini et al., 2005; Horwitz, 1994). Assim, seria de esperar que esta proteína também fizesse a reversão do fenótipo de afastamento do centrossoma relativamente ao núcleo, causado pela depleção da proteína TBCCD1. De forma a observar se havia ou não reversão do fenótipo, as células sujeitas aos siRNAs foram transfetadas com um plasmídeo com a sequência da proteína CEP170 em fusão à GFP (consultar III.4.2).

Como descrito na literatura, observou-se que em células hTERT-RPE-1 a sobreexpressão da proteína CEP170 também causa a formação de feixes nos microtúbulos (Figura 39). À semelhança do taxol, quando se formam feixes em grande extensão as células diminuem de tamanho e a morfologia dos núcleos é afetada (Figura 39). Este efeito tornou difícil a observação e quantificação do fenótipo de afastamento do centrossoma relativamente ao núcleo porque, como as células contraem, o tamanho do citoplasma diminui o que faz com que o centrossoma fique mais perto do núcleo. Por outro lado, a eficiência de transfeção destas células é baixa (cerca de 25 %) e os níveis

de CEP170 na célula são difíceis de controlar. Deste modo, esta proteína ou está pouco expressa ou, na maioria das células, os seus níveis são já suficientemente elevados para induzir a formação de feixes, tornando difícil a análise do fenótipo. Nas células em que se observaram feixes de microtúbulos foi, ainda, particularmente difícil detetar o centróssoma. Estes problemas experimentais condicionaram esta experiência, tornando impossível a quantificação do número de células em que se observou afastamento do centróssoma relativamente ao núcleo.

Observou-se ainda que, quando sobreexpressa em baixas quantidades não causando a formação excessiva de feixes, a CEP170 parece dispor-se em complexos em forma de anéis no citoplasma, à semelhança do que foi observado nas células em condições fisiológicas (Figura 33). Estas estruturas são semelhantes ao modo como a CEP170 se associa aos apêndices sub-distais do centríolo-mãe e parecem sugerir que esta proteína pode oligomerizar e formar estes complexos em torno dos microtúbulos ou no citoplasma, principalmente quando sobreexpressa (Figura 33, Figura 36 e Figura 39).





**Figura 39. Análise do afastamento do centrossoma do núcleo em células hTERT-RPE-1 causado pela depleção da proteína TBCCD1 no contexto da sobreexpressão da proteína CEP170.** A – Imagens representativas de células HTERT-RPE-1 controle, sujeitas a siRNAs específicos para a TBCCD1 e sujeitas a siRNAs específicos para a TBCCD1 e transfetadas com o plasmídeo contendo a sequência codificante da CEP170 em fusão com a GFP. As células foram processadas para serem analisadas por microscopia de imunofluorescência e marcadas com o anticorpo que reconhece a  $\gamma$ -tubulina (a vermelho). As setas indicam as estruturas em formas de anéis de CEP170 no citoplasma das células hTERT-RPE-1. O DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala representam 10  $\mu$ m.

Estes resultados sugerem que a TBCCD1 tem um papel estabilizador nos microtúbulos. Assim, o afastamento do centrossoma em relação ao núcleo em hTERT-RPE-1 causado pela destabilização dos microtúbulos, como resultado da depleção da TBCCD1, parece ser parcialmente regulado pela dinâmica dos microtúbulos, mais concretamente de uma sobpopulação em torno do núcleo à qual a CEP170 se associa.



## VI. DISCUSSÃO

### 1. Estudo das proteínas interatuantes da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2: a abordagem utilizada

As células mantêm a sua integridade e funções à custa de complexos processos biológicos, rigorosamente regulados. Para perceber estes processos, é fundamental perceber quais as funções das proteínas envolvidas nos mesmos. Nos últimos anos têm-se vindo a compreender que, apesar de já se ter identificado um elevado número de proteínas e de se ter estudado as suas estruturas, as suas funções só podem ser elucidadas a partir do estudo do interactoma, isto é, da rede de proteínas com que interagem na célula.

Existem várias técnicas para estudar o interactoma de proteínas, como a purificação por afinidade molecular e o sistema *yeast two-hybrid* (Y2H), que têm sido amplamente utilizadas para estudar a interação entre proteínas. O sistema Y2H utiliza a expressão de genes repórter que só são transcritos quando a proteína de interesse se liga à proteína interatuante, que está fundida com um domínio promotor requerido para a transcrição do gene repórter. Esta técnica tem como desvantagem a alteração do microambiente das células, porque este sistema é feito em levedura pelo que, para a maioria dos casos, é heterólogo. Assim as proteínas em estudo, que podem ter outras origens, poderão não ter a capacidade de adquirir o seu *folding* correto, ou não serem alvo de modificações pós-traducionais que acontecem normalmente no seu ambiente biológico, o que levará a impossibilidade de identificar algumas interações. Esta desvantagem é particularmente importante quando as proteínas em estudo são membranares (Galletta and Rusan, 2015). Uma outra técnica, a purificação por afinidade molecular, baseia-se na co-imunoprecipitação de proteínas, em geral, marcadas com uma *tag*. Esta técnica tem, no entanto, duas limitações: por um lado, as condições necessárias para solubilizar as proteínas não são, muitas vezes, compatíveis com as interações entre as proteínas interatuantes e, por isso, perdem-se as interações mais fracas. Por outro lado, é difícil detetar proteínas pouco abundantes devido ao limite de deteção das técnicas utilizadas e à dificuldade de preparação de amostras em larga escala. Recentemente foi também desenvolvido um método de *crosslinking* para estabilizar os complexos proteicos antes de ser feita a imunoprecipitação (Kubben et al, 2010), o que melhora esta estratégia. No entanto, este método tem a desvantagem de introduzir mais variáveis no sistema, o que pode levar à criação de artefactos (Roux, 2013).

Neste trabalho teve-se como objetivo, como referido anteriormente, estudar as proteínas TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 e proteínas interatuantes num ambiente o mais próximo possível do fisiológico. Para tal, recorreu-se à técnica BiOLD, que se baseia, como descrito anteriormente, na expressão de uma proteína de fusão com o ligase de biotina com atividade enzimática promíscua (BirA\*), que leva à biotinição seletiva das proteínas que estão na sua proximidade e, portanto, com quem a proteína de interesse interage. Após a biotinição, as proteínas biotiniladas são purificadas por cromatografia de afinidade para a biotina e identificadas por espectrometria de massa. Esta técnica foi pela primeira vez utilizada com sucesso para identificar proteínas interatuantes da proteína lamina A, um constituinte da membrana nuclear (Roux et al., 2012). Foi também já utilizada com sucesso para proteínas do centróssoma, como por exemplo, a PLK4 e a CEP192, e outras proteínas celulares (Dingar et al., 2015; Firat-Karalar et al., 2014; Lambert et al., 2015). Estes estudos demonstram a eficácia desta técnica no estudo de interações entre proteínas, particularmente de proteínas centrossomais, ao contrário dos outros métodos. Em geral, quando se centrifugam as células para se proceder à extração proteica, o centróssoma é arrastado para o *pellet* juntamente com o núcleo devido à sua interação, constituindo uma fração insolúvel. Assim, as técnicas bioquímicas dificilmente podem ser aplicadas a proteínas centrossomais, pois a manutenção do estado nativo das proteínas não é compatível com a preparação de extratos totais uma vez que a sua solubilização requer agentes desnaturantes. No método de BiOLD, a preparação dos extratos proteicos a usar na identificação das proteínas interatuantes não necessita que as proteínas estejam no seu estado nativo, pois não são selecionadas por afinidade mas sim por estarem biotiniladas, o que resultou da sua interação quando se encontravam *in vivo*. Assim, é possível preparar facilmente extratos proteicos totais, eliminando a hipótese de se perder o centróssoma e o núcleo durante a manipulação experimental. Por outro lado, muitas das proteínas centrossomais têm tendência a precipitar sendo perdidas nas imunoprecipitações, o que também é evitado com este método.

## **2. As funções da proteína centrossomal TBCCD1**

A proteína centrossomal TBCCD1 tem um papel importante no correto posicionamento do centróssoma relativamente ao núcleo e no normal funcionamento das células (Gonçalves et al., 2010a). Foi observado que, em células hTERT-RPE-1, a

depleção desta proteína causa o afastamento do centróssoma relativamente ao núcleo, a desfragmentação do complexo de Golgi, um aumento do tamanho das células, um atraso na migração e no ciclo celular e, ainda, que as células são menos eficientes na montagem dos cílios. No entanto, apesar do afastamento significativo entre o centróssoma e o núcleo, o centróssoma das células depletadas de TBCCD1 mantém a sua capacidade de nucleação dos microtúbulos, o que mostra que a proteína TBCCD1 não está envolvida neste processo (Gonçalves, 2010; Goncalves et al., 2010a).

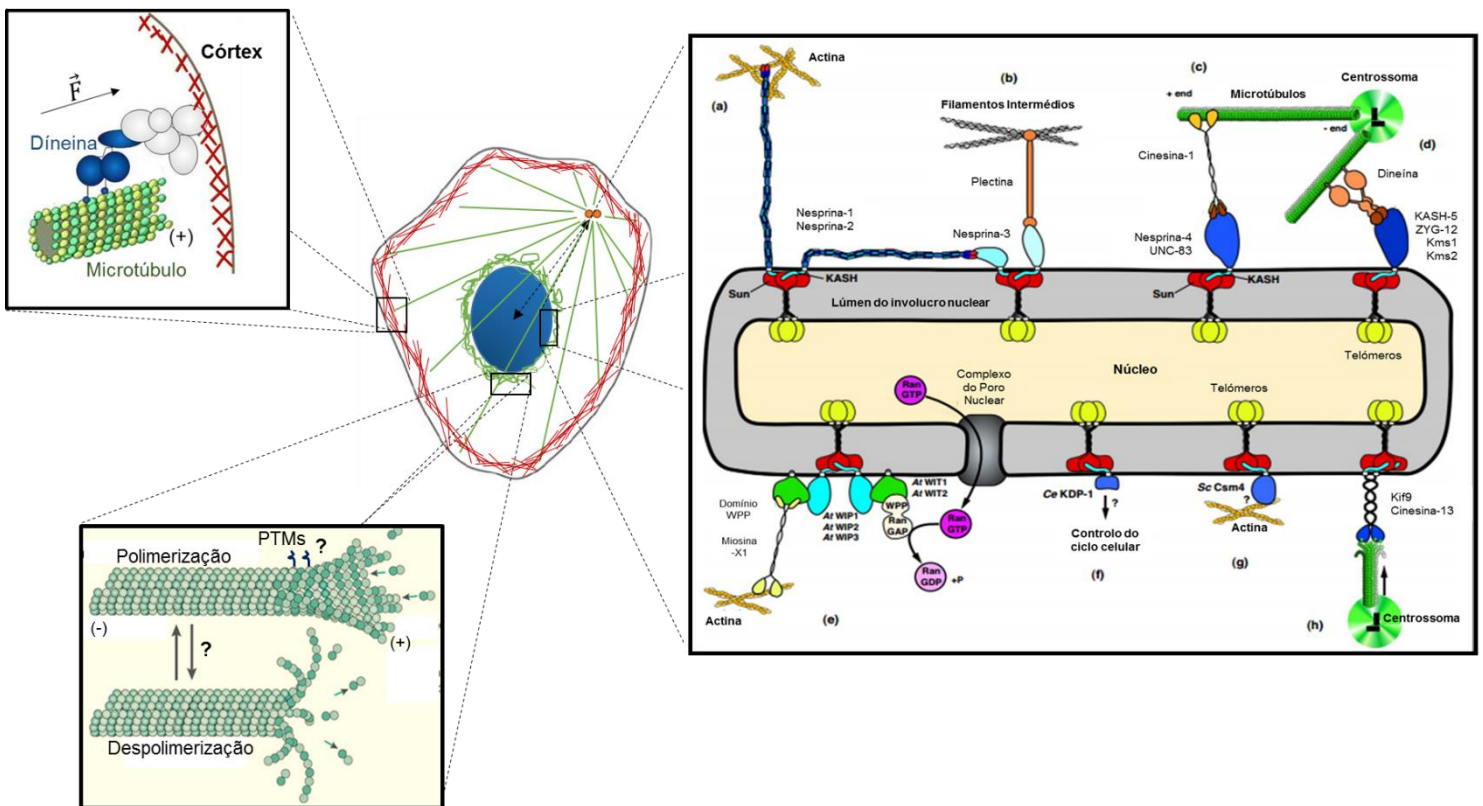
Estes resultados foram obtidos por transfeção das células hTERT-RPE-1 com uma mistura de quatro siRNAs que causam a depleção da proteína TBCCD1 e também das suas variantes de *splicing*, que não tinham sido ainda identificadas. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho para as proteínas candidatas a interagir com a TBCCD1 e a TBCCD1 variante 2, os fenótipos observados em Gonçalves et al. (2010) parecem dever-se, principalmente, à depleção da primeira. Com efeito, observou-se que a TBCCD1 interage com diversas proteínas, que estão sobretudo envolvidas e localizadas no centróssoma, nos microtúbulos e nas junções aderentes, enquanto que a variante 2 parece interagir principalmente com *chaperones* moleculares, com proteínas mitocondriais e dos cinetocoros/centrómeros (Quadro 8 e Quadro 9). Desta forma, o afastamento do centróssoma relativamente ao núcleo parece estar principalmente relacionado com a diminuição dos níveis da TBCCD1, excepto o atraso/bloqueio da divisão celular que pode estar também relacionado com erros a nível dos cinetocoros. Os resultados obtidos para o interactoma da TBCCD1 variante 2 sugerem ainda a possibilidade da existência de outros fenótipos dependentes desta proteína e diferentes dos observados em Gonçalves et al. (2010) envolvendo alterações a nível dos mitocôndrios e dos centrómeros, que ainda não foram analisados. Assim sendo, é possível que a depleção da TBCCD1 e da variante 2 tenham um impacto mais dramático no funcionamento das células do que previamente observado, nomeadamente em organelos que ainda não foram analisados ou durante a mitose.

De fato, foi observado que a TBCCD1 parece interagir com um elevado número de proteínas, com funções muito variadas nas células. Assim, seria de esperar que se observassem com mais clareza alterações em algumas estruturas celulares causadas pela depleção desta proteína como, por exemplo, no citoesqueleto de actina. A ausência de fenótipos claros pode dever-se ao fato de esta proteína ser muito estável e ter um tempo de semivida na célula elevado, o que faz com que os seus níveis nas células transfetadas com siRNAs específicos para a TBCCD1 se mantenham aproximadamente a 40 % dos níveis nas células controlo (Gonçalves, 2010). A TBCCD1 que permanece na célula pode ser suficiente para sustentar as funções e as vias celulares mais importantes e, por isso, as células não apresentam alterações mais dramáticas.

Por outro lado, muitas das proteínas interatuantes da TBCCD1 têm uma funções específicas e importantes nas células neuronais, nomeadamente nos axónios, e em células polarizadas, como as dos epitélios. Assim, alguns possíveis fenótipos, nomeadamente no citoesqueleto de actina, poderão ser mais facilmente observados nestes tipos de células do que em células hTERT-RPE-1. Apesar de as células hTERT-RPE-1 serem polarizadas, para as experiências de transfeção com siRNAs é necessário cultivar as células com uma confluência muito baixa e, nesta situação, as junções célula-célula estão pouco ativas. Várias das proteínas que interagem com a TBCCD1 têm um papel importante na integridade das junções celulares e, por isso, é possível que as alterações a nível do citoesqueleto de actina e de microtúbulos ocorram de modo localizado nas junções, o que não foi analisado neste trabalho. Algumas das proteínas interatuantes da TBCCD1 estão também envolvidas na mitose, nomeadamente durante o processo de citocinese, como a RACGAP1, que está envolvida na formação do anel contrátil de miosina e na ligação do corpo mediano à membrana celular. A depleção da TBCCD1 pode, por isso, causar alterações na rede de microtúbulos e de actina durante o processo de mitose, o que também não foi abordado neste trabalho, pois o número de células depletadas de TBCCD1 a dividir-se é praticamente nulo, uma vez que a diminuição dos níveis de proteína causa um atraso ou mesmo a paragem do ciclo celular (Goncalves et al., 2010a). Este atraso/paragem do ciclo está, provavelmente, relacionado com o papel da TBCCD1 na estabilização do fuso mitótico, através, por exemplo, das proteínas HAUS3 e CNTROB e na citocinese, via KI14 e KIF23, entre outras (Quadros 8 e 9).

O fenótipo de afastamento do centrossoma e do núcleo causado pela depleção da TBCCD1 pode ser explicado por três hipóteses (Figura 40). Por um lado, a TBCCD1 pode estabelecer uma ligação física entre o centrossoma e o núcleo e, por isso, a sua depleção leva ao aumento da distância entre os dois ou, por outro lado, a TBCCD1 pode regular a dinâmica do citoesqueleto, nomeadamente de uma subpopulação de microtúbulos, que controlam o posicionamento do centrossoma em relação ao núcleo. Quando a TBCCD1 é depletada, a dinâmica desta rede de microtúbulos fica desregulada, causando o afastamento entre o centrossoma e o núcleo. A distância entre o centrossoma e o núcleo pode ainda ser regulada por um balanço de forças exercidas pelos microtúbulos no córtex e no centro das células (no centrossoma) e pelos filamentos de actina, principalmente do córtex das células e na zona perinuclear, onde estão ligadas aos microtúbulos, e este balanço ficar desregulado pela depleção de TBCCD1 (Figura 40). Existem outros fatores, como a despolimerização dos microtúbulos, a sobreexpressão de algumas proteínas, como a CEP170, e a depleção de outras, como o complexo de proteínas SUN e KASH que, à semelhança da depleção da

TBCCD1, provocam o afastamento do centróssoma em relação ao núcleo (Broers et al., 2006; Burakov and Nadezhdina, 2013; Chang et al., 2013; Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012). Sabe-se por isso, que a posição relativa do centróssoma e do núcleo dependem sobretudo da dinâmica da rede de microtúbulos e das forças que exercem no córtex e no centro da célula, nomeadamente através de proteínas motoras, como a dineína (Burakov et al., 2003; Laan et al., 2012). Sabe-se também que a posição do centróssoma e do núcleo está relacionada indiretamente com o citoesqueleto de actina pois, apesar de não estar descrita nenhuma proteína de ligação física entre o centróssoma e os microtúbulos, existem várias proteínas que estabelecem interações entre a rede de microtúbulos e os filamentos de actina. Estas proteínas existem principalmente no núcleo, como por exemplo a emerina, que se liga aos filamentos de actina nucleares e aos microtúbulos e ainda no córtex das células (Burakov et al., 2003; Chang et al., 2013). Assim, a desregulação do citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, da rede de microtúbulos contribuem para o afastamento do centróssoma relativamente ao núcleo.



**Figura 40. Hipóteses explicativas para o afastamento do centróssoma em relação ao núcleo causado pela depleção do TBCCD1 em células hTERT-RPE-1** (Laan et al., 2012; Walczak et al., 2010; Luxton and Starr, 2014). O fenótipo de afastamento do centróssoma (a laranja) em relação ao núcleo (a azul) pode ser explicado por três hipóteses: a distância entre o centróssoma e o núcleo é regulada pelo balanço de forças exercidas pelos microtúbulos (a verde) e pelos filamentos de actina (a vermelho) no córtex e no centro das células (imagem à direita); a TBCCD1 estabelece uma ligação física entre o centróssoma e o núcleo, diretamente ou através de várias proteínas, como as SUN-KASH, e quando é depletada esta ligação é perdida (imagem à esquerda); a TBCCD1 regula a dinâmica de uma subpopulação de microtúbulos em torno do núcleo, que controlam o posicionamento correto do núcleo e do centróssoma (imagem em baixo).

Os resultados apresentados em células depletadas de TBCCD1 e tratadas com taxol, um agente estabilizador dos microtúbulos, mostram que este é capaz de reverter parcialmente o fenótipo de afastamento do centróssoma e do núcleo. Assim, a estabilização dos microtúbulos causada pelo taxol compensa a destabilização causada pela ausência da TBCCD1. Este resultado sugere que a proteína TBCCD1 está envolvida na estabilização dos microtúbulos e que, a sua depleção destabiliza-os, causando o afastamento entre o núcleo e o centróssoma. Estes resultados mostram que a TBCCD1 parece ter uma função reguladora da dinâmica dos microtúbulos e que, em células hTERT-RPE-1, a dinâmica dos microtúbulos tem um papel importante no posicionamento do centróssoma relativamente ao núcleo.

Apesar de nenhum isotipo de tubulina ter sido considerado como proteína interatuante da TBCCD1, estas foram identificadas na análise por espectrometria de massa, estando listadas no *Raw Material*. As tubulinas são proteínas muito expressas nas células e, por isso, é provável que sejam biotiniladas nas células que expressavam a proteína *flag-BirA\** e, assim, apareçam nos controlos, obtendo um valor SAINT inferior a 0,8. Assim, apesar de não parecer que a TBCCD1 interaja com as tubulinas, esta hipótese não deve ser desprezada.

A TBCCD1 parece interagir com várias proteínas que se ligam aos microtúbulos e regulam a sua dinâmica, quer em células em interfase quer durante a mitose, o que está de acordo com os resultados obtidos na presença de taxol para células hTERT-RPE-1 em interfase. Por outro lado, a TBCCD1 não se associa a nenhuma proteína do complexo de proteínas SUN e KASH ou à emerina, nem com nenhuma proteína que esteja descrita como interagindo com estes complexos proteicos, que estabelecem uma ligação física entre o núcleo e o citoesqueleto, controlando desta forma, pelo menos

parcialmente, a posição do centrossoma relativamente ao núcleo (Broers et al., 2006; Burakov and Nadezhdina, 2013; Chang et al., 2013). Os resultados obtidos neste trabalho sustentam a ideia de que a TBCCD1 não estabelece nenhuma relação física entre o centrossoma e o núcleo mas que controla a posição dos dois por afetar a rede de microtúbulos. A TBCCD1 interage também com a proteína OFD1, que regula a distância entre o centríolo-mãe e o centríolo-filho e, por isso, a TBCCD1 pode também ter um papel na ligação entre os dois e, desta forma, regular a posição do centrossoma relativamente ao núcleo. Foi observado em *Chlamydomonas* que a TBCCD1 se localiza entre os centríolos, ligando o centrossoma ao núcleo, e que a sua depleção causa a separação entre os dois centríolos (Feldman and Marshall, 2009). Do mesmo modo, foi observado que em células hTERT-RPE-1, a TBCCD1 se localiza entre os dois centríolos e que a sua depleção faz com que os centríolos tenham uma posição estática um em relação ao outro, em oposição ao que se observa nas células controlo, em que os dois centríolos têm posições mais dinâmicas um em relação ao outro (Gonçalves, 2010). Assim, a TBCCD1 humana pode estar envolvida na regulação da distância entre os dois centríolos, desempenhando a mesma função que em *Chlamydomonas*.

Por outro lado, a TBCCD1 interage com algumas proteínas localizadas no núcleo e que se associam ao DNA, nomeadamente à proteína SPATA24, o que sugere que a TBCCD1 se localize, pelo menos parcialmente, no núcleo e seja uma proteína de ligação entre o núcleo e o centrossoma. Assim, à semelhança de outras proteínas do invólucro nuclear, poderia ter uma porção nuclear e outra citoplasmática, localizada no centrossoma (Burakov and Nadezhdina, 2013). A TBCCD1 interage também com os fatores de transcrição NFATC3 e 4, o que pode sugerir que esta proteína se ligue ao DNA. Estes fatores de transcrição podem, no entanto, interagir com a TBCCD1 através dos microtúbulos, quando são recrutados para o núcleo. É ainda interessante referir que a TBCCD1 tem, na sua sequência, um domínio que se pensa estar envolvido no recrutamento para o núcleo e/ou para os cílios (Pereira, 2011). Estes resultados são também coerentes com as funções descritas para a TBCCD1 em *Chlamydomonas*, em que estabelece uma associação entre o centrossoma e o núcleo e em *Trypanosoma brucei* (Andre et al., 2013; Feldman and Marshall, 2009). Neste último organismo, a TBCCD1 localiza-se nos centríolos, no complexo de Golgi e no pólo anterior das células e a sua depleção causa a desorganização do complexo de Golgi e a perda da ligação do corpo basal ao DNA mitocondrial (Andre et al., 2013), o que sugere que esta função pode ter sido conservada, sendo partilhada pela TBCCD1 humana. Neste caso, a TBCCD1 pode ter atuar como uma plataforma de interação, controlando o recrutamento e o posicionamento das várias proteínas, regulando a dinâmica de pelo menos uma subpopulação de microtúbulos.

Sabe-se que a proteína CEP170, como referido anteriormente, se associa aos microtúbulos e que, quando é sobreexpressa, causa a estabilização e a formação de feixes de microtúbulos (Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012). Assim, a sobreexpressão desta proteína tem um papel semelhante ao taxol e, por isso, seria de esperar que levasse à reversão do fenótipo de afastamento do centrossoma ao núcleo causado pela depleção da TBCCD1. Assim sendo, tentou-se testar esta ideia, no entanto, a sobreexpressão da CEP170 causa a diminuição do tamanho da célula, o que impossibilita a análise deste fenótipo (Figura 39). De fato, todas as experiências que causam a diminuição da célula não permitem avaliar o fenótipo de depleção da TBCCD1, pois o centrossoma fica sempre próximo do núcleo, o que se pode dever não à reversão do fenótipo mas sim à diminuição do tamanho das células.

Neste estudo foi ainda observado que a proteína CEP170 se localiza, em células controlo hTERT-RPE-1, em torno do núcleo e, preferencialmente, do lado do centrossoma. Quando é possível definir um *leading edge* esta proteína orienta-se preferencialmente na direção do *leading edge*, estabelecendo um eixo de polaridade (Figura 33). Foi previamente descrito que esta proteína se associa aos microtúbulos em células HeLa e U2OS (Dumoux et al., 2015; Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012), o que foi também observado nas células hTERT-RPE-1, em que a CEP170 co-localiza com algumas regiões da  $\alpha$ -tubulina (Figura 36). De fato, em células hTERT-RPE-1 esta proteína parece dispor-se ao longo e em torno dos microtúbulos, organizado-se em estruturas que parecem ser oligoméricas, com a forma de anéis que parecem envolver mais do que um microtúbulo (Figura 36 a e b). Este mecanismo de associação pode ser o responsável por a CEP170 estabilizar os microtúbulos e, quando sobreexpressa, induzir a formação de feixes, uma vez que foi observado que em células hTERT-RPE-1 transfetadas com CEP170-GFP esta proteína também parece dispor-se no citoplasma e em maior número, em estruturas com as mesmas formas. É possível que o elevado número destas estruturas que se localizam no citoplasma, mesmo sem ser em torno dos microtúbulos, se deva à concentração mais elevada de CEP170, o que poderá promover a sua oligomerização mesmo sem ser em torno dos microtúbulos (Figura 36). Apesar de estar descrito (Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012) e também ter sido observado neste trabalho que a sua sobreexpressão causa a formação de feixes de microtúbulos, ainda não tinha sido descrita a observação destas estruturas de CEP170, quer em condições de sobreexpressão quer em células controlo.

Foi também observado, neste trabalho, que a CEP170 perde o seu padrão de localização em torno do núcleo e preferencialmente junto ao centrossoma, quando as células RPE-1 são tratadas com o agente despolimerizante de microtúbulos nocadozole,



à semelhança do que acontece em células UO2S (Figura 37) (Guarguaglini et al., 2005). Estes resultados suportam a ideia de que, nas células hTERT-RPE-1, a CEP170 também se associa aos microtúbulos, particularmente a uma subpopulação de microtúbulos que rodeia o núcleo e que se localiza em torno do centrossoma e, durante a migração, no sentido do *leading edge*. Em células HeLa e U2OS não foi descrita esta localização preferencial da CEP170 (Guarguaglini et al., 2005; Welburn and Cheeseman, 2012), o que se pode dever, em parte, por estes autores estarem a analisar as diversas localizações da CEP170 ao longo do ciclo celular e, por isso, não estarem interessados em células em interfase. Alternativamente, e mais provavelmente, por esta subpopulação de microtúbulos ser específica do tipo de célula e, por isso, o seu padrão de localização ser mais evidente em células hTERT-RPE-1.

Observou-se que a depleção de TBCCD1 em células hTERT-RPE-1 causou, de forma significativa (27 % das células depletadas apresentam o padrão de localização em comparação com 97 % das células controlo, aproximadamente) a perda deste padrão de localização característico da CEP170 que, em células depletadas, parece estar dispersa pelo citoplasma. No entanto, esta proteína não perde a sua localização centrossomal, o que evidencia que a TBCCD1 afeta a subpopulação de microtúbulos a que a CEP170 se liga. O efeito da TBCCD1 causa, à semelhança do nocadazole, a dispersão da proteína CEP170. No entanto, este fenótipo pode não resultar da despolimerização da rede de microtúbulos mas sim das alterações da sua dinâmica, através das suas modificações pós-traducionais ou das proteínas a que se ligam e que podem comprometer a ligação da CEP170 aos microtúbulos, levando a que fique deslocalizada no citoplasma.

Para além de causar a dispersão da CEP170, a ausência de TBCCD1 causa ainda uma diminuição dos níveis de CEP170 nas células hTERT-RPE-1. Assim, parece haver uma relação de *feedback* positivo entre as duas proteínas, uma vez que a depleção da TBCCD1 causa uma diminuição dos níveis de CEP170. Este resultado deve, no entanto, ser confirmado por *western-blot*. Na análise por espectrometria de massa a CEP170 foi identificada como proteína interatuante da TBCCD1, no entanto, obteve um valor SAINT inferior a 0,8. Por esse motivo, não foi considerada como candidata a proteína interatuante (encontra-se listada no *Raw Material*). Assim, parece que os níveis de CEP170 diminuem devido a uma interação indireta com a TBCCD1, não se podendo no entanto descartar a hipótese de as duas proteínas interagirem. A CEP170 está associada aos microtúbulos e tem uma *pool* citoplasmática e, por isso, pode ser facilmente biotinilada nas células que expressam a proteína *flag-BirA\**, aparecendo por isso também nos espectros das amostras controlo. Assim, o valor de SAINT obtido pode não ter sido suficientemente alto para se considerar como proteína

interatuante, uma vez que resulta da comparação dos péptidos identificados nas amostras e nos controlos (Choi et al., 2011). A CEP170 pode, assim, ser um falso negativo.

Uma das formas possíveis e mais comuns formas de alteração da dinâmica dos microtúbulos é através das modificações pós-traducionais e, por isso, foi avaliado se a subpopulação de microtúbulos a que a CEP170 se associa corresponderia a uma subpopulação de tubulina acetilada. Sabe-se que a acetilação está presente nos microtúbulos estáveis apesar de não estar esclarecido se promove ou não a sua estabilização (Janke, 2014) e que quer a TBCCD1 quer a variante 2 interagem com desacetilases, respetivamente, o Sirt1 e o Sirt2 (Quadro 8 e Quadro 9). Apesar de não estar descrito que o Sirt1 interage com os microtúbulos, sabe-se que o Sirt2 promove a desacetilação dos microtúbulos, de modo dependente do NAD (dinucleótido de nicotinamida e adenina) e que é muito abundante em células neuronais (Maxwell et al., 2011; Skoge et al., 2014). Estas evidências sugerem também que a TBCCD1 e a variante 2 possam estar envolvidas na acetilação dos microtúbulos. Observou-se, no entanto, que a CEP170 não se associa à tubulina acetilada, nem em células controlo nem em células depletadas de TBCCD1 e da variante 2 (Figura 38). No entanto, há evidências de que a sobreexpressão da variante 2 causa uma diminuição dos níveis de acetilação em células HEK 293T (Peneda et al., trabalho não publicado). No entanto, estes resultados foram obtidos para outra linha celular, em que a população de tubulina acetilada é diferente da presente em células RPE-1. Este resultado sugere que a TBCCD1 não afeta esta subpopulação de microtúbulos e que, por outro lado, em células hTERT-RPE-1, os microtúbulos acetilados não têm um papel fundamental na regulação da dinâmica dos microtúbulos que controlam a posição do centróssoma e do núcleo. Pensa-se que a acetilação dos microtúbulos varie conforme o tipo celular e conforme o contexto celular (Song and Brady, 2015).

Foi no entanto observado que a depleção de TBCCD1 parece causar alterações no padrão de localização dos microtúbulos acetilados em células hTERT-RPE-1 (Figura 38). Nas células controlo a tubulina acetilada localiza-se preferencialmente em torno do centróssoma, no entanto, em células depletadas de TBCCD1 estes microtúbulos parecem estar mais dispersos pelo citoplasma. Esta alteração pode dever-se a uma interação direta entre a TBCCD1 e a TBCCD1 variante 2 e a acetilação da tubulina, através dos desacetilases Sirt1 e Sirt2, ou por a diminuição dos níveis de TBCCD1 afetarem a dinâmica da rede de microtúbulos e esta alteração ser compensada através da estabilização dos microtúbulos, nomeadamente através da acetilação dos mesmos. É necessário, no entanto, analisar um maior número de células para se poder concluir se a rede de microtúbulos é realmente afetada pela depleção da TBCCD1.

É ainda de salientar que a TBCCD1 se associa à proteína *leucine rich repeat containing 49* (LRRC49), que faz parte de um complexo proteico neuronal que catalisa a poliglutamilação da tubulina. Esta modificação pós-traducional é muito abundante em cílios, centríolos e microtúbulos de células neuronais e pensa-se que possa estar envolvida na especialização e especificidade das funções dos microtúbulos (Janke, 2014; Song and Brady, 2015). Será assim interessante analisar se a depleção ou a sobreexpressão de TBCCD1 provocam alguma alteração nos microtúbulos poliglutamilados.

Para além de ter na sua sequência um domínio TBCC, a proteína TBCCD1 tem também um domínio CARP, que se pensa estar associado à polimerização da actina. Do mesmo modo, várias proteínas interatuantes da TBCCD1 estão envolvidas com a reorganização e a polimerização do citoesqueleto de actina, como a proteína ARHGEF10 e as proteínas SIPA1L1 e 2 (Quadro 8 e Figura 23). Apesar de a TBCCD1 não parecer interagir diretamente com a actina, esta proteína foi identificada na análise de espectrometria de massa (está listada no *Raw Material*), não tendo sido considerada como proteína interatuante devido à análise com o *software* SAINT. No entanto, esta proteína é bastante expressa nas células e, por isso, pode ser facilmente biotinilada nas células controlo que expressam a proteína *flag-BirA\**, o que diminui o seu valor SAINT, como descrito anteriormente. Por outro lado, o citoesqueleto de actina pode contribuir para o posicionamento do centróssoma em relação ao núcleo (Burakov et al., 2003; Dupin and Etienne-Manneville, 2011; Laan et al., 2012) e, por isso, o afastamento entre os dois causado pela depleção da TBCCD1 pode também estar relacionado com a ligação desta proteína aos filamentos de actina.

De modo a tentar estabelecer uma relação funcional entre a TBCCD1 e o citoesqueleto de actina procedeu-se à análise de células hTERT-RPE-1 transfetadas com siRNAs específicos para esta proteína em condições semelhantes às fisiológicas, com a depolimerização dos filamentos de actina com o agente citocalasina D e durante a recuperação dos mesmos, após despolimerização. No entanto, em nenhuma das condições testadas foi possível estabelecer uma associação clara entre esta proteína e os filamentos de actina, o que pode ser explicado por a TBCCD1 poder estar relacionada com um tipo específico de filamentos de actina e, por isso, não serem observadas alterações a nível geral do citoesqueleto de actina. Várias das proteínas interatuantes da TBCCD1 e que interagem com a actina têm funções importantes nas junções célula-célula e na adesão à matriz. De fato, a proteína TBCCD1 parece ter um papel importante na formação/integridade das junções celulares bem como na manutenção da polaridade da célula, o que pode explicar o fato de as células hTERT-RPE-1 depletadas de TBCCD1 serem mais lentas que as células controlo (Gonçalves, 2010). Quando

depletadas de TBCCD1, as interações que as células estabelecem com a matriz poderão estar alteradas, o que pode fazer com que as células tenham mais dificuldade em formá-las e/ou desmantelá-las sendo, por isso, mais lentas.

Ainda assim, observou-se que durante a recuperação dos filamentos de actina após a despolimerização, em células depletadas de TBCCD1 a rede de actina que se forma parece ser mais densa do que a das células controlo (Figura 28). No entanto, seria necessário analisar um maior número de células para confirmar esta observação. Este resultado pode ser explicado por uma interação entre a TBCCD1 e o citoesqueleto de actina através de uma das proteínas interatuantes da TBCCD1. Por outro lado, sabe-se que a dinâmica da rede de microtúbulos está afetada pela depleção da TBCCD1 o que pode ter consequências no citoesqueleto de actina. Este efeito da depleção da TBCCD1 pode não depender do domínio CARP (que o relaciona com a actina) mas sim ser o resultado deste balanço das forças exercidas pelos microtúbulos e pelos filamentos de actina, que já foi descrito ter um papel importante no normal funcionamento das células (Burakov et al., 2003; Burakov and Nadezhdina, 2013; Dupin and Etienne-Manneville, 2011). De fato, o domínio CARP não parece estar associado à actina na TBCCD1 nem na TBCCD1 variante 2, uma vez que é partilhado pelas duas e só a primeira parece interagir com proteínas associadas à actina, enquanto que a variante 2 não parece estar de todo relacionada com o citoesqueleto de actina (Figura 23 e Figura 24). Assim sendo, o domínio CARP pode estar associado a outras funções que ainda não foram descritas.

Neste trabalho, foi ainda observado que a localização centrossomal da proteína TBCCD1 não depende dos filamentos de actina, pois a despolimerização destes filamentos não afeta a localização centrossomal da proteína. Por outro lado, tinha sido já observado que a sua localização centrossomal também não depende dos microtúbulos (Gonçalves, 2010). Assim, pode-se concluir que a localização da TBCCD1 no centrossoma não depende nem da rede de microtúbulos nem do citoesqueleto de actina.

Inicialmente, pensou-se que a TBCCD1 seria uma proteína estrutural, pois a sua posição no centrossoma não é afetada pelo citoesqueleto e não tem influência na sua polimerização (Gonçalves, 2010). No entanto, os resultados obtidos sugerem que esta proteína esteja envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos e, possivelmente, seja também uma proteína estrutural do centrossoma, participando na regulação da distância entre os dois centríolos. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a TBCCD1 possa ser uma proteína mediadora da interação entre proteínas, ligando-se a proteínas com variadas funções celulares, como a regulação da polaridade e a manutenção das junções célula-célula e de adesão. A sua localização centrossomal

permite-lhe interagir com um elevado número de proteínas e regular a dinâmica dos microtúbulos assim como, possivelmente, a do citoesqueleto de actina. Assim, a TBCCD1 parece estar envolvida na dinâmica do citoesqueleto e na polaridade da célula.

## VII. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS

Com este trabalho pode concluir-se que a proteína centrossomal TBCCD1 está envolvida na regulação da dinâmica de uma subpopulação de microtúbulos que rodeia o núcleo e se localiza preferencialmente do lado do centrossoma. A proteína CEP170 está associada a esta subpopulação de microtúbulos, tendo sido observado que a depleção da proteína TBCCD1 causa a dispersão da proteína CEP170 em células hTERT-RPE-1 e a diminuição dos seus níveis na célula.

Não foi identificada claramente nenhuma relação funcional entre os filamentos de actina e a proteína TBCCD1, apesar de esta ter na sua sequência o domínio CARP e de parecer interagir com proteínas relacionadas com a polimerização dos filamentos de actina. No entanto, estes resultados não significam que não exista nenhuma relação entre os dois. No entanto, uma análise preliminar parece indicar que a ausência da proteína TBCCD1 torna a rede de actina mais densa. Será, portanto, importante determinar se esta observação se confirma. Observou-se ainda que a localização centrossomal da proteína TBCCD1 não depende do citoesqueleto de actina.

Os resultados de espectrometria de massa permitiram perceber que a TBCCD1 tem uma função importante na dinâmica dos microtúbulos e na polaridade celular, nomeadamente na manutenção das junções célula-célula e de adesão. Por outro lado, esta proteína parece também ser importante na integridade do centrossoma, podendo regular a distância entre os dois centríolos, e ainda na divisão celular, nomeadamente na citocinese. A TBCCD1 variante 2 parece interagir com *chaperones* moleculares, com proteínas mitocôndrias e ainda com proteínas presentes nos cinetocoros/centrómeros. Assim, esta proteína parece também ter uma função importante na divisão celular. A análise mais aprofundada destes resultados será importante para tentar compreender um pouco melhor quais as funções da proteína TBCCD1 e TBCCD1 variante 2 e os mecanismos em que estão envolvidas. Posteriormente, serão feitas imunoprecipitações com o anticorpo contra o *flag* e contra as proteínas mais promissoras, de forma a confirmar que são proteínas interatuantes.

Com o objetivo de tentar perceber qual o papel da TBCCD1 seria também interessante estudar a localização da CEP170 noutras células, nomeadamente em células que não sejam polarizadas para perceber se o fenótipo de depleção da TBCCD1 é específico do tipo de célula ou é comum a todos os tipos celulares. Seria também importante avaliar se a sobreexpressão ou depleção da proteína CEP170 causa alguma alteração da proteína TBCCD1.

De forma a avaliar se a dinâmica geral da rede de microtúbulos é afetada pela TBCCD1 seria interessante observar a proteína EB1, que se liga às extremidades (+)

dos microtúbulos em células com sobreexpressão de TBCCD1 e na ausência de TBCCD1. A TBCCD1 parece interagir com um poliglutamilase de tubulina, pelo que será importante perceber se a TBCCD1 afeta a rede de microtúbulos através da poliglutamilização da tubulina.

Em relação à interação entre a TBCCD1 e o citoesqueleto de actina será necessário avaliar se a rede de actina se torna mais densa na ausência desta proteína. Seria também interessante explorar um possível papel da TBCCD1 como intermediário entre os dois elementos do citoesqueleto. Para tal, poder-se-ia estudar a depleção desta proteína em células sujeitas a nocadazole ou citocalasina D e analisar alterações do citoesqueleto que não foi manipulado.

Sabe-se que a depleção da proteína dineína provoca, à semelhança da TBCCD1, o afastamento do centróssoma em relação ao núcleo (Burakov et al., 2003). Seria, por isso, interessante estudar se a sobreexpressão/depleção da TBCCD1 afeta a expressão e ou a localização da dineína.

Tendo em conta que a TBCCD1 parece ter um papel importante na manutenção das junções célula-célula e na adesão das células à matriz seria também interessante testar se, de fato, a adesão das células ou se os contatos que se estabelecem entre elas estão alterados em células depletadas de TBCCD1. Do mesmo modo, esta proteína parece ser bastante importante no processo de citocinese pelo que seria importante observar os efeitos da depleção da TBCCD1 em células em divisão.

Devido ao elevado número de proteínas que têm um papel importante nas células neuronais, será também interessante estudar os fenótipos de depleção e de sobreexpressão da TBCCD1 em células neuronais. Alguns dos fenótipos, nomeadamente no citoesqueleto de actina, serão provavelmente mais óbvios nestas células.

## VIII. REFERÊNCIAS

Andre, J., Harrison, S., Towers, K., Qi, X., Vaughan, S., McKean, P.G., and Ginger, M.L. (2013). The tubulin cofactor C family member TBCCD1 orchestrates cytoskeletal filament formation. *Journal of cell science* 126, 5350-5356.

Bartolini, F., Bhamidipati, A., Thomas, S., Schwahn, U., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (2002). Functional overlap between retinitis pigmentosa 2 protein and the tubulin-specific chaperone cofactor C. *The Journal of biological chemistry* 277, 14629-14634.

Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 451-463.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews* 94, 235-263.

Bornens, M., and Gonczy, P. (2014). Centrosomes back in the limelight. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369.

Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B., and Hutchison, C.J. (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological reviews* 86, 967-1008.

Brouhard, G.J. (2015). Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. *Molecular biology of the cell* 26, 1207-1210.

Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., and Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. *The Journal of cell biology* 162, 963-969.

Burakov, A.V., and Nadezhdina, E.S. (2013). Association of nucleus and centrosome: magnet or velcro? *Cell biology international* 37, 95-104.

Burgess, A., Vigneron, S., Brioude, E., Labbe, J.C., Lorca, T., and Castro, A. (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12564-12569.

Câmara, A.I.R. (2013). Estudo de padrões de expressão de transcritos alternativos do gene *tbccd1* em tecidos humanos e linhas celulares cancerígenas (Escola Superior de Saúde Egas Moniz).

Chang, W., Folker, E.S., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2013). Emerin organizes actin flow for nuclear movement and centrosome orientation in migrating fibroblasts. *Molecular biology of the cell* 24, 3869-3880.



Choi-Rhee, E., Schulman, H., and Cronan, J.E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 3043-3050.

Choi, H., Larsen, B., Lin, Z.Y., Breitkreutz, A., Mellacheruvu, D., Fermin, D., Qin, Z.S., Tyers, M., Gingras, A.C., and Nesvizhskii, A.I. (2011). SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods* 8, 70-73.

Cronan, J.E. (2005). Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *The Journal of nutritional biochemistry* 16, 416-418.

De La Cruz, E.M., and Gardel, M.L. (2015). Actin Mechanics and Fragmentation. *The Journal of biological chemistry* 290, 17137-17144.

Dingar, D., Kalkat, M., Chan, P.K., Srikumar, T., Bailey, S.D., Tu, W.B., Coyaud, E., Ponzielli, R., Kolyar, M., Jurisica, I., *et al.* (2015). BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors. *Journal of proteomics* 118, 95-111.

Dumoux, M., Menny, A., Delacour, D., and Hayward, R.D. (2015). A *Chlamydia* effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization. *Journal of cell science* 128, 3420-3434.

Dupin, I., Camand, E., and Etienne-Manneville, S. (2009). Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *The Journal of cell biology* 185, 779-786.

Dupin, I., and Etienne-Manneville, S. (2011). Nuclear positioning: mechanisms and functions. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 1698-1707.

Durocher, D., and Jackson, S.P. (2002). The FHA domain. *FEBS letters* 513, 58-66.

Elie, A., Prezel, E., Guerin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., and Arnal, I. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Scientific reports* 5, 9964.

Elric, J., and Etienne-Manneville, S. (2014). Centrosome positioning in polarized cells: common themes and variations. *Experimental cell research* 328, 240-248.

Feldman, J.L., and Marshall, W.F. (2009). ASQ2 encodes a TBCC-like protein required for mother-daughter centriole linkage and mitotic spindle orientation. *Current biology : CB* 19, 1238-1243.

Firat-Karalar, E.N., Rauniyar, N., Yates, J.R., 3rd, and Stearns, T. (2014). Proximity interactions among centrosome components identify regulators of centriole duplication. *Current biology : CB* 24, 664-670.

Fischer, R.S., and Fowler, V.M. (2015). Thematic Minireview Series: The State of the Cytoskeleton in 2015. *The Journal of biological chemistry* 290, 17133-17136.

Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.

Galletta, B.J., and Rusan, N.M. (2015). A yeast two-hybrid approach for probing protein-protein interactions at the centrosome. *Methods in cell biology* 129, 251-277.

Gonçalves, J. (2010). Caracterização da proteína centrossomal TBCCD1, em linhas celulares humanas e durante o desenvolvimento de *Danio Rio* (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica).

Goncalves, J., Nolasco, S., Nascimento, R., Lopez Fanarraga, M., Zabala, J.C., and Soares, H. (2010a). TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning. *EMBO reports* 11, 194-200.

Goncalves, J., Tavares, A., Carvalhal, S., and Soares, H. (2010b). Revisiting the tubulin folding pathway: new roles in centrosomes and cilia. *Biomolecular concepts* 1, 423-434.

Guarguaglini, G., Duncan, P.I., Stierhof, Y.D., Holmstrom, T., Duensing, S., and Nigg, E.A. (2005). The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Molecular biology of the cell* 16, 1095-1107.

Hinchcliffe, E.H. (2014). Centrosomes and the art of mitotic spindle maintenance. *International review of cell and molecular biology* 313, 179-217.

Hofmann, K., and Bucher, P. (1995). The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends in biochemical sciences* 20, 347-349.

Horio, T., and Murata, T. (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in plant science* 5, 511.

Horwitz, S.B. (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 5 Suppl 6, S3-6.

Huber, F., Boire, A., Lopez, M.P., and Koenderink, G.H. (2015). Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Current opinion in cell biology* 32, 39-47.

Hubert, T., Vandekerckhove, J., and Gettemans, J. (2011). Actin and Arp2/3 localize at the centrosome of interphase cells. *Biochemical and biophysical research communications* 404, 153-158.

Janke, C. (2014). The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *The Journal of cell biology* 206, 461-472.

Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., *et al.* (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308, 1758-1762.

Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 709-721.

Kwon, M., Bagonis, M., Danuser, G., and Pellman, D. (2015). Direct Microtubule-Binding by Myosin-10 Orients Centrosomes toward Retraction Fibers and Subcortical Actin Clouds. *Developmental cell* 34, 323-337.

Laan, L., Pavin, N., Husson, J., Romet-Lemonne, G., van Duijn, M., Lopez, M.P., Vale, R.D., Julicher, F., Reck-Peterson, S.L., and Dogterom, M. (2012). Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell* 148, 502-514.

Lambert, J.P., Tucholska, M., Go, C., Knight, J.D., and Gingras, A.C. (2015). Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *Journal of proteomics* 118, 81-94.

Li, J., Lee, G.I., Van Doren, S.R., and Walker, J.C. (2000). The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *Journal of cell science* 113 Pt 23, 4143-4149.

Li, J., Williams, B.L., Haire, L.F., Goldberg, M., Wilker, E., Durocher, D., Yaffe, M.B., Jackson, S.P., and Smerdon, S.J. (2002). Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Molecular cell* 9, 1045-1054.

Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A., Coll, M., and Zabala, J.C. (2001). Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *Journal of structural biology* 135, 219-229.

Luders, J., and Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 161-167.

Luxton, G.W., and Starr, D.A. (2014). KASHing up with the nucleus: novel functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus. *Current opinion in cell biology* 28, 69-75.

Manneville, J.B., and Etienne-Manneville, S. (2006). Positioning centrosomes and spindle poles: looking at the periphery to find the centre. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 98, 557-565.

Margolis, R.L., and Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 20, 830-836.

Maxwell, M.M., Tomkinson, E.M., Nobles, J., Wizeman, J.W., Amore, A.M., Quinti, L., Chopra, V., Hersch, S.M., and Kazantsev, A.G. (2011). The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human molecular genetics* 20, 3986-3996.

McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., Lorca, T., Castro, A., and Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell cycle* 13, 1400-1412.

Meinke, P., and Schirmer, E.C. (2015). LINC'ing form and function at the nuclear envelope. *FEBS letters*.

Mohan, R., and John, A. (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB life* 67, 395-403.

Nigg, E.A., and Raff, J.W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* 139, 663-678.

Nigg, E.A., and Stearns, T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature cell biology* 13, 1154-1160.

Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 30, 397-420.

Pantaloni, D., Le Clairche, C., and Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506.

Pereira, I.D.F. (2011). Estudo da proteína humana centrossomal TBCCD1: determinação de domínios funcionais. In Departamento de Química e Bioquímica (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências).

Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 813-825.

Roux, K.J. (2013). Marked by association: techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 3657-3664.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 196, 801-810.

Sadok, A., and Marshall, C.J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* 5, e29710.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676-682.

Schmoranzer, J., Fawcett, J.P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R.B., Pawson, T., and Gundersen, G.G. (2009). Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Current biology : CB* 19, 1065-1074.

Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nature cell biology* 16, 335-344.

Skau, C.T., and Waterman, C.M. (2015). Specification of Architecture and Function of Actin Structures by Actin Nucleation Factors. *Annual review of biophysics* 44, 285-310.

Skoge, R.H., Dolle, C., and Ziegler, M. (2014). Regulation of SIRT2-dependent alpha-tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA repair* 23, 33-38.

Song, Y., and Brady, S.T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in cell biology* 25, 125-136.

Szolajska, E., and Chroboczek, J. (2011). Faithful chaperones. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 3307-3322.

They, M., Racine, V., Piel, M., Pepin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.B., and Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19771-19776.

Tollenaere, M.A., Mailand, N., and Bekker-Jensen, S. (2015). Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 11-23.

Vignaud, T., Blanchoin, L., and They, M. (2012). Directed cytoskeleton self-organization. *Trends in cell biology* 22, 671-682.

Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 91-102.

Waterman-Storer, C.M., and Salmon, E. (1999). Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Current opinion in cell biology* 11, 61-67.

Welburn, J.P., and Cheeseman, I.M. (2012). The microtubule-binding protein Cep170 promotes the targeting of the kinesin-13 depolymerase Kif2b to the mitotic spindle. *Molecular biology of the cell* 23, 4786-4795.

Winey, M., and O'Toole, E. (2014). Centriole structure. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369.

Wloga, D., Webster, D.M., Rogowski, K., Bre, M.H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S.T., and Gaertig, J. (2009). TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Developmental cell* 16, 867-876.

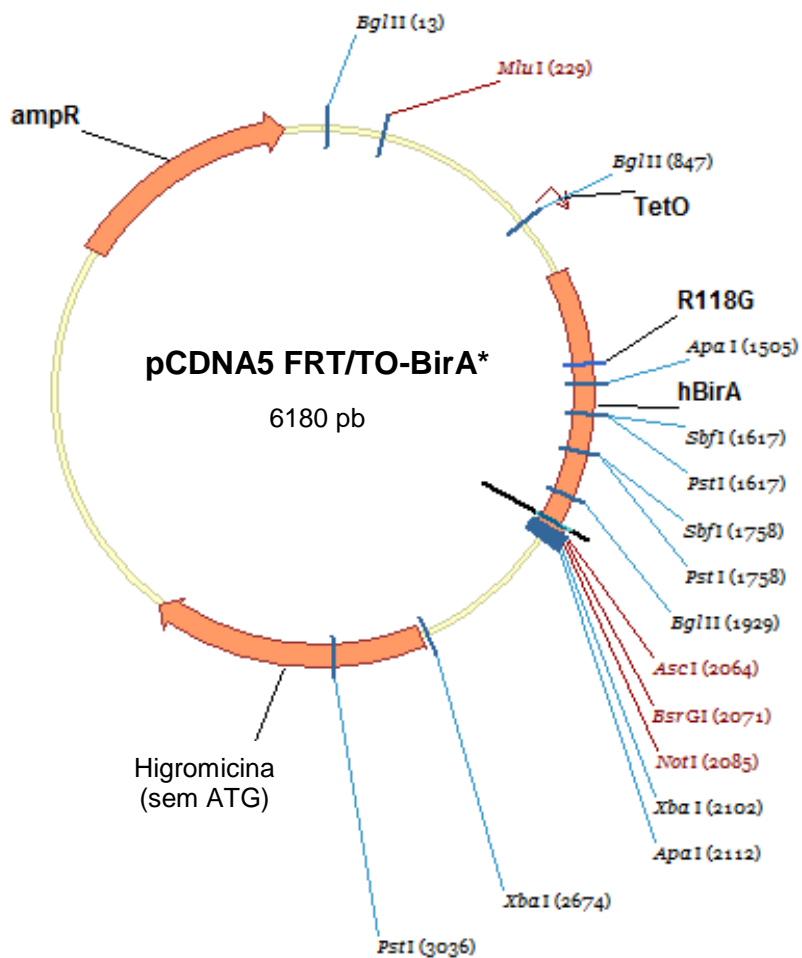
Yoon, J.H., Qiu, J., Cai, S., Chen, Y., Cheetham, M.E., Shen, B., and Pfeifer, G.P. (2006). The retinitis pigmentosa-mutated RP2 protein exhibits exonuclease activity and translocates to the nucleus in response to DNA damage. *Experimental cell research* 312, 1323-1334.

Yu, I., Garnham, C.P., and Roll-Mecak, A. (2015). Writing and Reading the Tubulin Code. *The Journal of biological chemistry* 290, 17163-17172.

Zhu, X., and Kaverina, I. (2013). Golgi as an MTOC: making microtubules for its own good. *Histochemistry and cell biology* 140, 361-367.

## IX. ANEXOS

### 1. Vetor pcDNA5 *Flag-FRT/TO-BirA\**



**Figura A.1. Representação do vetor pcDNA5 *Flag-FRT/TO-BirA\**.** Evidencia-se os locais reconhecimento de vários enzimas de restrição, a mutação R11G na região codificante do BirA\*, o promotor induzível por tetraciclina e os locais de resistência aos antibióticos ampicilina e higromicina.

## 2. Proteínas interatuantes pelo método de BioID

### 2.1. Proteínas interatuantes da TBCCD1 e da TBCCD1 variante 2

Quadro A.1. Proteínas interatuantes da proteína TBCCD1

Gene ID	Proteína ID	Símbolo	Nome da proteína	top 4 controlos	TBCCD1 BioID				Total	SAINT
					pool A		pool B			
					1	2	1	2		
5108	134142826	<b>PCM1</b>	<i>pericentriolar material 1</i>	21 19 18 16	158	174	146	138	<b>616</b>	<b>1,00</b>
667	34577049	<b>DST</b>	<i>Dystonin</i>	24 20 19 17	144	137	136	132	<b>549</b>	<b>1,00</b>
1856	4758216	<b>DVL2</b>	<i>dishevelled segment polarity protein 2</i>	47 46 33 29	109	106	124	130	<b>469</b>	<b>1,00</b>
28227	33695078	<b>PPP2R3B</b>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta</i>		123	133	112	71	<b>439</b>	<b>1,00</b>
54839	312222716	<b>LRRC49</b>	<i>leucine rich repeat containing 49</i>	32 32 28 26	103	114	99	80	<b>396</b>	<b>0,90</b>
22994	111955084	<b>AZI1</b>	<i>centrosomal protein 131kDa</i>	1 0 0 0	98	90	88	78	<b>354</b>	<b>1,00</b>
8481	4503179	<b>OFD1</b>	<i>oral-facial-digital syndrome 1</i>	3 2 2 2	89	106	78	71	<b>344</b>	<b>1,00</b>
9493	20143967	<b>KIF23</b>	<i>kinesin family member 23</i>	22 13 12 12	63	70	63	62	<b>258</b>	<b>1,00</b>
79848	116174778	<b>CSPP1</b>	<i>centrosome and spindle pole associated protein 1</i>		60	59	46	43	<b>208</b>	<b>1,00</b>
55125	255003833	<b>CEP192</b>	<i>centrosomal protein 192kDa</i>	6 4 3 3	62	68	36	36	<b>202</b>	<b>1,00</b>
29127	186910300	<b>RACGAP1</b>	<i>Rac GTPase activating protein 1</i>	7 7 7 6	47	57	45	46	<b>195</b>	<b>1,00</b>
165055	21450665	<b>CCDC138</b>	<i>coiled-coil domain containing 138</i>		46	41	46	39	<b>172</b>	<b>1,00</b>
23053	122114658	<b>KIAA0913</b>	<i>zinc finger, SWIM-type containing 8</i>		38	43	42	35	<b>158</b>	<b>1,00</b>
324	189011566	<b>APC</b>	<i>adenomatous polyposis coli</i>	2 2 1 0	44	39	27	32	<b>142</b>	<b>1,00</b>
1855	32479521	<b>DVL1</b>	<i>dishevelled segment polarity protein 1</i>	7 6 6 4	34	37	30	32	<b>133</b>	<b>1,00</b>



11215	7706457	<b>AKAP11</b>	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 11</i>	5	5	2	2	39	39	23	23	<b>124</b>	<b>1,00</b>
79598	31377705	<b>CEP97</b>	<i>centrosomal protein 97kDa</i>	4	3	2	2	31	31	36	26	<b>124</b>	<b>1,00</b>
57498	55741641	<b>KIDINS220</b>	<i>kinase D-interacting substrate, 220kDa</i>	1	0	0	0	30	25	27	32	<b>114</b>	<b>1,00</b>
4775	27886555	<b>NFATC3</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3</i>	2	1	0	0	32	36	27	19	<b>114</b>	<b>1,00</b>
10144	56119110	<b>FAM13A</b>	<i>family with sequence similarity 13, member A</i>	4	0	0	0	30	31	25	25	<b>111</b>	<b>1,00</b>
10464	55769583	<b>PIBF1</b>	<i>progesterone immunomodulatory binding factor 1</i>					27	26	32	24	<b>109</b>	<b>1,00</b>
10807	89353278	<b>SDCCAG3</b>	<i>serologically defined colon cancer antigen 3</i>	4	4	3	2	30	32	31	16	<b>109</b>	<b>1,00</b>
81839	20373171	<b>VANGL1</b>	<i>VANGL planar cell polarity protein 1</i>	2	2	2	1	24	24	31	29	<b>108</b>	<b>1,00</b>
23243	304361757	<b>ANKRD28</b>	<i>ankyrin repeat domain 28</i>	6	4	4	4	28	32	27	19	<b>106</b>	<b>1,00</b>
9897	120952851	<b>KIAA0196</b>	<i>KIAA0196</i>	3	2	2	1	38	28	19	18	<b>103</b>	<b>1,00</b>
9851	154689847	<b>KIAA0753</b>	<i>KIAA0753</i>					34	29	17	20	<b>100</b>	<b>1,00</b>
9231	95089461	<b>DLG5</b>	<i>discs, large homolog 5 (Drosophila)</i>	1	0	0	0	27	26	21	23	<b>97</b>	<b>1,00</b>
51306	156142188	<b>FAM13B</b>	<i>family with sequence similarity 13, member B</i>					31	40	12	13	<b>96</b>	<b>1,00</b>
23325	40018629	<b>KIAA1033</b>	<i>KIAA1033</i>	4	4	3	3	33	26	20	13	<b>92</b>	<b>0,99</b>
5116	81295809	<b>PCNT</b>	<i>Pericentrin</i>	13	0	0	0	25	29	19	12	<b>85</b>	<b>1,00</b>
93594	223005859	<b>WDR67</b>	<i>TBC1 domain family, member 31</i>					24	18	26	16	<b>84</b>	<b>1,00</b>
9857	171184451	<b>CEP350</b>	<i>centrosomal protein 350kDa</i>					28	27	14	13	<b>82</b>	<b>1,00</b>
117178	261878469	<b>SSX2IP</b>	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein</i>	1	1	1	0	26	17	19	17	<b>79</b>	<b>1,00</b>
79441	56711324	<b>HAUS3</b>	<i>HAUS augmin-like complex, subunit 3</i>	7	6	5	4	21	18	18	21	<b>78</b>	<b>0,88</b>
613	82546843	<b>BCR</b>	<i>breakpoint cluster region</i>	5	4	2	2	26	24	15	12	<b>77</b>	<b>0,92</b>
10198	37537696	<b>MPHOSPH9</b>	<i>M-phase phosphoprotein 9</i>	1	1	1	0	21	23	14	12	<b>70</b>	<b>1,00</b>
49856	224586777	<b>WRAP73</b>	<i>WD repeat containing, antisense to TP73</i>	6	5	4	4	17	20	17	13	<b>67</b>	<b>0,91</b>
50628	122939157	<b>GEMIN4</b>	<i>gem (nuclear organelle) associated protein 4</i>	1	1	0	0	20	22	9	10	<b>61</b>	<b>1,00</b>
375056	122891870	<b>MIA3</b>	<i>melanoma inhibitory activity family, member 3</i>					17	10	17	16	<b>60</b>	<b>1,00</b>
283373	157743284	<b>ANKRD52</b>	<i>ankyrin repeat domain 52</i>	4	3	3	3	20	21	10	9	<b>60</b>	<b>0,85</b>
26005	148596944	<b>C2CD3</b>	<i>C2 calcium-dependent domain containing 3</i>					21	20	6	11	<b>58</b>	<b>1,00</b>
54462	80861486	<b>FAM190B</b>	<i>coiled-coil serine-rich protein 2</i>					17	20	12	9	<b>58</b>	<b>1,00</b>

29079	7661788	<b>MED4</b>	<i>mediator complex subunit 4</i>	2	1	1	0	14	15	12	14	<b>55</b>	<b>1,00</b>
11218	256223453	<b>DDX20</b>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20</i>	5	3	2	1	13	18	14	10	<b>55</b>	<b>0,88</b>
4776	27886563	<b>NFATC4</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4</i>					12	14	20	8	<b>54</b>	<b>1,00</b>
9928	7661878	<b>KIF14</b>	<i>kinesin family member 14</i>	6	2	2	1	17	13	8	16	<b>54</b>	<b>0,94</b>
89796	267844811	<b>NAV1</b>	<i>neuron navigator 1</i>	3	2	1	1	15	14	10	9	<b>48</b>	<b>0,98</b>
57216	62955805	<b>VANGL2</b>	<i>VANGL planar cell polarity protein 2</i>					11	11	12	13	<b>47</b>	<b>1,00</b>
10207	112382257	<b>INADL</b>	<i>InaD-like (Drosophila)</i>	9	2	1	1	7	10	10	18	<b>45</b>	<b>0,93</b>
148137	311771577	<b>C19orf55</b>	<i>proline and serine rich 3</i>					15	10	8	8	<b>41</b>	<b>1,00</b>
55722	62899065	<b>CEP72</b>	<i>centrosomal protein 72kDa</i>					14	9	12	6	<b>41</b>	<b>1,00</b>
8496	312032467	<b>PPFIBP1</b>	<i>PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)</i>	2	2	1	0	12	9	9	9	<b>39</b>	<b>0,92</b>
6742	374671775	<b>SSBP1</b>	<i>single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial</i>	1	0	0	0	8	8	9	13	<b>38</b>	<b>1,00</b>
22832	148612801	<b>KIAA1009</b>	<i>centrosomal protein 162kDa</i>					10	12	9	6	<b>37</b>	<b>1,00</b>
22995	110347568	<b>CEP152</b>	<i>centrosomal protein 152kDa</i>					10	9	9	8	<b>36</b>	<b>1,00</b>
84318	14150165	<b>CCDC77</b>	<i>coiled-coil domain containing 77</i>	2	1	1	0	11	9	7	8	<b>35</b>	<b>0,93</b>
23322	118442834	<b>RPGRIP1L</b>	<i>RPGRIP1-like</i>					6	8	10	10	<b>34</b>	<b>1,00</b>
9462	226958575	<b>RASAL2</b>	<i>RAS protein activator like 2</i>					10	12	7	2	<b>31</b>	<b>0,95</b>
64770	169646281	<b>CCDC14</b>	<i>coiled-coil domain containing 14</i>					11	7	6	5	<b>29</b>	<b>1,00</b>
58155	10863997	<b>PTBP2</b>	<i>polypyrimidine tract binding protein 2</i>	1	1	1	0	9	12	5	3	<b>29</b>	<b>0,99</b>
9855	7662310	<b>FARP2</b>	<i>FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2</i>	2	1	0	0	8	7	5	7	<b>27</b>	<b>1,00</b>
221061	63025206	<b>FAM171A1</b>	<i>family with sequence similarity 171, member A1</i>					7	5	5	8	<b>25</b>	<b>1,00</b>
57568	112421013	<b>SIPA1L2</b>	<i>signal-induced proliferation-associated 1 like 2</i>					11	7	4	3	<b>25</b>	<b>0,99</b>
23411	7657575	<b>SIRT1</b>	<i>sirtuin 1</i>	1	1	0	0	7	11	4	3	<b>25</b>	<b>0,99</b>
144100	239047795	<b>PLEKHA7</b>	<i>pleckstrin homology domain containing, family A member 7</i>	2	1	1	0	3	5	7	8	<b>23</b>	<b>0,99</b>
84445	45331215	<b>LZTS2</b>	<i>leucine zipper, putative tumor suppressor 2</i>					8	5	5	4	<b>22</b>	<b>1,00</b>
23334	335353804	<b>SZT2</b>	<i>seizure threshold 2 homolog (mouse)</i>	3	0	0	0	8	5	6	2	<b>21</b>	<b>0,95</b>
9213	19923272	<b>XPR1</b>	<i>xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1</i>					5	7	5	3	<b>20</b>	<b>0,99</b>
114928	19923967	<b>GPRASP2</b>	<i>G protein-coupled receptor associated sorting protein 2</i>					9	6	3	2	<b>20</b>	<b>0,94</b>

202051	210147558	<b>SPATA24</b>	<i>spermatogenesis associated 24</i>	1	0	0	0	4	6	4	5	<b>19</b>	<b>1,00</b>
9639	62548864	<b>ARHGEF10</b>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10</i>	1	1	1	1	6	7	3	2	<b>18</b>	<b>0,94</b>
8500	29171753	<b>PPFIA1</b>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1</i>					7	2	5	3	<b>17</b>	<b>0,94</b>
55835	130980075	<b>CENPJ</b>	<i>centromere protein J</i>	2	1	1	0	4	5	4	3	<b>16</b>	<b>0,98</b>
8897	10835109	<b>MTMR3</b>	<i>myotubularin related protein 3</i>					4	8	3		<b>15</b>	<b>0,93</b>
116840	191252785	<b>CNTROB</b>	<i>centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein</i>					4	4	3	3	<b>14</b>	<b>0,98</b>
285331	213688413	<b>CCDC66</b>	<i>coiled-coil domain containing 66</i>					6	4	2		<b>12</b>	<b>0,94</b>
100287171	261337183	<b>WASH1</b>	<i>WAS protein family homolog 1</i>	1	0	0	0	3	5	2	2	<b>12</b>	<b>0,89</b>
1859	18765750	<b>DYRK1A</b>	<i>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>					4	3	2	2	<b>11</b>	<b>0,89</b>
343099	327315395	<b>CCDC18</b>	<i>coiled-coil domain containing 18</i>					2	4	2	2	<b>10</b>	<b>0,85</b>
26037	7662126	<b>SIPA1L1</b>	<i>signal-induced proliferation-associated 1 like 1</i>	1	1	1	0	4	3	2		<b>9</b>	<b>0,90</b>
22884	41281564	<b>WDR37</b>	<i>WD repeat domain 37</i>	2	1	0	0	3	2	2	2	<b>9</b>	<b>0,85</b>
8568	4503247	<b>RRP1</b>	<i>ribosomal RNA processing 1</i>					2	2	2	2	<b>8</b>	<b>0,81</b>

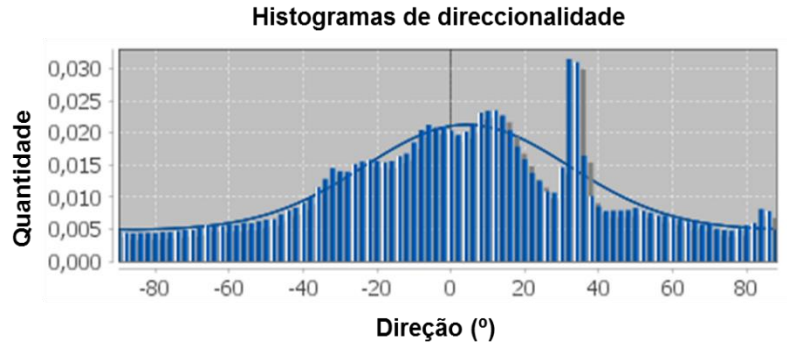
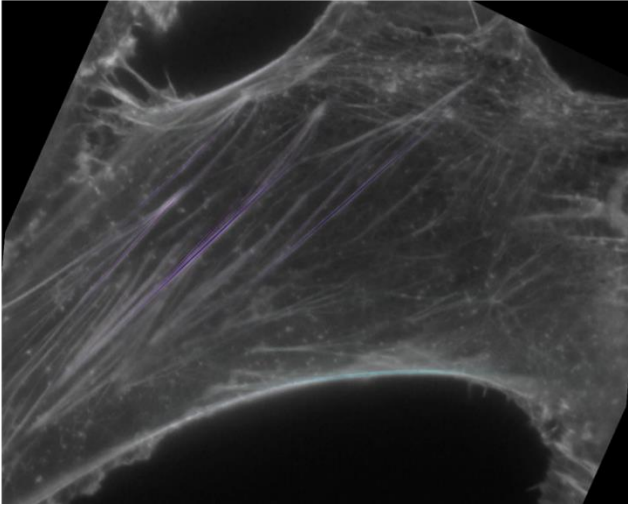
## 2.2. Proteínas interagentes da TBCCD1 variante 2

Quadro A.2. Proteínas interagentes da proteína TBCCD1 variante 2

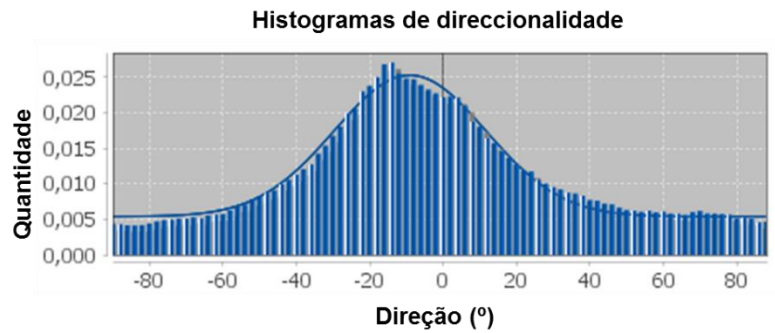
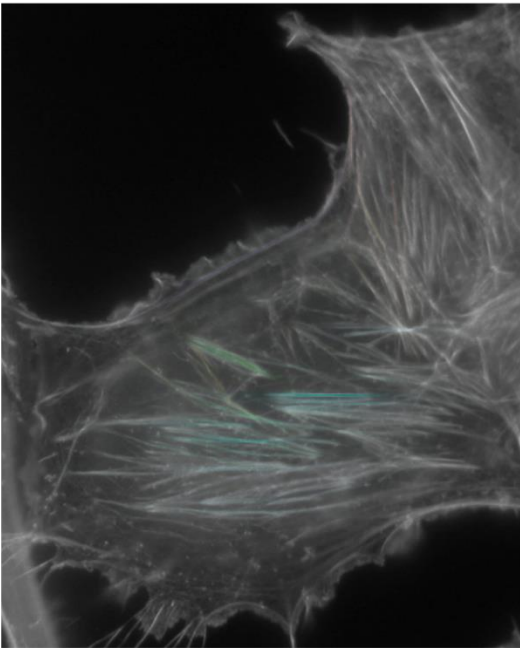
Gene ID	Proteína ID	Símbolo	Nome da proteína	top 4 controlos	TBCCD1 variante 2 BioID					
					pool A		pool B		Total	SAINT
					1	2	1	2		
501	188035924	<b>ALDH7A1</b>	<i>aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1</i>	4 4 3 3	21	21	22	14	<b>78</b>	<b>0,96</b>
9049	201860300	<b>AIP</b>	<i>aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>	3 1 1 1	13	13	13	12	<b>51</b>	<b>0,97</b>
9532	4757834	<b>BAG2</b>	<i>BCL2-associated athanogene 2</i>	5 5 5 4	27	29	14	17	<b>87</b>	<b>0,91</b>
64946	12597655	<b>CENPH</b>	<i>centromere protein H</i>	11 6 6 3	112	126	114	99	<b>451</b>	<b>1,00</b>
2491	41352697	<b>CENPI</b>	<i>centromere protein I</i>		20	23	8	13	<b>64</b>	<b>1,00</b>
64105	16905073	<b>CENPK</b>	<i>centromere protein K</i>	7 4 4 3	74	88	120	104	<b>386</b>	<b>1,00</b>
790	13129022	<b>CENPM</b>	<i>centromere protein M</i>	1 1 0 0	6	5	4	6	<b>21</b>	<b>0,99</b>
26128	24308113	<b>KIAA1279</b>	<i>KIF1 binding protein</i>	5 3 2 2	14	11	11	14	<b>50</b>	<b>0,87</b>
23386	122939165	<b>NUDCD3</b>	<i>NudC domain containing 3</i>	12 11 11 10	46	47	48	50	<b>191</b>	<b>1,00</b>
148137	311771577	<b>C19orf55</b>	<i>proline and serine rich 3</i>		4	9	3	9	<b>25</b>	<b>0,99</b>
28227	33695078	<b>PPP2R3B</b>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta</i>		29	29	28	25	<b>111</b>	<b>1,00</b>
6742	374671775	<b>SSBP1</b>	<i>single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial</i>	1 0 0 0	2	2	6	3	<b>13</b>	<b>0,89</b>
22933	13775600	<b>SIRT2</b>	<i>sirtuin 2</i>	1 1 0 0	11	12	6	5	<b>34</b>	<b>1,00</b>
6674	27262636	<b>SPAG1</b>	<i>sperm associated antigen 1</i>		3	5	7	4	<b>19</b>	<b>0,98</b>
6767	19923193	<b>ST13</b>	<i>suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)</i>	6 5 4 3	23	24	18	20	<b>85</b>	<b>1,00</b>
7268	156627581	<b>TTC4</b>	<i>tetratricopeptide repeat domain 4</i>	1 0 0 0	15	15	10	9	<b>49</b>	<b>0,99</b>
80222	20070344	<b>TARS2</b>	<i>threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)</i>	1 1 0 0	5	3	2	3	<b>13</b>	<b>0,93</b>
727910	256542293	<b>TLCD2</b>	<i>TLC domain containing 2</i>		7	8	8	9	<b>32</b>	<b>1,00</b>
7372	4507835	<b>UMPS</b>	<i>uridine monophosphate synthetase</i>	1 1 1 1	2	3	2	2	<b>9</b>	<b>0,85</b>

### 3. Análise da direccionalidade dos filamentos de actina

Células hTERT-RPE-1 controlo



Células hTERT-RPE-1 depletadas de TBCCD1



**Figura A.2. Análise da direccionalidade dos filamentos de actina em células hTERT-RPE-1.** As células controlo e depletadas de TBCCD1 foram alinhadas segundo o *leading edge* e foi feita a análise de direccionalidade recorrendo ao ImageJ Fiji. O eixo horizontal é considerado 0° e os filamentos de actina são analisados em relação a este eixo e apresentados na forma de histograma.