

IV. Discussão e Conclusões

O objectivo deste trabalho foi definir a função do gene Mob2 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular e, para tal, tentou-se determinar a localização de Mob2 e procedeu-se à análise do fenótipo dos mutantes Mob2.

Através da análise de imunofluorescência de cérebros marcados com o soro ACR11B e com o anticorpo anti-mob2 purificado verificou-se que a proteína dMob2 parece estar localizada nos cinetocoros, embora esta localização ainda tenha de ser confirmada através da co-localização com outras proteínas localizadas nos cinetocoros.

A captura dos cinetocoros pelos microtúbulos e o alinhamento dos cromossomas no fuso, normalmente, são processos muito eficientes mesmo que o SAC não esteja funcional. Contudo, quando uma mutação diminui esta eficiência, ocorrem erros mitóticos que, muitas vezes, podem provocar a morte nas moscas deficientes no ponto de controlo de montagem do fuso (revisto em Emre *et al.*, 2011). Por exemplo, Mad1 é uma das proteínas envolvidas no ponto de controlo, e é necessária para gerar um inibidor da anafase, pois catalisa a formação do complexo Mad2-Cdc20, um passo essencial para a inibição da anafase (De Antoni *et al.*, 2005; Mapelli *et al.*, 2007; Sironi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008). Como nos cérebros mutantes Mob2 há um aumento do número de metáfases, em comparação com os cérebros selvagens, é possível sugerir que Mob2 pode interagir com Mad1, inibindo a ligação de Mad2 a Cdc20 e a acção dos inibidores da anafase e, conseqüentemente, promovendo a transição metafase-anafase.

Tal como foi referido anteriormente, em *S. cerevisiae* foi identificada uma proteína pertencente à família das securinas, a Pds1, que tem uma sequência consenso de destruição reconhecida pelo APC, e que está envolvido na inibição da anafase (Choen-Fix *et al.*, 1996). Pds1 é responsável pela inibição de Esp1 que, por sua vez, está envolvido na clivagem de Scc1. Esta última proteína faz parte do complexo da coesina, que é clivada proteoliticamente, permitindo a separação dos cromátídeos irmãos e, em consequência, a transição metafase-anafase. Assim sendo, quando não é degradada pelo APC/C, Pds1 provoca uma paragem em metafase porque os cromátídeos irmãos não se separam. Mob2 pode, assim, promover a ligação do APC/C a Pds1 e como tal, pode mediar a sua destruição, promovendo a transição metafase anafase. Esta hipótese poderia ser uma explicação aceitável para o aumento do número de metafases nos cérebros de larvas mutantes Mob2. Ou seja, como os níveis de Mob2 são menores

nos mutantes, esta proteína não vai mediar a destruição de Pds1 pelo APC/C e, por isso, vai ocorrer uma paragem da célula em metafase. Além disso, Mob2 pode também ser necessário para a clivagem da coesina, o que explicaria os problemas verificados na segregação dos cromossomas durante a anafase.

Analisando o fenótipo dos mutantes Mob2 verificou-se a existência de problemas ao nível da formação do fuso mitótico. Um dos fenótipos muito observados é a inexistência de qualquer estrutura que se assemelhe a um fuso em células com um estado de condensação do DNA avançado. Nestas células, os centrossomas parecem não existir, embora não tenha sido realizada uma marcação específica para esta estrutura. Por sua vez, também são muito visíveis células com fusos monopolares. Nestas células, o fenótipo observado pode dever-se ao facto de os centrossomas não se terem separado durante a profase ou, se a separação ocorreu, os pólos do fuso podem ter colapsado e os centrossomas caído um sobre o outro, sobrepondo-se. Mob2 parece, assim, ser necessário para a separação dos centrossomas e montagem do fuso mitótico. Como tal, é possível que Mob2 interaja com uma cinesina. Uma cinesina com que Mob2 poderia interagir seria a Klp67A, uma proteína envolvida na separação dos centrossomas, na biorientação dos cromátídeos irmãos e na montagem do fuso mitótico (Gandhi *et al.*, 2004; Savoian *et al.*, 2004; Goshima *et al.*, 2007).

A existência de células com problemas na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos do fuso é outro fenótipo visível nos mutantes Mob2. A ocorrência deste fenótipo vem também sugerir que Mob2 pode interagir com uma cinesina, uma vez que, tal como foi referido anteriormente, estas proteínas estabelecem ligações cruzadas com os microtúbulos e, quando a sua função é alterada ocorre uma perda de coesão entre os pólos do fuso resultando numa projecção de feixes de microtúbulos para fora do pólo do fuso. Além disso, Mob2 pode também ser necessário para a focagem das fibras K, tal como acontece com a proteína Mob4 em células S2 de *Drosophila* (Trammeli *et al.*, 2008). Nestas células, os centrossomas parecem também, estar deslocados, contudo seria necessário marcar esta estrutura para inferir realmente a sua posição.

Estudos anteriores mostraram a existência de um índice metafase/anafase superior no mutante Mob2, em comparação com cérebros selvagens, o que sugere a existência de um bloqueio em metafase (Samora, 2007). Através da microscopia em tempo real, confirmou-se este fenótipo. Todas as células filmadas mostraram um bloqueio em metafase, contudo, como todos os filmes se iniciaram quando a célula já estava em metafase, não é possível discernir se a célula parou a progressão do ciclo

devido à mutação no gene Mob2 ou devido a factores ambientais. Nos filmes controlo realizados, por sua vez, a mitose progride normalmente e, como nos mutantes, todos os filmes se iniciam em metafase. Assim sendo, e como as condições utilizadas para a realização dos filmes controlo e dos filmes mutantes Mob2 foram as mesmas, é possível dizer que ocorre um bloqueio em metafase devido à mutação no gene Mob2. Contudo, para que se poder afirmar com certeza a ocorrência deste fenótipo é necessário aumentar o número da amostra e começar os filmes logo no início da mitose.

Este bloqueio em metafase poderia sugerir o aumento do número de mitoses nos cérebros mutantes, em comparação com os selvagens. No entanto, o que se verifica é o contrário, ou seja, os cérebros selvagens apresentam um número de mitoses superior ao dos mutantes Mob2. Para tentar explicar esta contradição, em trabalhos anteriores procedeu-se à análise do perfil celular do mutante por FACS (fluorescence-activated cells sorting) e verificou-se a existência de um elevado número de células que sofrem apoptose (Esteves, 2009). Além disso, outra explicação possível é que Mob2 pode ser necessário para a entrada em mitose.

Em conclusão, neste trabalho mostrou-se que Mob2 parece localizar-se nos cinetocoros e, por isso, é possível sugerir várias funções para esta proteína. Assim sendo, Mob2 de *Drosophila melanogaster* pode funcionar como inibidor da anafase, mediando a destruição de Pds1 pelo APC/C ou mesmo inibindo o APC/C. Além disso, os resultados obtidos mostram que Mob2 pode ser necessário para a formação do fuso mitótico e para a correcta progressão do ciclo celular. Em suma, é possível dizer que Mob2 tem um papel fundamental na progressão da mitose.

No futuro, a procura dos parceiros moleculares de Mob2 poderia ser uma abordagem necessária para ajudar a encontrar a função de Mob2. Além disso, o aumento do número de amostras utilizadas na microscopia em tempo real será necessário para que se possa afirmar com certeza que uma das características fenotípicas dos mutantes Mob2 é o bloqueio em metafase. Seria ainda interessante criar uma linha de moscas mutantes Mob2, que tivessem em simultâneo uma marcação ao nível da tubulina e dos cinetocoros.