

Vanessa Félix Pires

Regulação molecular da execução de mitose



Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Vanessa Félix Pires

Regulação molecular da execução de mitose

Mestrado em Oncobiologia- Mecanismos moleculares do cancro

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professor Doutor Álvaro Tavares



Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Regulação molecular da execução de mitose

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Vanessa Félix Pires

Copyright © Vanessa Félix Pires

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Álvaro Tavares, o meu orientador, por me ter aceite no seu laboratório, pela disponibilidade, partilha de conhecimentos e todos os seus conselhos.

À Doutora Cláudia Florindo por todos os seus ensinamentos na microscopia e pela sua disponibilidade para ajudar quando necessário.

À Inês, a minha companheira de laboratório, por estar sempre lá para me ajudar quando precisei, pela paciência e amizade.

Aos membros do CBMR em especial ao Leonardo, à Cristina, à Susana, ao Tomás e o ao Gil por toda a ajuda laboratorial e pela amizade.

Aos meus amigos Rodrigo, Gonçalo, Andreia, Lizelle e Adriana por toda a paciência e atenção que sempre estiveram o meu lado a incentivar-me.

Aos meus pais, Paula e Sérgio, por me terem apoiado sempre em todos os momentos da minha vida.

Resumo

A regulação do ciclo celular e a integração de todos os sinais permite que as células mantenham a capacidade de se dividirem sem erros. A família de proteínas *monopolar spindle* (Mps) *one binder* (Mob) interagem com cinases que regulam o ciclo celular e a morfologia celular. A desregulação de membros da família Mob foi relacionado com o cancro. Esta família é altamente conservada desde levedura até aos seres humanos, contudo a função de alguns dos membros, como Mob1 e Mob3, durante o ciclo celular ainda não é totalmente conhecida. O objetivo deste projeto foi determinar a função dos genes Mob1 e Mob3 de *Drosophila melanogaster* no ciclo através da análise do fenótipo de mutantes.

Os mutantes nulos de Mob1 em *Drosophila melanogaster* (dMob1) apresentam figuras mitóticas alteradas em neuroblastos larvares de terceiro estadio. Nestas figuras foram observadas anomalias na focagem do fuso nos polos e na formação do fuso. Verificou-se a ocorrência de figuras com fusos mal formados apresentando uma torção do fuso, fusos mal definidos num dos polos, fusos com curvaturas acentuadas e fusos alongados que já deveriam ter iniciado a constrição para prosseguir para telófase.

Os mutantes nulos de Mob3 em *Drosophila melanogaster* (dMob3) são férteis e viáveis. Observou-se que os mutantes de dMob3 apresentaram regiões com manchas escuras que se assemelham manchas necróticas em várias regiões do corpo e, para além disso, apresentam também pequenas massas acinzentadas que se parecem com tumores. Estes mutantes dMob3 apresentam uma desorientação pronunciada. Durante a análise dos neuroblastos larvares, observou-se uma diminuição dos lóbulos óticos e defeitos mitóticos na focagem dos microtúbulos e no alinhamento dos cromossomas. Alguns indivíduos mutantes de dMob3 apresentam uma película esbranquiçada sobre o corpo que se parece com fungos, sugerindo que poderão ter o sistema imune mais debilitado.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que dMob1 poderá estar envolvido na dinâmica de microtúbulos e dMob3 poderá ser um novo gene supressor de tumores que poderá estar relacionado com vias de proliferação celular e vias que promovem a resposta imune.

Palavras chave: Ciclo celular; dMob1; dMob3; *Drosophila melanogaster*; dinâmica de microtúbulos; gene supressor de tumores

Abstract

The cell cycle regulation and integration of all signalling pathway allow the cells to maintain the ability to divide without errors. The *monopolar spindle (Mps) one binder* (Mob) protein family interacts with kinases that regulate the cell cycle and cell morphology. The dysregulation of Mob family members has been associated with cancer. This family is highly conserved from yeast to humans. However, the cell cycle function of some of its members, like Mob1 and Mob3, is still not known. The aim of this project is to determine the function of *Drosophila melanogaster* Mob1 and Mob3 genes during the cell cycle through mutant phenotype analysis.

Mob1 null individuals in *Drosophila melanogaster* (dMob1) present altered mitotic figures in neuroblasts of Third stage instar larvae. Some of the observed anomalies were: unfocused spindle poles, malformed spindles (twisted-spindles or curved-spindles) and anaphases with elongated spindles which should have started the constriction of the membrane but are still not advancing to telophase.

Mob3 null mutants in *Drosophila melanogaster* (dMob3) are fertile and viable indicating that this gene is not essential.. It was observed that dMob3 mutants present regions with darker pigmentation, similar to necrotic tissue in various regions of the body. They also present small grey masses resembling tumours. These dMob3 mutants show an accentuated disorientation on the climbing assay. During larval neuroblasts analysis, it was observed a decrease in the size of optical lobes. Mitotic defects were observed, namely the alignment of chromosomes and small defects in the mitotic fuse. Some dMob3 mutant individuals show a white membrane attached to the body which resembles fungi, suggesting the possibility of a weaker immune system.

In conclusion, the results from this project suggest that dMob1 might be involved in regulating microtubule dynamics, and dMob3 might be a new tumour suppressor gene, possibly involved in immune response pathways

Keywords: Cell cycle; dMob1; dMob3; *Drosophila melanogaster*; microtubule dynamics; tumour suppressor genes

Índice

Agradecimentos.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
Índice.....	xv
Índice de figuras.....	xix
Índice de tabelas.....	xxi
Lista de abreviaturas.....	xxiii
1 Introdução.....	1
1.1 Ciclo celular.....	1
1.1.1 Cromossomas.....	2
1.1.2 Microtúbulos e centrossomas.....	3
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> no estudo do ciclo celular.....	5
1.3 Pontos de controlo do ciclo celular.....	8
1.3.1 Regulação molecular do ciclo celular.....	8
1.4 Ciclo celular e cancro.....	13
1.5 Via de sinalização <i>Hippo</i>	16
1.5.1 Via <i>Hippo</i> e o sistema imune.....	19
1.6 Complexo STRIPAK.....	20
1.7 Família das proteínas Mob.....	22
1.7.1 Mob1 humano.....	24
1.7.2 Mob1 de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
1.7.3 Mob3.....	28
1.8 Objetivos deste projecto.....	31
2 Materiais e Métodos.....	33

2.1	Linhas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas	33
2.2	Condições de crescimento e alimentação	33
2.3	Ensaio de eclosão, mobilidade e fenótipo de linhas mutantes Mob3.....	33
2.4	Medição dos cérebros das larvas de 3ºestadio larvar de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	34
2.5	Identificação e caracterização dos fenótipos mitóticos	34
2.5.1	Optimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros larvares ...	34
2.5.2	Anticorpos primários e secundários utilizados.....	37
2.5.3	Imunomarcaçao de cérebros larvares de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.5.4	Preparação de embriões de <i>Drosophila</i> para marcação com anticorpos	39
2.5.5	Imunomarcaçao de embriões.....	40
2.6	Técnicas de biologia molecular	41
2.6.1	Preparação de amostras <i>Drosophila melanogaster</i> para géis de proteína.....	41
2.6.2	Géis SDS-PAGE	41
2.6.3	Western-blot	42
3	Resultados	45
3.1	Mutantes Mob 1 e Mob3 utilizados neste trabalho.....	45
3.2	Expressão de dMob1 e dMob3 em moscas revertentes.....	47
3.3	Validação de Anticorpos para Western blot	49
3.3.1	Validação do soro ACR10B	49
3.3.2	Validação do soro ACR10A.....	50
3.3.3	Validação do soro ACR4.....	52
3.4	Caracterização do fenótipo do mutante de Mob1	54
3.4.1	Embriões de mutantes de Mob1 apresentam problemas na formação do fuso mitótico.....	54
3.4.2	Processo de optimização da imunomarcaçao de cérebros larvares do terceiro estadio.....	57

3.5	Mutantes Mob1 apresentam uma diminuição do tamanho dos cérebros de larvas de 3ºestadio.....	65
3.6	Caracterização do fenótipo dos mutantes Mob3.....	66
3.6.1	Mutantes Mob3 desenvolvem necrose e tumores	68
3.6.2	Mutantes Mob3 parecem ter imunidade debilitada	70
3.6.3	Mutantes Mob3 ^{sac} apresentam problemas de orientação.....	71
3.6.4	Mutantes de Mob3 apresentam defeitos mitóticos	73
3.6.5	Mutantes Mob3 apresentam uma diminuição do tamanho dos cérebros de larvas de 3ºestadio	75
4	Discussão e Conclusão.....	76
5	Perspetivas futuras	81
6	Bibliografia	83

Índice de figuras

Figura 1.1- Representação esquemática do ciclo celular.	1
Figura 1.2- Cromossomas durante a transição de fases	3
Figura 1.3- Embriogénese em <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Figura 1.4- Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	7
Figura 1.5- Variação da concentração de ciclinas ao longo do ciclo celular.	10
Figura 1.6- Controlo da transição de metafase para anafase.....	12
Figura 1.7- <i>Hallmarks</i> do cancro	15
Figura 1.8 - Via sinalização <i>Hippo</i> conservada em <i>Drosophila</i>	18
Figura 1.9- Papel da via <i>Hippo</i> na regulação imune	19
Figura 1.10- Representação esquemática do complexo STRIPAK em mamíferos	21
Figura 1.11- hMob1 é centrossomal em mitose e a diminuição dos níveis de hMob1 em células HeLa leva a defeitos mitóticos	25
Figura 1.12- Embriões sincícios de <i>Drosophila melanogaster</i> fixados para imunofluorescência	28
Figura 2.1- Representação esquemática da montagem da cassette de transferência.....	43
Figura 3.1- Representação da deleção do gene Mob1 e Mob3 da região genómica do cromossoma 2.....	46
Figura 3.2- Expressão de dMob1 e dMob3 em extratos de cérebros larvares.	48
Figura 3.3- Validação do soro ACR10B.....	51
Figura 3.4- Validação do soro ACR10A.....	52
Figura 3.5- Validação soro ACR4.....	53

Figura 3.6- Embriões sincícios de mutantes Mob1 no ciclo 10 apresentam problemas na formação do fuso mitóticos.	56
Figura 3.7- Imunofluorescência de neuroblastos de 3ºestadio larvar.....	58
Figura 3.8- Otimização do processo de fixação de Imunofluorescência em neuroblasto.....	59
Figura 3.9- Mutantes nulos Mob1 apresentam defeitos em metáfase.....	63
Figura 3.10- Mutantes nulos Mob1 apresentam defeitos em anáfase.....	64
Figura 3.11- Diminuição do tamanho dos cérebros larvas 3ºestadio de mutantes Mob1.....	65
Figura 3.12- Mutante Mob3 é viável e fértil.....	67
Figura 3.13- Mutante Mob3 desenvolvem necrose e tumores em várias regiões.....	69
Figura 3.14- Mutantes Mob3 desenvolvem necrose e tumores.....	70
Figura 3.15- Mutantes Mob3 ^{sac} parecem terá imunidade debilitada.....	71
Figura 3.16- Mutantes Mob3 ^{sac} têm dificuldades de mobilidade.....	72
Figura 3.17- Mutantes <i>w</i> Mob3 ^{sac} apresentam defeitos mitóticos.....	74
Figura 3.18- Diminuição do tamanho dos cérebros larvas 3ºestadio de mutantes Mob3.....	75

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Condições testadas no processo de fixação para otimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros de 3ºestadio larvar de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
Tabela 2.2- Condições testadas no processo de permeabilização e bloqueio para otimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros de 3ºestadio larvar de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
Tabela 2.3- Anticorpos primários utilizados	37
Tabela 2.4- Anticorpos secundários utilizados.....	38

Lista de abreviaturas

APC/C	Complexo promotor de anafase/ciclossoma
ATP	Adenosina trifostato
CAK	Cinase ativadora de CDK
CDK	Cinase Dependente de Ciclina (do inglês <u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase)
Cka	do inglês Connector of kinase to AP-1
CKI	Cinase inibidora de CDK
CRISPR	do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CyO	<i>Curly derivative of Oster</i>
dMob	Mob de <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid)
E2F	Fator transcrição E2
Eps15	do inglês Epidermal growth factor receptor substrate 15
Ex	do inglês <u>E</u> xpanded
GDP	Guanosina difosfato
GFP	do inglês <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent protein
gRNA	Acido ribonucleico guia
GTP	Guanosina trifosfato
hMob	Mob de humano
Hpo	do inglês <i>Ste20-like protein kinase Hippo</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
LATS	do inglês <u>L</u> arge <u>t</u> umour <u>s</u> uppressor
MAPs	Proteínas associadas aos microtúbulos (do inglês <u>M</u> icrotubule <u>a</u> ssociated <u>p</u> roteins)
Mats	do inglês <u>M</u> ob <u>a</u> s <u>t</u> umour <u>s</u> uppressor
Mer	do inglês <i>Merlin</i>
Mob	do inglês <u>M</u> onopolar spindle (<u>mps</u>) <u>o</u> ne <u>b</u> inder
MPF	Fator promotor da maturação
MST1/2	do inglês <i>Mammalian Sterile 20-like 1 and 2</i>
MTOC	Centro organizador de microtúbulos (do inglês <u>M</u> icrotubule <u>o</u> rganizing <u>c</u> enter)
mts	do inglês <i>microtubule star</i>

NDPK	do inglês <i>Nucleoside-diphosphate kinases</i>
NDR	do inglês <i>nuclear Dbf2-related kinase</i>
NSCs	Células estaminais neurais (do inglês <i>Neural Stem Cells</i>)
OMS	Organização mundial de saúde
PBS	Tampão salino fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PH3	Fosfo-histona H3
PP2A	Proteína fosfatase 2A
pRb	Fosfoproteína retinoblastoma
PVDF	fluoreto de polivinilideno
Rb	retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA de interferência
S2	Linha celular <i>Schneider 2</i>
Sav1	do inglês <i>Salvador 1</i>
Sd	do inglês <i>Scalloped</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFP	Fator promotor da fase S
SG2A	do inglês <i>S/G2 nuclear autoantigen</i>
STRIPAK	cinases e fosfatases associadas a <i>striatin</i> (do inglês <i>Striatin-interacting phosphatase and kinase</i>)
TAZ	do inglês <i>Tafazzin</i>
Tb	do inglês <i>Tubby</i>
TBS	Tampão salino Tris (do inglês <i>Tris-buffered saline</i>)
TEAD	do inglês <i>TEA domain transcription factor</i>
TLR	do inglês <i>Toll-like receptor</i>
Trc	do inglês <i>tricornered</i>
VGLL4	do inglês <i>transcription cofactor vestigial-like protein 4</i>
Wts	do inglês <i>Warts</i>
YAP	do inglês <i>Yes associated protein</i>
Yki	do inglês <i>Yorkie</i>

1 Introdução

Todos os organismos vivos, unicelulares ou multicelulares, para sobreviverem têm que ser capazes de dividir as suas células através de um processo conhecido como divisão celular, em que uma célula progenitora terá que dar origem a duas células filhas geneticamente idênticas. A divisão celular deve ocorrer de acordo com uma sequência ordenada de eventos e caso ocorra alguma falha nestes eventos ou no momento adequado poderão surgir várias complicações como o desenvolvimento de tumores.

1.1 Ciclo celular

O ciclo celular é constituído por quatro fases: G1, S, G2 e M (Figura 1.1). Durante a fase G1 a célula cresce e as proteínas necessárias para a divisão são sintetizadas. Após esta fase, as células podem optar por sair do ciclo celular e passar para uma fase G0. Nesta fase as células estão num estado quiescente e mantêm o tamanho constante. Contudo as células podem permanecer em G0 ou regressar ao ciclo celular ativo. Segue-se a fase S (de síntese), na qual a célula sintetiza uma cópia completa do seu material genético no núcleo e também duplica os centríolos. Por fim segue-se a fase G2 que antecede a fase M, a célula prepara-se para entrar em mitose continuando a crescer e a sintetizar proteínas (Alberts et al. 2015).

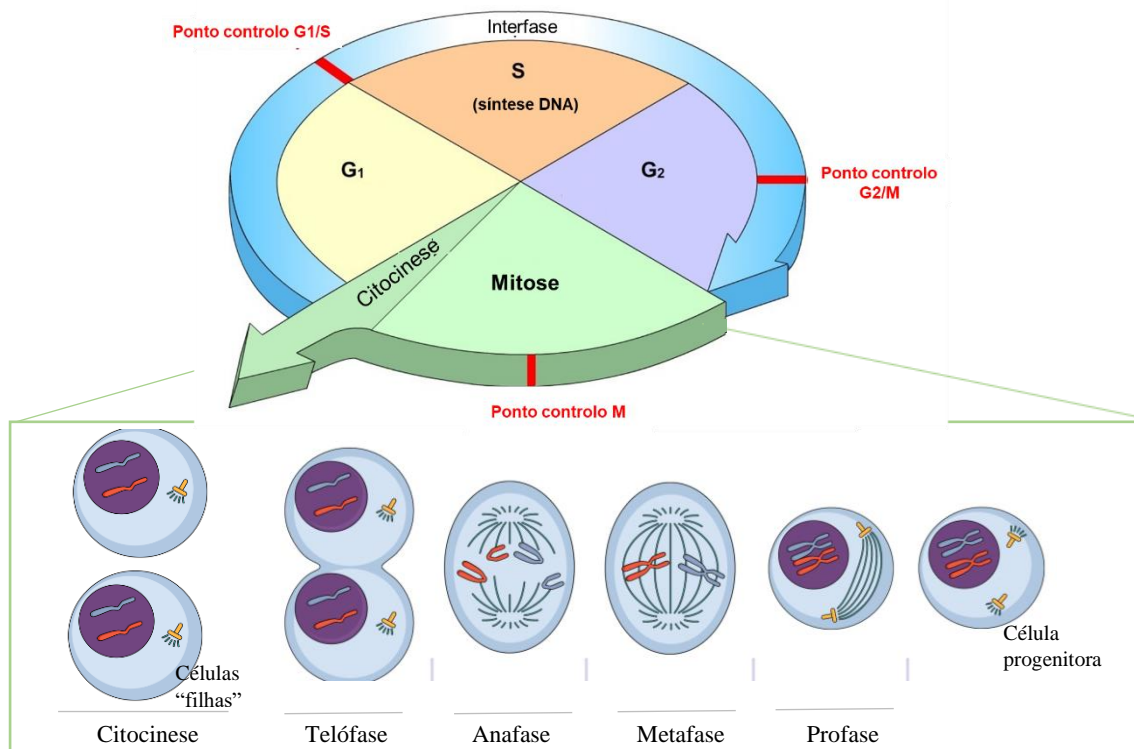


Figura 1.1- Representação esquemática do ciclo celular (G1,S,G2,M) e fases da mitose (prófase, metafase, anafase, telófase e citocinese).

A fase M (mitótica), compreende a prófase, metáfase, anafase e telófase (figura 1.1). A prófase é a primeira fase da mitose, na qual se inicia a condensação da cromatina, desintegração do involucro nuclear, migração dos centrossomas para polos opostos e inicia-se a polimerização dos microtúbulos para a formação do fuso mitótico. Os cromossomas começam a movimentar-se para a zona equatorial da célula e quando estão alinhados na zona equatorial, formam a placa metafásica. Neste momento, a célula encontra-se em metáfase, na qual permanecerá até que todos os cromossomas estejam alinhados e com a orientação bipolar. Quando se encontra nesta condição, a célula prossegue para anafase, onde ocorre a quebra da ligação entre os cromátídeos irmãos, a sua separação e migração para os polos opostos da célula. A mitose termina com a telófase quando os cromossomas atingem os polos da célula. Quando isto acontece, o DNA descondensa, a membrana nuclear volta a formar-se e o fuso mitótico é despolimerizado. Posteriormente iniciam-se os mecanismos que originam a divisão física em duas células filhas, a citocinese (Alberts et al. 2015).

1.1.1 Cromossomas

A vida depende da capacidade das células armazenarem, obterem e traduzirem as informações genéticas necessárias para manter o organismo vivo. A informação genética é hereditária e transmitida de uma célula para as células-filhas durante o processo da divisão celular. Esta informação está armazenada no núcleo celular que contém os cromossomas. Os cromossomas são constituídos pela cromatina que é um complexo de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e proteínas histonas. A estrutura da cromatina apresenta diferentes graus de condensação ao longo das fases do ciclo celular. (Alberts et al. 2015)

No início de interfase a cromatina encontra-se em filamentos descondensados em que não são visíveis estruturas. Após a duplicação do DNA (fase S), são visíveis dois cromátídeos-irmãos que são mantidos unidos pela coesina em toda a sua extensão (figura 1.2). No início da prófase, a cromatina começa a ser compactada através do complexo de condensinas que promove a condensação do DNA e começam a ser formadas estruturas visíveis. No final da prófase quando os cromossomas já estão bastante condensados, as coesinas são removidas dos braços dos dois cromátídeos-irmãos mantendo-se, porém, na região central, o centrómero, de forma a manter os cromátídeos juntos até ao início de anafase. Em anafase, a conexão entre os cromátídeos-irmãos é rompida através da ação da separase que quebra proteoliticamente a restante coesina, permitindo a migração de cada um dos cromátídeos-irmãos para os polos

opostos da célula (figura 1.2) (Antonin and Neumann 2016; Azevedo 2005; Hirano 2015). Os cromossomas apresentam cinetocoros que são estruturas baseadas em proteínas localizadas na superfície de cada cromossoma, na região do centrómero, que medeia sua interação com os microtúbulos de forma a controlar o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica para prosseguir no ciclo celular de forma a fazer a segregação correta dos cromossomas nas células filhas (Maiato, Sampaio, and Sunkel 2004).

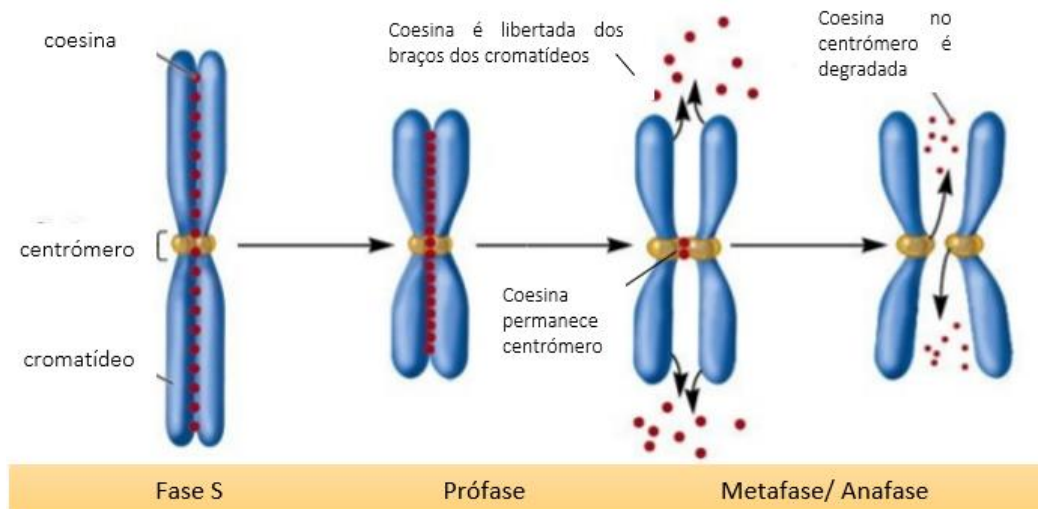


Figura 1.2-Cromossomas durante a transição de fases. Em interfase, no final da fase S dois cromátídeos-irmãos (representado a azul) que são mantidos unidos pela coesina (representado a vermelho) em toda a sua extensão. Em prófase a cromatina é compactada e no final de prófase as coesinas (vermelho) são removidas dos braços dos dois cromátídeos-irmãos mantendo-se, apenas no centrómero (representado a amarelo). Em anafase, a conexão entre os cromátídeos-irmãos é rompida através da degradação proteolítica da coesina. Adaptado de *McGraw Hill Publishers*

Os cromossomas eucarióticos contêm assim a maquinaria intrínseca necessária para iniciar a condensação e possibilitar a movimentação dos cromossomas de forma a assegurar a segregação correta em duas células filhas durante a mitose (Hirano 2015).

1.1.2 Microtúbulos e centrossomas

Os microtúbulos são filamentos do citoesqueleto que estão envolvidos na separação dos cromossomas durante a divisão celular. Os polímeros de microtúbulos formam-se linearmente a partir de dímeros de α - e β -tubulina. Tipicamente, cada polímero contém 13 proto-filamentos

que formam um cilindro oco com 22 nm de diâmetro (Akhmanova and Steinmetz 2015). O crescimento dos microtúbulos ocorre a partir da extremidade positiva, que alcança os centros organizadores de microtúbulos (MTOC). No MTOC, as extremidades negativas dos microtúbulos estão ancoradas, em que se dá um crescimento lento dos microtúbulos. Na extremidade positiva um dímero de guanosina trifosfato (GTP)-Tubulina é incorporado e o GTP ligado é hidrolisado num local de ligação de troca de GTP na subunidade β -tubulina durante ou após a polimerização. Como o GTP ligado à α -tubulina não pode ser hidrolisado, leva à formação de um microtúbulo latente predominantemente constituído de moléculas de guanosina difosfato (GDP). A perda rápida de subunidades de GTP-tubulina nas extremidades dos microtúbulos desencadeia o processo de despolimerização. Quando passam de um estado de polimerização para despolimerização denomina-se de “catástrofe”, e a transição do estado de despolimerização para polimerização denomina-se como salvamento. Assim, os polímeros podem transitar entre um estado de polimerização e despolimerização, esta propriedade denomina-se de “instabilidade dinâmica”(Maiato, Sampaio, and Sunkel 2004).

As alterações na dinâmica dos microtúbulos são essenciais para a organização nas diferentes fases do ciclo celular (Roostalu and Surrey 2017). Esta dinâmica é regulada pelas proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) que se ligam ao longo dos microtúbulos e aumentam a sua estabilidade (Daire and Poüs 2011). As proteínas MAPs vão ter um papel na organização e manutenção do fuso bipolar, na ligação dos microtúbulos aos cinetocoros, o movimento dos cromossomas e da formação da zona de clivagem durante a citocinese (Maiato, Sampaio, and Sunkel 2004).

O principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) das células animais é o centróssoma, um organelo citoplasmático que não possui membranas, constituído por dois centríolos posicionados perpendicularmente rodeados pelo material pericentriolar (PCM), que contém proteínas importantes para a integridade e função dos centróssomas, como os anéis de γ -tubulina (γ -TuRC)(Bettencourt-Dias and Glover 2007; Sanchez and Feldman 2017). Os centróssomas desempenham uma função essencial no processo de divisão celular, uma vez que regulam a nucleação e a organização espacial dos microtúbulos, são importantes para mediar a separação bipolar equilibrada dos cromossomas, contribuindo para a bipolaridade do fuso mitótico, a posição do fuso e para a citocinese (Sanchez and Feldman 2017; Schatten 2008). Inicialmente a célula apresenta um centróssoma (dois centríolos) que, na fase G1, se separam. Durante a fase S ocorre a duplicação dos centróssomas e na fase G2 os centríolos recém

formados atingem o tamanho de centríolos maduros. Na entrada de mitose ocorre a nucleação dos microtúbulos pelos centrossomas, que se separam, e afastam-se para os polos opostos do núcleo. Quando ocorre a citocinese, o centríolo mais maturo move-se para a zona de abscisão, e cada centrossoma é incorporado na respetiva célula filha (Kobayashi and Dynlacht 2011; Schatten 2008).

1.2 *Drosophila melanogaster* no estudo do ciclo celular

A *Drosophila melanogaster*, ou mosca da fruta como é denominada vulgarmente, teve um papel importante no desenvolvimento da biologia durante o século XX, através dos primeiros estudos genéticos neste organismo realizados por Thomas Morgan que permitiu estabelecer os princípios básicos da hereditariedade (Dahmann 2008). A *D.melanogaster* é um dos organismos modelo mais usado e tem vindo a desempenhar um papel relevante em diversas áreas da biologia, incluído a genética clássica, biologia do desenvolvimento, fisiologia, nutrição, estudo do desenvolvimento do sistema nervoso, biologia das células estaminais, ciências comportamentais. A *D.melanogaster* é frequentemente usada para estudar mecanismos subjacentes a doenças humanas como, por exemplo, cancro e doenças neurodegenerativas (Roote and Prokop 2017).

Este organismo modelo de estudo apresenta diversas vantagens, nomeadamente, a facilidade de manter em cultura, o ciclo de vida relativamente curto (10-15 dias) e uma descendência numerosa. Para além disso a mosca da fruta é um bom sistema biológico para o estudo do ciclo celular devido às particularidades do seu desenvolvimento.

O embrião de *D.melanogaster*, nas primeiras fases de desenvolvimento apresenta uma sucessão rápida de mitoses, sendo considerado um sincício (figura 1.4). As divisões celulares consistem apenas na alternância entre a fase M e a fase S (estando suprimidas as fases G1 e G2) e ocorrem todas no mesmo citoplasma, os núcleos têm divisão síncrone. O citoplasma contém todos os nutrientes necessários para as divisões. Inicialmente os núcleos localizam-se no centro do sincício, por volta do ciclo 7, sendo que a maioria migra para a periferia e distribui-se em monocamada (figura 1.3). Estes núcleos continuam uma divisão sincronizada até ao ciclo 14. No ciclo 14 ocorre a celularização originando uma alteração no desenvolvimento, no qual se forma a membrana celular entre os núcleos e distingue-se a fase G2, na qual se em que iniciam também os movimentos de gastrulação. A partir do ciclo 15 a divisão celular começa a ser

controlada pela expressão dos genes do embrião, dado que até esta fase todos os componentes necessários para as primeiras mitoses foram fornecidos pela mãe (Brooks R. and Fantes P. 1993)(Roote and Prokop 2017).

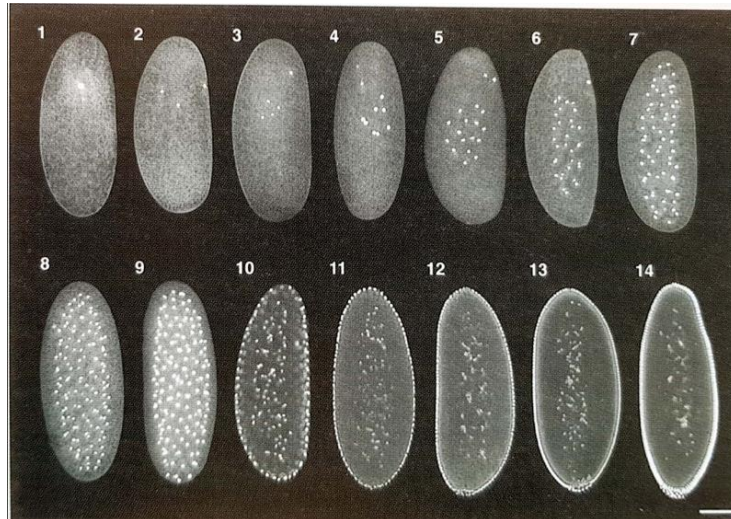


Figura 1.3- Embriogénese em *Drosophila melanogaster*. Na figura estão representadas as primeiras 14 divisões do desenvolvimento embrionário. O embrião divide-se de forma sincronizada até ao ciclo 14, altura em que ocorre a celularização (Sullivan, Ashburner, and Hawley 2000).

O fator que induz a maturação dos oócitos denomina-se de fator promotor da maturação (MPF) que antes de cada divisão celular o MPF aumenta (fase ativa) induzindo a condensação dos cromossomas, a desorganização da membrana nuclear e a formação do fuso mitótico. A desativação do MPF provoca a segregação dos cromossomas, a formação da membrana nuclear e a citocinese seguindo-se a interfase. No ciclo celular das células embrionárias, a inativação do MPF provoca, a replicação do DNA e a duplicação dos centros organizadores dos microtúbulos (MTOC). A ativação do MPF está relacionado com a síntese proteica, do qual existe uma proteína que desaparece no final de cada mitose e reaparece gradualmente na fase seguinte, tendo um comportamento cíclico que foi designada de ciclina. A acumulação das ciclinas durante a interfase, ativa o MPF e este, ativo, induz a destruição da ciclina que conduz a inativação do MPF. O fator MPF é formado por um complexo proteico de duas subunidades, a proteína cinase CDK1 ou p34cdc2 e a ciclina B que se encontra muito concentrada no início da mitose (Alberts et al. 2015; Azevedo 2005).

Após a eclosão do ovo seguem-se três fases larvares em que o desenvolvimento larvar é conseguido pelo crescimento das células larvares. Apenas o sistema nervoso central e os discos imaginais mantêm a sua atividade mitótica que é mais elevada na fase do terceiro estadio. Segue-se a pupa, onde ocorre a diferenciação dos tecidos, do qual ocorre a metamorfose, dando origem ao organismo adulto (figura 1.4).

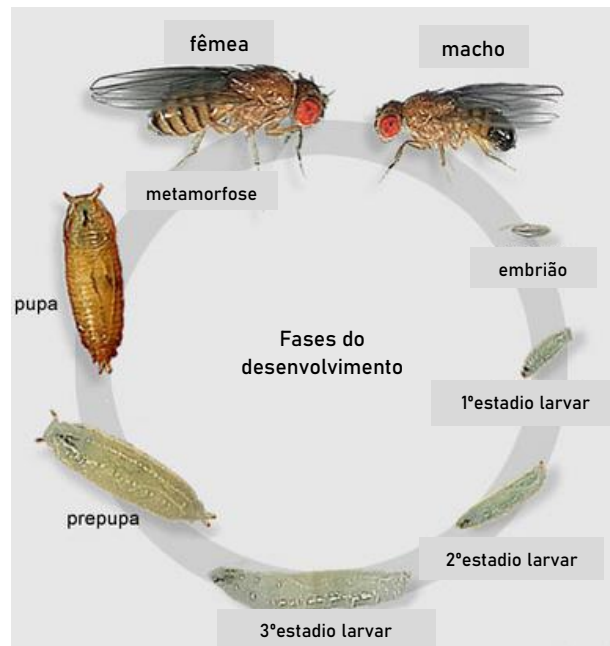


Figura 1.4 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Desde a eclosão do ovo até ao 3ºestadio larvar o desenvolvimento é conseguido apenas através do crescimento das células larvares. Apenas o sistema nervoso central e os discos imaginais apresentam atividade mitótica e só de seguida na pupação é que se inicia a diferenciação dos tecidos (processo de metamorfose) dando origem a um organismo adulto. Adaptado de (Roote and Prokop 2017).

O ciclo celular deste organismo é semelhante ao das células de mamíferos, não só quanto ao nível da organização do ciclo que contém as mesmas fases (G1,S,G2 e M), mas também quanto ao nível molecular do qual a maquinaria fundamental do ciclo, como as ciclinas, são altamente conservadas entre mosca e mamífero. As semelhanças existentes entre mosca e mamíferos, sugerem que a mosca pode servir como modelo no estudo do processo de proliferação durante a tumorigenese.

1.3 Pontos de controlo do ciclo celular

A sequência ordenada de todos os eventos do ciclo celular é assegurada pelas relações de dependência entre cada um dos acontecimentos. Os pontos de controlo do ciclo celular determinam as condições apropriadas para que a célula possa prosseguir para a fase seguinte do ciclo, identificaram-se três pontos de controlo: na transição da fase de G1/S (ou ponto de restrição), na transição da fase de G2/M e na transição em mitose de metáfase/anáfase (figura 1.1). A principal função destes pontos de controlo é assegurar a integridade do genoma ao longo do ciclo celular.

Na transição de G1/S é quando atua o principal sensor de danos do DNA, que monitoriza o tamanho e integridade do DNA. Contudo a célula no caso de replicação incompleta pode parar na fase S. Na transição de G2/M é monitorizada a fidelidade do DNA replicado e tal como o ponto de controlo anterior é um sensor de dano DNA. É seguido pelo ponto de controlo da transição metáfase-anáfase, do qual os cromossomas devem estar devidamente alinhados com o fuso mitótico e os cromátídeos-irmãos têm que estar ligados bilateralmente com o fuso mitótico. Se houver algum problema na montagem do fuso ou alinhamento dos cromossomas, este ponto de controlo irá impedir a saída de mitose (Garrett 2001; Tyson, Csikasz-Nagy, and Novak 2002).

A nível molecular o ciclo celular é controlado por cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e por ciclinas, que ativam as CDKs. Quando associadas com a ciclina apropriada, as CDKs desencadeiam a fosforilação dos substratos efetores envolvidos na síntese DNA, biogénese de histonas, duplicação do centrosomas, condensação da cromatina, montagem do fuso e desintegração do envelope nuclear (Santo, Siu, and Raje 2015; Tyson, Csikasz-Nagy, and Novak 2002). A oscilação periódica da atividade CDK/ciclina garante que o ciclo celular ocorra de forma ordenada e irreversível.

1.3.1 Regulação molecular do ciclo celular

A progressão ordenada do ciclo celular para cada uma das fases é regulada intrinsecamente através de moléculas reguladoras positivas e negativas, que é a base do desenvolvimento dos organismos. A desregulação do crescimento celular poderá dar origem a diversas consequências como falhas ou alterações no desenvolvimento e crescimento neoplásico.

A progressão do ciclo celular é regulada positivamente pela família de proteínas cinases denominadas como cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs são consideradas enzimas binárias, que são constituídas por uma subunidade catalítica (CDK) que coordena a adenosina trifosfato (ATP) e transfere o fosfato para o substrato apropriado. A CDK na forma de monómero não tem atividade enzimática. Para a sua ativação é necessária a associação de um ativador alostérico específico, a ciclina. As subunidades da CDK associam-se com ciclinas específicas durante as diferentes fases do ciclo celular. As ciclinas sofrem um ciclo de síntese e de degradação a cada ciclo, enquanto que as CDK mantêm-se constante. As mudanças cíclicas das ciclinas resulta na formação e ativação dos complexos CDK-ciclina que levam à ativação de cinases que desencadeiam a transição através das fases do ciclo celular. A ativação completa do complexo de ciclina-CDK ocorre quando uma outra cinase, a cinase ativadora de CDK (CAK), fosforila a treonina na posição 160 próximo do sítio ativo da CDK, causando uma mudança conformacional que aumenta ainda mais a atividade do complexo. Cada fase do ciclo celular é ativada por um complexo CDK-ciclina, se a ciclina se encontrar na concentração máxima (figura 1.5)(Coutts and Weston 2016; Li, Barbash, and Diehl 2014; Malumbres and Barbacid 2009).

No ponto de restrição (R) atuam os complexos CDK4-ciclina D e CDK6-ciclina D, ajudam a desencadear a progressão e entrada no ciclo celular, os níveis da ciclina D decrescem na fase S. No início da fase S a ciclina E liga-se à CDK2 e ajuda a estimular a duplicação dos cromossomas, os níveis da ciclina E permanecem elevados até à mitose. No início da mitose o complexo CDK1-ciclina B (também conhecido MPF) atinge a sua concentração máxima, estimulando a entrada na mitose no ponto de controlo transição de G2/M. Quando o complexo se encontra ativo fosforila substratos chave que controlam a condensação dos cromossomas, a desintegração do involucro nuclear, bem como a formação do fuso mitótico e, por fim, a separação dos cromatídios irmãos. Uma vez que os cromatídios irmãos estão separados, a célula retoma para níveis reduzidos da atividade do complexo, que levará à reorganização do involucro nuclear, do fuso mitótico e a poderá dar-se a citocinese (Alberts et al. 2015; Azevedo 2005; Li, Barbash, and Diehl 2014).

Os complexos CDK4-ciclina D e o complexo CDK2-ciclina E são indispensáveis para a progressão do ciclo celular ambos constituem o fator de promoção da fase S (SPF), mas é necessária a ação da fosfoproteína do retinoblastoma (pRb). Na sua forma ativa, ou seja, desfosforilado, o retinoblastoma liga-se a fatores de transcrição como E2F e bloqueia a transcrição de genes associados à síntese de DNA. Quando o Rb é fosforilado (forma inativa)

pela CDK2/CDK4 irá libertar o E2F levando à transcrição de genes associados à síntese de DNA, permitindo assim a transição de G1/S (Alberts et al. 2015; Li, Barbash, and Diehl 2014b; Santo, Siu, and Raje 2015).

Cada ciclina possui uma região molecular que a diferencia de outras ciclinas, e possui também uma região de degradação que é reconhecida por outras proteínas (de reconhecimento da região de degradação) que permitem a fixação de moléculas de ubiquitina. A ubiquitina é reconhecida pelas protéases no citoplasma e degrada pela via do proteossoma.

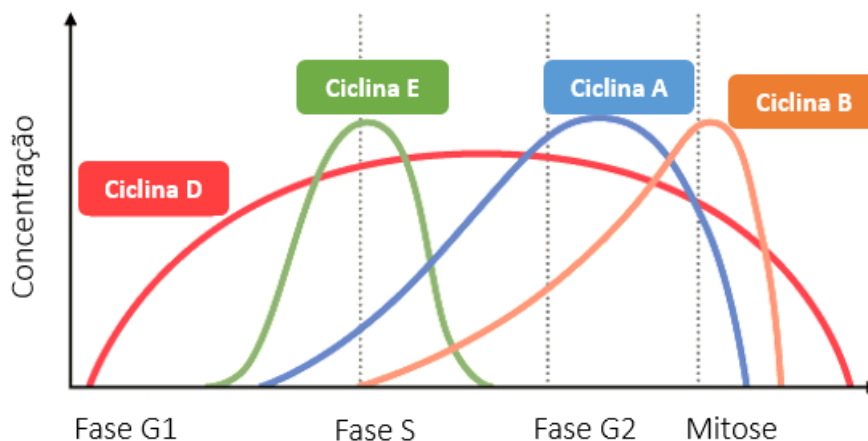


Figura 1.5-Variação da concentração de ciclinas ao longo do ciclo celular. Existe uma correlação direta entre a acumulação de ciclinas e os três pontos de controlo do ciclo celular. O declínio acentuado dos níveis de ciclinas correspondem aos pontos de controlo, nomeadamente à transição entre as fases do ciclo, bem como à degradação de ciclinas por enzimas proteolíticas. Adaptado de “WikiMiMa”/Wikimedia Commons.

Os complexos ciclinas-CDK são controlados tanto por fosforilação como por desfosforilações. A fosforilação do par de aminoácidos, tirosina 15 e treonina 14, pela cinase Wee1 inibe a atividade do complexo ciclina-CDK, enquanto que a desfosforilação desses aminoácidos pela fosfatase Cdc25 irá aumentar a atividade das CDKs, uma vez que retira os fosfatos inibitórios CDK1 permitindo assim a entrada em mitose. A ligação de proteínas inibidoras de CDKs (CKIs) também regulam os complexos ciclina-CDK, nomeadamente as proteínas p53 e p21, que impedem as ciclinas se ligarem as CDKs, e a p16 que competem com as ciclinas pela ligação as CDKs (Coutts and Weston 2016; Malumbres and Barbacid 2009).

A p53 é uma proteína supressora de tumores, regula os mecanismos da proliferação celular, atuando ao nível da transcrição do DNA. No caso de lesões do DNA, ativa os genes de apoptose ou provoca a paragem do ciclo em G1, pela indução de outra proteína, a p21(CKIp21),

que por sua vez atua sobre as CDK-ciclina, inibindo a replicação do DNA na fase S. Se a p53 não induzir a ação da p21, a célula com lesões continua a proliferar podendo provocar o aparecimento de cancro.

A p16 (CDKIp16) é a proteína inibidora do complexo CDK4-ciclina D. O complexo p16-CDK4-ciclinaD-pRb é essencial para a regulação da transição da fase G1/S, uma vez que quando o retinoblastoma não se encontra fosforilado pela CDK está ligado ao fator de transcrição E2F e bloqueia a transição de G1/S (Coutts and Weston 2016; Malumbres and Barbacid 2009).

O segundo tipo de mecanismo de controlo durante a divisão celular envolve a monitorização da ligação entre os cinetocoros de cada cromatídio e os microtúbulos do fuso mitótico. Este mecanismo de controlo irá monitorizar a transição de metafase para anafase de forma a que todos os cromossomas estejam biorientados (Azevedo 2005). A transição de metafase para anafase é desencadeada não pela fosforilação, mas pela destruição de proteínas que vão permitir determinar quando um cromossoma não está biorientado ou quando o fuso não está a exercer a devida tensão sobre os cromossomas. O complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C), pertence à família de ubiquitinas ligases que se localiza no cinetocoro. O APC/C é o principal regulador da segregação dos cromossomas e progressão para anafase através da degradação proteolítica de proteínas reguladoras específicas (Castro et al. 2005).

Um dos substratos do complexo promotor da anafase (APC) é a securina. O APC adiciona a marcação de ubiquitina à proteína securina que leva à degradação pelo proteossoma no citoplasma (figura 1.6). A securina normalmente está ligada à separase mantendo esta inativa. Assim quando a securina é degradada, separa-se da separase e ativa a separase. A separase corta a coesina, que é responsável pela coesão entre os cromatídios-irmãos que permite que estejam unidos durante o início de mitose. Por isso, enquanto o APC estiver inibido a célula não consegue sair de mitose e não ocorre a segregação dos cromatídios (figura 1.6). A célula para além da monitorização da ligação dos cinetocoros aos microtúbulos do fuso também monitoriza a tensão que estes exercem através dos complexos de proteínas Bub1-Bub3, BubR1-Bub3 e Mad1-Mad2 (Azevedo 2005; Castro et al. 2005; Liu et al. 2019).

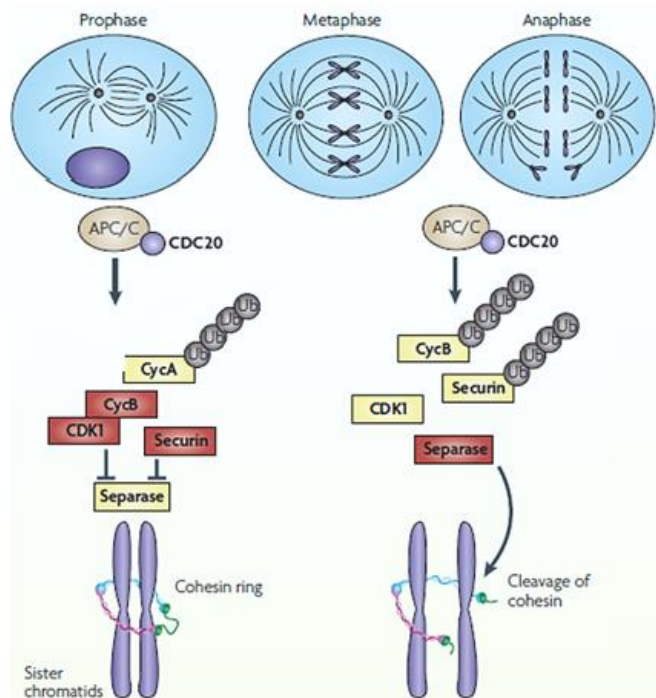


Figura 1.6- Controle da transição de metafase para anafase. O complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C)-complexo cdc20 (cell division control 20) têm como alvo a degradação proteolítica da ciclina A por ubiquitinação. Na presença de cromossomas desalinhados a separase é mantida inativa pela securina e pela CDK1-ciclina B. Após a ligação bipolar dos cromossomas ao fuso mitótico a securina e a ciclina B são também ubiquitinadas pelo APC/C-cdc20. A degradação destas proteínas inibem a CDK1 levando à ativação da separase, que cliva a coesina e separa os cromatídeos-irmãos, facilitando assim a transição de metafase para anafase. As proteínas que se encontram ativas estão representadas nas caixas a vermelho. Adaptado de (Malumbres and Barbacid 2009)

Durante o a fase final de prófase, o complexo Bub1-Bub3 começa a concentrar-se nos cinetocoros, e pouco depois surge a proteína Mad2. Estas proteínas acumulam nos cinetocoros também durante a prometáfase conjuntamente com a proteína BubR1. Quando um cinetocoro estabelece uma ligação estável com microtúbulos do fuso, as proteínas Mad2 e Bub1 deixam de se acumular, e quando os cromossomas se encontram biorientados a Mad2 migra em direção aos polos. Porém, a proteína BubR1 continua a acumular-se nos cinetocoros durante a prometáfase e só sai depois de os microtúbulos exercerem tensão. As proteínas Mad2 e BubR1 não se acumulam apenas nos cinetocoros que não estão ligados ou que não têm tensão. Os cinetocoros servem de local em que estas proteínas entram isoladamente, mas saem na forma de complexos inibitórios, isto é, os complexos contêm as proteínas Mad2, BubR1 e a proteína cdc20 que é um ativador do APC. Deste modo quando não há ligação aos microtúbulos ou não há tensão as proteínas Mad2 e BubR1 entram nos cinetocoros e fazem complexos com a

proteína cdc20 e, portanto, o APC não pode ser ativado. Quando os cinetocoros ligam aos microtúbulos a proteína Mad2 não entra nos cinetocoros, assim os microtúbulos exercem tensão, não deixando BubR1 entrar. A proteína cdc20 fica assim livre e pode ativar o complexo promotor da anafase (APC). A ativação do APC pela proteína cdc20 leva à clivagem das coesinas permitindo assim a separação dos cromatídios. A presença de apenas um cinetocoro não ligado aos microtúbulos é suficiente para impedir a saída de mitose (Azevedo 2005; Castro et al. 2005; Li, Barbash, and Diehl 2014; Liu et al. 2019).

Outro sistema de controlo do ciclo celular que também utiliza uma ubiquitina ligase é o complexo SCF (Skp1–Cullin–F-box-protein). O complexo SCF reconhece substratos fosforilados para que são reconhecidos especificamente pela proteína F-box que direciona a destruição dos inibidores das ciclina E-CDK2 no final da fase G1 para o proteossoma, promovendo assim a ativação deste complexo ciclina-CDK na fase S e a replicação do DNA (Cardozo and Pagano 2004; Castro et al. 2005; Li, Barbash, and Diehl 2014).

A perda do controlo da progressão de mitose está associada à formação de células tumorais que, em muitos casos, não conseguem manter a estabilidade do seu genoma.

1.4 Ciclo celular e cancro

Os organismos multicelulares para crescerem e sobreviverem têm que ter a capacidade de se dividir, assim a integração de todos os sinais e a regulação do ciclo celular permite que as células mantenham essa capacidade controlada de se dividirem sem erros. Contudo caso ocorra alguma falha na execução dos eventos do ciclo celular ou no momento adequado poderá levar a defeitos na segregação dos cromossomas que causa instabilidade genómica e daí poderão surgir várias consequências para a células e o organismo, como por exemplo, o aparecimento de cancro.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é uma doença associada à proliferação celular descontrolada e à sua capacidade invasiva. As células cancerígenas dividem-se de forma desregulada resultante de defeitos em vias de sinalização associadas ao crescimento celular, apoptose e alterações em vias metabólicas.

A hiperproliferação de células cancerígenas é principalmente devido à ativação de sinais de crescimento induzido por proto-oncogenes, como RAS,RAF,MAPK, que têm funções

efetoras nas cascatas de sinalização, e estão desregulados em cerca de 25% dos tumores humanos. As células cancerígenas também escapam aos genes supressores de tumores que funcionam como reguladores negativos de ciclo celular, como gene Rb (retinoblastoma) e o TP53, através de mutações nesses genes, que resulta no crescimento descontrolado. A morte celular por apoptose é outro mecanismo fisiológico que mantém a homeostase celular e as células cancerígenas desenvolvem estratégias para escapar à apoptose, através aumento da atividade dos genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w) e dos fatores de pro-sobrevivência (Igf-1, igf2) ou pela diminuição da expressão de genes pro-apoptóticos (Bax, PUMA, bin). Outra das características de células cancerígenas é a reativação da enzima telomerase, presente em cerca de 90% dos cancros humanos, esta impede o encurtamento dos telómeros dos cromossomas permitindo assim a imortalidade replicativa (Mirzoyan et al. 2019; Weinberg 2014).

Para que as células cancerígenas possam sobreviver alteram também vias metabólicas. Estas células apresentam uma elevada taxa replicativa, assim têm uma elevada taxa metabólica e por isso encontram-se em condições de baixos níveis de oxigénio (hipóxia). Em tumores epiteliais, esta condição desencadeia uma alteração ao nível dos vasos sanguíneos, do qual é induzida a proliferação da secreção de fatores pro-angiogénicos, como o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), permitindo a formação de novos vasos que penetram na massa tumoral de modo a fornecer mais nutrientes e oxigénio. Ocorre também uma reprogramação celular do seu metabolismo, do qual alteram de fosforilação oxidativa para a glicólise anaeróbia, onde a glucose é usada para produzir lactato através do processo denominado de “efeito de Warburg”. Esta reprogramação do metabolismo irá permitir a produção de intermediários necessários para a biossíntese celular (Mirzoyan et al. 2019; Weinberg 2014).

Um dos últimos estádios da tumorigénese é a capacidade de escapar às fronteiras impostas pelas células vizinhas, invadem os tecidos circundantes e metastizam para locais distantes do tumor primário, disrompendo a polaridade ápico-basal está associado com a diminuição da expressão de moléculas que permitem o contacto célula-célula e a libertação de metaloproteases (MMP-1) que degradam a matriz extracelular permitindo que as células tumorais escapem e colonizem outros órgãos e adquiram novas propriedades oncogénicas (Foster 2008; Mirzoyan et al. 2019; Weinberg 2014).

A maioria das vias de sinalização que controlam o crescimento celular e os processos de invasão em mamíferos têm uma função conservada em moscas. *A Drosophila melanogaster*,

tem sido um modelo amplamente utilizado para estudos genéticos e para estudos de compreensão de mecanismos moleculares associadas a doenças humanas, tal como o cancro, uma vez que muitas das propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas são conservadas, e cerca de 75% dos genes que causam doenças humanas têm um homólogo funcional em *Drosophila* (Pandey and Nichols 2011).

Em *Drosophila melanogaster*, um dos genes supressores de tumores descoberto foi o *Mob as tumour suppressor* (ortólogo em humano Mob4A/B) que pertence à via de sinalização *Hippo*. A via de sinalização *Hippo* coordena a proliferação e a morte celular pela regulação de moléculas requeridas para o controlo do ciclo celular e apoptose, como a ciclina E e a ubiquitina ligase DIAP1. A ausência de *Mats* em mutantes de *Drosophila* cria fenótipos de sobrecrecimento tal como de outros genes supressores de tumores envolvidos nessa via, como *hippo* (*hpo*), *savador* (*sav*) e *warts* (*wts*), que regulam negativamente a expressão da ciclina E, e de DIAP1. No caso de *Mats* para além de afetar a expressão da ciclina e da ubiquitina ligase poderá também regular negativamente a proteína fosfatase *cdc25* que é necessária para a transição de G2-M (Lai et al. 2005).

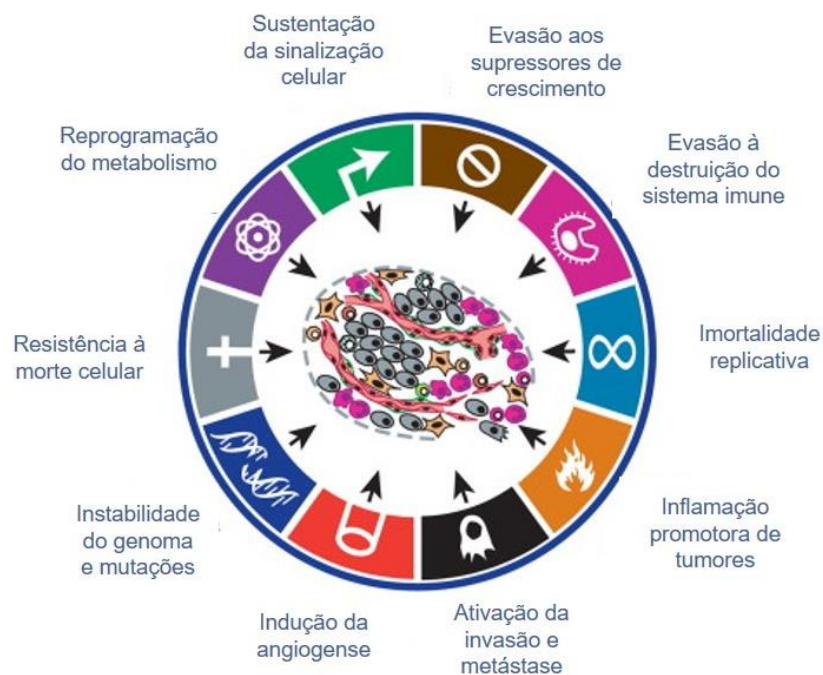


Figura 1.7- Hallmarks do cancro, características biológicas que as células cancerígenas adquirem. Adaptado de (Hanahan and Weinberg 2011)

Deste modo a desregulação do ciclo celular faz com que as células transformadas prossigam no ciclo e acumulem mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumores e adquiram características biológicas descritas como “*Hallmarks do cancro*”(figura 1.7)(Foster 2008; Hanahan and Weinberg 2011). Os proto-oncogenes atuam a nível da proliferação celular, quando mutados podem promover o crescimento de tumores. Os genes supressores de tumores funcionam como reguladores negativos de ciclo celular, e quando mutados, deixam de inibir a progressão do ciclo celular, facilitando o crescimento.

1.5 Via de sinalização *Hippo*

Em organismos multicelulares o controlo do tamanho dos órgãos é uma questão central da biologia. A via de sinalização *Hippo*, que regula a proliferação celular e apoptose em tecidos epiteliais, é uma das vias que regula o tamanho dos órgãos. A via foi primeiramente descoberta em *Drosophila melanogaster* através de rastreios genéticos para identificar genes supressores de tumores, permitindo a descoberta dos primeiros quatro componentes da via *Hippo*: *Warts* (Wts) da família de proteínas cinases NDR; a proteína *Salvador* (Sav); a proteína cinase *Ste-20-like Hippo* (Hpo); e a proteína adaptadora *Mob as tumour suppressor* (Mats). Mutantes com perda de função de algum destes quatro genes apresentam um fenótipo de sobrecrecimento caracterizado por um aumento da proliferação e uma diminuição da morte celular (Pan 2010). Estes quatro genes formam uma cascata na qual o complexo cinases Hpo-Sav fosforila e ativa o complexo cinases Wts-Mats. O efetor final desta cascata de cinases é o co-ativador transcripcional *Yorkie* (Yki) que Wts fosforila diretamente e inativa.(Huang et al. 2005) . O gene *Yorkie* funciona como um oncogene e a sua sobre-expressão leva à perda da sinalização de *Hippo*. Deste modo Yki é inibido pela cascata de cinases *Hippo* (figura 1.7) (Huang et al. 2005; Pan 2010).

A via de sinalização *Hippo* é altamente conservada desde de *Drosophila* a mamíferos (figura 1.8). Os ortólogos de Hpo em mamíferos são MST1 e MST2 que formam heterodímeros com SAV1 (ortólogo de Sav) e a sua interação é necessária para que MST1/2 fosforile SAV1, MOB4A e MOB4B (ortólogos de *Mats*) e as cinases LATS1 e LATS2 (ortólogo de Wts) (figura 1.8). Paralelamente à cinase MST1/2, outras cinases, incluindo a família de proteínas MAP4K1/2/3/5 (ortólogo em *Drosophila happyhour* (hppy), MAP4K4/6/7 (ortólogo em

Drosophila Misshapen(Msn)) e as cinases TAO (TAOK1/2/3), podem também ativar LATS1/2 através da sua fosforilação direta (Meng et al. 2015).

As cinases LATS1 e LATS2 fosforilam diretamente o YAP e TAZ (ortólogo de Yki) em múltiplos locais inibindo a sua localização nuclear, ou seja YAP/TAZ fosforilado liga-se à proteína 14-3-3 e é sequestrado para o citoplasma ou poderá sofrer fosforilações subsequentes pela cinase caseína 1 que leva à sua ubiquitinação e posterior degradação pelo proteossoma (figura 1.8) (Yu, Zhao, and Guan 2015). YAP e TAZ são co-reguladores transcricionais que não se ligam ao DNA, mas que se associam a fatores de transcrição que se ligam ao DNA, como a família de fatores de transcrição TEAD (ortólogo em *Drosophila Scalloped* (Sd)). Uma vez ativada a via *Hippo* irá limitar o crescimento e a proliferação celular através da fosforilação e inibição de YAP/TAZ. Quando a via *Hippo* está inativa YAP/TAZ encontra-se desfosforilado e transloca-se para o núcleo, onde se irá ligar a TEAD e induzir a transcrição de genes necessários para a proliferação celular, sobrevivência e migração (figura 1.8). A atividade transcricional de YAP/TAZ é modulada negativamente por VGLL4 (*transcription cofactor vestigial-like protein 4, ortholog of Drosophila Tgi*), assim VGLL4 compete diretamente com YAP para se ligar a TEAD, resultando na inibição da expressão dos genes alvo e suprimindo assim o fenótipo de sobrecrecimento (Koontz et al. 2013).

A regulação da via de sinalização *Hippo* pode ser feita por sinais intrínsecos e extrínsecos, incluindo contacto célula-célula, rigidez da matriz extracelular, sinais de stress e polaridade celular. Estes sinais são maioritariamente modulados por eventos de fosforilação da cascata de cinases MST-LATS através de componentes a montante ou periféricos à via de sinalização. Por exemplo, em *Drosophila*, as proteínas *Merlin* (Mer) e *Expanded* (Ex) formam complexos distintos com reguladores da via *Hippo* no córtex celular ou nas junções intracelulares para integrar sinais resultantes na ativação da cascata *Hippo*. Em mamíferos, a proteína Neurofibromatose tipo 2 (NF2- homólogo de *Merlin* em mamíferos), promove a via *Hippo* através da ligação direta e recrutamento das cinases LATS para a membrana plasmática e assim aumentar a fosforilação para o complexo de cinases MST-Sav1 associado à membrana (Bae and Luo 2018).

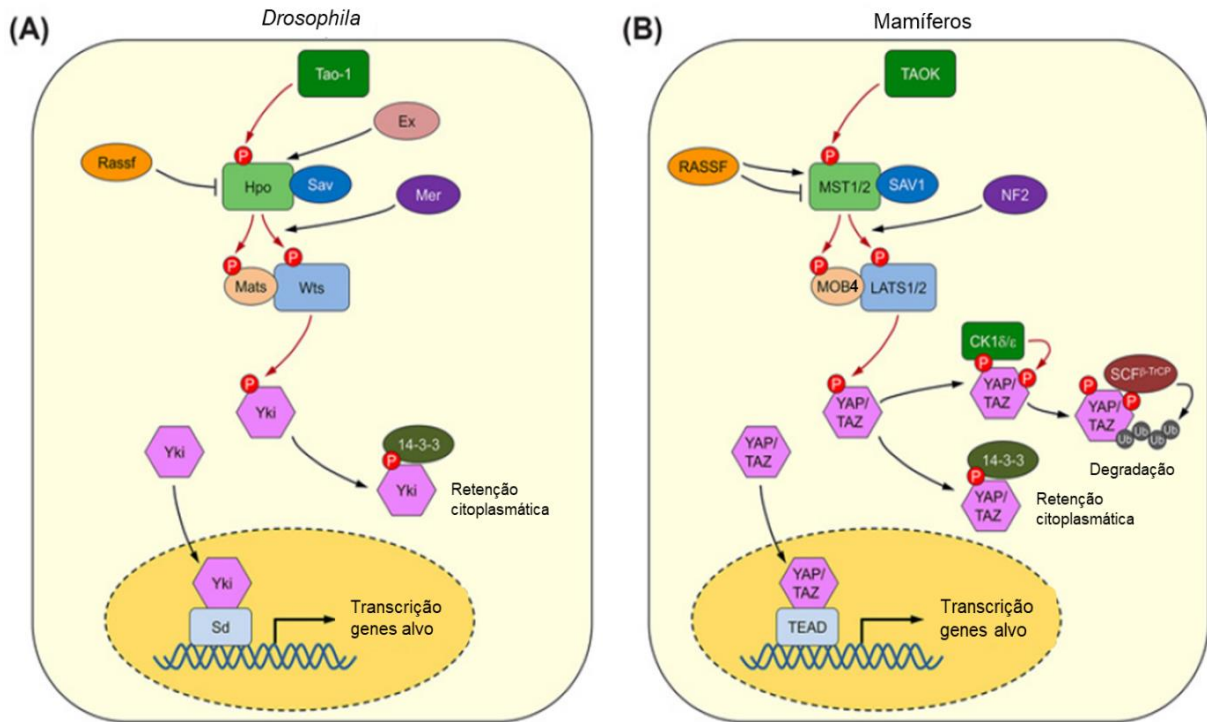


Figura 1.8 - Via sinalização Hippo conservada em *Drosophila* (A) e mamíferos (B). O mesmo esquema de cores corresponde aos componentes homólogos. As fosforilações estão indicadas com setas vermelho escuro. A ativação das cinases MST1/2 é o evento chave para iniciar a via de sinalização, contudo também poderá ser ativada em *Drosophila* por Merlin (Mer) e Expanded (Ex), em mamíferos NF2 e TAOK promovendo recrutamento das cinases efetoras LATS. Quando a via hippo está inativa, YAP/TAZ encontra-se desfosforilado e acumula-se no núcleo onde se liga com TEADs para induzir a transcrição de genes alvo. Quando a via hippo está ativa, a cinase MST1/2 ativa LATS fosforila YAP/TAZ resultando na sua ligação a proteína 14-3-3 e à sua retenção citoplasmática e posterior degradação. Um dos reguladores negativos desta via de sinalização hippo é a proteína RASSF impede a ativação de Hippo/MST1/2. Adaptado de (Bae and Luo 2018)

A ativação das cinases MST1/2 é o evento central da via de sinalização Hippo, uma vez que MST1/2 tem a habilidade intrínseca de se autoativar através da dimerização, e a sua atividade cinase tem que ser estritamente regulada para evitar o funcionamento inadequado da via de sinalização e defeitos no desenvolvimento. Um dos mecanismos para evitar a autoativação de Hippo/MST1/2 é através das proteínas supressoras de tumores RASSFs que podem formar heterodímeros com Hippo/MST1/2 (através domínios SARAH), inibindo a autoativação da cinase Hippo, funcionando assim como um regulador negativo da via de sinalização Hippo tanto em *Drosophila* como em mamíferos (Bae and Luo 2018). Outro mecanismo de regulação negativa é a antagonização de MST1/2 por fosfatases, como as fosfatases associadas a striatin (complexo STRIPAK). Em células humanas, o STRIPAK liga-

se à cinase MST1/2 por associação dependente de fosforilação através da interação MST1/2 com a proteína adaptadora SLMAP (*sarcolemmal membrane-associated protein*).

A desregulação dos componentes da via de sinalização *Hippo*, como as cinases MST e LATS/NDR, proteína Mob4, bem como efetores YAP/TAZ, foram reportados em vários modelos animais com tumores e com múltiplos tipos de cânceros humanos, incluindo gliomas, câncer colorretal e câncer do endométrio (Harvey, Zhang, and Thomas 2013).

1.5.1 Via *Hippo* e o sistema imune

Em *Drosophila*, a via de sinalização *Hippo* e *Toll* estão funcionalmente interligadas na mediação da resposta imune anti-microbiana. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos e é conseguida através das células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) que contêm receptores, como por exemplo as da família de receptores *Toll-like* (TLR) que irão detectar, fagocitar e matar os patógenos. Este reconhecimento desencadeia a síntese e libertação de vários tipos de citocinas e quimiocinas, que por sua vez, recrutam mais células imunes.

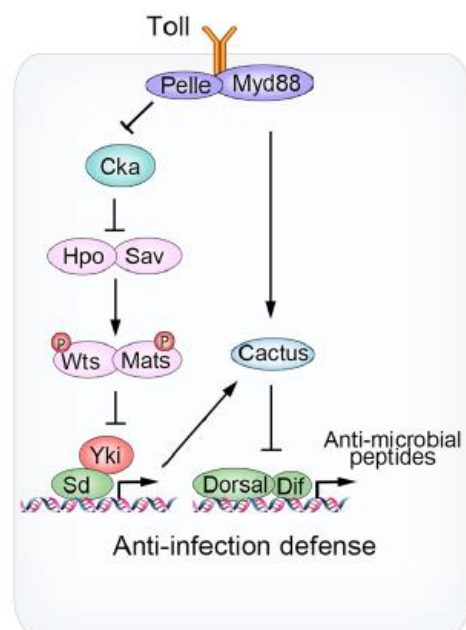


Figura 1.9- Papel da via *Hippo* na regulação imune. A via de sinalização *Toll* ativa a via *Hippo* em células do sistema imune inato. Em *Drosophila*, a cascata *Toll-Myd88-Pelle* leva à ativação da sinalização *Hippo*, que causa o bloqueio de *Yorkie* (*Yki*) e a indução da expressão de peptídeos antimicrobianos mediado por *Dorsal/ Dif*. Adaptado de (Hong et al. 2018)

A ativação de *Yorkie*-Sd regula diretamente a transcrição de *Cactus* (ortólogo IκB *Drosophila*), inibindo assim a produção de péptidos anti-microbianos e aumenta a vulnerabilidade para infecções por bactérias gram-positivas e fungos. A ativação da cascata sinalização *Toll-Myd88-Pelle* leva à fosforilação e degradação de Cka, uma das subunidades do complexo inibitório de *Hippo* (STRIPAK), permitindo que *Hippo* impeça a atividade de *Yorkie* e que sejam induzidos efeitos antimicrobianos (figura1.9). (B. Liu et al. 2016)

1.6 Complexo STRIPAK

Como atrás descrito, a via de sinalização *Hippo* é determinante para a proliferação tanto em *Drosophila* como em organismos superiores. Um dos mecanismos de regulação negativa da via *Hippo* identificados é através da antagonização por fosfatases, mais especificamente pelo complexo de cinases e fosfatases que interagem com *striatin* (STRIPAK) (Goudreault et al. 2009; Ribeiro et al. 2010).

O complexo STRIPAK está evolutivamente conservado e está envolvido numa variedade de processos celulares. A depleção ou mutação de algum dos componentes deste complexo revelou ter um papel na sinalização celular, no controlo do ciclo celular, apoptose, tráfego vesicular, montagem do Golgi, polaridade celular, adesão celular, migração celular, desenvolvimento vascular e neural e algumas doenças incluindo cancro (Shi, Jiao, and Zhou 2016).

Em mamíferos, o complexo STRIPAK é fundamentalmente constituído pela fosfatase PP2A - por uma subunidade regulatória B (*striatins*) , uma subunidade catalítica C (PP2Ac) , subunidade estrutural A (PP2Aa), pela proteína adaptadora Mob1/*phocein*, pelo complexo de cinase *germinal center III* (GCKIII- MST4,STK24, e STK25- subfamília das cinases Ste20), pela proteína *cerebral cavernous malformations 3* (CCM3) e pelas proteínas que interagem com a *striatin* 1 e 2 (STRIP1/2) (figura 1.10) (Goudreault et al. 2009) .O complexo STRIPAK é conservado em *Drosophila* e os componentes centrais são Cka (a única proteína *striatin*), *microtubule star* (mts – a subunidade catalítica PP2Ac), PP2A-29B (a subunidade estrutural PP2A), dMob1/*phocein*, a proteína Ccm3, Strip (ortólogo de STRIP1/2 de mamífero) e as GCKIII (Ribeiro et al. 2010). Para além destas proteínas centrais do complexo STRIPAK ainda se podem associar outras proteínas de maneira mutuamente exclusiva para formar complexos STRIPAK distintos que contêm membros da família *cortactin-binding protein 2 family member*

(CTTNBP2 or CTTNBP2NL) /ou *sarcolemmal membrane-associated protein* (SLMAP) e *coiled-coil protein suppressor of I.B kinase-e* (IKKe), designado de SIKE/FGOP2 (em *Drosophila*)(Goudreault et al. 2009) (figura 1.10).

O complexo STRIPAK/PP2A associa-se a *Hippo*/MST em *Drosophila* e em células de mamífero e restringe a atividade da cinase por desfosforilação (Couzens et al. 2013) . O STRIPAK pode ser antagonizado por Sav1 (componente da via *Hippo*) , de forma que SAV1 liga-se diretamente à PP2A inibindo a atividade da fosfatase, assim promovendo a ativação da cinase MST1 / 2 (Bae and Luo 2018).

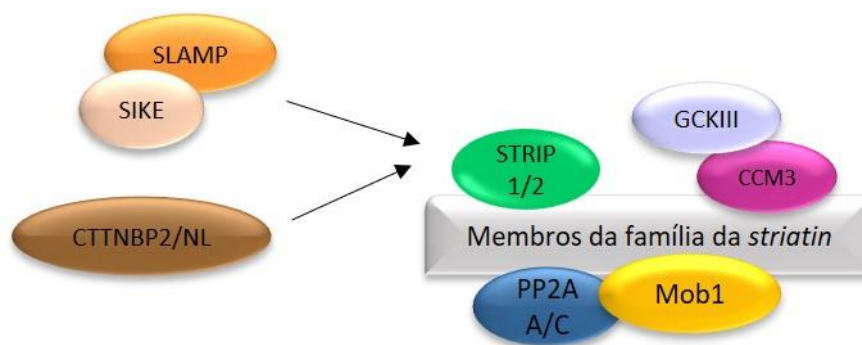


Figura 1.10-Representação esquemática do complexo STRIPAK em mamíferos com os principais componentes: membros da família *striatin* (cinzento); PP2A subunidade A e C (azul); Mob1 (amarelo); STRIP1 ou STRIP2 (verde); CCM3 (roxo); GCK III (branco). Podem ainda associar outras proteínas como SLMAP e SIKE ou CTTNBP2/NL que poderão formar complexos distintos. Adaptado de (Hwang and Pallas 2014)

Os componentes do complexo STRIPAK, como Mob1, Cka, e a fosfatase PP2A/mts estão envolvidas no mecanismo de regulação da reativação das células estaminais neurais (NSCs), funcionando como um interruptor molecular que “inativa” a via de sinalização *Hippo* e “ativa” a cascata de sinalização InR/PI3K/Akt. A fosfatase PP2A mantém a quiescência evitando a fosforilação prematura Akt e contribui para a polaridade apico-basal. A perda dos componentes Mob1 e Cka impede a reativação NSCs enquanto que a sua sobre-expressão pode acelerar a reativação. A expressão ectópica de hMob1 em *Drosophila* induziu o crescimento prematuro das NSCs e entrada em mitose(Gil-Ranedo et al. 2019). Em células S2, durante a mitose, dMob1 parece estar envolvido na focagem das fibras K(Trammell et al. 2008). dMob1 também tem um papel na alongação de neurites e organização dos microtúbulos, sugerindo que dMob1 poderá modelar a estabilidade dos microtúbulos através da regulação da atividade da PP2A(Schulte et al. 2010).

1.7 Família das proteínas Mob

Uma das proteínas centrais na via *Hippo* são as proteínas Mob4A/B. A proteína *Mps One Binder* (MOB) é a proteína fundadora da família de proteínas reguladoras de cinases que evidenciou ter um papel em mitose e que se encontra altamente conservada desde a levedura até aos humanos. A Mob foi primeiramente descoberta em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como parceira molecular da proteína Msp1 e em termos de função está envolvida na citocinese e saída de mitose (Luca and Winey 1998). As proteínas Mob têm vindo a ser implicadas em vias de sinalização importantes para a saída de mitose, progressão do ciclo celular, morfogénese, polaridade celular e apoptose (Hergovich 2011).

Apesar de ser uma família conservada de genes, o número de genes varia entre organismos. Em levedura há dois genes, Mob1p e Mob2p. Em *Drosophila melanogaster* existem quatro genes do tipo Mob, dMob1/*phocean*, dMob2, dMob3 e dMob4/*mats* (*mob as tumour suppressor*). Em humanos existe ainda uma maior complexidade, estando de momento descritos 7 genes desta família: hMob1/*Phocean*, hMob2, hMob3-hMob3A, hMob3B, hMob3C e hMob4- hMob4A e hMob4B (Florindo & Tavares, *Human Genome Data Base, direct submission*, 2003).

Um dos membros mais bem estudados desta família são as proteínas hMob4A/B que se localiza nos centrossomas em mitose e no corpo central do fuso (*midbody*). Na ausência de hMob4 (através de RNAi) verificou-se que células HeLa não são capazes de realizar o passo final da citocinese, a abscisão e para além disso observou-se que as células se tornavam mais móveis (Florindo 2004). Em *Drosophila*, a proteína dMob4 é um supressor de tumores. Os mutantes de *Drosophila* sem o gene dMob4 apresentaram um fenótipo de elevada proliferação celular, apoptose deficiente e sobre-crescimento dos tecidos, e conseqüente formação de tumores (Lai et al. 2005). Estudos feitos em *Tetrahymena* (protozoário ciliado), revelaram que a ausência de Mob4 resulta em planos anormais de divisão, paragem em citocinese e a ciliogénese é atrasada. A Mob4 é também um marcador importante da polaridade celular (Tavares et al. 2012).

As proteínas Mobs também se encontram associadas às cinases NDR (*nuclear Dbf2-related*) /LATS (*large tumor suppressor*) (Hergovich 2011). As cinases NDR/LATS são um subgrupo da família de cinases AGC e células humanas expressam quatro tipos de cinases NDR/LATS: NDR1, NDR2, LATS1 e LATS2. Em levedura de gemulação (*Saccharomyces cerevisiae*), existem dois complexos distintos de módulos Mob-NDR : Mob1p-Dbf2p e Mob2p-

Cbk1p. Além disso, as proteínas Mob são essenciais para ativar as respectivas subunidades das cinases NDR (Hergovich et al. 2006; Komarnitsky et al. 1998; Weiss et al. 2002). Em organismos multicelulares como a *Drosophila*, dMob4/mats é necessário para a função tanto da cinase *trc* e *warts*, indicando que as proteínas Mob4 não se ligam especificamente a uma única cinase NDR, como acontece em levedura (He et al. 2005). As cinases NDR e LATS também encontram-se envolvidas na via de sinalização *Hippo*. Para o funcionamento correto das cinases NDR e LATS, estas têm de ser ativadas através da sua fosforilação por membros da família de cinases Ste20 (como as MST1/2) e a família dos Mobs.

A proteína Mob2p foi descoberta em *Saccharomyces cerevisiae* e não é essencial para a viabilidade (Luca and Winey 1998). A proteína Mob2p interage fisicamente com a cinase Cbk1 (uma das cinases NDR em *S. cerevisiae*). A interação da proteína Mob2p com a cinase Cbk1 regula o crescimento polarizado e a assimetria celular, uma vez que as células mãe e filha em *S. cerevisiae* têm destinos diferentes, assim irá induzir programas genéticos específicos para as células filhas (Colman-Lerner, Chin, and Brent 2001). Nas leveduras de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, a proteína Mob2 é essencial e interage com uma cinase Orb6 (cinase NDR), regulando a polaridade da célula e a progressão do ciclo celular (Hou et al. 2003). Em *Drosophila*, a proteína dMob2 interage com a cinase *tricornered* (*trc*- cinase NDR), sendo necessária para a morfogénese normal, como no desenvolvimento das cerdas (He et al. 2005). Em células humanas, a proteína hMob2 interage apenas com as cinases NDR1 e NDR2 e não com as cinases LATS1 e LATS2 e está envolvida na duplicação dos centróssomas e na apoptose. Quando o gene hMob2 é sobre-expresso afeta funções da cinase NDR, como a apoptose e a duplicação dos centróssomas. Por outro lado, quando as células são depletadas de hMob2 a atividade cinase NDR aumenta. Em células humanas, a proteína hMob2 regula negativamente as cinases NDR1/NDR2 e compete com a proteína hMob4 para se ligar a estas cinases (Kohler et al. 2010). Além disso a proteína hMob2 é responsável pela ativação do ponto de controlo G1/S e pela resposta ao dano de DNA, uma vez que interage com a proteína RAD50 pertencente ao complexo envolvido na reparação de danos DNA. Células depletadas de hMob2 apresentam defeitos na proliferação celular e sensibilidade para danos no DNA (Gomez et al. 2015). Mais recentemente foi descrito que a perda de função de Mob2 em células humanas afeta o correto posicionamento neuronal no córtex em desenvolvimento. A perda de função de hMob2 está associada a um distúrbio como a heterotopia nodular periventricular (O'Neill et al. 2018).

Os restantes membros desta família, Mob1 e Mob3, vão ser descritos nas secções seguintes detalhadamente.

1.7.1 Mob1 humano

A proteína hMob1, também denominada *phocein*, foi descoberta num rastreio duplo-híbrido em levedura para identificar proteínas que interagem com a *striatin*. A hMob1 é uma proteína intracelular com 225 aminoácidos, evolutivamente conservada, com 100% de identidade entre humano e rato. Em *Drosophila melanogaster* codifica uma proteína com 223 aminoácidos com 80% de identidade com humano e a de *Caenorhabditis elegans* tem 67% de identidade com humano (G. Baillat et al. 2001).

A proteína hMob1 interage com a fosfatase PP2A, com a *striatin* bem como com outros membros pertencentes à família de *striatin*, SG2NA (*S/G2 nuclear autoantigen*) e *zinedin*, que formam complexos com a PP2A (G. Baillat et al. 2001) (Moreno, Lane, and Pallas 2001). A inibição da atividade da PP2A induz a fosforilação de hMob1/*phocein*, sugerindo que a fosfatase PP2A está envolvida na desfosforilação de hMob1 e que as três proteínas *phocein*, *striatin* e SG2NA são substratos desta fosfatase (Moreno, Lane, and Pallas 2001). Sabe-se que *striatin* é maioritariamente expressa em neurónios. Observou-se que a proteína hMob1 co-localiza com a *striatin* na região dendrítica. Em neurónios de ratos parece estar no soma, dendrites e ramificações, e está presente também no citosol. Em células HeLa, a proteína hMob1 co-localiza com SG2A na área do complexo de golgi (Baillat et al. 2001; Bailly and Castets 2007)). A proteína hMob1 também interage com NDPK (*nucleoside-diphosphate kinase*) e Eps15 (*Epidermal growth factor receptor substrate 15*) que está envolvida na endocitose mediada pela clatrina. Ambas as proteínas NDPK e Eps15 estão envolvidas na endocitose e são parceiros moleculares da *dynamin I*, uma GTPase que tem um papel essencial na endocitose. A *dynamin I*, co-localiza parcialmente com a hMob1 em neurónios de rato, sugerindo que a hMob1 é integrante dos complexos Eps15:NDPK:dynamin:*striatin* envolvidos no tráfego vesicular em particular da endocitose (Gilbert Baillat et al. 2002).

Em células tumorais do pâncreas, identificou-se o complexo MST4-Mob1/*phocein* que foi descrito como promotor da proliferação e migração. Este complexo formado quando há um excesso de MST4 e Mob1 que irá perturbar o complexo da via *Hippo* MST1-Mob4 pela competição da ligação tanto de MST4 com Mob4 como de MST1 com Mob1/*phocein*,

impedindo a inibição de YAP. Assim o complexo MST4-*phoecin* antagoniza funcionalmente MST1-Mob1 regulando positivamente a atividade de YAP(Chen et al. 2018).

Dados preliminares obtidos no laboratório do professor Álvaro Tavares, sugerem que a proteína hMob1 terá um papel em mitose. Observou-se que quando se diminuem os níveis de hMob1 (usando a técnica de RNAi) as células falham o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e que a γ -tubulina se encontrava dispersa nos polos do fuso (Figura 1.11). Para além disso observou-se que a proteína hMob1 localiza-se nos centrossomas durante a mitose (Figura 1.10) (Florindo e Tavares-resultados não publicados).

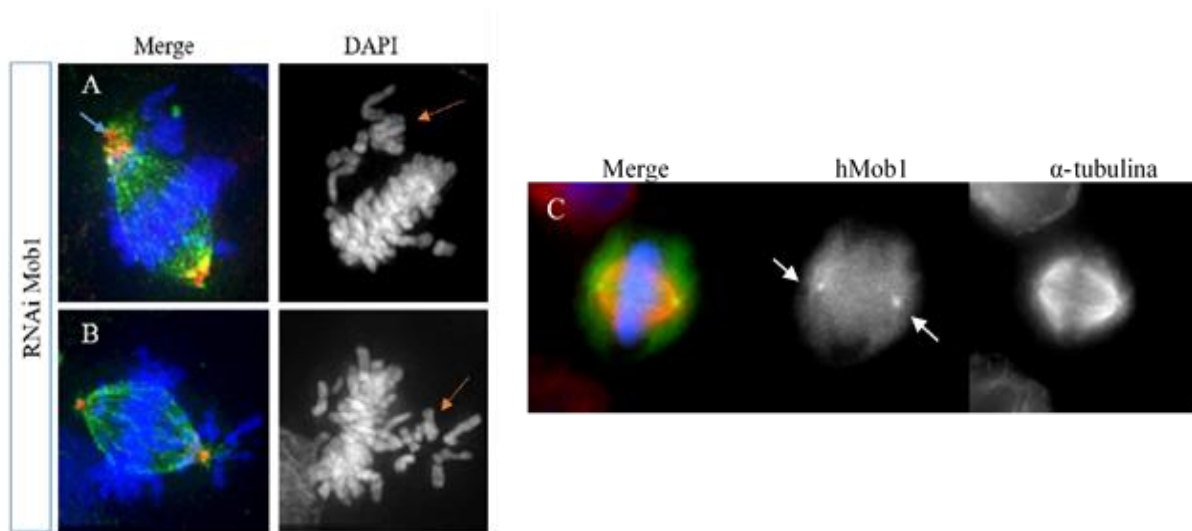


Figura 1.11- hMob1 é centrossomal em mitose e a diminuição dos níveis de hMob1 em células HeLa leva a defeitos mitóticos. Nos painéis A e B. a marcação a verde com α -tubulina-microtúbulos, a vermelho com γ -tubulina -centrossomas e a azul o DNA. No painel C a marcação vermelho com α -tubulina- microtúbulos, a verde com anti-hMob1 e a azul DNA. No painel (A) célula que sofreu RNAi de hMob1 apresenta cromossomas desalinhados (indicados com uma seta laranja) e a γ -tubulina dispersa no polo do fuso (indicada com seta azul). No painel (B) célula que sofreu RNAi de hMob1 apresenta cromossomas desalinhados (indicados com seta laranja). No painel (C) observa-se que a proteína Mob1 humana localiza-se nos centrossomas (setas a branco) durante a mitose. Cláudia Florindo e Tavares- resultados não publicados

1.7.2 Mob1 de *Drosophila melanogaster*

A proteína Mob1 de *Drosophila melanogaster* (dMob1) foi identificado num rastreio para identificar proteínas envolvidas na organização dos polos do fuso em células S2 de *Drosophila* (Trammell et al. 2008). Células depletadas de dMob1 apresentavam frequentemente dois defeitos. Um dos defeitos causa a formação inicial de um fuso monopolar devido à presença de apenas um centrossoma no início de mitose. Contudo este estado não é

permanente, os fusos acabam por assumir uma forma bipolar através da nucleação dos microtúbulos mediada pela cromatina. Segue-se a reorganização dos microtúbulos num segundo polo, criando assim um fuso bipolar monoastral. O segundo defeito frequentemente observado consiste em polos do fuso desfocados ao longo do tempo, e este defeito parece ocorrer tanto em fusos bipolares como monoastrais. O defeito da focagem dos polos é dinâmico e reversível com a re-junção das fibras K após a separação temporária, contudo noutras células as fibras K ficam permanentemente dissociadas do polo, deixando completamente os centrossomas destacados e separados dos polos do fuso mitótico. Assim em células S2 observou-se que a proteína dMob1 tem um papel em mitose, nomeadamente na focagem das fibras K mesmo na ausência de centrossomas funcionais (Trammell et al. 2008).

Levente e Tavares (2018, dados não publicados) criaram um mutante nulo de Mob1 em *Drosophila* dos quais a maioria dos indivíduos morre no estadio larvar e apenas 10% conseguem chegar a fase de pré-pupa. Assim este mutante é 100% letal na fase larvar, indicando que o gene é essencial para a viabilidade. De modo a confirmar que o fenótipo observado é devido à perda de dMob1 fizeram um revertente usando o sistema UAS-dMob1, ou seja, voltaram a inserir dMob1 revertendo o fenótipo observado.

O gene dMob1 também está envolvido no desenvolvimento de neurites e na regulação da morfologia neuronal. Assim o silenciamento em *Drosophila* resultou na disrupção da morfologia neuronal, diminuição dos agregados de neurómeros e um aumento da complexidade das ramificações das neurites. No revertente do mutante nulo de dMob1 com *driver* específico “*elav*”, que expressa apenas dMob1 no sistema nervoso, verificou-se que apenas 20% das larvas de *D. melanogaster* conseguiram chegar à fase de pupa, no entanto, não conseguindo eclodir. Deste modo o gene dMob1 terá também funções essenciais fora do sistema nervoso (Schulte et al. 2010).

Os mutantes nulos dMob1 apresentaram um fenótipo de “*tail flip*” em larvas do 3ºestadio com metade posterior da larva paralisada, tendo este fenótipo sido também descrito anteriormente em mutantes de proteínas motoras dos microtúbulos. Os mutantes dMob1 apresentam uma rede de microtúbulos desorganizadas nos nervos periféricos, sinapses e múltiplos compartimentos subcelulares, sugerindo que dMob1 tem um papel crítico na organização dos microtúbulos em múltiplos compartimentos celulares (Schulte et al. 2010). Para além disso dMob1 funciona pré-sinápticamente como regulador da formação sináptica uma vez que mutantes nulos apresentam uma extensa formação de botões sinápticos semelhante

ao fenótipo observado em mutantes de endocitose Dap160, podendo estar relacionada com a dinâmica de microtúbulos (Koh, Verstreken, & Bellen, 2004; Schulte et al., 2010).

A proteína dMob1 é também um componente do complexo multiproteico STRIPAK, que funciona como antagonista via *Hippo*. Estes complexos dMob1 e Cka (*striatin*) são ambos necessários para a associação física de mts (PP2Ac) a *Hippo* para que a via seja inibida (Ribeiro et al. 2010). As proteínas do complexo STRIPAK, nomeadamente dMob1, Cka e mts, estão envolvidas no mecanismo de regulação da reativação das células estaminais neurais (NSC)(Gil-Ranedo et al. 2019). As células estaminais neurais entram em quiescência no final da embriogénese e reativam-se pos-embrionicamente para gerar os neurónios e glia num cérebro adulto. Deste modo o restabelecimento neural depende da capacidade das NSCs de controlar o equilíbrio entre a quiescência e a proliferação. As células estaminais neurais de mutantes nulos dMob1 permanecem pequenas e não apresentam atividade mitótica. A única atividade mitótica detetada é ao nível dos quatro *mushroom bodies* (MbNSC), as NSC não são capazes de re-entrar no ciclo celular. Deste modo dMob1 promove a reativação das células estaminais neurais. Sabe-se que quiescência é mantida através da via *Hippo*, em que as cinase *Hippo* e *warts* previnem a transcrição do co-ativador *Yorkie* de entrar no núcleo e levar ao crescimento, assim o processo de reativação NSC envolve aumento do tamanho celular durante a quiescência, seguido da entrada em divisão, é necessário também um estímulo nutricional de forma a secretar péptidos como insulina que irão ativar os receptores de insulina e toda uma cascata de sinalização InR/PI3K/Akt. A inibição de dMob1 e Cka resulta num aumento da ativação da via *Hippo*. Estas proteínas cooperam para promover a reativação NSC e ambos são necessários para a associação da mts (PP2A) a *Hippo*, levando à sua inativação, o que é consistente com que a via *Hippo* permaneça ativa em NSC após a perda de dMob1. Deste modo, dMob1, mts (PP2A), Cka (*striatin*) regulam os estados de quiescência/reativação através de um mecanismo de integração de sinais de *Hippo* e InR/PI3K/Akt (Gil-Ranedo et al. 2019; Ribeiro et al. 2010; Zheng et al. 2017).

Resultados preliminares da análise de embriões mutantes de dMob1 (resultados não publicados Tavares e Samora 2007) obtidos no laboratório do professor Álvaro Tavares, sugerem que dMob1 poderá ter um papel na mitose, uma vez que se observaram em embriões sincícios pequenos defeitos em mitose, como o deslocamento dos centrossomas dos polos cujos fusos estão desfocados (figura 1.12).

Além das informações referidas sobre as funções desta proteína existem evidências experimentais da sua localização no citosol (Schulte et al. 2010). Existem também evidências experimentais que durante a mitose em células S2 a proteína dMob1 encontra-se nos centrossomas e nos cinetocoros (Trammell et al. 2008)

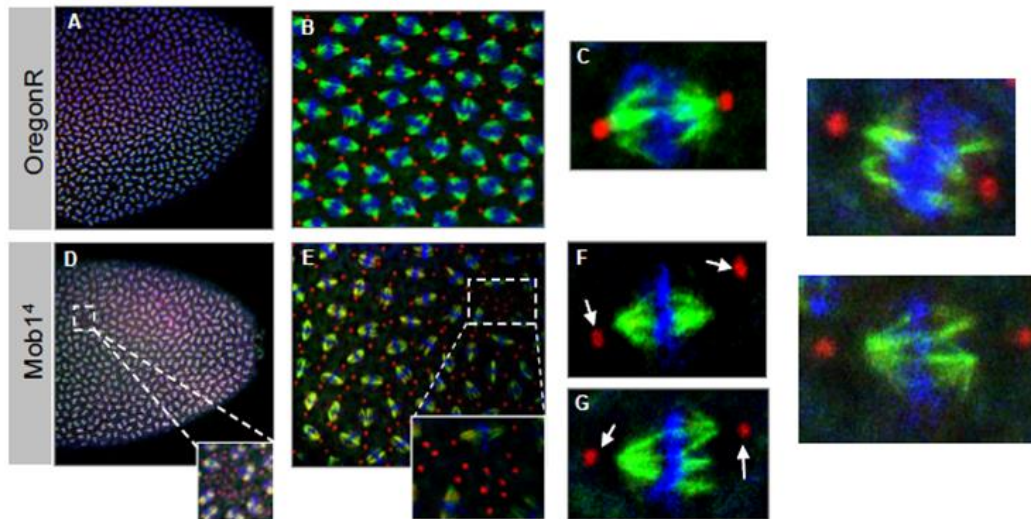


Figura 1.12- Embriões sincícios de *Drosophila melanogaster* fixados para imunofluorescência, com marcação a verde de α -tubulina- dos microtúbulos, a vermelho γ -tubulina-centrossomas e a azul DNA. Nas figuras A,B e C são embriões selvagens (Oregon R), e as figuras D,E,F e G embriões de mutantes dMob1 ($Mob1^4$), apresentam lacunas no córtex que é desprovido de núcleo mas contem muitos centrossomas. As setas a branco em F e G indicam o deslocamento dos centrossomas do polo. Resultados não publicados- Tavares e Catarina Samora 2007

1.7.3 Mob3

O gene Mob3, em mamíferos, existe em três isoformas: hMob3A, hMob3B e hMob3C, que são três genes únicos localizados em diferentes cromossomas (cromossoma 19; 9; 1, respetivamente), sendo que estas isoformas são 80% idênticas (Tang et al., 2014). Como já referido anteriormente, as proteínas Mob são altamente conservadas evolutivamente desde a levedura ate aos humanos, uma das propriedades conservadas é a sua associação e ativação com as cinases NDR.

Os alinhamentos das sequências, bem como análises filogenéticas da família da proteína Mob em humano revelaram uma relação próxima entre as proteínas hMob3 com hMob4A (50% de identidade). Nas células humanas, as proteínas hMob4A e hMob4B ligam-se e ativam todas as quatro cinases NDR (NDR1/2 ;LATS1/2) e são essenciais para o funcionamento das cinases

NDR1 e NDR2 na apoptose e na duplicação dos centrossomas (Bichsel et al. 2004; Hergovich et al. 2009; Praskova, Xia, and Avruch 2008). A sobre-expressão da proteínas hMob3 não mostrou afetar a duplicação dos centrossomas, que é uma das funções conhecidas das cinases NDR1 e NDR2 (Hergovich et al. 2009). Apesar das similaridades entre hMob3 e hMob4, observou-se que nenhuma das proteínas hMob3 interage com as cinases NDR1 e NDR2 nem se associa fisicamente com as cinases LATS1 e LATS2, contrariamente ao descrito para hMob4 (Kohler et al. 2010).

Em pacientes com glioblastoma múltiplo observou-se que as isoformas da proteína hMob3A, hMob3B, hMob3C se encontravam desreguladas, com os níveis mRNA aumentados para as isoformas hMob3A e hMob3C e os níveis de mRNA da isoforma hMob3B diminuídos. Em linhas celulares de glioblastoma múltiplo a redução dos níveis da isoforma hMob3B resulta no aumento dos níveis da proteína total, sugerindo que a inativação de hMob3 leva a um mecanismo compensatório pelas outras isoformas (Tang et al. 2014).

Está reportado que hMob4 forma complexo com MST1 e NDR1 sobre estímulo apoptótico, e dada a homologia entre hMob4 e hMob3, averiguou-se se algumas das isoformas de hMob3 poderia também interagir com a cinase MST1. A cinase MST1 (Hippo em *Drosophila*) está envolvida na via Hippo que tem um papel na regulação da proliferação e da apoptose celular, esta cinase está descrita como uma cinase pro-apoptótica que potencia a apoptose através do *cross-talk* com as caspases.

Foi observado em linhas celulares de glioblastoma, que todas as isoformas de hMob3 interagem com MST1 e para além disso esta interação é induzida em condições de apoptose e de elevada densidade celular. Observaram também que hMob3 regula o processo de clivagem de MST1 potenciando a sua atividade apoptótica. *In vivo*, através do modelo *xenograft*, observaram que a proteína hMob3 contribui para a proliferação celular, uma vez que a depleção da proteína hMob3 suprime o crescimento tumoral. Sugerindo que a proteína hMob3 poderá ter um potencial papel de onco-proteína, contudo a função da proteína Mob3 e os seus parceiros moleculares ainda não é conhecida nem em mamíferos, nem em *Drosophila* (Tang et al., 2014).

1.8 Objetivos deste projecto

O funcionamento correto da divisão celular é essencial para que o material genético seja transmitido, de forma a que uma célula progenitora dê origem a duas células filhas geneticamente idênticas, assegurando a continuidade da vida. No caso deste processo ser comprometido, poderão surgir várias complicações como por exemplo o aparecimento de cancro. No entanto, grande parte dos mecanismos de controlo e execução da divisão celular continuam por ser esclarecidos. De modo a aprofundar o nosso conhecimento destes mecanismos foi objetivo deste projeto determinar a função dos genes *Mob1* e *Mob3* de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular, através da análise do fenótipo de mutantes.

2 Materiais e Métodos

2.1 Linhas de *Drosophila melanogaster* utilizadas

No decorrer deste trabalho foram utilizadas várias linhas de *Drosophila melanogaster* existentes no laboratório. Como controlo negativo para todas as experiências realizadas utilizou-se a linha de moscas *white* (*w*) e como controlo positivo no ensaio de *westernblot* a linha Polo-GFP. Para os ensaios de imunofluorescência e *westernblot* utilizaram-se as linhas mutantes $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, $Mob1^{svc}/CyO\ tb$ e $w\ Mob3^{sac}/Mob3^{sac}$ (Tavares e Levente 2018, não publicado) e as linhas revertentes dos respetivos mutantes $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$; Ubq-GFP-*Mob1* e $Mob3^{sac}/Mob3^{sac}$; Ubq-GFP-*Mob3* (Tavares e Levente 2018, não publicado).

2.2 Condições de crescimento e alimentação

Todos os stocks de linhas *white* e mutantes de *Drosophila melanogaster* foram mantidos em tubos ou garrafas com meio de cultura padronizado e em condições de temperatura entre os 18°C e os 25°C.

Para a recolha de embriões de *Drosophila*, as moscas foram colocadas em gaiolas com placas de agar de sumo de maçã à temperatura de 25°C com luminosidade reduzida. Preparou-se placas de agar de sumo de maçã (para 500 ml) de acordo o seguinte protocolo. Adicionou-se 250 ml água destilada e 9,8 g de agar e ferveu-se no microondas. Acrescentou-se 150 ml de água e 5g de açúcar e foi novamente fervido no microondas. Colocou-se 125 ml de sumo de maçã e deixou-se arrefecer para, por fim, adicionar-se o antifúngico (5ml de 10% de *nipagin* (peso/volume) em etanol absoluto).

2.3 Ensaio de eclosão, mobilidade e fenótipo de linhas mutantes *Mob3*

De forma a avaliar a eclosão das pupas em linhas mutantes $w\ Mob3^{sac}$ e *white* cruzou-se 10 fêmeas e 10 machos $w\ Mob3^{sac}$ e 10 fêmeas e 10 machos *white* em tubos com meio de cultura padronizado a diferentes condições de temperatura (18°C, 25°C e 29°C). Estas colocaram ovos durante 2 dias. De seguida aguardou-se que as moscas se desenvolvessem e contabilizou-se as moscas que ficaram presas em fase de pupa. As moscas que nasceram foram

avaliadas quanto à presença de defeitos como necroses ou desenvolvimento de tumores. A mobilidade das moscas foi também avaliada para verificar se teria sido afetada.

Para os ensaios de mobilidade, foram colocados dois tubos com o mesmo número de moscas selvagens e *w* Mob3^{sac}. Noutros tubos foram colocadas moscas *w* Mob3^{sac} com defeitos. Os tubos com moscas foram “batidos” verticalmente para que as moscas caiam para a base do tubo de forma a observar a sua mobilidade até ao topo. Apenas se fez uma análise qualitativa da mobilidade das moscas.

2.4 Medição dos cérebros das larvas de 3ºestadio larvar de *Drosophila melanogaster*

Dissecou-se os cérebros de larvas do terceiro estadio larvar em 0,7% NaCl das linhas *white*, mutantes Mob1^{svc}/ Mob1^{svc} e *w* Mob3^{sac}, tal como os respetivos revertentes Mob1^{svc};GFP-Mob1 e Mob3^{sac};GFP-Mob3. Estes cérebros foram observados na SteREO Lumar v12 com uma ampliação de 125x. A aquisição de fotografias foi feita através da câmara AxioCam MRc. Fez-se as medições das áreas dos lóbulos óticos dos cérebros utilizando o software Image J/Fiji versão 1.52p.

2.5 Identificação e caracterização dos fenótipos mitóticos

2.5.1 Optimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros larvares

Esta técnica constitui uma abordagem para a análise do fenótipo mitótico em *Drosophila melanogaster*, que possibilita a observação dos componentes celulares, como DNA, microtúbulos, centrossomas ou determinadas proteínas. A técnica de imunofluorescência indireta baseia-se fixação dos componentes celulares do qual se vão estabelecer pontes químicas entre os diversos componentes, seguindo-se a permeabilização da amostra para que o anticorpo seja capaz de atravessar as células do tecido. Para tal foram utilizados detergentes fracos, sendo necessário o bloqueio para que não existam ligações inespecíficas dos anticorpos. Após este processo o tecido foi incubado com anticorpos primários que irão reconhecer o epítipo de interesse, prosseguiram-se lavagens e incubou-se com o anticorpo secundário que contém o fluoróforo. Este irá reconhecer o anticorpo primário retirou-se o excesso através de lavagens e prosseguiu-se com a montagem da amostra. Para a realização da técnica foi necessário definir as condições ótimas para cada um dos passos anteriormente descritos. Como tal foram testadas

várias condições desde o processo de fixação, permeabilização e bloqueio. (tabela 2.1 e tabela 2.2)

Tabela 2.1- Condições testadas no processo de fixação para otimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros de 3ºestadio larvar de *Drosophila melanogaster*.

Optimização do passo de Fixação
3,7% formaldeído (Sigma F8775) em PBS durante 30 minutos
4% formaldeído sem metanol (Thermo Scientific 28908) em PBS durante 20 minutos
4% formaldeído sem metanol em PBS durante 30 min
Adição de lavagem após a fixação (3x 10 min em PBS)
4% formaldeído sem metanol em PEM durante 30 min
Pré-lavagem em 30% Glicerol em PEM
Pré-lavagem com PEM, seguida da fixação a 4% formaldeído sem metanol em PEM
Taxol (Alfa Aesaer J62734) 1µM em 0,7% NaCl durante 30 segundos antes da fixação
Taxol 1µM em 0,7% NaCl durante 5 minutos antes da fixação
Taxol 1µM em 4% formaldeído em PEM durante 30 minutos
8% formaldeído sem metanol em 0,7% NaCl durante 20 minutos
8% formaldeído sem metanol em 0,7% NaCl durante 30 minutos
4% formaldeído sem metanol em 0,7% NaCl durante 20 minutos
4% formaldeído sem metanol em 0,7% NaCl durante 30 minutos
4% formaldeído sem metanol em 0,4% Triton-X-100 durante 20 minutos
4% formaldeído sem metanol em 0,4% Triton-X-100 durante 30 minutos

Tabela 2.2- Condições testadas no processo de permeabilização e bloqueio para otimização da técnica de imunofluorescência indireta de cérebros de 3ºestadio larvar de *Drosophila melanogaster*

Optimização do passo de Permeabilização e bloqueio
10% SFB (Gibco 10500-04) em 0,3% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante 30 minutos
10% SFB em 0,4% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante 30 minutos
Separação do passo do bloqueio e permeabilização: - permeabilizar 0,4% <i>Triton-x-100</i> em PBS durante 10 minutos; - bloqueio 10% FCS em PBS durante 30 minutos
Separação do passo do permeabilização e bloqueio: permeabiliza - 0,5% <i>Triton-x-100</i> em PBS durante 10 minutos; bloqueio - 10% SFB em 0,5% <i>Triton-x-100</i> em PBS durante 30 minutos
10% SFB em 0,5% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante a noite
10% SFB em 1% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante 30 minutos
10% SFB em 1% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante 1 hora
10% SFB em 1% <i>Triton-X-100</i> em PBS durante 2 hora

As condições ótimas definidas para a realização desta técnica estão descritas na secção 2.5.3

2.5.2 Anticorpos primários e secundários utilizados

Nos ensaios de imunofluorescência e *Westernblot* realizados utilizaram-se anticorpos primários e secundários. As informações relativas a todos os anticorpos utilizados apresentam-se nas tabelas 2.3 e 2.4.

Tabela 2.3- Anticorpos primários utilizados

Anticorpo primário	Gerado em	Aplicação	Companhia
Fosfohistona H3 (PH3)	coelho	Imunofluorescência 1:500	Millipore #06-570
γ - tubulina (GTU-88)	ratinho	Imunofluorescência 1:500	Sigma # T-6557
α - tubulina (YL1/2)	rato	Imunofluorescência cérebros 1:100, embriões 1:200	Serotec # MCAP77
Anti-GFP (clone 3E1)	ratinho	<i>Westernblot</i> 1:500 Imunofluorescência 1:500	CR-UK
ACR3 – Dmob3 (CG4946)	coelho	<i>Westernblot</i> 1:1000	SK833*//99 Gerado no laboratório
ACR4 – DMob1 (CG3403)	coelho	<i>Westernblot</i> 1:250	SK832 Gerado no laboratório
ACR10A– DMob1 (CG3403)	coelho	<i>Westernblot</i> 1:250	02060 Gerado no laboratório
ACR10B– DMob1 (CG3403)	coelho	<i>Westernblot</i> 1:250	05110 Gerado no laboratório

Tabela 2.4- Anticorpos secundários utilizados

Anticorpo secundário	Gerado em	Anti IgG de	Aplicação	Companhia
Alexa fluor 488	cabra	rato	Imunofluorescência 1:1000	Molecular Probes
Alexa fluor 594	cabra	coelho	Imunofluorescência 1:1000	Molecular Probes IgG #A11037
Alexa fluor 594	cabra	ratinho	Imunofluorescência 1:1000	Molecular Probes # A-11005
Cy5	-	coelho	Imunofluorescência 1:500	-
HRP-conjugado com peroxidase	cabra	ratinho	<i>Westernblot</i> 1:4000	Jackson Immuno Research Laboratories
HRP-conjugado com peroxidase	cabra	coelho	<i>Westernblot</i> 1:4000	Jackson Immuno Research Laboratories

2.5.3 Imunomarcção de cérebros larvares de *Drosophila melanogaster*

Cérebros de larvas em terceiro estadio larvar foram dissecados em NaCl 0,7%. De seguida, procedeu-se à fixação a 4% formaldeído livre de metanol (Thermo Scientific 28908) em PBS com 0,5 mM EGTA e 5 mM MgCl₂, durante cerca de 20 minutos. De seguida fez-se duas lavagens de 10 minutos cada em PBS para remover resíduos de formaldeído. Fez-se o bloqueio e permeabilização numa solução de 10% soro fetal bovino (SFB; Gibco 10500-04) e 1,5% *Triton-x-100* em PBS, durante cerca de 1 hora. Incubou-se com os anticorpos primários em 10% SFB e 1,5% *Triton-X-100* em PBS, a 4°C durante a noite em atmosfera húmida. Lavou-se três vezes com 1,5% *Triton-X-100* em PBS durante 45 minutos. Realizou-se a incubação com o anticorpo secundário, em 10% SFB e 1,5% *Triton-x-100* em PBS, durante cerca de 4 horas à temperatura ambiente em atmosfera húmida. É de notar que deve ser evitada a exposição à luz uma vez que o anticorpo secundário contém o fluoróforo. Lavou-se novamente três vezes com 1,5% *Triton-x-100* em PBS durante 45 minutos. Por fim montou-se em meio de montagem *slow fade gold antifade* (Invitrogen S36937) entre a lâmina e a lamela, e selou-se com verniz transparente.

Quando necessário para evitar reação cruzada de reconhecimento de anticorpos, realizou-se o protocolo com incubações sequenciais, ou seja fez-se o protocolo descrito anteriormente, incubando-se primeiro o anticorpo primário anti-ratinho e em seguida com o respectivo anticorpo secundário, depois fez-se novamente o passo do bloqueio e incubou-se com anticorpo primário anti-rato e o respectivo anticorpo secundário. Deste modo evita-se que possa existir reações cruzadas entre reconhecimento dos anticorpos do mesmo género.

Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 2.3 e 2.4.

Estas preparações foram observadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager Z2 com filtro apropriado aos anticorpos e corante de DNA (DAPI) utilizados, com uma objetiva com ampliação 10x, 20x, 40x, 63x imersão em óleo e 100x imersão em óleo. Para aquisição de imagens utilizou-se a câmara AxioCam HR Rev.3 e para a análise das imagens utilizou-se o *Image J/Fiji* versão 1.52p.

Estas técnicas foram aplicadas em paralelo para os cérebros de larvas mutantes e *white*.

2.5.4 Preparação de embriões de *Drosophila* para marcação com anticorpos

Remoção do cório

Para a remoção do cório dos embriões, colheram-se embriões com um pincel. Estes foram colocados num tubo de microcentrifuga juntamente com 400 µl de solução de lavagem (0,7% NaCl e 0,05% *Triton X-100*). Lavou-se os embriões duas vezes em solução de lavagem e removeu-se a solução de lavagem. Adicionou-se lixívia a 50% durante 2 a 3 minutos, uma vez que a lixívia vai dissolver o cório presente, resultando na sedimentação dos embriões em suspensão. Removeu-se o líquido cuidadosamente sem arrastar os embriões e lavou-se 2 a 3 vezes em 1 ml de solução de lavagem.

Fixação

A fixação realizou-se em 300 µl de solução de fixação (3,7% formaldeído em PBS) e 1ml heptano e agitou-se vigorosamente durante 30 segundos. Deixou-se em agitação moderada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Devido à diferença de densidades entre o formaldeído e o heptano causando duas camadas distintas, os embriões fixos deverão ficar na

interface entre a camada inferior de formaldeído e a superior de heptano. Por fim removeu-se por completo a camada inferior de formaldeído.

Remoção da membrana vitelina

Removeu-se a membrana vitelina dos embriões em 1ml de metanol, agitou-se vigorosamente durante 1 minuto e deixou-se repousar durante 1 minuto. Desta forma os embriões desvitelinizados sedimentam. Removeu-se a camada superior de heptano juntamente com os embriões que não sedimentaram. Adicionou-se metanol aos restantes embriões até completar dois terços do volume do tubo de microcentrifuga. Os embriões foram armazenados a 4°C. Os embriões podem ser conservados indefinidamente a uma temperatura de -20°C.

2.5.5 Imunomarcção de embriões

Os embriões foram rehidratadas em metanol, sendo lavados três vezes em 0,1% *Triton-X-100* em PBS durante 15 minutos. De seguida, os embriões foram bloqueados em 500µl de 1 % SFB e 0,1% *Triton-X-100* em PBS durante 1 hora em agitação moderada. Incubou-se com anticorpo primário em 1% SFB e 0,1% *Triton-X-100* em PBS, a 4°C em agitação moderada durante a noite. Lavou-se três vezes com 0,1% *Triton-X-100* em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação moderada. Realizou-se a incubação com o anticorpo secundário em 1% SFB e 0,1% *Triton-X-100* em PBS, durante cerca de 2 horas à temperatura ambiente com agitação moderada. Lavou-se novamente três vezes em 0,1% *Triton-X-100* em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação moderada. A coloração do DNA foi realizada com DAPI a 0,25µg/ml em PBS, durante 20 minutos à temperatura ambiente com agitação moderada. Seguiram-se duas lavagens com 0,1% *Triton-X-100* em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação moderada. Por fim montou-se em *slow fade gold antifade* entre a lâmina e a lamela, e selou-se com verniz transparente.

Os anticorpos utilizados encontram-se descritos na tabela 2.3 e 2.4.

Estas preparações foram observadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager Z2 com filtro apropriado aos anticorpos e corante de DNA utilizado. Foram utilizadas as objetivas com ampliação 10x, 20x, 40x, 63x imersão em óleo e 100x imersão em óleo. Para aquisição de imagens utilizou-se a câmara AxioCam HR Rev.3 e para a análise das imagens utilizou-se o *Image J/Fiji* versão 1.52p.

2.6 Técnicas de biologia molecular

2.6.1 Preparação de amostras *Drosophila melanogaster* para géis de proteína

Os cérebros no terceiro estadio larvar foram dissecados em 0,7% NaCl. A partir desde passo o protocolo realizou-se em gelo para evitar degradação das proteínas pela ação de protéases. Após a dissecação, os cérebros foram colocados em *loading buffer* 4x concentrado (40% glicerol, 400mM beta-mercaptoetanol, 10% SDS, 0,4% azul bromofenol, 200mM Tris-HCl pH 6,8) de forma a quebrar a barreira lipídica. Por cada 10 cérebros colocou-se 10 µl de *loading buffer* 4x. De seguida foram feitos 3 ciclos de congelação e descongelação a -80°C durante 2 minutos. Diluiu-se o extrato de proteína de 1:2 em TBS. O extrato foi centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 13 000 rpm. O sobrenadante foi retirado, descartando-se o *pellet*. Neste passo, o sobrenadante recolhido pode ser armazenado a -20°C ou utilizado para prosseguir com a preparação dos extratos para o gel de proteínas. De seguida realizaram-se novamente 3 ciclos de congelação e descongelação a -80°C durante 2 minutos. Em seguida as amostras foram fervidas a 100°C no banho seco durante 10 minutos (deve-se previamente furar as tampas dos tubos de microcentrifuga para retirar a pressão).

2.6.2 Géis SDS-PAGE

Para a separação das proteínas da amostra de acordo com o seu tamanho utilizou-se a eletroforese em gel poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). As amostras foram tratadas previamente com um agente redutor forte (*loading buffer* 4x contendo beta-mercaptoetanol), que permitiu remover a estrutura secundária e terciária das proteínas. As proteínas são separadas em gel de poliacrilamida contendo o agente desnaturante SDS em que as proteínas ficam cobertas de cargas negativas do SDS e migram para a carga positiva do elétrodo em resposta à corrente elétrica. As proteínas de baixo peso molecular migram mais rapidamente no gel do que as proteínas de alto peso molecular. O gel de acrilamida é dividido em duas partes: gel de concentração e gel de separação. Inicialmente, preparou-se o gel de separação, com uma percentagem de acrilamida a 15% (5 ml: 1,1 ml H₂O, 2,5 ml acrilamida 30%, 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml persulfato de amónio 10% e 0,002 ml TEMED) e deixou-se polimerizar pelo menos durante 40 minutos. De seguida preparou-se o gel de concentração com uma percentagem de acrilamida a 5% (3 ml: 2,1 ml H₂O, 0,5 ml acrilamida

30%, 0,38 ml 1M Tris-HCl pH 6,8 , 0,03 ml SDS 10% , 0,03 ml persulfato de amónio 10% e 0,003 ml TEMED) e deixou-se polimerizar durante pelo menos 30 minutos. Por cada poço colocou-se 10ul de amostra pretendida e como marcador de peso molecular utilizou-se o *PageRuler-Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas). Os géis correram-se no sistema mini-PROTEAN III (BioRad), em tampão de corrida 1x (25mM Tris, 0,19mM glicina, 0.1% SDS). Aplicou-se inicialmente a corrente elétrica de 12mA enquanto as amostras se encontravam no gel de concentração, sendo que após atingirem o gel de separação aumentou-se a corrente elétrica para 25mA.

Os géis de proteínas foram corados com *coomassie* (0,25% azul de *coomassie* , 45% etanol e 10% ácido acético glacial) durante 1 hora, seguido de descoloração num solução de 40% etanol, 10% ácido acético glacial para visualização dos extratos proteicos no gel ou transferidos por eletroforese para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), para a realização de *westernblot*.

2.6.3 Western-blot

A membrana de PVDF hidrofóbica foi submersa em metanol durante 1 minuto de modo a tornar-se hidrofílica, de seguida colocou-se em água destilada durante 5 minutos e, por fim foi equilibrada em tampão de transferência 1x (5mM Tris e 192mM Glicina) durante 5 minutos. Em simultâneo, incubou-se o gel em tampão de transferência. O gel e a membrana foram colocados numa cassette pela seguinte ordem: esponja, três folhas de papel *Whatman* 3 MM, gel, membrana, três folhas de papel *Whatman* 3 MM e por fim a esponja (figura 2.1). As proteínas foram transferidas durante a noite a 60mA em tampão de transferência em gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada numa solução de 10% de leite magro em pó em TBS-0,1% *Tween20* durante 1 hora. Posteriormente, procedeu-se a uma lavagem com 1% de leite magro em pó em TBS-0,1% *Tween20* e incubou-se o anticorpo primário na mesma solução durante 1 hora, à temperatura ambiente. De seguida, procederam-se a 3 lavagens, de 5 minutos cada, com 1% de leite magro em pó em TBS-0,1% *Tween20* e incubou-se o anticorpo secundário na mesma solução durante 1 hora, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente 3 vezes, durante 5 minutos cada em TBS-0,1% *Tween20*, seguindo-se de duas lavagens de 5 minutos cada em TBS. O sinal foi detetado pelo método quimiluminescente utilizando uma mistura de solução de ECL com peróxido de hidrogénio.

Utilizou-se filmes *Hyperfilm ECL* (GE *healthcare Amersham*) para a exposição. Por fim foi realizada a revelação numa sala escura.

Os anticorpos utilizados encontram-se descritos na tabela 2.3 e 2.4.

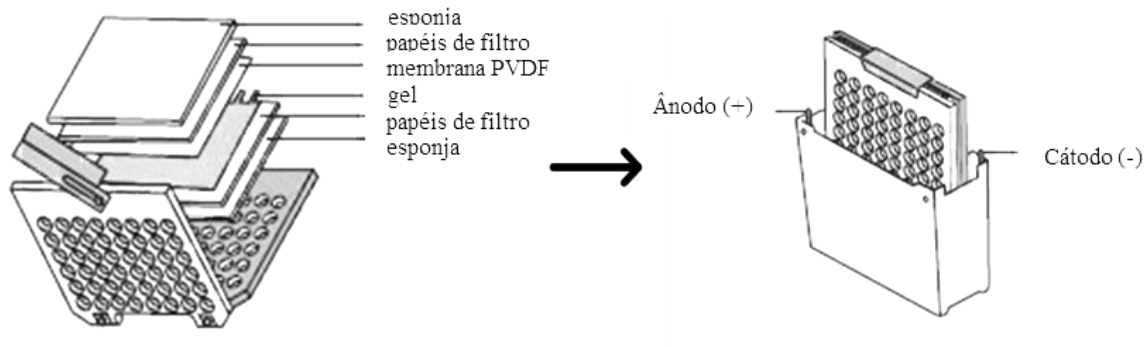


Figura 2.1-Representação esquemática da montagem da cassetete de transferência pela seguinte ordem: esponja, três folhas de papel *Whatman 3 MM*, gel, membrana, três folhas de papel *Whatman 3 MM* e a esponja. Por fim coloca-se a cassetete no tanque em que membrana é orientada mais próxima do eletrodo positivo enquanto o gel está situado na direção do eletrodo negativo, desta forma as proteínas carregadas negativamente migrarão para fora do gel e para a membrana

3 Resultados

O objetivo deste trabalho era determinar a função dos genes Mob1 e Mob3 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular. Uma das formas de analisar a função de um gene é através da deleção do gene ou sobre-expressão e analisar os efeitos causados. Para fazer a análise dos possíveis defeitos mitóticos foram criados os mutantes nulos de dMob1 e dMob3 (Tavares e Levente 2018 não publicado).

3.1 Mutantes Mob 1 e Mob3 utilizados neste trabalho

O genoma da *Drosophila melanogaster* contém apenas quatro pares de cromossomas, um par X/Y cromossomas sexuais 1 e três pares cromossomas autossômicos 2, 3 e 4.

O gene Mob1 localiza-se no cromossoma 2 do braço direito e o gene Mob3 localiza-se no cromossoma 2 do braço esquerdo. Os mutantes nulos de dMob1 e de dMob3, também denominados respectivamente Mob1^{svc}/Mob1^{svc} e *w* Mob3^{sac}, foram criados por Tavares e Levente pela técnica de edição genética de CRISPR, do qual foi feita a excisão completa das regiões codificantes para estes genes (figura 3.1).

O sistema CRISPR/Cas9 (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), utiliza um RNA guia (gRNA) que guia a endonuclease Cas9 para a sequência alvo de interesse. A endonuclease Cas induz quebras duplas na cadeia de DNA (DSB – do inglês *Double Strand Break*) no local da sequência de interesse, que vai levar à ativação dos mecanismos de reparação do DNA da célula, como a reparação homologa (HDR- do inglês *Homology-Directed Repair*). Para desencadear o sistema HDR é necessária uma cadeia molde de DNA exógena flanqueada por braços de homologia no local genómico alvo. Assim são usados frequentemente plasmídeos de DNA ou transgenes que têm braços homólogos, que após a quebra cadeia dupla de DNA são inseridos no genoma por reparação homologa depois do promotor. Este sistema CRISPR/Cas fornece uma alta especificidade no direcionamento da nucleasa para a sequência de interesse e uma redução dos efeitos *off-target* (Gratz et al. 2016; Xu et al. 2015).

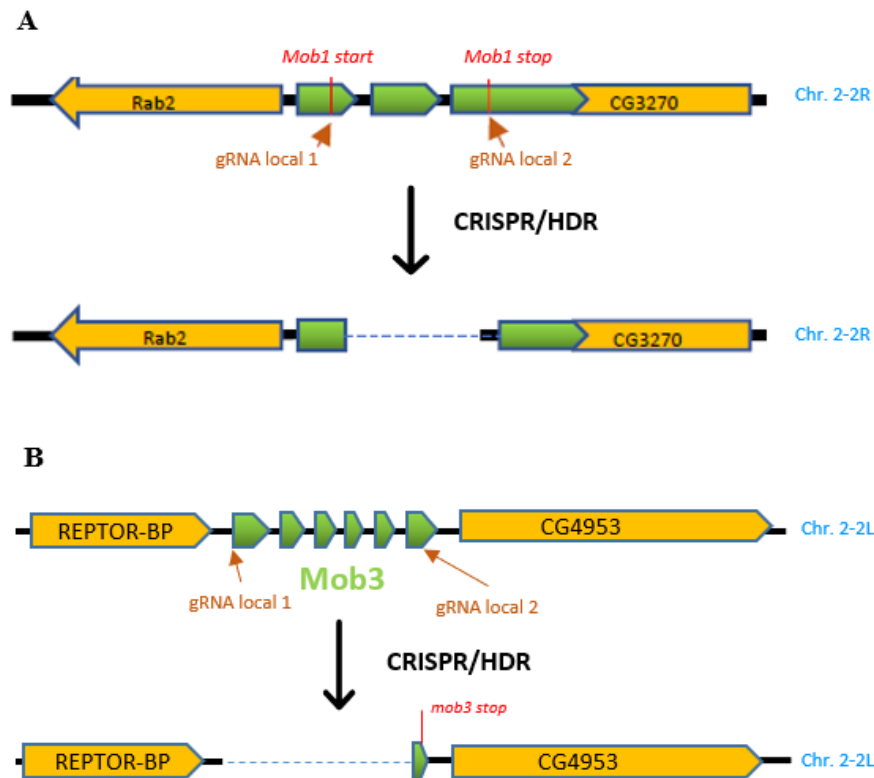


Figura 3.1- Representação da deleção do gene Mob1 e Mob3 da região genómica do cromossoma 2. (A) mutante nulo Mob1, $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$; (B) mutante nulo Mob3, $Mob3^{sac}$; os mutantes nulos foram construídos usando a técnica de edição do genoma CRISPR. A linha a tracejado indica a região deletada.

O mutante $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, como referido anteriormente, é 100% letal na fase larvar. De modo a que fosse possível manter o stock de moscas estável o mutante teve que ser balanceado. Os cromossomas balanceadores contêm múltiplas inversões evitando que ocorram recombinações entre o cromossoma balanceador e o cromossoma mutado, mantendo a mutação no cromossoma original. Para além disso os cromossomas balanceadores também contêm marcadores que permitem visualizar características físicas nas moscas. No caso do mutante $dMob1$ foram utilizados os balanceadores *Curly derivative of Oste* (*CyO*) que dá origem a um fenótipo de asas curvas e o balanceador *Tubby* (*Tb*) originando um fenótipo no estadio larvar em que estas são pequenas e gordas. Assim as moscas heterozigóticas do mutante $Mob1^{svc}/CyO$ *Tb* na fase larvar e pupa vão apresentar-se característica da marca *Tb* e na fase adulta vão apresentar asas curvas característica da marca *CyO*. Outra das características dos cromossomas balanceadores é que são letais quando homozigóticos, ou seja, moscas com os dois alelos balanceadores não vão sobreviver.

O mutante *w Mob3^{sac}* não necessitou de ser balanceado, uma vez que o stock do mutante é viável e fértil.

Para além dos mutantes nulos, Tavares e Levente criaram também moscas revertentes, ou seja, os genes dMob1 e dMob3 foram inseridos novamente nos respetivos mutantes nulos. A inserção dos genes foi realizada sob a forma de fusão com GFP sobre o controlo do promotor da ubiquitina. Em ambos os casos ocorrem a reversão do fenótipo indicando que: 1- as mutações nos genes Mob1 e Mob3 são responsáveis pelo fenótipo, 2- as proteínas dMob1-GFP e dMob3-GFP são funcionais.

3.2 Expressão de dMob1 e dMob3 em moscas revertentes

As moscas revertentes *Mob1^{svc};GFP-Mob1* e *Mob3^{sac};GFP-Mob3*, são as moscas dos quais os genes dMob1 e dMob3 foram inseridos novamente nos respetivos mutantes nulos. A inserção dos genes foi realizada sob a forma de fusão com GFP, esperando que a expressão destas proteínas seja reposta, uma vez que se encontram sobre o controlo do promotor da ubiquitina, portanto é de esperar que todas as células expressem os respetivos genes Mob. As proteínas Mob1 e Mob3 tem um peso esperado de 26 kDa e a proteína GFP um peso esperado de 27kDa. O peso previsto da proteína de fusão Mob:GFP seria de 52 kDa.

De forma a confirmar se de facto as moscas revertentes tanto as *Mob1^{svc};GFP-Mob1* e *Mob3^{sac};GFP-Mob3* expressam novamente as respetivas proteínas Mob1 e Mob3, analisei os extratos de larvas do 3º estadio (20 cérebros para cada uma das condições testadas) através da técnica de *westernblot* do qual utilizei o anticorpo anti-GFP que reconhece a proteína GFP (3E1;CR-UK) (figura 3.2). Como controlo negativo utilizaram-se cérebros do 3ºestadio larvar de moscas *white* e o respetivo mutante nulo *Mob1^{svc}/ Mob1^{svc}* e *Mob3^{sac}* e como controlo positivo utilizei cérebros do 3ºestadio larvar de moscas Polo-GFP do qual se sabe que expressam a proteína GFP.

O anticorpo anti-GFP reconhece no controlo positivo (figura 3.2 A/B-coluna 4), a GFP da proteína de fusão Polo-GFP com uma banda com um peso aproximado de 100kDa. O peso molecular previsto desta proteína de fusão é de 96kDa, sendo que a proteína polo tem um peso de 69kDa e a proteína GFP de 27kDa. Confirmando assim que o anticorpo anti-GFP consegue reconhecer a proteína GFP. O controlo negativo (figura 3.2 A/B-coluna 1 e coluna 3) como seria

de esperar não detetou nenhuma banda, confirmando assim que o anticorpo reconhece de forma específica a proteína GFP.

Nos extratos de cérebros do 3ºestadio lavar de $Mob1^{svc};GFP-Mob1$ (figura 3.2-A-coluna 2) e nos extratos de cérebros do 3ºestadio lavar de $Mob3^{sac};GFP-Mob3$ (figura 3.2-B-coluna 2) foi reconhecida uma banda com o peso molecular aparente de 55kDa. O peso previsto da proteína de fusão Mob:GFP seria de 52kDa, as proteínas detetadas têm um peso aparente de 55kDa deste modo poderá sugerir que a expressão das proteínas Mob1 e Mob3 foi repostada, uma vez que o seu peso aparente está próximo do peso previsto.

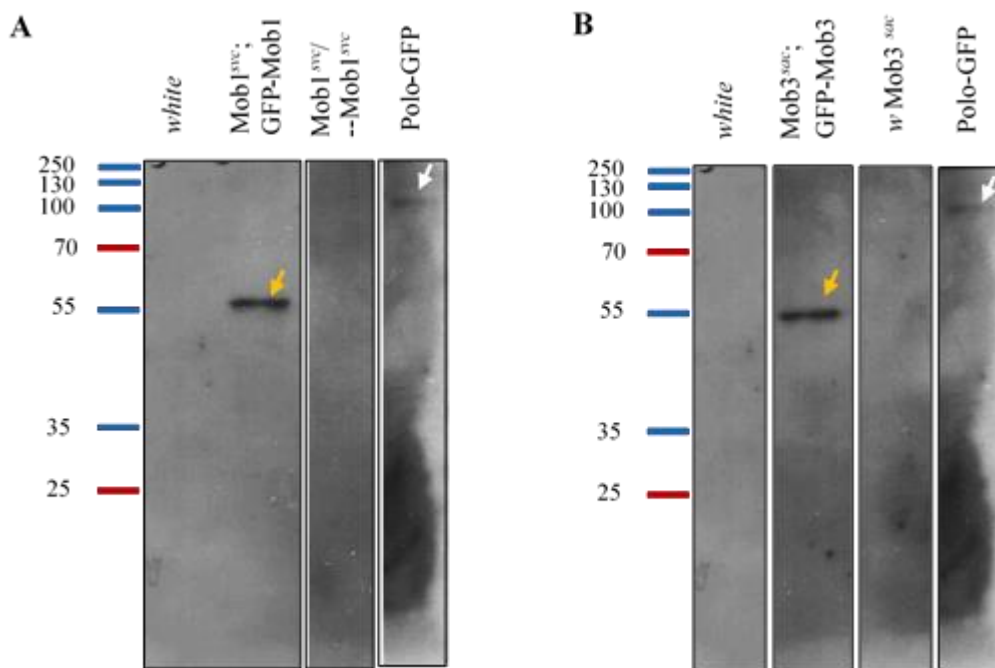


Figura 3.2- Expressão de dMob1 e dMob3 em extratos de cérebros larvares. (A) Na coluna 1 e 3 apresentam-se os controlos negativos, respetivamente extratos cérebro de larvas no 3ºestadio larvar de moscas *white* e mutantes nulos $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, do qual não detetaram a proteína GFP. Na coluna 2, extratos de cérebro de larvas de 3ºestadio do revertente $Mob1^{svc};GFP-Mob1$, foi possível detetar a proteína GFP com um peso molecular de 55kDa (seta a amarelo), sugerindo que o revertente está a produzir a Mob1 acoplado à GFP. Na coluna 4 o controlo positivo, extratos de cérebro de larvas de 3ºestadio Polo-GFP, foi possível detetar a GFP com peso molecular aproximado de 100 kDa (seta a branco). (B) Na coluna 1 e 3 apresentam-se os controlos negativos, respetivamente extratos cérebro de larvas no 3ºestadio larvar de moscas *white* e mutantes nulos $w Mob3^{sac}$, do qual não detetaram a proteína GFP. Na coluna 2, extratos de cérebro de larvas de 3ºestadio do revertente $Mob3^{sac};GFP-Mob3$, foi possível detetar a proteína GFP com um peso molecular de 55kDa (seta a amarelo), sugerindo que o revertente está a produzir a Mob3 acoplado à GFP. Utilizaram-se 20 cérebros larvares 3ºestadio para cada uma das condições testadas. Utilizou-se o anticorpo anti-GFP 3E1 (CR-UK)

3.3 Validação de Anticorpos para Western blot

Com o objetivo de avaliar os níveis da proteína Mob1 ao longo das fases de desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* foi necessário fazer a validação dos anticorpos para *westernblot*. No laboratório foram criados os soros policlonais em coelho, ACR10B, ACR10A e ACR4 contra a proteína dMob1, para os quais é feita a validação nas secções seguintes.

Os soros policlonais são produzidos através da injeção de imunogénicos num animal, como por exemplo o coelho. Depois do animal ser injetado com um antigénio específico para obter uma resposta imune primária, o animal recebe uma imunização secundária, para produzir mais anticorpos contra o antigénio específico. Após a imunização, é colhido o soro, sangue do qual foram removidas as proteínas de coagulação e os glóbulos vermelhos. Este soro pode posteriormente ser purificada para ficar isento de outras proteínas do soro.

3.3.1 Validação do soro ACR10B

O soro policlonal de coelho ACR10B foi criado contra o péptido CSKENLLIVPINVALGENA (região C terminal, aas 202 a 216 da proteína dMob1). Para avaliar se o soro reconhecerá a proteína dMob1, analisei pela técnica de *westernblot* os extratos de cérebros de larvas do 3ºestadio: 20 cérebros *white*, 20 cérebros mutantes nulo Mob1^{svc}/ Mob1^{svc} e 20 cérebros revertentes Mob1^{svc};GFP-Mob1 (figura 3.3 A/B). A proteína Mob1 tem um peso esperado de 26 kDa enquanto que a proteína de fusão Mob1:GFP tem o peso previsto de 52kDa, os 26kDa da proteína Mob1 e 27kDa da proteína GFP.

Como controlo negativo utilizei o mutante nulo de Mob1 (Mob1^{svc}/ Mob1^{svc} – figura 3.3 A-coluna 3). Como controlo positivo utilizaram-se extratos de cérebros do 3ºestadio larvar de moscas revertentes Mob1^{svc}; GFP-Mob1 (figura 3.3A-coluna 2) do qual se confirmou anteriormente a expressão da proteína de fusão Mob1:GFP pela deteção da proteína GFP (figura 3.3 B).

O soro policlonal ACR10B reconheceu várias proteínas tanto nos extratos de cérebros *white*, mutante nulo e revertente de Mob1, parecendo assim que as bandas com peso molecular superior a 70kDa detetadas são inespecíficas uma vez que se deteta o mesmo padrão todos os extratos (figura 3.3 A-coluna 1/2/3). O controlo negativo (figura 3.3A- coluna 3), o mutante

nulo $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, como seria de esperar não se detetou nenhuma banda com peso de 26kDa, podendo sugerir que a proteína não é expressa ou que não será expressa o suficiente para ser detetada. Contudo nos extratos de cérebros larvares $Mob1^{svc};GFP-Mob1$ (revertentes, figura 3.3 A - coluna 2) detetou-se uma banda mais definida com um peso aproximado a 55 kDa. Comparando a banda observada neste extrato $Mob1^{svc};GFP-Mob1$ (figura 3.3 A- coluna 2) com a banda detetada com o anticorpo anti-GFP 3E1(CR-UK) nos extratos revertentes $Mob1^{svc};GFP-Mob1$, ambas as bandas parecem ter o mesmo peso molecular de 55kDa podendo sugerir o soro policlonal ACR10B reconhece a proteína Mob1 acoplado à proteína GFP (Figura 3.3- B).

Nos extratos de cérebros larvares do 3ºestadio de *white* bem como nos extratos de cérebros revertentes seria de esperar a deteção da proteína Mob1 endógena com cerca de 26kDa. Contudo não se detetou nenhuma banda correspondente à proteína endógena com cerca de 26 kDa nem nos extratos de *white* nem do revertente de Mob1. Uma das possíveis causas, poderá ser devido ao facto de que a proteína endógena poderá não ser expressa a um nível suficiente para conseguir ser detetada, ou seja, poderá estar abaixo do limite de deteção. Uma vez que as moscas revertentes expressam a proteína Mob1-GFP exógena sobre o controlo do promotor da ubiquitina, nestas a dMob1 será sobre-expressa em todos os tecidos, daí resultando uma maior capacidade de deteção da proteína exógena do que a endógena.

3.3.2 Validação do soro ACR10A

Tal como o soro policlonal ACR10B, também o soro policlonal de coelho ACR10A foi gerado contra o péptido CSKENLLIVPINVGENA (região C terminal, aas 202 a 216 da proteína dMob1). Por análise em *westernblot* de extratos os extratos de cérebros de larvas do 3ºestadio: 20 cérebros *white*, 20 cérebros mutantes nulo $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$ e 20 cérebros revertentes $Mob1^{svc};GFP-Mob1$ (figura 3.4). Como controlo negativo utilizei o mutante nulo de Mob1 ($Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$ – figura 3.4 A). Como controlo positivo utilizaram-se extratos de cérebros do 3ºestadio larvar de moscas revertentes $Mob1^{svc};GFP-Mob1$ do qual se confirmou anteriormente a expressão da proteína de fusão Mob1:GFP pela deteção da proteína GFP (figura 3.3 B-coluna 2).

O soro policlonal ACR10A reconhece bandas com peso molecular superior a 70kDa em todos os extratos (figura 3.4-coluna 1/2/3), parecendo que a bandas são inespecíficas. O controlo negativo (figura 3.4A- coluna 3), o mutante nulo $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, como seria de

esperar não se detetou nenhuma banda com peso de 26kDa, podendo sugerir que a proteína não é expressa ou que não será expressa o suficiente para ser detetada.

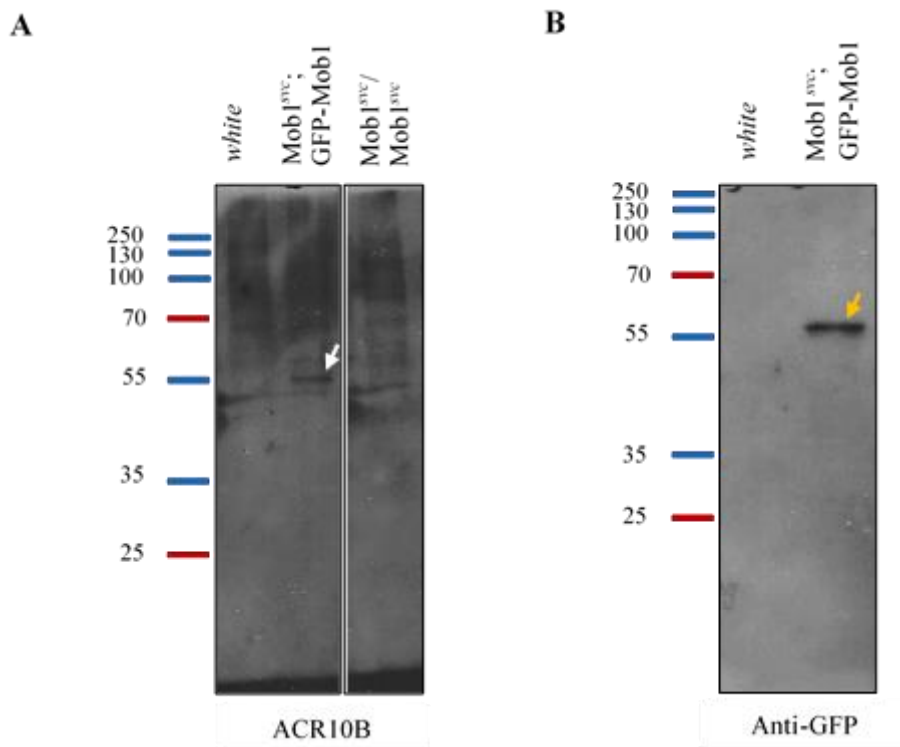


Figura 3.3-Validação do soro ACR10B. (A) O soro policlonal ACR10B parece reconhecer proteínas de forma inespecífica acima dos 70kDa, uma vez que apresenta o mesmo padrão de bandas nos extratos de cérebros larvares 3ºestadio de *white* (coluna 1), revertente Mob1^{svc};GFP-Mob1 (coluna 2) e no mutante nulo Mob1^{svc}/Mob1^{svc} (coluna 3). Nos extratos de cérebros larvares 3ºestadio de *white* (coluna 1) e de Mob1^{svc}/Mob1^{svc} (coluna 3), o soro policlonal ARC10 não parece detetar nenhuma banda de forma específica. Nos extratos de cérebros de larvas em 3ºestadio revertente Mob1^{svc};GFP-Mob1 (coluna 2) deteta uma banda específica com um peso molecular aproximado de 55kDa (seta a branco) que poderá ser a proteína de fusão Mob1:GFP. (B) Apresenta-se o *westernblot* para detetar a GFP, utilizando anticorpo anti-GFP 3E1 (CR-UK), na coluna 1 os controlos negativos, extratos cérebro de larvas no 3ºestadio larvar de moscas *white* do qual não detetaram a proteína GFP; na coluna 2, extratos de cérebro de larvas de 3ºestadio do revertente Mob1^{svc};GFP-Mob1 detetou-se GFP com um peso molecular de 55kDa (seta a amarelo), sugerindo que o revertente está a produzir a Mob1 acoplado à GFP.

Nos extratos de cérebros de 3ºestadio larvar de revertentes Mob1^{svc};GFP-Mob1 detetou-se uma banda específica com um peso aproximado de 55kDa (figura 3.4-coluna 2). Comparando a banda observada no extrato Mob1^{svc};GFP-Mob1 (figura 3.4- coluna 2) com a banda detetada com o anticorpo anti-GFP 3E1(CR-UK) nos extratos revertentes Mob1^{svc}; GFP-Mob1 (figura 3.3-B-coluna 2), ambas as bandas parecem ter o mesmo peso molecular de 55kDa podendo sugerir o soro policlonal ACR10A reconhece a proteína Mob1 acoplado à proteína

GFP (Figura 3.3- B). Nos extratos de cérebros larvares do 3ºestadio de *white* bem como nos extratos de cérebros revertentes seria de esperar a deteção da proteína Mob1 endógena com cerca de 26kDa. Contudo não se detetou nenhuma banda correspondente à proteína endógena com cerca de 26 kDa nem nos extratos de *white* nem do revertente de Mob1. Uma das possíveis causas, como já descrito anteriormente para o soro policlonal ACR10B, poderá dever-se ao facto de que a proteína endógena poderá não ser expressa a um nível suficiente para conseguir ser detetada, ou seja, poderá estar abaixo do limite de deteção.

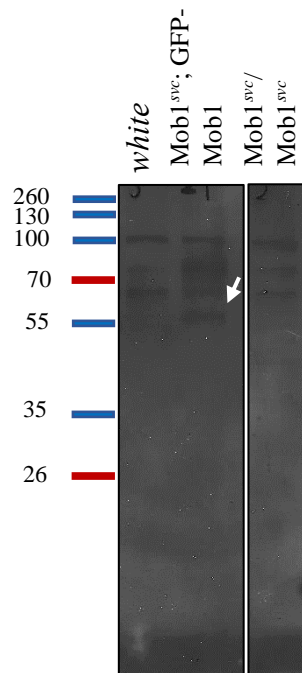


Figura 3.4- Validação do soro ACR10A. O soro policlonal ACR10A parece reconhecer proteínas de forma inespecífica acima dos 70kDa, uma vez que apresenta o mesmo padrão de bandas nos extratos de cérebros larvares 3ºestadio de *white* (coluna 1), revertente *Mob1^{svc};GFP-Mob1* (coluna 2) e no mutante nulo *Mob1^{svc}/Mob1^{svc}* (coluna 3). Nos extratos de cérebros larvares 3ºestadio de *white* (coluna 1) e de *Mob1^{svc}/Mob1^{svc}* (coluna 3), o soro policlonal ARC10 não parece detetar nenhuma banda de forma específica. Nos extratos de cérebros de larvas em 3ºestadio revertente *Mob1^{svc};GFP-Mob1* (coluna 2) deteta uma banda específica com um peso molecular aproximado de 55kDa (seta a branco) que poderá ser a proteína de fusão *Mob1:GFP*.

3.3.3 Validação do soro ACR4

O soro policlonal de coelho ACR4 foi criado contra a proteína de fusão *DMob1GST* e através da análise dos extratos de cérebros de larvas do 3ºestadio: 20 cérebros *white*, 20 cérebros mutantes nulo *Mob1^{svc}/Mob1^{svc}* e 20 cérebros revertentes *Mob1^{svc};GFP-Mob1* (figura 3.5). em *westernblot*. Como controlo negativo utilizei o mutante nulo de *Mob1* (*Mob1^{svc}/Mob1^{svc}* – figura 3.5-coluna 1). Como controlo positivo utilizaram-se extratos de cérebros do 3ºestadio

larvar de moscas revertentes $Mob1^{svc}$; GFP-Mob1 do qual se confirmou anteriormente a expressão da proteína de fusão Mob1:GFP pela detecção da proteína GFP (figura 3.3 B-coluna 2).

O soro policlonal ACR4 reconhece várias bandas com peso molecular superior a 55kDa em todos os extratos (figura 3.5-coluna 1/2/3), parecendo assim que as bandas são inespecíficas uma vez que se deteta o mesmo padrão todos os extratos (figura 3.5 -coluna 1/2/3).

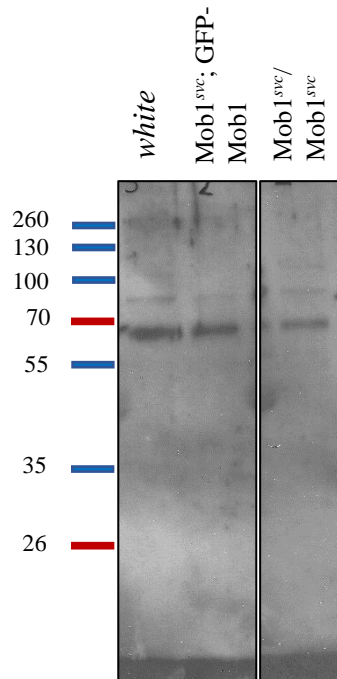


Figura 3.5-Validação soro ACR4. O soro policlonal ACR4 parece reconhecer proteínas de forma inespecífica acima dos 55kDa, uma vez que apresenta o mesmo padrão de bandas nos extratos de cérebros larvares 3ºestadio de *white* (coluna 1), revertente $Mob1^{svc}$;GFP-Mob1 (coluna 2) e no mutante nulo $Mob1^{svc}/ Mob1^{svc}$ (coluna 3), sugerido que as bandas são inespecíficas.

A validação dos soros policlonais ACR10B,ACR10A e ACR4 fez-se com o objetivo de avaliar os níveis da proteína Mob1 ao longo das fases de desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* para perceber até quando a proteína poderá ser necessária para o desenvolvimento. Os soros policlonais são gerados em animais imunizados e produzidos a partir de uma mistura de linfócitos e reconhecem múltiplos epítomos no mesmo antígeno. Contudo dado que o soro é uma mistura que contém não só os linfócitos como também outras proteínas do soro pode reconhecer várias proteínas de forma inespecífica aumentando o ruído de fundo.

Não foi possível caracterizar a expressão de Mob1 com os soros policlonais ACR10B, ACR10A e ACR4 uma vez que não foi possível detetar os níveis das proteínas endógenas (figura 3.3; 3.4; 3.5). Uma das possibilidades será que a proteína endógena possa estar a ser pouco expressa e encontrar-se abaixo do nível de deteção ou poderá dever-se ao ruído de fundo devido às ligações inespecíficas. Caso se procedesse à purificação de um dos soros policlonais poder-se-ia melhorar o sinal de deteção e diminuir o ruído de fundo.

3.4 Caracterização do fenótipo do mutante de Mob1

De forma a determinar a função do gene Mob1 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular, analisou-se a sua função através da deleção do gene, ou seja, utilizando os mutantes de Mob1. Para caracterizar o fenótipo destes mutantes realizou-se imunofluorescência indireta de um tecido embrionário e um tecido somático como cérebros de larvas do 3ºestadio. Nas primeiras fases do desenvolvimento do embrião de *Drosophila* apenas existe uma célula com múltiplos núcleos a dividirem-se de forma sincronizada no mesmo citoplasma. Após a eclosão os únicos tecidos que mantêm a atividade mitótica são o cérebro e os discos imaginais, esta atividade mitótica é mais intensa no terceiro estadio larvar.

3.4.1 Embriões de mutantes de Mob1 apresentam problemas na formação do fuso mitótico

Os embriões *white* e de mutantes Mob1^{svc} foram analisados por imunofluorescência de forma a perceber qual o efeito da deleção do gene em *Drosophila melanogaster* em mitose nas primeiras fases do seu desenvolvimento, se existirão defeitos mitóticos e se estes poderão ser uma das causas que levam à morte precoce dos mutantes de Mob1.

Fiz a técnica imunofluorescência indireta de embriões colhidos até às 2 horas, que estão nas fases iniciais do desenvolvimento, onde é considerado um embrião sincício, ou seja, um embrião no qual as divisões celulares ocorrem de forma síncrone no mesmo citoplasma. Para que fosse possível visualizar o aparelho mitótico fez-se a marcação com: α -tubulina permitindo visualizar os microtúbulos, γ - tubulina para visualizar os centrossomas e com corante de DNA, DAPI, para visualizar os cromossomas. Analisei cerca de 150 embriões *white* e 180 mutantes Mob1^{svc}/CyO *tb*, mas apenas 20 e 16 embriões se encontravam na fase de sincício, respetivamente, não se procedeu à quantificação de defeitos.

Os embriões *white* no ciclo 10 em metafase encontram-se todos sincronizados e o seu DNA encontra-se alinhado na placa metafásica (figura 3.6-A4- DAPI). É possível observar que todas as figuras mitóticas nos polos dos microtúbulos (figura 3.6 A3 - α -tubulina) têm ambos os centrossomas (figura 3.6 A2- γ - tubulina).

Os embriões sincícios de *Mob1^{svc}/CyO tb* no ciclo 10 em metafase parecem estar sincronizados e com o DNA alinhado na placa metafásica (figura 3.6 B-D). Através da marcação com α -tubulina é possível observa-se que a maioria das figuras mitóticas conseguem desenvolver os microtúbulos do fuso mitótico (figura 3.6-B-D). Contudo na figura 3.6 painel B observou-se figuras mitóticas com fuso malformado ou inexistente (figura 3.6 B- α -tubulina e merge), mas todas as figuras mitóticas apresentam ambos os centrossomas nos respetivos polos do fuso (figura 3.6 B- γ - tubulina). Na figura 3.6-C observou-se o desenvolvimento apenas do fuso num polo mesmo na presença de ambos os centrossomas. No painel D-figura 3.6 observou-se que os fusos com dimensões diferentes apresentando-se por vezes alongados.

Os resultados das imunofluorescências de embriões de mutantes *Mob1^{svc}/CyO tb* apresentam figuras mitóticas deformadas podendo sugerir problemas na formação do fuso mitótico. Contudo os defeitos observados poderão não estar diretamente relacionados com a mutação, uma vez que os embriões recolhidos poderão ser tanto mutantes homozigóticos de *Mob1* como mutantes balanceados, mutantes que têm dois alelos balanceadores terão múltiplos defeitos e não sobreviveriam. O embrião tem todos os componentes da maquinaria necessária para se dividir inicialmente porque foram colocados pela mãe no ovo. Só a partir do ciclo 15 é que a expressão dos genes começa a ser controlada pelo embrião. Os defeitos mitóticos observados em embriões mutantes de *Mob1* foram por volta do ciclo 10, como tal existe a necessidade de analisar um tecido somático e perceber se também existirão defeitos mitóticos.

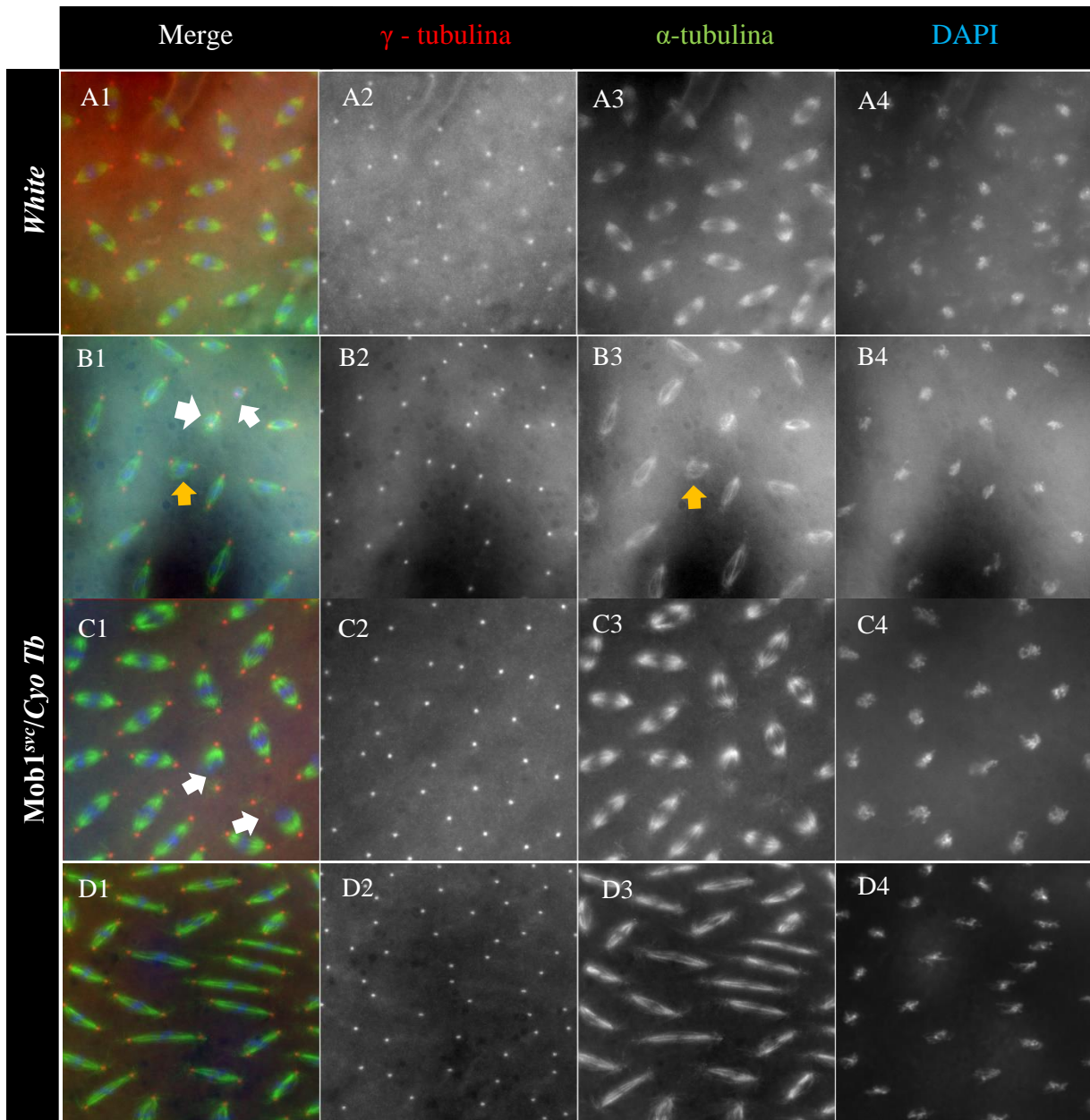


Figura 3.6- Embriões sincícios de mutantes *Mob1* no ciclo 10 apresentam problemas na formação do fuso mitóticos. A marcação das estruturas mitóticas fez-se com γ - tubulina representado a vermelho os centrossoma , com α -tubulina representado a verde os microtúbulos do fuso e a azul a marcação do DNA com DAPI. O merge é a imagem composta das três marcações descritas anteriormente. (A1-4) Embrião sincício *white* em metafase com o DNA alinhado na placa metafásica e com os centrossomas em ambos os polos do fuso mitótico. (B-D) Embrião sincício *Mob1^{svc}/Cyo tb* : (B1-4) Sincício em metafase com DNA alinhado na placa metafásica, apresenta fusos que não estão totalmente desenvolvidos (setas brancas) ou outro que o fuso parece malformado (seta amarelo) na presença de ambos os centrossomas. (C1-4) Sincício em metafase com DNA alinhado na placa metafásica, apresenta fusos em apenas um dos polos mesmo na presença de dois centrossomas (setas brancas). (D1-4) Sincício em metafase com DNA alinhado na placa metafásica, apresenta os fusos mitóticos alongados.

3.4.2 Processo de otimização da imunomarcção de cérebros larvares do terceiro estadio

Com o objetivo de analisar o fenótipo mitótico, realizei a imunomarcção de neuroblastos larvares do terceiro estadio. Para tal é necessária a visualização das estruturas mitóticas como os microtúbulos do fuso (α -tubulina) e os cromossomas mitóticos (fosfo-histona H3). Comecei por testar o seguinte protocolo: Dissecou-se os cérebros de larvas selvagens em terceiro estadio em NaCl 0,7%. De seguida, procedeu-se à fixação a 3,7% formaldeído (Sigma F8775 com metanol) em PBS durante cerca de 30 minutos. De seguida fez-se o bloqueio e permeabilização numa solução de 10% soro fetal bovino (SFB; Gibco 10500-04) e 0,4% *Triton-X-100* em PBS, durante cerca de 30 minutos. Incubou-se com os anticorpos primários α -tubulina YL1/2 (diluídos de 1:100) e fosfo-histona H3 (PH3- diluído de 1:500) em 10% SFB e 0,4% *Triton-X-100* em PBS, a 4°C durante a noite em atmosfera húmida. Lavou-se três vezes com 0,4% *Triton-X-100* em PBS durante 45 minutos. Realizou-se a incubação com o respectivo anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-rato (diluído de 1:1000) e Alexa Fluor 594 anti-coelho (diluído de 1:1000), em 10% SFB e 0,4% *Triton-X-100* em PBS, durante cerca de 4 horas à temperatura ambiente em atmosfera húmida. Lavou-se novamente três vezes com 0,4% *Triton-X-100* em PBS durante 45 minutos. Por fim montou-se em meio de montagem *slow fade gold antifade* (Invitrogen S36937) entre a lâmina e a lamela, e selou-se com verniz transparente.

A imunomarcção realizada com base no protocolo descrito anteriormente (figura 3.7 A/B) apenas se conseguiu a marcação da fosfo-histona H3 observando-se os cromossomas mitóticos apenas nas zonas periféricas dos lóbulos óticos. A marcação dos microtúbulos parece ser apenas muito superficial não tendo sido possível a marcação dos microtúbulos do fuso mitótico (figura 3.7 A/B). Foram observados 3 cérebros *white* e nenhum apresentava células com microtúbulos do fuso.

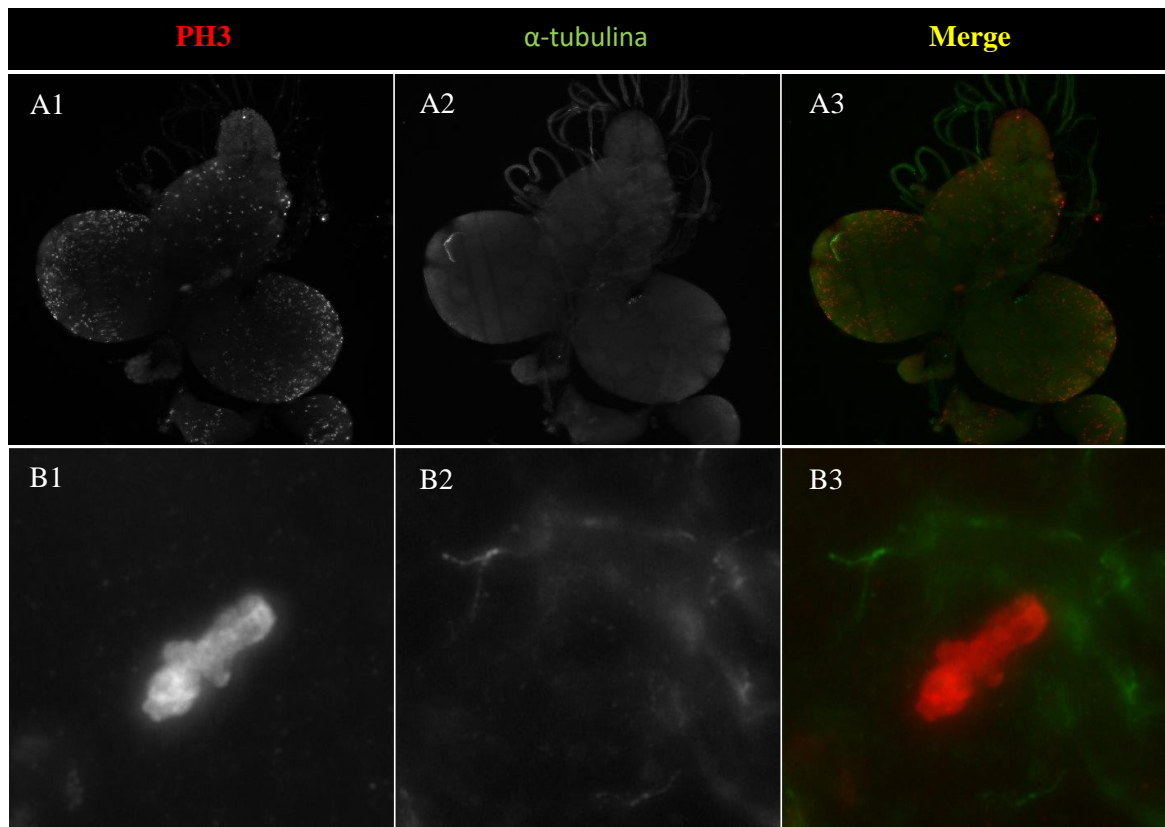


Figura 3.7- Imunofluorescência de neuroblastos de 3ºestadio larvar de *white* com fosfo-histona H3 (PH3) para marcar os cromossomas mitóticos (representado a vermelho) e com α -tubulina (representado a verde) para marcar os microtúbulos do fuso No painel superior (A1-A3) neuroblasto larvar 3ºestadio de *white* com ampliação de 10x. Apenas se obteve uma marcação periférica da fosfo-histona e não se conseguiu marcação de microtúbulos com α -tubulina. No painel inferior (B1-B3) ampliação de 100x de metafase num lobulo ótico, confirma-se que não há marcação de microtubulos do fusos mitótico.

Como não foi possível a observação dos microtúbulos (figura 3.7) com base no protocolo descrito anteriormente foi necessário otimizar a imunomarcacção de modo a obter as duas marcações necessárias para a análise posterior de fenótipos mitóticos. Todas as alterações ao protocolo foram testadas apenas mudando uma condição de cada vez mantendo o restante protocolo base.

Comecei a pensar que o processo de fixação poderia estar a afetar a visualização destas estruturas uma vez que a fixação foi feita em formaldeído contendo metanol. Optei por realizar o mesmo protocolo descrito anteriormente alterando somente a fixação para 4% formaldeído sem metanol (figura 3.8), uma vez que o metanol poderia estar a afetar a estrutura dos microtúbulos. Na figura 3.8A os neuroblastos parecem rachados, contudo parece haver uma melhoria da marcação com fosfo-histona, está mais uniforme quer nos lóbulos óticos quer no

central. Relativamente à α -tubulina parece ser uma marcação muito superficial. Analisando mitoses mais em detalhe figura 3.8.B confirma-se a marcação da fosfo-histona e não foi possível observar microtúbulos do fuso mitótico. Foram observados 4 cérebros *white* e em nenhum foi possível detetar células com microtúbulos do fuso.

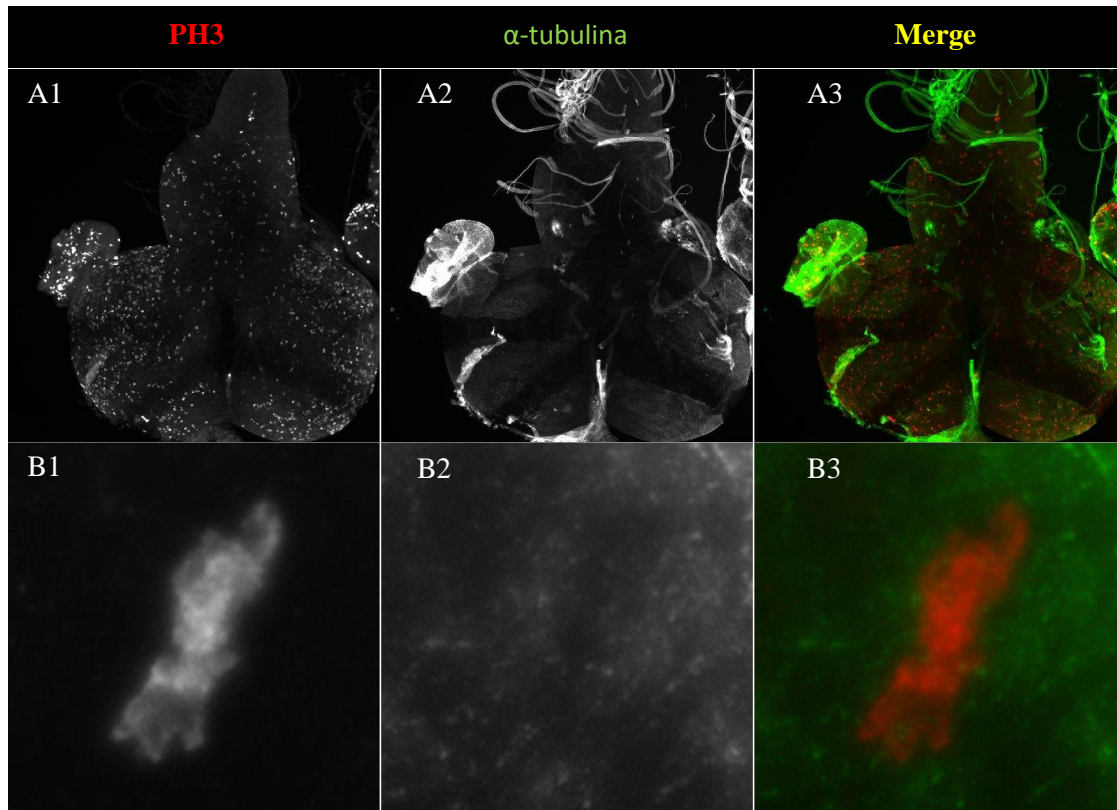


Figura 3.8- Optimização do processo de fixação de Imunofluorescência em neuroblastos de 3ºestadio larvar de *white* com fosfo-histona H3 (PH3) para marcar os cromossomas mitóticos (representado a vermelho) e com α -tubulina (representado a verde) para marcar os microtúbulos do fuso. Testou-se fixação em 4%formaldeído sem metanol em PBS. No painel superior (A1-A3) neuroblasto larvar 3ºestadio de *white* com ampliação de 10x. Apenas se obteve uma marcação periférica da fosfo-histona e não se conseguiu marcação de microtúbulos com α -tubulina. No painel inferior (B1-B3) ampliação de 100x de metafase num lóbulo ótico, confirma-se que não há marcação de microtúbulos do fusos mitótico.

Pensei que da fixação poderiam ficar resíduos de formaldeído nas células, deste modo adicionaram-se três lavagens com o tampão fosfato salino (PBS) após o processo de fixação. Contudo continuou-se a não conseguir observar os microtúbulos do fuso mitóticos, mas manteve-se a marcação dos cromossomas mitóticos com a fosfo-histona. Testei uma pré-lavagem 30% glicerol em tampão PEM, para tentar obter a marcação dos microtúbulos uma vez

este tampão ajuda a estabilizar a tubulina, seguindo de fixação com 4% formaldeído sem metanol. Testei também o 1 μ M de taxol que é um estabilizador dos microtúbulos e impede a despolimerização dos microtúbulos, seguindo de fixação em 4% formaldeído sem metanol durante 30 minutos. Não se conseguiu observar microtúbulos novamente em ambas as condições testadas. Decidiu-se aumentar a concentração do agente fixador para 8% de formaldeído sem metanol durante 20 e 30 minutos, porém não se observou microtúbulos novamente e os cérebros apresentavam-se rachados e sem marcação uniforme nem de fosfo-histona nem de α -tubulina.

Após ter testado vários processos de fixação sem resultados a nível da marcação dos microtúbulos comecei a pensar se poderia haver um problema no processo de permeabilização. O processo de permeabilização é necessário para que se criem poros na membrana celular, para permitir a entrada dos anticorpos, normalmente são utilizados detergentes para permeabilizar a membrana. No protocolo inicial fez-se o passo de permeabilização e bloqueio em simultâneo, numa solução 10% SFB e 0,4% *Triton-X-100* durante 30 minutos. Começou-se a aumentar gradualmente a concentração do detergente para permeabilizar 0,5%, 1% *Triton-X-100* e testou-se também para cada uma das concentrações tempos de incubações distintos 30 minutos, 1 hora, 2 horas e durante a noite. Para a condição de 1% *Triton-X-100* durante 1h ou 2h houve uma melhoria significativa no sentido em que se observou de forma mais uniforme dos microtúbulos superficiais no tecido e da fosfo-histona. Foi possível visualizar microtúbulos do fuso mitótico nas periferias dos lóbulos óticos. Optou-se por aumentar a concentração e o tempo de incubação para 1,5% *Triton-X-100* durante 1 hora foi possível obter-se fusos mitóticos de forma mais uniforme que na periferia dos lóbulos óticos como na zona central.

Através de informação recolhida da literatura decidi testar a fixação com 4% formaldeído sem metanol em 0,5 mM EGTA e 5 mM MgCl₂, que funcionam como preservantes do citoesqueleto e dos microtúbulos. Esta condição fixação conjuntamente com a alteração do processo de permeabilização foi possível conseguir a marcação dos microtúbulos do fuso mitótico. O protocolo utilizado está descrito detalhadamente na secção de materiais e métodos 1.5.3.

3.4.2.1 Metáfases dos neuroblastos de mutantes Mob1 apresentam problemas na formação do fuso mitótico e focagem dos microtúbulos ao nível dos polos do fuso

Em *Drosophila melanogaster*, após a fase de embrião seguem-se três fases larvares em que o desenvolvimento larvar é conseguido pelo crescimento das células larvares, do qual apenas o sistema nervoso central e os discos imaginais mantêm a sua atividade mitótica que é mais elevada na fase do terceiro estadio.

De modo a verificar o que provoca a morte das larvas em 3ºestadio de mutantes nulos de Mob1 (Mob1^{svc}/Mob1^{svc}), analisou-se um tecido somático como os cérebros do 3ºestadio larvar. A análise dos neuroblastos *white* e mutantes nulos Mob1^{svc}/Mob1^{svc} fez-se por imunofluorescência indireta para que fosse possível visualizar o aparelho mitótico, com marcação dos microtúbulos do fuso com α -tubulina e do DNA em mitose com fosfo-histona H3 (PH3). Analisaram-se cerca de 4 neuroblastos *white* e 5 neuroblastos larvares mutantes de terceiro estadio, não se procedeu à quantificação.

Os neuroblastos de larvas *white* em metafase (figura 3.9-A1-3) apresentam os polos dos fusos bem definidos, em que a polimerização dos microtúbulos parece ocorrer a partir dos polos formando um fuso bipolar (figura 3.9 A2- α -tubulina) com os cromossomas alinhados em placa metafásica (figura 3.9 A3 -PH3).

Os resultados das imunofluorescências de neuroblastos de larvas de mutantes nulos Mob1^{svc}/ Mob1^{svc} apresentam figuras mitóticas em metafase em que os cromossomas mitóticos parecem estar alinhados na placa metafásica (figura 3.9 B-C-PH3), contudo os microtúbulos do fuso mitótico não parecem se encontrar-se focados num dos lados do polo (Figura 3.9-B2 e C2- α -tubulina). Observaram-se também fusos mitóticos de mutantes nulos Mob1 com uma ligeira curvatura em forma de “banana” num dos polos do fuso (figura 3.9-D2- α -tubulina) e os cromossomas não parecem estar completamente alinhados (figura 3.9-D3-PH3). Na figura 3.9-E, os microtúbulos do fuso parecem estar torcidos num dos lados do polo (figura 3.9-E1-3).

A perda de dMob1 parece causar alguns defeitos ao nível na formação do fuso mitótico em neuroblastos do terceiro estadio larvar, contudo para melhor perceber era essencial fazer a quantificação dos defeitos mitóticos.

3.4.2.2 Anafases dos neuroblastos de mutantes Mob1 apresentam problemas no fuso e na constrição

Para além de figuras mitóticas em metafase de neuroblastos de larvas em terceiro estadio larvar também se analisaram mitoses em anafase de neuroblastos *white* e de mutantes nulos de Mob1 (Mob1^{svc}/Mob1^{svc}) por imunofluorescência indireta, com marcação dos microtúbulos do fuso com α -tubulina e do DNA em mitose com fosfo-histona H3 (PH3) (figura 3.10). Analisaram-se cerca de 4 neuroblastos *white* e 5 neuroblastos larvares mutantes de terceiro estadio, não se procedeu à quantificação.

Os neuroblastos de larvas *white* em anafase (figura 3.10-A1-3) apresentam os polos dos fusos bem definidos e os microtúbulos (figura 3.10 A2- α -tubulina), e é também possível visualizar-se a migração dos cromossomas para polos opostos do fuso mitótico (figura 3.10 A3 -PH3).

Os neuroblastos de larvas mutantes Mob1^{svc}/Mob1^{svc} apresentam fusos mitóticos que parecem estar em anafase A, aparentam ter um dos lados do polo do fuso mitótico desfocado, contudo poderá ser consequência de fases anteriores de mitose (figura 3.9-C1-3). Observaram-se também anafases com curvatura acentuada nos microtúbulos do fuso em forma de “banana” (Figura 3.10-D3 PH3). Também se observou fusos que parecem estar em anafase B com fusos mais alongados (figura 3.10-E2, F2- α -tubulina) que já deveriam ter iniciado a constrição para prosseguir para telófase.

A perda de Mob1 parece causar alguns defeitos ao nível da constrição do fuso que poderá ter consequências nas fases seguintes do ciclo celular. Contudo para melhor perceber os efeitos da perda de Mob1 seria essencial fazer a quantificação dos defeitos mitóticos observados.

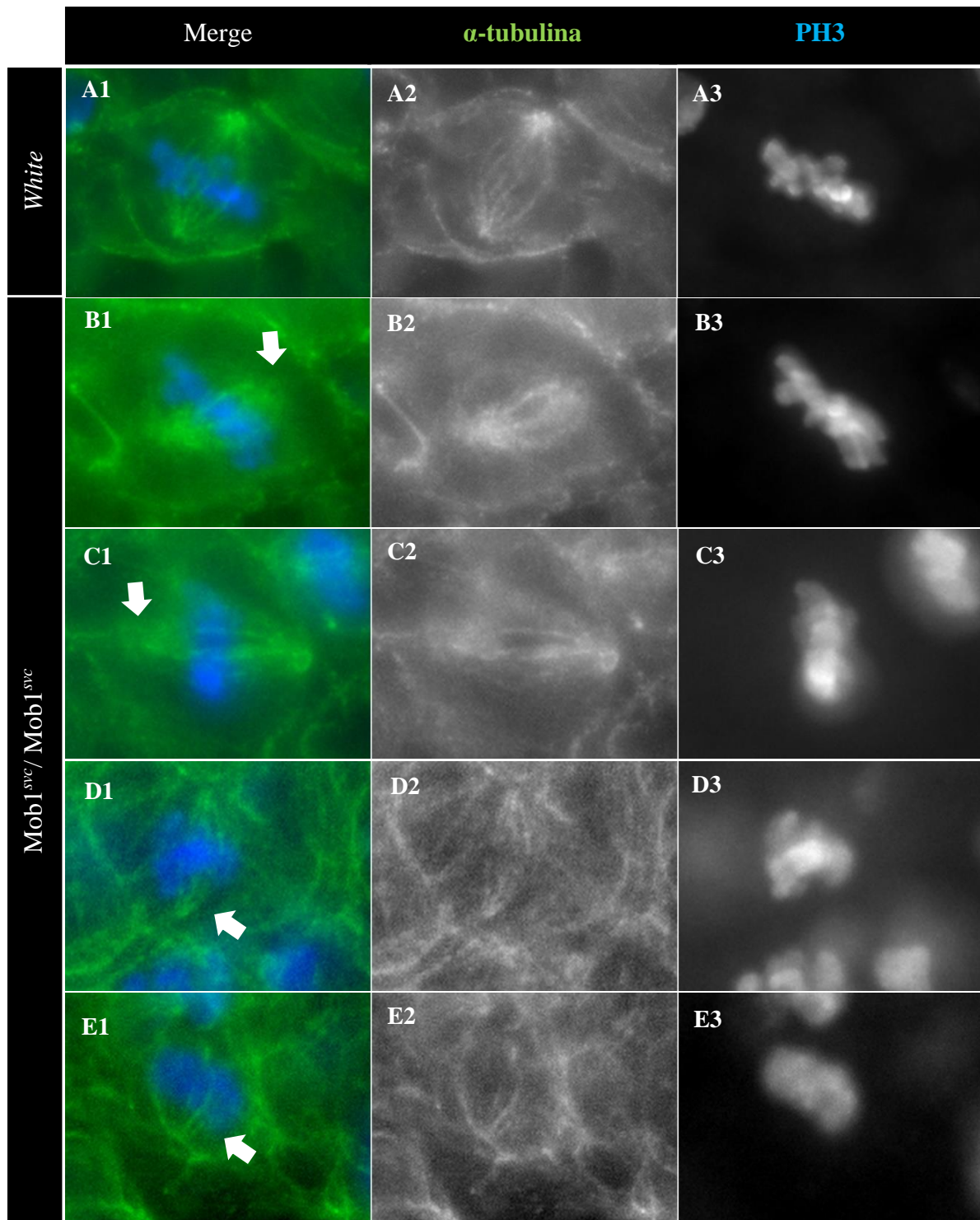


Figura 3.9- Mutantes nulos Mob1 apresentam defeitos em metáfase. (A1-3) Metáfase de neuroblastos *white*. (B1-3) e (C1-3) Mutante nulo *Mob1^{svc}/Mob1^{svc}* em metáfase com desfocagem do fuso num lado dos pólos (seta branca). (D1-3) Metáfase de mutante nulo com fuso mitótico com ligeira curvatura num dos polos (seta branca). (E1-3) Metáfase mutante nulo com fuso mitótico com aparência de estar torcido.

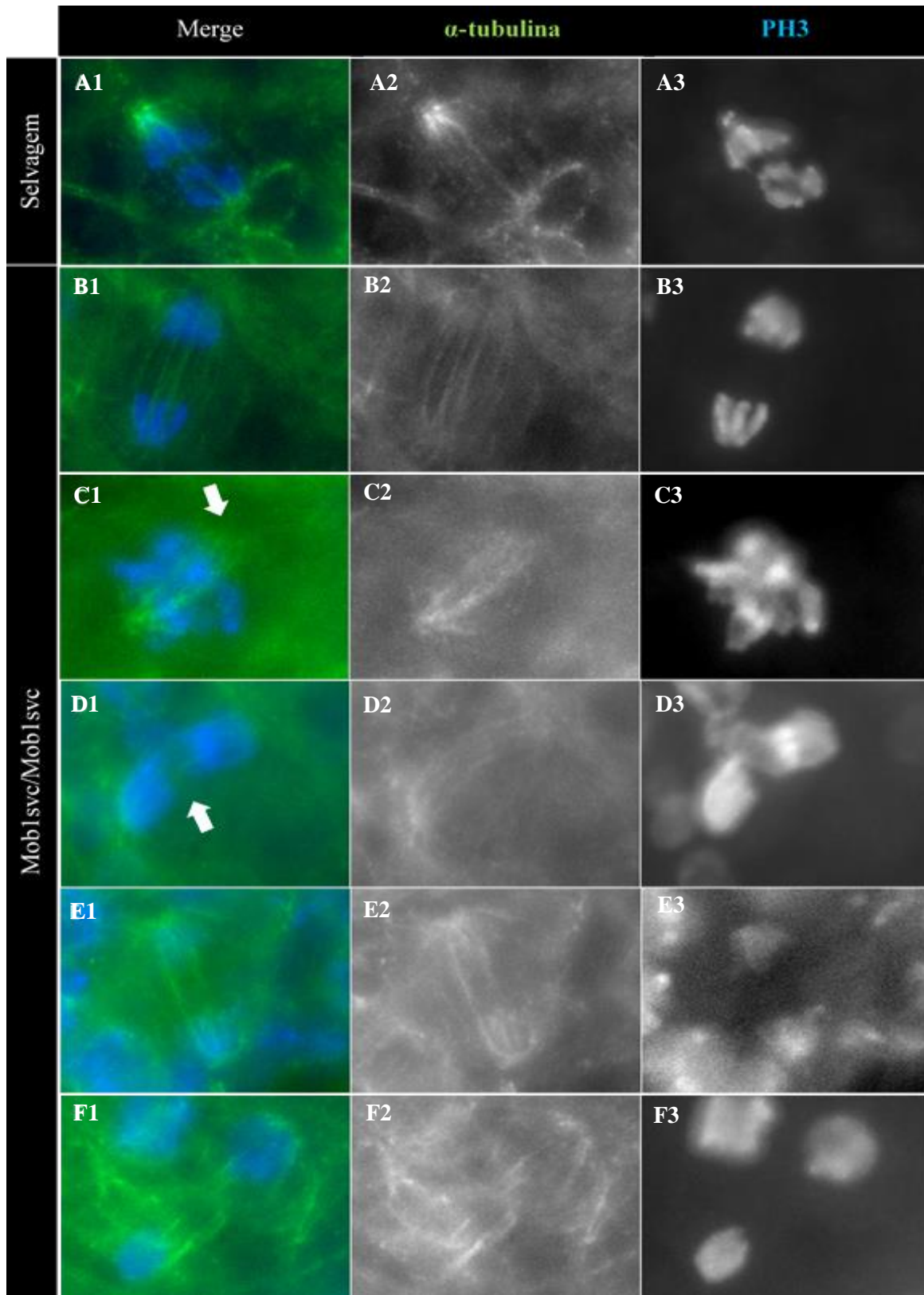


Figura 3.10- Mutantes nulos Mob1 apresentam defeitos em anafase. (A1-3) Fuso em metafase de neuroblastos *white*. (B1-3) Anafase aparentemente normal de mutante nulo Mob1^{svc}/Mob1^{svc}. (C1-3) Anafase A com um lado dos polos desfocados (seta branca). (D1-3) Anafase B com curvatura acentuada em forma de “banana” (seta branca). (E1-3) e (F1-3) Anafase B com fusos alongados dos quais já deveria ter iniciado a constrição para avançar para a fase seguinte.

3.5 Mutantes Mob1 apresentam uma diminuição do tamanho dos cérebros de larvas de 3ºestadio

Ao realizar os ensaios de imunofluorescência observei que os cérebros de mutantes nulos $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$ pareciam mais pequenos que os cérebros *white*. Deste modo para confirmar esta hipótese medi os lóbulos óticos de 10 cérebros de larvas de terceiro estadio *white*, 10 cérebros de larvas de terceiro estadio mutante nulo de Mob1 ($Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$) e 10 cérebros de larvas de terceiro estadio de revertentes ($Mob1^{svc};Mob1-GFP$), usando o software *Image J* versão 1.52p.

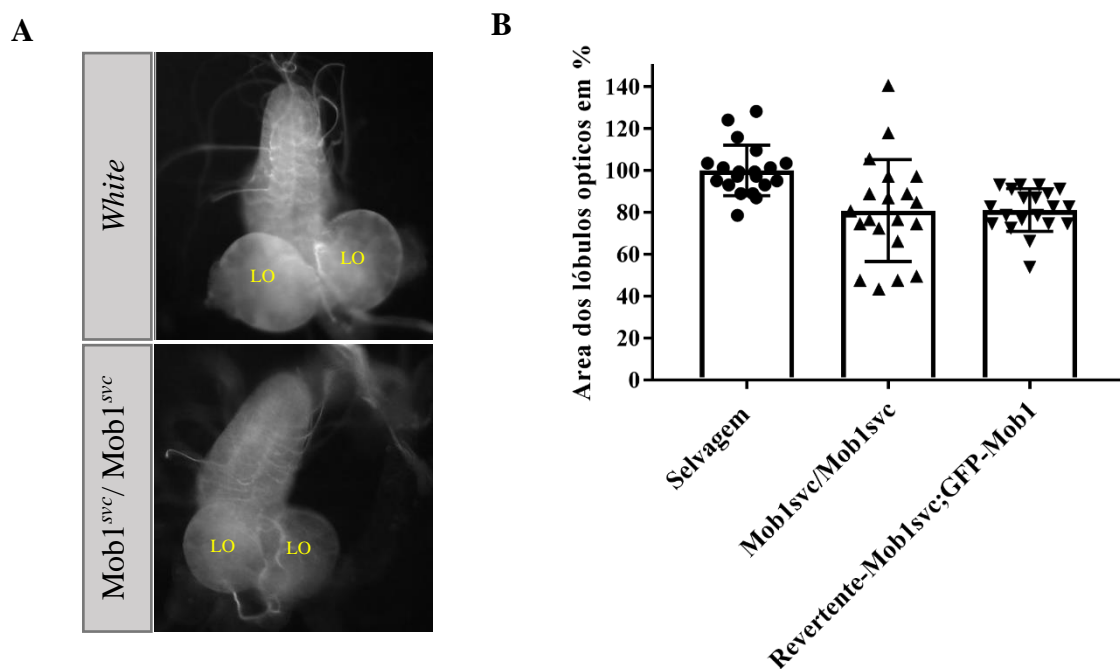


Figura 3.11- Diminuição do tamanho dos cérebros larvas 3ºestadio de mutantes Mob1.(A)Imagem representativa de um cérebro do 3ºestadio larvar de *white* e mutante nulo $Mob1^{svc} / Mob1^{svc}$ com as áreas medidas correspondem aos lóbulos óticos (LO) .(B) Área dos lóbulos óticos em percentagem de 10 cérebros de larvas do 3ºestadio *white*, mutantes nulos de Mob1 ($Mob1^{svc} / Mob1^{svc}$) e revertente ($Mob1^{svc};GFP-Mob1$), observou-se uma diminuição aproximadamente de 20% e o revertente não recuperou o tamanho comparado com os cérebros *white*, mantêm o mesmo tamanho que os lóbulos óticos dos mutantes nulos de Mob1

Os cérebros de terceiro estadio larvar de mutantes nulos de Mob1 ($Mob1^{svc} / Mob1^{svc}$) apresentam uma diminuição de cerca de 20% da área dos lóbulos óticos comparado com os cérebros das larvas *white* (figura 3.11 A e B). Contudo existe uma grande dispersão nas áreas

medidas dos lóbulos óticos dos cérebros das larvas $Mob1^{svc} / Mob1^{svc}$. Nos cérebros de revertente ($Mob1^{svc}$; GFP-Mob1) do terceiro estadio larvar parece não haver recuperação do tamanho dos lóbulos comparando com os cérebros *white* do 3º estadio larvar. Os cérebros de revertente ($Mob1^{svc}$; GFP-Mob1) do terceiro estadio larvar mantiveram a mesma área dos lóbulos óticos que os mutantes nulos $Mob1^{svc} / Mob1^{svc}$, contudo já não existe uma grande dispersão das medições. Isto poderá sugerir que a diminuição do tamanho dos cérebros se deve à ausência de Mob1 mas que a inserção de novo de Mob1, poderá não ser suficiente para recuperação do tamanho (figura 3.11). Esta diminuição dos cérebros de larvas de terceiro estadio dos mutantes dMob1 poderá também dever-se ao facto de poder existir mais morte celular ou menos mitoses por área, contudo seria necessário a realização de experiências complementares.

3.6 Caracterização do fenótipo dos mutantes Mob3

Em *Drosophila melanogaster* ainda existe pouca informação descrita na literatura sobre o gene dMob3, a sua função e sobre mutantes de dMob3. Para determinar a função do gene Mob3 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular, analisou-se a sua função através da deleção do gene, ou seja, utilizando os mutantes nulos de Mob3. Para caracterizar o fenótipo destes mutantes realizou-se imunofluorescência indireta de cérebros de larvas do 3º estadio.

O mutante nulo $w Mob3^{sac}$ é homocigótico e sobrevive até à fase adulta. O mutante $w Mob3^{sac}$ é viável e fértil, não apresenta diferenças aparentes a nível morfológico quer em macho e fêmea, *white* e mutante (figura 3.12-A).

Realizei um ensaio de forma a perceber se o desenvolvimento de mutantes a diferentes temperaturas (18°C, 25°C e 29°C) se afetaria a capacidade de eclosão da pupa. O desenvolvimento de moscas a diferentes temperaturas afeta a divisão celular. A 18° C o desenvolvimento é mais lento cerca de 18-20 dias, a 25°C cerca de 10-15 dias e a 29°C sob condições de stress cerca de 5-8 dias.

Verifiquei que cerca de 4% dos mutantes a 18°C (n=1; 8 de 46 $Mob3^{sac}$ não eclode vs 1 de 63 *white* não eclode), 15% mutantes a 25°C (n=1; 6 de 125 $Mob3^{sac}$ não eclode vs 3 de 130 *white* não eclode; n=2; 8 de 126 $Mob3^{sac}$ não eclode vs 1 de 147 *white* não eclode), 13% dos

mutantes a 28°C^{1*} (n=1 ;19 de 95 Mob3^{sac} não eclode vs 5 de 104 *white* não eclode;n=2; 15 de 91 Mob3^{sac} não eclode vs 8 de 155 *white* não eclode), morrem na fase de pupa ou a eclodir da pupa. Os indivíduos Mob3^{sac} parecem ter maior dificuldade em eclodir da pupa do que as moscas *white*.

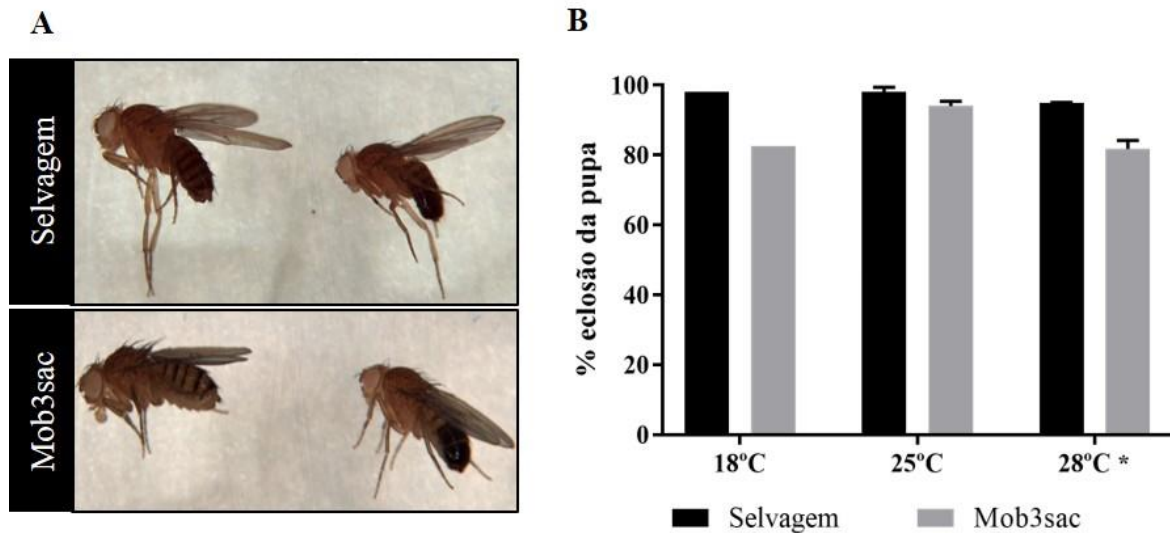


Figura 3.12-Mutante Mob3 é viável e fértil. (A) No painel superior do lado direito encontra-se uma fêmea adulta *white* e do lado esquerdo um macho adulto *white*. No painel inferior do lado direito encontra-se uma fêmea adulta mutante Mob3^{sac} e do lado esquerdo um macho adulto mutante Mob3^{sac}. Não parecem existir diferenças entre fêmeas e machos *white* e mutante. (B) Gráfico da percentagem da eclosão das pupas *white* e mutante Mob3^{sac} em função de diferentes condições de temperatura (18°C,25°C, 28°C). Cerca de 4% dos mutantes a 18°C (n=1; 8 de 46 Mob3^{sac} não eclode vs 1 de 63 *white* não eclode), 15% mutantes a 25°C (n=1 ;6 de 125 Mob3^{sac} não eclode vs 3 de 130 *white* não eclode; n=2; 8 de 126 Mob3^{sac} não eclode vs 1 de 147 *white* não eclode), 13% dos mutantes a 28°C (n=1 ;19 de 95 Mob3^{sac} não eclode vs 5 de 104 *white* não eclode;n=2; 15 de 91 Mob3^{sac} não eclode vs 8 de 155 *white* não eclode), morrem em pupa ou a eclodir da pupa

Para analisar o fenótipo dos mutantes Mob3 realizei também medições dos cérebros de larvas do 3ºestadio e foi também feita imunofluorescência indireta em cérebros. Analisei também se existiria algum defeito quer no desenvolvimento quer no comportamento dos mutantes nulos Mob3.

¹ * - a estufa utilizada encontrava-se uma temperatura interior de 28°C e não de 29°C como apresentado no mostrador do aparelho

3.6.1 Mutantes Mob3 desenvolvem necrose e tumores

Os membros da família dos Mob, sabe-se que estão envolvidos em vias de proliferação celular, nomeadamente na via *Hippo* as proteínas Mob4A/B. Em *Drosophila*, mutantes com a ausência de *Mats* (em humanos Mob4A/B) apresentaram um fenótipo de elevada proliferação celular, apoptose deficiente e sobre-crescimento dos tecidos, e consequente formação de tumores (Lai et al. 2005). A proteína *Mats* é considerada um supressor de tumores. Tendo em conta que um dos membros da família dos Mob está envolvido numa via de proliferação celular foi averiguar-se, se também outro membro desta família como o dMob3 poderia estar nesta via e se apresentaria algum fenótipo semelhante. Analisei o desenvolvimento de 140 moscas *white* e 332 moscas mutantes nulos *w Mob3^{sac}*. Observou-se que os mutantes nulos *w Mob3^{sac}* apresentavam zonas com machas escuras que se assemelham manchas necróticas em várias regiões, como no abdómen, tórax, patas, peça bucal e zonas salientes acinzentadas, pequenas massas que se parecem com tumores (figura 3.13 A-E). Cerca de 19% das moscas mutantes de Mob3 (63 de 332 *w Mob3^{sac}*) desenvolvem a 25°C algum dos defeitos anteriormente descritos (Figura 3.14-A). A maioria dos defeitos são manchas necróticas nas patas 12,7%, seguido de 2,4% de manchas necróticas no tórax e massas tumorais (Figura 3.14-A). As manchas necróticas observadas nas patas são sobretudo na zona dos ligamentos e não no comprimento da pata (figura 3.13-D).

Em larvas de terceiro estadio de mutantes *w Mob3^{sac}* observei muito raramente zonas escuras que se assemelham a manchas necróticas em várias zonas ao longo do seu comprimento (Figura 3.14-B).

A perda de Mob3 em *Drosophila melanogaster* poderá levar ao desenvolvimento de manchas necróticas e de pequenos tumores.

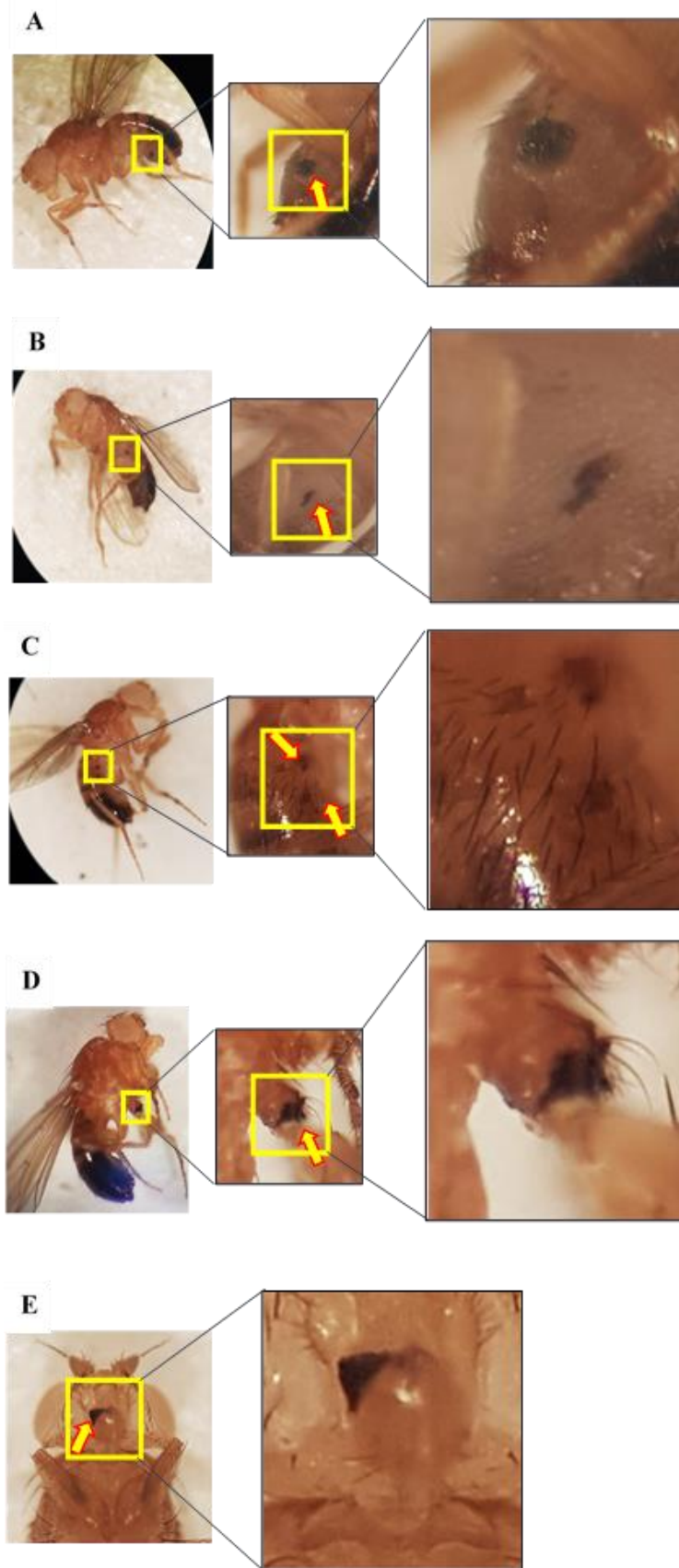


Figura 3.13- Mutante Mob3 desenvolvem necrose e tumores em várias regiões. Imagens representativas dos defeitos observados-A-massas tumorais; B-manchas necróticas abdômen; C-manchas necróticas tórax;D-manchas necróticas patas. E- manchas necróticas peça bucal; Fotografias adquiridas com Samsung galaxy S8

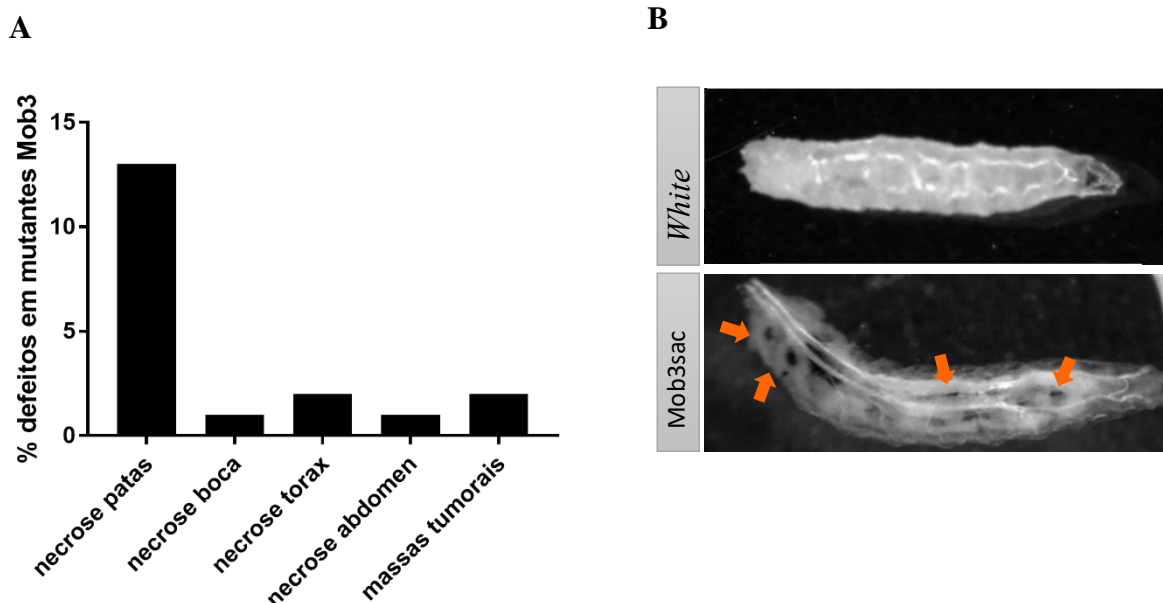


Figura 3.14- Mutantes Mob3 desenvolvem necrose e tumores. (A) Cerca de 19% (63 de 332) dos mutantes nulos de Mob3 (w Mob3^{sac}) desenvolvem algum defeito, como manchas necróticas nas patas (12,7%), peça bucal (0,6%), tórax (2,4%), abdômen (0,9%) e pequenas massas tumorais (2,4%). Observou-se também moscas *white* ($n=140$) e nenhuma apresentava nenhum tipo defeito descrito anteriormente. (B) No painel superior larva *white* do 3ºestadio, no painel inferior larva w Mob3^{sac} do 3ºestadio com manchas necróticas em todo o seu comprimento-setas a laranja. Fotografias adquiridas com a câmera AxioCam MRc na SteREO Lumar v12

3.6.2 Mutantes Mob3 parecem ter imunidade debilitada

Enquanto analisava o desenvolvimento de mutantes w Mob3^{sac}, observei que algumas moscas w Mob3^{sac} apresentavam uma película esbranquiçada sobre o corpo (figura 3.15-A). Também se verificou que quando se sacrificavam as moscas Mob3^{sac} com zonas de necrose e se guardavam a 4°C para posteriormente fotografar, as moscas surgiam cobertas de uma película esbranquiçada visualmente semelhante a fungos (Figura 3.15-B). Após esta observação realizou-se uma pequena experiência, em que moscas mutantes w Mob3^{sac} com defeito e *white* foram sacrificadas em éter, no mesmo dia, e armazenadas durante 15 e 19 dias a 4°C. Após os 15 e 19 dias, respectivamente, verificou-se que as moscas w Mob3^{sac} com defeitos desenvolveram uma película visualmente semelhante a fungos ao contrário das moscas *white* (Figura 3.15-C). A ausência de Mob3 poderá tornar os mutantes mais suscetíveis ao desenvolvimento ou contágio de microrganismos, estes poderão ter alguma debilidade ao nível da imunidade, uma vez que se sabe que em *Drosophila* a via de sinalização *Hippo* e *Toll* estão funcionalmente interligadas na mediação da resposta imune anti-microbiana. Para confirmar de

facto se a pelicula esbranquiçada se deve a microorganismos dever-se-ia fazer estudos de supressão do sistema imune da mosca para melhor compreensão da relação da imunidade e Mob3.

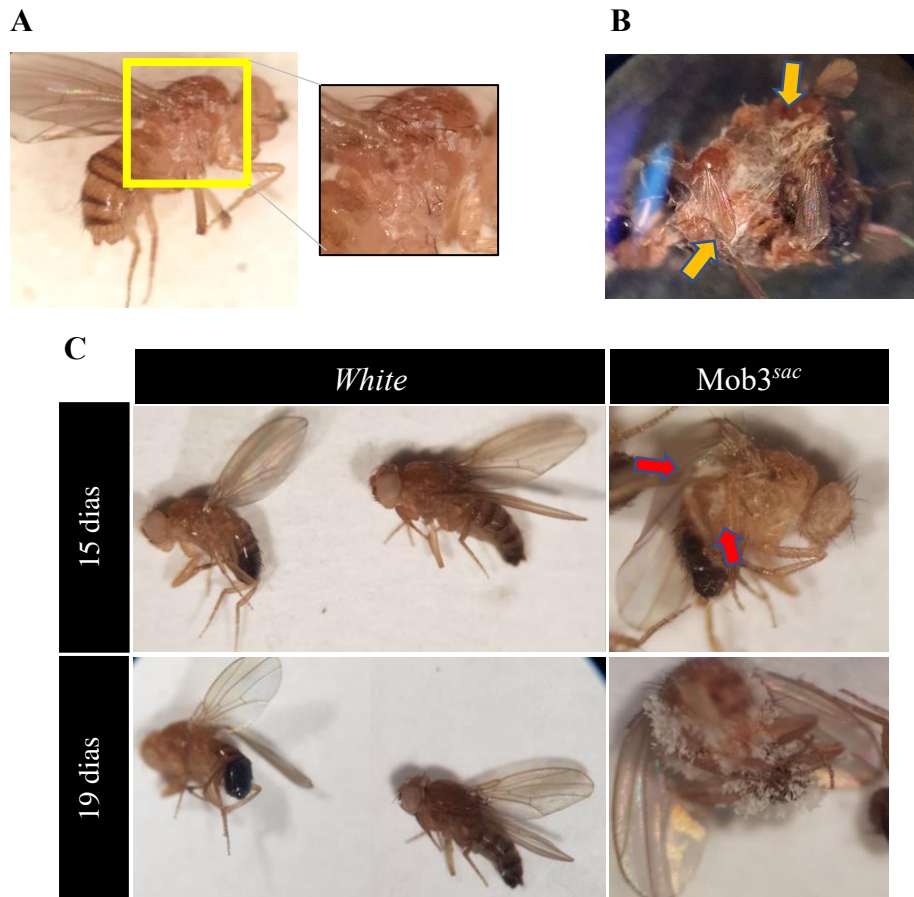


Figura 3.15-Mutantes Mob3^{sac} parecem ter a imunidade debilitada. (A) Mutante Mob3^{sac} com uma pelicula esbranquiçada sobre o tórax. (B) Mutante Mob3^{sac} com defeitos armazenados a 4°C desenvolveram fungos. (C) Mutantes Mob3 com defeitos e moscas *white* sacrificadas em éter e armazenadas a 4°C durante 15 dias e 19 dias, mutantes Mob3^{sac} após 15 dias aparentam ter uma pelicula esbranquiçada, aos 19 dias a mosca está coberta de fungos

3.6.3 Mutantes Mob3^{sac} apresentam problemas de orientação

O comportamento de mutantes *w* Mob3^{sac} foi também analisado uma vez que observei que alguns indivíduos demonstravam um comportamento distinto. Realizei ensaios de mobilidade (*climbing assay*) que consiste em bater verticalmente os tubos com moscas mutantes e os tubos com as moscas *white* ao mesmo tempo e observar a reação das moscas. Foram colocados dois tubos com o mesmo número de moscas *white* e Mob3^{sac} selecionadas aleatoriamente. Noutros tubos foram colocadas moscas *w* Mob3^{sac} com manchas necróticas ou

com pequenas massas que se assemelham a tumores. Os tubos com moscas selecionadas aleatoriamente, observou-se que todos os indivíduos *white* atingem quase de imediato o topo do tubo enquanto que nos mutantes *w Mob3^{sac}* a maioria alcança o topo, mas não todos os indivíduos o fazem. Quando observei os tubos com os mutantes *w Mob3^{sac}* com defeitos verifiquei que tinham dificuldade em alcançar o topo do tubo ao contrário das moscas *white* que quase de imediato atingem o topo do tubo (figura 3.16). As moscas *w Mob3^{sac}* mantêm-se na parte inferior do tubo, contudo parece que apenas estão desorientadas. Poderá sugerir que a perda de *Mob3* causa desorientação uma vez que as moscas continuam a ter a capacidade de se mover apenas aparentam não ter uma reação natural ao estímulo.

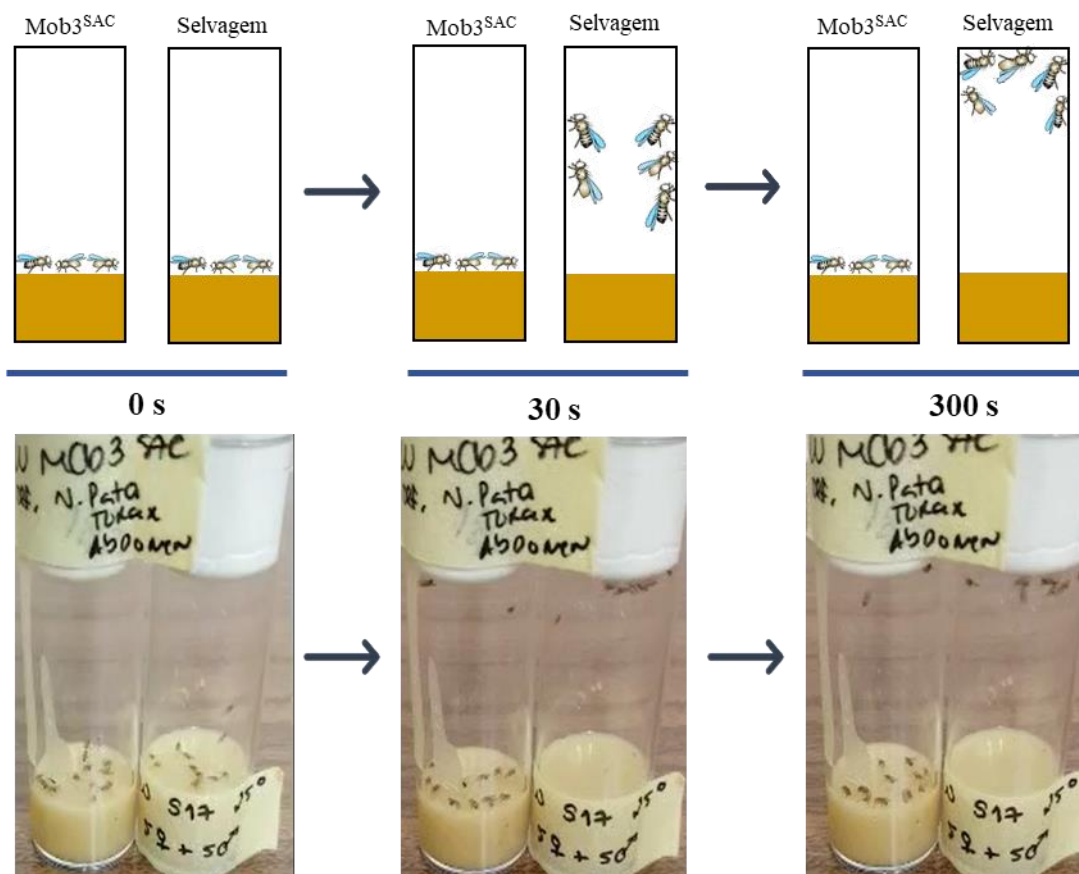


Figura 3.16- Mutantes *Mob3^{sac}* têm dificuldades de mobilidade. No painel superior a representação esquemática do ensaio de mobilidade e no painel inferior o vídeo. Para começar, bate-se com o tubo e as moscas caem no fundo do tubo. As moscas *white* começam imediatamente a subir até ao topo. No entanto, as moscas *Mob3^{sac}* conseguem alcançar o topo apesar de tentarem. O mutante mostra dificuldades de mobilidade, indicando alguma desorientação

3.6.4 Mutantes de Mob3 apresentam defeitos mitóticos

Para caracterizar se existiria algum fenótipo mitótico em mutantes w Mob3^{sac} realizou-se ensaios de imunofluorescência indireta em cérebros de larvas do 3ºestadio. Analisou-se 4 neuroblastos *white* e 4 neuroblastos mutantes nulos w Mob3^{sac} de larvas de 3ºestadio, não se procedeu à quantificação de defeitos. Para que fosse possível a visualização do aparelho mitótico fez-se a marcação dos centrossomas com γ -tubulina, os microtúbulos com α -tubulina e os cromossomas em mitose com fosfo-histona H3 (PH3).

Os neuroblastos de larvas *white* em metafase (figura 3.17-A1-4) apresentam os centrossomas em ambos os polos bem como os microtúbulos de fuso (figura 3.17 A2/3- γ -tubulina/ α -tubulina) com os cromossomas alinhados em placa metafásica (figura 3.17 A4 - PH3).

Os neuroblastos de larvas de mutantes nulos w Mob3^{sac} apresentam figuras mitóticas em metafase que parecem ter um cromossoma desalinhado na placa metafásica (figura 3.17-C,D). Observou-se também fusos mitóticos que parecem estar ondulados com a ausência dos centrossomas nos polos do fuso parecendo que os microtúbulos estão desfocados (Figura 3.17 -E1-4). Em algumas figuras mitóticas observou-se fusos em que os microtúbulos não parecem estar bem formados com desfocagem num dos polos mesmo na presença de ambos os centrossomas (Figura 3.17 -F1-4).

Apesar de terem sido optimizadas as condições para a realização das imunofluorescências obteve-se muito ruído de fundo nas amostras.

A perda de dMob3 poderá também causar alguns defeitos ao nível na formação do fuso mitótico em neuroblastos do terceiro estadio larvar, contudo para melhor perceber era essencial fazer a quantificação dos defeitos mitóticos, para se perceber se poderá existir alguma correlação com o desenvolvimento de pequenas massas tumorais.

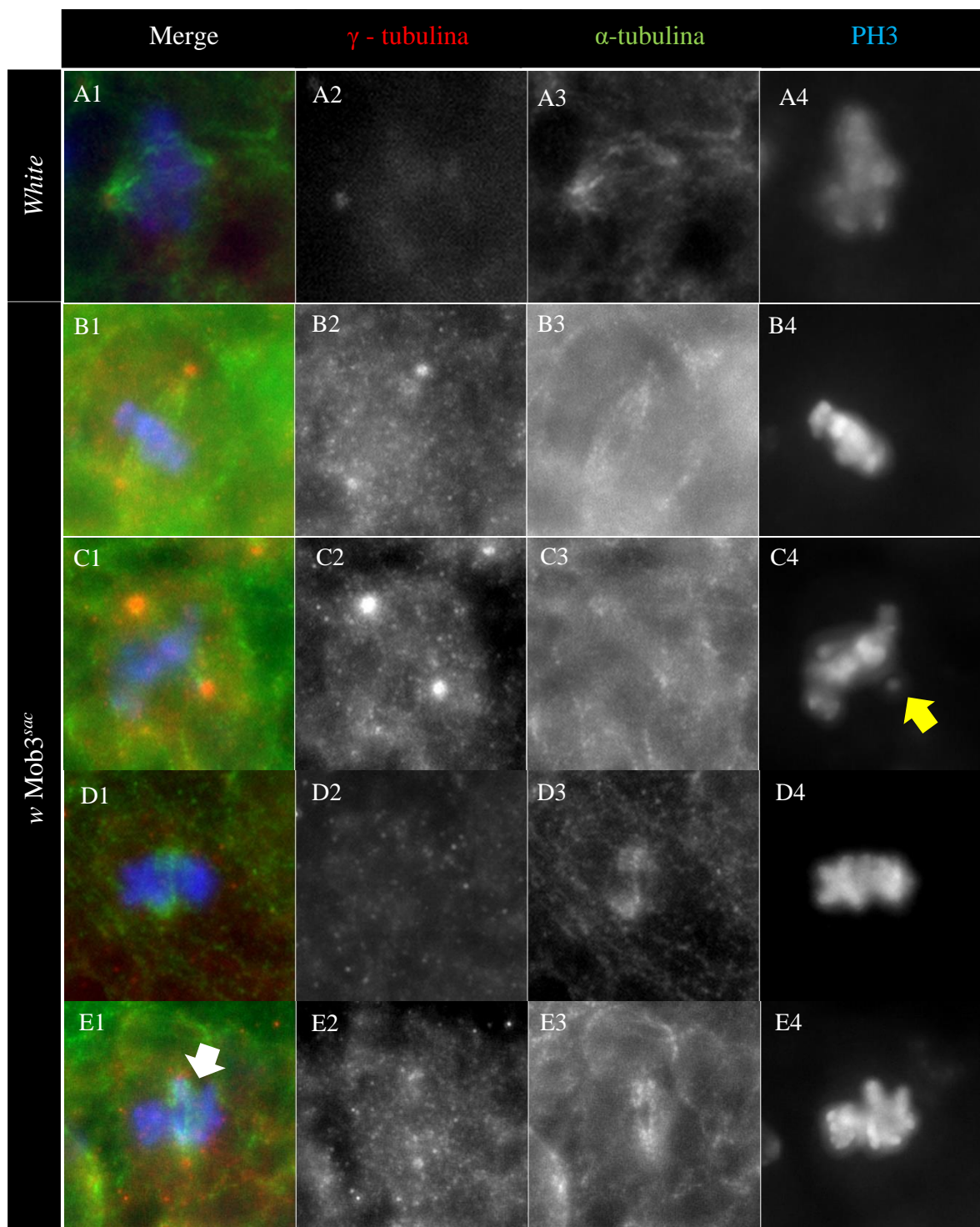


Figura 3.17-Mutantes *w Mob3^{sac}* apresentam defeitos mitóticos. (A1-4) Metafase de neuroblastos *white*.(B1-4) Metafase de mutante nulo Mob3sac aparentemente normal.(C1-4) Metafase mutante nulo com cromossoma desalinhado da placa metafásica (setas amarelas). (D1-4) Fusão mitótico com forma ondulada e ausência dos centrosomas nos polos do fusão. (E1-4) Fusão com estrutura dos microtúbulos malformado com desfocagem num dos polos (seta branca).

3.6.5 Mutantes Mob3 apresentam uma diminuição do tamanho dos cérebros de larvas de 3ºestadio

Ao realizar os ensaios de imunofluorescência, à semelhança dos cérebros de mutantes nulos $Mob1^{svc}/Mob1^{svc}$, os cérebros do mutante nulo $w Mob3^{sac}$ pareciam mais pequenos que os cérebros *white*. Medi os lóbulos óticos de 10 cérebros de larvas *white*, mutante nulo $w Mob3^{sac}$ e os revertentes $Mob3^{sac}; GFP-Mob3$ do 3ºestadio, usando o software *Image J* versão 1.52p.

Observei que os mutantes nulos $w Mob3^{sac}$ apresentam uma diminuição de cerca de 20% da área dos lóbulos óticos comparado com os cérebros das larvas *white*. As moscas do qual se inseriu novamente *Mob3*, ou seja o revertente $Mob3^{sac}; GFP-Mob3$ recuperaram cerca de 10% da área dos lóbulos óticos comparando com os mutantes nulos $w Mob3^{sac}$. Contudo não recuperaram totalmente a área comparando com os cérebros *white* do 3ºestadio larvar (figura 3.18). Esta diminuição dos cérebros dos mutantes $dMob3$ poderá dever-se ao facto de existir mais morte celular ou menos mitoses por área, contudo seriam necessárias a realização de mais experiência.

A

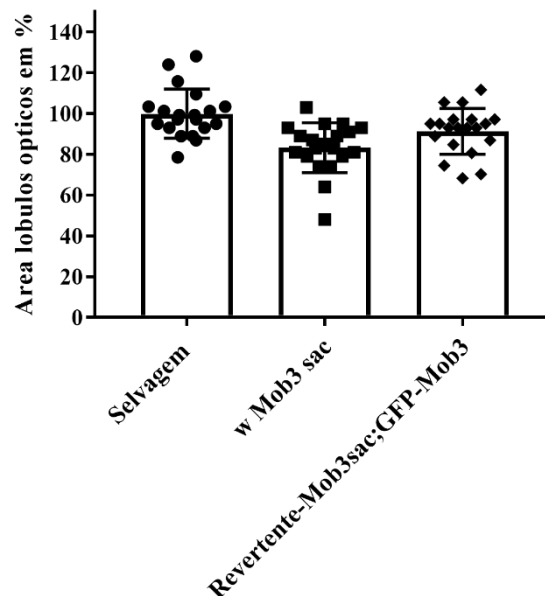


Figura 3.18-Diminuição do tamanho dos cérebros larvas 3ºestadio de mutantes Mob3.(A)Área dos lóbulos óticos em percentagem de 10 cérebros de larvas do 3ºestadio *white*, mutantes nulos ($w Mob3^{sac}$) e revertente ($Mob3^{sac}; GFP-Mob3$),do qual observou-se uma diminuição aproximadamente de 20%, o revertente recuperou cerca de 10% do tamanho comparado com o mutante nulo mas não chega a alcançar o mesmo tamanho dos cérebros *white*.

4 Discussão e Conclusão

Este trabalho teve como objetivo determinar a função dos genes Mob1 e Mob3 de *Drosophila melanogaster* no ciclo celular através da análise do fenótipo de mutantes. Estes dois genes pertencem à família dos genes Mob que se encontra evolutivamente conservada desde levedura até aos humanos. Os membros desta família de genes têm vindo a ser implicadas em vias de sinalização importantes para a progressão do ciclo celular, saída de mitose, morfogénese, polaridade celular e apoptose (Hergovich 2011).

Mob1

Em *Drosophila melanogaster* dMob1 é essencial para a viabilidade, sendo que indivíduos mutantes nulos de dMob1 (Mob1^{svc}/ Mob1^{svc}) morrem na fase larvar (Levente e Tavares 2018 não publicado). Uma das questões que se colocou foi: porque morre este mutante na fase larvar? Uma das possíveis respostas poderá ser que Mob1 tem um papel no sistema nervoso. Foi descrito que dMob1 está envolvido na regulação do transporte axonal, na organização dos microtúbulos (Schulte et al. 2010), e na regulação dos estados de quiescência/reativação das células estaminais neurais através de um mecanismo de integração de sinais de *Hippo* e InR/PI3K/Akt (Gil-Ranedo et al. 2019). A proteína dMob1 é também um componente do complexo multiproteico STRIPAK, que funciona como antagonista via *Hippo*. Estas proteínas dMob1 e Cka (*striatin*) são ambas necessários para a associação física de mts (PP2Ac) a *Hippo* para que a via seja inibida (Ribeiro et al. 2010). Será que Mob1 poderá também estar envolvido em mitose? As células S2 depletadas de Mob1 em *Drosophila melanogaster* (dMob1) apresentaram inicialmente um fuso monopolar com a presença de apenas um centrossoma no início de mitose e também observaram desfocagem dos fusos bipolares e monoploares ao longo do tempo, do qual as fibras K se dissociam do polo (Trammell et al. 2008).

Dados preliminares obtidos no laboratório do professor Álvaro Tavares, observaram células HeLa com níveis diminuídos de hMob1 falham o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica e que a γ -tubulina se encontrava dispersa nos polos do fuso (Figura1.10). Para além disso observaram que a proteína hMob1 localiza-se nos centrossomas durante a mitose (Figura1.11) (Florindo e Tavares-resultados não publicados). Outros membros da família dos Mob têm um papel na mitose e a sua ausência causa defeitos mitóticos (Florindo 2004; Gundogdu and Hergovich 2019; Lai et al. 2005; Schulte et al. 2010; Tavares et al. 2012), como

tal colocou-se a hipótese de os mutantes nulos do gene Mob1 em *Drosophila melanogaster* (dMob1) morrem devido a defeitos mitóticos.

Para responder à questão colocada realizei imunofluorescências indiretas em amostras fixas de embriões sincícios de mutantes Mob1^{svc}/CyO *tb* do qual observei figuras mitóticas com possíveis defeitos na formação do fuso mitótico. Contudo os defeitos observados podem não estar diretamente relacionados com a mutação. Uma vez que os embriões recolhidos poderão ser tanto mutantes homozigóticos de Mob1 como mutantes balanceados, mutantes que têm dois alelos balanceadores terão múltiplos defeitos e não sobreviveriam. Uma forma através da qual se poderiam distinguir os embriões mutantes homozigóticos dos balanceados seria colocar um *tag*-GFP, por exemplo em embriões mutantes balanceados. O embrião tem inicialmente todos os componentes da maquinaria necessária para se dividir inicialmente porque foram colocados pela mãe no ovo. Só a partir do ciclo 15 é que a expressão dos genes começa a ser controlada pelo embrião. Os defeitos mitóticos observados em embriões mutantes de Mob1 foram por volta do ciclo 10, daí a necessidade de analisar um tecido somático e perceber se também existiam defeitos mitóticos.

De forma a perceber se também existiam defeitos mitóticos em tecidos somáticos realizei imunofluorescências indiretas em cérebros de terceiro estadio larvar de mutantes homozigóticos de Mob1 (Mob1^{svc}/Mob1^{svc}), em que observei possíveis defeitos durante a metafase que sugerem problemas na formação do fuso, na focagem dos microtúbulos nos polos do fuso e durante a anafase sugerem problemas no fuso bem como na iniciação da constrição para prosseguir para telófase (figuras 3.9 e 3.10). Trammell et al. 2008 realizaram ensaios realizados em cultura de células S2 em que células depletadas de dMob1 apresentaram desfocagem dos microtúbulos nos polos. Em *Drosophila* a proteína dMob1 é também necessária para o transporte axonal, desenvolvimento sináptico e para a regulação da organização dos microtúbulos em neurónios (artigo Schedule 2010). A proteína dMob1 associa-se à cinase NDPK e foi estabelecido que NDPK tem um papel na endocitose e na dinâmica dos microtúbulos, uma vez que faz a síntese de GTP a partir de GDP que é necessário para tubulação dos microtúbulos (Zala et al. 2017). Está ainda descrito que a dMob1 se associa à fosfatase PP2A (Goudreault et al. 2009). A fosfatase PP2A tem função mitótica na regulação do estado de fosforilação de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). A fosfatase PP2A e dMob1 são componentes do complexo STRIPAK, mas no entanto este complexo ainda não está descrito como tendo uma função mitótica (Sontag et al. 2012). Com base nos resultados obtidos e com o descrito na literatura sugerimos que a proteína dMob1 poderá estar envolvida

na dinâmica dos microtúbulos uma vez que a maioria das suas funções parece estar afetar a disposição espacial dos microtúbulos durante a mitose e também se encontra em complexos com proteínas que regulam a dinâmica dos microtúbulos.

Para além disso observei no decorrer do trabalho que cérebros do terceiro estadio larvar de mutantes homozigóticos de dMob1 apresentaram uma diminuição de cerca de 20% da área dos lóbulos óticos comparando com cérebros larvares *white*. Esta diminuição poderá estar relacionada com os defeitos mitóticos ou pela ocorrência de menos mitoses ou por existir mais morte celular. Seriam necessários mais estudos para perceber a relação do tamanho dos cérebros do terceiro estadio larvar com o papel de dMob1 em mitose.

Mob3

O mutante nulo do gene Mob3 em *Drosophila melanogaster* (Mob3^{sac}) foi criado por Levente e Tavares (2018 não publicado), em que observaram que estes indivíduos são viáveis e férteis. O desenvolvimento a diferentes temperaturas 18°C, 25°C e 29°C parece afetar a sua capacidade de eclosão da pupa, viabilidade e esterilidade. O desenvolvimento das moscas a diferentes temperaturas acelera a divisão celular. A 18° C o desenvolvimento cerca de 18-20 dias, a 25° o desenvolvimento é de 10-15 dias e a 29°C o desenvolvimento é de cerca de 5-8 dias. Levente observou que indivíduos mutantes de Mob3 a 29° são semi-letais e estéreis. Cerca de 40% dos indivíduos morre na pupa ou durante a eclosão. Ao repetir estes ensaios a 29°C verifiquei que apenas 13% das moscas morria na pupa ou durante a eclosão. Posteriormente foi observado que ocorreu um erro técnico durante o procedimento a estufa utilizada encontrava-se uma temperatura interior de 28°C e não de 29°C como apresentado no mostrador do aparelho. Como tal, um grau de diferença parece causar stress nas moscas e ser suficiente para causar letalidade mas não tão significativa como a 29°C.

Os indivíduos mutantes de dMob3 a 25°C cerca de 15% falham a eclosão da pupa e os indivíduos que eclodem desenvolvem manchas necróticas escuras em várias regiões do corpo, maioritariamente nas patas na zona dos ligamentos e pequenas massas acinzentadas. Um fenótipo semelhante anteriormente observado por (C. Green et al. 2000; Clare Green et al. 2003) em mutantes nulos do gene *nec* em *Drosophila melanogaster*. Mutantes de *nec*, têm deleção de uma família de inibidores de proteases serinas, as serpinas, que controlam a coagulação e inflamação em células humanas. Estes mutantes são fracos, em que cerca de 10% falham a

eclosão da pupa e indivíduos adultos apresentavam uma distribuição irregular de manchas melanocíticas com disposição variável no corpo e nas junções das patas. As manchas melanocíticas, por microscopia eletrônica, correspondiam a células epiteliais que se encontram em necrose. Os autores sugeriram que as manchas melanocíticas poderão ser uma reação secundária em resposta a danos celulares causadas pela ativação de distintas cascatas de proteases quando *nec* se encontra ausente.

No decorrer do trabalho observei que indivíduos mutantes de dMob3 com necrose ou pequenas massas tumorais apresentam uma camada esbranquiçada sobre o corpo que se assemelha visualmente a fungos quando se desenvolve sobre a mosca. Em *Drosophila* a resposta imune é mediada pela via *Hippo* e pela via *Toll-like*, está descrito que ausência da função de *hippo* torna as moscas mais vulneráveis a infecções por bactérias gram-positivas e fungos aumentando a sua letalidade. A ativação da cascata sinalização *Toll-Myd88-Pelle* leva à fosforilação e degradação de *Cka*, uma das subunidades do complexo inibitório de *Hippo* (STRIPAK), permitindo que *Hippo* impeça a atividade de *Yorkie* e que sejam induzidos efeitos antimicrobianos (B. Liu et al. 2016). Têm vindo a ser descrito também que MST1 poderá ter um papel na imunidade, dado que tanto ratinho como humanos com perda de função de MST1 (corresponde a *Hippo* em *Drosophila*) apresentam mais infecção bacterianas e virais bem como múltiplos defeitos no sistema imune ao nível dos linfócitos B e T (Hong et al. 2018). Foi observado que todas as isoformas de hMob3 interagem com MST1 e que esta interação é induzida sobre condições de apoptose e elevada densidade celular. Para além disso em linhas celulares de glioblastoma hMob3 regula o processo de clivagem MST1 que potencia a atividade apoptótica da cinase (Tang et al. 2014). Está ainda descrito que o gene *nec* também controla a expressão de péptidos antifúngicos através da via *Toll-like* (C. Green et al. 2000; Clare Green et al. 2003). Os mutantes nulos de dMob3 poderão ter o sistema imune mais débil do qual a proteína Mob3 poderá estar envolvido num mecanismo que promove a imunidade, uma vez que o papel de MST1 poderá ter um potencial papel na imunidade e o facto destas proteínas hMob3-MST1 interagirem.

Os indivíduos mutantes nulos dMob3 que apresentavam manchas melanocíticas escuras ou tumores possuíam uma desorientação pronunciada. Também observei que os cérebros das larvas de mutantes dMob3 apresentam lóbulos óticos mais pequenos e defeitos mitóticos ao nível da formação do fuso. Ainda não é clara a relação entre a desorientação, o tamanho dos cérebros larvares e os defeitos mitóticos.

Com base nos meus resultados, a ausência de Mob3 parece potencializar o aparecimento de massas semelhantes a tumores, o que poderá pensar-se que o gene Mob3 em *Drosophila* poderá funcionar como um gene supressor de tumores. Contrariamente ao que foi observado em estudos *in vivo* em *xenograph* que referem que a presença de Mob3 contribui para a proliferação celular, uma vez que a depleção de Mob3 suprime o crescimento tumoral e foi por isso sugerido ter um papel de oncoproteína (Tang et al., 2014).

Em suma parece que a proteína Mob1 em *Drosophila melanogaster* poderá estar envolvida na dinâmica de microtúbulos durante a mitose. O gene Mob3 em *Drosophila melanogaster* sugere ser um novo gene supressor de tumores que poderá estar interligado tanto com a via de sinalização *Hippo* como com a via *Toll* promovendo a resposta imune. Contudo são necessários mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos de ação das proteínas dMob1 e dMob3.

5 Perspetivas futuras

No futuro, seria interessante proceder a localização das proteínas dMob1 e dMob3 em neuroblastos larvares do 3ºestadio para ter uma ideia mais precisa das suas funções durante a mitose. A microscopia em tempo real das moscas Mob1^{svc}; GFP-Mob1 e Mob3^{sac}; GFP-Mob3 permitiriam elucidar-nos sobre a dinâmica destas proteínas durante a mitose, bem como perceber o potencial papel de dMob1 na dinâmica dos microtúbulos e de dMob3 dado a sua ausência causar problemas na formação do fuso mitótico. Também deveria quantificar os defeitos observados em neuroblastos do terceiro estadio larvar para entender se estes defeitos por si só são suficientes para causar a letalidade larvar dos mutantes nulos de dMob1.

Nos indivíduos nulos dMob3 com necrose e pequenos tumores seria interessante fazer análises histológicas dos tecidos afetadas de forma a perceber a organização do tecido. De forma a perceber a desorientação observada nestes indivíduos dever-se-ia quantificar os defeitos mitóticas observados nos neuroblastos larvares do terceiro estadio bem como fazer uma marcação para perceber os níveis de apoptose de forma a verificar se a desorientação poderá estar ou não relacionada com o aumento da morte celular em neuroblastos larvares. Uma vez que os mutantes nulos de Mob3 aparentam ter o sistema imune debilitado devem-se realizar ensaios para avaliar se estas moscas estão imunossuprimidas infetando-as com fungos ou bactérias gram-positivas, uma vez que foi demonstrado levar à ativação da via *Toll* e *Hippo* (B. Liu et al. 2016), permitindo assim perceber qual o papel de dMob3 em vias relacionadas com a imunidade e na via de proliferação celular.

Os membros da família das proteínas Mobs estão envolvidos em vias de sinalização importantes para a saída de mitose, progressão do ciclo celular, morfogénese, polaridade celular e apoptose (Hergovich 2011). A melhor compreensão destas vias bem como a identificação dos possíveis parceiros moleculares de dMob1 e dMob3 permitirá entender a sua função durante a mitose tanto em moscas como em humanos dado a elevada homologia existente nesta família de proteínas.

6 Bibliografía

- Akhmanova, Anna, and Michel O. Steinmetz. 2015. "Control of Microtubule Organization and Dynamics: Two Ends in the Limelight." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(12): 711–26. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4084>.
- Alberts, Bruce et al. 2015. 1 Garland Science *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Antonin, Wolfram, and Heinz Neumann. 2016. "Chromosome Condensation and Decondensation during Mitosis." *Current Opinion in Cell Biology* 40: 15–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.013>.
- Azevedo, Carlos. 2005. *Biologia Celular e Molecular*. 4th ed. Lidel.
- Bae, Sung Jun, and Xuelian Luo. 2018. "Activation Mechanisms of the Hippo Kinase Signaling Cascade." *Bioscience Reports* 38(4): 1–14.
- Baillat, G. et al. 2001. "Molecular Cloning and Characterization of Phocein, a Protein Found from the Golgi Complex to Dendritic Spines." *Molecular Biology of the Cell* 12(3): 663–73.
- Baillat, Gilbert, Stéphane Gaillard, Francis Castet, and Ariane Monneron. 2002. "Interactions of Phocein with Nucleoside-Diphosphate Kinase, Eps15, and Dynamin I." *Journal of Biological Chemistry* 277(21): 18961–66.
- Bailly, Yannick J.R., and Francis Castets. 2007. "Phocein: A Potential Actor in Vesicular Trafficking at Purkinje Cell Dendritic Spines." *Cerebellum* 6(4): 344–52.
- Bettencourt-Dias, Mónica, and David M. Glover. 2007. "Centrosome Biogenesis and Function: Centrosomics Brings New Understanding." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(6): 451–63.
- Bichsel, Samuel J., Rastislav Tamaskovic, Mario R. Stegert, and Brian A. Hemmings. 2004. "Mechanism of Activation of NDR (Nuclear Dbf2-Related) Protein Kinase by the HMOB1 Protein." *Journal of Biological Chemistry* 279(34): 35228–35.
- Brooks R. and Fantes P. 1993. *The Cell Cycle: A Practical Approach*. Oxford University Press. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90089-2).
- Cardozo, Timothy, and Michele Pagano. 2004. "The SCF Ubiquitin Ligase: Insights into a Molecular Machine." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(9): 739–51.
- Castro, Anna et al. 2005. "The Anaphase-Promoting Complex: A Key Factor in the Regulation of Cell Cycle." *Oncogene* 24(3): 314–25.
- Chen, Min et al. 2018. 293 *Journal of Biological Chemistry* *The MST4-MOB4 Complex Disrupts the MST1-MOB1 Complex in the Hippo-YAP Pathway and Plays a pro-Oncogenic Role in Pancreatic Cancer*.
- Colman-Lerner, Alejandro, Tina E. Chin, and Roger Brent. 2001. "Yeast Cbk1 and Mob2 Activate Daughter-Specific Genetic Programs to Induce Asymmetric Cell Fates." *Cell*

107(6): 739–50.

Coutts, Amanda, and Louise Weston. 2016. “Cell Cycle Oscillators. Methods and Protocols.” 1342: 352.

Couzens, Amber L. et al. 2013. “Protein Interaction Network of the Mammalian Hippo Pathway Reveals Mechanisms of Kinase-Phosphatase Interactions.” *Science Signaling* 6(302).

Dahmann, Christian. 2008. *Drosophila-Methods and Protocols*. Humana Press.

Daire, Vanessa, and Christian Poüs. 2011. “Kinesins and Protein Kinases: Key Players in the Regulation of Microtubule Dynamics and Organization.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510(2): 83–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.02.012>.

Florindo, Claudia. 2004. “Estudo Dos Genes Humanos Tipo Mob : HsMob4A e HsMob4B.”

Foster, Irene. 2008. “Cancer: A Cell Cycle Defect.” *Radiography* 14(2): 144–49.

Garrett, Michelle D. 2001. “Cell Cycle Control and Cancer.” *Current Science* 81(5): 515–22.

Gil-Ranedo, Jon et al. 2019. “STRIPAK Members Orchestrate Hippo and Insulin Receptor Signaling to Promote Neural Stem Cell Reactivation.” *Cell Reports* 27(10): 2921-2933.e5.

Gomez, Valenti et al. 2015. “Regulation of DNA Damage Responses and Cell Cycle Progression by HMOB2.” *Cellular Signalling* 27(2): 326–39.

Goudreault, Marilyn et al. 2009. “A PP2A Phosphatase High Density Interaction Network Identifies a Novel Striatin-Interacting Phosphatase and Kinase Complex Linked to the Cerebral Cavernous Malformation 3 (CCM3) Protein.” *Molecular and Cellular Proteomics* 8(1): 157–71.

Gratz, Scott Rubinstein, Dustin Harrison, Melissa Wildonger, Jill O’Connor-Giles, Kate. 2016. “Crispr-Cas9 Genome Editing.” *Current Biology* (May): 1–27.

Green, C. et al. 2000. “The Necrotic Gene in *Drosophila* Corresponds to One of a Cluster of Three Serpin Transcripts Mapping at 43A1.2.” *Genetics* 156(3): 1117–27.

Green, Clare et al. 2003. “*Drosophila* Necrotic Mutations Mirror Disease-Associated Variants of Human Serpins.” *Development* 130(7): 1473–78.

Gundogdu, and Hergovich. 2019. “MOB (Mps One Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer.” *Cells* 8(6): 569.

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harvey, Kieran F., Xiaomeng Zhang, and David M. Thomas. 2013. “The Hippo Pathway and Human Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 13(4): 246–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3458>.

He, Ying et al. 2005. “*Drosophila* Mob Family Proteins Interact with the Related Tricornered (Trc) and Warts (Wts) Kinases.” *Molecular Biology of the Cell* 16(September): 4341–49.

- Hergovich, Alexander et al. 2009. "The MST1 and HMOB1 Tumor Suppressors Control Human Centrosome Duplication by Regulating NDR Kinase Phosphorylation." *Current Biology* 19(20): 1692–1702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.020>.
- Hergovich, Alexander 2011. "MOB Control: Reviewing a Conserved Family of Kinase Regulators." *Cellular Signalling* 23(9): 1433–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.007>.
- Hergovich, Alexander, Mario R. Stegert, Debora Schmitz, and Brian A. Hemmings. 2006. "NDR Kinases Regulate Essential Cell Processes from Yeast to Humans." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(4): 253–64.
- Hirano, Tatsuya. 2015. "Chromosome Dynamics during Mitosis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(6): 1–15.
- Hong, Lixin et al. 2018. "Role of Hippo Signaling in Regulating Immunity." *Cellular and Molecular Immunology* 15(12): 1003–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0007-1>.
- Hou, Ming Chin, David J. Wiley, Fulvia Verde, and Dannel McCollum. 2003. "Mob2p Interacts with the Protein Kinase Orb6p to Promote Coordination of Cell Polarity with Cell Cycle Progression." *Journal of Cell Science* 116(1): 125–35.
- Huang, Jianbin et al. 2005. "The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP." *Cell* 122(3): 421–34.
- Hwang, Juyeon, and David C. Pallas. 2014. "STRIPAK Complexes: Structure, Biological Function, and Involvement in Human Diseases." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 47(1): 118–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.021>.
- Kobayashi, Tetsuo, and Brian D. Dynlacht. 2011. "Regulating the Transition from Centriole to Basal Body." *Journal of Cell Biology* 193(3): 435–44.
- Koh, Tong Wey, Patrik Verstreken, and Hugo J. Bellen. 2004. "Dap160/Intersectin Acts as a Stabilizing Scaffold Required for Synaptic Development and Vesicle Endocytosis." *Neuron* 43(2): 193–205.
- Kohler, R. S. et al. 2010. "Differential NDR/LATS Interactions with the Human MOB Family Reveal a Negative Role for Human MOB2 in the Regulation of Human NDR Kinases." *Molecular and Cellular Biology* 30(18): 4507–20.
- Komarnitsky, Svetlana I. et al. 1998. "DBF2 Protein Kinase Binds to and Acts through the Cell Cycle-Regulated MOB1 Protein." *Molecular and Cellular Biology* 18(4): 2100–2107.
- Koontz, Laura M. et al. 2013. "The Hippo Effector Yorkie Controls Normal Tissue Growth by Antagonizing Scalloped-Mediated Default Repression." *Developmental Cell* 25(4): 388–401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.04.021>.
- Lai, Zhi Chun et al. 2005. "Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Mob as Tumor Suppressor, Mats." *Cell* 120(5): 675–85.
- Li, Yan, Olena Barbash, and J. Alan Diehl. 2014a. 2 The Molecular Basis of Cancer: Fourth

- Edition *Regulation of the Cell Cycle*. Fourth Edi. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00011-1>.
- Liu, Bo et al. 2016. “Toll Receptor-Mediated Hippo Signaling Controls Innate Immunity in *Drosophila*.” *Cell* 164(3): 406–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.029>.
- Liu, Xinran et al. 2019. “Targeting Mitosis Exit: A Brake for Cancer Cell Proliferation.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1871(1): 179–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.12.007>.
- Luca, Francis C., and Mark Winey. 1998. “Mob1, an Essential Yeast Gene Required for Completion of Mitosis and Maintenance of Ploidy.” *Molecular Biology of the Cell* 9(1): 29–46.
- Maiato, Hélder, Paula Sampaio, and Claudio E. Sunkel. 2004. “Microtubule-Associated Proteins and Their Essential Roles during Mitosis.” *International Review of Cytology* 241(SPEC.ISS.): 53–153.
- Malumbres, Marcos, and Mariano Barbacid. 2009. “Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm.” *Nature Reviews Cancer* 9(3): 153–66.
- Meng, Zhipeng et al. 2015. “MAP4K Family Kinases Act in Parallel to MST1/2 to Activate LATS1/2 in the Hippo Pathway.” *Nature Communications* 6: 1–13. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9357>.
- Mirzoyan, Zhasmine et al. 2019. “*Drosophila Melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer.” *Frontiers in Genetics* 10(March): 1–16.
- Moreno, Carlos S., William S. Lane, and David C. Pallas. 2001. “A Mammalian Homolog of Yeast MOB1 Is Both a Member and a Putative Substrate of Striatin Family-Protein Phosphatase 2A Complexes.” *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 24253–60.
- O’Neill, Adam C. et al. 2018. “Mob2 Insufficiency Disrupts Neuronal Migration in the Developing Cortex.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12(March): 1–13.
- Pan, Duoia. 2010. “The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer.” *Developmental Cell* 19(4): 491–505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>.
- Pandey, Udai Bhan, and Charles D Nichols. 2011. “Human Disease Models In.” *Pharmacological Reviews* 63(2): 411–36.
- Praskova, Maria, Fan Xia, and Joseph Avruch. 2008. “MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation.” *Current Biology* 18(5): 311–21.
- Ribeiro, Paulo S. et al. 2010. “Combined Functional Genomic and Proteomic Approaches Identify a PP2A Complex as a Negative Regulator of Hippo Signaling.” *Molecular Cell* 39(4): 521–34.
- Roostalu, Johanna, and Thomas Surrey. 2017. “Microtubule Nucleation: Beyond the Template.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(11): 702–10. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.75>.

- Roote, John, and Andreas Prokop. 2017. "A Rough Guide to Drosophila Mating Schemes."
- Sanchez, Ariana D., and Jessica L. Feldman. 2017. "Microtubule-Organizing Centers: From the Centrosome to Non-Centrosomal Sites." *Current Opinion in Cell Biology* 44: 93–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.09.003>.
- Santo, Loredana, Ka Tat Siu, and Noopur Raje. 2015. "Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers." *Seminars in Oncology* 42(6): 788–800. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.024>.
- Schatten, Heide. 2008. "The Mammalian Centrosome and Its Functional Significance." *Histochemistry and Cell Biology* 129(6): 667–86.
- Schulte, Joost et al. 2010. "DMob4/Phocein Regulates Synapse Formation, Axonal Transport, and Microtubule Organization." *Journal of Neuroscience* 30(15): 5189–5203.
- Shi, Z., S. Jiao, and Z. Zhou. 2016. "STRIPAK Complexes in Cell Signaling and Cancer." *Oncogene* 35(35): 4549–57. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.9>.
- Sontag, Jean Marie et al. 2012. "The Protein Phosphatase PP2A/B α Binds to the Microtubule-Associated Proteins Tau and MAP2 at a Motif Also Recognized by the Kinase Fyn: Implications for Tauopathies." *Journal of Biological Chemistry* 287(18): 14984–93.
- Sullivan, William, Michael Ashburner, and Scott Hawley. 2000. *Drosophila Protocols*. CSHL press.
- Tang, Fengyuan et al. 2014a. "HMOB3 Modulates MST1 Apoptotic Signaling and Supports Tumor Growth in Glioblastoma Multiforme." *Cancer Research* 74(14): 3779–89.
- Tavares, Alexandra et al. 2012. "Mob1: Defining Cell Polarity for Proper Cell Division." *Journal of Cell Science* 125(2): 516–27.
- Trammell, Matthew A., Nicole M. Mahoney, David A. Agard, and Ronald D. Vale. 2008. "Mob4 Plays a Role in Spindle Focusing in Drosophila S2 Cells." *Journal of Cell Science* 121(8): 1284–92.
- Tyson, John J., Attila Csikasz-Nagy, and Bela Novak. 2002. "The Dynamics of Cell Cycle Regulation." *BioEssays* 24(12): 1095–1109.
- Weinberg, Robert A. 2014. 58 Garland Science *The Biology of Cancer*. Cambridge: Cambridge University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403>.
- Weiss, Eric L. et al. 2002. "The Saccharomyces Cerevisiae Mob2p-Cbk1p Kinase Complex Promotes Polarized Growth and Acts with the Mitotic Exit Network to Facilitate Daughter Cell-Specific Localization of Ace2p Transcription Factor." *Journal of Cell Biology* 158(5): 885–900.
- Xu, Jiang et al. 2015. "A Toolkit of CRISPR-Based Genome Editing Systems in Drosophila." *Journal of Genetics and Genomics* 42(4): 141–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2015.02.007>.
- Yu, Fa Xing, Bin Zhao, and Kun Liang Guan. 2015. "Hippo Pathway in Organ Size Control,

Tissue Homeostasis, and Cancer.” *Cell* 163(4): 811–28.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>.

Zala, Diana et al. 2017. “The Advantage of Channeling Nucleotides for Very Processive Functions.” *F1000Research* 6.

Zheng, Yonggang et al. 2017. “Homeostatic Control of Hpo/MST Kinase Activity through Autophosphorylation-Dependent Recruitment of the STRIPAK PP2A Phosphatase Complex.” *Cell Reports* 21(12): 3612–23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.076>.