

II. Materiais e Métodos

2.1. Linhas de *Drosophila* utilizadas

No decorrer deste trabalho foram utilizadas várias linhas de *Drosophila* existentes no laboratório. Como controlo utilizou-se, para todas as experiências, a linha Oregon R, para os ensaios de imunofluorescência utilizaram-se as linhas mutantes If/CTG; Mob2⁵/TM6B e Mob2⁵/TM6C e para a microscopia em tempo real foi utilizada a linha β -tubulina-GFP/Cyo; Mob2⁵/TM6B.

No nosso laboratório existem vários alelos obtidos da colecção Blomington (mob2¹, mob2², mob2³, mob2⁴, mob2⁵ e mob2⁶), que correspondem a inserções de elementos P na região genómica de Mob2 (figura 2.1) (Samora, 2007). Estes alelos foram previamente caracterizados por Samora (2007), que mostrou a maioria dos alelos não apresenta fenótipo a nível da viabilidade e, dos que eram 100% letais no terceiro estadio larvar ou no estadio de pupa, apenas a letalidade do alelo mob2⁵ era devida uma mutação na região genómica. Assim sendo, este foi o alelo utilizado para todas as experiências referidas neste trabalho. O alelo mob2⁵, tal como se pode verificar na figura 2.1, corresponde à inserção de um elemento P na região genómica do transcrito Mob2-A, que origina uma proteína com um peso molecular previsto de aproximadamente 78 kDa.

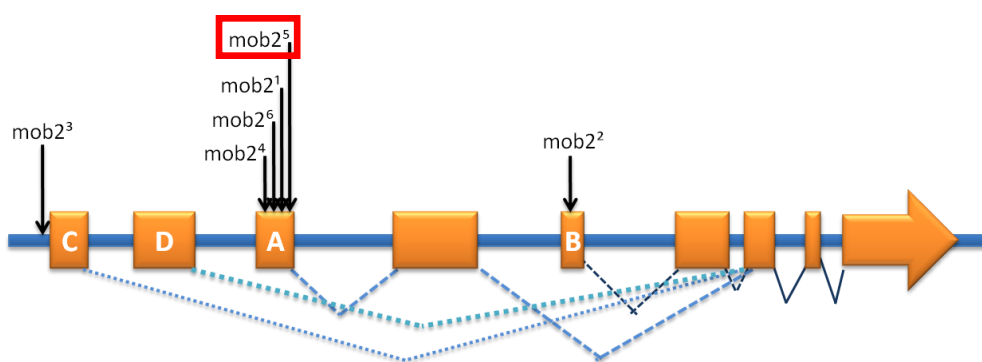


Figura 2.1 – Representação esquemática dos quatro transcritos de DMOB2 e dos seis alelos obtidos por inserção de elementos P. A laranja estão representados os exões e a azul os intrões. As setas pretas representam os elementos P e, o quadrado vermelho evidencia o alelo usado neste trabalho.

2.2. Anticorpos

Nos vários ensaios de imunofluorescência e Western Blot foram utilizados vários anticorpos primários e secundários. As informações relativas a todos os anticorpos utilizados estão apresentadas nas tabelas 1 e 2. As diluições utilizadas são referidas aquando da descrição das técnicas utilizadas.

Os soros policlonais ACR11A, ACR11B, ACR36 e ACR37 foram anteriormente gerados no laboratório. Os soros ACR11A e ACR11B foram gerados contra o péptido SPTSQAPTRTSLFD, e os soros ACR36 e ACR37 foram criados contra os péptidos KARRKERDGDQNSTD e QKTVSDESIFPTKYA.

Tabela 2.1 – Anticorpos primários.

	Anti-	Gerado em	Referência
YL1/2	α -tubulina	Ratazana	Serotec
PH3	Fosfohistona H3	Coelho	Upstate
GTU 88	γ -tubulina	Coelho	Sigma
ACR11A	DMob2	Coelho	
ACR11B	DMob2	Coelho	
ACR36	DMob2	Coelho	
ACR37	DMob2	Coelho	

Tabela 2.2 – Anticorpos Secundários.

Conjugado com	Anti IgG de	Gerado em	Companhia
Alexa 488	Ratazana	Cabra	Molecular Probes
Alexa 594	Coelho	Cabra	Molecular Probes
HRP	Coelho	Cabra	Jackson ImmunoResersh
HRP	Ratinho	Coelho	Jackson ImmunoResersh

2.3. Géis de Proteínas e Western Blot

2.3.1. Preparação da Amostra

Os cérebros de larva no 3º estadio foram dissecados numa solução de 0,7 % de NaCl e homogeneizados em tampão Laemmli 2 vezes concentrado (100mM trisHCL

pH8, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 200 mM β -mercaptoetanol). Por poço foram utilizados 20 cérebros OR homogeneizados em 10 μ l de tampão e o mesmo número de cérebros mutantes Mob2 também homogeneizados em 10 μ l de tampão de Laemmli, tendo a amostra sido previamente fervida durante 5 minutos e centrifugada à 13000 rpm durante o mesmo tempo.

2.3.2. Géis de Proteínas (SDS-PAGE)

Para a separação das proteínas da amostra de acordo com o seu tamanho utilizara-se os géis de proteínas (SDS-PAGE). Inicialmente, preparou-se o gel de separação, com uma percentagem de acrilamida de 10% (**5ml**: 1,9 ml H₂O, 1,7 ml acrilamida 30%, 1,3 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml Persulfato de Amónio 10% e 0,002 ml TEMED) e deixou-se polimerizar durante 30 minutos. De seguida, preparou-se o gel de concentração (**2ml**: 1,4 ml H₂O, 0,33 ml acrilamida 30%, 0,25 ml 0.5 M Tris pH 6.8, 0,02 ml SDS 10%, 0,02 ml Persulfato de Amónio 10% e 0,002 ml TEMED) e deixou-se polimerizar durante 10 minutos. Utilizou-se uma solução de 30% de acrilamida/bis acrilamida (Bio Rad) e TEMED (Sigma). Tal como foi referido no ponto anterior, por poço colocou-se 10 μ l de amostra OR ou 10 μ l de amostra mutante, alternadamente de acordo com o pretendido, e como marcador de pesos moleculares utilizou-se o PageRuler - Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Os géis foram corridos num sistema Mini-PROTEAN III (BioRad), em tampão de corrida 1x (25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Aplicou-se uma corrente eléctrica de 15 mA enquanto as amostras se encontravam no gel de concentração, sendo posteriormente aplicada uma corrente eléctrica de 30 mA, quando as amostras atingiram o gel de separação.

Os géis de proteínas foram corados com azul de Coomassie (0,25% azul brilhante de Coomassie (Bio Rad), 45% Metanol e 10 % de Acido Acético Glacial) durante 4 horas, seguidos de descoloração (40% Metanol, 10% Ácido Acético Glacial), ou transferidos por electroforese para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), para a realização de Western Blot.

2.3.3. Western Blot

A membrana de PVDF foi inicialmente submersa em metanol durante 1 minuto, seguida de água destilada durante 5 minutos e, finalmente foi equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% de Metanol, pH entre 8 e 8,3)

durante um tempo mínimo de 10 minutos. Em simultâneo, incubou-se o gel em tampão de transferência durante 10 minutos. O gel e a membrana foram colocados numa cassette, no meio de três folhas de papel Whatman 3MM, seguidos de duas esponjas. As proteínas foram transferidas durante 1 hora a 200 mA em tampão de transferência. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de TBS (500 mM Tris-HCl, 1500 mM NaCl, pH 7.4), 0,1% Tween20, 10% leite magro em pó, durante 1 hora. Posteriormente, procedeu-se a uma lavagem rápida com TBS, 0,1% Tween20, 1% leite magro em pó e incubação dos anticorpos primários na mesma solução durante 1 hora, à temperatura ambiente. Realizaram-se 3 lavagens de 5 minutos em TBS, 0,1% Tween20, 1% leite magro em pó e incubaram-se os anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 minutos, seguindo-se uma lavagem de 5 minutos em TBS. O sinal foi detectado utilizando uma mistura 1:1 das soluções ECL (solução 1 – 90 mM Tris, 2,27 mM Luminol, 0,36 mM Ácido p-coumárico; solução 2 – 100 mM Tris, 0,002% peróxido de hidrogénio). Utilizou-se filme Hyperfilme ECL (Amersham) para a exposição, de seguida realizou-se a revelação.

Quando necessário, realizou-se o stripping da membrana, de modo a remover os anticorpos primários e secundários ligados às proteínas da membrana e posteriormente se fazer o re-blot com outros anticorpos diferentes. A membrana foi submersa em tampão de stripping (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS) e incubada durante 30 minutos num banho a 60°C. Posteriormente a membrana foi sujeita a três lavagens com água, de modo a retirar quaisquer vestígios de β -mercaptoetanol.

Os anticorpos primários utilizados foram: os anticorpos anti-DMob2, ACR11A (1:100), ACR11B (1:100), ACR36 (1:500) e ACR37 (1:500); e anti γ -tubulina GTU 88 (1:1000). Como anticorpos secundários utilizaram-se os anticorpos anti-IgG de coelho (1:4000) ou anti-IgG de ratinho (1:2000), conjugados com HRP-peroxidase.

2.4. Imunopurificação de anticorpos

2.4.1. Produção de Proteína

Colocaram-se a crescer, durante a noite a 37°C, bactérias previamente transformadas com o plasmídeo pGEX4T (GE Healthcare) contendo o gene DMob2. A partir desta cultura, fez-se uma diluição de 1:100 e incubou-se novamente a 37° com

agitação. Quando a DO da cultura estava ente 0,3 e 0,6, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,1 mM, e incubaram-se novamente as bactérias a 37°C durante 4h. No fim deste tempo, as bactérias foram centrifugadas (10 minutos, 4000g) e lavadas com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). As amostras foram congeladas para análise futura ou foram ressuspensas em tampão Laemmli, fervidas durante 5 minutos, e analisadas num gel de SDS-PAGE, com uma percentagem de acrilamida de 12% (**5ml**: 1,6 ml H₂O, 2,0 ml acrilamida 30%, 1,3 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml Persulfato de Amónio 10% e 0,002 ml TEMED). Como controlo utilizou-se uma cultura crescida nas mesmas condições, mas à qual não se adicionou IPTG e, que por isso, não deveria expressar a proteína de interesse.

2.4.2. Imunopurificação de Anticorpos

As amostras referidas no ponto anterior foram corridas num gel de SDS-PAGE (10% de acrilamida) e transferidas para uma membrana de PVDF, que foi posteriormente corada com Azul de Comassie (0,2% Azul de Comassie, 40% Metanol, 10% Ácido Acético) durante 10 minutos e, depois descoradas (40% Metanol, 10% Ácido Acético) durante 3 minutos. Cortaram-se as bandas correspondentes à proteína de interesse e descorou-se completamente a membrana com Metanol absoluto. Depois de descorados, os pedaços da membrana foram re-equilibrados em tampão de transferência durante 5 minutos e lavados com PBS duas vezes durante 5 minutos. Bloqueou-se a membrana com PBS, 0,1% Tween 20, 10% BSA, 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente, incubou-se com o soro, numa diluição de 1:100, durante 2 horas a 4°C. Findo este tempo, recolheu-se o imunodepletado e realizaram-se duas lavagens de 5 minutos com PBS, seguidas das eluições ácidas. Os anticorpos foram eluidos com glicina 100 mM pH 2,4 durante 2 minutos, tendo sido depois a glicina adicionada a um tubo com Tris 1M pH8. Verificou-se se o pH da mistura se encontrava entre 7 e 8. Este processo foi repetido até serem obtidas três eluições ácidas. As membranas foram depois incubadas durante 5 minutos com Tris 1M pH8 e lavadas durante 5 minutos com PBS. Seguiram-se as eluições básicas. Os anticorpos foram eluidos com trietilamina 100 mM, pH 11,5 durante 2 minutos e a trietilamina foi adicionada a um tubo contendo Tris 1M pH6. Certificou-se novamente que o pH da mistura se encontrava entre 7 e 8 e repetiu-se este procedimento até se obterem três eluições básicas. A membrana foi depois incubada 5 minutos com Tris 1M pH8 e lavada durante o mesmo tempo com

PBS. A membrana foi novamente bloqueada como descrito anteriormente, e todo o procedimento foi repetido, tendo o cuidado de alternar a ordem das eluições, ou seja, realizou-se primeiro a eluição básica e só depois a eluição ácida. As eluições e imunodepletados foram confirmadas em Western Blot.

2.5. Técnicas citológicas

2.5.1. Imunofluorescência

Os cérebros de larvas no 3º estadio foram dissecados em 0,7% NaCl e fixados imediatamente em 3,7% Formaldeído (Aldrich) em PBS (Sigma) durante 20 minutos e lavados em PBS 3 vezes durante 10 minutos. Os cérebros foram depois permeabilizados durante 1 hora em PBS, 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), seguindo-se 1 hora de bloqueio em PBS, 0,3% Triton X-100, 10% soro fetal bovino. A incubação com os anticorpos primários foi feita na mesma solução, durante a noite a 4° C. Os cérebros foram lavados 3 vezes durante 10 minutos, em PBS, 0,3% Triton X-100, e incubados com os anticorpos secundários numa solução de PBS, 0,3% Triton X-100, 10% soro fetal bovino, durante 3 horas, à temperatura ambiente. Realizaram-se novamente 3 lavagem de 10 minutos, seguidas de incubação com DAPI durante 30 minutos. Os cérebros foram lavados durante 5 minutos em PBS e montados em Mowiol¹, tendo-se selado a preparação com verniz transparente (Nivea).

Os anticorpos usados nestes ensaios foram: anti- α -tubulina (ratinho, diluído 1:100), anti-fosfohistona H3 (coelho, diluído 1:500), soros anti-Mob2, ACR11A, ACR11B, ACR37 (coelho, diluição 1:100). Utilizaram-se como anticorpos secundários os anticorpos Alexa 488 e 594 (diluídos 1:500).

Para a aquisição de imagens de imunofluorescência foi usado um microscópio confocal Zeiss LSM710.

2.5.2. Microscopia em Tempo Real

Os cérebros de larvas de 3º estágio foram dissecados em 0,7% NaCl, e montados em 5,5 μ l da mesma solução. A preparação foi selada com Valap (Lanolina, Vaselina, Parafina, 1:1:1).

As fotografias foram tiradas com intervalos de 30 segundos, durante 30 minutos, a uma exposição constante de 20 ms, sem binning, com um gain de 2 e com a objectiva

de 63x. A aquisição de imagens foi feita num microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager Z2, com a câmara AxioCam HR Rev. 3.

ⁱ **Preparação do Mowiol:** Misturaram-se 2,4 g de Mowiol (Calbiochem) e 6 g de glicerol (Sigma) num Erlenmeyer, agitando-se sempre. Adicionaram-se 6 ml de água destilada, e a mistura foi mantida numa agitação fraca, para não se formarem bolhas, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, adicionaram-se 12 ml de 0,2 M Tris (pH 8.5) e aqueceu-se a 50-60°C, durante 30 minutos ou até o Mowiol estar completamente dissolvido. A solução foi centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos, para remover os sólidos não dissolvidos. Adicionou-se 2,4% de DABCO (Sigma), um agente anti-fading. Centrifugou-se novamente a 4000 rpm durante 15 minutos e armazenou-se em aliquotas em tubos eppendorf a -20°C. Os tubos em utilização podem armazenar-se durante 1 mês a 4°C.