

III. Resultados

3.1. Caracterização de Mob2 de *Drosophila melanogaster*

Tal como foi referido anteriormente, o gene Mob2 de *Drosophila* está localizado na região 68C do braço esquerdo do cromossoma 3, e codifica para quatro proteínas diferentes (Mob2-A, Mob2-B, Mob2-C e Mob2-D).

3.2. Validação dos anticorpos anti-DMob2

Neste trabalho utilizaram-se quatro soros policlonais de coelho criados contra a proteína Mob2 de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos para cada um dos soros vão ser referidos nos pontos seguintes do trabalho, e estão resumidos na tabela 3.1.

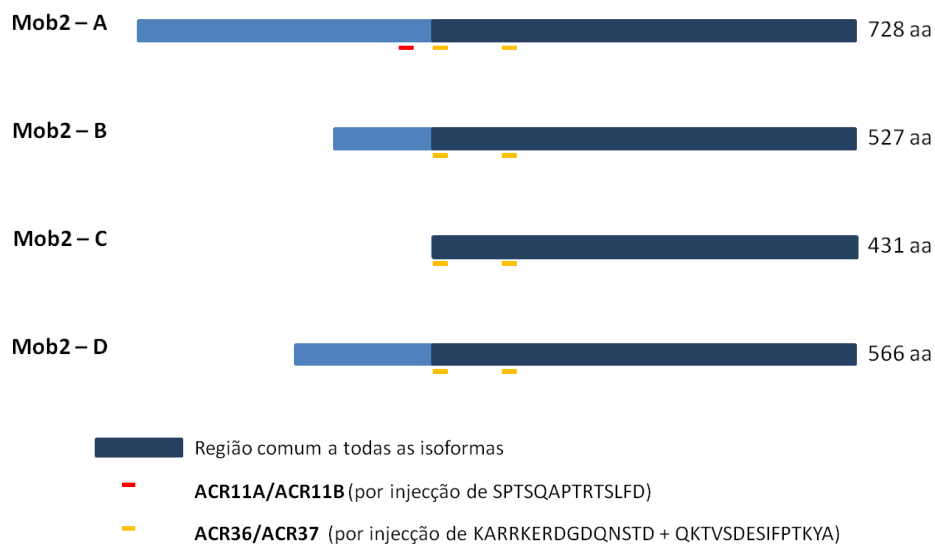


Figura 3.1 – Representação esquemática dos epítomos dos anticorpos nas diferentes isoformas da proteína Mob2. A vermelho está representado o epítopo de ACR11A e ACR11B, que é comum apenas à isoforma A da proteína, e a amarelo estão representados os epítomos de ACR36 e ACR37, que são comuns a todas as isoformas da proteína Mob2, a azul escuro está representada a região comum a todas as isoformas da proteína.

3.2.1. Validação de ACR11A

O soro ACR11A foi criado contra o péptido SPTSQAPTRTSLFD, comum apenas à isoforma A da proteína DMob2 (figura 3.1) e, através de análise de extractos de cérebros de larvas no 3º estadio (20 cérebros selvagens e 20 cérebros mutantes Mob2) em Western Blot verificou-se que o soro ACR11A reconhece várias proteínas nos extractos de cérebros. Contudo quando comparados os extractos dos selvagens com

os extractos dos mutantes Mob2 verifica-se que no selvagem aparece uma banda com um peso aproximado de 78 kDa, semelhante ao peso previsto da isoforma A da proteína, que é menos intensa no mutante (figura 3.2 A), o permite concluir que a banda indicada com a seta na figura x corresponde a dMob2 endógeno. Para comprovar que a quantidade dos extractos colocados nos poços era a mesma foi realizado um loading control, utilizando o anticorpo anti- γ -tubulina GTU88 (figura 3.2 B).

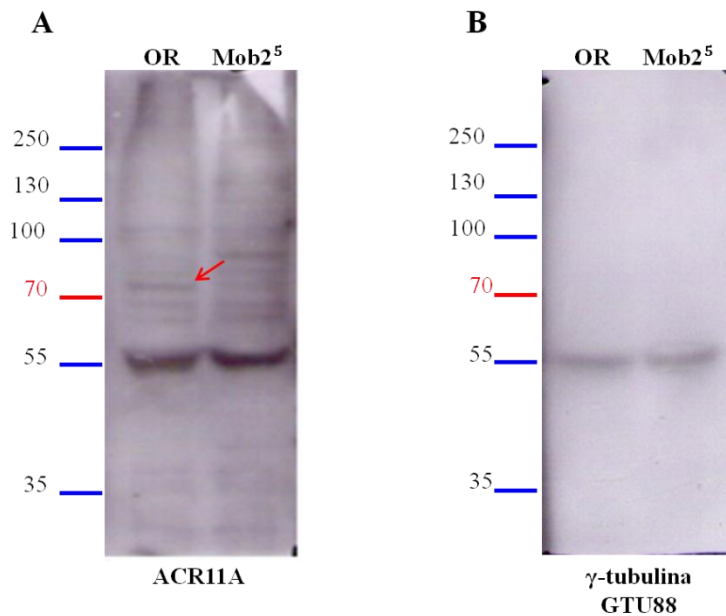


Figura 3.2 – Caracterização do soro anti-dMob2, ACR11A. (A) O soro ACR11A reconhece, em extractos de cérebros de larvas no 3^o estadio, uma proteína com um peso molecular de 78 kDa (seta), que é menos intensa no mutante. (B) Loading control, com o anticorpo anti- γ -tubulina GTU88.

3.2.2. Validação do soro ACR11B

Tal como ACR11A, também ACR11B foi gerado contra o péptido SPTSQAPTRTSLFD, comum apenas à isoforma A da proteína DMob2 (figura 3.1).

Relativamente a este soro, verificou-se também por análise em Western Blot, que nos extractos de cérebros selvagens aparece uma banda com o peso semelhante ao previsto para a isoforma A da proteína Mob2 de *Drosophila*. Tal como para o soro anterior, a banda reconhecida pelo ACR11B apresenta uma intensidade menor nos extractos de cérebros mutantes, como se pode observar na figura 3.3 A. O mesmo resultado foi obtido para os diferentes sangramentos (figura 3.3 A). Foi também realizado um loading control com anti- γ -tubulina GTU88 para certificar a quantidade de cérebros colocados em cada poço (figura 3.3 B).

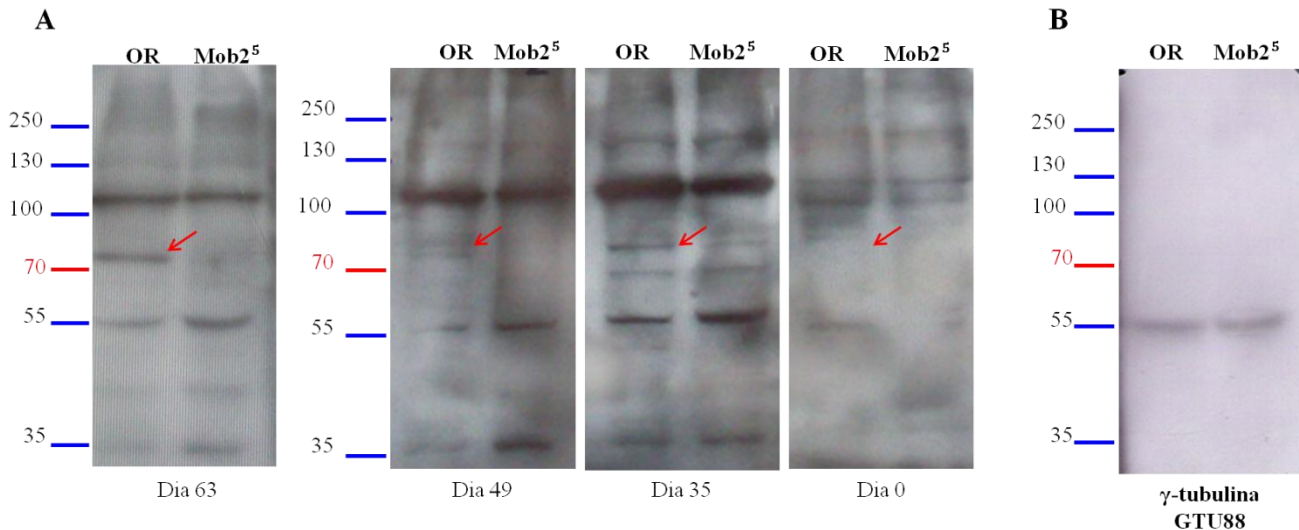


Figura 3.3 – Caracterização do soro anti-dMob2, ACR11B. **(A)** O soro ACR11B reconhece, em extractos de cérebros de larvas no 3º estadio, uma proteína com um peso molecular de 78 kDa (seta), que é menos intensa no mutante. O mesmo acontece para os diferentes dias de sangramento após a infecção com o péptido. **(B)** Loading control, com o anticorpo anti- γ -tubulina GTU88.

3.2.3. Validação do soro ACR36

O soro ACR36 foi criado contra os péptidos KARRKERDGDQNSTD e QKTVSDESIFPTKYA, que são comuns a todas as isoformas da proteína (figura 3.1).

Por análise com a técnica referida verificou-se que o soro ACR36 não reconhece qualquer isoforma da proteína dMob2 (figura 3.4 A). Na figura 3.4 B está representado o loading control com anti- γ -tubulina GTU88.

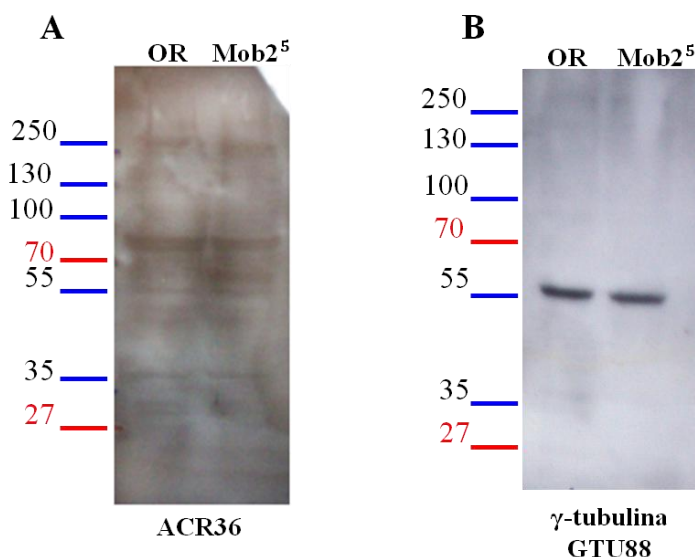


Figura 3.4 – Caracterização do soro anti-dMob2, ACR36. **(A)** O soro ACR37 não parece reconhecer nenhuma banda com o peso molecular previsto para as isoformas da proteína Mob2 nos cérebros OR, que seja menos intensa nos cérebros mutantes Mob2. **(B)** Loading control, com o anticorpo anti- γ -tubulina GTU88.

3.2.4. Validação do soro ACR37

À semelhança de ACR36, o soro ACR37 também foi gerado contra os péptidos KARRKERDGDQNSTD e QKTVSDESIFPTKYA, comuns a todas as isoformas da proteína (figura 3.1).

Através da análise por Western Blot com este soro, verificou-se que ACR37 reconhece uma proteína com um peso aproximado de 46 kDa, sendo esta banda menos intensa nos extractos mutantes, o que indica que este soro reconhece a isoforma C da proteína dMob2 (figura 3.5). O loading control com anti- γ -tubulina GTU88 está representado na figura.

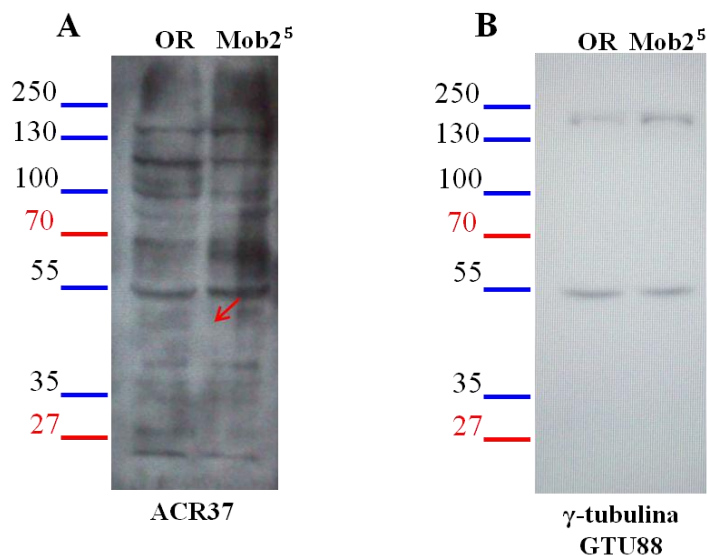


Figura 3.5 – Caracterização do soro anti-dMob2, ACR37. **(A)** O soro ACR37 reconhece, em extractos de cérebros de larvas no 3º estadio, uma proteína com um peso molecular de 46 kDa (seta), que é menos intensa no mutante. **(B)** Loading control, com o anticorpo anti- γ -tubulina GTU88.

3.3. Imunolocalização de dMob2

A localização celular de uma proteína pode fornecer pistas sobre a sua possível função e sobre possíveis parceiros moleculares. A localização das proteínas dMob2 em neuroblastos pode ser feita através de duas abordagens diferentes, utilizando os soros anti-Mob2 gerados no laboratório, ou através de uma proteína de fusão, que permite a ligação de Mob2 a uma proteína fluorescente, como a GFP. No decorrer deste trabalho apenas foi utilizada a primeira abordagem, tendo sido utilizados os ACR11A, ACR11B e ACR37 (referidos anteriormente) para tentar determinar a localização da proteína dMob2 em neuroblastos de larvas no 3º estadio.

Tabela 3.1 – Resumo dos resultados obtidos para a caracterização dos soros anti-Mob2.

Soros	Western Blot	Imunofluorescência	Imunofluorescência com anticorpo purificado
ACR11A	Reconhece isoforma A da proteína Mob2	Não marca nenhuma estrutura específica	-
ACR11B	Reconhece isoforma A da proteína Mob2	Parece marcar os cinetocoros	Ruído de fundo diminui; pode marcar cinetocoros
ACR36	Não reconhece nenhuma isoforma	-	-
ACR36	Reconhece isoforma C da proteína Mob2	Não marca nenhuma estrutura específica	-

Utilizando o soro ACR11A, não foi possível determinar a localização da proteína Mob2 de *Drosophila*. Este soro apresenta uma localização difusa em todas as fases da mitose, não sendo possível esclarecer a sua localização específica (figura 3.6).

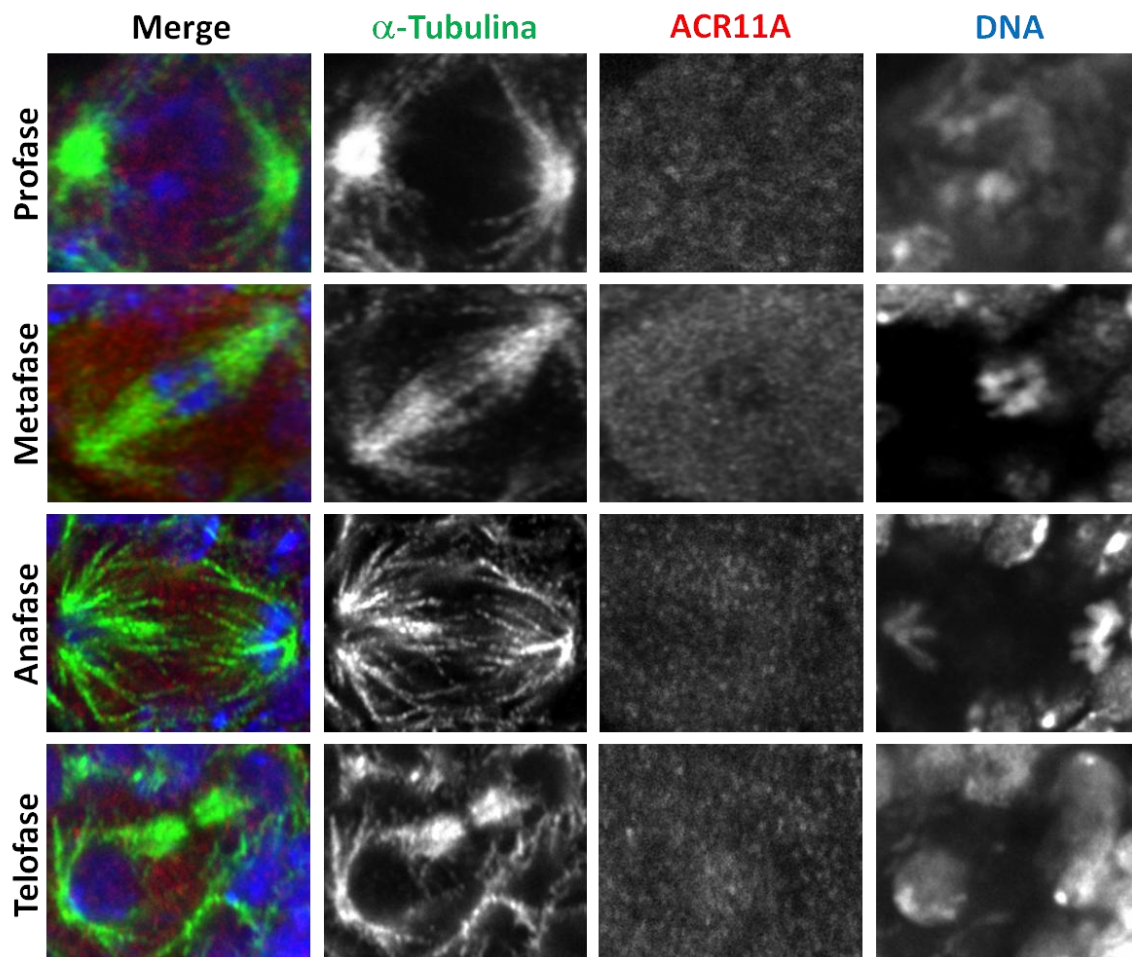


Figura 3.6 – Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR11A, em profase, metafase, anafase e telofase. A imunofluorescência com soro ACR11A não permite identificar a localização de dMob2, pois o sinal está disperso por todo o citoplasma. A α -tubulina está marcada a verde, o soro ACR11A está a vermelho e o DNA está marcado a azul.

Por sua vez, na imunolocalização com o soro ACR11B, apesar de parecer que todo o citoplasma está marcado, é possível verificar uma maior intensidade na marcação em certos pontos junto ao material genético, que parecem ser os cinetocoros (figura 3.7). Esta marcação é visível em todas as fases da mitose, contudo seria necessário uma marcação complementar para os cinetocoros (como o Spc 25), para se poder afirmar com certeza que a proteína Mob2 de *Drosophila melanogaster* está localizada nesta estrutura. Além disso, é também possível realizar a purificação do anticorpo anti-dMob2, o que vai permitir eliminar a maioria do ruído de fundo, e ajudar a esclarecer qual a localização intracelular da proteína Mob2.

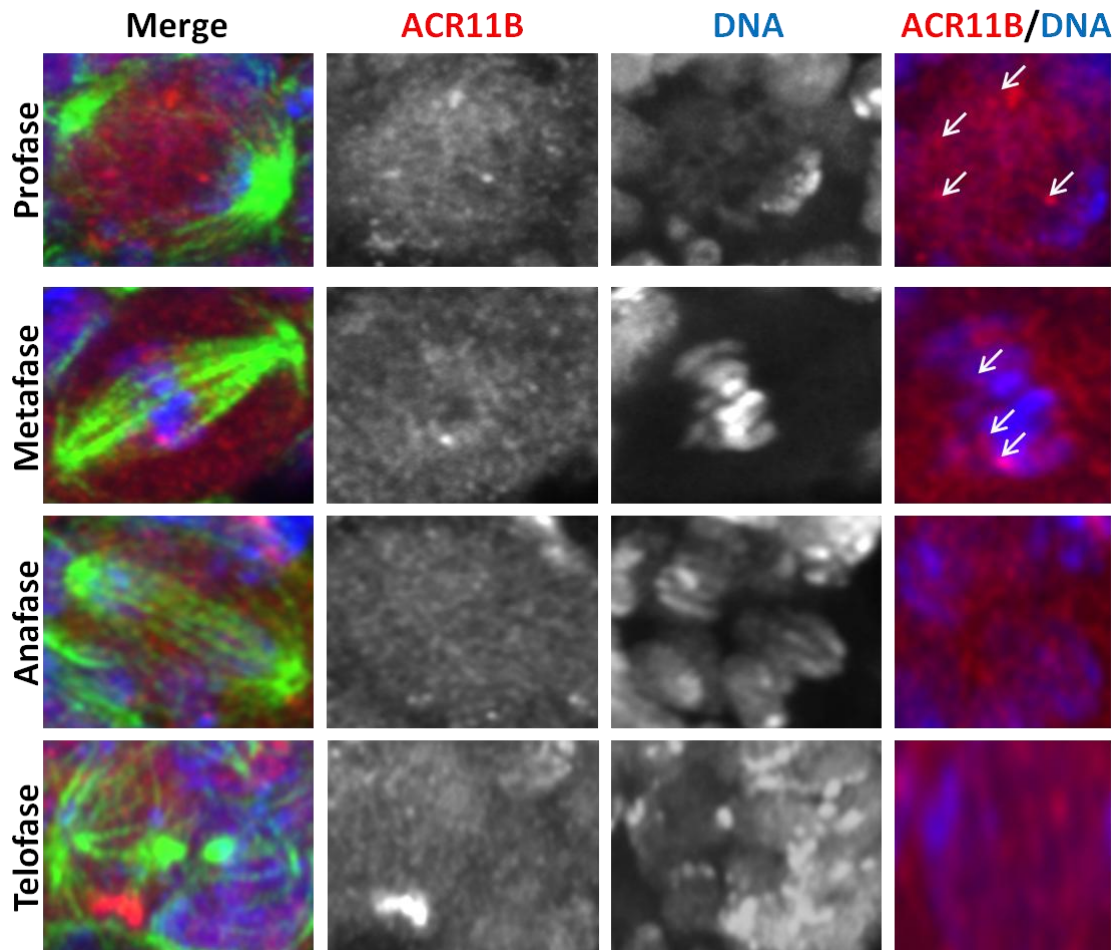


Figura 3.7 – Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR11B, em profase, metafase, anafase e telofase. A marcação com este soro está dispersa por todo o citoplasma, em todas as fases da mitose, mas em profase e metafase é possível distinguir umas pontuações mais intensas (setas) que se sobrepõem ao DNA e parecem marcar cinetocoros. A verde estão marcados os microtúbulos (α -tubulina), a vermelho o soro ACR11B e azul o DNA. Na ultima coluna é visível uma sobreposição ampliada de ACR11B e do DNA.

Tal como o que aconteceu com o soro ACR11A, na imunolocalização com o soro ACR37, também não foi possível identificar a localização de dMob2, em qualquer

uma das fases da mitose (figura 3.8). No caso deste soro, a marcação também estava difusa por todo o citoplasma, não incidindo sobre nenhuma localização específica.

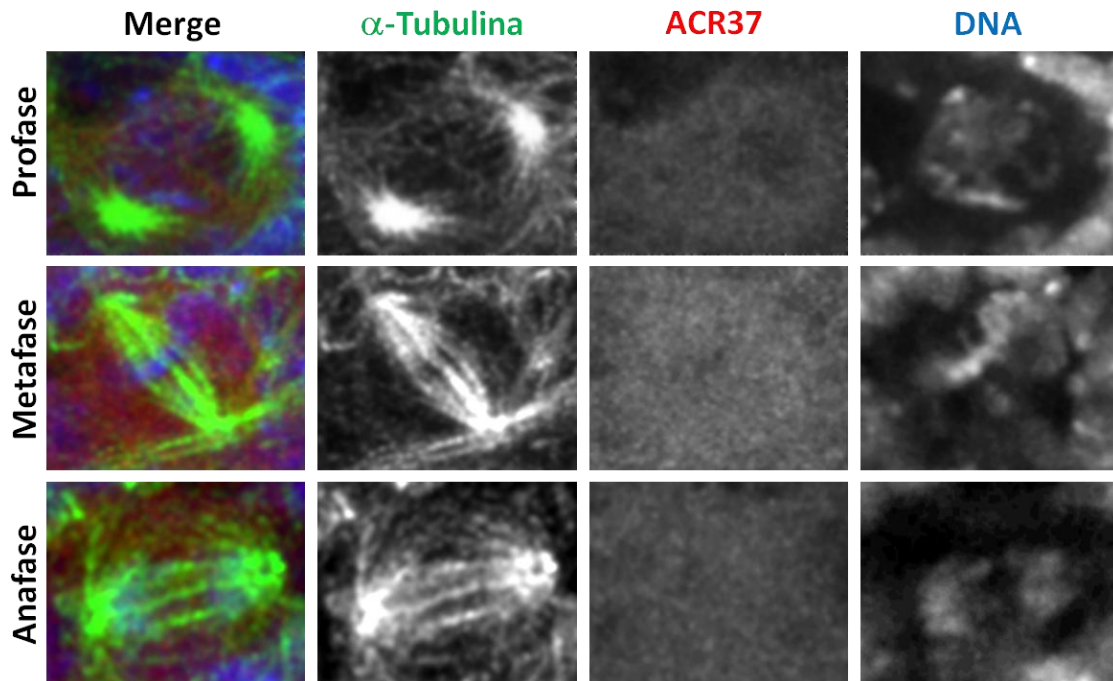


Figura 3.8 – Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR37, em profase, metafase e anafase. A marcação com o soro ACR37 apresenta um sinal difuso por todo o citoplasma, não sendo possível identificar a localização de dMob2. A α -tubulina está marcada a verde, o soro ACR37 está a vermelho e o DNA está marcado a azul.

3.4. Purificação do soro ACR11B

Com o objectivo de clarificar a localização intracelular de dMob2 realizou-se a purificação do anticorpo anti-dMob2, a partir do soro ACR11B. A expressão da proteína de fusão GST.dMob2 em *E. coli* torna-se visível, na cultura induzida com IPTG, ao fim de uma hora de crescimento (figura 3.9). Após a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF foi realizada a purificação dos anticorpos por afinidade, da qual resultaram várias eluições, ácidas e básicas (figura 3.10).

Utilizando a 1ª eluição ácida, resultante do processo de purificação, em imunofluorescência, observou-se que, apesar da enorme perda de sinal, a marcação do anticorpo anti-dMob2, em células em metafase, parece coincidir com a marcação mais intensa do soro ACR11B, referida anteriormente, os cinetocoros (figura 3.11). Além disso, esta marcação desaparece quando se realiza imunofluorescência em cérebros mutantes Mob2, o que confirma que este anticorpo reconhece mesmo a proteína Mob2 (figura 3.12). Apesar de esta marcação visível, a co-localização de dMob2 com

proteínas existentes no cinetocoro continua a ser necessária para que se possa afirmar com certeza que a proteína dMob2 está localizada nos cinetocoros.

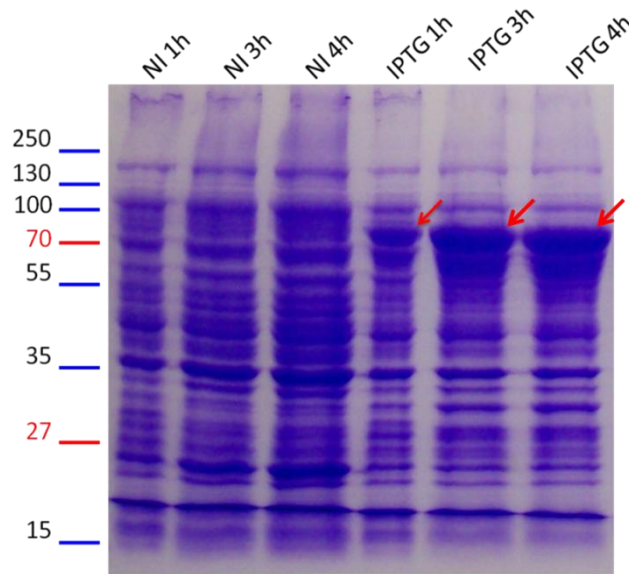


Figura 3.9 – Expressão de GST.dMob2 em *E. coli* não induzidas (NI) e induzidas com IPTG 1mM, ao fim de 1, 3 e 4 horas após o início da subcultura. A banda correspondente à proteína de fusão é visível ao fim de apenas 1 hora após a indução com IPTG (seta), mantendo-se pelo menos até 4 horas após a indução.

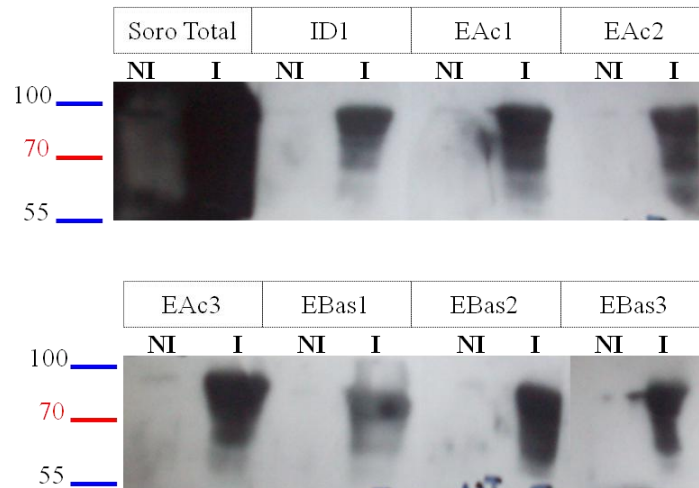


Figura 3.10 – Purificação do anticorpo. Confirmação por Western Blot das eluições ácidas (EAc) e básicas (EBas) e imunodepletado (ID) obtidos a partir da purificação do anticorpo. Foram utilizados os extractos de células não induzidos (NI) e induzidos (I) com IPTG 1mM.

3.5. Expressão da proteína Mob2 ao longo do desenvolvimento de *D. melanogaster*

De modo a caracterizar a expressão da proteína Mob2 ao longo do desenvolvimento da *D. melanogaster* realizou-se uma análise em Western Blot, utilizando o anticorpo anti-dMob2 purificado. Contudo, devido à baixa concentração do

anticorpo, e como este foi purificado contra a proteína endógena, não foi possível caracterizar a expressão de Mob2. Para que esta caracterização seja possível, será necessário aumentar a concentração dos extractos utilizados, ou seja, aumentando o número de cérebros, de modo a que o anticorpo se ligue mais facilmente.

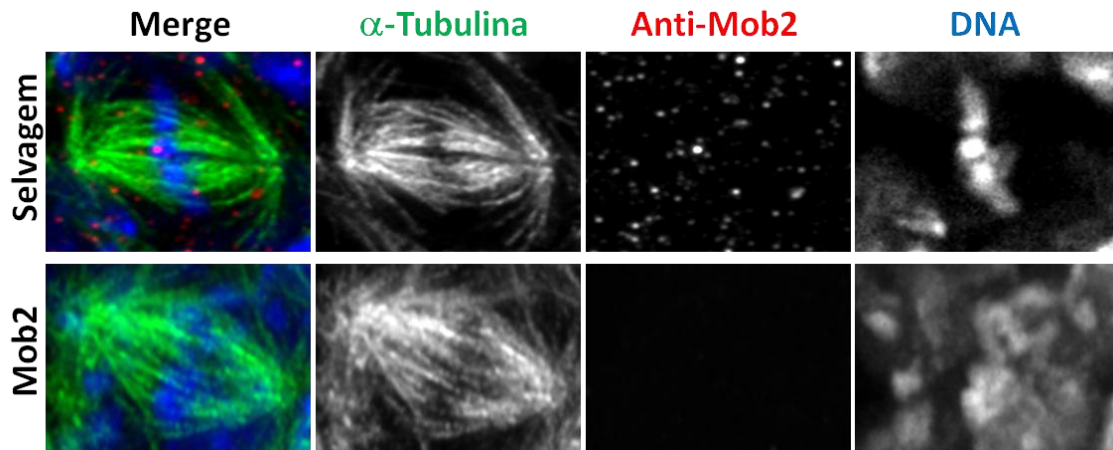


Figura 3.11 – Marcação de neuroblastos com anti-Mob2 (ACR11B purificado). Nas figuras apresentadas observa-se uma diminuição do ruído de fundo e uma marcação pontuada, que apesar de parecer localizar-nos nos cinetocoros está dispersa por todo o citoplasma. Esta marcação desaparece quando se realiza Imunofluorescência em cérebros mutantes mob2. A verde estão marcados os microtúbulos, a vermelho o anticorpo purificado e a azul o DNA.

3.6. Caracterização do fenótipo dos Mutantes Mob2⁵

O fenótipo dos mutantes Mob2⁵ foi analisado por imunofluorescência e por microscopia em tempo real, em neuroblastos de larvas no 3º estadio, utilizando como controlo cérebros de larvas selvagens no mesmo estadio de desenvolvimento. O cérebro e os discos imaginais, como são estruturas onde ocorrem numerosos ciclos de divisão celular, são estruturas muito utilizadas para estudar este processo nos estádios larvares.

3.6.1. Mutação no gene Mob2⁵ provoca uma diminuição no tamanho do cérebro das larvas no 3º estadio

Quando se comparam os cérebros de larvas homozigóticas para Mob2⁵ com os cérebros de larvas selvagens, no mesmo estadio de desenvolvimento, verifica-se que os cérebros das larvas mutantes são muito inferiores em tamanho (figura 3.12) e que, quando existem, os discos imaginais são atrofiados, em relação aos das larvas selvagens. Além disso, é possível observar que os cérebros mutantes apresentam um número de mitoses muito inferior (média de $159,2 \pm 49,8$, $n = 12$) aos dos cérebros

selvagens (média de $461,3 \pm 29,5$, $n = 6$). Esta diminuição é visível na figura 3.13, através da marcação da fosfo-histona-H3.

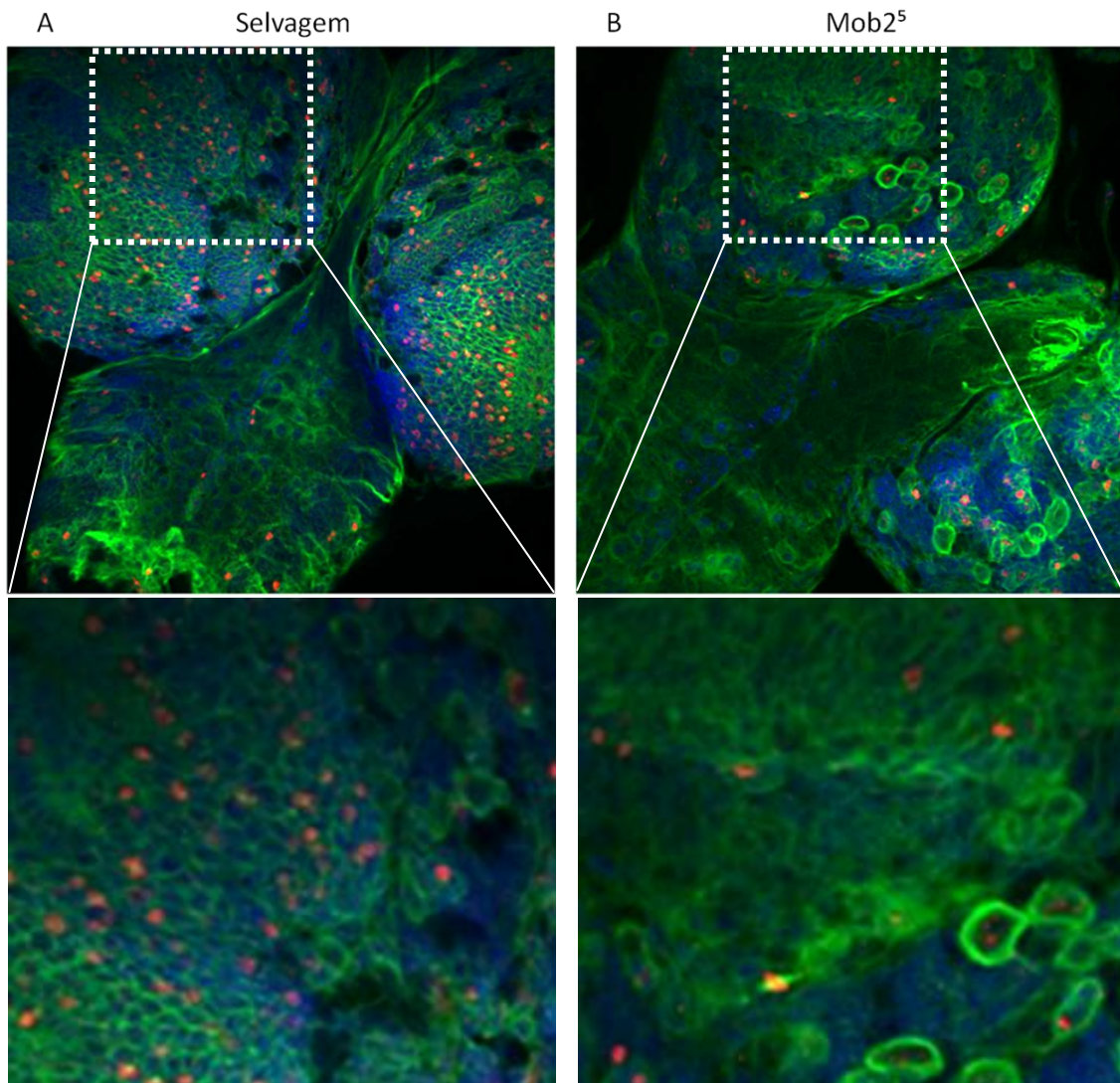


Figura 3.12 – Diferenças entre os cérebros selvagem e mutante $mob2^5$. O cérebro selvagem é maior e apresenta um número de mitoses mais elevado (A), do que o cérebro mutante $mob2^5$ (B). As células mitóticas estão marcadas a vermelho, pela fosfo-histona-H3. Os microtúbulos (α -tubulina) estão marcados a verde e o DNA a azul .

3.6.2. Mutantes Mob2 apresentam problemas na montagem do fuso mitótico

Para verificar o que estava a provocar esta diminuição no tamanho dos cérebros mutantes, analisaram-se os neuroblastos por imunofluorescência, através da marcação dos microtúbulos e do DNA. Através desta análise, verificou-se a existência de várias células em que, apesar de o DNA já se encontrar num estado de condensação avançado, não é possível observar qualquer vestígio da existência de um fuso mitótico (figura 3.13 B'). O estado de condensação do DNA é verificado pela marcação com a fosfo-histona-H3, que marca o DNA em mitose. Neste caso, embora não tenha sido feita uma

marcação dos centrossomas, parece que estas estruturas estão ausentes e, como tal, não a nucleação dos microtúbulos não ocorre correctamente. São também visíveis várias células monopolares, ou seja, células com fusos mitóticos que apresentam apenas um pólo (figura 3.13 B''). Nestas células, é possível que não tenha ocorrido a separação dos centrossomas na profase ou, se a separação ocorreu, os pólos do fuso podem ter colapsado e caído um sobre o outro.

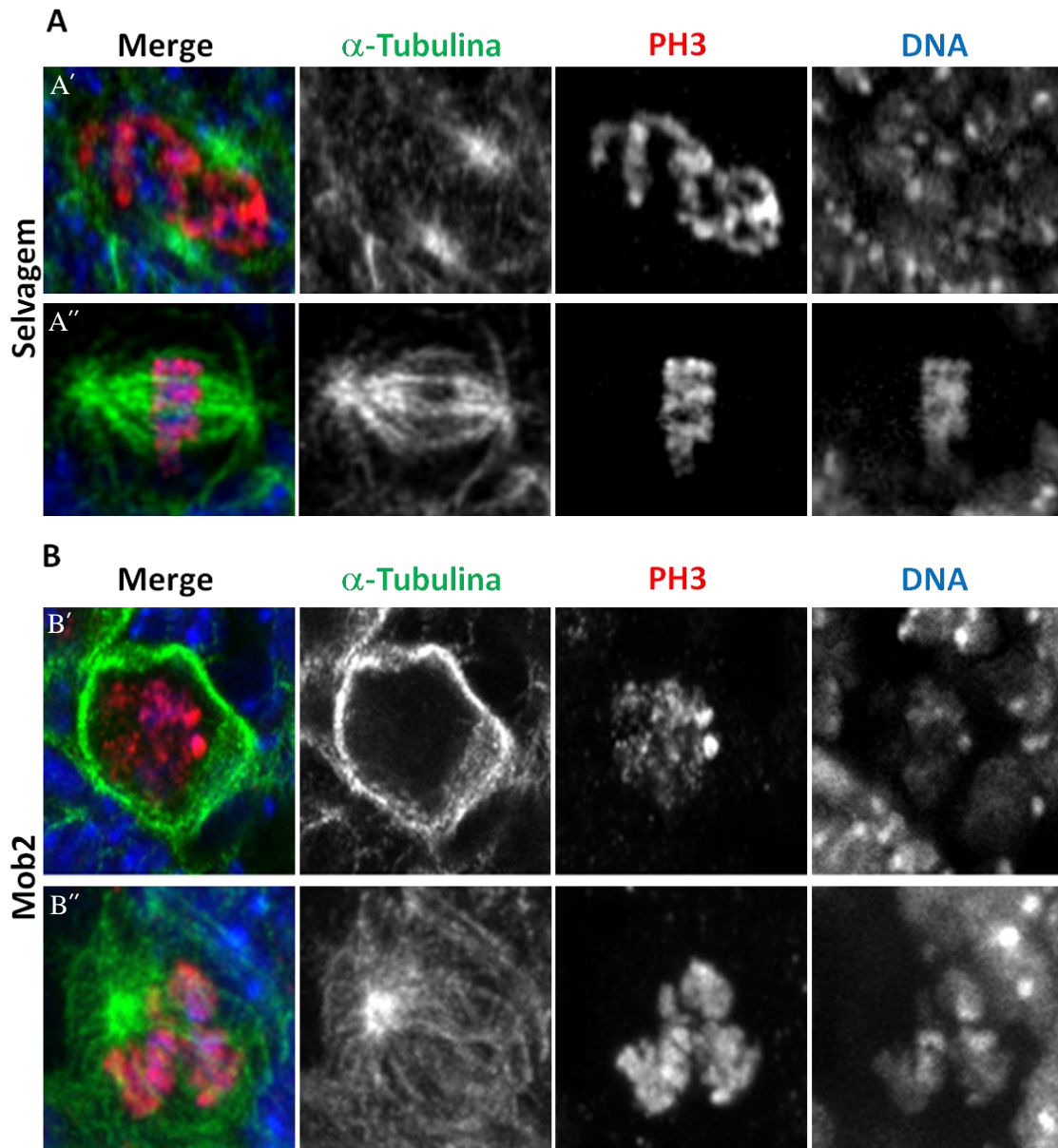


Figura 3.13 – Mutantes Mob2⁵ apresentam problemas na montagem do fuso mitótico. **(A)** Fusos Mitóticos normais de células em profase e em metafase. **(B)** Na primeira imagem do mutante Mob2 a estrutura do fuso mitótico não é visível, apesar de o DNA já estar condensado (marcação com PH3). Na segunda imagem é possível visualizar uma célula monopolar, ou seja, o fuso mitótico da célula apresenta apenas um pólo. Os microtúbulos (α -tubulina) estão marcados a verde, o DNA a azul e o DNA fosforilado a vermelho.

3.6.3. Metafases dos mutantes Mob2 apresentam problemas na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos do fuso

Adicionalmente, verificou-se que, apesar de a maioria das metafases nos neuroblastos mutantes serem aparentemente normais, quando comparadas com metafases de cérebros selvagens (figura 3.14 A), existem algumas células que apresentam defeitos na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos (figura 3.14 B).

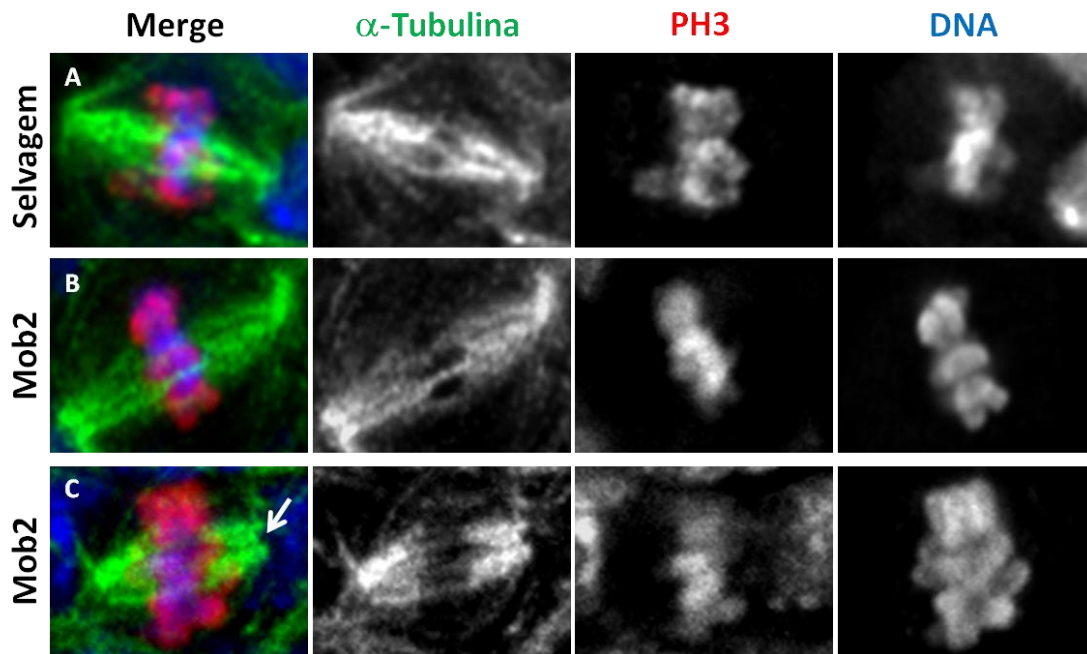


Figura 3.14 – Comparação entre as metafases de cérebros selvagens e cérebros mutantes. (A) Célula metafásica normal. (B) Célula metafásica mutante aparentemente normal. (C) Célula metafásica mutante com problemas na focagem dos microtúbulos nos pólos. Os microtúbulos (α -tubulina) estão marcados a verde, a fosfo-histona a vermelho e o DNA a azul.

3.6.4. Anafases mutantes apresentam problemas na segregação dos cromossomas

Além das várias anomalias verificadas na montagem do fuso mitótico, os mutantes Mob2⁵ apresentam também problemas ao nível na segregação dos cromossomas e, conseqüentemente, ao nível da progressão da mitose. Ao observar as figuras mitóticas através de imunofluorescência, verificou-se que as poucas anafases existentes no cérebro mutante apresentam problemas na segregação dos cromatídeos irmãos (figura 3.15 B).

3.6.5. Células mutantes apresentam um bloqueio em metafase

Trabalhos anteriores referem que o índice metafase/anafase (razão entre o número de metafases e o número de anafases) é muito superior no mutante em relação

ao selvagem, o que sugere a existência de um bloqueio em metafase (Samora, 2005). Este fenótipo é confirmado através de microscopia em tempo real de cérebros de larvas no 3º estadio, com a β -tubulina ligada ao GFP.

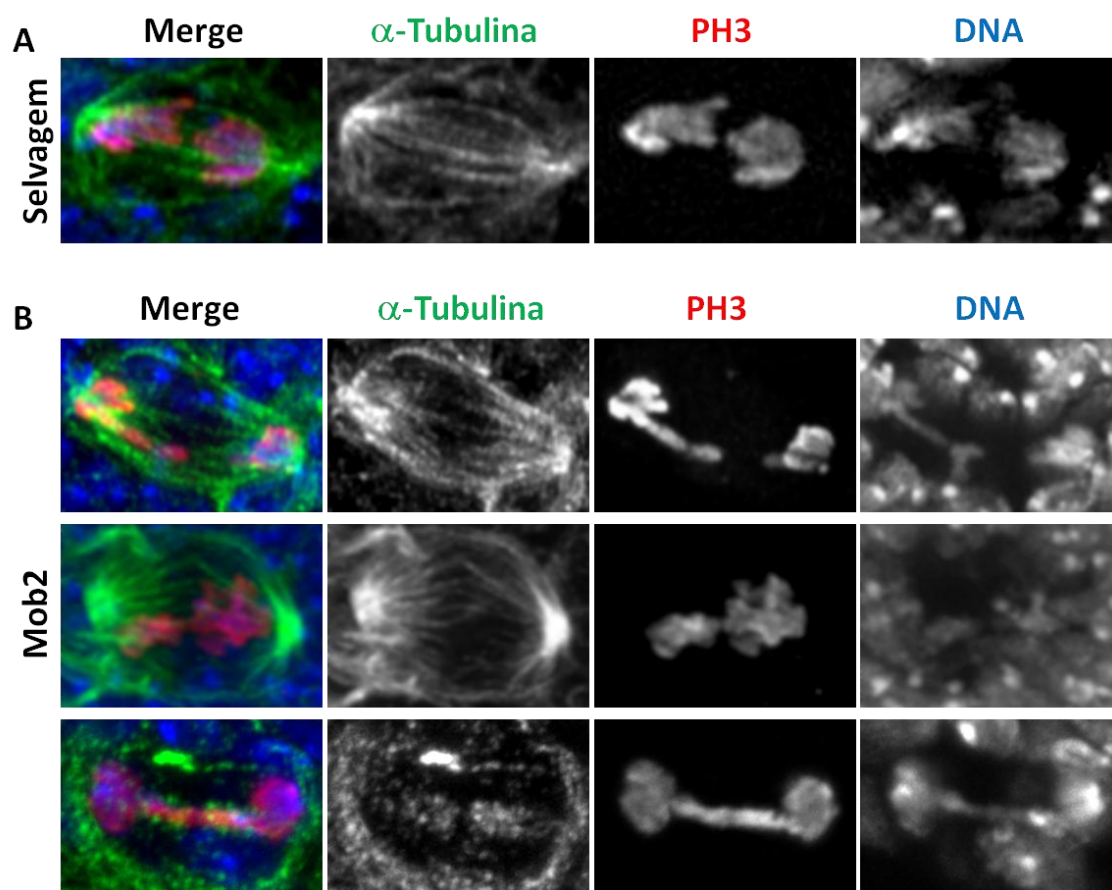


Figura 3.15 – Comparação entre anafases de cérebros selvagens e cérebros mutantes. (A) Anafase normal. (B) Anafases mutantes apresentam problemas na segregação dos cromossomas. Os microtúbulos (α -tubulina) estão marcados a verde, a fosfo-histona a vermelho e o DNA a azul.

Tabela 3.2 – Tempo de cada fase do ciclo celular em células normais e duração média dos filmes dos mutantes bloqueados em metafase. Valores em segundos.

	Controlo	Mob2
Metafase	94,29	2049,23
Anafase	154,29	-
Telofase	137,48	-

Tabela 3.3 – Defeitos verificados no mutante Mob2, em comparação com cérebros selvagens. Analisaram-se 16 células para o controlo e 18 células para o mutante.

	Selvagem	Mob2
Bloqueio em metafase	16,67	88,89
Fuso com pólo não focado	0	5,56
Bloqueio em profase	0	5,56
Apoptose	0	5,56

(valores em percentagem)

Como controlo utilizaram-se cérebros normais, com a marcação referida. A média da duração das fases da mitose estão apresentadas na tabela 3.2. Os filmes foram todos iniciados em metafase, excepto o representado nos fotogramas da figura 3.16. Os filmes realizados nos mutantes têm uma duração média de 35 minutos, e todos se iniciam em metafase. Nos fotogramas da imagem 3.17 e 3.18 é possível observar um bloqueio em metafase. Assim sendo, e como a metafase é a fase mais rápida do ciclo celular, uma vez que a célula prossegue para anafase assim que o último cromossoma está correctamente ligado ao fuso, os filmes parecem confirmar a existência de um bloqueio em metafase. Contudo, é necessário realizar um maior número de filmes, e que o início destes ocorra no início do ciclo (profase), para confirmar que o bloqueio não ocorre devido a factores ambientais.

Na tabela 3.3 é apresentado o resumo dos fenótipos observados por microscopia em tempo real. Os filmes confirmam o problema na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos do fuso (figura 3.18), observado na imunofluorescência.

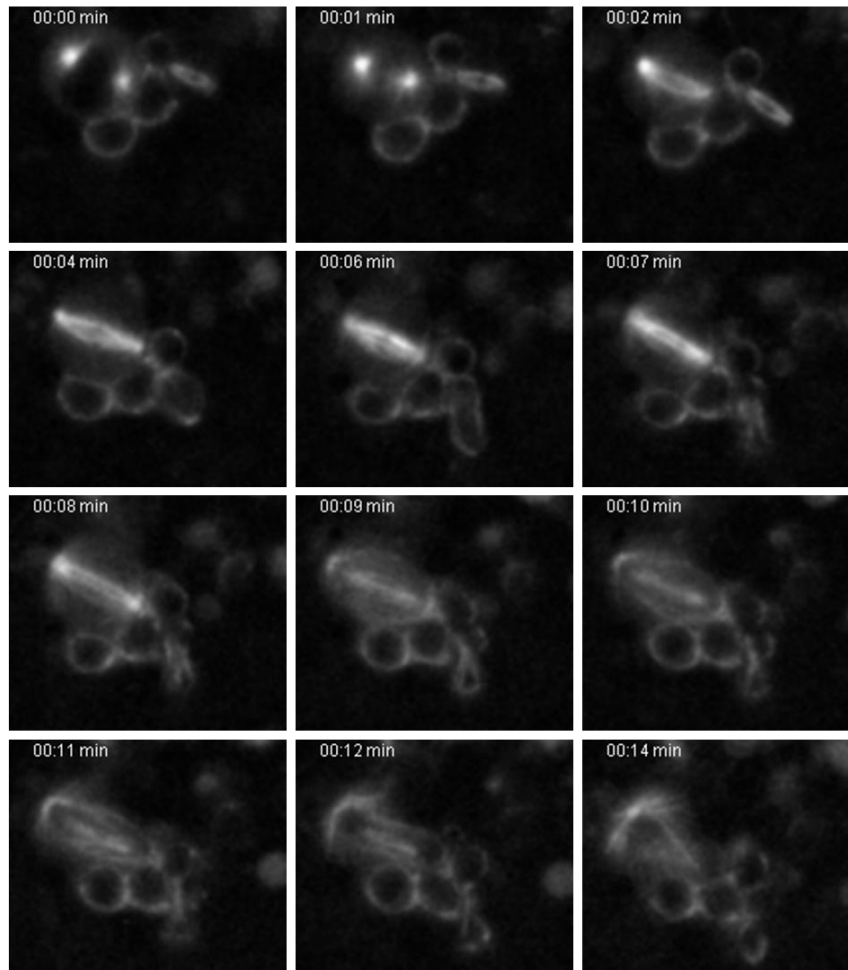


Figura 3.16 – Ciclo celular de uma célula normal. O tempo (min:seg) em que cada fotografia foi tirada está no canto superior esquerdo.

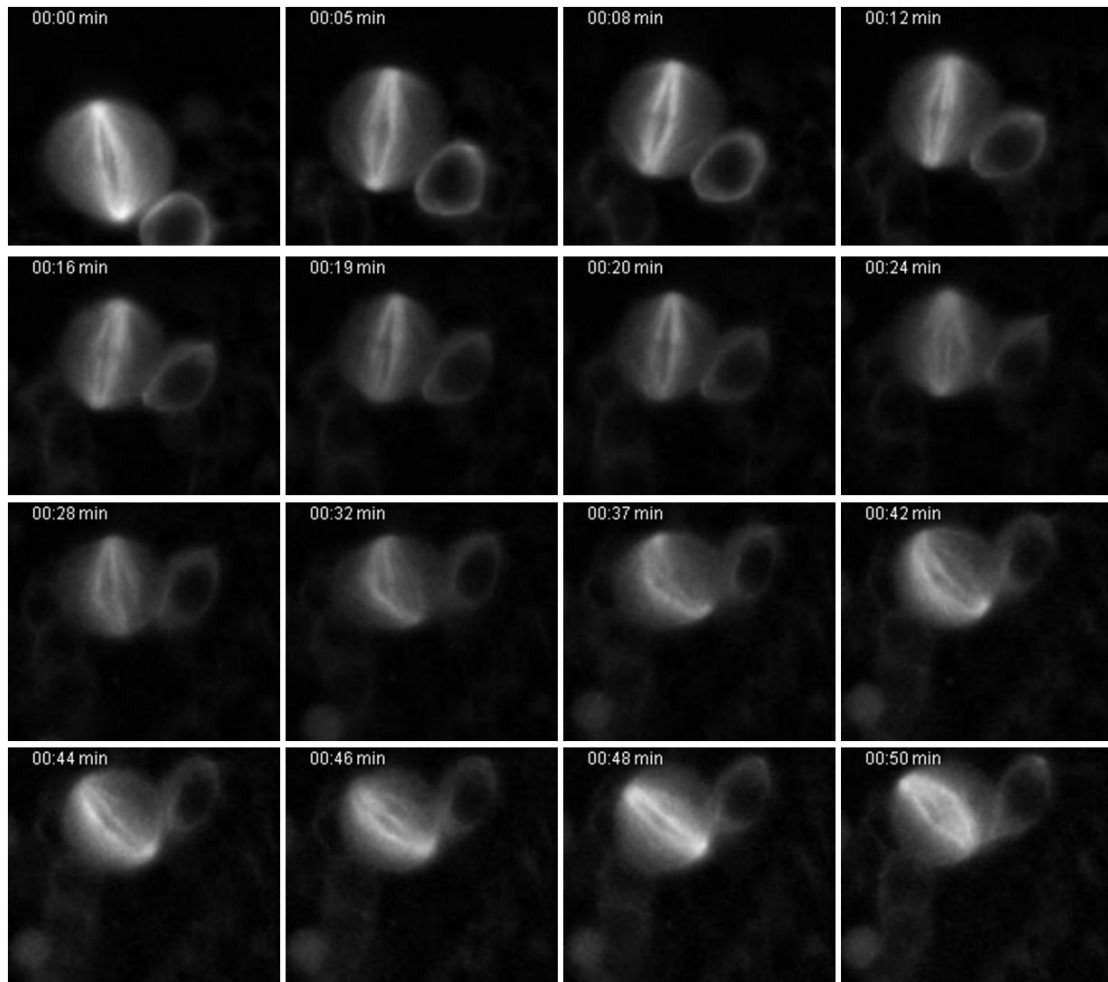


Figura 3.17 – Mutantes Mob2 apresentam um bloqueio em metafase. O tempo (min:seg) em que cada fotografia foi tirada está no canto superior esquerdo.

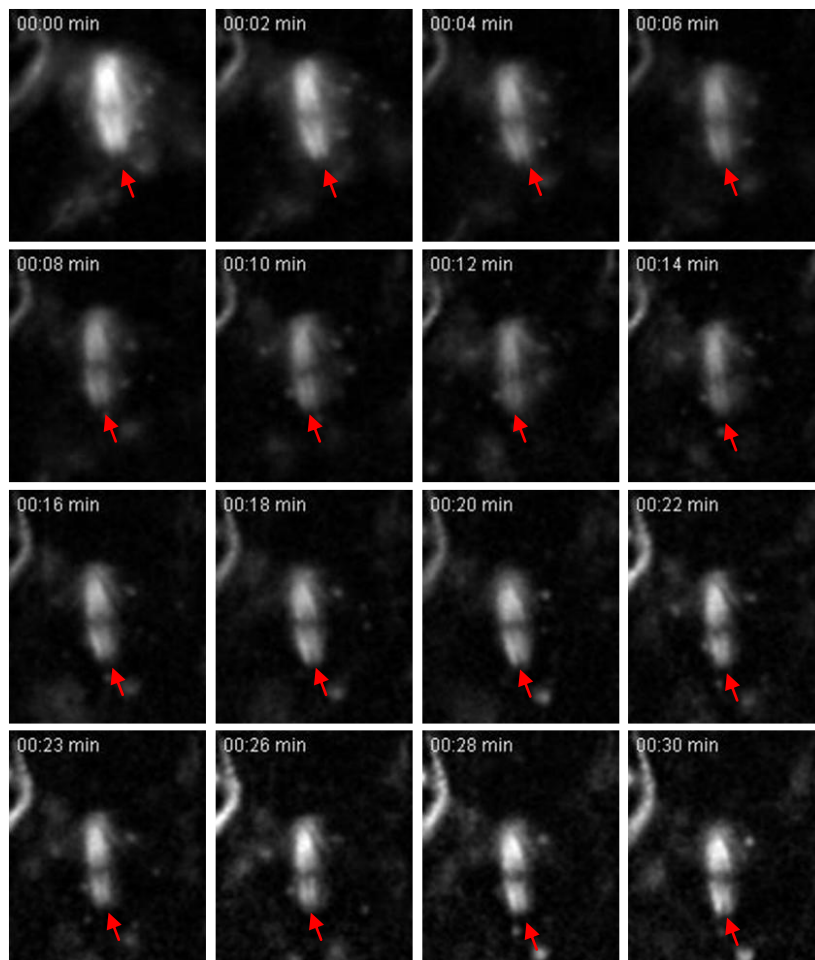


Figura 3.18 – Mutantes Mob2 apresentam um bloqueio em metafase e problemas na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos do fuso (seta). O tempo (min:seg) em que cada fotografia foi tirada está no canto superior esquerdo.