



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

Caracterização da Função do gene *mob2* de *Drosophila melanogaster*

Claudia Filipa Rodrigues Fonseca

Dissertação de mestrado orientada por:

Doutor Álvaro Tavares

Mestrado em Ciências Biomédicas

2011

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Álvaro Tavares, o meu orientador, pelo incentivo e colaboração constantes no decorrer deste trabalho, pela partilha de conhecimentos e disponibilidade demonstrada.

À Doutora Cláudia Florindo, por todos os ensinamentos na microscopia e por estar sempre disponível para ajudar quando era necessário.

À Maurícia por toda a ajuda com as moscas e não só, pela disponibilidade e amizade demonstradas.

À Carolina, a minha companheira de laboratório, por estar sempre disponível quando era preciso e pelos dias bem passados.

Ao Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, na Universidade do Algarve pelas ótimas condições de trabalho.

Ao pessoal dos diferentes grupos do CBME, nomeadamente os grupos do Professor José Bragança, Professora Isabel Palmeirim, Professor José Belo, Professor Nuno Santos e Professora Gabriela Silva, pelo acolhimento, ajuda e amizade.

Ao Luís, por me aturar e estar sempre disponível para me ajudar.

À minha Avó Adelaide por estar sempre disponível para ajudar e por tudo o que me proporcionou.

Aos meus pais e irmão, por tudo o que me proporcionaram, por todo o apoio e paciência demonstrados durante toda a minha vida.

Resumo

O correcto funcionamento do ciclo de divisão celular é essencial para a correcta transmissão do material genético da célula mãe para as células filhas, durante várias gerações, assegurando a continuidade da vida e a evolução das espécies. E, quando este processo é comprometido podem surgir várias complicações que geram o aparecimento de doenças como o cancro. Nas leveduras, *S. cerevisiae* e *S. pombe*, foi demonstrado que os genes da família Mob desempenham um papel fundamental da saída de mitose, citocinese e polaridade das células. Assim sendo, como estes genes estão conservados nos eucariotas, é possível que na *Drosophila melanogaster*, a família Mob também desempenhe funções essenciais no ciclo celular. Para determinar a função do gene Mob2 de *Drosophila*, realizou-se a análise do fenótipo dos mutantes Mob2 e tentou-se determinar a localização da proteína Mob2 ao longo das várias fases da mitose. Em conclusão, verificou-se que a proteína Mob2 parece estar localizada nos cinetocoros e que parece estar envolvida na formação do fuso e progressão do ciclo celular.

Abstract

The proper functioning of the cell division cycle is essential for the correct transmission of genetic material from the mother cell to daughter, during several generations, ensuring the continuity of life and evolution of species. When this process is compromised, several complications may arise and cause diseases, like cancer. In the yeasts, *S. cerevisiae* and *S. pombe*, mob genes have been shown to play important roles in mitotic exit, cytokinesis and cell polarity. So, like these genes are conserved in all eukaryotes, it's possible that in *Drosophila melanogaster*, mob's family also play essential roles in cell cycle. To determine *Drosophila melanogaster* Mob2 gene function, was performed the analysis of the mutant Mob2 phenotype and was tried to determine the location of Mob2 protein during different phases of mitosis. In conclusion, we found that Mob2 protein appears to be localized in kinetochores and appears to be involved in spindle formation and cell cycle progression.

Abreviaturas

APC/C – Complexo Promotor da Anafase ou Ciclossoma (do inglês: Anaphase Promoting Complex or Cyclosome)

BUB – do inglês Budding Uninhibited by Benzimidazole

Cdc – Mutantes do Ciclo Celular (do inglês: Cell Division Cycle)

CDK – Cinase Dependente da Ciclina (do inglês: Cyclin-Dependent Kinase)

DMob1 – Mob1 de *Drosophila melanogaster*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: Deoxyribonucleic Acid)

GEF – do inglês Guanine Nucleotide Exchange Factor

hsMob1 – Mob1 de *Homo sapiens*

IPTG – Isopropil-β-tiogalactopiranosido (do inglês: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

kDa - kilodalton

MAD – do inglês Mitotic Arrest Deficient

MAPs – Proteínas Associadas aos Microtúbulos (do inglês: Microtubule-Associated Proteins)

Mats – Mob como supressor de tumores (do inglês: Mob as tumor suppressor)

MEN – do inglês Mitotic Exit Network

Mob1 – do ingles Mps One Binder

MTOC – Centro Organizador dos Microtúbulos (do inglês: Microtubule Organizing Center)

NuMA – do inglês Nuclear Mitotic Apparatus

PBS – Tampão salino de fosfato (do inglês: Phosphate Saline Buffer)

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno (do inglês: Polyvinylidene Fluoride)

RENT – Regulador do Silenciamento Nucleolar e da Telofase (do inglês: Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase)

SAC – Ponto de Controlo de Montagem do Fuso (do inglês: Spindle Assembly Checkpoint)

SDS – Dodecil Sulfato de Sodio (do inglês: Sodium Dodecil Sulfatum)

SDS-PAGE – Electroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS (do inglês: Polyacrylamid Gel Electrophoresis)

SIN – do inglês Septation Initiation Network

SPB – Corpo polar do fuso (do inglês: Spindle Pole Body)

TBS – Tampão Tris Salino (do inglês: Tris Buffered Saline)

Índice Geral

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Abreviaturas.....	v
Índice Geral.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xii

I. Introdução	1
1.1. Divisão Celular	1
1.1.1. Ciclo Celular	1
1.1.2. Mitose	2
1.1.3. Microtúbulos em Mitose	3
1.1.3.1. Estrutura do Fuso Mitótico	4
1.1.4. Entrada em Mitose	7
1.1.5. Transição Metafase-Anafase	8
1.1.5.1. Ponto de Controlo de Montagem do Fuso (SAC)	8
1.1.5.2. APC/C (Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome)	9
1.1.5.3. Inibidores da Anafase	10
1.1.6. Citocinese	11
1.1.6.1. Coordenação da Citocinese com a Mitose	14
1.1.6.2. MEN (Mitotic Exit Network)	14
1.1.6.3. SIN (Septation Initiation Network)	15
1.2. Família Mob	16
1.2.1. Mob1 de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	16
1.2.2. Mob1 de <i>Schizosacharomyces pombe</i>	17
1.2.3. Mob2 de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	18
1.2.4. Mob2 de <i>Schizosacharomyces pombe</i>	19
1.2.5. Homólogos dos Genes Mob em Eucariotas Superiores	19
1.2.6. Genes Mob de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.2.6.1. Mob2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> no Estudo do Ciclo Celular	24

II. Materiais e Métodos	27
2.1. Linhas de <i>Drosophila</i> Utilizadas	27
2.2. Anticorpos	28
2.3. Géis de Proteínas e Western Blot	28
2.3.1. Preparação da Amostra	28
2.3.2. Géis de Proteínas (SDS-PAGE)	29
2.3.3. Western Blot	29
2.4. Imunopurificação de Anticorpos	30
2.4.1. Produção de Proteína	30
2.4.2. Imunopurificação de Anticorpos	31
2.5. Técnicas Citológicas	32
2.5.1. Imunofluorescência	32
2.5.2. Microscopia em Tempo Real	32
III. Resultados	34
3.1. Caracterização de Mob2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
3.2. Validação dos Anticorpos anti-DMob2	34
3.2.1. Validação do soro ACR11A	34
3.2.2. Validação do soro ACR11B	35
3.2.3. Validação do soro ACR36	36
3.2.4. Validação do soro ACR37	37
3.3. Imunolocalização de DMob2	37
3.4. Purificação do soro ACR11B	40
3.5. Expressão da proteína Mob2 ao longo do desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i>	41
3.6. Caracterização do Fenótipo dos Mutantes Mob2	42
3.6.1. Mutação no gene Mob2 ⁵ provoca uma diminuição no tamanho do cérebro das larvas no 3º estágio	42
3.6.2. Mutantes Mob2 apresentam problemas na montagem do fuso mitótico	43
3.6.3. Metafases dos mutantes Mob2 apresentam problemas na focagem dos microtúbulos ao nível dos pólos do fuso	45
3.6.4. Anafases mutantes apresentam problemas na segregação dos cromossomas	45
3.6.5. Células mutantes apresentam um bloqueio em metáfase	45

IV. <u>Discussão e Conclusões</u>	51
V. <u>Bibliografia</u>	54
VI. <u>Anexos</u>	65

Índice de Figuras

1. Introdução

1.1. Representação esquemática das fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M).....	1
1.2. Fases da Mitose: Profase, Metafase, Anafase e Telofase.....	3
1.3. Representação esquemática da anatomia do fuso mitótico durante a metafase.....	5
1.4. Representação esquemática dos mecanismos gerais da citocinese em eucariotas.....	12
1.5. Cascatas de sinalização que promovem a saída de mitose em leveduras.....	16
1.6. Árvore filogenética evidenciando as distâncias relativas entre as proteínas tipo Mob de <i>Homo sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> e <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.7. Representação esquemática de DMob2.....	23
1.8. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	25

2. Materiais e Métodos

2.1. Representação esquemática dos quatro transcritos de DMob2 e dos seis transcritos obtidos por inserção de elementos P.....	27
---	----

3. Resultados

3.1. Representação esquemática dos epítomos dos anticorpos nas diferentes isoformas da proteína Mob2.....	34
3.2. Caracterização do soro ACR11A.....	35
3.3. Caracterização do soro ACR11B.....	36
3.4. Caracterização do soro ACR36.....	36
3.5. Caracterização do soro ACR37.....	37
3.6. Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR11A.....	38
3.7. Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR11B.....	39
3.8. Marcação de neuroblastos selvagens com o soro ACR37.....	40
3.9. Expressão de GST.dMob2 em <i>E. coli</i> não induzidas e induzidas com IPTG.....	41
3.10. Purificação do anticorpo.....	41
3.11. Marcação de neuroblastos com anti-Mob2.....	42

3.12.	Diferenças entre os cérebros selvagem e mutante Mob2.....	43
3.13.	Mutantes Mob2 apresentam problemas na montagem do fuso mitótico.....	44
3.14.	Comparação entre metafases dos cérebros selvagens e mutantes.....	45
3.15.	Comparação entre anafases dos cérebros selvagens e mutantes.....	46
3.16.	Ciclo celular de uma célula normal.....	48
3.17.	Mutantes Mob2 apresentam um bloqueio em metáfase.....	49
3.18.	Mutantes Mob2 apresentam um bloqueio em metáfase e problemas na focagem dos microtúbulos.....	50
6.	Anexos	
6.1.	Mapa do vector pGEX.....	65
6.2.	Expressão de mRNA de Mob2 ao longo do desenvolvimento da Drosophila....	66
6.3.	Expressão do mRNA de Mob2 nos órgãos/tecidos de larva em comparação com as moscas adultas.....	67

Índice de Tabelas

2. Materiais e Métodos

2.1. Anticorpos primários.....	28
2.2. Anticorpos secundários.....	28

3. Resultados

3.1. Resumo dos resultados obtidos para a caracterização dos soros anti-Mob2...	38
3.2. Tempo de cada fase do ciclo celular em células normais e duração média dos filmes dos mutantes bloqueados em metafase.....	46
3.3. Defeitos verificados no mutante Mob2, em comparação com cérebros selvagens.....	47