ÁLVARO AUGUSTO MARQUES TAVARES

ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA POLO DE *Drosophila melanogaster*

UNIVERSIDADE DO PORTO
1996

ICBAS
U BIBLIOTECA P
PORTO

Álvaro Augusto Marques Tavares

ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA POLO DE *Drosophila melanogaster*

UNIVERSIDADE DO PORTO
1996

7217

Álvaro Augusto Marques Tavares

ANÁLISE MOLECULAR DA PROTEÍNA POLO DE *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

UNIVERSIDADE DO PORTO
1996

DECLARAÇÃO

De acordo com o disposto no nº2 do Artº 8º do Decreto-lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados constantes na publição abaixo indicada. No cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, o autor desta dissertação declara que interveio na concepção e na execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção do manuscripto enviado para publicação, sob o nome de Álvaro Tavares.

Tavares, Á., D. Glover e C. Sunkel (1996). The conserved mitotic kinase polo is regulated by phosphorylation and has preferred microtubule-associated substrates in *Drosophila* embryo extracts. *EMBO J.* **15,** *in press.*

À minha mãe, Fernanda,
por me ter dado o mundo

À Carmo,
pela beleza que lhe trouxe

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar expresso o meu agradecimentos a diversas pessoas que, de uma maneira ou de outra, contribuiram para a realização deste trabalho.

Começando por quem moldou o meu espiríto científico: de entre os professores extradordinários com que estudei saliento o Professor Doutor Rui Pinto, a Professora Doutora Ana Ponces e também a Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada. Souberam transmitir um prazer enorme por Ciência e mostraram o que é empenho e coragem ao tentarem, estoicamente, criar cientistas de uma turba bárbara e rebelde.

Tive ainda a sorte de ter como colegas universitários pessoas brilhantes, de criatividade e loucura (especialmente a ultima). Estou certo que serão referências futuras de trabalho científico. Desse grupo, em especial a Ana Coelho, pelo sorriso, pela franqueza e por ser loura; a Alexandra Carmo, pela paciência, por ser a Alexandra; o Jorge Gaspar, pelo Heavy-Metal, pelas anedotas, pela praia; o Sebastião Rodrigues, pela alegria, pelo riso; o grupo de herois, António Baptista (o Mago), Mário Pires (o Druída), Renato Pousada (o Paladino), Paulo Martel (também Paladino), por me ensinarem a trinchar um Dragão, e por nunca me darem razão nem recusarem luta. A todos agradeço a amizade inabalável que se mantém viva.

Ao Doutor Claudio Sunkel, meu orientador de Doutoramento, agradeço a oportunidade da realização deste projecto, a paciência e apoio que se sempre me dispensou, os ensinamentos indispensáveis a quem trabalha com Drosophila, e o CD ocasional de jazz.

à Carmo Moreira, por tudo, pela serenidade, pelas discussões de trabalho, por compartilhar os coelhos.

aos amigos e colegas do centro de Citologia Experimental, pela paciência (em doses cavalares) para me aturarem, pelas mil pequenas ajudas no trabalho.

à Suzana Guedes, à Inês Chaves e ao Sam Morée, pelo empenho e amizade, por compartilharem o seu trabalho.

I would like to thank Prof. David Glover, not just for allowing me to do part of this work in his lab, but also for all the advice, encouragement and enthusiasm put on this project. My special thanks go also to all the members of the C.R.C. Cell Cycle Genetics Research Group, for providing such a friendly atmosphere of work., and to Carol Midgley for an invaluable help with the baculovirus system.

Um abraço especial ao Joaquim Faria, pelas soberbas horas gastas a jogar xadrez, poker, king, AD&D, etc....(um dia, quiça talvez, ganhará um jogo), e pelo seu apoio crítico sempre que necessário.

E mais uma vez o meu agradecimento muito especial à minha família por todo o apoio e carinho que sempre me dispensou.

Finalmente gostaria de agradecer a JNICT o ter-me financiado com uma Bolsa de Doutoramento.

RESUMO

O gene polo é essencial para o desenrolar da mitose em *Drosophila melanogaster*. Mutações neste gene provocam aberrações mitóticas entre as quais fusos mitóticos monopolares, fusos com polos anormalmente largos e hipercondensação cromossómica. A análise inicial da sequência do gene indicou que este codifica uma proteína com elevada homologia na sequência primária com cinases proteícas pertencentes à sub-classe serina-treonina.

Neste trabalho, de modo a obtermos uma melhor compreensão da função biológica da cinase polo, procurámos desenvolver técnicas que permitissem analizar a sua actividade catalítica e, principalmente, identificar os seus substratos fisiológicos. Assim começámos por desenvolver um ensaio onde a actividade catalítica da proteína polo pudesse ser medida, estudámos um sistema onde essa actividade não se encontrasse presente, utilizámos esse sistema para procurar substratos fisiológicos da cinase polo, e finalmente tentámos identificar os substratos encontrados.

Os resultados obtidos confirmam a proteína polo como sendo uma cinase pertencente à família das cinases tipo serina/treonina. Fomos capazes de verificar que a proteína polo é ela mesma uma fosfoproteína e que perde a actividade catalítica quando tratada com fosfatases, levantando a hipótese de ter a sua acção controlada intracelularmente por modificações no seu estado de fosforilação.

Com recurso a embriões mutantes desprovidos de enzima polo catalíticamente activo, desenvolvemos uma abordagem que permitiu identificar três substratos potenciais endógenos da cinase. Num primeiro tipo de ensaio verificámos que a cinase polo é capaz de fosforilar três proteínas (de 54kDa, 85kDa e 220kDa) em extractos de embriões, em que as cinases endógenas tinham sido inactivadas por calor. Significativamente, essa mesma fosforilação é mais intensa em extractos de embriões *polo*^{1}, que não contêm uma forma activa da cinase, do que em embriões selvagens.

Num segundo tipo de ensaio, realizado com extractos "cell-free", verificámos que estas mesmas três proteínas são fosforiladas pelas cinases endógenas a um maior grau em extratos de embriões selvagens do que em extractos de embriões *polo*^{1}. Este resultado em conjunto com o do ensaio anterior sugere que os três polipeptidos correspondem a substratos fisiológicos da cinase polo.

A realização de ensaios de cinase com extractos de microtúbulos e a utilização de um anticorpo monoclonal específico permitiram a identificação da proteína de 54kDa como sendo a β-tubulina.

O facto de a proteína de 85kDa co-imunoprecipitar com a β-tubulina nos ensaios de cinase sugeriu que a p85 poderá uma proteína associada a microtúbulos. Esta observação é confirmada pelo facto de a proteína polo reconhecer uma proteína de 85kDa, altamente enriquecida em preparações de microtúbulos, em ensaios de "ligand blotting".

Observou-se ainda que a proteína polo apresenta ela mesma características de proteína associada a microtúbulos e, muito significativamente, que é responsável por parte da actividade cinásica capaz de fosforilar a tubulina que co-purifica com microtúbulos.

Os resultados obtidos neste trabalho parecem pois fornecer uma base bioquímica para o fenótipo mutante observado e reforçam a ideia de que o polo tem um papel relevante associado à formação e/ou ao funcionamento de um fuso mitótico bipolar.

SUMMARY

The *Drosophila* gene *polo* encodes a protein kinase required for progression through mitosis. Mutations in this gene result in a high mitotic index and abnormal chromosome segregation in larval neuroblasts, Many of these cells do not proceed into anaphase and are characterized by having broad or disorganised spindle poles and some are clearly monopolar.

Our aim was to develop assays that could help in the identification of polo protein kinase physiological substrates.

We have found that polo protein kinase is capable of using casein as a exogenous substrate and belongs to the ser/thr protein kinase family. We also show that polo is itself a phosphoprotein and phosphatase treatment abolishes the kinase activity.

We have determined putative polo substrates using two different assays. In the first type of assay, exogenous polo protein kinase phosphorylates proteins of sizes 220kDa, 85kDa and 54kDa, to a greater extent when added to extracts of *polo*^{1}-derived embryos (where the kinase is catalytically inactive) compared to extracts of wild-type embryos. Both types of extracts had been previously subject to mild heat-treatment to inactivate endogenous kinases.

In the second type of assay, we have used a cell-free system derived from Drosophila embryos. Proteins of the same size are predominantly phosphorylated by the endogenous kinases present in wild-type extracts, and are either not phosphorylated or are poorly phosphorylated in extracts of *polo*^{1}-derived embryos.

Assays with microtubule preparations and the use of a monoclonal antibody allowed the identification of the 54kDa phosphorylated by polo protein kinase in the embryo extracts as β -tubulin.

Our observations that the monoclonal antibody to β-tubulin precipitates the phosphorylated 54kDa protein together with an associated 85kDa protein also phosphorylated by polo protein kinase suggest that the p85 is a microtubule associated protein. Moreover polo binds to an 85kDa protein that is enriched in microtubule preparations.

We have further shown that polo co-purifies with microtubules and is responsible for part of the kinase activity able to phosphorylate β-tubulin associated with microtubules.

Our results seem to give a biochemical base to the observed mitotic phenotype and reinforce the idea for a role of polo in the assembly/function of a bipolar mitotic spindle.

RESUMÉ

Le gène *polo* de *Drosophila melanogaster* code pour une protéine kinase nécessaire à la progression de la mitose. Mutations dans ce gene entrainent un fort index mitotique et une segregation anormale des chromosomes dans les neuroblastes larvaires. Un grand nombre de ces cellules n'atteind pas le stade d'anaphase et presente pour caracteristiques des poles du fuseau mitotique diffus et desorganisés, certains d'entre eux étant clairement monopolaires.

Notre but a été de developper des approches experimentales qui permettraient d'identifier des substrats physiologiques pour la protéine kinase polo.

Nous avons mis en évidence que polo est capable d'utiliser la caseíne comme substrat exogéne et appartient à la famille des kinases à ser/thr. Nous avons aussi montré que polo est elle-même phosphorylée et qu'un traitement par des phosphatases abolit son activité catalityque.

Nous avons identifies des substrats potentiels de polo en utilisant deux types d'approches. Dans des extraits embryonnaires, dans lesquels la protéine kinase endogène a été inactivée par un traitment doux à la chaleur, l'addition de polo exogène entraine la phosphorylation de protéines de 220kDa, 85kDa et 54kDa. Ces phosphorylations sont plus intenses quand on utilise des extracts d'embryo *polo*^{1}, dans lesquels la kinase est catalytiquement inactive, comparées à des embryons sauvages.

Dans le deuxiéme type d'approche, nous avons utilisé un système acellulaire à partir d'embryons mutants *polo*^{1} et d'embryons sauvages. Des proteínes de tailles similaires à celles observées dans l'approche prècédente sont majoritairement phosphorylées par la kinase endogène presente dans les extraits d'embryons sauvages mais ne sont pas, ou sont faiblement phosphorylées, dans les extraits d'embryons *polo*^{1}.

L'utilisation de préparations de microtubules et d'anticorps monoclonaux ont permis d'identifier la proteíne de 54kDa phosphorylée par polo comme étant la β-tubuline.

Un anticorps monoclonal contre la β-tubuline co-precipite la proteíne phosphorylée de 54kDa avec la proteíne de 85kDa, elle-même phosphorylée par polo. Ceci suggère que cette proteíne (85kDa) soit associée aux microtubules. De plus polo reconnait une proteíne de 85kDa enrichie dans des préparations de microtubules.

Nous avons enfin montré que polo co-purifie avec microtubules et est en partie responsable de l'activité kinase associée aux microtubules capable de phosphoryler la β-tubuline.

Les resultats obtenus semblent expliquer le phenotype mutant observé et renforce l'idée que polo a un role dans la formation/fonctionnement d'un fuseau mitotique bipolaire.

ABREVIATURAS

a.a.	- aminoácido
A. nidulans	- *Aspergillus nidulans*
Aspergillus	- *Aspergillus nidulans*
ATP	- trifosfato de adenosina
bp	- par de bases
cDNA	- DNA complementar
Cdk	- cinase dependente de ciclina.
DNA	- ácido desoxirribonucleico
D. melanogaster	- *Drosophila melanogaster*
dNTP	- 5′ trisfosfato de desoxirribonucleósido
Drosophila	- *Drosophila melanogaster*
DTT	- ditiotreitol
E. coli	- *Escherichia coli*
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
e.g.	- *exempli gratia* - por exemplo
EGTA	- ácido etileno glicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N′,N′-tetracético
EMS	- Sulfato de etil-metano
HEPES	- ácido N-(2-hidroxietilpiperazina)-N′-(2-etanossulfónico)
i.e.	- *id est* - isto é
IPTG	- isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	- kilobases
kDa	- kilodalton
Klp	- proteína tipo cinesina
MBC	- metil-benzimidazole-2-ilcarbamato
min	- minuto
mRNA	- RNA mensageiro
MW	- peso molecular
ser	- serina
Refs	- referências
r.p.m.	- rotações por minuto
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RNA	- ácido ribonucleico
S. cerevisiae	- *Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe	- *Schizzosaccharomyces pombe*
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TLC	- Cromatografia de camada fina
tre	- treonina
X-GAL	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido
Xenopus	- *Xenopus laevis*

Nota: Optou-se por não se traduzir alguns termos de Biologia Molecular utilizados correntemente em inglês, sendo antes indicados no texto pela utilização de aspas.

ÍNDICE

RESUMO *vi*
SUMMARY *vii*
RESUMÉ *viii*

CAPÍTULO 1.- INTRODUÇÃO

1.1- CICLO CELULAR **1**
1.1.1- Análise genética do ciclo celular 2
1.1.2- Análise bioquímica do ciclo celular 5
1.1.3- Controlo do ciclo celular 5
1.1.4- Mecanismos de controlo 8
Transcrição 8
Proteólise 9
Inibidores 11

1.2- MITOSE **11**
1.2.1- Cromossomas 12
1.2.2- Microtúbulos e centrossomas 14
1.2.3- Dinâmica do fuso, movimento cromossómico e motores 20

1.3- Regulação da $p34^{cdc2}$ durante a mitose. Um modelo geral. **24**
1.3.1- As cinases wee1, a mik1 e myt1 inibem a mitose fosforilando a $p34^{cdc2}$ 25
1.3.2- A CAK activa a cdc2 fosforilando o resíduo T161 26
1.3.3- A cdc25 induz a mitose desfosforilando a $p34^{cdc2}$ 27

1.4- A REGULAÇÃO DA MITOSE EM *DROSOPHILA* **28**
1.4.1- Desenvolvimento embrionário 28
1.4.2- Mutantes mitóticos em *Drosophila* 31
1.4.3- Regulação mitótica do embrião sincício 32
1.4.4- Regulação mitótica das primeiras divisões zigóticas 33
1.4.5- Regulação mitótica das divisões na larva 34

1.5- O GENE *POLO* **35**
1.5.1- O gene *polo* encontra-se conservado noutros organismos 39
1.5.2- A cinase Plk é necessária durante a mitose 42
1.5.3- Os homólogos em leveduras 43
1.5.4- Têm as proteínas homólogas uma função homóloga ? 45

CAPÍTULO 2.- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Estirpes de *Drosophila melanogaster* e linhas celulares 47
2.2- Congelamento e descongelamento de linhas celulares 47
2.3- Marcação de células com ortofosfato 47

2.4- Preparação de células competentes 48
2.5- Preparação de DNA plasmídico 48
2.6- Doseamento de DNA e de proteínas 49
2.7- Clonagem de DNA 49
2.8- Geis de agarose e de poliacrilamida 49
2.9- Produção de proteína polo em sistema de baculovirus
2.9.1- Construção do plasmídeo recombinante 49
2.9.2- Transfecção de células Sf9 50
2.9.3- Isolamento de placas virais transformantes 50
2.9.4- Identificação de placas virais positivas 50
2.9.5- Produção de stock viral 51
2.9.6- Produção de proteína recombinante 51
2.10- Imunoprecipitações 52
2.11- Ensaios de cinase 52
2.12- Tratamento com fosfatases 53
2.13- Análise de fosfoaminoácidos 53
2.14- Preparação de extractos de microtúbulos 54
2.15- Western blotting 55
2.16- Ligand blotting 55

CAPÍTULO 3.- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POLO *IN VIVO*

3.1- Expressão de proteína polo em Baculovirus 57
3.2- Expressão de proteína polo em E. coli 61
3.3- Discussão 63

CAPÍTULO 4.- ANÁLISE BIOQUÍMICA DA CINASE POLO

4.1- A proteína polo é uma cinase 67
4.1.1- Ensaios com proteína polo produzida *in vitro* 67
4.1.2- Ensaios com proteína polo nativa 68
4.2- A cinase polo pertence à família das cinases serina/treonina 70
4.3- A proteína polo encontra-se fosforilada *in vivo* 70
4.4- A proteína polo tem de se encontrar fosforilada para ter actividade catalítica 73
4.5- Discussão 75

CAPÍTULO 5.- ACTIVIDADE DA PROTEÍNA MUTANTE POLO1

5.1- Embriões *polo*^{1} 78
5.2- Os níveis de mRNA e de proteína polo1 são normais em embriões *polo*^{1} 80
5.3- A proteína polo1 não tem actividade catalítica 82
5.4- A proteína polo1 não é correctamente fosforilada 84
5.5- Discussão 84

CAPÍTULO 6.- IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTRATOS DA CINASE POLO

6.1- Desenho de ensaios para identificação de substratos fisiológicos da cinase polo 87
6.2- Inactivação das cinases endógenas em extractos de embriões 90
6.3- A cinase polo fosforila três proteínas em extractos de embriões 94
6.4- Ensaios de cinase em extractos inactivados por calor 94
6.5- Ensaios de cinase em extractos "cell free" 99
6.6- Fosforilação de proteínas que co-precipitam com a proteína polo 100
6.7- Discussão 103

CAPÍTULO 7.- CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS DA CINASE POLO

7.1- A cinase polo fosforila a β-tubulina em extractos de microtúbulos 109
7.2- A p54 fosforilada pela cinase polo em extractos de embriões é a β-tubulina 112
7.3- A cinase polo fosforila a tubulina em resíduos de serina e de treonina 112
7.4- A proteína de 85kDa associa-se a microtúbulos 114
7.5- A proteína polo associa-se a microtúbulos 117
7.6- A cinase polo faz parte da actividade cinásica associada a microtubulos 119
7.7- Discussão 119

CAPÍTULO 8.- DISCUSSÃO FINAL

Actividade catalítica da cinase polo 126
Regulação da actividade catalítica do enzima polo 126
Função da cinase polo 128
A cinase polo fosforila proteínas associadas a microtúbulos 131
Outros substratos da cinase polo 133
Ensaio utilizado para identificação de substratos 135
Envolvimento de cinases tipo polo em G1/S ? 137

9.- BIBLIOGRAFIA 139

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1.1- Representação esquemática do ciclo celular 2
Fig. 1.2- Mutantes cdc 4
Fig. 1.3- Ordem no ciclo 7
Fig. 1.4- Degradação de proteínas durante a mitose 10
Fig. 1.5- Fases da mitose 12
Fig. 1.6- Centros organizadores de microtúbulos 15
Fig. 1.7- Alterações morfológicas nos centrossomas 15
Fig. 1.8- O ciclo centrossómico em animais 17
Fig. 1.9- O ciclo dos microtúbulos em levedura 18
Fig. 1.10- Efeitos da fosforilação na estabilidade de microtúbulos 20
Fig. 1.11- Proteínas motoras e centrossomas 22
Fig. 1.12- Activação/inactivação da cdc2 27
Fig. 1.13- Primeiras divisões no embrião de *Drosophila* 29
Fig. 1.14- Ciclo celular em embriões de *Drosophila* 31
Fig. 1.15- Figuras mitóticas em neuroblastos selvagens 36
Fig. 1.16- Figuras mitóticas em neuroblastos *polo* 37
Fig. 1.17- Comparação da estrutura primária de proteínas tipo-polo 40
Fig. 1.18- Árvore filogenética das proteínas tipo-polo 40
Fig. 1.19- Proteínas tipo-polo 41
Fig. 1.20- Fenotipo de mutantes polo e homólogos 44

CAPÍTULO 3

Fig. 3.1- Esquema de construção do baculovirus recombinante 58
Fig. 3.2- Detecção de proteína polo recombinante em células Sf9 59
Fig. 3.3- Detecção de proteína polo recombinante em extractos Sf9 59
Fig. 3.4- Produção de proteína poloB4 em células Sf9 60
Fig. 3.5- A proteína poloB4 tem actividade cinásica 60
Fig. 3.6- Comparação de poloB4 com polo nativa 62
Fig. 3.7- Estabilidade da actividade catalítica 62
Fig. 3.8- Proteínas de fusão em *E. coli* 64

CAPÍTULO 4

Fig. 4.1- Ensaio de cinase com proteína polo traduzida *in vitro* 69
Fig. 4.2- Ensaio de cinase com proteína polo nativa 69
Fig. 4.3- Análise de aminoácidos fosforilados na caseína 72
Fig. 4.4- A proteína polo é uma fosfoproteína 72
Fig. 4.5- Tratamento da cinase polo com fosfatases 74
Fig. 4.6- Tratamento de extractos de embriões com CIP 74

CAPÍTULO 5

Fig. 5.1- Embriões selvagens e embriões *polo1* 79
Fig. 5.2- Extractos de embriões selvagens e de embriões *polo1* 81
Fig. 5.3- A proteína polo1 não tem actividade catalítica 83
Fig. 5.4- A proteína polo1 não é correctamente fosforilada 83

CAPÍTULO 6

Fig. 6.1- Esquema do ensaio com extractos inactivados 88
Fig. 6.2- Esquema do ensaio com extractos "cell free" 89
Fig. 6.3- Inactivação de cinases endógenas 92
Fig. 6.4- Análise dos extractos após incubação a 55ºC 93
Fig. 6.5- A cinase polo fosforila três proteínas em extractos inactivados 96
Fig. 6.6- Ensaio de cinase em extractos (wt e polo1) inactivados 97
Fig. 6.7- Ensaios de cinase com PKA e PKC 98
Fig. 6.8- Ensaios de cinase em extractos "cell free" 101
Fig. 6.9- Comparação dos ensaios de cinase com extractos de embriões 102
Fig. 6.10- Fosforilação de proteínas que co-precipitam com o polo 102

CAPíTULO 7

Fig. 7.1- Preparação de extractos de microtubulos 111
Fig. 7.2- Caracterização do anticorpo Bx69 113
Fig. 7.3- A cinase polo fosforila a β-tubulina 113
Fig. 7.4- Análise de fosfoaminoácidos na β-tubulina 116
Fig. 7.5- A proteína de 85kDa associa-se a microtúbulos 116
Fig. 7.6- Associação da proteína polo a microtúbulos 118
Fig. 7.7- O polo faz parte da actividade cinásica assocoiada a microtúbulos 120

CAPÍTULO 8

Fig. 8.1- Possível local de fosforilação na proteína polo 128
Fig. 8.2- Regulação e função da cinase polo 129
Fig. 8.3- Fenótipo *polo*^{1}*/scant* 130
Fig. 8.4- Desenho de ensaios de cinase 136
Fig. 8.5- Desenho de ensaios de cinase 137

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1- CICLO CELULAR

A geração de organismos multicelulares a partir de uma unica célula, um ovo fertilizado, implica a existência de mecanismos de crescimento e de divisão celular. Cada célula deve duplicar a maioria dos seus constituintes antes de se dividir para que as células filhas sejam por sua vez capazes de se multiplicarem,. A maioria destes constituintes pode formar-se sem necessitar da existência prévia de um molde e está normalmente presente em grande número (eg. os ribossomas). A acumulação progressiva deste tipo de componentes celulares é usualmente exponencial e, por constituir o grosso do aumento da massa celular, é conhecida como crescimento celular. Um segundo tipo de constituintes existe intracelularmente apenas como uma ou duas cópias e requer a pré-existência de moldes para a sua formação, como é o caso dos cromossomas e dos centrossomas. Este tipo de constituintes duplica-se normalmente num ponto específico do ciclo celular.

Define-se como ciclo celular o intervalo que separa a formação de uma célula da sua divisão em células filhas, e subdivide-se o ciclo em fases de acordo com duplicação e divisão do seu material genético. Deste modo, a fase do ciclo em que ocorre a divisão do material genético é denominada mitose ou fase M, e a fase em que ocorre a duplicação deste material por fase S (de síntese). Os intervalos que separam a fase S do fim da mitose anterior, e do ínicio da próxima são conhecidos como G1 e G2, respectivamente. À mitose normalmente segue-se a divisão celular (citoquinése), mas esta última não é necessária para a continuação do ciclo cromossómico (ciclo de duplicação e segregação dos cromossomas), estando mesmo ausente durante largos intervalos no ciclo de vida de organismos sincício.

A duplicação e segregação dos cromossomas deve executar-se com fidelidade se ambas as células filhas (progenia) são supostas herdar um conjunto completo de instruções genéticas. Assim sendo não é de admirar que as células possuam mecanismos que controlem o decorrer da duplicação e da divisão do material genético, bloqueando ou atrasando fases do ciclo caso algum erro esteja a ocorrer durante estes processos. A divisão de outros componentes celulares não necessita de

ser tão precisa. Na realidade, a divisão celular assimétrica é extremamente comum e muitas vezes essencial para a formação de progenia com diferentes destinos de desenvolvimento. A necessidade de controlar a duplicação e divisão do material genético assume uma importância especial em organismos multicelulares. Nestes organismos, a ocorrência de divisões celulares inapropriadas durante a fase embrionária resulta normalmente em malformações ou mesmo morte do organismo e, em individuos adultos, originam muitas vezes o desenvolvimento de tumores. Por esta razão o interesse no estudo do ciclo celular é mais do que académico, podendo o conhecimento em pormenor dos mecanismos que regulam a divisão celular conduzir a novos tratamentos desta doença .

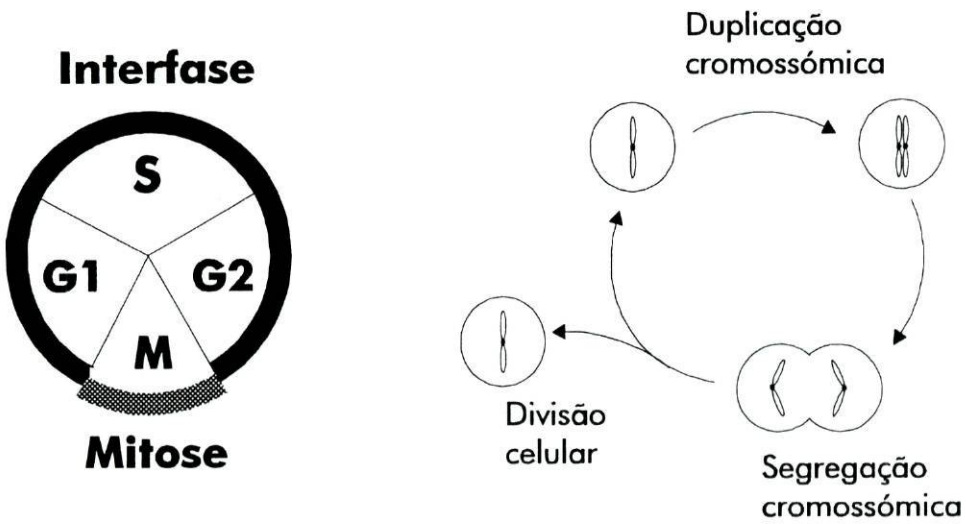


Fig.1- *Representação esquemática do ciclo celular.* A duração de cada fase varia consoante o organismo e consoante o tipo de célula.

1.1.1- Análise genética do ciclo celular

A análise do ciclo celular iniciou-se com estudos genéticos realizados em leveduras. Foi pelo isolamento de mutantes sensíveis à temperatura[1], em levedura *Saccharomyces cereviseae,* que se identificou o primeiro conjunto de genes que afectam o ciclo da divisão celular (Hartwell *et al,* 1973, 1974). Um pouco mais tarde, um segundo grupo de investigadores criou também de uma colecção de mutantes sensiveis à temperatura, mas utilizando como modelo a levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse *et al,* 1976).

[1] mutantes ts - temperature sensitive

Quando uma cultura assíncrona de mutantes ts é colocada à temperatura restritiva as células páram normalmente o crescimento ou divisão em pontos aleatórios do ciclo celular. Mas caso se trate de uma mutação num gene essencial para a realização de uma fase específica do ciclo, todas as células da cultura páram no ponto em que o produto do gene é necessário. Estes mutantes definem portanto genes importantes para o seguimento normal do ciclo de divisão celular e foram designados mutantes cdc[1]. O ponto de execução de cada mutante foi definido como o ponto do ciclo celular em que o produto do gene é normalmente necessário. O isolamento dos mutantes cdc é facilitado em levedura porque as células mudam de forma (a *S. cereviseae*, com o aparecimento da gemula) ou de tamanho (a *S. pombe*) consoante a fase do ciclo em que se encontram.

Infelizmente ambos os grupos classificaram os mutantes obtidos como mutantes cdc. Assim, quando mais tarde os genes homólogos foram isolados nos dois organismos verificou-se que o número dos mutantes não coincidia causando uma certa confusão. Por exemplo, o gene cdc2 de *S. pombe* tem o seu homólogo no gene CDC28 em *S. cereviseae*.

A análise dos mutantes cdc permitiu ainda estabelecer uma ordem temporal dos genes necessários para a progressão das células ao longo do ciclo celular, e obter a primeira definição molecular de pontos de controlo (checkpoints). Um ponto de controlo é definido como um mecanismo que assegura a dependência de um processo celular da execução de processos prévios (Hartwell e Weinert, 1989) (*eg.* a entrada em mitose depende de todo o genoma ter sido anteriormente replicado). De notar que nem todos os pontos de controlo são necessáriamente essenciais, como o que impede a entrada em mitose até o DNA ter sido reparado caso as células tenham sido sugeitas a radiação (que só funciona quando as células são expostas a radiação).

Foram ainda descritas outras classes de mutantes ts e que embora também envolvidas em pontos-de-controlo não páram o ciclo, como por exemplo a classe de mutantes wee[2]. Neste caso as células destes mutantes continuam a dividir-se mas antes de terem atingido o tamanho necessário, resultando numa população de células minusculas (wee), interpretando-se este fenótipo como uma necessidade do produto destes genes para impedir as células de uma entrada prematura em divisão.

[1] cdc - **c**ell **d**ivision **c**ycle
[2] wee - do escoçês para minusculo, pequenino

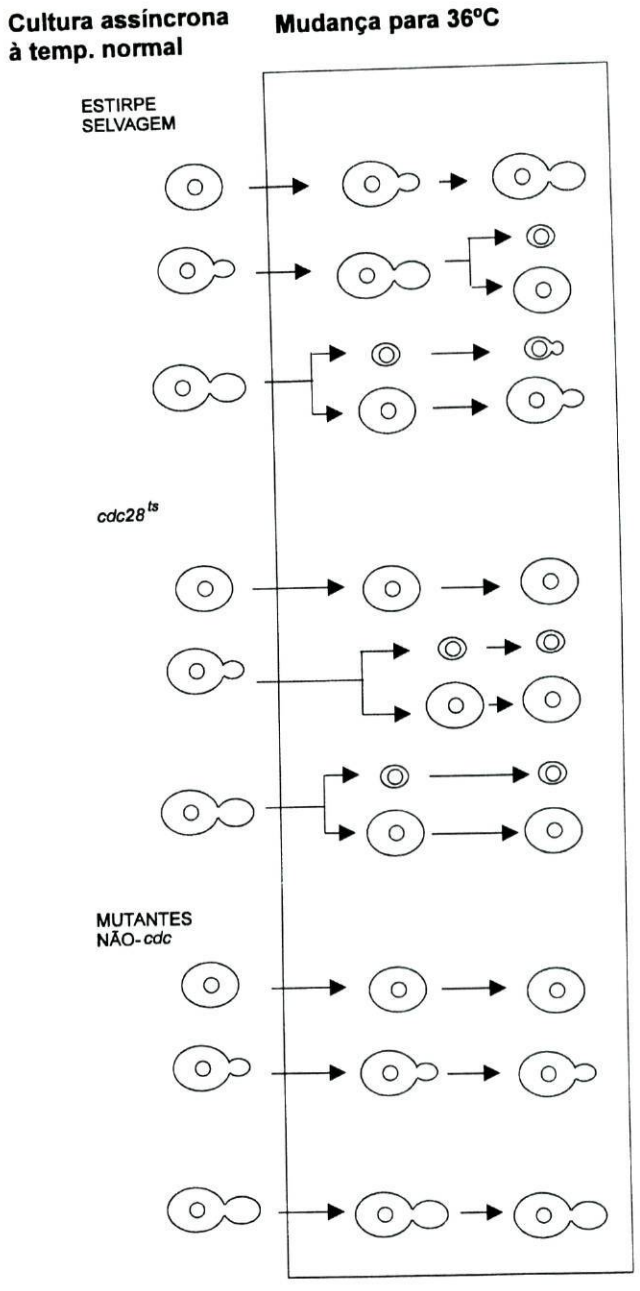


Fig. 1.2- *Mutantes cdc*. Os mutantes *cdc* sensíveis à temperatura destinguem-se dos outros mutantes sensíveis à temperatura devido ao seu comportamento quando colocados à temperatura restrictiva. Quando se coloca uma cultura assíncrona à temperatura restrictiva, na maioria dos mutantes sensíveis à temperatura as células páram, individualmente, em alturas aleatórias do ciclo celular. No caso de um mutante *cdc*, no entanto, todas as células da população páram no mesmo ponto do ciclo celular (exemplo: cdc28). A figura apresentada refere-se a *S. cereviseae.*

1.1.2- Análise bioquímica do ciclo celular

A análise bioquímica do ciclo celular também se iniciou em meados dos anos 70. Uma série de experiências elegantes, por Johnson e Rao, mostraram que existem controlos que ordenam as fases do ciclo celular (Johnson & Rao, 1970; Rao & Johnson 1970). As experiências de fusão celular destes autores, indicam por exemplo que a fase M é dominante sobre as outras fases do ciclo, i.e., que a fusão de uma célula em fase M com uma célula noutra fase do ciclo induz o início de mitose nesta última (quer estas se encontrem nas fases G1, S ou G2). Esta observação sugeriu a existência nas células na fase M de um factor capaz de induzir a mitose. Noutras experiências verificou-se ainda que uma célula em G2, fundida com uma célula na fase S, não inicia a mitose até que o nucleo da fase S tenha completado a replicação do DNA.

A existência de um factor indutor de mitose (a que se passou a chamar MPF[1]) foi confirmada com experiências de transferência de citoplasma de ovos de *Xenopus*. Verificou-se que a injecção de citoplasma de ovos maduros em oócitos induzia a maturação destes últimos (Masui and Market 1971). Quando purificado o MPF verificou-se que era composto por uma proteína cuja concentração intracelular variava ao longo do ciclo celular (a que se chamou ciclina) e por uma subunidade catalítica identificada como sendo a cinase codificada pelo gene cdc2 de *S. pombe* (Evans *et al,* 1983; Labbe *et al,* 1989; Gautier *et al,* 1990).

A capacidade do MPF isolado de células de mamífero de induzir a maturação em oócitos de *Xenopus* sugeriu que os genes necessários para o ciclo celular se encontram conservados entre organismos. Esta hipótese foi definitivamente provada com o isolamento do homologo humano do gene cdc2/CDC28 por complementação em levedura (Lee and Nurse 1987).

1.1.3- Controlo do ciclo celular

Os passos essenciais do ciclo celular, as fases S e M, têm que se manter obrigatóriamente alternados de modo a ser preservada a ploidia genómica. Só muito

[1] MPF - inicialmente de **M**aturation **p**romoting **f**actor, mas agora sub-entende **M**-phase **p**romoting **f**actor

recentemente se fizeram grandes progressos na compreensão dos mecanismos que mantêm a ordem temporal correcta destes acontecimentos essenciais. O início de ambas as fases é controlada por um conjunto de cinases que se associam a subunidades proteicas da família das ciclinas, sendo por isso chamadas cinases-dependentes-de-ciclinas ou, abreviadamente, Cdks[1] (revisto em Gould, 1994; Nigg, 1995). A proteína p34, produto do gene cdc2 em *S. pombe*, foi o primeiro membro desta família a ser descrito, e com a descoberta de que era a subunidade catalítica do MPF alcançou um estatuto padrão, sendo as Cdk referidas muitas vezes na literatura em relação à $p34^{cdc2}$.

Em leveduras está descrita apenas uma Cdk, denominada CDC28 em *S. cereviseae* e cdc2 em *S. pombe*, obtendo-se diferentes cinases funcionais pela associação desta subunidade catalítica com diferentes ciclinas (revisto em Nasmyth, 1993). Em *S.cereviseae*, por exemplo, à CDC28 associam-se as ciclinas CLN1-CLN3 aquando da decisão de começo da divisão (START[2]), as ciclinas CLB5 e CLB6 antes da entrada na fase S, e as ciclinas CLB1-CLB5 para que se possa formar fuso mitótico e se complete a fase M (Epstein & Cross 1992; Fish *et al,*. 1992; Richardson *et al,* 1992; Schwob and Nasmyth 1993).

Em eucariotas multicelulares o panorama é mais complicado pois existe não uma só Cdk mas uma família complexa de destas subunidades catalíticas, e que embora estruturalmente relacionadas são funcionalmente distintas. Mais uma vez, diferentes ciclinas estão relacionadas com diferentes fases do ciclo e, desta vez, por diferente associação a diferentes Cdks (por exemplo Fang e Newport 1991; Baldin *et al,*. 1993; van den Henwel *et al,* 1993; Knoblich *et al,* 1994; para revisões ver Solomon 1993; Nigg, 1995). Os complexos ciclina-Cdk envolvidos nos vários eventos do ciclo diferem quer a nivel das subunidades ciclina quer a nivel da subunidade Cdk associada. Por exemplo, e muito simplificadamente, a transição G2-M é controlada pela cinase cdc2 associada com as ciclinas G2 (ciclinas A e B) ao passo que a passagem po G1 e S parece ser controlada pelas cinases Cdk4/6 e Cdk2 em conjunto com as ciclinas G1 (ciclinas D e E) (para revisão ver Sherr 1995).

[1] Cdk- cyclin dependent kinase

[2] O ponto START foi inicialmente definido como o ponto do ciclo celular em que a célula se compromete a iniciar os mecanismos conducentes à divisão. Uma vez ultrapassado este ponto a célula não pode voltar atrás no ciclo e tem de prosseguir os processos que a conduzem à divisão.

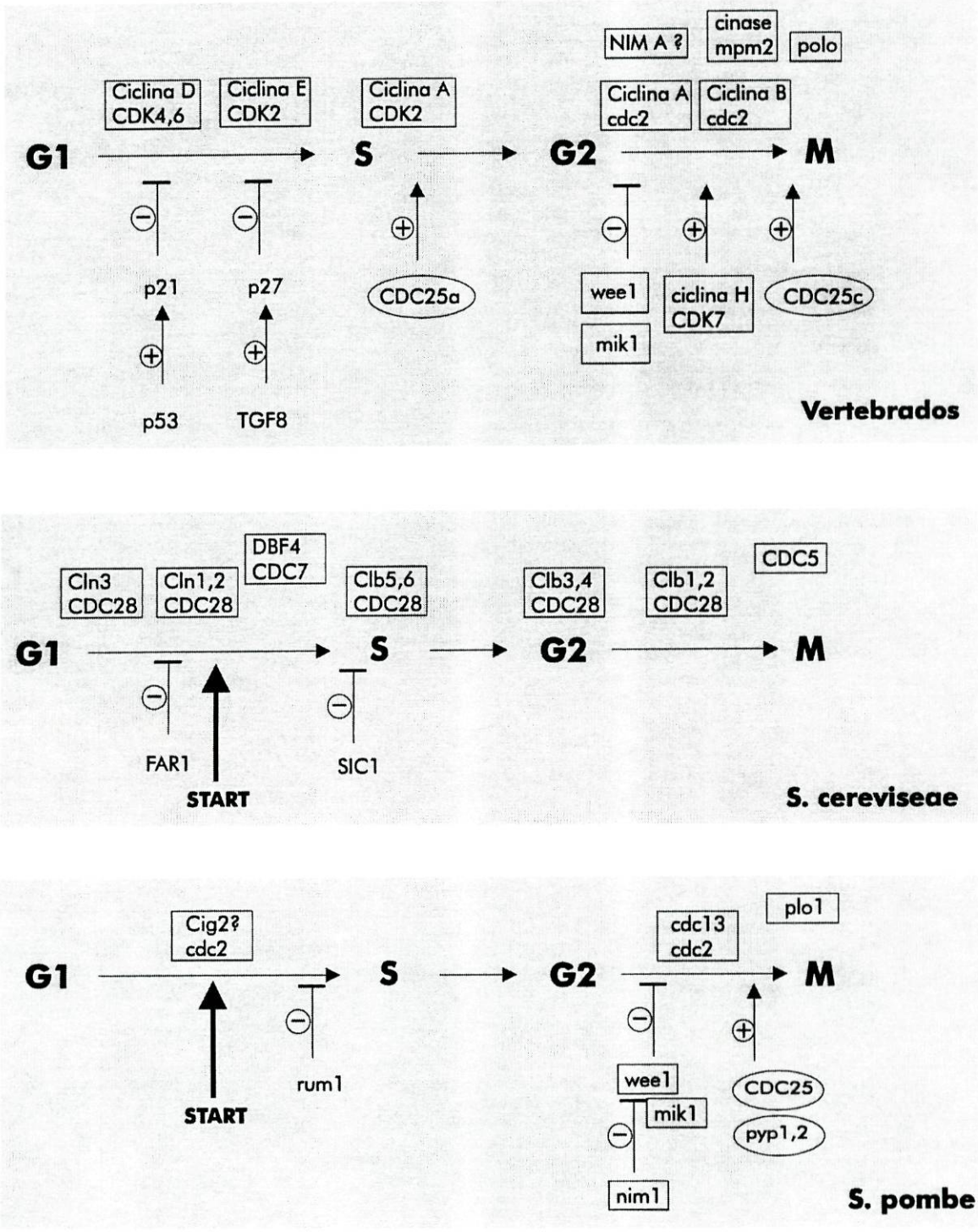


Fig. 1.3- *Ordem no ciclo celular.* Neste esquema apresentam-se algumas das moléculas envolvidas no controlo das diferentes fases do ciclo celular. As cinases estão respresentadas sob a forma de quadrados e as fosfatases sob a forma oval. O efeito activador ou repressor de cada molécula é indicado por um sinal + ou - respectivamente. No texto incluem-se descrições mais detalhadas de cada molécula.

1.1.4- Mecanismos de controlo

O controlo do ciclo celular é efectuado, sobre as proteínas que regulam as fases do ciclo, por diversos mecanismos que actuam a vários níveis. O controlo principal parece residir na modificação da actividade das proteínas necessárias por fosforilação/desfosforilação. E este controlo não é só exercido pelas cinases tipo Cdk, pois mesmo a activação dos diferentes complexos ciclina-Cdks está ela mesma, na maioria dos casos, dependente da acção de uma rede complexa de cinases e de fosfatases. É deste modo, por exemplo, que o ponto de controlo que em G2/M monitoriza se a síntese/reparação de DNA se completou, bloqueia a activação do MPF (ver por exemplo Hayles *et al.* 1994; revisto em Roberge 1992). Mas as modificações pós-traducionais por fosforilação/desfosforilação de proteínas não são o único modo que as células têm de controlar o ciclo celular. Alguns dos outros mecanismos consistem na regulação de

- **Transcrição**

E.g., as células podem a controlar a actividade dos complexos ciclina-Cdk através de uma expressão regulada das ciclinas. O controlo transcricional da expressão das ciclinas resulta na acumulação ordenada e periódica das ciclinas G1 e G2[1] permitindo que a sua concentração intracelular apenas atinja um pico na fase em que são necessárias. Em *S. cereviseae* este controlo transcricional envolve vias de retroacção (feedback) positivas e negativas. As ciclinas G1 CLN1 e CLN2, assim como a ciclina G2 CLB2, são capazes de estimular a transcrição dos seus próprios genes (Cross e Tinkelenberg 1991; Dirick e Nasmyth, 1991; Amon *et al,* 1993). E, muito importante, a ciclina CLB2, cuja função se executa na fase G2, é também capaz de suprimir a transcrição das ciclinas CLN1 e CLN2, necessárias na fase G1(Amon *et al,* 93). Obtém-se assim um mecanismo das células controlarem o inicio de processos chaves na altura exacta: as ciclinas G1 permitem a execução da fase G1 e impedem simultâneamente a realização da fase G2, enquanto as ciclinas G2 permitem a entrada em M e impedem a entrada numa fase G1/S.

[1] Ciclinas G1 e ciclinas G2- ciclinas necessárias para a execução das fases G1 e G2, respectivamente.

- **Proteólise**

Em leveduras, a substituição da transcrição periódica de qualquer das ciclinas G1 e G2 por transcrição contínua não é incompatível com uma progressão ordenada ao longo do ciclo (ver por exemplo Ghiara *et al,* 1991; Amon *et al,* 1994). E além disso os ciclos celulares embrionários de muitas espécies, incluindo *Xenopus* e *Drosophila,* dependem exclusivamente dos produtos maternos depositados no ovo durante a oogenese, e prosseguem normalmente na ausência completa de transcrição.

Um destes mecanismos pós-transcricionais reside no controlo da estabilidade das ciclinas G2. A degradação abrupta destas proteínas durante a mitose resulta na inactivação da cinase cdk associada e permite a saída de mitose (Glotzer *et al,* 1991; Holloway *et al,* 1993; Surana *et al,* 1993). Dados obtidos em *Drosophila* e *S. cereviseae* indicam que a reacumulação de ciclinas G2 após a mitose é dependente da presença de ciclinas G1 (Amon *et al,* 1994; Knoblich *et al,* 1994) uma vez que o sistema de degradação das ciclinas G2, activado durante a mitose, parece permanecer activo durante a interfase seguinte até ser inactivado por ciclinas G1. Deste modo, a acumulação de ciclinas G2 após a mitose não pode acontecer antes da acumulação de ciclinas G1. Presumivelmente este controlo impede a entrada numa segunda mitose antes que uma fase S tenha ocorrido (Enoch *et al,* 1992; Kelly *et al,* 1993; Saka e Yanagida 1993; Weinert *et al,* 1994). Conhece-se menos acerca dos controlos que impedem a entrada numa segunda fase S antes da ocorrência de mitose. Um modelo atractivo envolve a existência de um factor de licenciamento, postulada com base em experiências realizadas com extractos de ovos de *Xenopus,* mas cuja identidade molecular permanece desconhecida (Blow e Laskey 1988; Blow 1993; Coverley *et al,* 1993). De acordo com este modelo, o início da fase S depende da presença no núcleo do factor de licenciamento. Este factor deverá acumular-se no citoplasma durante a interfase e só ter acesso à região do núcleo após o desaparecimento da membrana nuclear durante a mitose. Uma vez no núcleo é necessário e consumido durante a execução da replicação do DNA (fase S). Para que uma segunda fase S possa ocorrer é necessário que novo factor tenha acesso ao nucleo e para tal é necessário que as células passem primeiro por mitose.

Durante a mitose, parece ser necessária a degradação específica de certas proteínas para que se dê a execução ordenada das diferentes etapas. Por exemplo,

proteínas cromossomais como de coesão e segregação cromossómica, sofrem uma degradação abrupta nesta fase. Esta degradação observada processa-se numa ordem específica. Por exemplo, a ciclina A é degradada antes da transição metafase/anafase, enquanto que a degradação da ciclina B ocorre imediatamente após esta transição (Surana *et al,* 1993; Holloway *et al,* 1993). Acerca dos mecanismos que medeiam esta cascata proteólitica sabe-se já que são, pelo menos em parte, mediados pela ubiquitina (Glotzer *et al,* 1991; Hershko *et al,*. 1991). Observou-se que inibidores da ubiquitinação embora impeçam a entrada em anafase não têm este efeito por impedirem a degradação da ciclina B (*e.g.* Holloway *et al,*. 1993). É a degradação de outras proteínas, executada pelo recém identificado complexo APF[1], que contém as proteínas CDC16, CDC23 e CDC27 (em levedura, mas já foram identificadas proteínas homólogas noutros organismos), que leva as células para além da metafase (Tugendreich *et al,*. 1995; Irniger *et al,*. 1995; King *et al,*. 1995; para revisão ver Glotzer 1995). Interessantemente o complexo ciclina B/p34^{cdc2} é responsável pela degradação da sua própria ciclina por activação do complexo APF (Luca *et al,* 1991). Exemplos de outras proteínas que são degradadas durante a mitose, embora não se tenha mostrado que o complexo APF é o responsável pela sua degradação, são as envolvidas na coesão das cromatides irmãs até ao final da metafase, como as proteínas cut2 de *S. pombe* (Funabiki *et al,*. 1996) e pimples de *Drosophila* (Stratmann e Lehner, 1996), ou ainda a topoisomerase II, as INCENPs (proteínas que se situam entre as cromátides irmãs), e a CENP-E (uma proteína motora tipo cinesina) (Heck *et al,* 1988; Cooke *et al,*. 1987;Yen *et al,*. 1992),

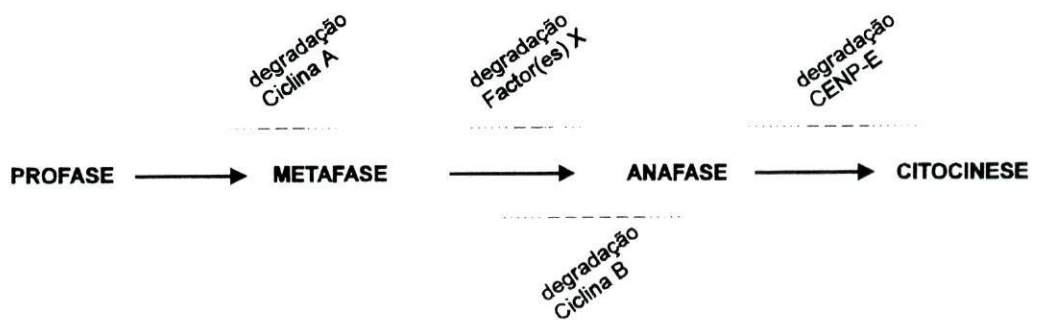


Fig. 1.4- *Sequência de degradação de proteínas ao longo da mitose.* Durante a mitose a degradação de certas proteínas egue uma ordem específica. As proteínas que têm de ser degradadas para que a anafase comece e responsáveis pela separação das cromatídeos irmãos ainda não estão identificadas (na figura representadas como factor X).

[1] APF- de **A**naphase **P**romoting **F**actor, factor promotor da anafase.

- **Inibidores**

Até muito recentemente a proteína suc1 era o único inibidor identificado de um complexo ciclina/Cdk mas a descrição de uma série de proteínas de baixo peso molecular que têm a capacidade de inibir especificamente associações específicas de ciclina/Cdk veio indicar que este é afinal um mecanismo vulgar de controlo à divisão celular. Estes inibidores (chamados CKIs[1] - entre os quais se incluem as p16, p21 e p27) ligam-se aos complexos ciclina-CDKs interligando-os a sinais externos, tais como factores de crescimento e antimitogéneos, integrando a divisão celular com estimulos ambientais e de desenvolvimento (para revisões ver Sherr 1995; Heichman e Roberts 1995; Hunter e Pines 1995).

1.2- MITOSE

A mitose resulta na segregação fiel do material genético para as células filhas bem como na divisão e distribuição de organelos celulares. Embora seja essencialmente um processo contínuo é tradicionalmente dividida em quatro fases fácilmente observáveis. A primeira destas fases, a profase, começa quando as longas fibras de cromatina se condensam em cromossomas compactos visíveis ao microscópio óptico. À medida que a condensação cromossómica avança observa-se uma divisão longitudinal dos cromossomas nos dois cromatídeos irmãos. Simultaneamente, a partir dos centrossomas que préviamente se dividiram e separaram, os microtúbulos formam arranjos paralelos que se estendem dum lado ao outro da célula formando o fuso mitótico. A fase seguinte, metafase, caracteriza-se pelo desaparecimento da membrana nuclear e pela ligação dos cromossomas aos microtúbulos do fuso mitótico. Uma vez unidos a ambos os polos do fuso os cromossomas deslocam-se para a zona central do fuso, formando a chamada placa metafásica. A ligação dos cromossomas ao fuso efectua-se pela interacção dos microtúbulos com uma estrutura especializada na superfície dos cromossomas, na região da constricção primária, chamada cinétocoro. Cada cromátide liga-se, por intermédio do seu cinétocoro, a microtúbulos que emanam de cada um dos polos, ficando no final os dois cromatídeos irmãos ligadas a polos opostos do fuso. Uma vez

[1] Cki - de cyclin dependent kinase inhibitor.

ligados a ambos os polos os cromossomas movimentam-se apra a zona central do fuso formando a placa metafásica. Durante a fase seguinte, a anafase, ocorre a separação dos cromatídeos irmãos que então se movimentam para polos opostos do fuso (anafase A), e os polos do fuso afastam-se ainda mais um do outro (anafase B). Na telofase, a última fase da mitose, a cromatina descondensa-se, reforma-se a membrana nuclear, o fuso mitótico é despolimerizado e a célula divide-se em duas células filhas (citoquinése). Esta é a descrição, muito sumária, de uma mitose típica em células eucariotas superiores e embora possam existir diferenças de organismos para organismo, estas são geralmente de detalhe e as linhas gerais encontram-se conservadas.

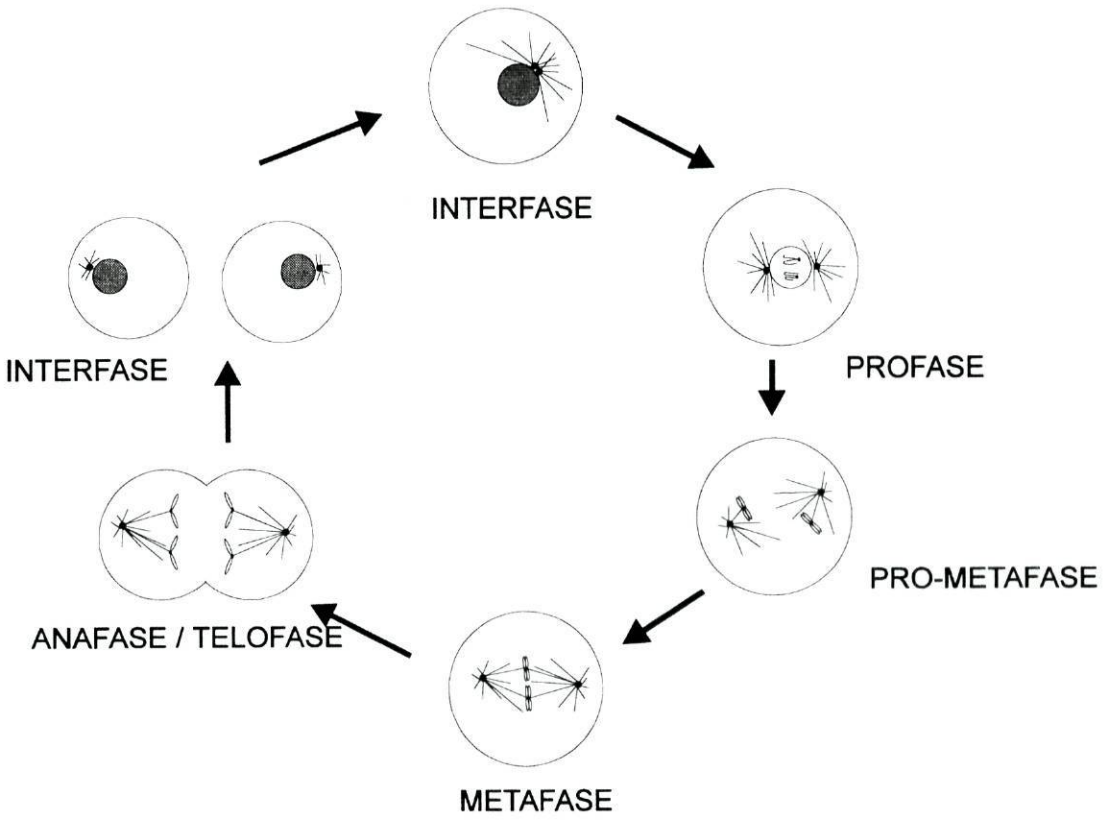


Fig. 1.5- *Fases da mitose.* Tradicionalmente dividida em profase, metafase, anafase, e telofase, alguns autores consideram ainda uma pró-metafase, durante a qual se dá a captura dos cromossomas pelos microtúbulos.

1.2.1- Cromossomas

Durante a mitose os cromossomas assumem uma forma altamente compacta, com os cromatídeos irmãos unidos em toda a extensão, sendo visível uma zona de constrição primária (cinétocoro) através da qual se ligam aos microtúbulos do fuso

mitótico. Pouco se sabe ainda de como a condensação cromossómica se processa, sabendo-se apenas que parece ser iniciada pela acção da cinase NimA, um enzima que por sua vez é activado pela cdc2 (O'Connell *et al.* 1994; Lu e Hunter 1995; Ye *et al.* 1995). A NimA tem ainda a particularidade de ser a única cinase descrita, até agora, cuja degradação é necessária para que as células saiam de mitose (Pu e Osmani 1995).

A regulação da coesão dos cromatídeos irmãos tem uma importância crucial na distribuição correcta dos cromossomas durante a mitose (para revisões ver Miyazaki e Orr-Weaver, 1994; Holm, 1994; Holloway, 1995). Durante a pro-metafase os cromatídeos irmãos têm que estabelecer ligações com os polos opostos do fuso, processo que é simplificado pelo facto de estar unidos um ao outro. A coesão entre ambos permite ainda o monitorizar do processo. Os cromossomas com ligações bipolares estão sobre tensão, por forças mecanoquímicas, que, puxando-os para ambos os polos, os movimentam para a placa central do fuso (McIntosh 1991). Se um dos cinétocoros num dos cromossomas for destruído ou removido, o cromossoma move-se na direcção do polo ao qual ainda se encontra ligado pelo outro cinétocoro. Os polos do fuso parecem exercer forças nos dois sentidos, puxando e empurrando os cromossomas. Braços isolados dos cromossomas, que se separarm dos seu cinétocoro, afastam-se dos polos do fuso aopasso que o cinétocoro se move na direcção do polo (McIntosh e Koonce, 1989; Cassemeris *et al,* 1994). A ausência da tensão exercida por ambos os polos sobre um cromossoma, provocada por cromossomas livres ou ligados a um só polo, é detectada e provoca um atraso no início da anafase (Li e Nicklas 1995). O modo como esta detecção se processa pode estar relacionada com presença de um epítopo fosforilado que se observa apenas em cinétocoros que não se ligaram aos microtúbulos do fuso (Gorbsky e Ricketts 1993).

A coesão entre os cromatídeos, embora essencial para a formação da placa metafásica, tem de desaparecer de modo a permitir a segregação dos cromatídeos irmãos durante a anafase. A separação final e irreversível dos cromatídeos um do outro ocorre rápida e simultaneamente em todos os cromossomas na transição metafase/anafase. O desaparecer da coesão é controlado nas diferentes partes do cromossoma, tanto durante a mitose como durante a meiose. Uma perca sequencial da coesão, primeiro nos braços dos cromossomas e depois na região centromérica, é essencial para a distribuição correcta dos homólogos e irmãos nas meioses I e II (Kerrebrock *et al,* 1992; Miyazaki e Orr-Weaver 1992). Esta coesão entre cromatídeos

parece ser estabelecida por proteínas específicas (já referidas e ver também Bickel *et al.* 1996) e simultâneamente pelo entrecruzamento das cadeias de DNA que se estabelece durante a replicação. A existência deste entrecruzamento explica a necessidade da acção da topoisomerase II (um enzima que cataliza a descatenação das cadeias de DNA) durante a mitose (Holm *et al.* 1989; Shamu e Murray 1992).

1.2.2- Microtúbulos e centrossomas

Os microtúbulos, tubos ocos compostos maioritáriamente por heterodímeros de α- e de β-tubulina, têm uma diversidade de funções biológicas, sendo essenciais por exemplo para o transporte intracelular, mobilidade dos axonemas bem como actuando como citoesqueleto. Tanto a α-tubulina como a β-tubulina são proteínas que se encontram evolutivamente conservadas, e que estão codificadas por famílias multigénicas (revisto em Ludueña, 1993). Intracelularmente os microtúbulos organizam-se (nucleiam) a partir de centros organizadores de microtúbulos (MTOCs[1]), *e.g.* o centrossoma. Devido ao modo como as subunidades de tubulina se associam os microtubulos apresentam polaridade, sendo que uma das extremidades dos microtúbulos apresenta uma taxa incorporação/desincorporação de heterodímeros de tubulina cerca de 4x superior à outra extremidade. As extremidades com este ritmo superior de polimerização/despolimerização são denominadas de extremidades mais, e por oposição chama-se extremidades menos à outra ponta dos microtúbulos. No interior das células os microtúbulos nucleiam a partir dos MTOCs com a extremidade menos embebida neste organelo e com a extremidade mais a estender-se para o citoplasma. O facto da extremidade menos estar associada ao MTOC parece conferir estabilidade aos microtúbulos impedindo a despolimerização.

Estão descritas várias drogas que afectam a estabilidade dos microtúbulos. A presença de taxol ou de nocodazole e vinbastina em baixas concentrações estabiliza os microtúbulos (de Brabander *et al*,1986; Jordan *et al*, 1992). Por outro lado altas concentrações de colchicina, de nocodazole ou de vinblastina causam numa despolimerização destas estruturas (Salmon *et al*, 1984; Jordan *et al*, 1992). O tratamento de células com qualquer destas drogas resulta numa paragem do ciclo na metafase mitótica. A utilização destas drogas tem facilitado a preparação de

[1] MTOC - de **m**icrotubule-organising **c**enter

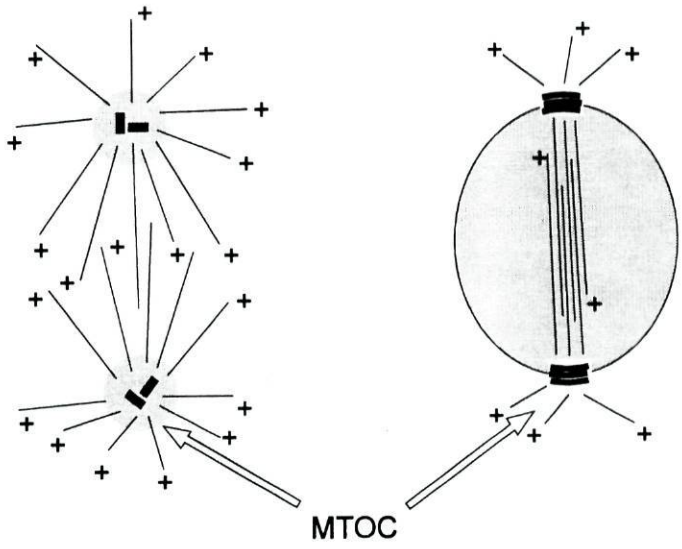


Fig. 1.6- *Centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) em células animais e em fungos.* Os centrossomas são os centros organizadores de microtúbulos, durante a mitose, em células animais (lado esquerdo da figura), ao passo que em leveduras e outros fungos (lado direito da figura) os organelos equivalentes são os corpos polares do fuso (SPB). Os organelos estão representados durante a mitose e não estão à escala. A extremidade menos dos microtúbulos encontra-se junto aos MTOCs (embebidas no material pericentriolar representado a cinzento nos centrossomas) e a extremidade mais extende-se para longe deles. No caso dos fungos a membrana nuclear não se desagrega durante a mitose crescendo os microtúbulos para o interior do nucleo).

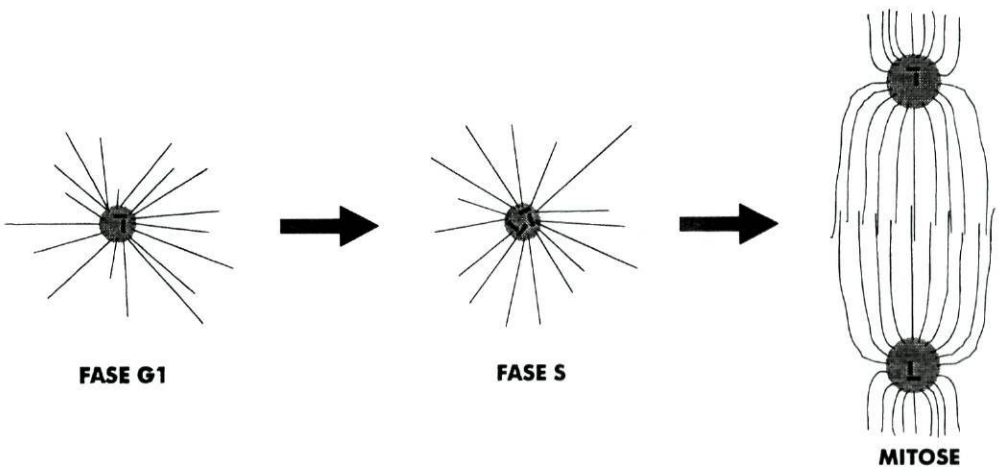


Fig. 1.7 - *Alterações morfológicas no centrossoma ao longo do ciclo celular.* Em células animais a duplicação dos centríolos ocorre durante a fase S mas os crentrossomas só se separam no início da mitose. Também é nesta altura que ocorre um aumento na quantidade do material pericentriolar (representado a cinzento) bem como um aumento dos microtúbulos nucleados por cada centrossoma.

cromossomas para análise microscópica bem como, no caso da vinblastina, auxilado no tratamento do cancro.

É a partir dos centrossomas que, em células animais, se organiza o fuso mitótico. Estas estruturas consistem em dois centríolos (cilindros de nove tripletos de microtúbulos em posição perpendicular relativamente um ao outro) rodeados por um material amorfo, denso quando observado ao microcópio electrónico, denominado material pericentriolar, e do qual emanam os microtúbulos. Os centrossomas parecem ser compostos por uma diversidade elevada de proteínas o que poderá reflectir uma complexidade funcional. Efectivamente, estes organelos têm de se duplicar, separar para extremos opostos da célula, nuclear microtúbulos e segregar o material genético. E para cada uma destas funções é esperada uma etapa de controlo, como por exemplo a que assegura que a duplicação centrossómica ocorre uma e só uma vez em cada ciclo. Em leveduras e outros fungos, o organelo equivalente ao centrossoma é o corpo polar do fuso (SPB[1]). Embora funcionalmente equivalentes são, no entanto estruturalmente diferentes. O SPB é composto por três camadas distintas ao microscópio, consistindo numa placa central, embebida directamente na membrana nuclear, e em duas camadas amorfas, uma intranuclear e outra citoplasmática chamadas placas interna e externa respectivamente. Tal como nos centrossomas, os microtúbulos irradiam a partir das camadas amorfas, com a extremidade mais afastando-se do SPB.

Os centrossomas sofrem mudanças características durante o ciclo celular. A entrada em mitose, por exemplo, é acompanhada por um aumento no número de microtúbulos nucleados pelo organelo (de 5 a 10 vezes mais) e também por um aumento dramático na quantidade de material pericentriolar e no nível de fosforilação das proteínas centrossomais (para revisões ver Kellogg *et al,* 1994; Rose *et al,* 1993).

O conhecimento sobre a estrutura e modo de funcionamento do centrossoma encontra-se fragmentado na descrição de proteínas que se sabem associadas a este organelo. Há já uma lista longa, se bem que incompleta, de proteínas centrossomais (Kalt e Schliwa, 1993). Estes autores proposeram uma classificação das proteínas centrossomais em quantro grupos, baseada na localização dessas proteínas ao longo do ciclo celular. Algumas proteínas, *e.g.* a γ-tubulina (ver abaixo), localizam-se apenas nos centrossomas, enquanto que outras, *e.g.* a cdc2 e as ciclinas, têm também

[1] SPB- de Spindle pole body.

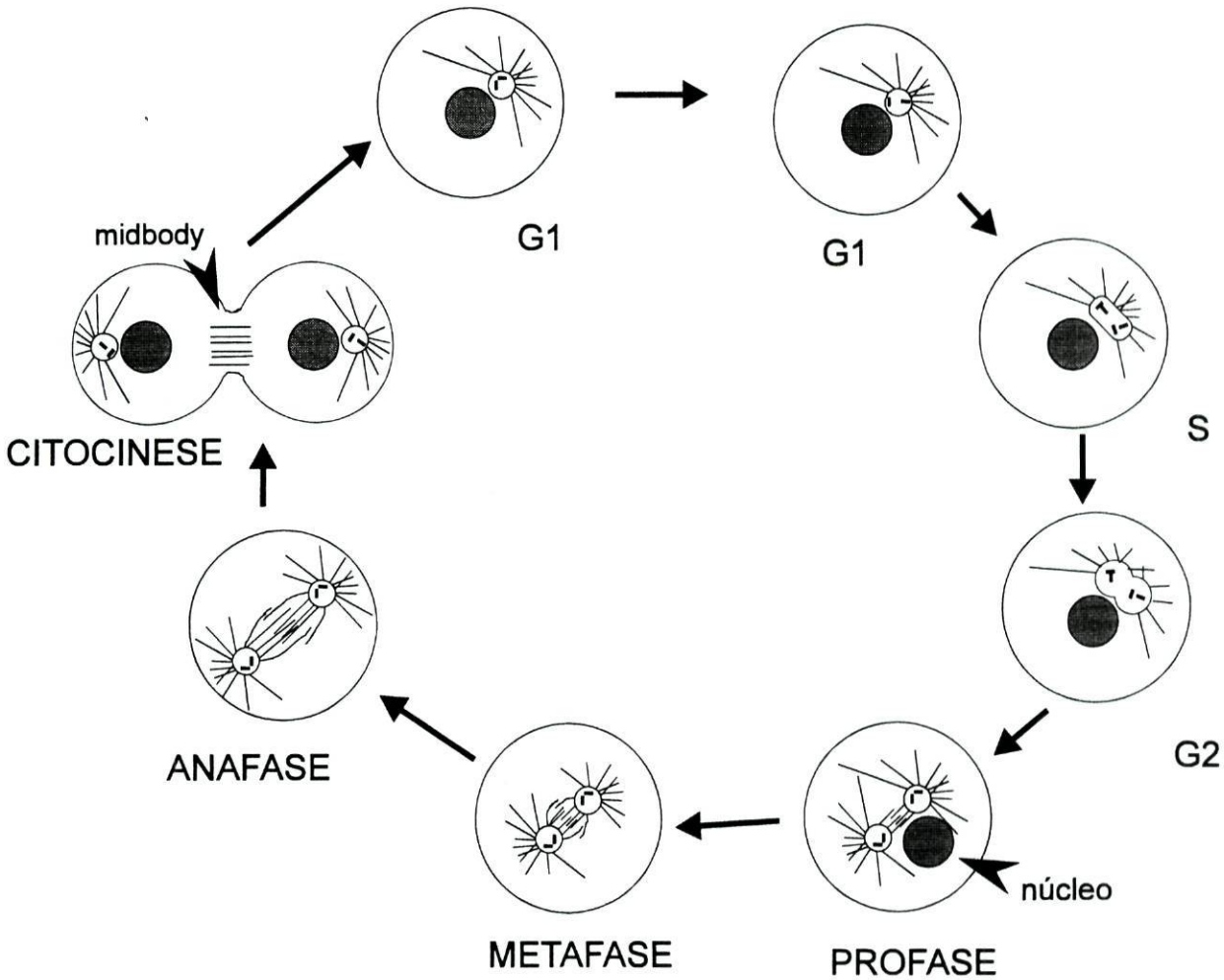


Fig. 1.8 - *O ciclo centrossómico em células animais.* Os centrossomas consitem num par de centríolos rodeados de material pericentriolar. Durante a fase G1 estes centríolos separam-se e durante a fase S seguinte é visível o aparecimento de novos centríolos próximos dos centríolos maduros. Durante a fase G2 estes centríolos recém criados atingem o tamanho dos centríolos maduros. Quando a mitose começa as características dos microtúbulos nucleados modificam-se e o seu número aumenta. Os centrossomas separam-se no início da mitose, afastando-se para lados opostos do nucleo, utilizando os microtúbulos interpolares que se interdigitam e onde estão localizadas várias proteínas motoras. Na anafase os centrossomas afastam-se ainda mais (anafase B). Quando ocorre a citocinése cada centrossoma é incorporado na respectiva célula filha. A figura não está à escala.

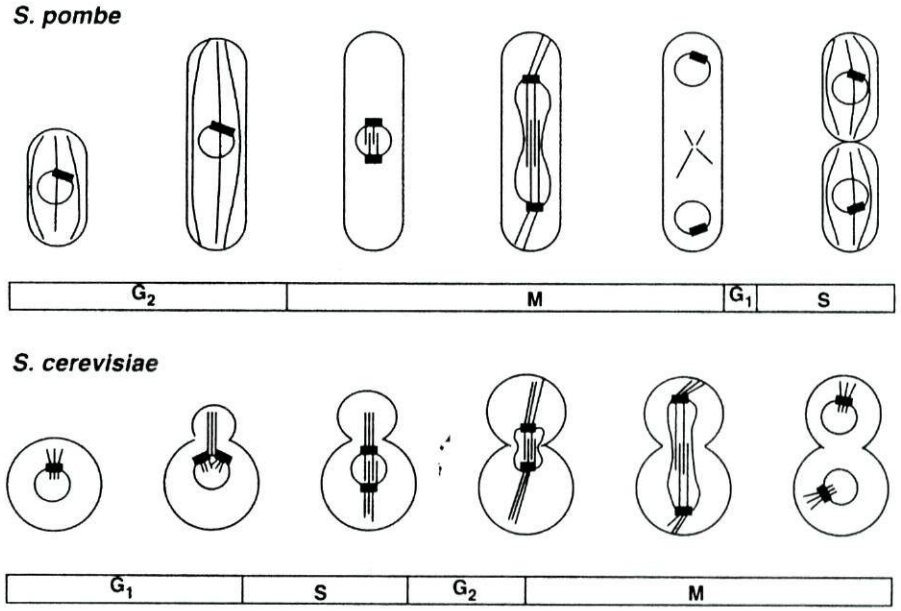


Fig. 1.9- *Ciclo dos microtúbulos em S. pombe e S. cereviseae.* Em *S. pombe* o fuso forma-se durante a fase M após os microtúbulos citoplasmáticos se terem despolimerizado. Em *S. cereviseae* o fuso forma-se durante a fase S, e a separação cromossómica ocorre durante a fase M.

funções noutros locais da célula. A identificação dessas proteínas centrossomais resulta essencialmente do esforço de vários laboratórios que desenvolveram técnicas de obtenção de extractos ricos em centrossomas, da utilização de soros obtidos de pacientes com doenças autoimunes, e de técnicas de genética clássica (revisto em Rose *et al,* 1993)

O isolamento da γ-tubulina, inicialmente de *Aspergillus nidulans* e posteriormente de muitos outros organismos, mostrou que esta é um componente ubíquo dos centrossomas de eucariotas superiores (revisto em Joshi, 1993; 1994; ver também Sobel e Snyder, 1995). A γ-tubulina é uma proteína essencial que se localiza no material pericentriolar e que se liga à extremidade menos dos microtúbulos (Stearns e kirschner 1994; Li e Joshi 1995). Os dados já reunidos indicam que a γ-tubulina interage directamente com o heterodímero de α-tubulina e β-tubulina e que é essencial para o nuclear dos microtubulos a partir dos centrossomas durante a mitose (ver por exemplo Masuda e Shibata 1996). Em *Drosophila* a γ-tubulina associa-se a duas outras proteínas centrossomais, a CP190 e a CP60 (Jordan *et al,* 1993), e este complexo poderá fazer parte das estruturas em forma de anel visíveis dispersas no material pericentriolar (Moritz *et al,* 1995). É a partir destes aneis que os os

microtúbulos poderão iniciar a sua nucleação. Estas estruturas em forma de anel foram já isoladas de extractos ovos de *Xenopus* e da sua composição proteica parecem fazer parte, além das tubulinas α-, β- e γ-, quatro outras proteínas com 75kDa, 109kDa, 133kDa e 195kDa (Zheng *et al,* 1995).

Uma outra proteína essencial para a função dos centrossomas é a pericentrina (Doxsey *et al,* 1994). Esta proteína de ~220kDa localiza-se no material pericentriolar, e tal como a γ-tubulina, parece ser essencial para o nuclear de microtúbulos a partir dos centrossomas. Ambas as proteínas são necessárias para que os centrossomas se tornem competentes (nucleiem os microtúbulos mitóticos) (revisto em Archer e Solomon 1994). O papel específico da pericentrina, bem como o de outras proteínas centrossomais essenciais como a centrin e a NuMA, se bem que essencial permanece ainda desconhecido (Schiebel e Bornens 1995; Cleveland 1995).

A fosforilação de proteínas centrossomais também parece ser importante para a sua função mitótica. Vandre *et al,* 1984; 1989) mostraram que ocorre a fosforilação de componentes centrossomais durante a mitose e que após o incício da anafase estas proteínas são desfosforiladas. A utilização de anticorpos MPM-1 e MPM-2, que se ligam a epítopos fosforilados em mitose, também indica um aumento substancial das proteínas centrossomais fosforiladas nessa fase do ciclo (Vandre *et al,* 1984; revisto em Rose *et al*, 1993). A pré-incubação com estes anticorpos ou com fosfatase alcalina inibe fortemente a capacidade dos centrossomas de nuclearem microtubulos (Centonze e Borisy, 1990). As cinases responsáveis por este incremento na fosforilação de proteínas centrossomais ainda não estão identificadas. A cinase cdc2 e a ciclina B foram detectadas na região dos polos do fuso (Alfa *et al*, 1990; Bailly *et al*, 1992) bem como a ciclina A foi detectada nos centrossomas no início da mitose (Bailly *et al*, 1992). Masuda *et al* (1992) mostraram que embora a cdc2 fosforile componentes centrossomais, não é suficiente para que a nucleação dos microtúbulos se inicie. Se se depletarem extractos em cinase MAP também não se observa um efeito significativo na capacidade dos centrossomas nuclearem microtúbulos. A activação dos centrossomas requer a actividade de uma outra cinase, podendo a cdc2 controlar esta activação indirectamente, fosforilando essa outra cinase (Ohta *et al* 1993; Masuda e Shibata 1996).

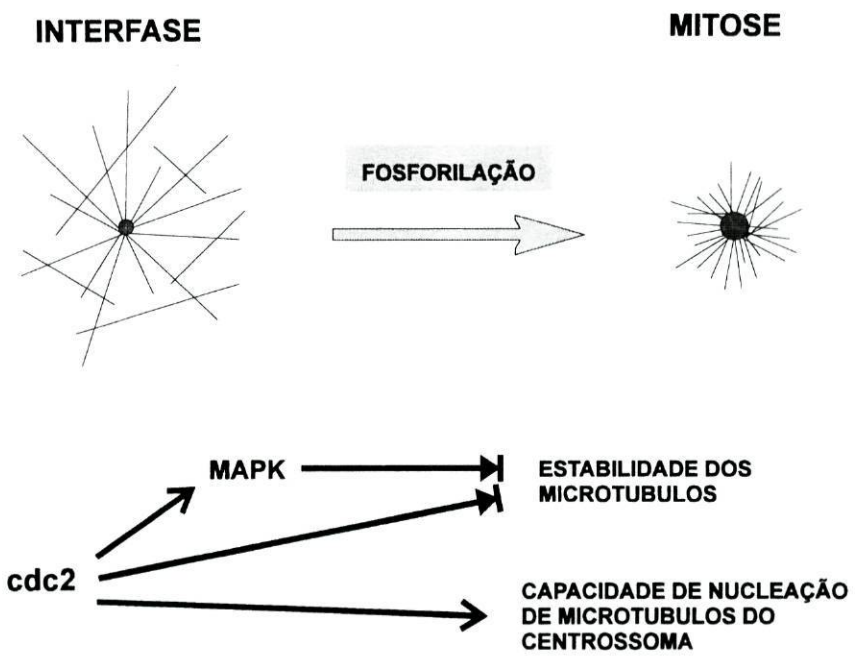


Fig. 1.10-*Efeitos opostos da fosforilação de proteínas na estabilidade dos microtúbulos e na capacidade de nucleação dos centrossomas.* A fosforilação de proteínas que ocorre durante a fase M (provávelmente em parte devida à cdc2 e à cinase MAP) diminui a estabilidade dos microtúbulos. Por outro lado, a fosforilação de proteínas centrossomais causa um aumento na capacidade dos centrossomas de nuclearem microtúbulos.

1.2.3- Dinâmica do fuso, movimento cromossómico e motores

A compreensão da estrutura do fuso mitótico modificou-se profundamente na ultima década com a observação de que os microtúbulos são estruturas dinâmicas, atravessando períodos de elongação gradual interrompidos por intervalos de encolhimento rápidos (Mitchison e Kirschner 1984; Walker *et al,* 1988). Este processo, de instabilidade dinâmica,é significativamente modificado quando as células transitam de interfase para mitose. A reorganização dos longos, e relativamente estáveis, microtúbulos citoplasmáticos interfásicos num fuso mitótico formado por microtúbulos instáveis dá-se principalmente pela regulação da frequência de recuperação e de catastrofe. As velocidades de elongação e de encurtamento são aproximadamente iguais em interfase e mitose, mas a frequência a que as transições de crescimento para encurtamento se verificam (frequência de catástrofe) aumenta cerca de 10x na passagem para mitose e, por outro lado, a transição oposta (frequência de recuperação) reduz-se (Belmont *et al,* 1990; Gliksman *et al,* 1992; Verde *et al,*

1992). Além disso, o número e tamanho intracelular dos microtúbulos também se reduz aquando da entrada mitose.

Experiências *in vitro* indicaram que estas mudanças são também reguladas por fosforilações específicas, durante a mitose, de proteínas que interagem com os microtúbulos (Belmont *et al,* 1990; Verde *et al,* 1992; Vandre e Willis 1992). Sabe-se que a cinase cdc2 têm um papel essencial no despoletar fosforilações, pois em mutantes cdc2 em que a cinase está inactiva o bloqueio em G2/M dá-se com os microtúbulos num arranjo interfásico, mas em mutantes em que a cinase está activa o bloqueio efectua-se com os microtúbulos organizados num fuso mitótico (Stone *et al,*. 1993).

A proteína NuMA é necessária para a formação e estabilização de um fuso mitótico bipolar (Yang e Snyder 1992). A injecção de anticorpos anti-NuMA impede a formação do fuso, e se injectados já após este se ter formado os polos do fuso colapsam um sobre o outro. Esta proteína de 240kDa é especificamente fosforilada durante a mitose, altura em que se desloca do nucleo para os polos do fuso (Sparks *et al*, 1995). Existem ainda evidências de que a NuMA poderá ser necessária para a reformação do nucleo no final da mitose (revisto em Cleveland, 1995).

Uma classe especial de proteínas associadas ao aparelho mitótico são as proteínas motoras, responsáveis pela geração de forças que puxam e empurram os cromossomas na direcção dos polos do fuso, além de serem também responsáveis pela separação dos centrossomas. Estas proteínas convertem a energia química no ATP em movimento e dividem-se em duas classes: dinaínas e cinesinas. Como regra geral, as dinaínas são responsáveis pelo movimento na direcção da extremidade menos dos microtúbulos, enquanto que as cinesinas[1] movem organelos na direcção da extremidade mais. Como excepção a esta regra pode-se apontar a proteína tipo cinesina de *Drosophila* codificada pelo gene *ncd* e que é um motor menos[2].

Algumas das cinesinas já descritas parecem estar implicadas na separação dos centrossomas, localizando-se nos microtúbulos provenientes dos dois polos e que se cruzam no centro do fuso. Se estes microtúbulos foram destruídos por irradiação, o fuso colapsa e os polos convergem, sugerindo que estes microtúbulos e forças

[1] No texto optámos por utilizar o termo cinesina para nos referirmos tanto à proteína cinesina como a outras proteínas da mesma família e vulgarmente descritas como tipo-cinesina.

[2] Define-se como motor mais protínas motoras que movimentem organelos em direcção à extremidade mais dis microtúbulos e, por oposição, como motor menos proteínas motoras que movimentem organelos na direcção menos dos microtúbulos.

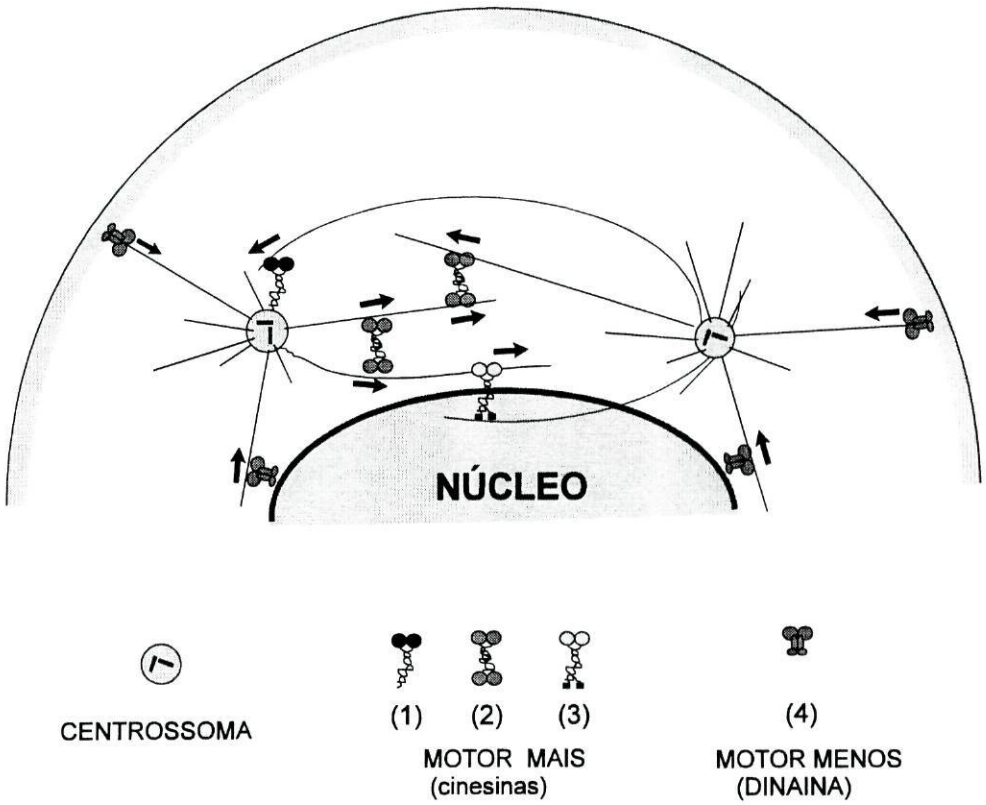


Fig. 1.11 - *Proteínas motoras mais e menos envolvidas na separação dos centrossomas.* Os centrossomas separam-se porque motores mais associados a estes organelos os empurram ao longo de microtúbulos originados no centrossoma oposto (1); porque motores mais multiméricos os empurram ao longo de microtúbulos anti-paralelos originados a partir dos dois centrossomas (2); ou porque motores mais ligados a um microtúbulo os empurram fazendo força num microtúbulo de polaridade oposta (3). Os centrossomas podem ainda ser puxados através de motores menos associados ao cortex celular (4). Os motores menos associados à membrana celular podem ajudar a manter os centrossomas junto do núcleo.

exercidas sobre eles mantêm os polos do fuso separados (revisto em McIntosh e Koonce, 1989; Ault e Rieder, 1994). Por outro lado, Walters *et al* (1993) mostraram que o movimento dos centrosomas que se estão a separar para formar o fuso é o mesmo quer os microtubulos do fuso interajam ou não, sugerindo que, pelo menos em alguns sistemas biológicos, este movimento é controlado pelos microtúbulos astrais ligados à membrana citoplasmática. A cinesina de *Xenopus* Xplk1 parece estar envolvida na estabilização dos microtúbulos antiparalelos do fuso mitótico (Vernos *et al*, 1995). Esta proteína apresenta homologia com a KLP3A de *Drosophila* (Williams *et al*, 1995). Mutantes neste ultimo gene apresentam um fenótipo interessante, observando-se que embora a interdigitação de microtúbulos antiparalelos na zona central do fuso seja suprimida, o elongamento do fuso na anafase B dá-se normalmente, sugerindo os autores que esta proteína é necessária para o acumular de materiais necessários para a citocinése na zona central do fuso.

As cinesinas bimC, de *A. nidulans,* cut7, de *S. pombe*, CIN8 e KIP1, de *S. cereviseae,* KLP61F, de *Drosophila*, e Eg5, de *Xenopus*, devido à elevada homologia entre si e devido à semelhança das suas propriedades bioquìmicas definem uma sub-família de cinesinas (a sub-famíla bimC) (revisto em Moore e Endow, 1996; Walczak e Mitchison, 1996). Estas proteínas são necessárias para a separação dos centrossomas e para que o fuso bipolar se mantenha estável. A utilização de anticorpos contra estas proteínas, ou mutações nestes genes causam um colapso do fuso mitótico pré-anafase e uma falha na separação dos polos na anafase B. É possível que esta proteínas actuem por ligação a microtúbulos provenientes dos dois polos, e os afastem exercendo força em direcção à extremidade menos. A função das cinesinas tipo bimC parece ser regulada por fosforilação. Por exemplo, a localização da Eg5 humana no fuso mitótico está dependente de está ser primeiro fosforilada pela cinase cdc2, num resíduo de treonina que se situa num domínio conservado em todos os membros desta sub-família (Blangy *et al*, 1995). Se este resíduo for mutado a proteína não é capaz de se ligar aos componentes do fuso.

Foi ainda isolada recentemente uma cinesina e *Xenopus*, a Xklp2, que embora não relacionada com a Eg5 parece ter uma função semelhante (Boleti *et al*, 1996). Esta proteína localiza-se nos centrossomas ao longo do ciclo celular e nos microtúbulos mitóticos. A incubação de extractos de ovos de *Xenopus* com anticorpos

anti-Xklp2 causa uma falha na separação dos centrossomas. Caso os fusos já estejam formados a incubação com os anticorpos provocam um colapso do fuso.

Interessante é a descrição de um outra cinesina recentemente descrita em *Xenopus*, a Xkcm1, que suprime a despolimerização dos microtúbulos durante a formação do fuso mitótico originando microtúbulos anormalmente longos (Walczak *et al,* 1996). A utilização de anticorpos permitiu observar que esta cinesina se localiza nos polos do fuso e nas regiões centroméricas. A descrição desta cinesina sugere um novo papel para as proteínas motoras: como acopuladoras do movimento dos cromossomas com o despolimerizar dos microtúbulos, função que já tinha sido sugerida com a descrição da proteína do cinétocoro CENP-E (revisto em Desai e Mitchison, 1995).

1.3- Regulação da cdc2 durante a mitose. Um modelo geral.

O modelo geral do ciclo celular sugere que a célula atravessa etapas diferentes durante um ciclo completo e que cada etapa é regulada pela ocorrência de fosforilações/desfosforilações de proteínas chave (Murray e Kirschner 1989; Lewin 1990; Nurse 1990). Uma classe particular de cinases, as Cdks, parece ter um papel fundamental neste modelo orquestrando a ocorrência das diferentes fases do ciclo (para revisão ver Norbury e Nurse 1992).

O melhor exemplo de uma Cdk é a cdc2, responsável pelo iniciar e terminar da mitose em *S. pombe*. A actividade deste enzima, do qual estão identificados homólogos em todos os organismos estudados, é baixa em interfase, aumenta rápidamente antes da mitose e desaparece abruptamente no final desta fase. Como os níveis desta proteina não são regulados nem transcriptionalmente nem traducionalmente durante o ciclo celular, a actividade catalítica da proteína está sugeita a um significativo controlo por modificações pós-traducionais (*e.g.* Draetta *et al.* 1988; e ver adiante). A especificidade da cdc2, por outro lado, parece ser regulada por associação a diferentes ciclinas. Assim, por exemplo, quando em mitose a cdc2 se associa à ciclina B tem uma função na organização do fuso mitótico, enquanto que se complexada com a ciclina A está mais envolvida na condensação dos cromossomas. A ciclina A é, além disso, degradada ligeiramente antes da ciclina B, sendo este um outro modo de regular a actividade da cinase.

A actividade catalítica do enzima é regulada positivamente por fosforilação no resíduo de treonina na posição 161 (T161) e regulada negativamente por fosforilação de resíduos de treonina e tirosina (T14 e Y15 respectivamente) situados na região de ligação ao ATP[1] (revisto em Morgan 1995). Observou-se os resíduos T14 e Y15 estão fosforilados durante a interfase sendo abruptamente desfosforilados no final de G2, permitindo a activação do enzima e a entrada em mitose. Simultâneamente, a fosforilação do T161 aumenta durante a mitose acompanhando a activação da cdc2, desaparecendo imediatamente após esta fase (Poon e Hunter 1995).

1.3.1- As cinases wee1, mik1 e myt1 inibem a mitose fosforilando a p34cdc2

A entrada em mitose é bloqueada caso a replicação do DNA não esteja completa, tendo-se observado que este ponto-de-controlo funciona, pelo menos em parte, por activação de enzimas responsáveis pela fosforilação do resíduo Y15 da cdc2. Em S. pombe identificaram-se duas cinases, a wee1 e a mik1, que impedem a entrada em mitose até que a fase S se complete, fosforilando este resíduo da cdc2 (Smythe and Newport 1992; Russell and Nurse 1987a; Lundgreen *et al,* 1991). Surpreendentemente, a estrutura primária destas proteínas sugeria que pertenceriam à família de cinases serina/treonina, mas estes enzimas fosforilam a cdc2 em resíduos de tirosina e de serina, definindo assim uma nova classe de cinases com especificidade dupla (Featherstone e Russell 1991).

A cinase wee1 é, por sua vez, regulada por fosforilação, sofrendo mudanças drásticas no seu nível de fosforilação e de actividade catalítica ao longo do ciclo. Este enzima, activo durante a interfase, é inactivado abruptamente na entrada em mitose por dois mecanismos diferentes: um envolvendo a fosforilação do domínio catalítico C-terminal pela cinase nim1 (Coleman *et al,* 1993), e outro envolvendo a fosforilação da região N-terminal por uma segunda cinase, ainda não identificada (Tang *et al,* 1993). Desconhece-se igualmente a fosfatase que desfosforila a wee1 para que esta recupere a actividade catalítica interfásica.

[1] A posição dos resíduos indicados no texto correspondem à proteína cdc2 de *Xenopus*. Noutros organismos estes resíduos encontram-se conservados mas em posição ligeiramente diferente. Assim, por exemplo, o resíduo T167 de *S. pombe* corresponde ao T161 de *Xenopus*.

A fosforilação inibidora no residuo T14 é observada sómente em eucariotas superiores (Norbury *et al,*. 1991). Ao passo que a fosforilação no residuo Y15 não parece interferir com a ligação do ATP, o mesmo não é claro relativamente ao resíduo T14. Embora inicialmente se pensasse que a weel fosforilaria tanto o T14 como o Y15, verificou-se que é incapaz de fosforilar a T14 da cdc2 *in vivo* (McGowan e Russel 1993). O enzima responsável pela fosforilação deste resíduo, myt1, inicialmente descrito como estando associado às membranas celulares, é no entanto capaz de fosforilar tanto o resíduo T14 como o resíduo Y15 (Kornbluth *et al,* 1994). A análise da estrutura primária deste enzima, recentemente isolado em *Xenopus,* indica que se trata de um enzima de especificidade dupla tipo weel, com a característica adicional de possuir um domínio transmembranar (Mueller *et al,*. 1995). As fosforilações em T14 e Y15 parecem portanto constituir vias paralelas de regulação da cdc2 e que poderão ser controladas independentemente uma da outra.

1.3.2- A cinase Cdk7 activa a cdc2 fosforilando o resíduo T161

Nem todas as fosforilações que ocorrem na cdc2 a inactivam. Em particular, a fosforilação do resíduo T161 é necessária para que o enzima tenha actividade catalítica (Gould *et al,* 1991; Ducommun *et al,*, 1991; Solomon *et al,* 1992), tendo-se verificado que a desfosforilação deste resíduo ocorre concumitantemente com a inactivação da cdc2 aquando da saída de mitose (Lorca *et al,* 1992). A cinase responsável pela fosforilação do T161, denominada de CAK[1], foi isolada quase que simultaneamente por diversos grupos a partir de estrela-do-mar e de *Xenopus* (revisto em Solomon, 1993; Clark, 1995). Surpreendentemente verificou-se que a cinase CAK activa é um complexo de uma proteína de 40kDa tipo Cdk, que tinha já sido préviamente isolada como produto do gene MO15 (Shuttleworth *et al,* 1990), associada a uma proteína tipo ciclina (Fisher e Morgan, 1994). A Cak mostrou estar activa constutivamente ao longo do ciclo celular e é também ela mesma uma fosfoproteina que necessita estar fosforilada para ter actividade catalítica (revisto em

[1] CAK - de cdc2 activating kinase

Clark, 1995). De modo a facilitar-se a nomenclatura, o nome da proteína CAK foi entretanto mudado para Cdk7 e a ciclina associada denominada ciclina H.

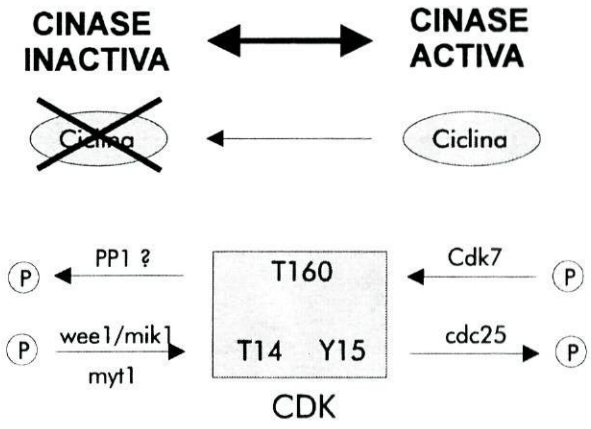


Fig. 1.12- As cinases Cdk são activadas/inactivadas por alterações ao seu estado de fosforilação e por associação/ dissociação com moléculas tipo ciclina. O esquema apresentado reflete o grau de conhecimento actual relativamente à cdc2, não sendo necessáriamente válido para todas as cdks.

1.3.3- A fosfatase cdc25 induz a mitose desfosforilando a p34cdc2

A activação da cdc2 está dependente da acção da fosfatase cdc25, que a desfosforila nos resíduos Y15 e T14 (Gautier *et al,* 91; Millar *et al,* 91; Lee *et al,* 92). A analise genética inicial, em *S. pombe,* sugeriu que a cdc25 estaria directamente envolvida na activação da cinase cdc2 (Russell e Nurse, 1986) e, quando a clonagem da proteína mostrou que esta possuía homologia com fosfatases e que era capaz de desfosforilar substratos *in vitro,* foi imediatamente proposto que ela seria a fosfatase que activaria a cinase cdc2 (Moreno e Nurse 1991; Dunphy e Kumagai 1991). A cdc25, tal como a cdc2, parece encontrar-se altamente conservada podendo, por exemplo, a proteína homóloga de *Drosophila* (denominada string) activar o MPF em extractos de *Xenopus* (Kumagai e Dunphy 91; Gautier *et al,* 1991). Também como no caso da cdc2, em organismos superiores existe mais do que uma proteína tipo cdc25. Em vertebrados, por exemplo, estão descritas as proteínas cdc25A, cdc25B e cdc25C, enquanto que em *Drosophila* já se identificaram duas formas, *string* e *twine* (Galaktionov, K e Beach, 1991; Jinno *et al,* 94; Jimenez *et al.* 1990). Estas proteínas da mesma família aparentam ter funções diferentes estando, por exemplo, a cdc25B e

a cdc25C envolvidas na transição G2/M, enquanto que a cdc25A é necessária para a execução da fase S. Em *Drosophila* a função dos dois homólogos descritos é também distinta pois, ao contrário do *string*, o *twine* parece ser necessário apenas durante a meiose (Alphey *et al.* 1992).

A actividade catalítica da cdc25 é por sua vez regulada durante o ciclo celular sendo modificada por fosforilação/desfosforilação. A proteína, que embora apresente alguma actividade catalítica durante a interfase, é rápidamente activada durante a transição G2/M devido a hiperfosforilação do domínio regulador N-terminal (Kumagai & Dunphy 1992; Izumi *et al.* 1992). Interessantemente, a actuar sobre a cdc25 parece existir uma rede de cinases e fosfatases, cuja actividade varia ao longo do ciclo celular, verificando-se que a subida da actividade cinásica estimuladora coincide com a descida da actividade fosfatásica inibidora imediatamente antes da mitose (Kumagai & Dunphy 1993). A descoberta de que certas cdks são capazes de activar a cdc25 parece indicar a existência de um circuito de autoactivação positivo que conduz ao início da mitose (Hoffman *et al,*. 1994).

1.4- A REGULAÇÃO DA MITOSE EM *DROSOPHILA*

A embriogénese de *Drosophila* dura aproximadamente 24 horas sendo seguida de três fases larvares (instares) e da formação da pupa, durante a qual ocorre a metamorfose e a formação do indivíduo adulto. O ciclo de vida completo dura aproximadamente dez dias a 25°C, durante os quais se verificam apenas dois períodos principais de divisão celular: durante a embriogénese e no final do período larvar, imediatamente antes do começo da metamorfose.

1.4.1- Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário da *Drosophila* pode ser dividido em varias fases no que respeita à natureza do ciclo celular e o seu controlo. As primeiras 13 divisões nucleares ocorrem num único citoplasma (embrião sincício), com todos os núcleos dividindo-se em síncronia. Estas divisões são extremamente rápidas, durando as primeiras nove divisões cerca de dez minutos cada uma, consistindo apenas em

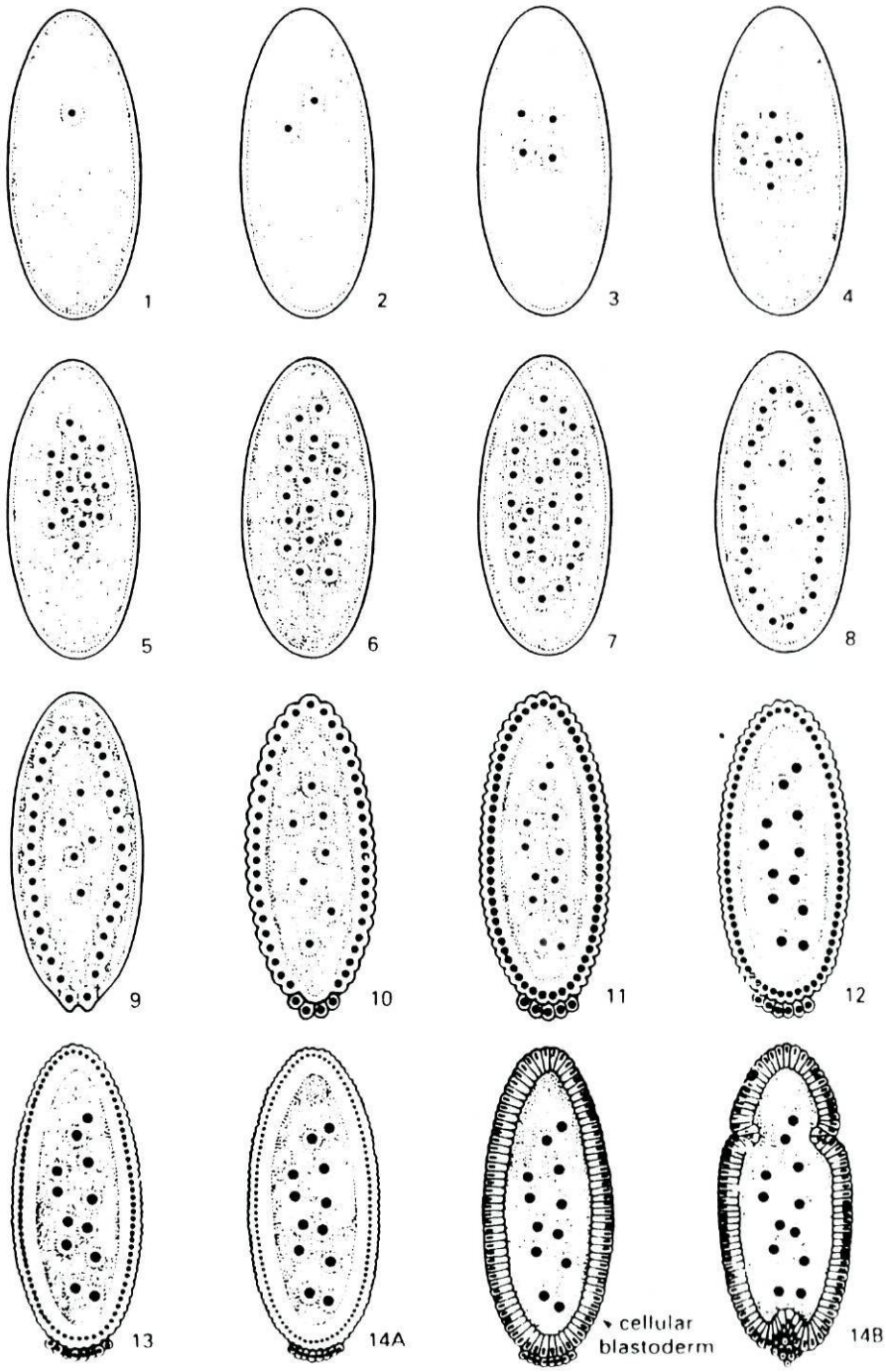


Fig. 1.13- *Distribuição dos núcleos em embriões sincício de Drosophila.* A figura representa as primeiras 14 divisões nucleares no sincício. Durante as primeiras divisões os núcleos permanecem no centro do embrião, migrando para o cortex nos ciclos 8 e 9, excepto alguns núcleos que permanecem no centro e que deixarão o ciclo mitótico. Dos núcleos que atingem o cortex, os que migraram para o polo posterior celularizam nos ciclos 9 e 10 e virão a formar a linha germinal. O resto dos núcleos continua a dividir-se em síncronia até que antes da mitose 14, os núcleos adquirem uma fase G2 durante a qual celularizam (adaptado de Foe e Alberts, 1983).

fases S e fases M sucessivas sem intervalos vísiveis. Além da ausência de fases G1 e G2 é ainda de notar a ausência de controlos de retroacção capazes, por exemplo, de assegurar que uma fase S se encontre completa antes de a fase M seguinte se iniciar. Estas divisões iniciais ocorrem no centro do ovo e, por volta do ciclo 7, a maioria dos núcleos migram para a superfície. Os núcleos que permanecem no interior do embrião saem da sincronia da divisão mas continuam, no entanto, a executar a replicação do DNA. Os restantes núcleos que migram para o cortex do embrião, continuam a dividir-se e atingem a superfície do ovo no início do ciclo 10, onde se distribuem numa monocamada. Estes núcleos dividem-se sincronamente mais três vezes, até que na interfase do ciclo 14 ocorre uma mudança súbita no programa do desenvolvimento. Nesta altura forma-se a membrana celular entre os núcleos ficando o embrião com cerca de 6000 células. Imediatamente a seguir à celularização ocorre a gastrulação, seguindo as células recém formadas um padrão definido de movimento e migração. O 14° ciclo mitótico marca também uma mudança no modo como a mitose é regulada, e o ciclo celular alonga-se adquirindo as células uma fase G2 visível. A partir de então as divisões mitóticas deixam de se realizar em sincronia, passando a ocorrer em domínios específicos do embrião, com fases G2 variando entre 30min e 150min (Foe 1989). A fase G1 parece ser introduzida só no ciclo 17 e, simultâneamente, a maioria das células do embrião deixa de se dividir. Estes núcleos que abandonam a divisão celular sofrem uma série de endoreduplicações, tornando-se poliploides, e perdem a capacidade de reentrarem no ciclo mitótico.

A maioria do crescimento da larva, devido ao baixo número de divisões celulares, é pois alcançado por crescimento celular, havendo muito pouca actividade mitótica no primeiro e segundo estados larvares. A actividade mitótica que ocorre ainda dá-se a um nível baixo no cérebro e nos discos imaginais das larvas. A maioria das mitoses do desenvolvimento larvar ocorrem durante o terceiro estado, durante a preparação para a metamorfose. Os ciclos celulares nestas células mitóticamente activas diferem dos da embriogénese, pois a seguir à introdução de fase G1 no ciclo 17, todas as células tem agora as quatro fases típicas do ciclo celular de eucariotas.

Uma vez que as primeiras divisões são demasiado rápidas, não ocorre transcrição no embrião, tendo sido os mRNAs e proteínas necessários para que essas divisões ocorram, depositados no ovo pela mãe. Os núcleos no ciclo 10 da

blastoderme sincícia já são capazes de transcrição, mas só a partir do ciclo 14 é que começa verdadeiramente a ocorrer transcrição zigótica.

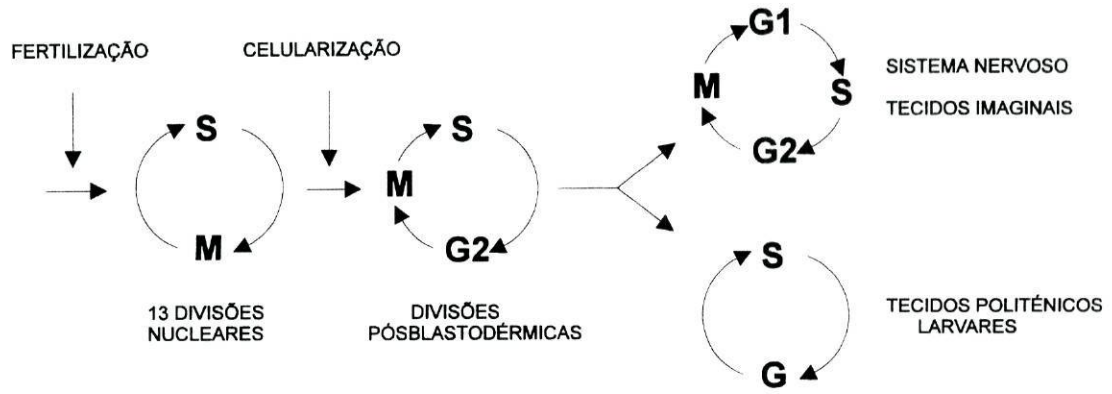


Fig. 1.14- *Ciclo celular nos embriões de Drosophila.* As primeiras 13 divisões no embrião sincício realizam-se na ausência de fases G1 e G2, sendo a fase G2 introduzida por altura da celularização. Após o ciclo 17 as células que irão formar o sistema nervoso e os tecidos imaginais adquirem a fase G1 passando a ter as quatro fases normais do ciclo celular.

1.4.2- Mutantes mitóticos em *Drosophila*

Os mutantes com alterações no desenrolar da mitose podem mostrar uma considerável pleiotropia nos seus fenótipos. Neste aspecto os mutantes mitóticos de *Drosophila* diferem consideravelmente dos de leveduras, em que os mutantes são maioritáriamente letais condicionais (ts) e seleccionados pelo facto de as células parárem num ponto específico do ciclo após a mudança da temperatura permissiva para uma temperatura não permissiva. Os mutantes mitóticos de *Drosophila* são usualmente seleccionados como mutações letais recessivas, e a partir de um fenótipo observável durante o desenvolvimento. Consequentemente as aberrações mitóticas muitas vezes só começam a ser visíveis à medida que as proteínas selvagens se esgotam, e deste modo o ponto de paragem do ciclo celular pode não ser preciso. Um número largo de mutações mitóticas é letal nas fases larvares tardias ou nas primeiras fases de pupa (Ripoll *et al,* 1985; Gatti e Baker 1989; Glover 1989). Os defeitos mitóticos normalmente não se manifestam senão nas fases tardias do desenvolvimento uma vez que os embriões mutantes homozigóticos estão abastecidos de produto selvagem suficiente (neles depositado pela mãe heterozigótica) que lhes permite

atravessar a embriogénese. A maioria dos tecidos larvares a partir de então apenas cresce e poliploidiza, com a excepção dos tecidos imaginais e as células do sistema nervoso central. Estes últimos têm que proliferar durante as fases de larva e pupa para virem a formar as estruturas do indivíduo adulto. Consequentemente muitos mutantes mitóticos possuem discos imaginais pequenos e mostram anormalidades mitóticas nos neuroblastos larvares. O fenótipo mitótico pode ser assim examinado em preparações de cérebros de larvas destes mutantes. Entre as mutações já identificadas algumas afectam a condensação cromossómica, outras induzem uma paragem em metafase, outras mostram falhas na separação dos cromossomas em anafase e outras ainda parecem afectar a citoquinése (para revisão ver Glover 1991; Gonzalez *et al,* 1994).

1.4.3- Regulação mitótica do embrão sincício

Uma vez que as proteínas necessárias para que se formem os milhares de fusos mitóticos iniciais são depositados no ovo pela mãe, é possível isolar mutações que afectem o desenrolar da mitose e que mostrem um efeito materno. Fêmeas mutantes homozigóticas adultas produzem embriões que são incapazes de completar as divisões iniciais (Glover, 1989).

A actividade de certos genes parece ser requerida apenas nesta fase do desenvolvimento, *e.g.* os genes *gnu* (giant nuclei), *plu* (plutonium) e *png* (pan gu) (Freeman *et al,* 1986; Shamanski and Orr-Weaver 1991). Mutações nestes genes levam ao desenvolvimento de núcleos gigantes nos embriões sincícios. Estes núcleos gigantes são causados pela ocorrência de sucessivas fases S na ausência de divisão nuclear. No caso dos ovos *gnu* nem sequer é necessário que se dê a fertilização para que se observe o desenvolvimento destes núcleos gigantes (Freeman *et al*, 1986; Freeman e Glover, 1987). Um dos aspectos mais interessantes no fenótipo deste mutante é que, embora a divisão nuclear não se realize, os centrossomas continuam a replicar-se e migram, como normalmente, para o cortex do embrião, após se terem dissociado completamente dos núcleos. Embora não formem fusos mitóticos estes centrossomas continuam capazes de nuclear microtúbulos astrais. O aumento do número e a migração dos centrossomas nos embriões *gnu* indica uma indepêndencia do ciclo centrossómico relativamente ao ciclo de divisão nuclear. Estes três genes parecem actuar numa via comum uma vez que se verifica uma interacção forte entre mutantes duplos.

Uma segunda classe de genes é a dos que além de necessários para as divisões iniciais do sincício são também necessários nas fases posteriores do desenvolvimento. Por vezes, algumas fêmeas homozigóticas com mutações neste tipo de genes, embora mostrem aberrações mitóticas durante as fases larvares do seu desenvolvimento, são capazes de sobreviver até à fase adulta e de depositar ovos que morrem durante a embriogénese,. Os alelos mais fortes desta classe de genes são no entanto muitas vezes letais nas fases larvares tardias ou de pupa, como por exemplo os nos genes *asp*, o *polo* e o *aurora* (Gonzalez *et al,* 1990; Sunkel e Glover 1988; Glover *et al,* 95) de que se falará mais adiante.

1.4.4- Regulação mitótica das primeiras divisões zigóticas

A seguir à celularização, o início da transcrição de genes zigóticos permite ao embrião produzir proteínas que não foram colocadas pela mãe no ovo e substituir aquelas que embora fazendo parte do suprimento materno foram já degradadas ou simplesmente esgotadas. Caso sejam mutados os genes correspondentes a estes produtos o desenvolvimento pára nesta fase, resultando numa letalidade zigótica. O gene *string* (stg) enquadra-se nesta categoria, sendo as células incapazes de iniciar a mitose 14, parando o desenvolvimento na transição G2-M da interfase 14 (Edgar e O'Farrell 1989, 1990). Um resultado semelhante é observado para mutações no gene da ciclina A, embora a paragem do desenvolvimento se observe um pouco mais tarde, durante os ciclos 15 e 16 (Lehner and O'Farrell 1990). Em ambos os casos as divisões iniciais processam-se normalmente devido à abundância das proteínas selvagens no ovo. No entanto, estas proteínas sofrem uma degradação maciça aquando da celularização e os embriões homozigóticos são incapazes de prosseguir os ciclos de divisão na sua ausência.

Foram também descritas mutações em genes que em embriões recém-celularizados são necessários para a transição metafase-anafase. Mutações no gene *fizzy*, por exemplo, provocam uma paragem no ciclo 15 com uma predominância de figuras metafásicas e com niveís de ciclina A e ciclina B elevados (Dawson *et al,* 1993). Mutações num outro gene, *three rows* (thr), têm um fenótipo similar mas não resultam numa paragem no ciclo 15, causando antes um atraso na metafase (observando-se células com os cromossomas alinhados na placa metafásica mas em que ambas as ciclinas se encontram já degradadas). No caso de mutações no *three*

rows, embora não se observe o movimento dos cromossomas na anafase, as células entram eventualmente em interfase, descondensando os cromossomas (Philp *et al,* 1993; D'Andrea *et al,* 1993).

O homólogo em *Drosophila* da ciclina E é requerido para a introdução de G1 no ciclo 17 da embriogénese (Richardson *et al,* 1993). Mutações neste gene provocam uma paragem no ciclo celular após a divisão 16, antes que a fase S se inicie (Knoblich *et al,* 1994).

1.4.5- Regulação mitótica das divisões na larva

Alguns dos produtos depositados no ovo são incorporados nas células, quando estas se formam, no ciclo 14. Mesmo que o zigoto seja incapaz de sintetizar uma certa proteína na sua forma funcional, o fornecimento materno é muitas vezes suficiente para as poucas divisões celulares a efectuarem-se ainda no embrião. Devido à maioria do desenvolvimento larvar se efectuar sem que ocorra divisão celular, a ausência de um produto necessário para mitose não provoca a morte do indivíduo nesta fase do desenvolvimento. Só nas ultimas fases do desenvolvimento larvar a divisão celular assume um papel essencial à sobrevivência do organismo. Muitos dos mutantes em genes implicados na divisão celular têm deste modo um fenótipo letal larvar tardio ou durante a fase de pupa.

Entre os mutantes descritos com estas características incluem-se os nos genes *polo*, *merry-go-round* (*mgr*), *aurora* (*aur*) e *urchin* (*urcn* ou KLP61F) (Sunkel & Glover 88; Gonzalez *et al,* 88; Glover *et al,* 95; Heck *et al,* 93). O produto de qualquer destes genes parece ser requerido para a duplicação e separação correctas dos centrossomas, observando-se em cérebros de larvas homozigóticas a formação de fusos mitóticos monopolares. As mutações *mgr* e *aur* parecem permitir a replicação dos centrossomas mas não a sua separação. Isto leva à formação de estruturas monopolares em que os centrossomas duplicados nucleiam microtúbulos que estão ligados a um arranjo circular de cromossomas. Um arranjo semelhante de cromossomas associados a um fuso monopolar é observado em células mutantes para o *urcn*, mas neste caso cada monopolo contém múltiplos centrossomas, o que sugere que o produto deste gene é requerido para a segregação dos centrossomas ou para manter a separação dos polos do fuso (Wilson *et al,*. 1992). De todos, só o gene *mgr* não se encontra ainda clonado, codificando o *polo* e o *aurora* cinases tipo ser/tre, e o

urchin uma proteína da família das cinesinas (Llamazares *et al,* 1991; Glover *et al,* 1995; Heck *et al,* 1993).

Um outro gene que parece ser requerido para o funcionamento de fuso mitótico é o gene *asp.* Mutações neste gene resultam em malformações do fuso mitótico, incluindo o agrupamento de microtúbulos do fuso e a formação de meios fusos sem polo opostos. Mas a caracteristica mais acentuada no fenótipo destas mutações é o aparecimento de um fuso meiótico anormalmente longo e com os microtúbulos sinuosos em vez de rectos (daí o nome *abnormal spindle*, *asp*) (Gonzalez *et al,* 90; Casal *et al,* 90).

Estão também descritos mutantes de genes que parecem afectar fases mais tardias da mitose, como por exemplo mutações em genes necessários para uma associação correcta dos cromossomas com o fuso mitótico e para a separação das cromatides. A este grupo de genes parecem pertencer o *zw10* (que codifica uma proteína que se localiza na região do cinétocoro na transição metafase-anafase), o *abnormal anaphase resolution* (ou *aar*, que codifica uma subunidade reguladora da fosfatase PP2A) e o *rough deal* (ainda não clonado) (William *et al,* 1992; Gomes *et al,* 1993; Karess and Glover 1989). As figuras mitóticas destes mutantes mostram que uns cromossomas ficam para trás na placa mitótica enquanto que outros se movem para os polos durante a anafase.

1.5- O GENE *polo*

O locus *polo* foi identificado pelo alelo $polo^1$, isolado como uma mutação recessiva semi-letal induzida pela droga EMS (Sunkel and Glover 1988). O facto de a mutação ser semi-letal implica neste caso que apenas cerca de 7% dos indivíduos homozigóticos atingem a fase adulta, morrendo a maioria como larvas nas fases tardias do terceiro estado ou durante a pupação. Foi ainda descrito um segundo alelo, $polo^2$, obtido por inserção no genoma de elementos transponíveis P. Este alelo apresenta um fenótipo mais extremo, em que nenhum indivíduo homozigótico $polo^2$ sobrevive, não passando as larvas do segundo estado larvar (Sunkel and Glover 1988). Os transheterozigóticos $polo^1/polo^2$ são viáveis, mas numa frequência muito inferior ao homozigótico $polo^1$.

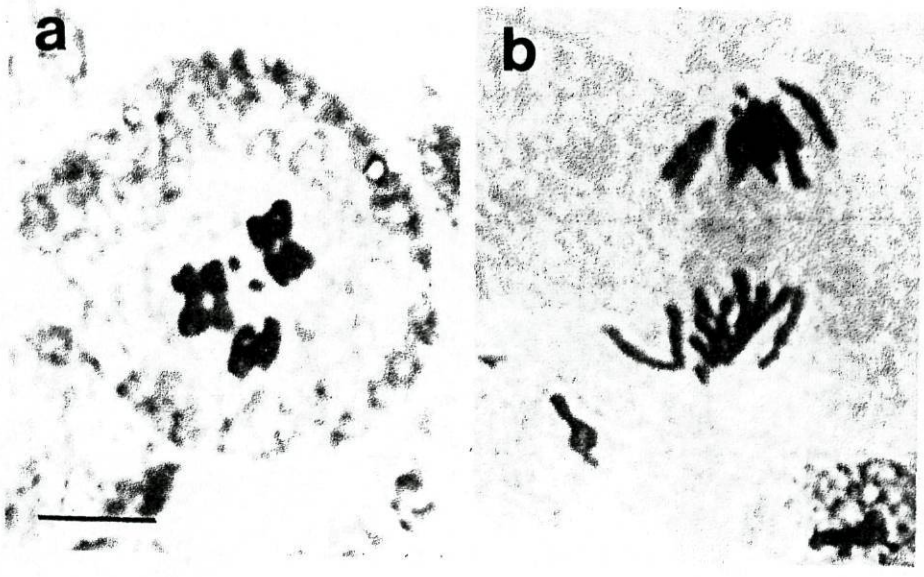


Fig. 1.15- *Figuras mitóticas em cérebros selvagens.* Em **a)** apresenta-se uma metafase típica. Os minusculos cromossomas 4 estão localizados no centro desta figura e os outros cromossomas encontram-se em tornno deles. É vísivel o emparelhamento somático das cromátides homologas, que se mantém durante a metafase. Em **b)** apresenta-se uma anafase, em que são visiveis as cromatides separadas movendo-se em direcção aos polos, com os braços dos cromossomas apontando para aplaca metafásica. A barra de escala indica 10um. Ambas as figuras mitóticas foram obtidas por esmagamento de um cérebro de uma larva selvagem e a cromatina corada com Giemsa (Figura centilmente cedida por Helen White-Cooper).

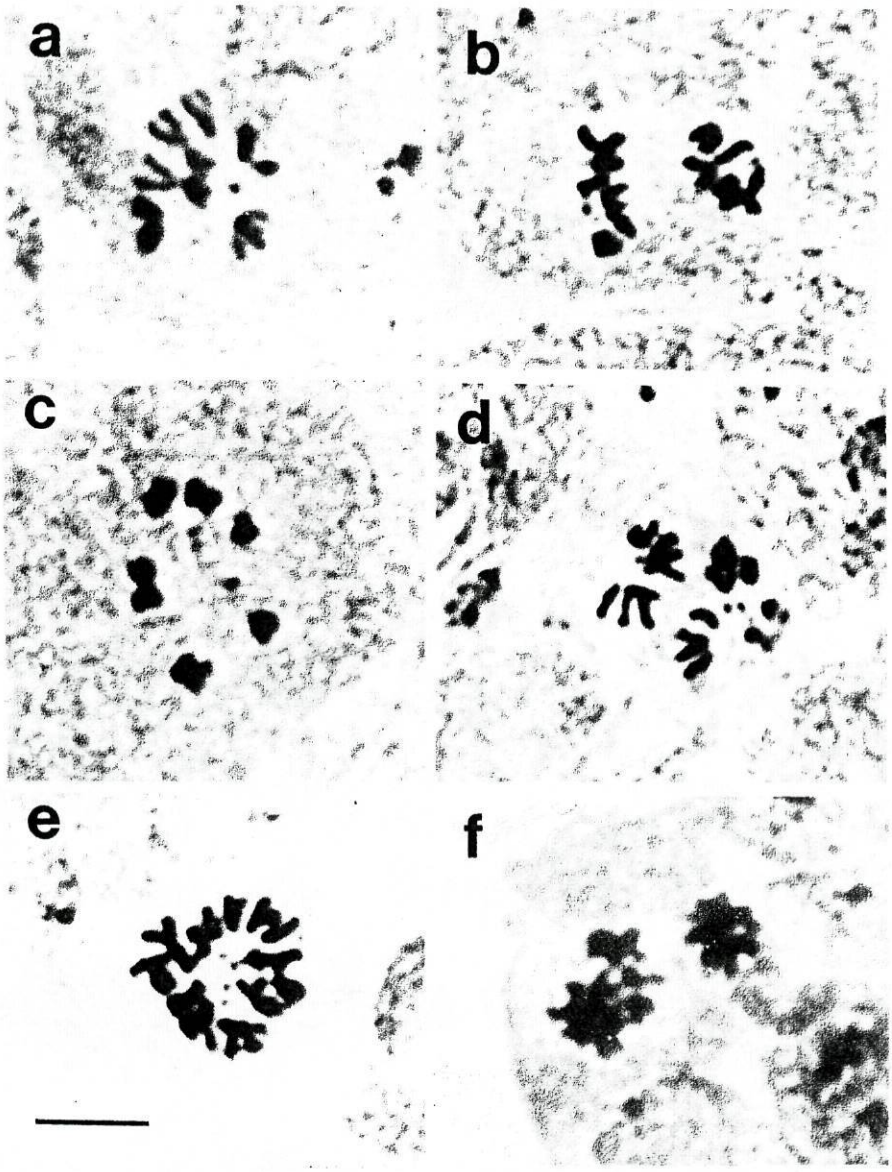


Fig. 1.16- *Figuras mitóticas em neuroblastos de larvas mutantes no gene polo..* Na figura apresentam-se vários defeitos mitóticos observados no mutante polo: **a)** uma metafase relativamente normal em que o emparelhamento somático de um dos autossomas está quebrado; **b)** uma anafase em que as cromátides estão hipercondensadas e desorganizadas em relação aos polos; **c)** uma metafase em que os cromossomas estão hipercondensados, outra vez com o emparelhamentos somático destruído, e em que embora os cromossomas estejam distribuidos num circulo não é classificada como uma figura mitótica circular porque os braços dos cromossomas não apontam para o exterior do circulo; **d)** uma anafase com os cromossomas ligeiramente hipercondensados e, num dos polos, arranjados em circulo; **e)** uma metafase tetraploide com os cromossomas numa orientação circular; **f)** uma anafase em que os cromossomas se apresentam hipercondensados e em arranjos circulos em torno dos polos.Há também mais cromátides num dos polos que noutro. A barra de escala indica 10um. As figuras mitóticas foram obtidas por esmagamento de cérebros de uma larvas mutantes e a cromatina corada com Giemsa (Figura gentilmente cedida por Helen White-Cooper).

Embora durante o seu desenvolvimento larvar mostrem mitoses defeituosas, alguns individuos homozigóticos *polo*^{1} chegam a atingir o estado adulto. Entre as alterações observadas durante o desenvolvimento larvar inclui-se um indice mitótico elevado em neuroblastos, sendo frequente observar fusos monopolares ou fusos com os polos muito largos. O fenótipo do mutante original mostra que 70% de todas as metafases em cérebros de larvas no terceiro estado, assim como 90% das anafases, são anormais. A maioria destas metafases apresenta figuras metafásicas circulares, quer euploides quer poliploides, em que os cromossomas se encontram dispostos em circulo à volta de um único polo. Nas anafases é visivel uma condensação extrema das cromatides e com uma orientação anormal dos cromossomas em relação aos polos (Sunkel e Glover 1988; Llamazares *et al,* 1991). Os embriões derivados de ovos depositados por mães homozigoticas *polo*^{1} nunca chegam a eclodir, mostrando mitoses altamente anormais, com redes de microtúbulos ramificadas e irregulares, associadas a massas de cromatina hipercondensada. Nestes embriões não é possivel visualizar os centrossomas usando-se anticorpos contra componentes associados a centrossomas como o CP190[1] ou a γ-tubulina, indicando que ou os centrossomas não se formam ou possuem uma estrutura anormal a que estes componentes não se associam (ambos os componentes referidos estão presentes nos embriões homozigóticos, podendo mesmo o CP190 ser localizado como agregados dispersos nos núcleos poliploides dos embriões *polo*^{1} (Sunkel e Glover 1988)). De notar que nestes embriões a cromatina, embora muito desorganizada, parece continuar a condensar-se e descondensar-se, e a replicação do DNA continua a processar-se, originando núcleos poliploides com massas de cromatina dispersas no interior (Sunkel and Glover 1988).

Assim, e embora as caracteristicas do fenótipo sejam bastante diversas, parece que a proteína codificada pelo gene *polo* é necessária para a formação e funcionamento de um fuso mitótico bipolar e que essa acção poderá ser exercida nos polos desse fuso

A análise da meiose em testiculos de machos homozigóticos *polo*^{1} revela fusos multipolares que resultam numa não-disjunção da cromatina, indicando que este gene é necessário não só em mitose mas também em meiose.

[1] CP190 é a nova denominação para a proteína anteriormente denominada Bx63 ou DMAP190.

O gene *polo* encontra-se já clonado e sequenciado (Llamazares *et al,*. 1991; Tavares 1992), tendo-se verificado que codifica uma proteína de 577 aminoácidos, que apresenta nos primeiros 250aa da região terminal-amina elevada homologia com o domínio catalítico de cinases pertencentes à família serina/treonina. A imunolocalização da proteína mostrou que esta apresenta uma distribuição cíclica durante os ciclos mitóticos em embriões sincicios: a proteína polo localiza-se no citoplasma durante a interfase e à medida que o ciclo progride a localização altera-se, vindo o antigénio a associar-se com os cromossomas condensados durante a metafase e a anafase (Llamazares *et al,* 1991). A actividade da proteína polo como cinase foi demonstrada quando se verificou, em ensaios *in vitro*, que é capaz de fosforilar caseina (Fenton and Glover 1993; este trabalho). Fenton e Glover mostraram ainda que a cinase polo parece estar inactiva durante a maior parte do ciclo celular em embriões sincício, tendo apenas um ponto específico de actividade, coincidente com a transição anafase/telofase. É curioso notar que, em embriões sincício, é também neste período do ciclo que ocorre a replicação dos centrossomas.

1.5.1- O gene *polo* encontra-se conservado noutros organismos

Muito recentemente, e já no decurso deste trabalho, foram publicados resultados que indicam que o gene *polo* de *Drosophila* se encontra conservado noutras espécies. Nos últimos três anos foram descritas as cinases Plk1 em células humanas (Lake & Jelinek 1993, Holtrich *et al,* 1994, Golsteyn *et al,* 1994; Hamanaka *et al,*., 1994), Snk, Fnk e Plk[1] em células de rato e de murganho (Simmons *et al,*. 1992; Clay *et al,* 1993; Lake & Jelinek 1993; Hamanaka *et al,*., 1994; Donohue *et al,*. 1995), CDC5 em *Sacharomyces cereviseae* (Kitada *et al,* 93), e a cinase *plo1* em *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura *et al,* 1995) que apresentam elevada homologia com a proteína polo. Estas proteínas têm em comum uma organização estrutural semelhante, com o domínio catalítico situado no terminal amina seguido de um domínio C-terminal de função desconhecida. O maior grau de identidade entre as diferentes proteínas é observado na região terminal amina, coincidindo com o domínio catalítico, sendo as cinases Plk de vertebrados as que possuem um indice mais elevado

[1] Plk- polo-like kinase

Fig. 1.17-*Comparação da estructura primária das proteínas tipo polo.* É no terminal amina das diferentes proteínas que se encontra a região de maior homologia, e que corresponde ao domínio catalítico das cinases. Na região C-terminal observar-se muito menos homologia e esta reside especialmente em três sub-domínios pequenos. A existência destes sub-domínios conservados em todas estas cinases sugere que terão um papel importante na estructura/função das proteínas. Na figura indicam-se os resíduos de aminoácidos conservados em todas as proteínas dentro de caixas.

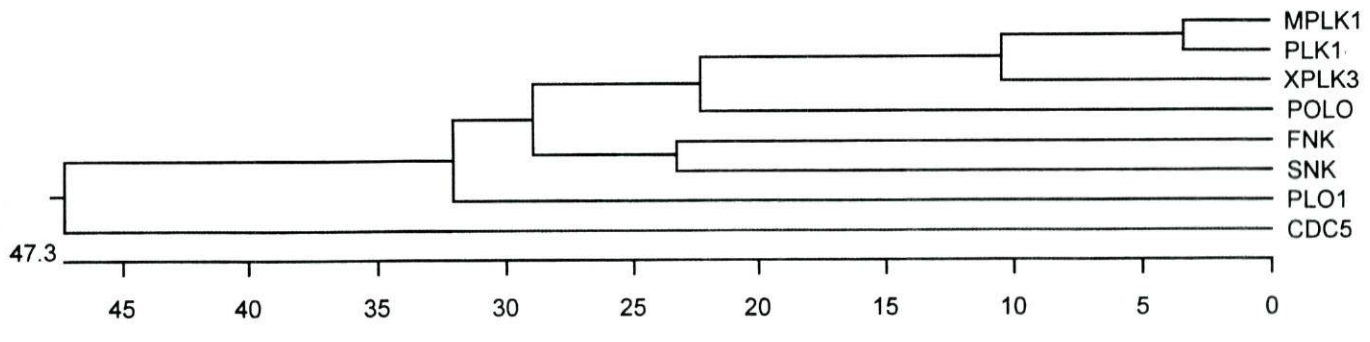


Fig. 1.18- Árvore filogenética das cinases tipo polo descritas na literatura, calculada pelo algoritmo Clustal do programa DNASTAR. polo- cinase de *Drosophila*; Mplk1, Snk e Fnk -cinases de murganho; Plk1-cinase humana; CDC5- cinase de *S. cerevisiae*; plo1- cinase de *S. pombe*; Xplk1- cinase de *Xenopus*.

de identidade com o polo (~65%). As regiões C-terminal apresentam menor homologia, e que reside especialmente em três blocos distintos (denominados PH2, PH3 e PH4), sendo o melhor índice de identidade desta região também observado com as proteínas Plk de vertebrados (~45%).

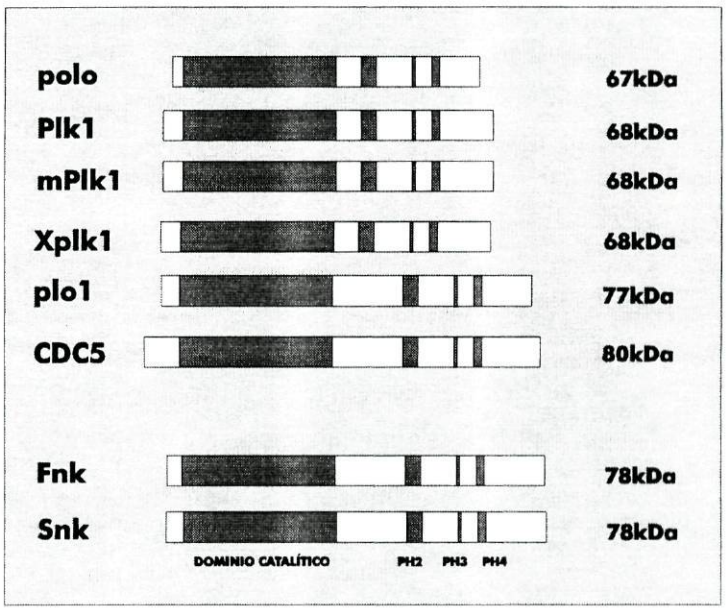


Fig. 1.19- *Esquema comparativo das diferentes cinases polo já identificadas nos diferentes organismos.* As regiões de elevada homologia (domínio catalítico, PH2, PH3 e PH4) são representadas a escuro. A massa molecular das diferentes proteínas está também indicada à direita.

A cinase Snk[1], um dos três homólogos descritos em murganho, é a que apresenta um menor grau de homologia quer a nível do domínio catalítico quer a nível da região C-terminal. A comparação da estrutura primária das cinases cinases tipo polo, com outras cinases já descritas, indica que definem uma nova sub-familia de cinases (Hanks e Hunter 1995).

Foi também recentemente descrita uma cinase em ratinho, denominada Sak[2], como se tratando de um membro da família das cinases tipo polo (Fode *et al,* 1994). No entanto, embora apresentado um nível significativo de homologia no domínio catalítico com o da proteína polo (~42%) não possui os três blocos conservados de homologia característicos na região C-terminal. A proteína Sak, também ao contrário das cinases tipo polo, possui diversos domínios "PEST", presentes em proteínas com

[1] Snk- serum-inducible kinase
[2] Sak- Snk/Plk-akin kinase

tempos de semi-vida intracelular curtos. Estas divergências parecem indicar que não se trata de um verdadeiro membro desta sub-classe de cinases.

1.5.2- A cinase Plk1 é necessária durante a mitose

A cinase Plk de vertebrados é, tal como a cinase polo, apenas expressa em tecidos com capacidade de divisão celular (Clay *et al,* 1993; Lake e Jelinek 1993; Hamanaka *et al,*, 1994; Holtrich *et al,*. 1994). Esta observação sugere um papel na divisão celular, ideia que é reforçada pelo facto de os niveis de mRNA da Plk se acumular periodicamente ao longo do ciclo celular, atingindo um pico imediatamente antes ou durante a mitose (Lake e Jelinek 1993), e pela observação de que a concentração intracelular da proteina também flutua ao longo do ciclo acompanhando os niveis de mRNA (Golsteyn *et al,*. 1994; Hamanaka *et al,*. 1995). É interessante notar que as flutuações do mRNA do Plk ao longo do ciclo se devem a mecanismos de regulação pós-transcricional, uma vez que o nivel de transcrição deste gene se mantem constante (Lake e Jelinek 1993).

Foi já demonstrado que a cinase Plk1, tal como a cinase polo, tem um máximo de actividade catalítica durante a mitose, mas neste caso com um padrão de variação similar ao observado para a cinase $p34^{cdc2}$ (Golsteyn *et al,*,1995; Hamanaka *et al,* 1995). A cinase polo de *Drosophila*, por outro lado, cuja a actividade foi apenas determinada em embriões sincício, parece estar máximamente activa um pouco depois de a $p34^{cdc2}$ ser inactivada, já durante a anafase e telofase (Fenton e Glover 1993). Não é ainda claro se esta discrepância nos pontos de actividade máxima nos dois organismos reflete sómente uma maior precisão com que a fase mitótica pode ser determinada nas divisões sincronas nos embriões de *Drosophila*, ou se reflete uma diferença fundamental no padrão de regulação mitótica entre estes dois sistemas. O padrão de actividade ciclica da Plk1 é coincidente com a sua localização intracelular: a cinase encontra-se associada aos centrossomas em células ainda em interfase e mantêm-se nos polos do fuso mitótico durante a metafase, migrando para a região equatorial do fuso durante a anafase, localizando-se finalmente sobre o "midbody" no final da telofase (Golsteyn *et al,* 1995). Deste modo durante o período em que tem actividade máxima, a cinase encontra-se associada com diferentes elementos do fuso mitótico.

É possível que nem todas as cinases tipo polo sejam necessárias para a execução da fase M. É interessante notar que a microinjecção de RNA "antisense" do gene *Plk* em células NIH3T3 (células de murganho) inibe a síntese de DNA, enquanto que a injecção de mRNA estimula essa mesma síntese (Hamanaka *et al,*. 1994). Com base nestes resultados os autores sugerem que o Plk poderá também desempenhar uma função durante as fases G1 ou S. A ideia que que cinases tipo polo terão um papel a desempenhar nas fases G1/S é apoiada pela descrição das cinases Snk e Fnk. Ambas são expressas transientemente quando células NIH3T3 são estímuladas com factores de crescimento (Simmons *et al,* 1992; Donohue *et al,* 1995) senda das poucas cinases descritas como sofrendo uma transcrição induzida por agentes mitogénicos. O pico de acumulação de mRNA destas cinases é durante a fase G1, enquanto que o da Plk1 se dá mais tarde e não se deve a um aumento da transcrição. A falta de mais informação sobre a actividade das cinases Snk e Fnk não permite ainda concluir se serão ou não requiridas para a passagem pelas fases G1 e S.

1.5.3- Os homólogos em leveduras

As cinases tipo polo também parecem exercer uma função durante a mitose em levedura. Tal como a mutação *polo*[1], os mutantes do gene *CDC5* em *S. cereviseae* boqueiam a divisão nuclear nas últimas fases da mitose, com um fuso mitótico alongado entre a celula mãe e a gemula, sem que ocorra separação (Hartwell *et al,.*, 1973; Byers e Goetsch 1974; Kitada *et al,.*, 1993). Esta cinase é também essencial para o desenrolar da meiose pois quando células diploides homozigóticas para um mutante *CDC5* ts são submetidas à temperatura restritiva durante a meiose, a divisão pára numa fase a seguir à duplicação do "spindle-pole body" e na presença de um fuso de aberrante (Shild e Byers, 1980). Um papel regulador directo deste enzima sobre o comportamento dos microtúbulos mitóticos é sugerido pela observação de que mutantes *CDC5* ts perdem a susceptibilidade à droga MBC[1], droga esta que impede a mitose por interacção directa com a β-tubulina (Wood e Hartwell, 1982). É curioso notar que o gene *CDC5* foi isolado e clonado como sendo um supressor do *dbf4*, um gene requerido para se iniciar a replicação do genoma na transição G1/S (Kitada *et al,*,

[1] MBC - metil-benzimidazole-2-il-carbamato

1993) mais uma vez sugerindo que as cinases tipo polo poderão exercer uma função extra-mitótica.

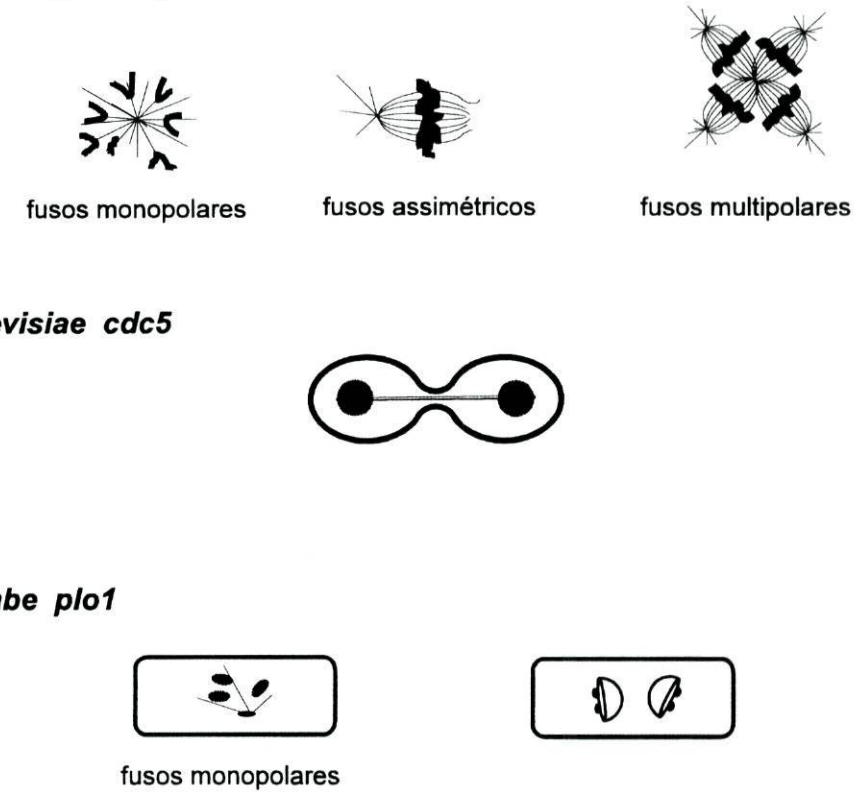


Fig. 1.20- *Fenótipo dos mutantes em proteínas tipo polo em diferentes organismos.* Entre as características principais do mutante em *Drosophila* estão a formação de fusos monopolares, em que os cromossomas se dispõem num arranjo circular em torno do polo, fusos assimétricos, em que um dos polos é aberrante, e fusos multipolares na meiose de machos homozigóticos. A divisão nos mutantes cdc5, de *S. cerevisiae*, observa-se uma paragem com um fuso mitótico alongado entre a célula mãe e a célula filha. Em *S. pombe* observam-se dois fenótipos distintos: paragem em mitose com fusos monopolares, e paragem no final da mitose após a divisão do material genético mas sem que ocorra septação.

Em *S. pombe* o fenótipo resultante da perca de função do gene *plo1* apresenta características inesperadas. A disrupção deste gene, além de provocar uma paragem em mitose, em que cromossomas condensados se encontram associados a fusos monopolares como os observados no mutante *polo1* de *Drosophila*, induz também uma incapacidade das células efectuarem a septação após a divisão nuclear (Ohkura *et al,* 1995). Simultâneamente, a sobrexpressão do *plo1* tem a capacidade de induzir a formação do septo em qualquer altura do ciclo celular e, na presença de $p34^{cdc2}$ activa, pode causar também à formação de fusos monopolares. Estas observações definem

assim dois papeis essenciais para a cinase *plo1* : como um enzima que coopera com a $p34^{cdc2}$ para regular o comportamento do fuso mitótico, e como a cinase primária capaz de independentemente induzir os eventos tardios da divisão celular da septação.

1.5.4- Têm as proteínas homólogas uma função homóloga ?

A descrição de proteínas com elevada homologia com polo em diferentes organismos coloca a questão se haverá alguma equivalência funcional biológica entre elas. Há ainda muito pouca informação bioquímica acerca dos homólogos em células de vertebrados. A análise genética, por outro lado, fornece uma quantidade de informação considerável acerca da função biológica destas cinases em *Drosophila*, e em leveduras (Sunkel e Glover 1988; Hartwell *et al,* 1973; Ohkura *et al,*, 1995) embora seja dificil afirmar se executam a mesma função. É difícil fazer comparações devido à natureza diferente (com as inerentes diferenças na divisão nuclear e ciclos celulares) dos três organismos. Por exemplo, embora nos alelos estudados da CDC5 não pareçam existir defeitos na formação de um fuso bipolar, é de notar que esta proteína parece também ter um efeito no comportamento dos microtúbulos dada a sua interacção com a droga MBC (Wood e Hartwell 1982). A ausência de fusos monopolares no mutante CDC5 pode simplesmente refletir o timing não convencional de formação do fuso mitótico em *S. cerevisiae,* que se inicia durante a fase S. A observação de que em células humanas a Plk1 se localiza no fuso mitótico durante a metafase e no midbody durante a telofase (Goldsteyn *et al,* 1994,1995) parece indicar que a função da proteína plk1 é idêntica às de *Drosophila* e levedura.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Estirpes de *Drosophila melanogaster* e linhas celulares

Neste trabalho usaram-se as estirpes selvagens Oregon R e Canton S de *Drosophila melanogaster*. As moscas foram mantidas à temperatura ambiente, ou a 18°C, em meio próprio (Ashburner, 1989). Os ovos *polo*^{1} utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de indíviduos adultos homozigóticos resultantes do stock $B^{s}Y$; *ru polo*^{1} *st e ca* / Tm3, Sb.

Como linhas celulares utilizaram-se as linhas Kc (de células embrionárias de *Drosophila melanogater*) e Sf9 (de *Spodoptera frugiperda*). Os stocks de células Kc e Sf9 foram mantidos em azoto liquido e descongelados quando necessário. As células Kc foram mantidas a 26°C em meio D22 (Sigma) com 5% de FCS e as células Sf9 a 27°C em meio Ex-cell 401 (Sera Lab) também suplementado com 5% FCS. A ambos os meios foram complementados com uma solução de penicilina, estreptomicina e fungizona. Para observação das células utilizou-se um microscópio invertido Nikon e a contagem era realizada com auxilio de uma câmara de NewBauer.

Meio de cultura de *Drosophila* - 5 g de Agar; 60 ml de melaço; 28g de extracto de levedura; 70 g de farinha de milho; 0,5g de Nipagin; água até 500 ml.

2.2- Congelamento e descongelamento de linhas celulares

Para congelamento das linhas celulares recolheram-se células em crescimento exponencial por centrifugação a baixa velocidade (1000 rpm, 5-15 min, centrífuga de bancada) ressuspenderam-se em 90% de FCS, 10% de DMSO, e congelaram-se em críotubos por períodos de 1 h a -20°C, 12 h a -70°C e depois transferidos para azoto líquido, sendo aí mantidos até posterior utilização.

No descongelamento das células, os críotubos eram aquecidos rápidamente nas mãos, as células lavadas com 10 ml do meio apropriado e ressuspendidas no volume final de meio de cultura.

2.3- Marcação de células com ortofosfato

Cresceram-se células Kc em frascos Nunc de 60cm^{2} e antes da adição do ^{32}P-ortofosfato lavaram-se as células duas vezes com meio D22 sem fosfato (Sigma)

suplementado com FCS a 5%. Após a adição do ^{32}P-ortofosfato (2mCi/ml, Amersham) as células foram incubadas 16h a 26°C, findas as quais se lavaram três vezes as células com PBS, que tinha sido préviamente arrefecido em gelo. As células foram então ressuspensas em 500ul de tampão IP + 1ug/ml aprotinina, pepstatina e leupeptina, também préviamente arrefecido, e lisadas por várias passagens através de uma agulha de 24G. O lisado foi clarificado por centrifugação e a proteína polo imunoprecipitada do sobrenadante como descrito em 2.10.

PBS - NaCl 137mM; Kcl 2.7mM; $Na_2HPO_4.7H_2O$ 4.3mM; KH_2PO_4 1.4mM; pH~7.3.
Tampão IP- Tris 50mM pH 8, EDTA 1mM, Triton X-100 0.5%, aprotinina 1ug/ml, leupeptina 1ug/ml, aprotinina 1ug/ul.

2.4- Preparação de células competentes

As células de *E.coli* (usualmente da estirpe XL-1 Blue (Stratagene)) foram preparadas segundo o método de permeabilização com cloreto de cálcio. Resumidamente, cresceram-se células em 50ml de meio LB até a densidade optica atingir os $D.O._{600nm}$=0,2. As células foram então colocadas em gelo durante 15min, recolhidas por centrifugação (15min a 1500g), ressuspensas em 20ml de $CaCl_2$ 100mM (previamente arrefecido a 4°C), e de imediato novamente colocadas em gelo durante 20 min. Após este período, recolheram-se as células por centrifugação, 15 min a 4°C a 1500g, ressuspenderam-se em 0,5 ml de $CaCl_2$ e deixaram-se a 4°C durante a noite. O grau de competência era então testado e as células guardadas, em 9% de glicerol, a -70°C até serem utilizadas.

Meio LB - 10 g/L de Triptona; 5 g/L de extracto de levedura; 5 g/L NaCl. Quando necessário meio sólido adicionou-se bacto-agar para 1.5%.

2.5- Preparações de DNA plasmídico

Os plasmídeos foram preparados a partir de culturas saturadas de células (*E. coli*) crescidas a 37°C com agitação, em meio LB com 50 mg/ml de ampicilina. O isolamento em pequena escala foi realizado utilizando-se um conjunto de reagentes Magic Miniprep (Promega), e o isolamento em média escala foi feito com um conjunto MidiPrep (Qiagen).

2.6- Doseamento de DNA e de proteínas.

O DNA em cadeia dupla foi doseado num fluorímetro Hoeffer. As proteínas foram doseadas segundo o método de Bradford (Bradford, 1976).

2.7- Clonagem de DNA

Os fragmentos de DNA a subclonar foram recuperados de geis de agarose por excisão da banda corada com brometo de etídeo (Sambrook *et al*, 1990). O fragmento de agarose contendo o DNA era colocado num eppendorff furado na base, e contendo lã de vidro silanizada. A agarose era então congelada a -20°C e o DNA recuperado por centrifugação (5 min, centrífuga eppendorff de bancada) para um segundo eppendorf. O brometo de etídeo foi então extraído com n-butanol (previamente saturado com água) o DNA precipitado com etanol e, após secagem ao ar, solubilizado em ddH_2O (Sambrook *et al*, 1990).

As reacções de ligação foram realizadas num volume de 20ul contendo o fragmento de DNA a subclonar e o plasmídeo linearizado (numa proporção de 1:3), 2ul de tampão de ligase (10x) e 2U de T4 DNA ligase. As reacções de ligação foram efectuadas à temperatura ambiente durante 2horas.

Da mistura de ligação utilizavam-se 10ul para transformar 100ul de células competentes. A mistura era incubada em gelo 20min, findos os quais se colocava a 37°C por 2min. Adicionavam-se então 400ul de meio LB, incubava-se a 37°C durante 30min com agitação e plaqueavam-se em 4 placas contendo ampicilina, IPTG e XGal.

2.8.- Geis de agarose e de poliacrilamida

Os geis de agarose foram feitos em tampão TAE (Sambrook *et al*, 1990) e os geis de poliacrilamida com SDS, foram feitos segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970) descrito em Ausubel *et al.* (1993).

Tampão Tris-acetato 10X (TAE 10X) - 48,4 g/L de Tris base; 11,4 ml/L de ácido acético; 9,3 g/L de EDTA.
Tampão SDS de amostra - ao tampão normal descrito em Ausubel *et al.* (1993) foi adicionado EDTA para 10mM.

2.9- Produção de proteína polo em sistema de baculovirus

2.9.1- Produção de plasmídeo recombinante. O fragmento de DNA codificando para a proteína desejada, incluindo o codão ATG inicial, foi inserido no

vector pVL1393 utilizando-se as técnicas descritas de clonagem acima descritas.

2.9.2- Tranfecção de células Sf9. Misturaram-se 20ul de lipofectina (GIBCO) com um volume igual de uma solução contendo vector AcRP23lacZ (100ng), préviamente linearizado com o enzima de restricção Bsu 361, e plasmídeo recombinante (500ng) diluídos em água. Esta mistura foi deixada à temperatura ambiente 15 minutos e depois adicionada a células Sf9 em plaquas de 35mm (~1 $x10^6$ células por placa e em 1.5ml de meio EX-Cell 401 sem FCS). Após incubação durante a noite adicionou-se 1.5ml de meio (suplementado com 5% de FCS) e deixaram-se crescer as células por mais dois dias, findos os quais se recolheu o sobrenadante que se utilizou então em ensaio de placa de agarose com diluições 1/10 a 1/1000, para detectar placas virais recombinantes.

2.9.3- Plaqueamento de baculovirus em agarose para isolamento de placas ou titulação. Plaquearam-se cerca de $2x10^6$ células em placas de 60mm e deixaram-se aderir durante uma hora. As células deviam ter uma distribuição homogénea e estar cerca de 50% confluentes. O meio de cultura foi então recolhido, as células cobertas com 1ml de diluição viral (1/10 a 1/1000), e incubadas durante 1hora. Após este período cobriram-se as células com 4ml de agarose de baculovirus 1.1% em meio Ex-cell 401 a 46°C. Deixou-se a infecção decorrer durante 5 dias a 27°C, e no quinto dia cobriram-se as placas com uma segunda camada de 2ml de agarose contendo Neutral Red e Xgal (feita nas proporções de 8ml de meio, 2ml de 2.5% agarose de baculovirus, 0.1ml de neutral red 10mg/ml, 0.1ml de Xgal 25mg/ml). Incubou-se então a 27°C durante várias horas, até os corantes se difundirem e se puderem identificar as placas virais como "buracos" num fundo vermelho opaco de células vivas. As placas de virus selvagem devem ainda aparecer coradas de azul. As potenciais placas virais positivas foram colhidas com uma pipeta de Pasteur.

2.9.4- Identificação de placas virais positivas. Plaquearam-se células Sf9 em placas de 10mm (cerca de 10^5 celulas por placa) com 1ml de meio, e adicionou-se-lhes directamente a placa viral em agarose. Após cinco dias de incubação a 27°C o sobrenadante foi recolhido e guardado a 4°C. As placas foram lavadas com PBS e

fixadas dois minutos com uma mistura 1:1 de metanol:acetona a 0°C. Esta mistura foi escorrida e as placas secas completamente. Incubou-se então com o anticorpo MA294 anti-polo durante uma hora, lavou-se 3x com PBS durante 8min e incubou-se com o segundo anticorpo (conjugado com peroxidase) durante 1h. Após novas lavagens adicionou-se DAB com sulfato de niquel e peróxido de hidrogénio, e parou-se a reacção lavando-se com água destilada. As placas positivas foram então identificadas por observação ao microscópio.

Os vírus recombinantes que produziam polo foram ainda melhor caracterizados utilizando-se o sobrenadante recolhido para produzir infecções em pequena escala. Infectaram-se células Sf9 crescidas em placas de 60mm, e recolheram-se estas células após 1, 2, 3 e 4 dias. As células foram então lisadas em tampão de amostra de geis de SDS e o extracto analizado em gel de poliacrilamida. Os geis foram corados com Coomassie blue ou utilizados em western blot para se detectar os niveis de proteina polo produzida.

2.9.5- Infecção de células para produção de stock viral. A produção de stock de virus recombinante foi efectuada em frascos de $25cm^2$ com cerca de $3x10^6$ células. As células foram infectadas com 20ul de sobrenadante viral (recolhido na identificação de placas virais positivas), e deixadas a crescer durante cinco dias. Findo este periodo o sobrenadante foi recolhido, os detritos celulares retirados por centrifugação (10min a 3000rpm), e o sobrenadante (stock viral) guardado a 4°C.

2.9.6- Infecção de células para produção de proteína. A produção de proteína foi geralmente efectuada em frascos de $150cm^2$ com $3,6x10^7$ células. O meio de cultura das células foi retirado e as células infectadas com o stock de virus recombinante não diluido (suficiente para cobrir as células) durante 2 horas. O sobrenadante foi então substituido por 20ml de meio fresco e as células deixadas a crescer durante 2 dias, findos os quais foram recolhidas por centrifugação a 3000rpm durante 10min. As células foram então ressuspensas em 0.1 volumes de tampão de lise (50mM Tris pH7.5, DTT 1mM e EGTA 0.1mM) e lisadas congelando e descongelando 4 vezes. Centrifugou-se a 14000g durante 10min a 4°C e o sobrenadante foi guardado a -20°C em aliquotas ou utilizado directamente em ensaios de cinase.

2.10- Imunoprecipitações

Os extractos proteicos (quer de células Sf9 quer de embriões de Drosophila) foram primeiramente tratados com proteina G - agarose (*ie*, proteína G conjugada a grãos de Sepharose (Sigma)) (préviamente equilibrada em tampão IP (50% w/v)), usualmente 1 volume de extracto para 1 volume de proteína G, durante 1h a 4°C com agitação suave. No final deste tempo a agarose foi recolhida por centrifugação (10s a 3000g). Simultaneamente incubava-se proteína G-agarose com anticorpo Ma294 (geralmente 20ul anticorpo-100ul proteína G-agarose) também durante 1h a uma temperatura de 4°C. Findo este tempo a proteína G-agarose/Ma294 era lavada três vezes com tampão IP, para remoção do anticorpo livre, e adicionada ao extracto proteico entretanto tratado com proteína G-agarose. Geralmente adicionou-se 10ul proteína G-agarose/Ma294 para 20ul de extracto. Deixou-se a imunoprecipitação decorrer durante 1h a 4°C com agitação suave e no final recolheu-se o imunoprecipitado por centrifugação (10s a 3000g). O imunoprecipitado foi então lavado uma vez com tampão IP + NaCl 500mM, duas vezes com tampão IP e finalmente uma vez com tampão IP sem inibidores de proteases. No final das lavagens o imunoprecipitado foi imediatamente utilizado em ensaios de cinase ou guardado a 4°C até ser utilizado.

Tampão IP- Tris 50mM pH 8, EDTA 1mM, Triton X-100 0.5%, aprotinina 1ug/ml, leupeptina 1ug/ml, aprotinina 1ug/ul.

2.11- Ensaios de cinase

O ensaio de cinase padrão era realizado misturando-se 5ul da cinase imunoprecipitada com 5ul de tampão de cinase 2x, 0.5ul de [g-^{32}P]ATP, 1ul de caseina-α desfosforilada a 20mg/ml e 1ul de ATP 2mM. A mistura era incubada a 20°C durante 20min findos os quais a reacção era parada por adição de 15ul tampão de amostra de SDS e as amostras fervidas 3 min e analisadas em geis de poliacrilamida. Em certas experiências a caseína foi substituída por histona H1 desfosforilada (GIBCO) também a 20mg/ml. Os ensaios de cinase realizados em extractos de embriões ou de microtúbulos estão descritos nas secções respectivas dos resultados.

Tampão de cinase 2x - Hepes 20mM pH7,5 , KCl 150mM, $MgCl_2$ 10mM, DTT 2mM e EGTA 1mM.

2.12- Tratamento com fosfatases

À amostra a tratar com fosfatase adicionou-se 1/10 de tampão da fosfatase 10x (no caso de se tratar de um imunoprecipitado lavou-se este 2 vezes com tampão da fosfatase e deixou-se num volume final de 10ul de tampão) e 3U de fosfatase. As fosfatases utilizadas foram a fosfatase alcalina intestinal bovina e a fosfatase ácida de batata (ambas Boehringer Manheim). A mistura foi incubada 15min a 37°C e a reacção parada com adição de tampão de amostra de SDS. No caso de se tratar de um imunoprecipitado, em vez da adição de tampão de amostra o imunoprecipitado era lavado 3 vezes com tampão IP e utilizado de seguida em ensaios de cinase.

Tampão da fosfatase alcalina - Tris 50mM pH8, NaCl 25mM e $MgCl_2$ 5mM
Tampão da fosfatase ácida - PIPES 10mM pH6.

2.13- Análise de aminoácidos fosforilados

A análise de fosfoaminoácidos foi efectuada em proteínas extraídas de geis de poliacrilamida de acordo com o protocolo de Van der *et al.* (1993), seguida de hidrólise ácida a 110°C. As fosfoproteínas, contendo ^{32}P, a analisar foram separadas em gel de poliacrilamida e localizadas no gel, seco sobre papel 3MM, por exposição a um filme de autoradiografia. As bandas de interesse foram cortadas do gel seco, e um máximo de papel foi raspado tendo-se o cuidado de não danificar o gel. Os fragmentos de gel foram re-hidratados durante 5min com 400ul de bicarbonato de amónio 50mM pH 7,3 - 7,5. Os pedaços re-hidratados foram então moídos até poderem ser pipetados com uma micropipeta de 200ul. A peça de vidro utilizada para moer o gel foi lavada 2x com 200ul de bicarbonato que se juntaram ao gel moído. Adicionou-se ainda 40ul de 2-mercaptoetanol e 8ul de SDS 10% ao gel moído. A mistura foi fervida 2-3min e incubada, com agitação, pelo menos 90min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10000rpm durante 2min o sobrenadante foi retirado e guardado num outro tubo. O pellet foi novamente incubado 90min com 400ul de bicarbonato de amónio, 4ul de SDS 10% e 20 ul de 2-mercaptoetanol. Após nova centrifugação os dois sobrenadantes foram juntos e recentrifugados. O sobrenadante obtido foi então arrefecido em gelo e misturado com 20ug de albumina, 250ul de TCA 100% (w/v) e deixado em gelo durante uma hora. A mistura foi centrifugada a 4°C a 13000rpm numa microcentrifuga durante 15min e o

sobrenadante descartado. O pellet foi então lavado com 500ul de etanol puro (préviamente arrefecido em gelo) e seco ao ar após nova centrifugação.

As proteínas foram então sugeitas a hidrólise ácida a 110°C (1hora com HCl 6N), e os resíduos fosforilados foram separados em cromatografia de camada fina ascendente, em placas de celulose, utilizando-se ácido isobutirico:NH_4OH 0,5M (5:3) como solvente. Os fosfoaminoácidos foram detectados por autoradiografia e identificados por comparação com padrões.

2.14- Preparação de extractos de microtúbulos

Os extractos de microtúbulos foram preparados de acordo com uma modificação do protocolo descrito por Goldstein et al 1986. Os embriões de Drosophila foram recolhidos após duas horas de postura, lavados com PBS contendo Triton X-100 0,1%, descorionados com hipoclorito de sódio 50% durante 1min, e lavados em tampão de lise. Os embriões foram então homogenizados em gelo e o extracto centrifugado a 16000g durante 30 min a 2°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 135000g durante 90min a 2°C. Os microtúbulos do extracto foram polimerizados pela adição de taxol e de GTP para concentrações finais de 20uM e de 1mM, respectivamente, e incubação a 37°C durante 10min. Findo este período o extracto foi arrefecido em gelo 15min e colocado sobre uma almofada de sacarose 15% (preparada com tampão de lise + taxol 20ul + GTP 1mM), sendo então centrifugado a 54000g durante 30min a 2°C. O pellet foi ressuspenso em tampão de lise + taxol 20ul + GTP 1mM + NaCl 0,4M , incubado a 37°C durante 30min e centrifugado (microcentrifuga) 30min a 4°C. O pellet final foi ressuspendido em tampão de lise e guardado a -70°C. Este pellet consiste maioritáriamente em tubulina e numa pequena fracção de proteínas associadas a microtubulos.

Alternativamente, para se obter um extracto enriquecido em microtúbulos mas contendo MAPs, seguiram-se os passos iniciais do protocolo anterior substituindo-se a centrifugação pela almofada de sacarose por uma centrifugação a 120000g durante 90min a 2°C. Os passos seguintes foram mantidos excepto quando indicado.

Tampão de lise - PIPES 0.1M pH6,6 , EGTA 5,0mM , $MgSO_4$ 1mM, glicerol 0,9M , PMSF 2mM e DTT 1mM.

2.15- Western blotting

As amostras foram corridas em geis de poliacrilamida e tranferidas para membrana de nitrocelulose por electroblot durante 1h a 300mA. A membrana foi então bloqueada 1h com 7% de leite em pó em TBST. Após lavagem da membrana durante 15min com TBST + 1% leite magro em pó, incubou-se com o anticorpo primário, em TBST + 1% leite em pó, durante 1h. Os blots foram então lavados durante 30min em TBST + 1% leite em pó, e de seguida incubados 1h com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano. Após 30min de lavagens com TBST os filtros foram revelados com os reagentes de detecção de ECL (Amersham) de acordo com as instruções do fabricante. Toda a técnica foi realizada à temperatura ambiente.

TBST - Tris 50mM pH7,5 , NaCl 150mM, Tween 20 0.05%.
Tampão de transferência - Tris 25mM pH8,3 , Glicina 191mM.

2.16- Ensaio de cobertura (Ligand blotting)

As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose como descrito para western blots. Após a transferência as membranas foram incubadas com PBS + 5% leite em pó durante 30min. As membranas foram de seguida lavadas 5min com tampão PEMF + DTT 1mM, e incubadas 2h com os ligandos (extractos de células Sf9 não infectadas ou extractos de células Sf9 infectadas com VpoloB4) em tampão PEMF + DTT 1mM à temperatura ambiente. No final da incubação removeram-se as proteínas não ligadas com três lavagens de 5min cada com TBST. O poloB4 ligado a proteínas bloqueadas na membrana foi detectado com anticorpo MA294 e com anticorpo secundário conjugado com peroxidase conforme descrito para a técnica de western blot. Este protocolo foi adaptado de Kirsch *et al.* (1990).

Tampão PEMF - Pipes 0.1mM pH6,6 , EGTA 1mM, $MgSO_4$ 1mM e NaF 25mM.
PBS - NaCl 136,8mM , KCl 2,7mM , Na_2HPO_4 16mM, KH_2PO_2 1,5mM.

CAPÍTULO 3

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POLO *IN VIVO*

Este projecto teve início imediatamente após a clonagem e sequenciação do gene *polo* (do qual foram clonados e sequenciados quer a região genómica, contendo o gene completo, quer dois cDNAs) (Tavares, A. 1992; Llamazares *et al,* 1991). A análise da sequência do gene indica que codifica uma proteína de 67kDa de elevada homologia na região N-terminal com o domínio catalítico de cinases de proteínas. Assim sendo, para se proceder a uma caracterização mais detalhada da função deste gene, foi necessário desenvolver-se um ensaio em que se detecte a actividade catalítica da proteína polo. O desenvolvimento deste tipo de ensaio permitiria a identificação de possíveis substratos endógenos fisiológicos e assim ter uma noção mais exacta do seu papel biológico.

3.1- EXPRESSÃO DE PROTEÍNA POLO EM BACULOVIRUS

Para a produção *in vivo* de proteína polo em células eucariotas construíu-se um baculovirus recombinante, codificando a cinase completa, que foi utilizado na infecção de células Sf9 em cultura.

O primeiro passo na construção deste virus recombinante consistiu na inserção da região codificante do gene polo no vector pVL1393. Para tal isolou-se o fragmento Pvu I - Not I do cDNA 2a2, contendo toda a região codificante para a proteína polo (o enzima Pvu I digere o DNA 156bp a montante do codão ATG inicial, e o local de digestão do enzima Not I está após o codão de terminação). O fragmento de DNA isolado foi inserido nos locais de restrição Sma I - Not I do vector pVL1393, e os transformantes positivos foram confirmados por mapa de restrição e por sequenciação do local de ligação Sma I / Pvu I. O plasmídeo purificado de um dos transformantes positivos foi então utilizado, em conjunto com DNA de virus AcRP23lacZ na co-transfecção de células Sf9 (ver protocolo seguido no Capítulo 2) (Fig. 3.1).

Os virus recombinantes foram isolados após três etapas de ensaio em placa, e a produção de proteína polo foi confirmada realizando-se "western blots" *in situ* com

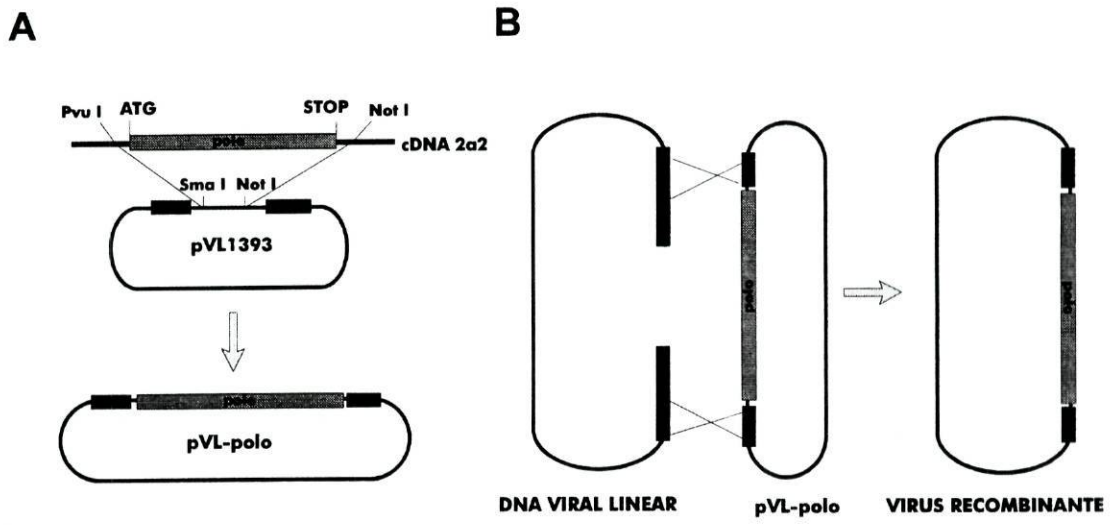


Fig. 3.1- *Construção de um baculovirus recombinante contendo o gene polo.* O fragmento Pvu I-Not I do cDNA 2a2, contendo a região codificante completa do gene polo, foi subclonada nos locais Sma I- Not I do vector pVL1393, criando a quimera pVL-polo (**A**). Este plasmídeo foi então co-transfectado com DNA viral linearizado para células Sf9. A existência de regiões de recombinação em ambos os tipos de DNA (regiões a negro) permitem que ocorra a recombinação *in vivo* , originado um vírus recombinante com o gene polo (**B**). Este vírus permitirá a expressão da proteína polo completa.

os anticorpos monoclonais anti-polo MA81 e MA294 (Fig. 3.2). De trinta e seis placas virais iniciais, apenas duas produziram uma proteína reconhecida pelos anticorpos.

Estes virus recombinantes foram denominados VpoloB2 e VpoloB4. Quando analizados em "western blot" extractos de células Sf9, após 4 dias de infecção com qualquer dos dois fagos recombinantes, verifica-se que o anticorpo MA294 reconhece em ambos os extractos uma proteína de 67kDa (Fig. 3.3). Esta proteína tem o mesmo peso molecular aparente da proteína polo observada de extractos de embriões de *Drosophila*. A concentração da proteína reconhecida pelos anticorpos é, no entanto, muito diferente nos dois extractos. O virus VpoloB4 parece induzir uma produção de proteína superior à do virus VpoloB2. O baculovirus VpoloB4 e a proteína produzida em células infectadas por este vírus (denominada poloB4) foram os utilizados em todas as experiências futuras indicadas neste trabalho.

É possivel detectar-se proteína poloB4, por "western blot", em extractos de células Sf9 a partir de 24h pós-infecção. A concentração desta proteína no extracto aumenta até 4 dias após a infecção (período máximo de tempo a que se estudou a expressão da proteína). No entanto, nos extractos realizados após 2 ou mais dias de I

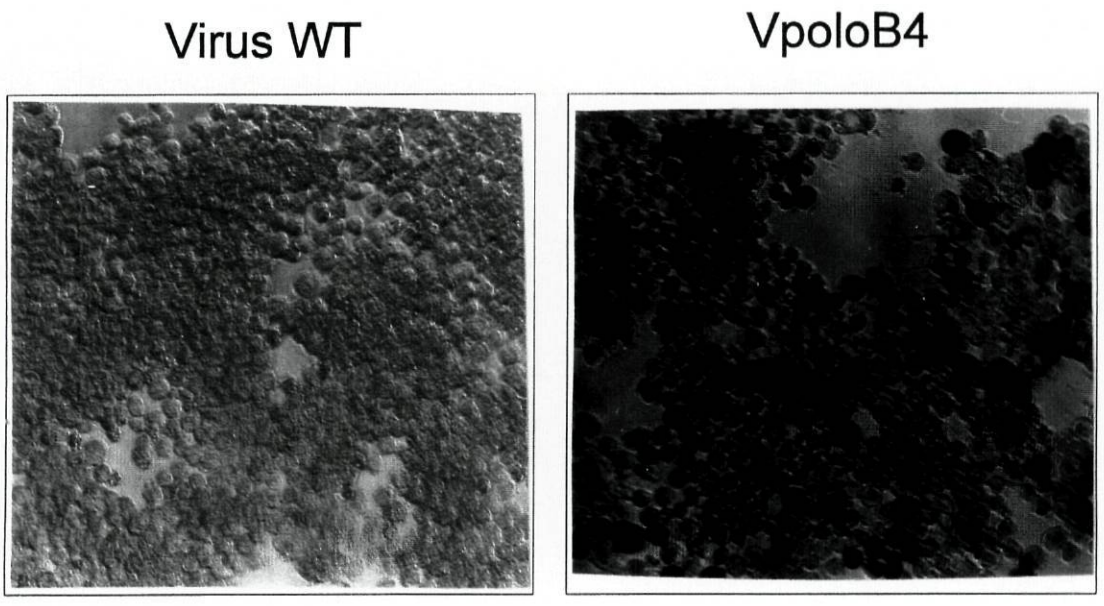


Fig. 3.2- *Detecção de proteína polo recombinante em células Sf9.* Dois dias após a infecção de células Sf9 com virus selvagem ou com virus recombinante, detectou-se a proteína polo recombinante com o anticorpo Ma294 realizando-se "Western blots" *in situ*. As células que se encontram a produzir a proteína recombinante são visiveis no painel poloB4 como tendo uma cor mais escura.

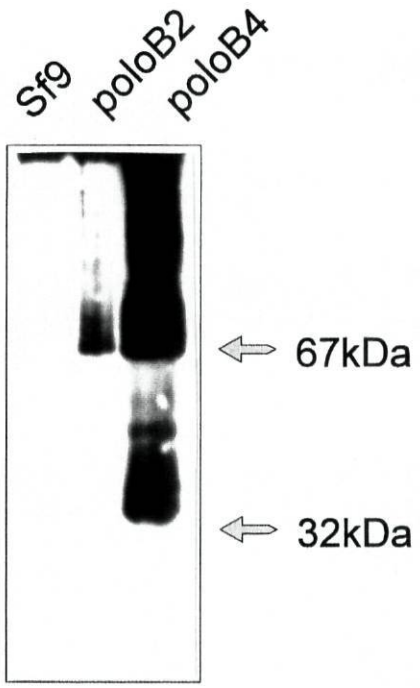


Fig. 3.3- *Detecção de proteína polo recombinante em extractos de células Sf9.* Análise por "western blot" de extractos de células Sf9 após 4 dias de infecção com virus poloB2 ou poloB4. Como controlo analizou-se uma mesma quantidade de proteína total de um extracto de células Sf9 que não foram infectadas. As proteínas foram detectadas com o anticorpo Ma294.

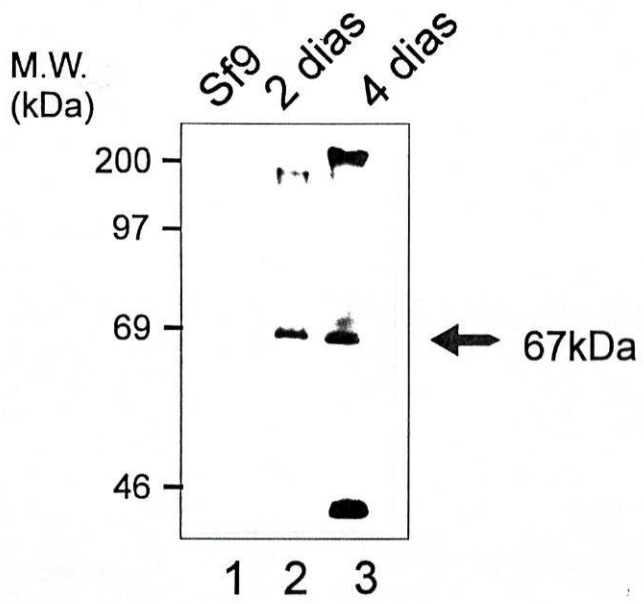


Fig. 3.4- *Produção de proteína polo recombinante em células Sf9*. Analisaram-se em gel de poliacrilamida extractos de células Sf9 obtidos a partir de células não infectadas (coluna 1) ou de células infectadas (2 ou 4 dias após infecção, colunas 2 e 3 respectivamente). A proteína poloB4 foi detectada por western blot com o anticorpo Ma294.

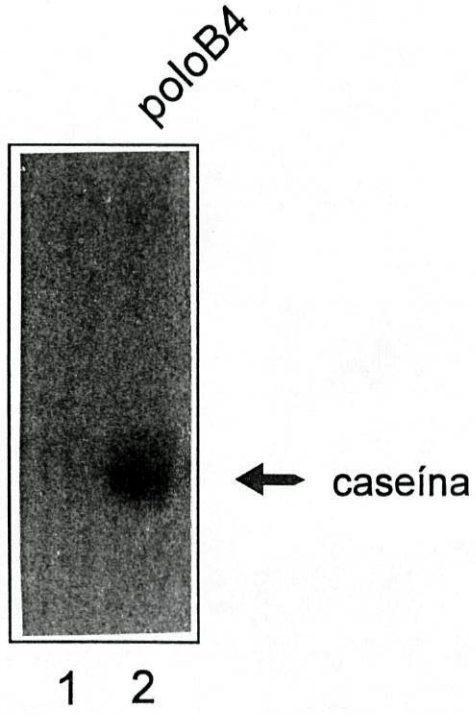


Fig. 3.5- *A proteína poloB4 tem actividade cinásica.* Com o anticorpo Ma294 realizaram-se imunoprecipitações a partir de células Sf9 infectadas com virus selvagem (coluna 1) ou infectadas com virus recombinante poloB4 (coluna 2). Os imunoprecipitados foram utilizados em ensaios de cinase e a marcação da caseína detectada por autoradiografia. A seta indica a posição da caseína.

infecção é visível em "western blot" o aparecimento de uma banda de baixo peso molecular, indicando que provávelmente começa a ocorrer degradação da proteína (Fig. 3.4). Por este motivo na continuação dos nossos estudos utilizou-se proteína poloB4 obtida de extractos de células após dois dias de infecção.

Quando analisadas em "western blot", não é detectada qualquer diferença entre os padrões de migração da proteína poloB4 e da proteína polo nativa. Quando os geis de SDS são efectuados de modo a obter-se maior resolução na zona dos 60kDa ambas apresentam uma banda dupla característica (Fig. 4.5B). Analizou-se também por "western blot" as proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo MA294 a partir de extractos de células Sf9 infectadas com VpoloB4 ou de extractos de embriões de *Drosophila*. Os resultados indicam que quando se utilizam quantidades idênticas de anticorpo MA294 se imunoprecipitam quantidades idênticas de proteína polo e de proteína poloB4 (Fig. 3.6).

Um grande número de cinases produzidas com recurso a baculovirus mostram possuir actividade catalítica idêntica às proteínas nativas. Deste modo utilizou-se também a proteína poloB4 no desenvolvimento de um ensaio em que a actividade catalítica da cinase pudesse se detectada de modo reprodutível (ver adiante descrição deste ensaio). A análise dos resultados obtidos nestes ensaios de cinase mostra que tanto o enzima polo nativo de embriões de *Drosophila* como o enzima recombinante poloB4 são capazes de utilizar a caseína como substrato exógeno. Mais, quando uma quantidade idêntica de anticorpo na imunoprecipitação das duas proteínas obtêm-se um nível idêntico de incorporação de ^{32}P na caseína nos ensaios de cinase (Fig. 3.6). Tanto a proteína polo nativa como a proteína recombinante poloB4 sofrem uma redução no nível de actividade catalítica se conservadas a -20°C após a imunoprecipitação (Fig. 3.7).

3.2- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POLO EM E. COLI

Um dos objectivos iniciais deste projecto seria o isolamento de proteínas que interajem com a proteína polo, utilizando-se uma coluna de afinidade com proteína

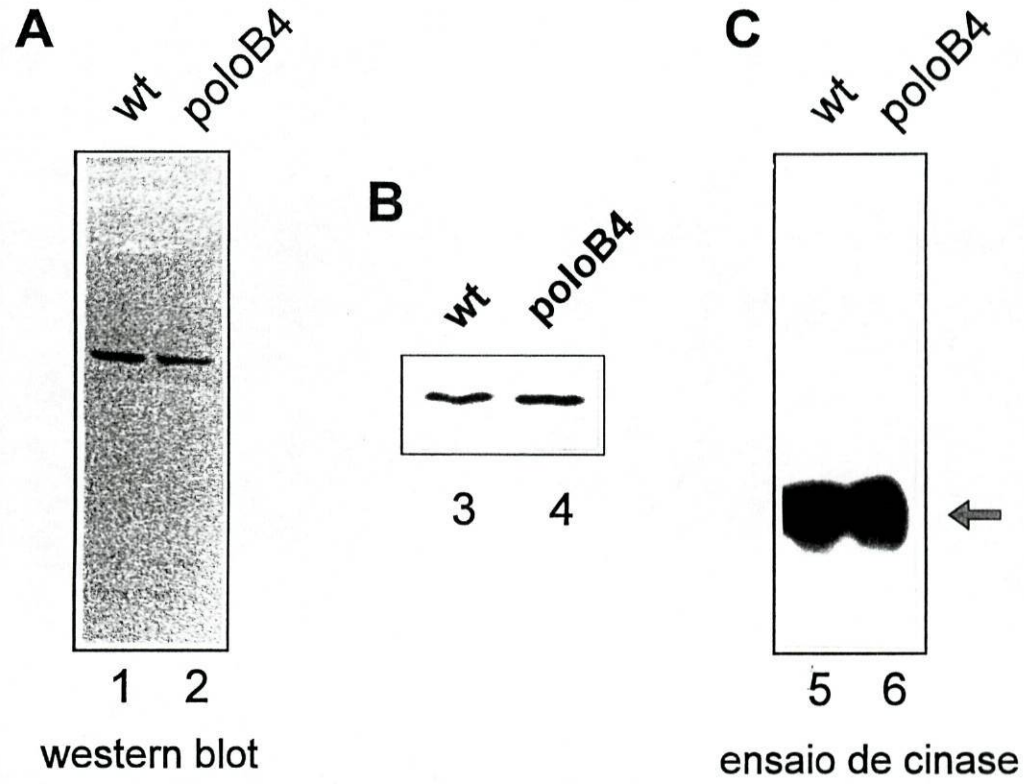


Fig. 3.6- *Comparação das massas moleculares e actividades catalíticas das cinases polo nativa e poloB4.* **A)** Analizou-se por western blot um extracto de 10 embriões wt e um extracto de células Sf9 infectadas com virus recombinante VpoloB4 (colunas 1 e 2 respectivamente). A proteína reconhecida pelo anticorpo Ma294 foi detectada por ECL. **B)** A proteína polo imunoprecipitada com anticorpo Ma294 de extractos de embriões ou de extractos de células Sf9 infectadas foi analizada por western blot (colunas 3 e 4, respectivamente). Utilizou-se a mesma quantidade de anticorpo nas duas imunoprecipitações. **C)** Utilizou-se uma quantidade igual de imunoprecipitados polo wt e poloB4 em ensaios de cinase (colunas 5 e 6, respectivamente), com a caseína como substrato. A caseína fosforilada (seta) foi detectada por autoradiografia após analise em gel de poliacrilamida.

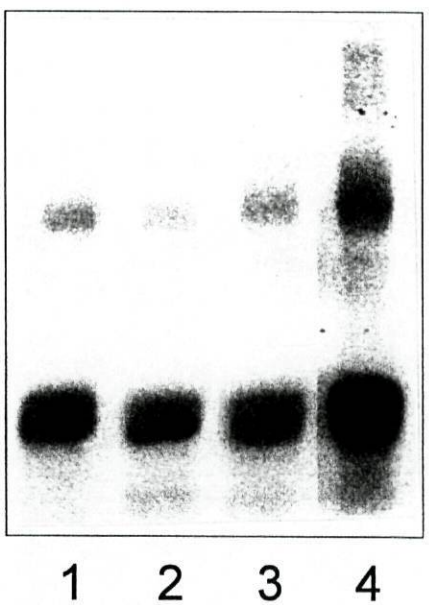


Fig. 3.7- Realizaram-se ensaios de cinase com proteína poloB4 que tinha sido imunoprecipitada e mantida durante uma semana a 4°C (coluna 1) ou a -70°C (coluna 2). Na coluna 3 o ensaio foi realizado com proteína polo selvagem guardada uma semana a -70°C. Como controlo realizou-se um ensaio com proteína poloB4 imunoprecipitada de um extracto obtido no mesmo dia (coluna 4).

polo ligada covalente a uma matriz. Para a construção de tal coluna seria necessário ter-se acesso a uma quantidade elevada de proteína polo pura, pelo que se tentou a produção de polo em sistemas bacterianos sob a forma de proteína de fusão com um polipéptido âncora ("tag"), que permitisse uma fácil purificação da proteína expressa.

No entanto, embora se utilizassem diferentes vectores com diferentes "tags" a expressão de proteína completa polo nunca foi alcançada. A região codificante foi subclonada nos vectores pMAL (BioLabs), pGEX (Pharmacia) e pET (Novagen) utilizando-se diferentes locais de restrição. Os vectores quimericos foram sempre analizados por mapa de restrição e as regiões de ligação fragmento/vector confirmadas por sequenciação. A expressão foi tentada em diversas estirpes de *E. coli* (DH5a, TG2 e XL-1) e a indução da expressão testada a várias temperaturas (20°C, 25°C, 30°C e 37°C). Tentou-se ainda induzir a expressão das proteínas com diferentes concentrações de IPTG (1/100, 1/10, 10x, 100x, e 1000x da concentração indicada no protocolo dos fabricantes).

Nenhuma das condições testadas resultou na expressão de proteína polo. A produção de proteína polo em bactéria é nula. A possibilidade de a proteína ser imediatamente reconhecida pela maquinaria proteolítica bacteriana é possivel pois nunca se detectou proteína polo mesmo em extractos de células com 15min de indução. A expressão de partes da proteína no entanto não apresentou qualquer problema (ver exemplo apresentado na Fig. 3.8).

3.3- DISCUSSÃO

Os sistemas de produção de proteínas *in vivo*, e em especial o sistema que emprega o uso de baculovirus na produção de proteínas em células Sf9, têm revelado excelentes resultados na produção de enzimas que retêm a actividade catalítica. Isto é tanto mais verdade para proteínas que requerem modificações pós-traducionais de modo a adoptarem uma conformação catalíticamente activa. No caso específico de expressão de proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular, os exemplos incluem as ciclinas A e B, a fosfatase cdc25 e as cinases wee1 e cdc2, todas elas expressas em células Sf9 numa forma activa.

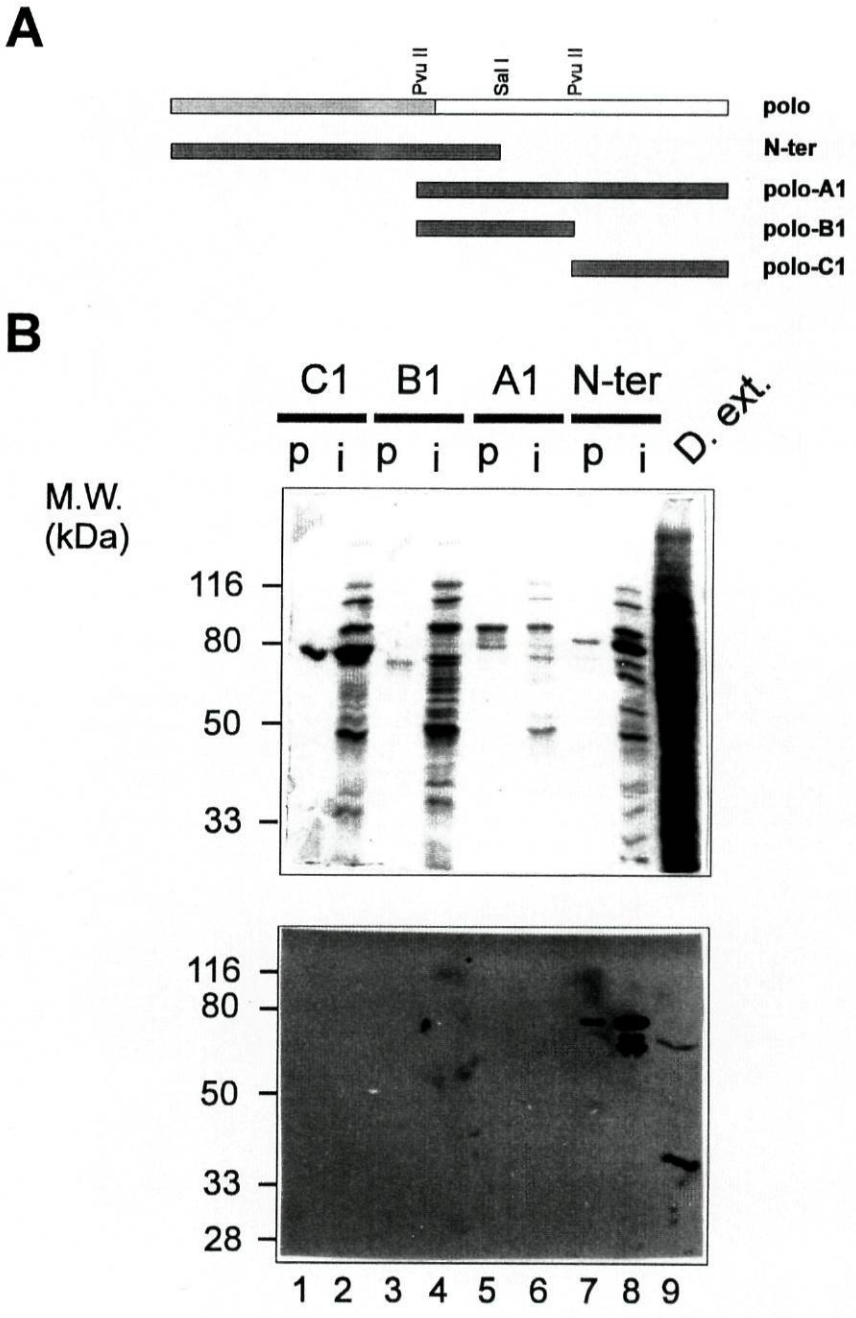


Fig. 3.8- *Proteínas de fusão em E. coli.* Diversos blocos da proteína polo foram produzidos em *E. coli* sob a forma de proteína de fusão com a proteína que se liga à maltose (MBP). **A)** Esquema dos framentos do gene polo subclonados no vector pMAL-c (BioLabs). Estes fragmentos são subclonados a jusante do gene codificante para a MBP e na mesma grelha de leitura.Deste modo a proteína de fusão produzida terá como N-terminal a MBP. **B)** As diferentes proteínas de fusão foram analisadas por gel de poliacrilamida corado com Azul de Coomassie (painel superior), e por "western blot" com o anticorpo Ma294 (painel inferior). Para cada quimera correu-se em gel extracto de bactérias após a indução com IPTG (i) e uma alíquota da proteína purificada por coluna de maltose (p). A coluna D. ext. refere-se a extracto de Drosophila. Em "western blot" apenas se detecta a proteína polo selvagem de *Drosophila* e a quimera N-ter (de lembrar que o anticorpo foi produzido contra um polipéptido igual ao N-ter).

Mostramos agora neste trabalho que este sistema é também eficaz na produção de cinase polo. A transformação de células Sf9 com um baculovirus recombinante contendo o gene *polo* resulta na expressão de uma proteína indistinta da proteína polo nativa em ensaios bioquímicos. Quer em "western blot", quer no seu grau de fosforilação (ver adiante), quer nos ensaios de cinase efectuados ao longo deste estudo, a proteína poloB4 apresentou sempre um comportamento idêntico à proteína polo nativa imunoprecipitada de embriões de *Drosophila*. Deste modo concluímos que a proteína produzida neste sistema pode ser utilizada em ensaios futuros em substituição à proteína nativa.

O recurso à imunoprecipitação não é, no entanto, o melhor processo de se purificar quantidades elevadas de proteína expressa. Como se pretendia também tentar isolar, por recurso à construção de uma coluna de afinidade contendo proteína polo imobilizada, proteínas que interagissem com esta ultima era necessário ter-se acesso a uma elevada concentração da cinase polo. A produção de proteínas em sistemas bacterianos, em que a proteína de interesse é produzida fundida a um polipeptido de fácil purificação, tem sido também utilizada frequentemente devido à sua relativa facilidade e eficácia. Deste modo recorreu-se a este sistema para se tentar produzir e purificar uma quantidade elevada de proteína polo. No entanto todas as nossas tentativas se revelaram infrutiferas. Embora se tenham testado diferentes vectores e diferentes condições de expressão não foi possível obter-se a produção de proteína polo completa nestes sistemas, muito embora tenha sido fácil a produção de partes da proteína.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE BIOQUÍMICA DA CINASE POLO

4.1- A proteína polo é uma cinase

A análise da estrutura primária da proteína polo tinha revelado uma homologia significativa com o domínio catalítico de cinases proteicas, indicando que a proteína polo seria provávelmente ela mesmo uma cinase. Assim tornou-se prioritário o desenvolvimento de um ensaio *in vitro* onde a actividade catalítica do enzima pudesse ser determinada (ensaio de cinase).

4.1.1- Ensaios com proteína polo produzida *in vitro*

No desenvolvimento dos ensaios de cinase utilizou-se inicialmente proteína polo produzida *in vitro* a partir dos cDNAs 2a2 e 9a2. Estes cDNAs encontram-se clonados no vector pNB40 que, por possuir os promotores para as RNA polimerases SP6 e T7, permite a sua utilização directa em sistemas de transcrição *in vitro*. A proteína polo foi assim sintetizada por tradução e transcrição *in vitro* (utilizando-se o enzima SP6 e um lisado de reticulócito de coelho (Amersham) de acordo com as instruções do fabricante). O produto final da tradução *in vitro* foi utilizado directamente, sem ser purificado, nos ensaios de cinase. As reacções de cinase foram iniciadas adicionando-se 6µl do produto obtido no sistema de tradução *in vitro* a uma mistura de 2µl de tampão K (Tris 50mM pH7.5, $MgCl_2$ 10mM, EDTA 6mM, DTT 1mM), 6µl de ATP 1mM, 6µl de substrato (caseína-α ou histona H1 ambas a 3mg/ml) e 1µl [γ–^{32}P]ATP. As misturas de reacção foram incubadas 20min a 25°C, as reacções terminadas por adição de um igual volume de tampão de amostra-SDS, e as proteínas fosforiladas foram analizadas em gel de poliacrilamida e detectadas por autoradiografia. Como controlo negativo realizaram-se ensaios com a mistura do sistema de tradução *in vitro* ao qual não foi adicionado mRNA . Os resultados obtidos neste tipo de ensaios, apresentados na Fig. 4.1, mostram que a proteína polo produzida no sistema de tradução *in vitro* é capaz de utilizar a histona H1 como substrato e que não reconhece a caseína. A fosforilação da histona H1 resulta específicamente da

actividade catalítica da proteína polo pois na reacção controlo em que a proteína não está a ser traduzida a histona H1 não aparece marcada (fig.4.1 pista 3). Nas reacções em que a proteína polo se encontra presente detecta-se ainda a marcação de uma proteína de 67kDa (ponta de seta na fig. 4.1) e que poderá corresponder ao produto da autofosforilação do polo. Foram obtidos os mesmos resultados quer o cDNA inicial utilizado fosse o 9a2 ou o 2a2. Este tipo de ensaio mostra assim que a proteína polo quando produzida num sistema de tradução *in vitro* tem actividade catalítica cinásica.

4.1.2- Ensaios com proteína polo nativa

O ensaio de cinase utilizado frequentemente no decurso deste projecto foi desenvolvido utilizando-se proteína polo imunoprecipitada de embriões de *Drosophila* com anticorpos monoclonais.

Em colaboração com o Prof. David Glover, na Escócia, produziram-se diversos anticorpos monoclonais contra a região N-terminal da proteína polo. Dos anticorpos obtidos e com base no seu comportamento em "western blot" seleccionou-se o anticorpo monoclonal MA294 para a continuação dos nossos estudos. Este anticorpo revelou-se excelente para imunoprecipitar a proteína polo, quer de extractos de embriões quer de extractos de células Sf9 (ver outros capítulos). A proteína assim imunoprecipitada pode ser usada directamente em ensaios de cinase utilizando-se a caseína e a histona H1 como substratos exógenos (descrição do ensaio de cinase em 2.11). Com este tipo de ensaio verificou-se que, quer a proteína nativa quer a proteína recombinante, utilizam como substrato preferencial a caseína-α e só muito ineficazmente a histona H1 (Fig. 4.2) confirmando que a proteína polo é uma cinase proteica.

No decurso deste trabalho Brian Fenton a trabalhar no laboratório do Prof. David Glover também utilizou anticorpos monoclonais anti-polo (neste caso os anticorpos MA84 e MA75) para imunoprecipitar a proteína polo de embriões e para determinar a sua actividade catalítica, tendo obtido resultados idênticos aos nossos, isto é, que a cinase imunoprecipitada de embriões de *Drosophila* é capaz de usar como substrato a caseína mas não a histona H1 (Fenton & Glover 1993).

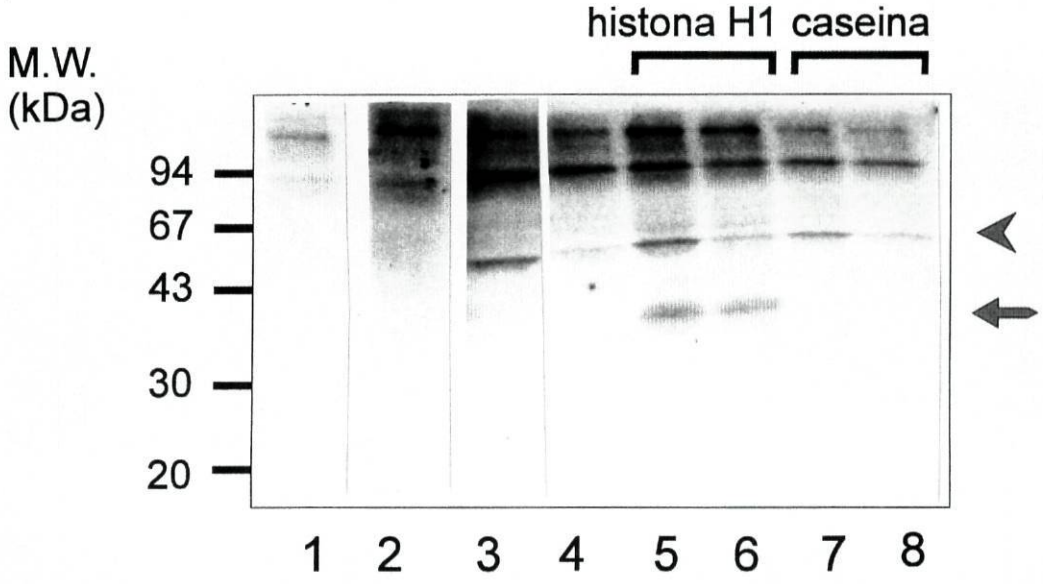


Fig. 4.1- *Ensaios de cinase com a proteína polo traduzida in vitro.* Realizaram-se ensaio de cinase com proteína polo transcrita e traduzida a partir do cDNA 2a2 (pistas 4, 6 e 8) ou do cDNA 9a2 (pistas 3, 5 e 7). Como substrato exógeno utilizou-se a caseína-α (pistas 2, 7 e 8) ou a histona H1 (pistas 1, 5 e 6). A ponta de seta à direita da autoradiografia indica uma proteína de 67kDa que aparece marcada apenas nas amostras em que a proteína polo está a ser traduzida. A seta indica a posição da histona H1 no gel corado com Azul de Coomassie. À esquerda do painel indica-se a massa molecular dos marcadores de peso molecular em kDa.

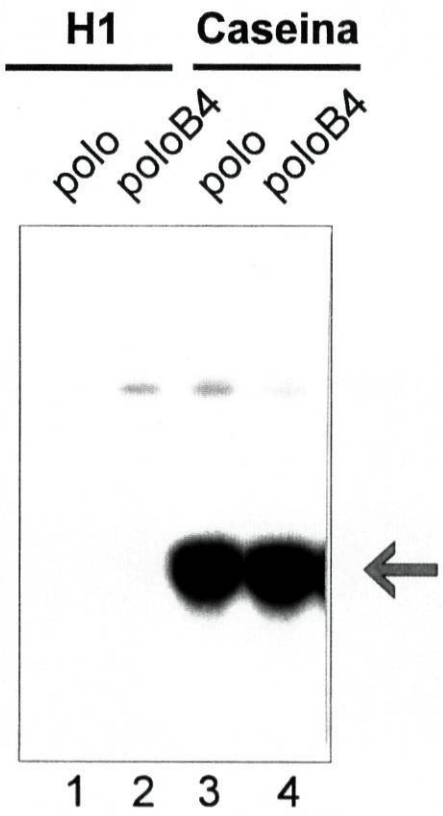


Fig. 4.2- *Ensaios de cinase com proteína polo nativa.* Realizaram-se ensaios de cinase com proteína polo imunoprecipitada de extractos de embriões (colunas 1 e 3), ou com proteína poloB4 (colunas 2 e 4). Como substrato exógeno utilizou-se caseína-α (colunas 3 e 4) ou histona H1 (colunas 1 e 2). A seta indica a posição da caseína.

4.2- A cinase polo pertence à família das cinases serina/treonina

A análise da estrutura primária da cinase polo indica que esta proteína pertence possívelmente à família das cinases tipo serina/treonina, isto é, que fosforilam os substratos em resíduos de serina e/ou de treonina. De modo a confirmar-se esta especificidade efectuou-se a análise dos resíduos de aminoácidos fosforilados pela cinase polo na caseína.

Após o ensaio de cinase isolou-se a caseína por electroforese (SDS-PAGE) e determinou-se a sua posição no gel seco por impressão em autoradiografia. A banda correspondente à caseína foi então extraída do gel seco e os fosfoaminoacidos foram identificados, após hidrólise ácida, por TLC. A análise da autoradiografia correspondente à separação dos fosfoaminoácidos em placa de TLC mostra que a cinase polo fosforila a caseína em residuos de serina e de treonina (Fig. 4.3). Não se observou marcação alguma em resíduos de tirosina. A cinase não parece ter qualquer preferência por um dos tipos de resíduo, isto é, entre a serina e a treonina, quando fosforila a caseína e o mesmo resultado é obtido quer se utilize cinase imunoprecipitada de embriões de *Drosophila* quer se utilize cinase recombinante poloB4 (Fig. 4.3).

4.3-A proteína polo encontra-se fosforilada *in vivo*

Muitas das cinases envolvidas na regulação do ciclo celular têm a sua actividade regulada por modificações pós-traducionais. A modificação mais frequente consiste na transferência de grupos fosfato e a activação/inactivação dessas cinases depende muitas vezes de serem fosforiladas e/ou desfosforiladas em fases específicas do ciclo. É portanto possível que a proteína polo seja também ela própria uma fosfoproteína e que tenha a sua actividade catalítica de algum modo alterada pelo estado de fosforilação.

De forma a analizar-se se a proteína polo se encontra fosforilada *in vivo* cresceram-se células Kc em cultura em meio contendo [^{32}P]-ortofosfato. Recolheram-se as células 16h após a adição do [^{32}P] -ortofosfato, homogenizaram-se por passagem numa agulha de 26G e imunoprecipitou-se a proteína polo do extracto proteico obtido

utilizando-se o anticorpo MA294. O produto da imunoprecipitação foi analizado por electroforese e o resultado da exposição da autoradiografia é apresentado na fig. 4.4. Verifica-se que o principal produto da imunoprecipitação é uma fosfoproteína de peso molecular aparente de 67Kda, que é o peso molecular aparente do polo em SDS-PAGE. Este resultado indica pois que a proteína polo é uma fosfoproteína.

No decurso deste trabalho observou-se por vezes em "western blots" que a proteína polo migrava em geis de SDS-PAGE como uma banda dupla. Sabendo-se que a fosforilação de proteínas pode alterar-lhes a retardação neste tipo de geis, pensou-se que as duas bandas observadas em "western blot" poderiam corresponder a formas da proteína polo fosforiladas diferentemente. De modo a comprovar-se esta hipótese submeteram-se extractos de embriões a uma incubação com fosfatase alcalina durante 30min e analisou-se por "western blot" se a migração da proteína polo se modificava. Este tipo de ensaio permitiu identificar a banda de maior peso molecular aparente em geis de SDS-PAGE como correspondendo a uma forma fosforilada da proteína polo uma vez que o tratamento dos extractos com fosfatase alcalina a elimina (fig. 4.4, B e C).

A migração da proteína como um dubleto em gel de poliacrilamida foi um resultado difícil de reproduzir. Aliás a detecção de mudanças na mobilidade electroforética de uma proteína induzidas por fosforilação é na generalidade técnicamente dificil. Estas alterações na mobilidade ocorrem em muitas mas não em todas as proteínas. A $p34^{cdc2}$, por exemplo, que tem sido intensamente estudada quanto a modificações no seu estado de fosforilação é também muito difícil de ser resolvida, por electroforese, nas diferentes formas fosforiladas (ver por exemplo Edgar *et al,,* 1994). Embora se pense que a adição de grupos fosfato afecta a carga ou a estrutura terciária das proteínas, mesmo em condições em que se usa SDS, a razão das mudanças na mobilidade permanece obscura (Cooper 1991). Na procura de um sistema reprodutível em que as formas diferentemente fosforiladas da proteína polo pudessem ser separadas tentámos utilizar geis de tamanhos diferentes, diferentes concentrações de acrilamida, diferentes proporções de acrilamida:bis-acrilamida e diferentes amperagens durante a corrida do gel. Nenhum método se revelou 100%

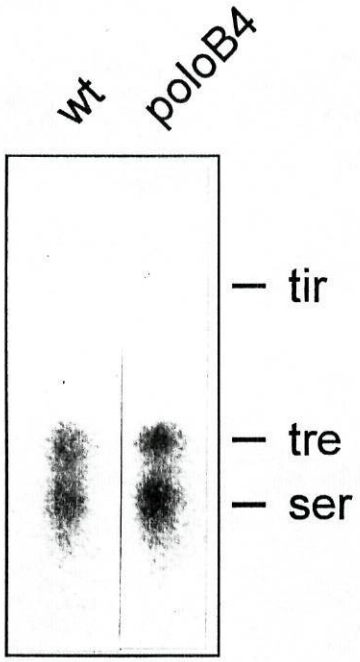


Fig. 4.3- *O polo fosforila a caseína em resíduos de serina e de treonina.* Após a realização de ensaios de cinase com polo imunoprecipitado de embriões de Drosophila ou poloB4, a caseína foi extraída do gel e os aminoácidos fosforilados resolvidos em placa de TLC após hidrólise ácida. A figura apresenta a autoradiografia da placa de TLC e a posição de fosfoaminoácidos padrão é indicada no lado direito do painel (tir- tirosina, tre- treonina, ser- serina). Neste ensaio utilizaram-se quantidades iguais de imunoprecipitados polo wt e poloB4, e de caseína como substrato, nas reacções de fosforilação.

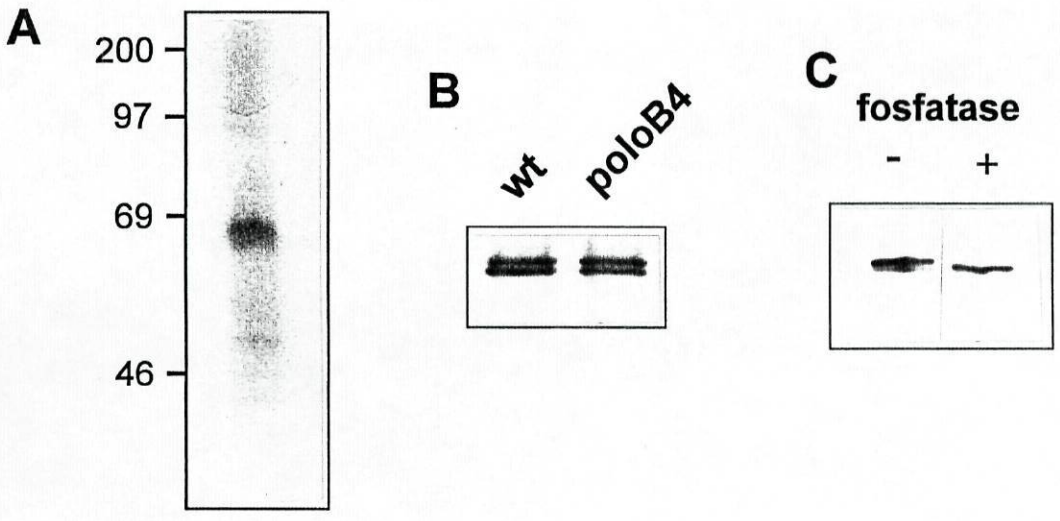


Fig. 4.4- *A proteína polo é uma fosfoproteína.* **A)** A proteína polo foi imunoprecipitada de um extracto de células Kc crescidas em meio com ^{32}P-ortofosfato. O imunoprecipitado foi analizado por SDS-PAGE e autoradiografia. **B)** A proteína polo imunoprecipitada de extractos de embriões selvagens (coluna wt) ou de células Sf9 (coluna poloB4) foi analizada em gel de poliacrilamida (120:1 acrilamida:bisacrilamida) e detectada em western blot com o anticorpo Ma294. **C)** A proteína polo imunoprecipitada de embriões de Drosophila foi incubada com fosfatase alcalina (CIP) e analisada em western blot. Como controlo analizou-se também uma alíquota idêntica que não foi incubada com fosfatase.

reprodutível sendo geis de 20x20cm, 120:1 acrilamida:bis-acrilamida, corridos a 40mA os que forneceram melhores resultados. Mas, mesmo nestas condições, a separação em duas bandas permaneceu difícil de reproduzir.

4.4- A proteína polo tem de se encontrar fosforilada para ter actividade catalítica

Sabendo-se que a proteína polo apresenta diferentes estados de fosforilação, estudou-se de que modo os diferentes graus de fosforilação definem a sua actividade catalítica. Deste modo, após imunoprecipitação, a proteína polo foi incubada com fosfatases e a sua actividade catalítica determinada de seguida. Verifica-se que o tratamento com fosfatase ácida de batata (AP), ou com fosfatase alcalina intestinal bovina (CIP), tem como efeito a supressão completa da actividade catalítica da cinase polo (fig.4.5, pistas B e D). De modo a verificar-se se as fosfatases foram eficazmente removidas antes da realização do ensaio de cinase, misturaram-se quantidades iguais de polo tratada com fosfatase (usada nas pistas B ou D) e de polo não tratada com fosfatase (usada na pista A) e a mistura foi utilizada no ensaio de cinase. Os resultados indicam que a actividade catalítica desta mistura, quando analizado o nível de fosforilação da caseína, é idêntica à de polo não tratada com fosfatase (comparar pista A com pista C, e pista A com pista E na fig. 4.5). Estes resultados indicam que as fosfatases foram eficazmente removidas no final da incubação após terem inactivado a cinase polo.

O mesmo resultado é observado se se imunoprecipitar a cinase polo de extractos de embriões préviamente tratados com fosfatase alcalina intestinal bovina. Para este tipo de ensaio trataram-se extratos de embrião com CIP durante 30 min a 30°C, como indicado anteriormente, e no final imunoprecipitou-se a proteína polo. A actividade catalítica foi então determinada e comparada com a da cinase imunoprecipitada de extractos não tratados com fosfatase e também incubados a 30°C durante 30min. Mais uma vez se verifica que o tratamento com fosfatase suprime a actividade catalítica da cinase polo (Fig. 4.6, pista B).

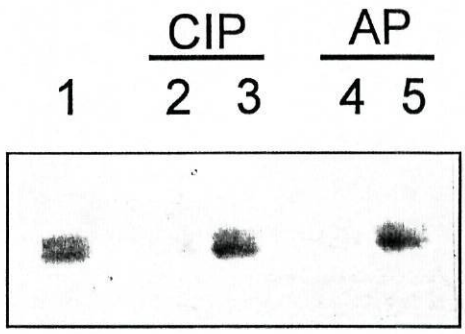


Fig. 4.5- *O tratamento com fosfatases elimina a actividade catalítica da cinase polo.* A proteína polo imunoprecipitada de extractos de embriões selvagens foi utilizada directamente em ensaios de cinase (pista 1) ou sugeita a tratamento com fosfatase alcalina (pista 2) ou com fosfatase ácida (pista 4) antes do ensaio de cinase. De modo a testar-se se a remoção da fosfatase alcalina foi eficaz, aliquotas idênticas de imunoprecipitado utilizado nas pistas 1 e 2 foram misturadas para o ensaio de cinase (pista 3). A remoção da cinase ácida foi analizada de igual modo (pista 5) utilizando-se imunoprecipitados identicos aos analizados em 1 e 4.

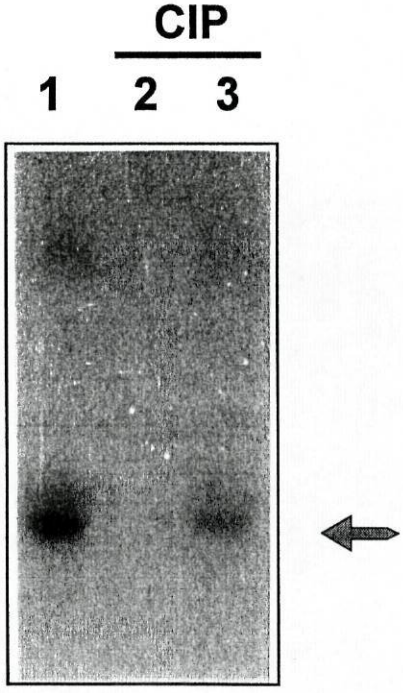


Fig. 4.6- *O tratamento com fosfatase alcalina elimina a actividade catalítica da cinase polo.* A proteína polo, imunoprecipitada de um extracto de embriões (coluna 1) ou imunoprecipitada de um extracto de embriões préviamente incubado com fosfatase alcalina (coluna 2), foi utilizada em ensaios de cinase com a caseína como substrato. Na pista 3 utilizou-se metade do imunoprecipitado usado em 1 misturado com metade do imunoprecipitado usado em 2 como controlo à lavagem da fosfatase. A seta à direita do painel indica a posição da caseína na autoradiografia.

4.5- DISCUSSÃO

De modo a prosseguir-se a análise bioquímica da proteína polo desenvolvemos um ensaio de cinase em que a sua actividade catalítica pudesse ser determinada. Com recurso a este tipo de ensaio verificou-se que a cinase polo nativa é capaz de utilizar a caseína-α como substrato mas que a sua capacidade de fosforilar a histona H1 é negligível. A publicação posterior de que os homólogos CDC5, Plk1 e plk possuem a mesma capacidade (Kitada *et al,* 1993; Golsteyn *et al,* 1995; Hamanaka *et al,* 1995; Lee *et al,* 1995) veio de algum modo confirmar os nossos resultados.

Curiosamente, os resultados obtidos nos ensaios de cinase com proteína polo obtida de sistemas biológicos (embriões de *Drosophila* ou células Sf9) são opostos aos obtidos nos ensaios realizados com a proteína obtida a partir de sistemas de transcrição e de tradução *in vitro.* Isto é, num caso a cinase fosforila preferencialmente a caseína e noutro preferencialmente a histona H1. Uma explicação possível para estes resultados contraditórios poderá ser a ocorrência de modificações pós-traducionais de que a proteína polo seja alvo e que lhe alterem a especificidade passando a cinase a ser capaz de aceitar como substrato proteínas diferentes. Essas modificações podem ser necessárias para que a proteína produzida *in vitro* possa aceitar a histona H1 como substrato tal como a proteína polo nativa ou a expressa em células Sf9 o fazem. No entanto, este aspecto da actividade catalítica do enzima polo não foi explorado em maior detalhe no decurso deste projecto.

Fomos ainda capazes de mostrar que a proteína polo é ela mesma uma fosfoproteína e, muito interessantemente, que o tratamento com fosfatases elimina por completo a sua capacidade de fosforilar a caseína. Este dado sugere que a cinase polo poderá ser um componente intermédio numa das cascatas de cinases/fosfatases que controlam o iniciar e decorrer da mitose. Esta noção de que a cinase é activada por modificações pós-traducionais é reforçada pela determinação da fase do ciclo em que as cinases polo e Plk1, em *Drosophila* e células humanas respectivamente, parecem exibir o seu máximo de actividade catalítica. No primeiro exemplo verificou-se que durante as rápidas divisões nucleares que ocorrem no embrião sincicio, a cinase polo sofre uma subita activação exibindo um pico de actividade máxima durante a anafase e telofase, imediatamente a seguir ao declínio de actividade da cinase $p34^{cdc2}$ (Fenton

e Glover 1993). Por outro lado, em culturas de células humanas, o padrão de actividade da Plk1 acompanha a da cinase $p34^{cdc2}$ (Goldsteyn *et al*, 1995; Hamanaka *et al,* 1995; Lee *et al,* 1995). Esta ligeira diferença na altura de actividade máxima das duas cinases pode refletir uma diferença inerente ao controlo dos ciclos embrionários invulgarmente rápidos quando comparados com os ciclos de células somáticas; ou advir apenas da precisão superior com que o estado mitótico pode ser determinado nos sistemas embrionários relativamente a culturas de células sincronizadas. Em qualquer dos casos é no entanto evidente que deve existir um mecanismo a regular o nível de actividade das cinases tipo polo no decurso do ciclo celular.

Embora a activação brusca da cinase polo sugira um controlo por modificações pós-traducionais, deve existir uma segunda via de controlo uma vez que apenas se detectam transcritos do gene *polo* em células com capacidade proliferativa, ou seja, capazes de entrar em divisão. Esta observação estende-se também aos homólogos plk em mamíferos, o que indica claramente um controlo ao longo do desenvolvimento celular. Mostrou-se ainda, que o nível de mRNA dos genes plk e CDC5, flutua ao longo do ciclo celular. Estes mensageiros sofrem uma acumulação periódica, que atinge o máximo nas fases G2/M, e deixam de ser detectados imediatamente após a mitose (Lake e Jelinek, 1993; Kitada *et al,*1992). Esta variação na abundância dos mRNA parece ser regulada por mecanismos de pós-transcrição, uma vez que ensaios de "run-off" mostram que o nível de transcrição parece ser igual tanto em G1 como em G2/M, que é quando os mensageiros estão no seu mínimo e máximo de abundância, respectivamente (Lake e Jelinek, 1993). O tempo de semi-vida dos mensageiros parece ser assim um factor determinante na regulação da actividade das cinases tipo polo. A existência na região 3´ não transcripta do cDNA de *Snk* e do *polo* de sequências ATTTA (Simmons et al 1992; Llamazares *et al*, 1991), que se pensa conferir instabilidade a alguns mRNAs (Shaw e Kamen, 1986), poderá sinalizar os mensageiros destes genes para uma degradação rápida.

CAPÍTULO 5

ACTIVIDADE DA PROTEÍNA MUTANTE

POLO1

A estratégia desenvolvida neste projecto de forma a identificar-se substratos fisiológicos da cinase polo exige que se utilizem extractos proteicos embrionários desprovidos de cinase polo activa ou em que esta actividade esteja pelo menos substancialmente reduzida. Uma possibilidade óbvia é a utilização de embriões de mutantes no locus *polo* como material biológico. Dos dois alelos descritos, $polo^1$ e $polo^2$, só o primeiro poderá ser utilizado uma vez que o alelo $polo^2$ é letal não sendo portanto possível obter-se individuos homozigóticos adultos. Por outro lado, o alelo $polo^1$ é semi-letal, apresentando um grau de sobrevivência em indivíduos homozigóticos de cerca de 7% (Sunkel e Glover 1988). As fêmeas homozigóticas que atingem a fase adulta são estéreis e depositam um numero pequeno de ovos, mas que é mesmo assim suficiente para ser utilizado na obtenção de extractos proteicos.

Os ovos depositados por fêmeas homozigóticas $polo^1/polo^1$ (doravante referidos como embriões $polo^1$) apresentam mitoses anormais desde os primeiros estadios da embriogénese (Sunkel and Glover, 1988). Estes embriões, que conseguem formar cerca de cem núcleos poliploides, nunca chegam a celularizar. Durante as primeiras divisões nucleares, os núcleos destes embriões sofrem variações cíclicas nas membranas nucleares, conforme é observável pela marcação das laminas com anticorpos específicos, e estas mudanças parecem estar sincronizadas com a condensação cromossómica. No entanto, embora estes aspectos da mitose sejam mantidos, pelo menos durante as primeiras mitoses, a morfologia dos núcleos e dos fusos mitóticos é completamente anormal.

5.1-Embriões $polo^1$

Devido a estes aspectos aberrantes dos embriões $polo^1$ procurou-se verificar se estes não iniciariam processos de degradação proteica pouco tempo após o momento da sua postura. A observação directa ao microscópio de embriões homozogóticos, após descorionação, mostra que cerca duas horas após a postura começa a ser evidente uma certa desorganização no interior destes embriões, quando

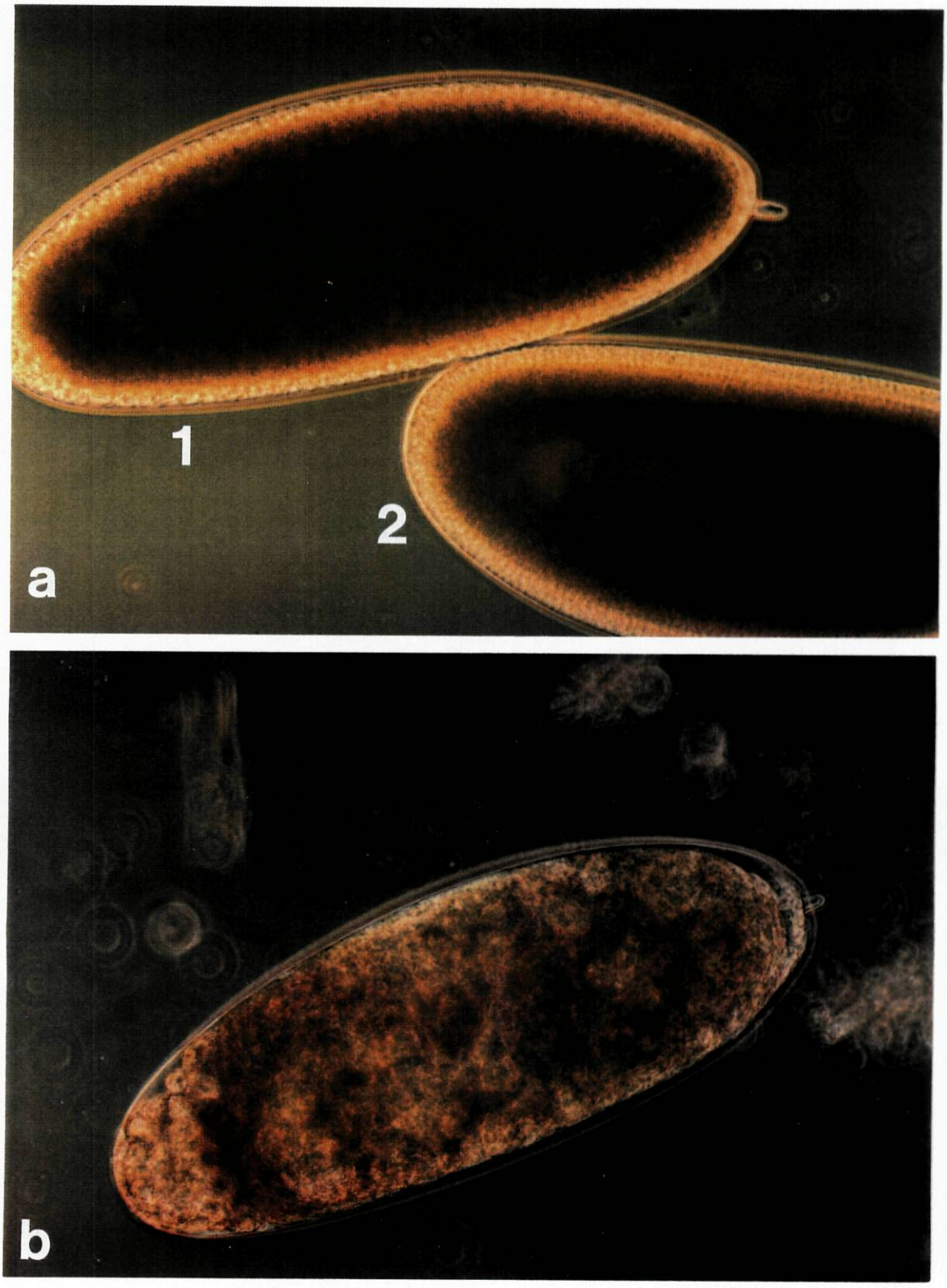


Fig. 5.1- *Embriões selvagens e embriões polo*^{1}. **A)** Embriões selvagens antes (1) e após (2) terem celularizado (ciclo 14) (~3h a 4h, a 18ºC). **B)** Embriões *polo*^{1} com a mesma idade dos apresentados em A). É visível uma elevada desorganização interna e, se se seguir estes embriões, a desorganização aumenta e nunca celularizam.

em comparação com embriões selvagens (Fig. 5.1). O grau de desorganização nos embriões mutantes aumenta com o tempo, e os embriões nunca chegam a celularizar (Fig. 5.1).

O aspecto dos embriões *polo*^{1} ao microcópio sugere que poderá estar a ocorrer degradação proteica. De forma a definir o grau de degradação proteíca colheram-se embriões *polo*^{1} a diferentes intervalos de tempos após a postura e, após homogenização, analisaram-se em SDS-PAGE. Como controlo fizeram-se extractos de embriões selvagens colhidos após períodos de tempo idênticos. Pelos resultados apresentados na Fig. 5.2 verifica-se que entre embriões selvagens e *polo*^{1} recolhidos até duas horas após a postura não se observam diferenças, em geis corados com Coomassie Blue (Fig. 5.2 colunas 1 e 3). No entanto, em embriões com 4h começa já a observar-se degradação de proteínas nos embriões mutantes (Fig. 5.2 colunas 2 e 4, e colunas 5 e 6).

Em virtude destes resultados todas as experiências futuras foram realizadas utilizando-se embriões *polo*^{1} colhidos até duas horas após a postura, e seleccionando-se ao microscópio aqueles que não apresentassem sinais evidentes de desorganização interna.

5.2- Os níveis de mRNA e de proteína polo1 são normais em embriões *polo*^{1}

De modo a analizar-se se o fenótipo observado no mutante se deve a deficiências na transcrição ou na tradução do gene *polo* procedeu-se ao doseamento do mRNA e proteína correspondentes a este gene em indivíduos *polo*^{1}.

O mRNA a analizar foi isolado de fêmeas homozigóticas adultas porque estas são mais fáceis de obter do que embriões *polo*^{1} e, simultâneamente, por fornecerem maior quantidade de RNA. Os resultados no final não devem ser diferentes dos obtidos com mRNA de embriões homozigóticos, uma vez que a quase totalidade do mRNA presente em embriões nas primeiras fases do desenvolvimento é aí depositada pela mãe, que neste caso é ela mesmo homozigótica.

Por Northern blot é possível observar que não existem diferenças significativas nos níveis de mRNA codificante para o polo entre moscas mutantes e moscas

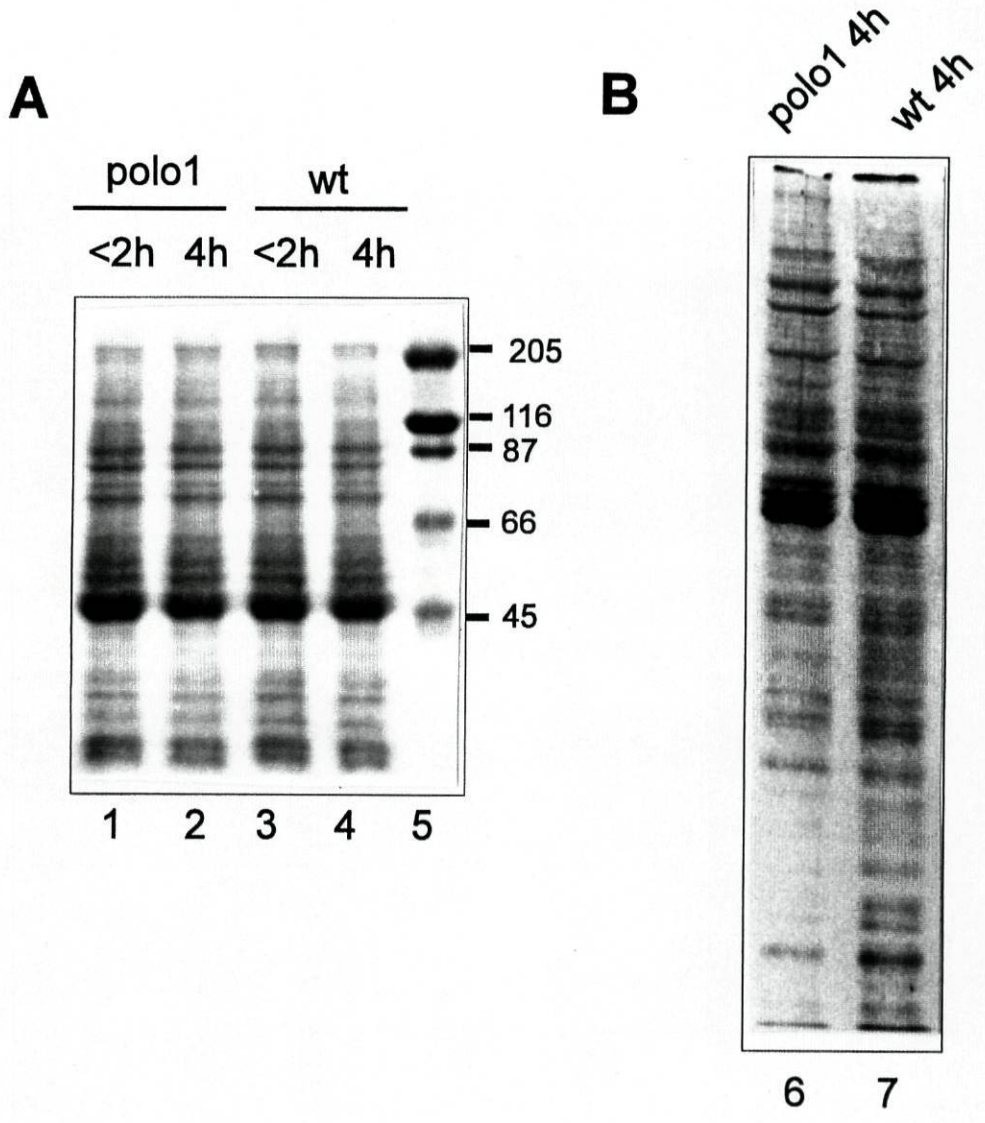


Fig. 5.2- *Comparação de extractos de embriões mutantes com extractos de embriões selvagens.* **A)** Correram-se em gel de poliacrilamida extractos de 25 embriões *polo*^{1} (pistas 1 e 2) ou de 25 embriões selvagens (pistas 3 e 4). Apresenta-se a fotografia do gel corado com azul de Coomassie. Nos embriões com <2h não há diferença entre os extractos mutante e selvagem. **B)** Mesmo ensaio que em A) usando-se um outro gel de modo a observar-se melhor a degradação de proteínas em embriões mutantes com 4h.

selvagens (Fig. 4.3, painel A). Não só o nível de transcrição parece ser semelhante como o tamanho dos transcritos também é idêntico. A mutação *polo*^{1} não parece pois afectar o nível da transcrição do mensageiro.

ICBAS

Para se analizar se haveria alterações a nível da tradução da proteína polo realizaram-se de seguida "western blots" utilizando-se extractos de embriões homozigóticos *polo*^{1}. Correram-se em gel de poliacrilamida extractos de embriões selvagens lado a lado com extractos de embriões *polo*^{1} (os extractos foram obtidos a partir 10 embriões nos dois casos) e detectaram-se as proteínas, após transferência para membrana de nitrocelulose, com o anticorpo monoclonal MA294.

Os resultados não indicam qualquer diferença entre os dois tipos de embriões, isto é, a proteína polo parece ter mesma concentração em embriões selvagens e em embriões *polo*^{1} (Fig. 4.3, painel B). Donde se conclui que os niveis de tradução da proteína polo são mantidos no mutante. Além disso a observação de que o peso molecular aparente da proteína detectada pelo anticorpo é idêntico nos dois tipos de extractos, indica que a mutação *polo*^{1} deve ser pontual ou então que se trata de uma pequena delecção.

5.3- A proteína polo1 não tem actividade catalítica

Uma vez que os níveis de transcrição e de tradução são aparentemente normais no mutante *polo*^{1} pensou-se que esta mutação poderia ter como efeito uma supressão da actividade catalítica do enzima. De forma a dosear-se a actividade catalítica da proteína mutante utilizou-se em ensaios de cinase a proteína mutante *polo*^{1} imunoprecipitada de embriões homozigóticos. A actividade catalítica da proteína mutante foi então comparada à da proteína polo imunoprecipitada de igual numero de embriões selvagens (utilizaram-se na imunoprecipitação extractos de 15 embriões de cada tipo).

Conforme se verifica pelos resultados obtidos, apresentados na Fig. R4.3 (painel C), os embriões *polo*^{1} encontram-se desprovidos de uma forma activa da cinase capaz de fosforilar a caseína. Este ensaio de cinase foi repetido utilizando-se proteína polo e polo^{1} imunoprecipitada com os anticorpos monoclonais anti-polo

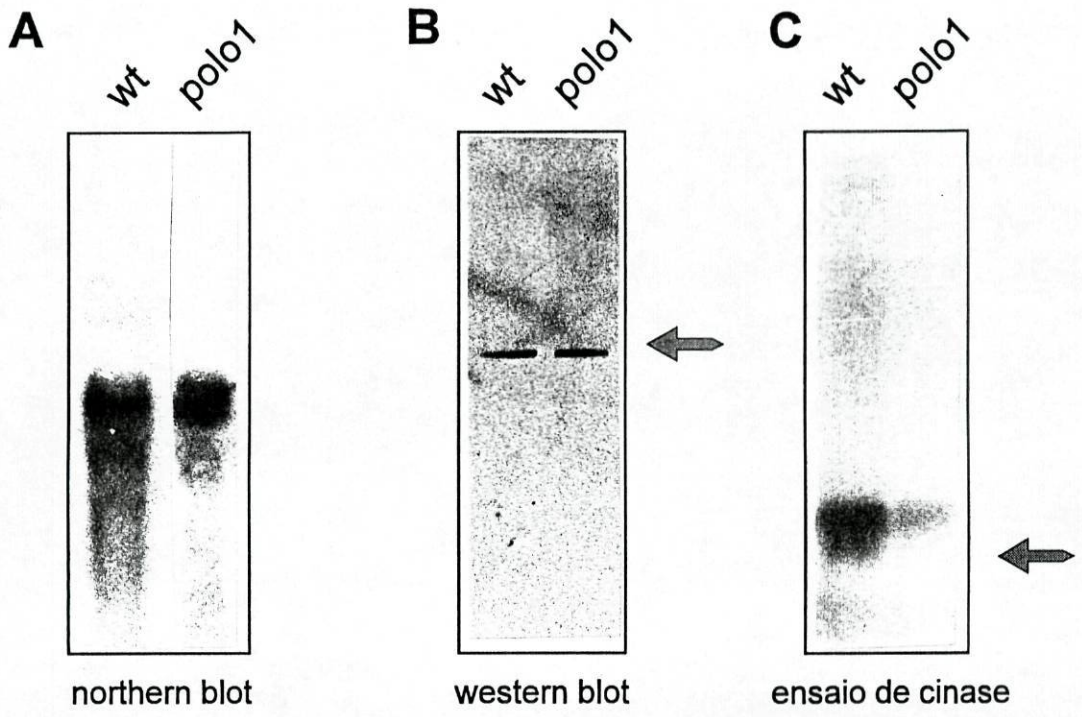


Fig. 5.3- *A proteína polo1 não tem actividade catalítica.* **A)** Correram-se 5ug de RNA total, preparado de fêmeas homozigóticas wt ou polo1, em gel de agarose. O RNA foi detectado, após transferência para membrana de nitrocelulose, utilizando-se como sonda marcada radioactivamente o cDNA 2a2. A seta indica a localização da banda com 2,2kb (marcadores não indicados). **B)** Analizaram-se em gel de poliacrilamida (10%) os extractos de dez embriões wt e de dez embriões *polo1*. Após transferencia para membrana de nitrocelulose o imunoblot foi realizado com o anticorpo Ma294. A seta indica a proteína polo (67 kDa). **C)** Utilizaram-se extractos de 25 embriões *polo1* e de 25 embriões wt em imunoprecipitações com o anticorpo Ma294. O imunoprecipitado foi então usado em ensaios de cinase, com a caseína como substrato, e o resultado analizado em gel de poliacrilamida. A seta indica a posição da caseína marcada radioactivamente, detectada em autoradiografia.

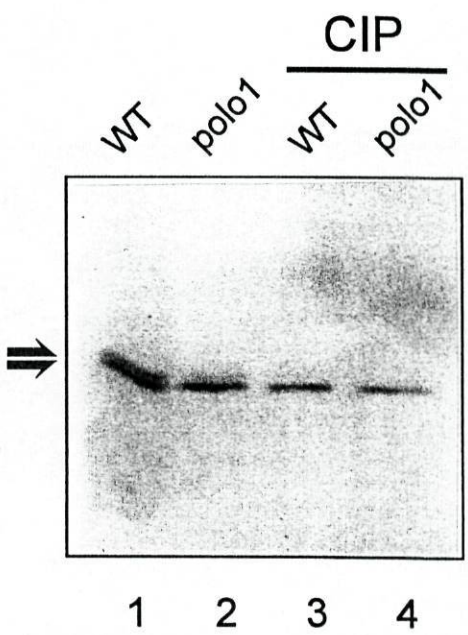


Fig. 5.4- *A proteína mutante polo1 não é correctamente fosforilada.* Extractos de 15 embriões selvagens ou polo1 foram sugeitos a SDS-PAGE (pistas 1 e 2) juntamente com extractos idênticos mas que foram incubados com fosfatase alcalina (CIP) (pistas 3 e 4). A proteína polo foi então detectada por western blot com o anticorpo Ma294.

MA81 e MA73 tendo-se obtido um resultado ao observado com o anticorpo MA294 (resultados não mostrados).

5.4- A proteína polo1 não é fosforilada correctamente

Sabendo-se que a proteína nativa polo se encontra fosforilada na sua forma activa, estudou-se se o fenótipo observado em embriões mutantes *polo*^{1} é devido a defeitos na fosforilação da proteína. Para este fim analizaram-se por "western blot" extractos de embriões *polo*^{1} e de embriões selvagens tratados com fosfatase alcalina, juntamente com extractos de ambos os tipos não tratadas com fosfatase.

Os resultados obtidos, apresentados na Fig. 4.4, indicam que já antes do tratamento com fosfatase alcalina a quase totalidade da proteína polo^{1} migra na banda de menor retardação em SDS-PAGE, indicando que se encontra sob a forma não-fosforilada (ou menos fosforilada). O tratamento com fosfatase em nada altera a retardação da proteína polo1 nos geis. A mutação *polo*^{1} parece portanto impedir que a proteína seja eficazmente fosforilada. Este defeito na fosforilação pode ser devido a uma modificação directa do resíduo alvo da fosforilação ou porque a mutação causa uma modificação da estrutura terciária da proteína impedindo a fosforilação dos resíduo(s) apropriado(s).

5.5- DISCUSSÃO

A mutação *polo*^{1} foi induzida pelo agente mutagéneo EMS. Este agente provoca usualmente mutações pontuais ou pequenas delecções no genoma. No caso específico do mutante *polo*^{1} não foi ainda identificado que tipo de mutação ocorreu mas os resultados que aqui apresentamos sugerem que provávelmente será uma mutação pontual, visto que a proteína mutada e a proteína nativa apresentam um peso molecular aparente idêntico em geis de SDS-PAGE. É razoável admitir que a mutação não afecta a região promotora do gene uma vez que tanto os níveis de mRNA como de proteína traduzida são comparáveis aos observados em embriões selvagens. Neste trabalho apresentamos evidências de que a proteína polo1 não tem actividade

catalítica uma vez que, ao contrário da proteína selvagem, não é capaz de fosforilar a caseína. No entanto, a possibilidade de ser apenas a especificidade da cinase que se encontra alterada não é eliminada pelos nossos estudos.

Quando se realizam "western blots" com extractos proteicos de embriões de *Drosophila* verifica-se que a proteína polo exibe dois padrões de retardação diferentes. A banda de menor migração corresponderá a uma forma fosforilada da proteína uma vez que é sensível ao tratamento com fosfatases. Em embriões *polo1*, no entanto, sómente uma banda é observada, correspondendo à de menor retardação, indicando que a proteína mutante não é correctamente fosforilada. Sabendo-se já que a forma activa da cinase parece corresponder à forma fosforilada da proteína, este dado sugere que a mutação *polo1* tem o efeito de tornar a proteína inactiva por evitar que seja eficientemente fosforilada, fornecendo uma base bioquimica para a afirmação anterior de que o *polo1* é um hipomorfo (Sunkel e Glover 1988).

É necessária uma certa cautela na interpretação dos resultados aqui obtidos. O facto de se observar em "western blot" apenas a banda de maior mobilidade em extractos de embriões mutantes não significa necessáriamente que a proteína polo1 não seja uma fosfoproteína. A mutação pode causar a inactivação sem afectar a fosforilação da proteína. Isto porque a detecção de isoformas fosforiladas por retardação (ou aceleração) em gel de poliacrilamida é problemática e pode variar com o contexto da sequência. A mutação pode pertubar um local da estrutura secundária de modo a que a fosforilação deixe de afectar a mobilidade da proteína. Ou pode ainda haver mais que um local de fosforilação na proteína polo e a fosforilação activadora não ser a causadora da mudança na mobilidade. A identificação do local de mutação *polo*^{1} poderá vir deste modo fornecer informações preciosas acerca do funcionamento e/ou da activação da cinase polo.

CAPÍTULO 6

IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTRATOS DA CINASE POLO

Para que se possa compreender a função biológica de qualquer cinase torna-se sempre necessário identificar os seus substratos fisiológicos. Uma vez que não se encontram descritos métodos que permitam identificar-se os alvos da acção biológica de uma cinase tentámos desenvolver uma abordagem que auxiliasse a resolução deste problema.

6.1- Desenho de ensaios que permitam identificar substratos fisiológicos da cinase polo

O desenho experimental dos nossos ensaios baseia-se no princípio de que em extractos de embriões *polo*^{1}, nos quais a cinase está inactiva, os substratos da cinase se devem encontrar numa forma desfosforilada. É legítimo pensar que os substractos fisiológicos da cinase polo se devem encontrar desfosforilados nestes embriões uma vez que a cinase é essencial à viabilidade celular, não tendo portanto uma função redundante. Simultâneamente espera-se que num extracto de embriões selvagens esses mesmos substratos endógenos se encontrem numa certa proporção já fosforilados, uma vez que a cinase terá a actividade catalítica a níveis normais. Deste modo, se a extractos destes dois tipos de embriões se adicionar cinase polo em conjunto com [γ–^{32}P]ATP, a cinase adicionada será capaz de fosforilar os seus substratos endógenos no extracto de embriões *polo*^{1} (porque aí se encontravam desfosforilados), mas não poderá fosforilar essas mesmas proteínas em extratos de embriões selvagens (uma vez que devem já estar fosforiladas). Se estes dois tipos de extractos forem analisados em SDS-PAGE, após a incubação com cinase polo e [γ–^{32}P]ATP, deverá entãoser possível detectar-se estes substratos fisiológicos. Eles corresponderão às proteínas marcadas com maior intensidade nos extractos de *polo*^{1} do que nos extractos de embriões selvagens (ver esquema do ensaio na Fig. 6.1). De modo a que estes ensaios

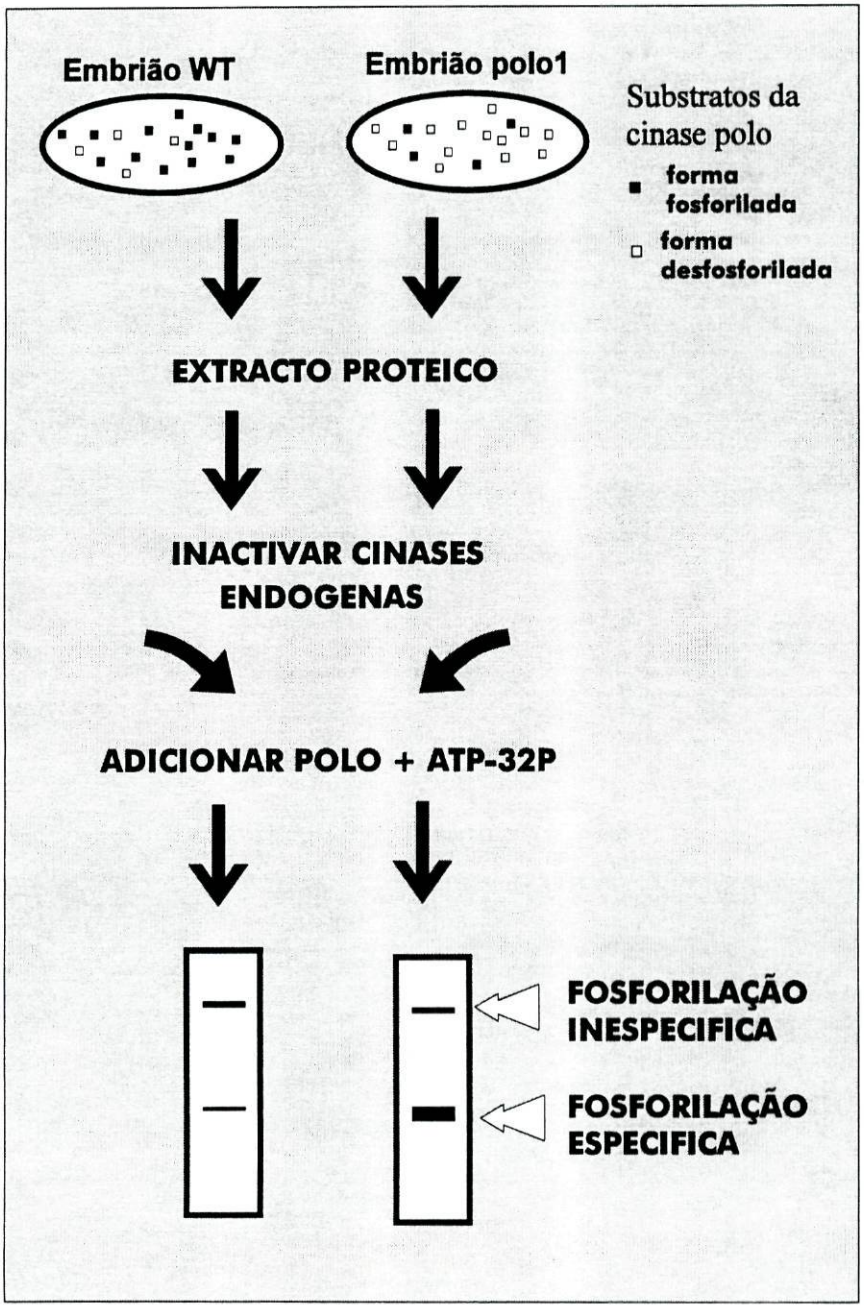


Fig. 6.1- *Esquema do ensaio a realizar para se determinar substratos fisiológicos da cinase polo.* Prevê-se que em embriões mutantes *polo*^{1}, devido a que o enzima se encontra inactivo, os seus substratos fisiológicos se encontrem por fosforilar (quadrados brancos). Em embriões selvagens esses mesmos substratos poderão já estar fosforilados (quadrados pretos) devido a que o enzima nativo se encontra activo. Extractos de ambos os tipos de embriões poderão ser fosforilados com enzima polo adicionado exógenamente, mas nos embriões *polo*^{1} a incorporação de ^{32}P nos substratos deverá ser superior, devido à razão acima indicada. Deste modo a detecção de proteínas com uma marcação mais intensa em extractos *polo*^{1} que wt indica deverão corresponder a substratos fisiológicos da cinase (fosforilação específica). Se o enzima polo for capaz de fosforilar proteínas que não sejam seus substratos endógenos deverá faze-lo a um nível igual em ambos os tipos de extracto (fosforilações inespecíficas).

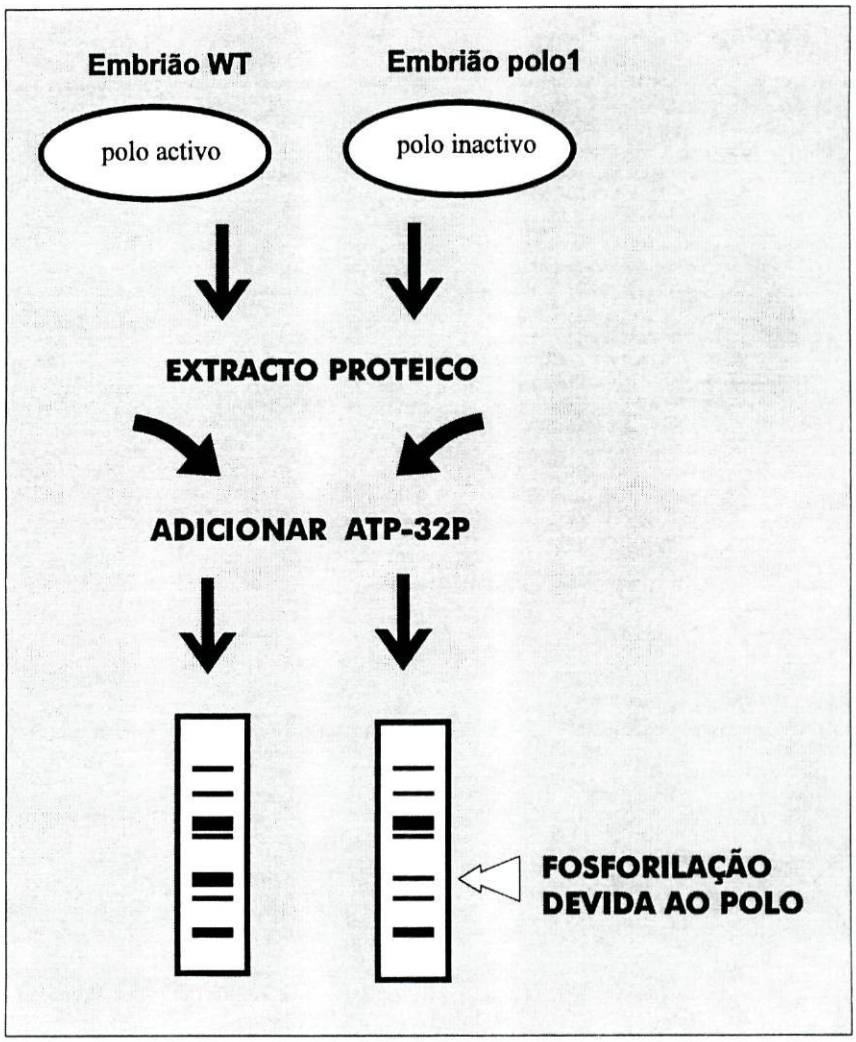


Fig. 6.2- *Esquema de ensaio a realizar de modo a determinar-se substratos fisiológicos da cinase polo.* Assume-se que preparando-se extractos de embriões num volume mínimo de tampão se obtém básicamente um extracto citoplasmático (cell-free extract) em que muitas das reacções intracelulares possam ser reproduzidas, à semelhança do que é obtido com extractos de ovos de *Xenopus*. Se se prepararem extractos de embriões *polo*^{1} e de embriões selvagens, e se incubarem estes extractos com [γ-^{32}P]ATP espera-se reproduzir reacções de fosforilação que ocorrem normalmente no interior dos embriões. As diferenças verificadas entre os dois tipos de extracto dever-se-ão à ausência de actividade polo nos extractos polo1, e deverão poder ser detectadas em autoradiografia como bandas mais intensas nos extractos de embriões selvagens do que em extractos de embriões *polo*^{1}, indicando possiveis substratos endógenos desta cinase.

se possam realizar é ainda necessário inactivar as cinases endógenas no extracto, antes da adição da cinase polo, pois a sua actividade catalítica confundiria os resultados.

É ainda previsível que neste tipo ensaio a cinase polo possa fosforilar inespecíficamente outras proteínas para além dos seus substratos fisiológicos. Este problema é eliminado pelo facto de se correrem lado a lado os dois tipos de extracto. As bandas que correspondem a fosforilações inespecíficas deverão aparecer com intensidades iguais nos dois tipos de extracto, só aparecendo as coorespondendo a fosforilações específicas com intensidades diferentes.

De modo a confirmar-se os resultados obtidos com o ensaio atrás explicado um segundo tipo de experiências podem ser planeadas tendo como princípio uma ideia oposta da anterior. Em vez de se analizar o estado de fosforilação dos substratos fisiológicos da cinase polo nos dois tipos de embriões (mutantes e selvagens) poder-se-á antes analisar a actividade das cinases endógenas em extractos desses mesmos embriões. Se se possuir um sistema "cell free" (isto é, em que muitas das reacções bioquímicas que ocorrem no interior da célular continuem a ocorrer mas desta feita no tubo de ensaio) em que a cinase polo presente esteja activa e um sistema "cell free" idêntico mas em que a mesma cinase se encontre inactiva, então as diferenças observadas nas reacções de fosforilação a ocorrer em ambos os sistemas terão como origem a diferença de actividade da cinase polo. Este tipo de ensaio deverá apresentar um resultado oposto do anteriormente descrito. Neste caso os substratos fisiológicos da cinase polo deverão aparecer mais intensamente marcados nos extractos de embriões selvagens do que nos extractos de embriões mutantes uma vez que é no primeiro tipo de extractos que a cinase tem actividade catalítica (ver esquema do ensaio na Fig. 6.2). Este ensaio tem ainda a vantagem de se modificar o sistema biológico o mínimo possível pois não há que inactivar as cinases endógenas.

6.2- Inactivação de cinases endógenas em extractos de embriões

Para que se possam utilizar extractos proteicos totais como fonte de substratos para a cinase polo é necessário proceder-se primeiro à inactivação das cinases endógenas que aí se encontram presentes. Uma vez que os embriões contêm uma

quantidade elevada de cinases activas, se se incubarem extractos de embriões na presença de [γ–^{32}P]ATP verifica-se que uma diversidade complexa de proteínas é marcada radioactivamente. Assim sendo, se a estes extractos se adicionar polo será muito difícil saber-se, de entre todas as proteínas fosforiladas, quais o serão devido à acção específica desta cinase. O método por nós escolhido para se inactivar estas cinases endógenas foi a inactivação por calor.

Estudou-se assim qual o efeito da incubação de extractos de embriões a diferentes temperaturas sobre a actividade catalítica endógena. Incubaram-se extractos de embriões selvagens a diferentes temperaturas durante um intervalo fixo de tempo, findo o qual se lhes adicionou [γ–^{32}P]ATP e se procedeu a nova incubação a 20ºC por 20min. Observou-se então, por análise em SDS-PAGE, qual a fracção da actividade cinasica total que ainda se mantinha. Na Fig. 6.3 apresenta-se o resultado da adição de [γ–^{32}P]ATP a extractos após estes terem sido incubados durante 15min a 20ºC, 40ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC. Como se observa, a incubação dos extractos neste intervalo de temperaturas tem como efeito uma diminuição acentuada da actividade cinásica total. A 50ºC ainda se detecta alguma actividade cinásica capaz de uma fosforilação fraca de algumas proteínas (visível em filmes sobreexpostos) mas a 55ºC verifica-se que é abolida a totalidade da actividade cinásica endógena.

A incubação a 55ºC dos extractos de embriões provoca uma certa precipitação de proteínas, que se removem por centrifugação antes dos ensaios de cinase. De modo a analizar-se qual o efeito dessa precipitação proteica na composição proteica total dos extractos, correram-se em geis de poliacrilamida extractos de embriões antes e depois da incubação a 55ºC. Os geis foram então corados com Azul de Coomassie. Embora seja visível que o tratamento por calor causa uma redução acentuada na concentração proteica total dos extractos essa redução é idêntica nos dois tipos de extractos (Fig. 6.4). Isto é, após a incubação a 55ºC o padrão proteico de extractos de embriões selvagens é indistinto do de embriões mutantes *polo1* quando comparados em geis de poliacrilamida corados com Azul de Coomassie. A mesma observação é obtida se se corarem os geis com prata (resultado não apresentado).

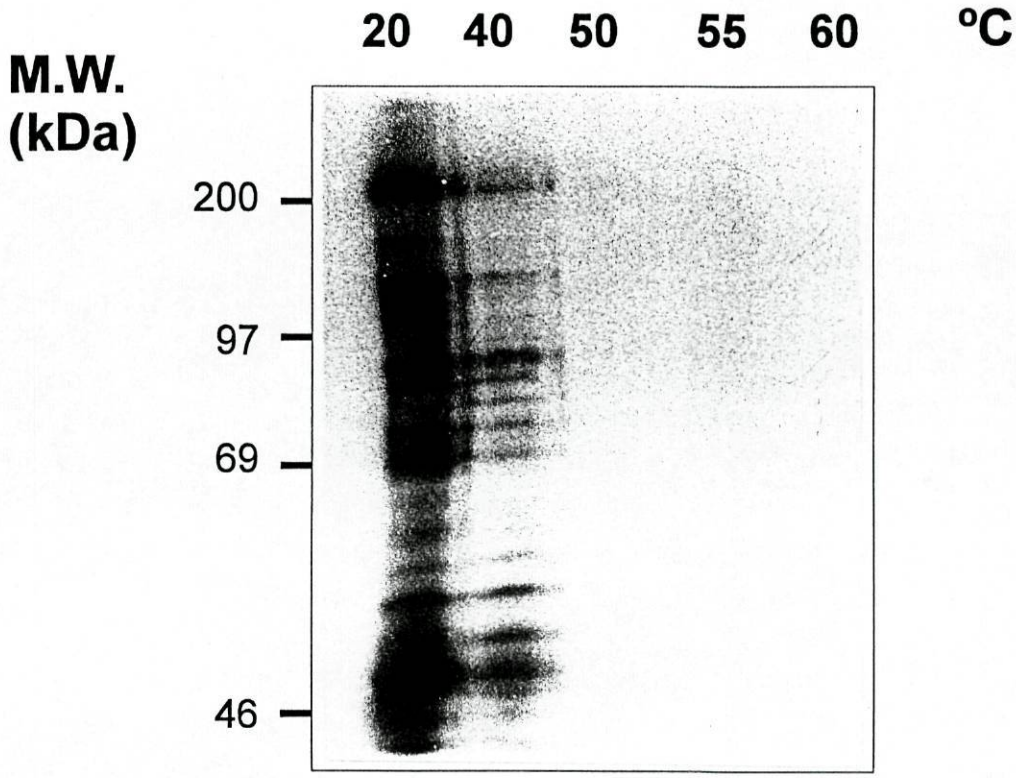


Fig. 6.3- *Inactivação de cinases endógenas por incubação a diferentes temperaturas.* Incubaram-se extractos proteicos de embriões wt durante 15 minutos a 20°C, 40°C, 50°C, 55°C e 60°C durante 15 minutos. A actividade cinásica endógena total remanescente foi então testada por incubação dos extractos com [γ-^{32}P]ATP. As proteínas fosforiladas foram então resolvidas em gel de poliacrilamida e detectadas por autoradiografia. Em cada ensaio utilizou-se um extracto obtido a partir de 10 embriões.

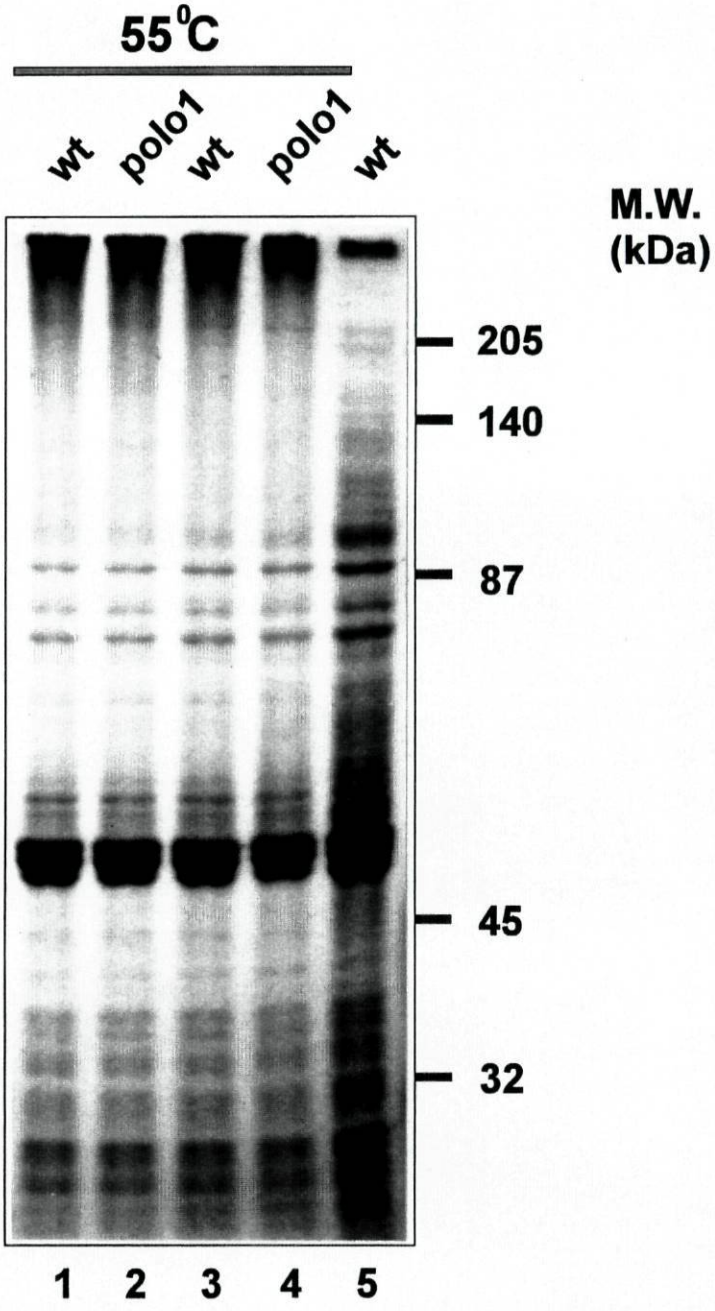


Fig. 6.4- *Análise de extractos proteicos após incubação a 55ºC.* Analizaram-se em gel de poliacrilamida extractos de 40 embriões polo1 (colunas 2 e 4) ou de 40 embriões wt (colunas 1 e 3) após terem sido incubados a 55ºC durante 15min. Na figura apresenta-se o gel corado com Azul de Coomassie. Como controlo foi analizada uma amostra correspondente a um extracto de 40 embriões wt que não foi sugeito à incubação a 55ºC (coluna 5).

6.3- A cinase polo fosforila três proteínas em extractos de embriões

Após os ensaios anteriores testou-se a capacidade do polo de fosforilar proteínas num extracto proteico total de embriões selvagens. Este ensaio foi realizado adicionando-se [γ–^{32}P]ATP e cinase polo imunoprecipitada de embriões selvagens ao extracto proteico inactivado a 55ºC, após este ter sido clarificado por centrifugação. A mistura de reacção foi incubada a 20ºC durante 20min e as reacções terminadas por adição de igual volume de tampão de amostra de SDS. As amostras foram então analizadas em SDS-PAGE e as proteínas fosforiladas detectadas por autoradiografia, apresentando-se os resultados obtidos na Fig. 6.5.

Verifica-se que neste tipo de ensaio a cinase polo fosforila essencialmente três proteínas de pesos moleculares aparentes de 220kDa, 85kDa e 54kD em extractos de embriões. Em alguns dos ensaios realizados foi possível observar a marcação outras proteínas, mas usualmente a um grau menor que as três proteínas referidas. Além disso a fosforilação destas outras proteínas não foi reprodutivel de ensaio para ensaio, enquanto que a fosforilação das três proteínas anteriormente apontadas foi constante em todos os ensaios efectuados.

6.4- Ensaios de cinase em extractos inactivados por calor

Para que este tipo de ensaio tenha significado os extractos proteicos a utilizar foram obtidos a partir de um número de embriões selvagens igual ao de embriões *polo*^{1} . O numero de embriões utilizados na preparação dos extractos foi controlado seleccionando-se os embriões individualmente à lupa e homogenizando-se de seguida, numa placa de multiplos poços, com auxílio de duas agulhas. A homogenização dos embriões foi, neste caso, realizada em 5ul de tampão IP suplementado de inibidores de proteases. Os extractos foram então clarificados por centrifugação (15s a 12000g), as cinases endógenas inactivadas por calor e, após nova centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de cinase. Para tal foi-lhes adicionado [γ–^{32}P]ATP e cinase polo imunoprecipitada com o anticorpo MA294.

Na fig.6.6 apresenta-se o resultado deste tipo de ensaio. As três bandas de proteínas fosforiladas préviamente observadas quando se utilizou extractos selvagens

como fonte de substrato para a cinase polo (Fig. 6.5) são também observadas nos extractos *polo*^{1}. Mas, mais importante, quando se compara o grau de marcação destas proteínas nos dois tipos de extractos, verifica-se são marcadas mais intensamente em extractos *polo*^{1} do que em extractos de embriões selvagens (a intensidade da marcação é pelo menos duas vezes superior nos embriões *polo*^{1}), o que de acordo com a linha de pensamento prévio indica que se tratam de potenciais substratos endógenos da cinase polo.

A fosforilação destas três proteínas foi verificada em todos os ensaios realizados utilizado-se quer polo imunoprecipitado de embriões selvagens quer poloB4 recombinante. Em alguns ensaios observou-se mais uma vez a marcação de proteínas de peso molecular diferente, mas esta marcação nunca foi reprodutível e a intensidade da marcação em extratos selvagens e de *polo*^{1} era normalmente idêntica donde se assume que se trate de marcações inespecíficas.

De modo a confirmar-se se as proteínas fosforiladas pela cinase polo correspondem a proteínas de elevada abundância nos embriões coraram-se com Coomassie blue os geis correspondentes ao ensaio de cinase. De notar que na Fig. 6.6 as pistas coradas correspondem a extractos completos, como os usados no ensaio de cinase, mas não às pistas do ensaio de cinase própriamente dito, porque nestas ultimas a presença de uma concentração elevada de anticorpo, utilizado na imunoprecipitação do polo, mascára as proteínas embrionárias com o mesmo peso molecular. Os resultados obtidos indicam que pelo menos as duas bandas de maior peso molecular (220kDa e 85kDa) não são das proteínas mais abundantes nos extractos de embriões, o que sugere que a cinase polo não as fosforila apenas devido a tratarem-se de proteínas muito abundantes.

De modo a estabelecer-se se a fosforilação observada destas três proteínas é específica da cinase polo, repetiram-se os mesmos ensaios em extractos de embriões inactivados por calor mas utilizando-se como cinases exógenas a PKA[1] (Cinase proteica A) e a PKC[2] (Cinase proteica C). Conforme se verifica pelos resultados apresentados (Fig. 6.7) nenhuma destas duas cinases fosforila preferencialmente

[1] PKA- **P**rotein **K**inase **A**
[2] PKC- **P**rotein **K**inase **C**

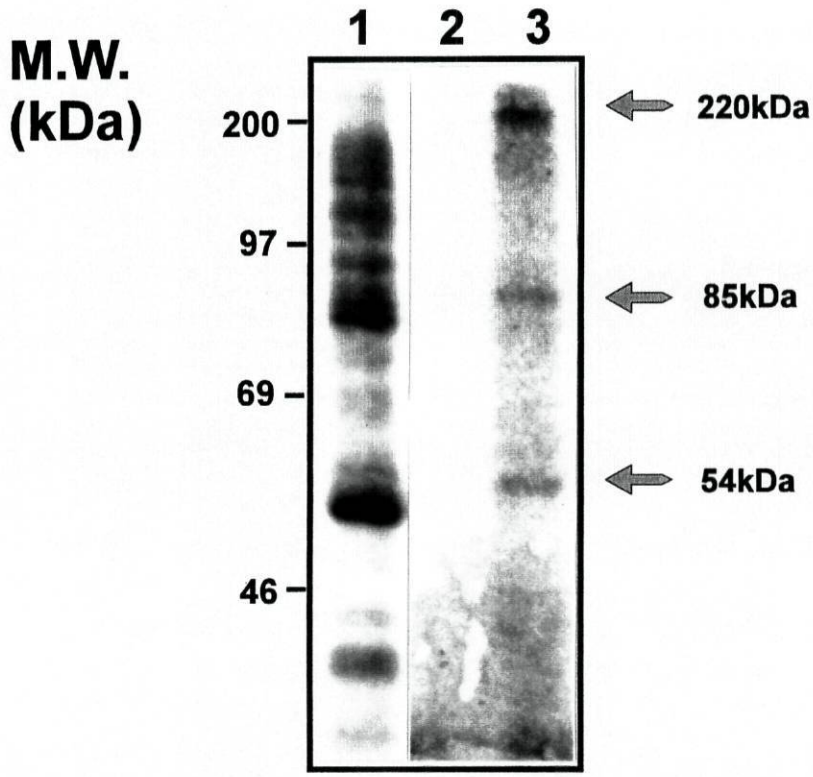


Fig. 6.5- *A cinase polo fosforila três proteínas em extractos de embriões.* A actividade cinásica endogena em extractos de 35 embriões foi determinada por incubação com [γ-^{32}P]ATP antes (pista 1) e depois (pista 2) do extracto ter sido submetido a 55ºC durante 15min. Um terceiro extracto, também inactivado a 55ºC, foi incubado com cinase polo e [γ-^{32}P]ATP (pista 3). As proteínas marcadas radioactivamente foram detectadas por autoradiografia do gel de poliacrilamida em que se analizaram os extractos.

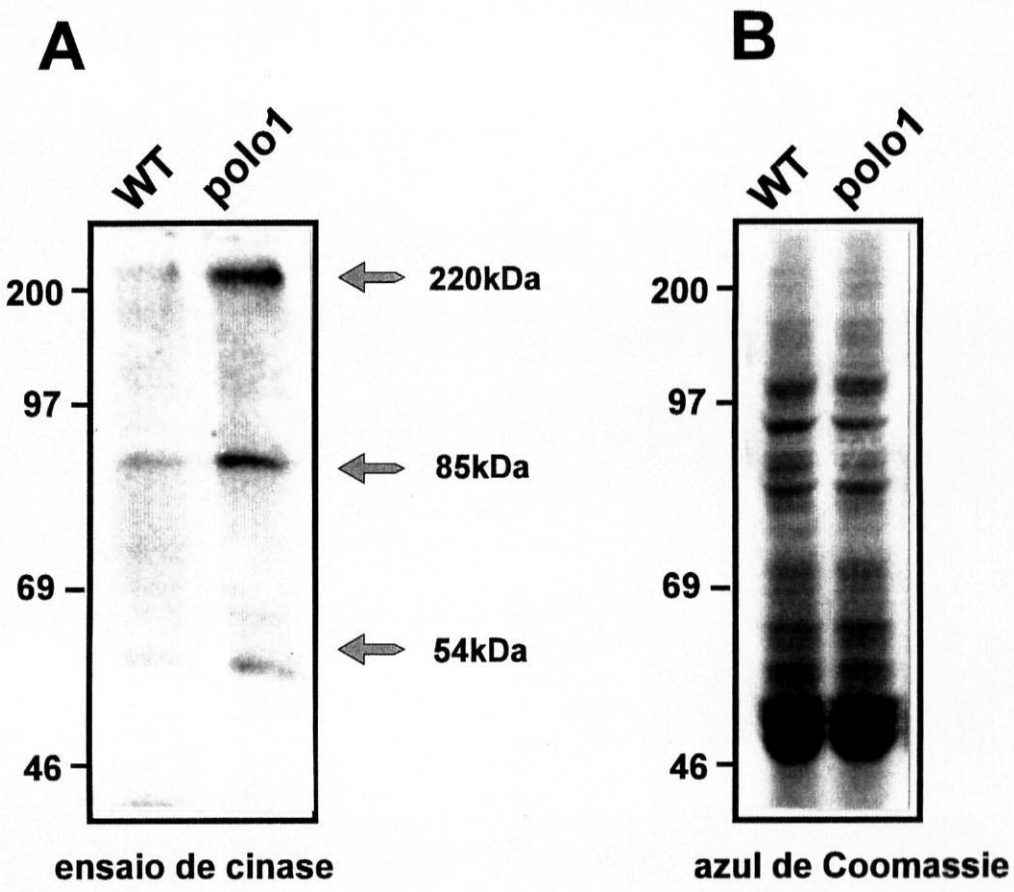


Fig. 6.6- *Comparação entre as proteínas fosforiladas pela cinase polo em extractos wt com extractos polo1.* **A)** Incubaram-se extractos de 35 embriões (selvagens ou *polo*^{1}), inactivados a 55ºC, com cinase polo e [γ–^{32}P]ATP. O resultado das reacções foi analizado em gel de poliacrilamida e as proteínas fosforiladas detectadas em autoradiografia. **B)** Num segundo gel foram analizados extractos de 35 embriões selvagens e de embriões *polo1*, também inactivados a 55ºC, e corou-se o gel com Azul de Coomassie. Os numeros à direita dos paineis correspondem aos marcadores de peso molecular utilizados.

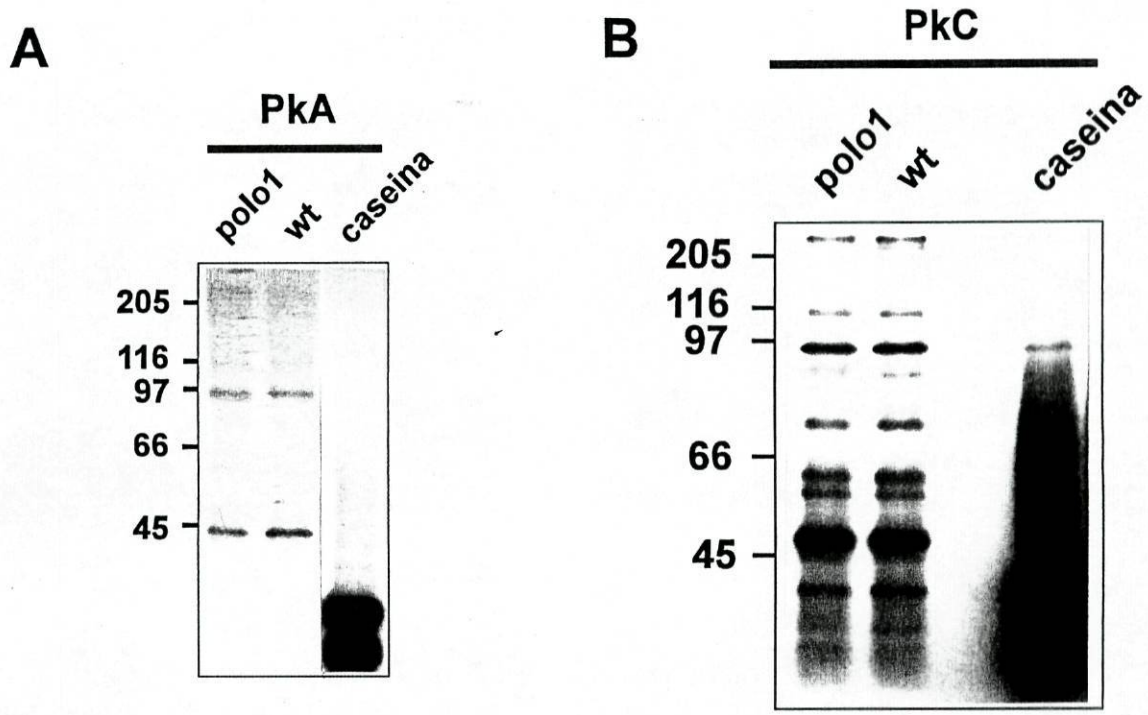


Fig. 6.7- *Ensaios de cinase em extractos de embriões wt e polo1 utilizando-se a PKA e a PKC.* **A)** Incubaram-se extractos de 30 embriões wt e de 30 embriões polo1, inactivados a 55°C, com cinase PKA e [γ–^{32}P]ATP. As proteínas marcadas radioactivamente foram analizadas em gel de poliacrilamida e detectadas por autoradiografia. Como controlo à actividade da cinase realizou-se um terceiro ensaio utilizando-se a caseína como substrato exógeno. **B)** Repetiram-se os ensaios apresentados no painel A) com a cinase PKC. À esquerda dos paineis apresenta-se a massa molecular dos padrões utilizados.

proteínas com 220kDa, 85kDa ou 54kDa nos extractos de embriões *polo1* ou de embriões selvagens. E, muito importante, ambas as cinases fosforilam proteínas a um grau idêntico nos dois tipos de extracto.

Os ensaios com PKA e PKC foram realizados nas mesmas condições que com o polo, substituindo-se o tampão (tampão PKA - acetato de magnésio 40mM, EGTA 2.5mM e MES 250mM pH6.9; tampão PKC - MgCl2 100mM, CaCl2 2.5mM, Triton X-100 0.3%, Tris 200mM pH7.5) e utilizando-se 1ul de PKA (5U/ul) (SIGMA) ou 1ul de PKC (~10U/ul) (gentilmente cedida por Carl Smythe).

6.5- Ensaios de cinase em extractos "cell free"

Para a realização de ensaios em extractos "cell free" homogenizaram-se embriões *polo*^{1} e embriões selvagens num volume minímo de tampão (usualmente 1 ul), de modo a alterar-se o sistema ao mínimo. A estes extractos adicionou-se então [γ–^{32}P]ATP e, após 15min de incubação a 20°C, as reacções foram terminadas por adição de tampão de amostra SDS e as proteínas fosforiladas examinadas em geis de poliacrilamida. Na fig. 6.8 apresentam-se os resultados obtidos com este tipo de ensaio. É observável a incorporação de ^{32}P num numero largo de proteínas em ambos os tipos de extracto, como esperado. E embora o padrão de proteínas fosforiladas seja muito semelhante em ambos os casos, verifica-se que algumas se encontram marcadas a níveis diferentes nos extractos *polo*^{1} e os extractos selvagens. De notar com particular atenção que, a confirmar o resultado dos anteriores ensaios e o racíocinio seguido, entre estas proteínas marcadas com diferente intensidade nos dois tipos de extracto se observam proteínas com 54kDa, de 85kDa e de 220kDa e, particularmente, que estas se encontram fosforiladas mais intensamente nos extractos que contêm enzima polo activa (extractos wt). A diferença de marcação destas proteínas não parece ser tão intensa como no ensaio anterior (Fig.6.6) refletindo as diferenças no tipo de ensaio, mas é particularmente interessante verificar que as intensidades relativas de marcação destas três proteínas se mantém, isto é, que a mais intensamente marcada é a proteína de 220kDa e que a proteína de 55kDa é a que apresenta menor intensidade de marcação em ambos os tipos de ensaio.

Uma observação cuidada das autoradiografias indica que estas não são as unicas proteínas que apresentam uma marcação diferente entre os extractos *polo1* e extractos wt. Quando analisadas em geis de poliacrilamida a 8% observam-se proteínas de baixo peso molecular que estão também marcadas mais intensamente nos extractos wt do que nos extractos *polo1* (indicadas com cabeça de seta na Fig. 6.8). Por outro lado, é ainda interessante notar que certas proteínas são marcadas mais intensamente nos extractos $polo^{1}$ do que em extractos de embriões selvagens, como por exemplo uma proteína com cerca de 80kDa de massa molecular aparente fosforilada nos extractos $polo^{1}$, e que não é detectada (ou é muito pouco marcada) em extractos wt (Fig.6.8).

Para que se pudesse determinar se as três proteínas fosforiladas pela cinase polo em extractos de embriões inactivados por calor corresponderiam às proteínas detectadas no ensaio realizado com extractos "cell free" correram-se num mesmo gel o resultado dos dois tipos de ensaios (Fig. 6.9). Verifica-se que efectivamente as três proteínas fosforiladas pela cinase polo em extractos de embriões inactivados por calor têm a mesma massa molecular aparente em geis de SDS-PAGE que três das proteínas marcadas mais intensamente em extractos "cell free" de embriões selvagens do que em embriões $polo^{1}$.

6.6- Fosforilação de proteínas que co-precipitam com a proteína polo

Numa outra tentativa de identificar substratos da cinase polo, analizámos se outras proteínas co-precipitariam com a cinase aquando da imunoprecipitação de polo a partir de extractos de embriões e, mais importante, em caso afirmativo, se a cinase seria capaz de fosforilar essas proteínas. Nesse sentido realizaram-se imunoprecipitações em condições mais próximas das fisiológicas e o produto da imunoprecipitação foi lavado com tampão a baixa concentração salina (ver Material e Métodos). Como controlo efectuaram-se imunoprecipitações em condições idênticas mas a partir de extractos de embriões $polo^{1}$. O produto final das imunoprecipitações foi dividido em duas alíquotas: uma das alíquotas foi usada directamente num ensaio de cinase normal com a caseína como substrato exógeno; a outra alíquota foi incubada sómente com tampão de cinase e [γ–^{32}P]ATP, sem lhe ter sido adicionada caseína. No

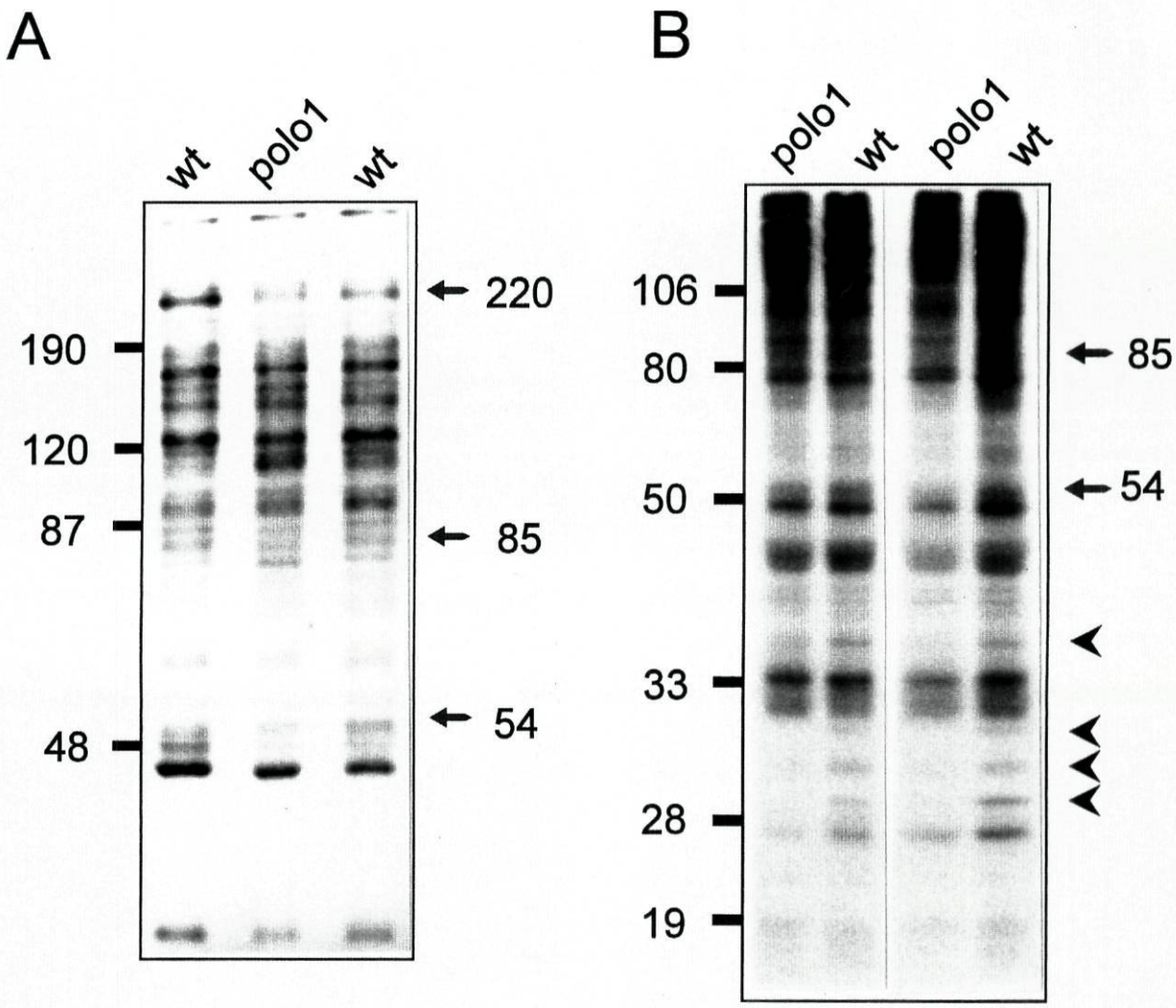


Fig. 6.8- *Comparaçãodas proteínasfosforiladas pela actividade cinásica endógena em extractos de embriões selvagens e polo*^{1}. **A)** Prepararam-se extractos de 15 embriões (selvagens ou polo1) num volume mínimo de tampão IP e incubaram-se na presença de [γ-^{32}P]ATP. Após o periodo de incubação as proteínas fosforiladas foram analizadas em gel de poliacrilamida (7.5%) e detectadas por autoradiografia. **B)** O mesmo ensaio foi repetido com o extracto de 20 embriões e o resultado analizado num gel de 12%. A posição dos marcadores de peso molecular é apresentada no lado esquerdo dos paineis. As setas indicam as proteínas de peso molecular correspondente mais fosforiladas nos extractos de embriões wt que de embriões polo1. As cabeças de seta indicam a posição de proteínas mais intensamente marcadas em extractos selvagens do que em extractos polo1 e que não foram detectadas em extractos inactivados por calor.

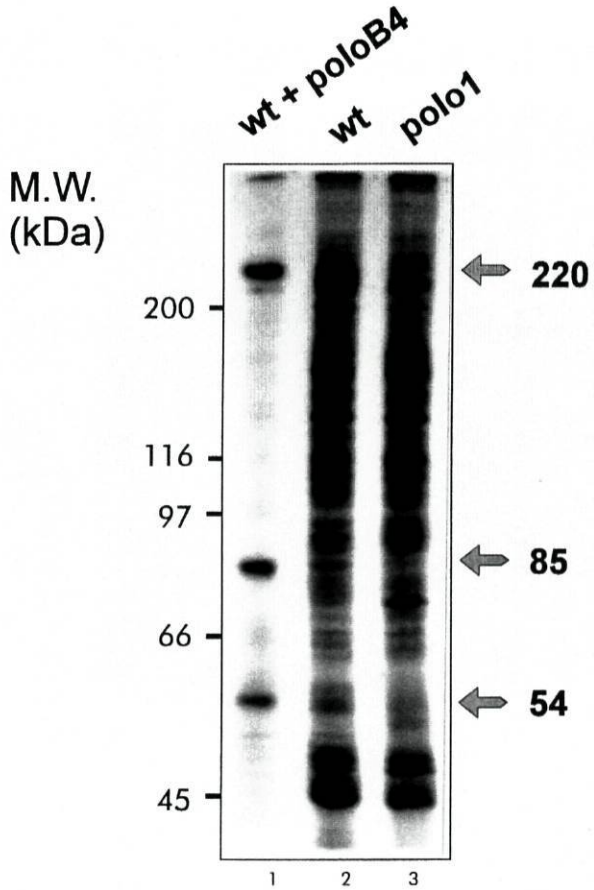


Fig. 6.9- *As três proteínas fosforiladas pela cinase polo em extractos de embriões inactivados por calor coincidem com as três proteínas fosforiladas em extractos "cell free" de embriões selvagens.* Um extracto de 35 embriões selvagens, inactivado a 55ºC, foi incubado com poloB4 e [γ-^{32}P]ATP, como na Fig. 6.6 (coluna 1). No mesmo gel analizaram-se extractos de embriões wt e de embriões *polo1* (coluna 2 e coluna 3) que tinham sido incubados directamente com [γ-^{32}P]ATP e sem terem sido tratados a 55ºC. As proteínas marcadas radioactivamente nos extractos foram detectadas por autoradiografia.

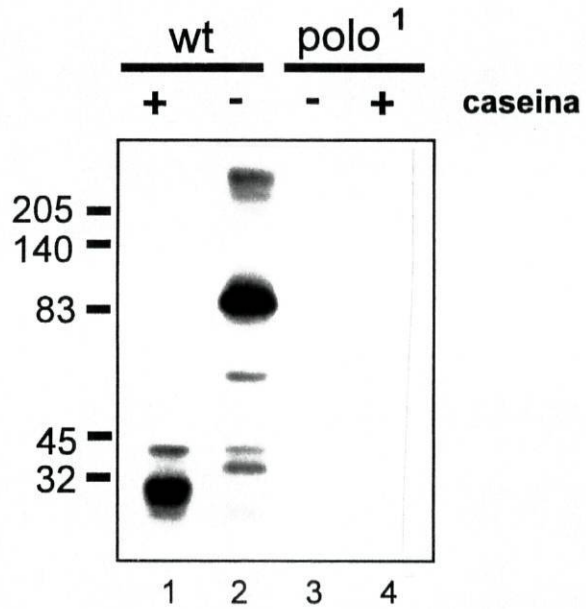


Fig. 6.10- *Fosforilação de proteínas que co-precipitam com a proteína polo.* Os imunoprecipitados de embriões selvagens (pistas 1 e 2) e de embriões *polo*^{1} (pistas 3 e 4), utilizando-se o anticorpo Ma294, foram lavados com baixa concentração salina e incubados a 20ºC na presença de [γ-^{32}P]ATP (pistas 2 e 3), ou na presença de [γ-^{32}P]ATP e caseína (pistas 1 e 4). No final do periodo de incubação as amostras foram analizadas por SDS-PAGE e as proteínas fosforiladas determinadas por autoradiografia.

final do periodo de reacção adicionou-se um volume igual de tampão de amostra de SDS, correram-se as amostras em geis de poliacrilamida e detetactarm-se as proteínas fosforiladas por autoradiografia.

Os resultados obtidos indicam que várias proteínas co-precipitam com proteína polo e que esta cinase as pode fosforilar (Fig. 6.10, coluna 2). A fosforilação destas proteínas é devida à acção da cinase polo uma vez que não se observam quando as imunoprecipitações foram realizadas a partir de embriões mutantes *polo*^{1} . É interessante notar que as duas proteínas marcadas mais intensamente têm um peso molecular de 220kDa e 85kDa. Embora seja detectada uma proteína marcada com ~50kDa a realização de outros ensaios permitiu-nos verificar que não corresponde à proteína de 54kDa observada nos ensaios anteriores (resultados não mostrados). Neste ensaio detectam-se também duas proteínas de baixo peso molecular que estão associadas e são fosforiladas pela cinase polo. Estas proteínas poderão corresponder a proteínas de baixo peso molecular já detectadas anteriormente nos ensaios com extractos "cell-free" (Fig. 6.8), mas esta possibilidade não foi analisada com maior detalhe.

6.7- DISCUSSÃO

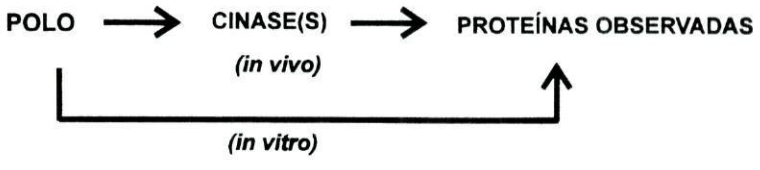
É comum encontrar-se publicada a identificação de cinases responsáveis pela fosforilação de proteínas específicas, isto é, sabendo-se que uma proteína possui resíduos fosforilados identificar-se a cinase que a fosforila. Mas o oposto, conhecendo-se a cinase identificar-se-lhe os substratos, é bastante invulgar. Neste trabalho procurou-se identificar substratos *in vivo* da cinase polo. Para tal desenvolveu-se uma abordagem baseada na comparação no nível de incorporação de ^{32}P pela cinase em proteínas presentes em extractos de embriões normais e em extractos de embriões que se desenvolveram num ambiente sem a presença de cinase activa (*polo*^{1}). O raciocínio por detrás desta abordagem baseia-se na assumpção de que em embriões sem cinase polo os seus substratos se encontrarão por fosforilar, enquanto que em embriões normais, dado o facto de a cinase endógena estar activa, os substratos se encontrarão já fosforilados. Este ensaio, embora sendo um ensaio *in vitro*

reflete portanto uma situação *in vivo* e por isso permitirá identificar substratos fisiológicos da cinase a estudar.

Com este tipo de abordagem fomos capazes de identificar três proteínas, que são potenciais substratos fisiológicos da cinase polo. Estas proteínas têm a massa molecular aparente de 220kDa, 85kDa e 54kDa em geis de SDS-PAGE, e são mais intensamente fosforiladas em extractos *polo*^{1} do que em extractos selvagens inactivados por calor. Neste tipo de ensaio, no entanto, devido ao protocolo de inactivação das cinases endógenas por incubação a uma temperatura elevada, poderemos não detectar outros substratos se estes forem lábeis à temperatura. Também não é implícito que todos os substractos fisiológicos, mesmo que resistentes à incubação a temperaturas elevadas, sejam detectados neste tipo de ensaios. Donde se conclui portanto que estas três proteínas não têm forçosamente que corresponder a todos os substratos endógenos da cinase polo.

O facto das três proteínas serem mais intensamente marcadas em extractos *polo*^{1}, neste tipo de ensaio, indica que se encontram menos fosforiladas nesta classe de embriões do que em embriões selvagens. Não pensamos que se trate do caso destas proteínas estarem apenas presentes em concentrações menores nos extratos de embriões selvagens, pois os dois tipos de extractos apresentam um padrão proteico exactamente igual quando se coraram os geis de poliacrilamida com Azul de Coomassie. O facto de se estar a trabalhar com embriões muito novos auxilia a que a degradação de proteínas embriónicas, observada em embriões *polo*^{1} algumas horas após a postura, ainda não se tenha iniciado.

Poderá ser argumentado que, embora estando as três proteínas sub-fosforiladas em embriões *polo*^{1}, não será a cinase polo responsável pela sua fosforilação *in vivo* mas sim uma outra cinase e assim que a fosforilação observada nestes ensaios seria uma fosforilação inespecífica destas proteínas. Não temos dados para eliminar completamente esta possibilidade. Neste caso contudo essa cinase só estará activa após o ponto de actuação do polo, segundo o esquema



e seria necessário que a cinase polo seja capaz de fosforilar as três proteínas precisamente no(s) mesmo(s) resíduo(s) que essa(s) hipotética(s) cinase(s). A possibilidade de assim acontecer para as três proteínas parece ser muito baixa.

É ainda possível que o tratamento por calor utilizado para inactivar as cinases exponha locais para fosforilação que não se encontram normalmente expostos *in vivo*. No entanto como se verifica uma fosforilação mais intensa dos três polipeptidos nos embriões *polo*^{1} do que nos embriões selvagens, indicando que há mais locais para fosforilação disponiveis no extracto de embriões mutantes, ter-se-á que argumentar com uma desnaturação diferencial entre os dois tipos de extracto. Em qualquer dos casos, o nosso segundo tipo de ensaio mostra que essas proteínas são mais fosforiladas em extractos de embriões selvagens não estando portanto numa concentração inferior neste tipo de embriões e o que número de locais disponiveis para fosforilar não será devido ao tratamento por calor, pois neste ensaio esse tratamento não é utilizado.

Como controlo aos ensaios anteriores realizámos ensaios com extractos que não foram sugeitos a tratamento por calor e aos quais apenas se adiciona [γ–^{32}P]ATP deixando-se as fosforilações endogenas seguirem o seu curso. É deste modo esperado um resultado oposto ao obtido na experiência realizada em extractos inactivados por calor, ou seja, as bandas correspondendo aos substractos fisiológicos e que apareceram mais intensamente marcadas nos extractos *polo*^{1} deverão aparecer agora marcadas mais intensamente nos extractos de embriões selvagens. Uma vantagem deste segundo tipo de ensaio reside no facto de não se recorrer a um tratamento por calor uma vez que não se pretende inactivar as cinases endógenas. Deste modo possíveis substratos lábeis ao calor, e que não são detectados nos ensaios anteriores, têm a possibilidade de serem agora detectados.

Com este segundo tipo de ensaio fomos capazes de observar uma fosforilação mais intensa nos extractos selvagens do que nos extractos *polo*^{1} de três bandas proteicas, com 220kDa, 85kDa e 55kDa de massa molecular aparente em geis de poliacrilamida, e que parecem corresponder às mesmas proteínas detectadas em extractos inactivados por calor. É importante notar que agora não foi adicionada cinase exógena ao meio de reacção e portanto os niveis de fosforilação observados

devem estar mais próximos dos que se verificam *in vivo*, indicando talvez que a proteína de 220kDa será a que sofre um maior grau de fosforilação.

Os resultados obtidos com extractos inactivados por calor confirmam os obtidos com extractos "cell free", isto é, indicando que a cinase polo é a responsável pela fosforilação *in vivo* das três proteínas. O ensaio realizado com extractos "cell free" por si só é de difícil análise devido à multiplicidade de proteínas que aparecem marcadas e das diferenças observadas, por vezes subtis, nos niveís de marcação entre os dois tipos de extracto. Uma das possíveis razões para uma marcação mais intensa de certas proteínas em extractos de embriões selvagens, será a presença nestes extractos de cinases que só estão activas após o ponto de acção da cinase polo. A actividade dessas cinases poderá ser detectada nos extractos de embriões selvagens e não nos de embriões $polo^{1}$, uma vez que embora os embriões $polo^{1}$ pareçam continuar o ciclo celular na ausência de mitoses normais durante um certo período de tempo, não sabemos quais as vias metabólicas que se encontram inactivadas nestes embriões mutantes. A realização dos ensaios com extractos em que as cinases endógenas foram inactivadas (no nosso caso por calor) é portanto essencial para indicar quais as proteínas cuja fosforilação é devida à acção da cinase polo.

Como a utilização de extractos "cell free" permite ultrapassar o problema de se utilizar a incubação a 55°C para a inactivação de cinases endógenas, poder-se-á detectar substratos lábeis ao calor com este tipo de ensaio. Na realidade, detectam-se várias proteínas que poderão corresponder a esta categoria (indicadas com cabeça de seta na Fig. 6.8) algumas das quais têm um peso molecular semelhante ao de proteínas que co-precipitam com a proteína polo (bandas de baixo peso molecular, Fig. 6.10).

Para que a abordagem seguida, de identificação de substratos fisiológicos da cinase polo, pudesse ser utilizada com credibilidade foi necessário garantir que os extractos proteicos dos dois tipos de embrião a comparar tivessem uma concentração proteica idêntica, que tivessem sofrido uma diluição idêntica aquando da sua preparação e que o volume dos extractos utilizado nos ensaios era também idêntico. Para a resolução deste problema, obtiveram-se os extractos a partir de um número reduzido de embriões e que foram homogenizados individualmente à lupa num volume de tampão rigorosamente controlado. Os embriões tinham já sido escolhidos

individualmente de modo a minimizar diferenças de idade. O tempo que se levou a preparar os homogenatos foi também controlado (~5s para 1 embrião e ~1min para 20 embriões). Nós observámos que a quantidade de embriões utilizada em cada ensaio era crucial no desenrolar dos ensaios. Se se utiliza-se demasiados embriões na preparação dos extractos o ruído de fundo observado nas autoradiografias não permitia que se observássem bandas definidas. Este ruido de fundo parece ter origem na degradação proteica que ocorre durante a preparação dos extractos e que é necessáriamente superior para um numero maior de embriões. As diferenças de marcação de proteínas entre os dois extractos também são mais visiveis para extractos preparados com o numero de embriões que aqui apresentámos. No entanto, o factor mais importante a ter de ser controlado foi o volume do tampão utilizado na preparação dos extractos de embrião. Quando se utilizavam volumes de tampão mais elevados não se observava a marcação de proteínas, e volumes muito pequenos implicavam uma perca de proteínas muito grande aquando da inactivação a 55°C.

Embora os resultados, por nós obtidos com este tipo de abordagem, permitam que se saiba a massa molecular de potenciais substratos fisiológicos da cinase, não fornecem mais nenhuma informação acerca da sua identidade. São por isso apenas uteis como ponto de partida ou, caso já se soubesse que a cinase fosforilava determinada proteína, como confirmação final de que esta proteína sofre uma fosforilação diferencial entre embriões selvagens e *polo*^{1}.

CAPÍTULO 7

CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS DA CINASE POLO

Uma série de observações prévias sugerem que a cinase polo deverá ter uma função associada à formação e manutenção de um fuso mitótico bipolar. Em primeiro lugar há os aspectos do fenótipo do mutante *polo1* associados à estrutura do fuso mitótico, como por exemplo a observação de arranjos desordenados de microtúbulos, de polos do fuso anormalmente largos e, em especial, de arranjos circulares de cromossomas em torno de um fuso monopolar. Em segundo lugar o gene polo parece interagir com o locus *asp*, em cujos mutantes também se observam alterações na estrutura dos microtúbulos mitóticos. Finalmente, os mutantes dos genes homólogos em leveduras apresentam igualmente deficiências no funcionamento do fuso mitótico, nomeadamente a formação de fusos monopolares. Muito interessante ainda é o efeito da mutação CDC5 sobre a acção da droga MBC. Esta droga inibe a execução da mitose por despolimerização dos microtúbulos, mas no entanto o mutante CDC5 é capaz de ultrapassar esta inibição. Dada esta informação fará sentido que se procurem os substratos da cinase polo entre proteínas associadas ao aparelho mitótico.

7.1- A cinase polo fosforila a β-tubulina em extractos de microtúbulos

Nos ensaios realizados anteriormente no sentido de se identificar potenciais substratos fisiológicos da cinase polo, observou-se que esta tem a capacidade de fosforilar uma proteína em extractos de embriões com um peso molecular aparente de 54kDa. Sabendo-se que em *Drosophila* este é também o peso molecular aparente da β-tubulina, um dos principais componentes dos microtúbulos, procurou-se então saber se a β-tubulina é proteína de 54kDa fosforilada pelo polo.

Nesse sentido prepararam-se extractos de microtúbulos segundo um protocolo modificado do descrito por Goldstein *et al,,* (1986) a partir de embriões de *Drosophila*. Muito sumáriamente, os microtúbulos são purificados com base na sua estabilização em presença de taxol, sendo no final separados de uma larga fracção de proteínas associadas por incubação com uma concentração elevada de NaCl. O

extracto final obtido está altamente enriquecido em tubulina e em proteínas associadas aos microtúbulos (Fig. 7.1).

Em gel de poliacrilamida a 12% é possível separar os monomeros da tubulina (α-tubulina e a β-tubulina) uma vez que a β-tubulina apresenta uma menor retardação (Fig. 7.2). A β-tubulina foi ainda identificada com auxílio do anticorpo monoclonal anti-β-tubulina Bx69, cuja a específicidade é analizada na Fig. 7.2 (painel B). No "western blot" apresentado verifica-se que o anticorpo Bx69 tem uma elevada especificidade para a β-tubulina, não reconhecendo nenhuma outra proteína quer em extractos totais de embriões quer em preparações de microtúbulos.

De modo a testar-se a presença de eventuais actividades cinásicas a serem co-purificadas em conjunto com os microtúbulos os extractos foram incubados durante 20min a 20°C na presença [γ–^{32}P]ATP. Após o período de incubação as proteínas fosforiladas foram analizadas por SDS-PAGE e detectadas em autoradiografia. Os resultados obtidos indicam que efectivamente em conjunto com os microtúbulos se isola actividade cinásica capaz de fosforilar quer a α-tubulina quer a β-tubulina (Fig. 7.3, coluna 1). Assim sendo, para se poderem utilizar estes extractos nos ensaios com a cinase polo, testou-se se esta actividade endógena será eliminada por incubação a 55°C durante 15min, antes da adição de [γ–^{32}P]ATP. Tal como nos nossos ensaios anteriores, a incubação a esta temperatura resulta eficazmente numa inactivação da actividade cinásica endógena presente no extracto de microtúbulos pois não se observa qualquer fosforilação da tubulina no final do período de reacção com [γ–^{32}P]ATP (Fig. 7.3, coluna 2).

Uma vez eliminada a actividade cinásica endógena, utilizou-se 1μl de extrato inactivado de microtúbulos, ajustado a uma concentração proteíca de ~1mg/ml, em substituição da caseína nos ensaios de cinase. Pelos resultados obtidos, autoradiografia apresentada na Fig 7.3 (coluna 3), verifica-se que o polo fosforila eficazmente a banda de tubulina de menor peso molecular (e que corresponde à β-tubulina) apresentando também alguma, mas fraca, actividade catalítica contra a α-tubulina.

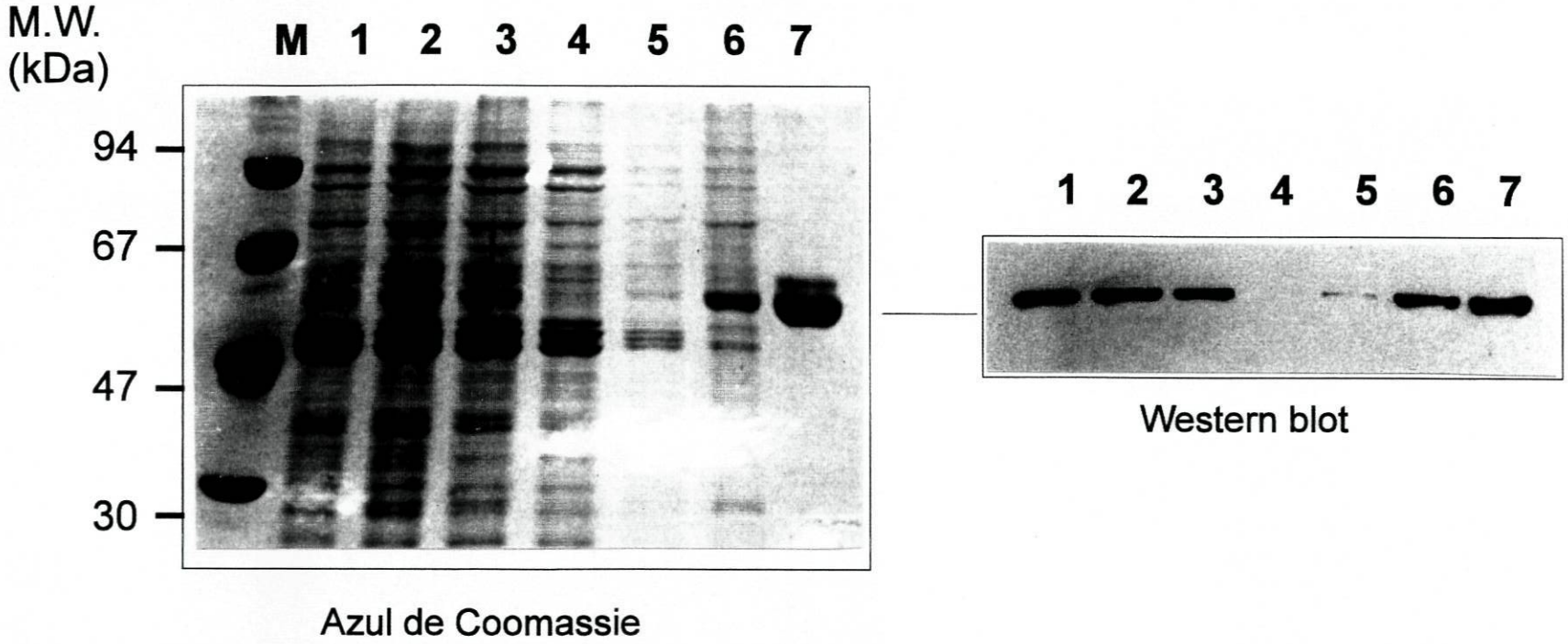


Fig. 7.1- *Preparação de microtubulos.* Prepararam-se microtubulos de acordo com o protocolo descrito no Capítulo 2 e analizaram-se alíquotas das diversas etapas da preparação em gel de poliacrilamida. Na figura apresenta-se o gel corado com Azul de Coomassie. Aliquotas das mesmas etapas da preparação foram também utilizadas na realização de um western blot com o anticorpo monoclonal anti-β-tubulina Bx69.

7.2- A p54 fosforilada pela cinase polo em extratos de embriões é a β-tubulina

Sabendo-se que o polo é capaz de fosforilar a β-tubulina nos ensaios *in vitro*, analizou-se então se esta corresponderia à proteína de 54kDa detectada nos ensaios de cinase com extratos de embriões inactivados por calor (ver Fig. 6.5). Repetiram-se os ensaios de cinase utilizando como fonte de substrato extractos de embriões *polo*^{1} e de microtúbulos, ambos inactivados por calor, mas no final do ensaio de cinase a mistura de reacção foi dividida em duas alíquotas iguais. Uma destas alíquotas foi analizada directamente em SDS-PAGE (Fig. 7.3, colunas 4 e 6), enquanto que a outra alíquota foi utilizada primeiro na imunoprecipitação da β-tubulina com o anticorpo monoclonal Bx69. O resultado da imunoprecipitação foi então analizado em gel de poliacrilamida (Fig. 7.3, colunas 5 e 7). A autoradiografia correspondente ao gel deste ensaio, apresentada na Fig. 7.3, indica que o anticorpo Bx69 imunoprecipita eficazmente a proteína de 54kDa marcada radioactivamente pela cinase polo quer em extractos de embriões quer em preparações de microtúbulos. Este resultado indica pois que a proteína de 54kDa fosforilada pela cinase polo corresponde efectivamente à β-tubulina.

É importante realçar que a cinase polo, além da β-tubulina, também fosforila uma proteína de elevado peso molecular nos extractos de microtúbulos (Fig.7.3, coluna 4). No entanto não pensamos que corresponda à proteína de ~220kDa que a cinase fosforila em extractos de embriões uma vez que tem um peso molecular aparente inferior (~190kDa) no extracto de microtúbulos.

7.3- A cinase polo fosforila a tubulina em resíduos serina e treonina

De modo a determinar-se em que tipo de residuos de aminoácidos o polo fosforila a β-tubulina, realizaram-se de ensaios de cinase com preparações de microtúbulos e extraiu-se do gel de poliacrilamida seco a banda correspondendo a esta proteína. A análise dos aminoácidos fosforilados foi então efectuada por cromatografia de camada fina após hidrólise ácida da proteína.

Por autoradiografia das placas de TLC verifica-se que o polo fosforila a β-tubulina em resíduos de serina e treonina (Fig. 7.4). No entanto, e ao contrário do que

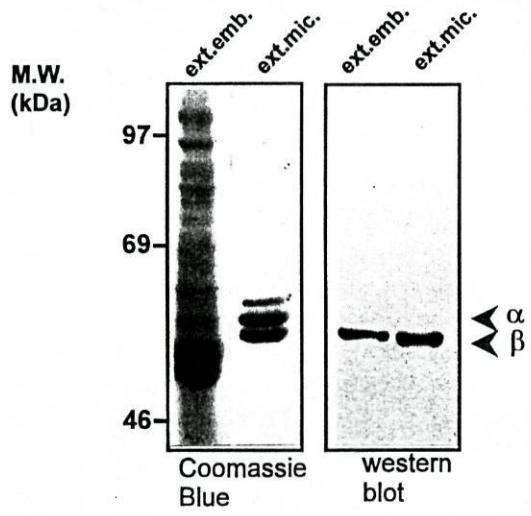


Fig. 7.2- *Caracterização do anticorpo monoclonal anti-β-tubulina Bx69.* Correram-se em gel de poliacrilamida aliquotas de extractos de embriões (ext. emb.) ou da fracção final de uma preparação de microtúbulos (ext. mic.). Após transferência para membrana de nylon o anticorpo Bx69 foi utilizado para se detectar a β-tubulina (painel da direita). De modo a visualizar-se quer a α- quer a β-tubulina (setas) um gel equivalente ao utilizado para western blot foi corado com azul de Coomassie (painel da esquerda). Os marcadores de peso molecular encontram-se assinalados à esquerda dos paineis.

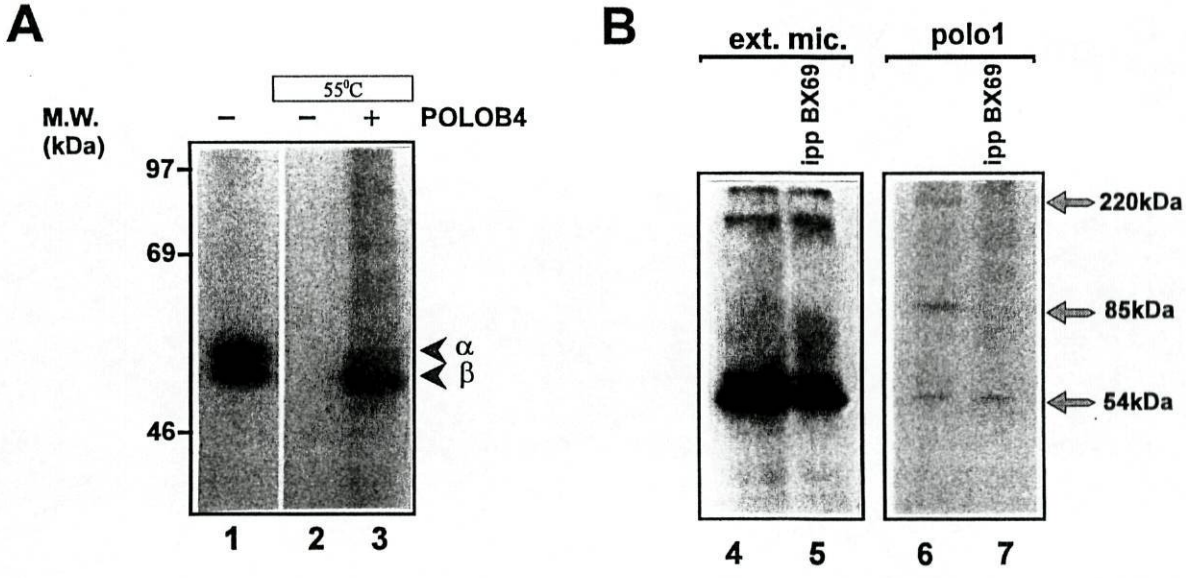


Fig. 7.3- *A cinase polo fosforila a b-tubulina.* **A)** Aliquotas de uma preparação de microtubulos (fracção final após extracção de MAPs por incubação com NaCl) foram incubadas com [γ-^{32}P]ATP antes (pista 1) ou depois (pistas 2 e 3) de terem sido tratadas a 55°C. A uma das alíquotas tratadas a 55°C foi ainda adicionada proteína poloB4 (pista 3). **B)** Uma aliquota de uma preparação de microtubulos (como em A)) após tratamento a 55°C e incubação com poloB4 e [γ-^{32}P]ATP foi dividida em duas alíquotas idênticas. Uma das alíquotas foi analizada directamente em gel SDS-PAGE (pista 4). A outra aliquota foi incubada com anticorpo Bx69 a 4°C durante 1h e o resultado da imunoprecipitação analizado em gel SDS-PAGE (pista 5). A mesma experiência foi realizada utilizando-se um extracto de 30 embriões polo^{1} (pistas 6 e 7). Tanto em A) como em B) apresentam-se as autoradiografias correspondentes aos geis de poliacrilamida de modo a detectarem-se as proteínas marcadas com ^{32}P.

acontece quando se utiliza a caseína como substrato, o grau de marcação destes resíduos não é idêntico. Neste caso a cinase polo fosforila a β-tubulina preferencialmente em resíduos de treonina e, a um menor grau, resíduos de serina.

Este resultado não indica necessáriamente que, *in vivo,* o polo fosforile a β-tubulina num maior numero de resíduos de treonina. Pode até ser que a fosforile preferencialmente em resíduos de serina. Como a tubulina utilizada nestes ensaios não foi tratada com fosfatases para remover grupos fosfato que já possuisse, resultantes de fosforilações endógenas, os locais de fosforilação pelo polo podem já estar ocupados. Pode ainda tratar-se que a fosforilação observada num dos dois tipos de resíduo seja meramente produto do nosso ensaio e que *in vivo* o polo fosforile a β-tubulina só em residuos de serina ou só em residuos de treonina.

7.4- A proteína de 85kDa associa-se a microtúbulos

Aquando das experiências realizadas de modo a verificar-se se a proteína de 54 kDa fosforilada pela cinase polo corresponderia à β-tubulina observou-se, nos ensaios com extractos de embriões selvagens, que a proteína de 85 kDa co-precipitava com a tubulina (Fig. 7.5, coluna 2). Este resultado sugeria que esta proteína poderia ser uma proteína associada a microtúbulos (MAP). De modo a estudar-se melhor esta associação da proteína de 85kDa com a β-tubulina e com a proteína polo, realizaram-se ensaios de "ligand blotting". Neste tipo de ensaio a proteína a estudar é incubada com uma membrana na qual foram préviamente bloqueadas as proteínas de extractos proteicos analizadas em gel de poliacrilamida. A proteína que se ligue às bloqueadas na membrana é depois detectada, usualmente por recurso a anticorpos.

Para a realização destes ensaios separaram-se em gel de poliacrilamida 10% as proteínas de extractos completos de embriões com <2h e, simultaneamente, preparações de microtúbulos de que não se retiraram as MAPs por lavagem numa solução salina (fracção 6 na fig. 7.1). Após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose esta foi incubada com um lisado de células Sf9 infectadas com o baculovirus VpoloB4. Como controlo negativo incubou-se uma membrana idêntica com extractos de células Sf9 infectadas com baculovirus selvagem. A proteína poloB4 associada a proteínas bloqueadas na membrana foi no final detectada

com o anticorpo MA294 seguindo-se o procedimento padrão de revelação de "western blots" por ECL.

A fig. 7.5 resume os resultados obtidos nestes ensaios. Em primeiro lugar é de notar, tanto na membrana incubada com poloB4 como no controlo negativo, a detecção de uma proteína de 67kDa em ambos os tipos de extractos, isto é, nos extractos proteicos totais e nos extractos de microtúbulos. Essa proteína corresponde ao polo endógeno presente nas duas amostras. A primeira conclusão que se pode tirar destes resultados é que a proteína polo co-purifica com microtúbulos.

A segunda observação importante é que na membrana incubada com poloB4 esta proteína interage com uma proteína de ~85kDa bloqueada na membrana, e esta interacção só é visível na coluna correpondente ao extracto enriquecido em microtúbulos (Fig. 7.5, coluna 6). Essa mesma interacção não é observável na pista correspondente ao extracto proteico completo (Fig. 7.5, coluna 5), o que sugere que a concentração desta proteína de 85kDa é mais elevada no extracto de microtúbulos, implicando que na preparação destes ultimos se obteve um extracto enriquecido na p85.

Em terceiro lugar observa-se a interacção entre a proteína poloB4 e duas proteínas de baixo peso molecular (40kDa e 36kDa) presentes no extracto de embrião (Fig. 7.5, coluna 5). Essa mesma interacção não é observada no extracto de microtúbulos (Fig. 7.5, coluna 6), sugerindo que na preparação dos microtúbulos essas proteínas são eliminadas.

Por fim, é importante também notar que não se detecta uma interacção directa entre a proteína poloB4 com a β-tubulina em qualquer dos extractos. Este resultado poderá significar apenas uma incapacidade do polo se complexar com a tubulina neste tipo de ensaio, dado que a tubulina está desnaturada e bloqueada na membrana. Por outro lado poderá indicar que a proteína polo é apenas capaz de se ligar a complexos de tubulina (como em microtúbulos) e de não a reconhecer na forma monomérica, como neste caso. Este resultado parece confirmar o obtido nos ensaios de imunoprecipitação (Fig. 6.10). Nesses ensaios não se observou a fosforilação de uma proteína de 54kDa que coprecipita-se com o polo. Observou-se sim a fosforilação de uma proteína de ~50kDa que, além de um peso molecular inferior ao da tubulina, não é reconhecida pelo anticorpo Bx69 (resultados não mostrados).

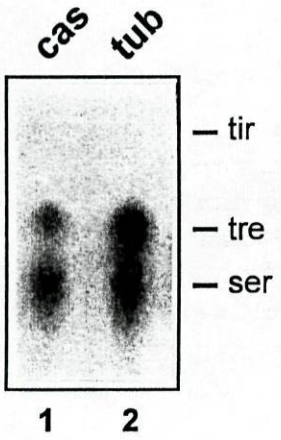


Fig. 7.4- *A cinase polo fosforila a tubulina em resíduos de treonina e de serina.* A β-tubulina fosforilada pela cinase polo em preparações de microtubulos (como na Fig. 7.3) foi extraída do gel seco e, após hidrólise ácida, os resíduos de aminoácidos fosforilados foram separados por cromatografia de camada fina e detectados por autoradiografia (pista 2). Como comparação o mesmo ensaio foi realizado com caseína também fosforilada pela cinase polo (pista 1). A posição de fosfoaminoácidos padrão é indicada à direita do painel.

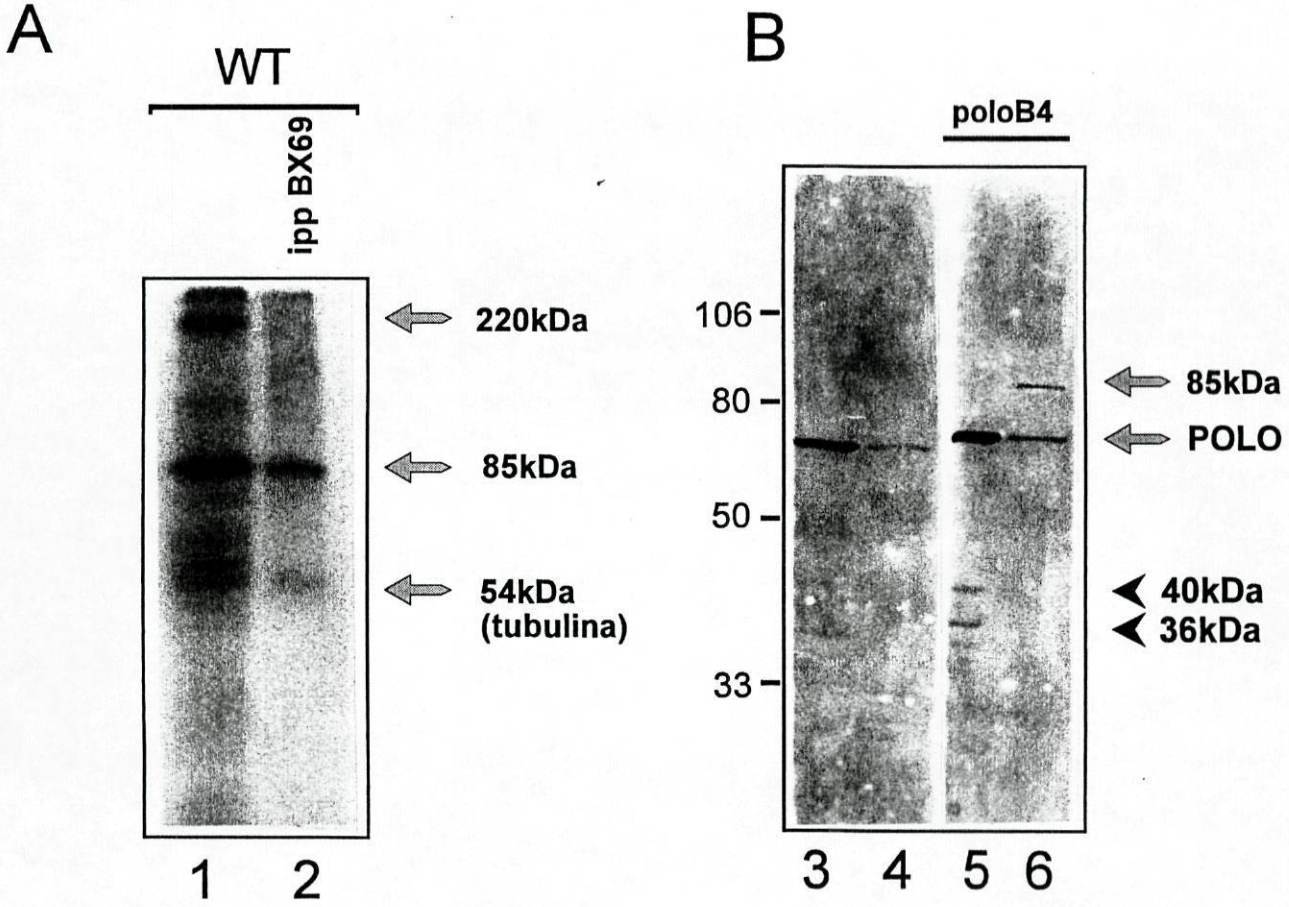


Fig. 7.5- *A proteína de 85kDa proteína associa-se a microtubulos.* **A)** Utilizaram-se como substrato da cinase polo extractos de 50 embriões selvagens, após tratamento a 55°C. Metade da mistura de reacção foi analizada em gel de poliacrilamida (coluna 1) enquanto que a outra metade utilizada para imunoprecipitação com o anticorpo Bx69 (pista 2). As proteínas marcadas radioactivamente foram detectadas por SDS-PAGE e autoradiografia. **B)** Correu-se em SDS-PAGE um extracto de embriões (pistas 3 e 5) e uma preparação de microtubulos (não incubada com NaCl) (pistas 4 e 6). No final da corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi então incubada com extractos de células Sf9 infectadas com baculovirus selvagem (pistas 3 e 4) ou de células Sf9 infectadas com baculovirus VpoloB4. No final a proteína poloB4 foi detectada com o anticorpo Ma294.

7.5- A proteína polo associa-se a microtúbulos

Os resultados obtidos nas experiências de ligand blotting sugerem que a proteína polo poderá associar-se a microtúbulos, uma vez que se encontra presente na fracção final da preparação de microtúbulos (Fig. 7.5, painel B). Para que se pudesse analizar melhor esta interacção realizaram-se então "western blots" com as fracções obtidas durante as diferentes etapas da purificação dos microtúbulos. Na realização destes "western blots" utilizou-se o anticorpo Bx69 para se detectar a β-tubulina e, após lavagem da membrana, reincubou-se com o anticorpo Ma294 para se detectar o polo (Fig. 7.6, paineis A). É vísivel nos Westerns obtidos que a proteína polo não só co-purifica com os microtúbulos como também a sua concentração nas fracções aumenta com o grau de purificação dos microtúbulos. Este aumento de concentração não foi quantificado mas, embora modesto, parece indicar que a proteína se encontra realmente associada a microtúbulos.

Na mesma experiência tentou-se ainda observar a totalidade das actividades cinásicas presentes nas diferentes fracções obtidas na preparação de microtúbulos. Alíquotas idênticas às que foram utilizadas para a realização dos "western blots" foram incubadas com [γ–^{32}P]ATP durante 15min a 20°C, como para os ensaios em extractos "cell free". As proteínas fosforiladas foram detectadas por análise das fracções em gel de poliacrilamida que depois de seco foi exposto a filme de raios-X. Como esperado observa-se com este tipo de ensaio uma diversidade enorme de proteínas marcadas com ^{32}P nas fracções analisadas (Fig.7.6, painel B). De notar no entanto que a fosforilação da tubulina, que é fraca na fracção correspondente ao extracto total de embriões (coluna 1), aumenta dramáticamente quando os microtúbulos são estabilizados pela inclusão de taxol no tampão (colunas 5 e 6). De notar ainda que na fracção 7 (Fig. 7.6, coluna 7) não se observa fosforilação da tubulina, embora a fracção contenha quer tubulina quer proteína polo. A fracção 7 corresponde ao sobrenadante obtido aquando da incubação do extracto de microtúbulos com uma solução de elevada concentração salina (ver Material e Métodos) e não é esperado que contenha microtúbulos polimerizados.

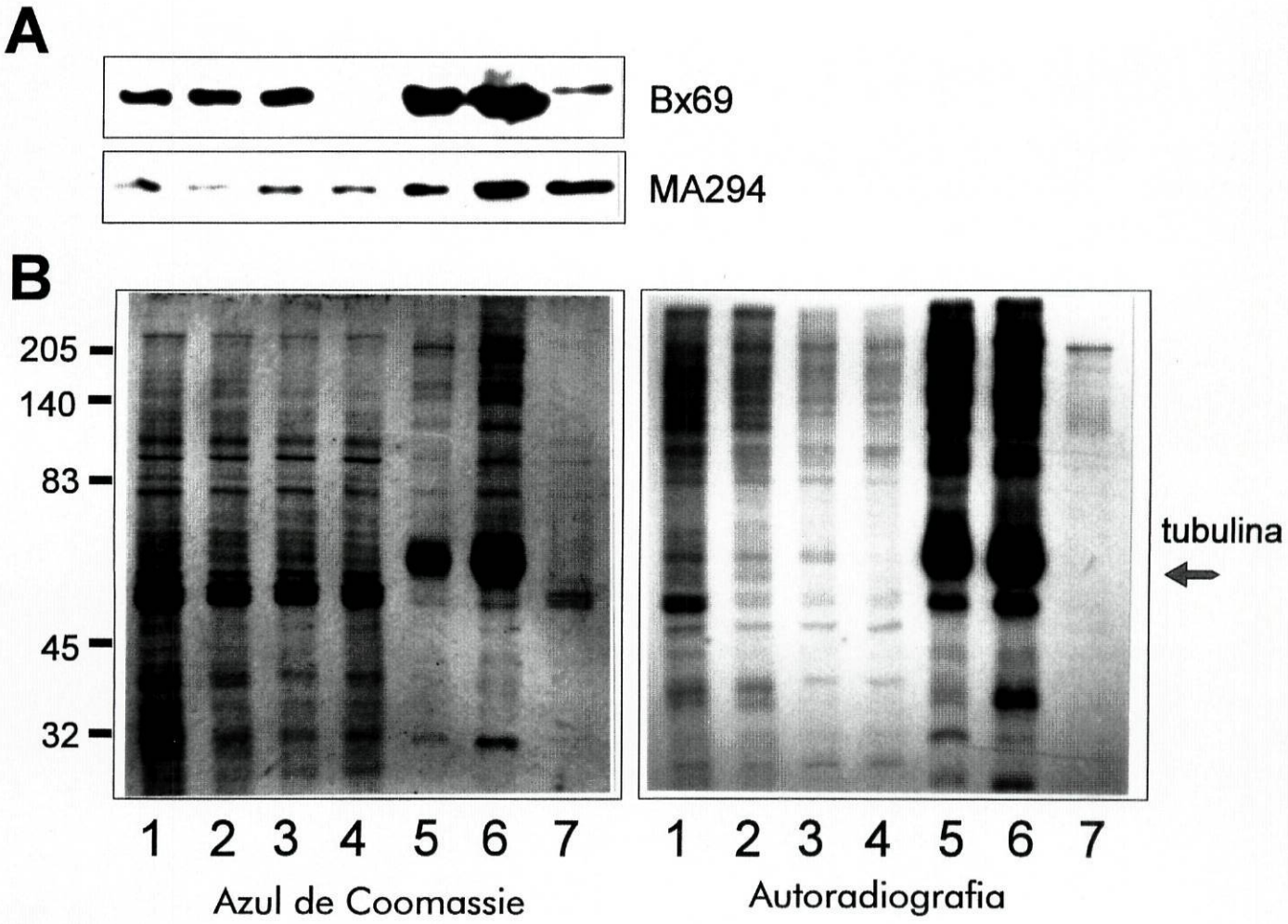


Fig. 7.6- *Associação da proteína polo a microtubulos.* **A)** As fracções obtidas durante a preparação de microtubulos foram analizadas em Western blot com os anticorpos anti-polo Ma294 e anti-β-tubulina Bx69. Pista 1- extracto total de embriões; pista 2- sobrenadante após centrifugação a 16000g; pista 3 - sobrenadante após centrifugação a 135000g; pistas 4 e 5 - sobrenadante e pellet após incubação com taxol e centrifugação a 54000g; pistas 6 e 7 - pellet e sobrenadante após incubação com NaCl 0,4M e centrifugação. **B)** As mesmas fracções analizadas em A) foram incubadas 15 min a 20ºC na presença de [γ-^{32}P]ATP e analisadas em gel de poliacrilamida (10%) seguido de autoradiografia. Tanto em A) como em B) as fracções analizadas continham 5ug de proteina.

7.6- A cinase polo é responsável por parte da actividade cinásica associada a microtúbulos

Sabendo-se que a proteína polo se encontra associada a microtúbulos tentámos então saber se esta cinase seria responsável pela acção cinásica que co-purifica com microtúbulos e que fosforila a tubulina (ver Fig.7.3, coluna 1). Para a realização deste ensaio utilizou-se a fracção 6 da preparação dos microtúbulos (Fig. 7.6, coluna 6) e que corresponde ao pellet obtido após a incubação do extracto de microtúbulos com 0.4M de NaCl. De uma alíquota desta fracção, com 1μg de proteína num volume de 20μl, imunoprecipitou-se a cinase polo com anticorpo Ma294 associado a proteína G-Sepharose, e incubaram-se as amostras durante 1h a 4°C. No final deste período, o imunoprecipitado foi removido por centrifugação e a actividade cinásica associada aos microtúbulos determinada por incubação com [γ-^{32}P]ATP, como para os ensaios com extractos "cell free". As proteínas fosforiladas foram analizadas em gel de poliacrilamida que posteriormente se expôs a filme de raios-X (Fig. 7.7, coluna 1). A actividade cinásica da amostra imunodepletada de polo foi comparada com a de uma amostra que tinha sido incubada com proteína G-Sepharose sem anticorpo Ma294 associado (Fig. 7.7, coluna 2). Como controlo à imunodeplecção da proteína polo realizaram-se "western blots" com alíquotas da fracção 6 que sofreram tratamento idêntico (Fig. 7.7, colunas 3 e 4).

A análise dos resultados indica que a imunodeplecção da proteína polo dos extractos foi bastante eficaz (embora não quantificada estima-se que em mais de 95%) (Fig. 7.7, colunas 3 e 4 , anticorpo Ma294). Como resultado da imunodeplecção observa-se uma diminuição na fosforilação da tubulina, bem como de duas outras proteínas (setas, Fig. 7.7). Os resultados indicam ainda que a fosforilação de outras proteínas na amostra não é afectada pela imunodeplecção de cinase polo do extracto (pontas de seta, Fig. 7.7).

DISCUSSÃO

Dos três polipeptidos fosforilados pela cinase polo em extractos de embriões fomos capazes de identificar o de 54kDa como sendo a β-tubulina. Mostramos ainda que o polo é capaz de fosforilar a β-tubulina em microtúbulos polimerizados pela

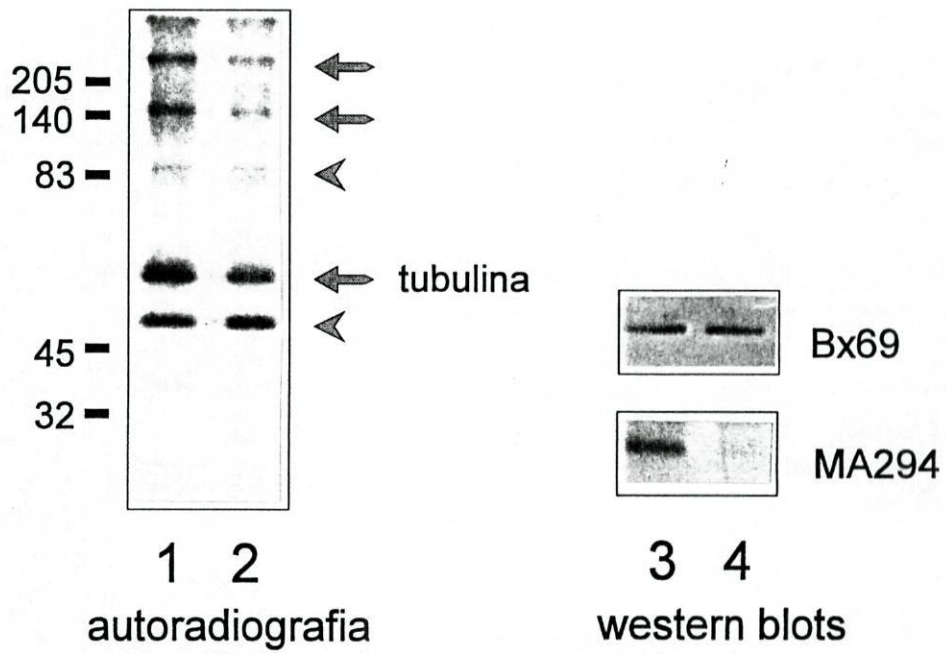


Fig. 7.7- *O polo é responsável por parte da actividade cinásica associada a microtubulos*. A actividade da cinase polo foi analisada na preparação de microtubulos (correspondentes à fracção 6 da Fig. 7.6). Aliquotas com 1ug de protein foram incubadas 1h a 4°C com proteina G-Sepharose (pista 1) ou com anticorpo Ma294 associado a proteína G-Sepharose (pista 2). Após remoção do imunoprecipitado a actividade cinásica que permanece associada aos microtubulos foi então analisada em metade das amostras por incubação com [γ-^{32}P]ATP durante 10min, seguida de SDS-PAGE e autoradiografia. Na figura as setas indicam proteínas cuja marcação com ^{32}P diminui após a imunoprecipitação e as cabeças de seta as proteínas cuja marcação não se altera. Como controlo realizou-se um western blot com a segunda metade das amostras utilizando-se o anticorpo Bx69. Após lavagem do blot este foi reincubado com anticorpo Ma294.

inclusão de taxol e GTP no tampão de purificação, e que esta cinase é responsável por parte da actividade cinásica que fosforila a tubulina e que co-purifica com microtúbulos.

A observação de que a β-tubulina se encontra fosforilada *in vivo* está já descrita (Eipper 1972, 1974; Sandoval *et al,,* 1976; Diaz-Nido *et al,,* 1990; Rudiger e Weber 1993) bem como que pode ser fosforilada *in vitro* por diversas cinases (Wandosell *et al,,* 1986; Crute e Van Burkirk 1992). A presença de uma actividade cinásica associada a microtúbulos purificados e capaz de fosforilar a β-tubulina e algumas das MAPs foi também descrita anteriormente (Serrano *et al,,* 1987; Diaz-Nido *et al,,* 1988a e 1988b; Bai *et al,,* 1992). A maioria das observações *in vivo* reporta-se a estudos realizados em neuroblastos. Neste tipo de células parece que apenas a β-tubulina é fosforilada e esta fosforilação dá-se em resíduos de serina da região C-terminal (Eipper 1974; Gard e Kirschner 1985; Diaz-Nido *et al,,* 1990). Estas observações foram muito recentemente estendidas a células não-nervosas tendo também sido detectada fosforilação da β-tubulina em eritrócitos e fosforilação da α-tubulina (em resíduos de tirosina) em linfócitos T (Rudiger e Weber 1993; Marie-Cardine *et al,,* 1995).

Pouco se sabe ainda sobre o papel que a fosforilação da tubulina desempenha e muito possivelmente estas fosforilações terão uma função diferente consoante o tipo de células em que ocorrem, como por exemplo a fosforilação da α-tubulina que parece estar correlacionada com a activação de células T (Marie-Cardine *et al,,* 1995). Especula-se que as modificações pós-traducionais da tubulina promovem a ligação de MAPs e desta maneira estabilizam os microtúbulos no interior das células. No entanto esta conclusão é baseada na evidência circunstancial de que é no terminal-C da tubulina que ocorrem tanto as modificações pós-traducionais como a ligação a muitas das MAPs já descritas. Mas há pouca ou nenhuma evidência a mostrar que as modificações pós-traducionais da tubulina aumentam a ligação a MAPs (para revisão ver Avila, J. 1990; 1992; Margolis e Job 1994).

Deste modo, o significado biológico da fosforilação da tubulina é ainda desconhecido. Por outro lado não há ainda evidências conclusivas acerca da identidade da cinase (ou cinases) responsável pelas fosforilações observadas. Entre as cinases capazes de fosforilar a tubulina *in vitro* contam-se a cinase dependente da

calmodulina, a cinase II da caseína, a cinase associada ao receptor da insulina e a cinase c-mos (Wandosell *et al,,* 1986; Serrano *et al,,* 1987; Zhou *et al,,* 1991). A observação de que a cinase associada ao receptor da insulina fosforila a tubulina em resíduos de tirosina sugere que esta poderá ser a responsável pela fosforilação observada em linfócitos T. A cinase dependente da calmodulina, no entanto, fosforila tanto a a-tubulina como a β-tubulina e causa mudanças conformacionais que inibem a capacidade da tubulina se auto-associar em microtúbulos e de se ligar a algumas das proteínas associadas a microtúbulos (Wandosell *et al,,* 1986). A fosforilação da tubulina pela cinase II da caseína por sua vez tem um efeito oposto, isto é, parece promover a montagem e estabilização de microtúbulos (Serrano *et al,,* 1989).

Neste trabalho não se examinou qual o efeito da acção da cinase polo sobre a capacidade de polimerização/despolimerização da tubulina, mas pelos resultados obtidos parece que a cinase fosforila preferencialmente a tubulina em condições que favorecem a polimerização de microtúbulos (Fig. 7.3 e Fig. 7.6). Por outro lado, quando as as condições favoreciam a despolimerização observou-se pouca ou nenhuma fosforilação da tubulina. Os nossos resultados estão ainda em concordância com os de Gard e Kirschner (1985), que observaram que quando células em cultura eram tratadas com taxol a fosforilação da tubulina aumentava rápidamente, e que essa mesma fosforilação se reduzia drásticamente quando drogas que induzem a despolimerização (como o nocodazole e a colcemida) eram utilizadas no meio de cultura. Nós também observámos, nos nossos ensaios *in vitro,* que a utilização de taxol para estabilizar microtúbulos provocava um enorme aumento na fosforilação da tubulina.

O facto da tubulina ser, dos três polipeptidos que o polo fosforila nos nossos ensaios, o que apresenta uma diferença menor de marcação entre embriões selvagens e embriões *polo1*, além de também uma menor marcação total, pode ser devida a diversos factores. O principal dos quais será que os ensaios não são realizados num ambiente que favorize a polimerização de microtúbulos. Sabe-se também que a tubulina é notóriamente sensivel a incubações a temperaturas elevadas. A ter um efeito biológico, a fosforilação da tubulina pelo polo *in vivo* poderá ocorrer apenas numa sub-população de microtúbulos alterando-lhes a estabilidade e conferindo-lhes a plasticidade necessária à execução da mitose.

Dois resultados obtidos de maneiras distintas nos nossos ensaios indicam um dos outros substratos da cinase polo, a proteína de 85kDa, é uma proteína associada a microtúbulos. No primeiro tipo de ensaios a p85 aparece associada à tubulina quando esta é imunoprecipitada de embriões, e no segundo uma proteína de 85kDa, à qual a proteína polo se liga, aparece enriquecida em fracções purificadas de microtúbulos. A classificação da p85 como sendo uma proteína associada a microtúbulos não é, no entanto, ainda absoluta. Será necessário caracterizar mais pormenorizadamente esta proteína para que se possa classificar com certeza como sendo uma MAP, nomeadamente purificando microtúbulos por ciclos de calor e frio e ver se a proteína de 85kDa co-purifica com os microtúbulos.

Em *Drosophila* estão descritas apenas duas proteínas de 85kDa que se associam a microtúbulos (Cambiazo *et al,,* 1995; Raff e Alberts resultados não publicados). O primeiro grupo isolou uma MAP com 85kDa expressa em embriões e que apresenta muitas das caracteristicas das MAPs de mamiferos, incluido a capacidade de se ligar a um domínio específico da região terminal-C da β-tubulina e de induzir a montagem de microtúbulos (Cambiazo *et al,,* 1995). Esta proteína foi purificada de extractos de microtúbulos preparados segundo um protocolo semelhante ao utilizado por nós e foi recuperada de microtúbulos estabilizados com taxol por incubação destes com concentrações salinas altas. Nós fomos capazes de detectar a fosforilação ou ligação à proteína de 85kDa apenas quando utilizámos concentrações salinas baixas para preparar microtúbulos (Fig. 7.5B) ou quando os imunocomplexos foram também lavados com concentrações salinas baixas (Fig. 6.10). Quando utilizámos concentrações altas de sal não se observou qualquer fosforilação da proteína de 85kDa (Fig. 7.3).

Uma proteína de 85kDa, associada a microtúbulos, foi também isolada de embriões de *Drosophila* através de colunas de afinidade construídas com microtúbulos ou com a proteína centrossomal CP190 (Raff e Alberts, resultados não publicados; ver também Kellog *et al,,* 1994). Não há ainda muita informação disponível acerca desta proteína excepto que, por imunofluorescência em embriões, tem uma localização centrossomal. Não se sabe, por exemplo, se esta proteína corresponde à isolada por Cambiazo *et al,,.* (1995) ou se se tratam de duas proteínas

diferentes com o mesmo peso molecular. Dado o fenótipo da mutação *polo1* será interessante determinar se a proteína centrossomal de 85kDa corresponde à que a cinase polo fosforila nos nossos ensaios.

A observação de que a proteína polo se associa a microtúbulos é bastante interessante. Fica ainda por determinar se esta ligação é directa ou por intermédio de outras proteínas. O facto de nos nossos ensaios de "ligand blotting" não observarmos uma ligação directa do polo à tubulina não exclui a possibilidade dessa mesma ligação ocorrer *in vivo*. As condições do ensaio, e em especial o facto de a tubulina se encontrar desnaturada e sob a forma monomérica, podem dificultar a interacção entre as duas proteínas. Uma possibilidade plausível será que a proteína polo apenas se ligue á tubulina quando esta se encontra polimerizada em microtúbulos.

Os ensaios de "ligand blotting" mostram que a cinase polo se liga a proteínas de baixo peso molecular (entre 30kDa e 40kDa). Já em ensaios anteriores tinhamos verificado que a proteína polo é capaz de se ligar e de fosforilar proteínas com este peso molecular (ver Fig. 6.8 e 6.10). No entanto não fomos capazes de detectar estas mesmas proteínas nos ensaios realizados com embriões selvagens e $polo^{1}$ inactivados por calor, o que poderá significar que se tratam de proteínas lábeis a 55°C. A identidade destas proteínas continua por estabelecer.

Acerca da proteína de 220kDa temos ainda muito pouca informação. Além de se saber que provávelmente co-precipita com a proteína polo e que esta ultima a fosforila em extractos de embriões, só o peso molecular em geis de SDS-PAGE fornece alguma indicação da sua possível identidade. Tanto em *Drosophila* como em muitos outros organismos diversas das proteínas associadas a microtúbulos têm um peso molecular entre 200kDa e 250kDa. Dado os dados já reunidos acerca da função da cinase polo e dos seus possíveis substratos fisiológicos não seria surpreendente que a proteína de 220kDa também seja uma MAP.

CAPÍTULO 8

DISCUSSÃO FINAL

Pretendia-se com este trabalho caracterizar-se melhor ao nível molecular a proteína codificada pelo gene polo. Com essa finalidade desenvolvemos ensaios em que se pudesse testar a actividade catalítica do enzima e, em especial, desenhámos ensaios que conduzissem à identificação dos seus substratos fisiológicos.

Actividade catalítica da cinase polo

Utilizando um anticorpo monoclonal específico contra a proteína polo fomos capazes de desenvolver um ensaio de cinase que nos permitiu analizar a actividade catalítica do enzima polo. Fomos capazes de observar que a cinase é capaz de utilizar a caseina α como substrato exógeno mas não a histona H1. Resultados similares foram posteriormente obtidos com os enzimas cdc5 e plk1 (Kitada *et al,* 1993; Golsteyn *et al,* 1995). Com este tipo de ensaio fomos ainda capazes de verificar que a cinase polo pertence à família das cinases que fosforilam os seus substratos em resíduos de serina e de treonina.

Regulação da actividade catalítica do enzima polo

A cinase polo de *Drosophila*, bem como o homólogo plk em células humanas, parece ser catalíticamente activo apenas durante a mitose e, também em ambos os casos, o súbito aparecimento de uma forma activa da cinase parece ser demasiado brusca para ser devida a uma sintese *de novo* do enzima (ver por exemplo discussão em Golsteyn *et al,* 1995), o que sugere que a activação observada é induzida por modificações pós-traducionais.

Neste trabalho apresenta-se alguma evidência de que a actividade da cinase polo poderá ser regulada por alterações no seu estado de fosforilação. Verificámos que a proteína polo é ela mesma uma fosfoproteína e que, quer isolada de embriões selvagens de *Drosophila* quer expressa a partir de baculovirus recombinantes, perde a

actividade catalítica quando tratada com fosfatases. Em embriões *polo1*, onde não há uma forma activa do enzima, apenas se detecta a forma desfosforilada indicando que a proteína mutante não é correctamente fosforilada.

É claramente possivel que a fosforilação da proteína polo, em embriões selvagens, seja resultado de uma fosforilação cíclica durante as rápidas mitoses iniciais.Várias das cinases envolvidas na regulação do ciclo celular estão sujeitas a controlo por fosforilação-desfosforilação (para revisões ver Gould, 1994; Kyriakis e Avruch, 1994). Por exemplo, existe uma correlação temporal entre a fosforilação da $p34^{cdc2}$ no resíduo T161 e a activação do enzima e, inversamente, a desfosforilação do T161 ocorre concomitantemente com a inactivação da $p34^{cdc2}$ na saída de mitose (Kreg and Nigg,1991; Lorca *et al,* 1992). A fosforilação de um resíduo equivalente também parece ser requerido para a activação de outras cinases como a cinase MAP e outras cdks (Gu *et al,* 1992; Kato *et al,* 1994). A análise por cristalografia de raios-X das estruturas da cdc2, da cinase MAP e da PKA, mostra que a ligação de um grupo fosfato nesta posição é crítico para o enrolamento das cinases numa conformação activa (revisto em Morgan e De Bondt 1994). A fosforilação deste resíduo embora sendo considerada constitutiva no caso da PKA (Taylor *et al,* 1993) é claramente regulada na activação da cascata de cinases MAP (ver por exemplo Pelech and Sanghera 1992; Nishida and Gotoh 1993). A observação de que na estrutura primária do polo há um residuo de treonina na posição 182, que é equivalente à treonina 161 da cdc2, suscita a hipótese de que neste resíduo poderá ocorrer uma fosforilação activadora. Não fomos, no entanto, capazes de determinar se a proteína polo sofre modificações no seu estado de fosforilação ao longo do ciclo. Será de extremo interesse saber se essas modificações ocorrem e, em caso afirmativo, qual a cinase responsável. A *Drosophila* não é um bom organismo modelo para se executar este género de análise bioquímica e prevê-se que, dado o crescente interesse na cinase polo, que esta questão será em breve respondida num outro modelo biológico. Na realidade, foi já recentemente publicada a observação de que a cinase Plk é especificamente fosforilada durante a mitose, embora a cinase responsável por essa fosforilação não tenha sido identificada (Hamanaka *et al,* 1995).

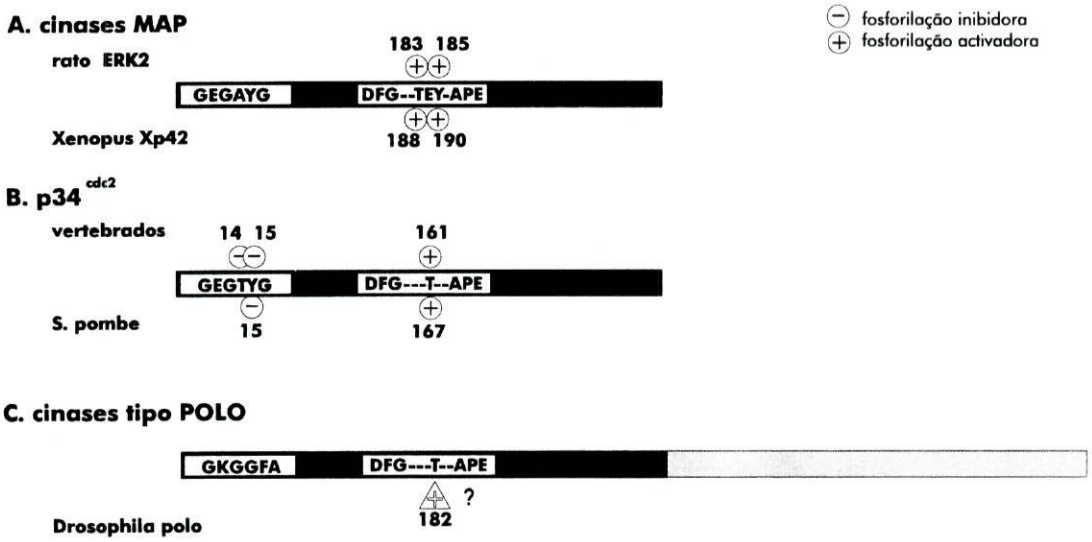


Fig. 8.1- *Possível local de fosforilação na cinase polo.* Indicam-se algumas das cinases envolvidas na regulação do ciclo celular e os resíduos onde são fosforiladas (bem como o efeito dessa fosforilação sobre a actividade catalítica desses enzimas).

Função da cinase polo

Para se poder antecipar qual a função da cinase polo é importante ter presente o fenótipo dos mutantes inicialmente descritos. A mutação *polo1* é uma mutação de efeito materno que origina embriões com redes anormais de microtúbulos associadas a cromossomas condensados e em que os centrossomas não se organizam correctamente. Os neuroblastos de larvas homózigóticas apresentam um largo espectro de defeitos mitóticos incluindo fusos monopolares e fusos com polos anormalmente largos (Sunkel e Glover, 1988; Llamazares *et al,* 1991).

O polo parece portanto afectar a estrutura/funcionamento do fuso mitótico muito possivelmente actuando ao nível dos centrossomas. Os fenótipos dos mutantes plo1 e cdc5, em levedura, confirmam as observações em Drosophila.

A possibilidade de uma acção da cinase polo sobre os centrossomas é também confirmada pela descrição de mutações no locus *scant*[1]. As mutações neste locus

[1] Scant - **S**cott of the **ant**arctic.

foram isoladas em *Drosophila* num rastreio para genes que interajissem com a mutação *polo*^{1} (mutações num segundo sítio[2]) (White-Cooper, 1994). Em embriões

Fig. 8.2- *Regulação e função da cinase polo.* A cinase polo é necessária para que um fuso mitótico normal se forme. A sua função poderá ser regulada positivamente por uma outra cinase e negativamente pela acção de uma fosfatase.

transheterozigóticos *scant/polo*^{1} observa-se a partir do ciclo 8 a formação de fusos mitóticos aparentemente normais mas em que se detecta apenas um dos polos do fuso. A outra extremidade do fuso mitótico não possui um polo normal uma vez que não se observam nem microtúbulos astrais nem marcação com o antigénio centrossomal CP190. Neste tipo de embriões, além desta não há nenhuma outra anormalidade visível na organização do fuso ou dos cromossomas em qualquer das fases mitóticas. Estes embriões mostram ainda frequentemente figuras mitóticas combinadas em que um polo único é compartilhado por dois fusos, sendo também visiveis dispersos no citoplasma numerosos centrossomas livres com microtúbulos astrais associados. Estes dados sugerem assim que pelo menos uma das funções da cinase polo está associada ao funcionamento dos centrossomas durante a mitose. É possivel que a proteína scant seja um substrato da cinase polo, e que o papel do scant seja a manutenção das ligações entre o centrossoma e os microtúbulos do fuso, isto é, o *scant* poderá ser um componente do centrossoma envolvido na ancoragem dos microtúbulos ao material pericentriolar. É interessante notar que mutações numa outra cinase de *Drosophila*, codificada pelo gene *aurora*, também originam a formação de fusos monopolares devido à ocorrência de falhas na separação dos centrossomas (Glover *et al,* 1995). No caso do mutante *polo1* é ainda desconhecido se o aparecimento de fusos monopolares é devido a falhas na separação dos centrossomas após estes se terem duplicado, ou se

[2] Second site mutations - identificadas em moscas trans-heterozigóticas, tendo num cromossoma a mutação a estudar (neste caso *polo1*) e no outro cromossoma uma mutação que se encotra numa posição não alélica (num segundo sítio portanto) e que não complementa a mutação a estudar, podendo indicar por isso uma interacção entre os dois genes.

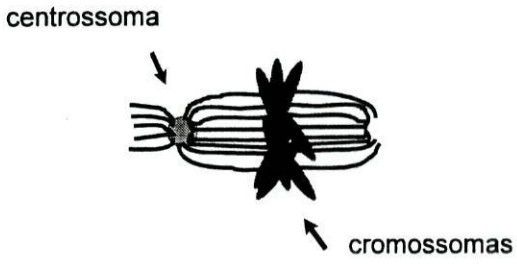


Fig. 8.3- Aspecto típico de um fuso mitótico em neuroblastos de larvas transheterozigóticas *polo1/scant*. Por imunofluorescência de tubulina e CP190, em microscopia confocal, não é muitas vezes visível um dos polos do fuso. O resto do fuso e os cromossomas têm no entanto um aspecto mitótico normal.

devido à existência de uma falha na própria duplicação dos centrossomas. Será de grande interesse esclarecer este aspecto do fenótipo mutante.

Encontram-se também descritas em *Drosophila* outras mutações capazes de causar a formação de fusos monopolares, nomeadamente nos genes *merry-go-round* e *urchin* (KLP61F) (Gonzalez *et al,* 1988; Heck *et al,* 1993). Embora o gene correspondente ao *merry-go-round* ainda não esteja clonado, o gene *urchin* já foi clonado e sequenciado sabendo-se que codifica uma proteína tipo cinesina. Alelos fracos do *urchin* apresentam, além de fusos monopolares, fusos bipolares monoastrais que, tal como no caso do *scant*, parecem formar-se como resultado de perca de um dos polos do fuso normal (Wilson *et al,* 1992; Heck *et al,* 1993). A cinesina KLP61F apresenta elevada homologia de sequência com os membros da família de cinesinas tipo bimC (onde se incluem as cinesinas bimC, CIN8, KIP1, cut7 e Eg5 isoladas de *Aspergillus*, levedura e *Xenopus*) e tanto experiências de genética clássica como de imunodeplecção indicam que as cinesinas desta família têm um papel preponderante em processos relacionados com a separação dos centrossomas durante a mitose (para revisão ver Goldstein 1993a e b; Hoyt 1994).

A relação entre as proteínas polo, aurora, scant, merry-go-round e KLP61F é ainda desconhecida. A possibilidade de qualquer das cinases fosforilar e modificar a função da proteína tipo cinesina *in vivo* é atraente mas terá de ser demonstrada.

A cinase polo fosforila proteínas associadas a microtúbulos

Neste projecto foi dada grande atenção ao desenvolvimento de uma abordagem que permitisse a identificação de substratos fisiológicos da cinase polo. Mas embora o conjunto final de ensaios alcançado (Cap. VI) permita que se saiba o peso molecular de potenciais substratos fisiológicos não fornece indicações mais claras acerca da sua identidade. A informação dos estudos genéticos sugeria no entanto que a função da cinase estaria relacionada com a estrutura/função de um fuso mitótico bipolar. Os nossos resultados estão em concordância com essas observações, pois apresentamos evidências bioquímicas que dois dos substratos da cinase são a β-tubulina e uma proteína de 85kDa que se associa a microtúbulos, fornecendo assim uma base bioquímica para o fenótipo observado no mutante *polo1* e confirmar que a cinase está envolvida nas alterações da dinâmica microtubular que ocorrem durante a mitose. Uma interacção entre a CDC5 e a β-tubulina tinha aliás já sido sugerida pelo efeito de mutações neste gene sobre a droga MBC (ver Capítulo 1).

O "turnover" dos microtúbulos durante a mitose é cerca de 20x mais rápido do durante interfase e acompanha uma reorganização dos longos microtúbulos interfásicos em microtúbulos mitóticos geralmente mais curtos. No entanto os mecanismos que regulam esta reorganização dos microtúbulos não estão ainda definidos. Em células de neuroblastoma foi descrita uma correlação entre o aparecimento de processos tipicos de axónios e a fosforilação da β-tubulina (Gard e Kirschner 1985; Serrano *et al,* 1987; Díaz-Nido *et al,* 1988). Devido a estas observações pensa-se que existe um papel para a fosforilação da β-tubulina no montar e/ou estabilizar de microtúbulos. Esta fosforilação da β-tubulina parece ser parcialmente devida ao enzima cinase II da caseína. Esta cinase fosforila a tubulina em residuos de serina, que por mapa peptídico parecem corresponder a resíduos fosforilados *in vivo,* e não tem um efeito aparente na capacidade da tubulina em polimerizar (Serrano *et al,* 1987). E não se sabe se esta será a única cinase que fosforila a β-tubulina. De notar ainda que estas observações foram realizadas apenas em células de neuroblastoma em diferenciação e que portanto não estão em divisão. Se a tubulina for transientemente fosforilada durante o processo de divisão celular pode dar-se o caso de essa fosforilação não ter sido detectada nestes estudos prévios. A possibilidade da fosforilação da tubulina pela cinase polo durante a mitose é pois

bastante interessante. Fica ainda por estudar qual o papel biológico desta fosforilação, nomeadamente se a capacidade de oligomerização da tubulina é alterada após a fosforilação e/ou se é a ligação da tubulina a MAPs que é modificada. Há também que ter em conta que de entre os microtúbulos mitóticos existem diferentes subpopulações com "turnovers" diferentes, como por exemplo o dos microtúbulos ligados aos cinétocoros que incorporam tubulina na extremidade + a um ritmo mais lento que os outros, e o dos microtúbulos que se cruzam na zona central do fuso e que estão intimamente ligados com a elongação do fuso na anafase B. Existe pois a possibilidade de a cinase polo fosforilar a tubulina apenas numa das subpopulações de microtúbulos, justificando também assim um baixo nível de tubulina fosforilada em células mitóticas e a dificuldade de se detectar essa fosforilação.

Será prioritário determinar-se o(s) resíduo(s) de aminoácido(s) na tubulina fosforilado(s) pela cinase polo e ver se corresponde(m) a resíduos fosforilados em células que se encontrem em mitose. A não existência de uma linha celular de Drosophila sincronizável torna no entanto estes estudos bastante dificeís.

Diversos estudos mostram que a dinâmica microtubular pode ser aumentada pela simples fosforilação das MAPs estabilizadoras (para revisão ver Avila 1990; Worderman e Mitchison 1994). A nossa observação de que um dos substratos da cinase polo parecer ser uma MAP de 85kDa é pois muito interessante. E muitas das MAPs já descritas são alvo de fosforilação durante a mitose e apresentam uma massa molecular entre 220kDa e 240kDa (e.g. Andersen *et al,* 1994), sugerindo que a proteína de 220kDa fosforilada pela cinase polo nos nossos ensaios se tratará também de uma proteína associada a microtúbulos. Além disso foram descritas muito recentemente várias proteínas centrossomais, como a pericentrina, a NuMA, a nineina, a PCM-1 e a centrina, que também têm um peso molecular da ordem dos 220kDa, e que exercem um papel de relevo na capacidade dos centrossomas de nuclearem microtúbulos e na formação/estabilização de um fuso mitótico bipolar (Boukson-Castaing *et al,* 1996; Balczon *et al,* 1994; Errabolu *et al,* 1994; Cleveland 1995). O facto de o aumento do numero de microtúbulos nucleados pelos centrossomas estar directamente relacionado com a fosforilação de proteínas centrossomais (ver por exemplo Ohta *et al,* 1993) e que esta fosforilação parece ser devida não só à acção da

cdc2 e da cinase MAP como também a uma outra cinase ainda não identificada (Masuda e Shibata, 1996) sugere que o polo poderá ser esta terceira cinase e fosforilar proteínas centrossomais.

Dados muito recentes indicam que uma proteína centrossomal, alvo da acção da cinase polo, será a codificada pelo gene *asp* de *Drosophila*. Mutações neste gene causam alterações no comportamento dos microtúbulos meióticos. E sabe-se que existe uma interacção forte entre mutantes *asp* e *polo* (Sunkel e Gonzalez, resultados não publicados). A clonagem recente do gene *asp* permitiu a produção de anticorpos contra esta proteína. Sabe-se agora que este gene codifica uma proteína de ~220kDa, que se localiza em centrossomas mitóticos em embriões síncicio e que co-purifica com microtúbulos (Saunders, Moreira, Howard e Glover, manuscrito em preparação). Resultados preliminares mostram ainda que a cinase polo, *in vitro,* é capaz de fosforilar a proteína asp apoiando a ideia de que as duas proteínas poderão interagir *in vivo*.

Outros substratos da cinase polo

Os nossos ensaios não implicam que a cinase polo tenha sómente três substratos fisiológicos sendo possível que algumas das proteínas que se sabem fosforiladas em mitose e que não têm ainda identificada a respectiva cinase responsável sejam alvo da acção do polo. É também plausível que o polo seja responsável por parte do aparecimento do fosfoepítopo MPM-2. O anticorpo monoclonal MPM-2 reconhece um epítopo fosforilado expresso em múltiplas proteínas predominantemente durante a fase M (Davis *et al,*. 1983). Essas proteínas, tanto mitóticas como meióticas, concentram-se nos centrossomas, fibras do fuso, cinétocoros e braços dos cromossomas (Vandré *et al.* 1984; Taagepera *et al.* 1993) e sabe-se que várias cinases, entre as quais provávelmente a cinase MAP e a cdc2, são responsáveis pela criação desse epítopo fosforilado (Kuang e Ashorn 1993; Westendorf *et al.* 1994) .

Em *Xenopus*, por exemplo, os resultados obtidos indicam a existência de uma cinase capaz de fosforilar e activar a cdc25, que não é nem a cdc2 nem a cdk2, e que essa fosforilação provoca a criação do fosfoepítopo MPM-2 (Izumi & Maller 1995; Kuang *et al.* 1994). Sabe-se ainda que essa cinase não necessita que a cdc2 esteja

activa para ser capaz de fosforilar os seus substratos e que poderá será regulada negativamente pela fosfatase PP1 ou PP2A. É curioso observar o paralelismo destas observações com o que se sabe sobre a cinase polo, que também não necessita da presença de cdc2 activa para estar funcional (Ohkura *et al,* 1995;Lee *et al,* 1995), que pode ser inactivada pela acção de fosfatases, e o facto de a proteína string (o homólogo da cdc25 em *Drosophila*) ter 83kDa podendo corresponder à proteína de 85kDa detectada nos nossos ensaios.

A cinase polo poderá ainda exercer a sua função biológica actuando sobre a proteína Op18 (oncoproteína 18 ou stathmina). A Op18 é fosforilada especificamente na entrada em mitose e esta fosforilação é necessária para que ocorra G2/M (Marklund *et al,* 1994; Larsson *et al,* 1995). Esta proteína promove um aumento na frequência de catástrofe dos microtúbulos como o observado durante a mitose (Belmont, L. e Mitchison, T. 1996). A fosforilação da Op18 *in vivo* ocorre em quatro resíduos de serina, dois dos quais mostraram ser bons substratos para a cdc2 e para a cinase MAP (Marklund *et al,* 1993; Beretta *et al,* 1993) o que parece confirmar resultados prévios que indicavam que as mudanças na frequência de catástrofe dos microtúbulos estão dependentes da acção da cdc2/ciclina B e possívelmente da acção da cinase MAP (Verde *et al,* 1992; Gotoh *et al,* 1991; Verlhac *et al,* 1994). No entanto a cinase responsável pela fosforilação dos outros dois resíduos de serina não foi ainda identificada. Esta fosforilação da Op18 é essencial e a expressão de Op18 com estes resíduos mutados provoca um bloqueio no ciclo celular em G2/M, onde as células bloqueadas em mitose apresentam os cromossomas condensados em vez de alinhados na placa metafásica (Marklund *et al,* 1994; Luo *et al,* 1994; Larsson *et al,* 1995). O conjunto destes dados sugerem assim que a cinase polo poderá ser uma das responsáveis pela fosforilação da Op18 estando já em curso ensaios para determinar se é este o caso.

Dado o fenótipo dos mutantes no gene polo é ainda verosímel que esta cinase tenha como substratos proteínas essenciais para a formação/estabilização de um fuso bipolar, como é o caso de proteínas tipo cinesina (Klps). Em *Drosophila* mutações no gene *urchin* (Klp61F) provocam a formação de fusos monopolares (Heck *et al,* 1993). O homólogo desta cinesina em humanos (HsEg5) tem a sua função regulada por fosforilação (Blangy *et al,* 1995), e embora pareça que essa fosforilação seja

provocada pela cdc2 não foi eliminada a hipótese de serem outras cinases as responsáveis pela fosforilação *in vivo*. É interessante notar que *in vitro* a cinase Plk1 é capaz de fosforilar a HsEg5 (Nigg, E. resultados não publicados), bem como a cinase polo é capaz de utilizar a Klp61F como substrato (Tavares, A. resultados não publicados). No caso da Klp61F parece existir alguma especificidade na fosforilação pois é a unica proteína tipo cinesina que o polo é capaz de utilizar como substrato entre várias testadas. A ideia de um substrato para a cinase polo entre as Klps é ainda apoiada pelos resultados recentes de Lee *et al,* (1995) que observaram que, *in vivo,* a cinase plk interage com a cinesina MKLP-1 e que é capaz de a utilizar como substrato em ensaios *in vitro*.

Ensaio utilizado para identificação de substratos

A identificação de substratos fisiológicos de uma cinase é normalmente muito difícil. Embora seja comum encontrar-se descrita a identificação de cinases aquando do estudo de proteínas que se sabiam já fosforiladas, o trajecto oposto, isto é conhecendo-se a cinase identificar-lhe os substratos, não é normalmente seguido.

No nosso caso específico tinha-se acesso a um sistema *in vivo* no qual a cinase a estudar se encontra inactiva (embriões *polo*^{1}). Caso não se possua este sistema anteve-se que ele possa ser simulado *in vitro* por imunodeplecção da cinase a estudar (cinase x; ver Fig. 8.4). Uma incubação do extracto com ATP permitirá então que as reacções cinásicas devido às actividades endógenas se processem (excepto, claro está, as devidas à cinase x que foi retirada). O produto final deverá ser semelhante a um extracto de embriões mutantes. Se se adicionar-se ao sistema assim obtido a cinase anteriormente imunoprecipitada em conjunto com [γ-^{32}P]ATP deverão poder-se identificar os substratos com possível significado biológico por comparação com o extracto controlo (de onde não se tinha inicialmente retirado a cinase a estudar) (ensaio esquematizado na Fig. 8.4A). Este tipo de ensaio deverá apresentar resultados semelhantes aos obtidos com o ensaio realizado na Fig. 6.6.

De modo a confirmar-se os resultados obtidos neste tipo de ensaio pode-se realizar uma experiência mais simples, mas com resultados mais dificeis de interpretar por si só (tal como os da experiência da Fig. 6.8 que confirmam os da Fig. 6.6). Neste

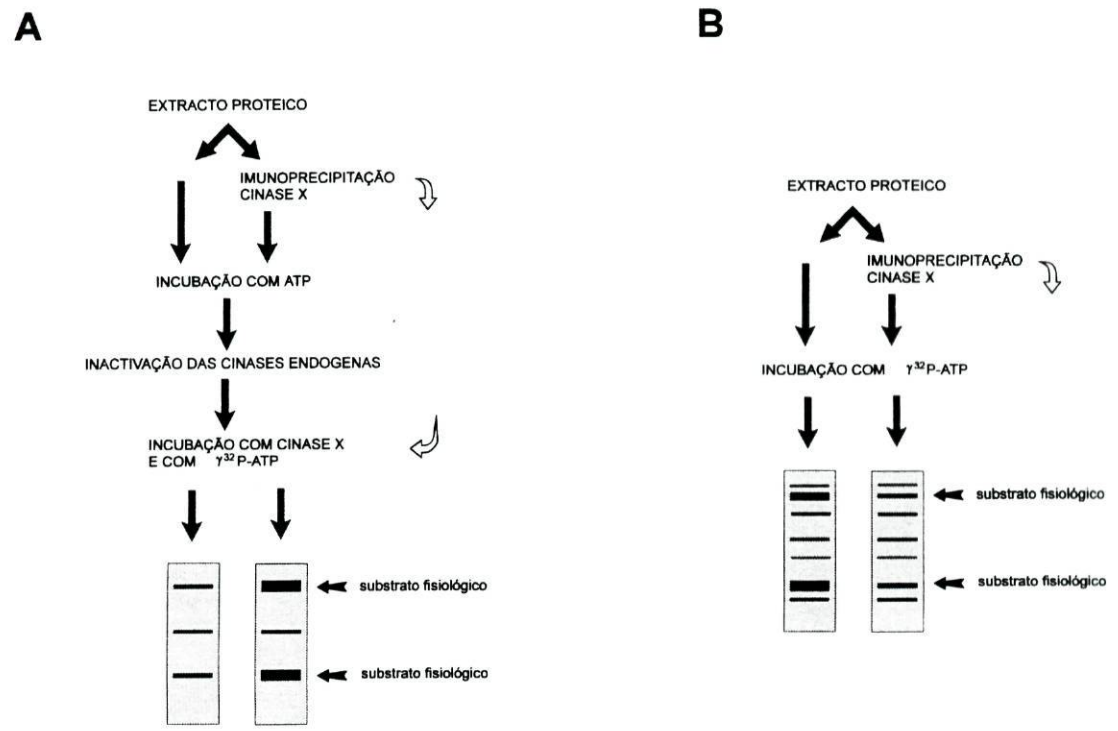


Fig. 8.4- Desenho de ensaios que permitam a identificação de substratos fisiológicos de enzimas com actividade cinásica.

tipo de ensaio não se inactivam as cinases endógenas incubando-se os extractos directamente com [γ -^{32}P]ATP, após a imunoprecipitação da cinase a estudar-se (ver esquema apresentado na Fig. 8.4B).

Este tipo de ensaios tem como vantagens o eliminar da necessidade de um mutante da cinase a estudar, o poder utilizar-se de qualquer tipo de células (isto é, de células em cultura, de levedura, etc), o poder utilizar-se extractos de células sincronizadas (e assim estudar fases específicas do ciclo), e principalmente o facto de o extracto controlo e de o extracto de onde se retira a cinase terem uma origem comum (no nosso caso utilizaram-se dois extractos diferentes: polo1 e selvagem).

A desvantagem de se utilizar dois extractos diferentes é também eliminado se se tiver acesso a mutantes sensíveis à temperatura (conforme esquema da Fig. 8.5).

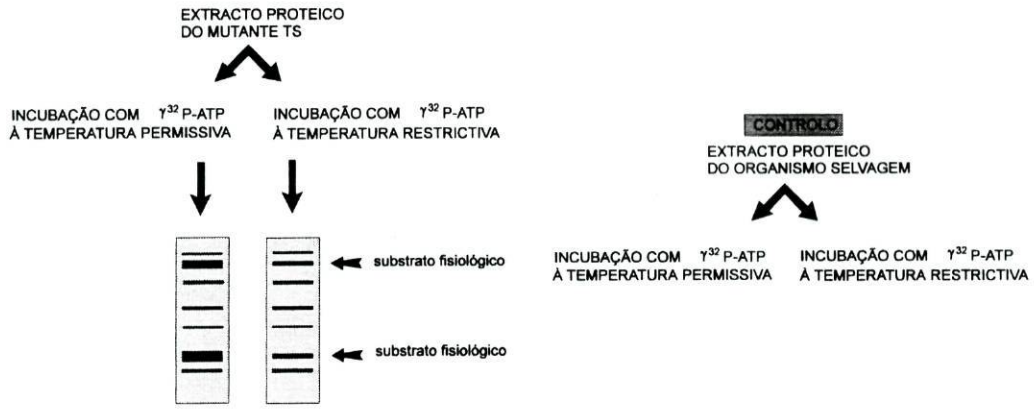


Fig. 21- Desenho de um ensaio que permita determinar-se substratos fisiológicos de uma cinase para a existem mutantes sensiveis à temperatura.

Um dos passos cruciais na abordagem seguida neste trabalho é a eliminação da actividade das cinases endógenas, de modo a ter-se uma percepção de fosforilações que são devidas sómente e directamente à cinase em estudo. A técnica escolhida neste trabalho, a inactivação por calor, tem desvantagens óbvias (ver capítulo V). Em alguns casos poderá mesmo ser muito difícil de empregar devido a alterar demasiado a composição proteica do sistema (como em ovos de Xenopus, por exemplo). Em alternativa prevê-se que se possa recorrer a inibidores químicos de cinases, que tenham uma acção geral e que possam ser removidos antes da adição da cinase a estudar. Um bom exemplo será o FSBA[3], um análogo do ATP que inibe as cinases irreversívelmente, e que pode ser eliminado do sistema por diálise (Adams e Parker, 1992).

Envolvimento de cinases tipo polo em G1/S ?

Uma série de resultados parecem indicar indirectamente que cinases tipo polo poderão ter também uma função durante as fases G1/S e não apenas durante a mitose. Entre eles contam-se o facto de o gene CDC5 ter sido isolado como um supressor do *dbf4* que é um gene necessário no inicío da replicação do DNA; de a microinjecção de RNA antisentido de Plk em células de rato suprimir a síntese de DNA enquanto que a microinjecção de mRNA de Plk estimula essa mesma sintese; de aquando da disrupção do gene *plo1*, embora o fenótipo principal seja a formação de fusos

[3] **FSBA** - 5′-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina.

monopolares e a ausência de septação, se observar um número elevado de células em G1/S (bloqueadas numa forma alongada e com um só nucleo); de a microinjecção de anticorpos anti-Plk em células humanas provocar em 20% dos casos uma paragem do ciclo na fase G1.

A ideia de que este tipo de cinases se encontra envolvido nas fases G1/S é ainda apoiada pelo isolamento dos genes Snk e Fnk de células de rato. Estes dois genes foram isolados quando se procurava identificar factores induzidos na resposta a agentes mitogénicos (Simmons *et al,* 1992; Donohue *et al,* 1995). Ambos apresentam uma expressão rápida e transiente quando as células são expostas a este tipo de agentes, tendo um máximo de expressão ainda antes do inicio da replicação do DNA. O conjunto destas observações parece pois indicar que estas proteínas integram a cascata intracelular de sinais que promove a progressão do ciclo em resposta a factores de crescimento. A descrição da Snk e da Fnk indica pois que, tal como para as cinases tipo cdc2, existem certas cinases tipo polo envolvidas nas fases G1/S e outras cinases tipo polo envolvidas nas fases G2/M. Em *Drosophila,* no entanto, não foram ainda isolados genes de outras proteínas tipo polo, sendo possível que a cinase polo acumule funções em G1/S com funções em G2/M, tal como a CDC28 em *S. cerevisiae.*

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFIA

Adams, P. e Parker, P. (1992). Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by a MAP kinase-kinase. *J. Biol. Chem.* **267**:13135-13137.

Alfa, C., Ducommun, B., Beach, D. e Hymans, J. (1990). Distinct nuclear and spindle pole body populations of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature* **347**: 680-682.

Alphey,L., Jimenez,J., White-Cooper, H., Dawson, I., Nurse, P. e Glover,D. (1992). *Twine*, a cdc25 homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila. Cell* **69**:977-988.

Amon,A., Irniger,S. e Nasmyth,K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclins proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* **77**: 1037-1050.

Amon,A., Tyers,M., Futcher,B. e Nasmyth,K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins Transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**: 993-1007.

Andersen,S., Buendia,B., Dominguez,J., Sawyer,A. e Karsenti,E. (1994). Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells. *J. Cell Biol.* **127**, 1289-1299.

Archer, J. e Solomon, F. (1994). Deconstructing the microtubule-organizing center. *Cell* **76**: 589-591.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila*: a laboratory handbook. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Avila, J. (1990). Microtubule dynamics. *FASEB J.* **4**:3284-3290.

Avila. J. (1992). Microtubule functions. *Life Sci.* **50**:327-334.

Ault, J. e Rieder, C. (1994). Centrosome and kinetochore movement during mitosis. *Curr. Opi. Cell Biol.* **6**: 41-49.

Ausubel, F. *et al.* (1993) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc.

Axton,J., Dombradi,V., Cohen, P. e Glover,D. (1990). One of the protein phosphatases 1 isozymes in *Drosophila* is essencial for mitosis. *Cell* **63**:33-46.

Bai, W., Singh, B., Yang, Y., Ramagli, L., Nash, M., Herzog, N. e Arlinghaus, R. (1992). The physical interactions between p37env-mos and tubulin structures. *Oncogene* 7:493-500.

Bailly, E., Doree, M., Nurse, P. e Bornens, M. (1989). p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm: part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J.* **8**: 3985-3995.

Balczon, R., Bao, L. e Zimmer, W. (1994). PCM-1, a 228kDa centrosome autoantigen showing a distinct cell cycle distribution. *J. Cell Biol.* **124**:783-793.

Baldin,V., Lukas,J., Marcote, M., Pagano,M. e Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Dev.* 7: 812-821.

Belmont,L., Hyman, A., Sawin,K. e Mitchison,T. (1990). Real-time visualization of the cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell* **62**:579-589.

Belmont, L. e Mitchison, T. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* **84**:623-631.

Beretta, L., Dobransky, T. e Sobel, A. (1993). Multiple phosphorylation of stathmin: identification of four sites phosphorylated in intact cells and *in vitro* by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **268**:20076-20084.

Bergen,L., Kuryama,R. e Borisy, G. (1980). Polarity of microtubules nucleated by centrossomes and chromosomes of chinese hamster ovary cells *in vitro. J. Cell Biol.* **50**:416-431.

Bickel, S., Wyman,D., Miyazaki, W., Moore, D. e Orr-Weaver, T. (1996). Identification of ORD, a *Drosophila* protein essential for sister chromatid cohesion. *EMBO J.* **15**:1451-1459.

Blangy, A., Lane, H., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., e Nigg, E. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo. Cell* **83**:1159-1169.

Blow,J. (1993). Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licencing factor. *J. Cell Biol.* **122**: 993-1002.

Blow,J. and Laskey,R. (1988). A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* **332** :546-548.

Boleti, H., Karsenti, E. e Vernos, I. (1996). Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell* **84**: 49-59.

Bouckson-Castaing, V., Moudjou, M., Ferguson, D., Mucklow, S., Belkaid, Y., Milos, G. e Crocker, P. (1996). Molecular characterization of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J. Cell Sci.* **109**:179-190.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.* **72**: 248-254

Brown, K., Coulson, R., Yen, T. e Cleveland, D. (1994). Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis. *J. Cell Biol.* **125**:1303-1312.

Byers, B. and Goestsch, L. (1974). Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 123-131.

Cambiazo,V., Gonzalez,M. and Maccioni, R. (1995) DMAP-85: a t-like protein from *Drosophila* melanogaster larvae. *J. Neurochem.* **64**:1288-1297.

Casal, J., Gonzalez, C., Wandosell, F., Avila, J. e Ripoll, P. (1990). Abnormal meiotic spindles cause a cascade of defects during spermatogenesis in *asp* males of *Drosophila. Development* **108**: 251-260.

Cassimeris, L., Rieder, C., e Salmon, E. (1994). Microtubule assembly and kinetochore directional instability in vertebrate monopolar spindles: implications for the mechanisms of chromossoeme congression. *J. Cell Sci.* **107**: 285-297.

Centonze, V. e Borisy, G. (1990). Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *J. Cell Sci.* **95**: 405-411.

Clark, P. (1995) Cak-handed kinase activation. *Curr. Biol.* **5**: 40-42.

Clay, F., McEwen, S., Bertoncello, I., Wilks, A. and Dunn, A. (1993). Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, *Plk*, related to the *polo* gene of *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4882-4886.

Cleveland, D. (1995). NuMA: a protein involved in nuclear structure, spindle assembly, and nuclear re-formation. *Trends Cell Biol.* **5**:60-64.

Coleman, T., Tang, Z. e Dunphy, W. (1993). Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the Nim1/Cdr1 mitotic inducer. *Cell* **72**: 919-929

Compton, D. e Cleveland, D. (1994). NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:343-346.

Compton, D. e Luo, C. (1995). Mutation of the predicted p34cdc2 phosphorylation sites in NuMA impair the assembly of the mitotic spindle and block mitosis. *J. Cell Sci.* **108**:

Cooke,C., Heck., Earnshaw, B. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.* **105**:2053-2067.

Cooper,J.A. (1991). Estimation of phosphorylation stoichiometry by separation of phosphorylated isoforms. *Meth. Enzymol.* **201**: 251-260.

Coverly,D., Downes,C., Romanowski,P. e Laskey,R. (1993) Reversible effects of nuclear membrane permeabilization on DNA replication: evidence for a positive licencing factor. *J. Cell Biol.* **122**: 985-992.

Cross,F., e Tinkelenberg,A. (1991). A potential positive feedback loop controling CLN1 and CLN2 gene-expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875-883.

Crute, B. e Van Buskirk, R. (1992). A casein kinase-like kinase phosphorylates beta-tubulin and may be a microtubule-associated protein. *J. Neurochem.* **59**:2017-2023.

D´Andrea, R., Stratmann, R., Lehner, C. John, U. e Saint, R. (1993). The *three rows* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel protein that is required for chromosome disjunction during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **4**: 1161-1174.

Davies, F., Tsao, T., Fowler, S., e Rao, P. (1983). Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2926-2930.

Dawson,I., Roth,S., Akam,M. e Artavanis-Tsakonas,S. (1993). Mutations of the *fizzy* locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* **117**:359-376.

de Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrods, R. e Aerts, F. (1986). Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Ptk2 cells at different stages of the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* **101**: 215-274.

Desai, A. e Mitchison, T. (1995). A new role for motor proteins as couplers to depolymerizing microtubules. *J. Cell Biol.* **128**: 1-4.

Diaz-Nido,J., Serrano, L., Lopez-Otin, C., Vandekerckhove,J. e Avila, J. (1990). Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* **265**: 13949-13954.

Dirick,L. e Nasmyth,K. (1991). Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* **351**: 754-757.

Donohue,P., Alberts, G., Guo, Y. e Winkles,J. (1995). Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 10351-10357.

Doxsey, S., Stein, P, Evans, L., Calarco, P. e Kirschner, M. (1994). Pericentrina, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell*, **75**: 639-650.

Draetta,G., Piwnica-Worms, H., Morrison, D., Druker, B., Roberts, T. and Beach, D. (1988). Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* **336**:736-744.

Ducommun, B. Brambilla, P., Felix, M., Franza, B., Karsenti, E. e Draetta, G. (1991). *cdc2* phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J.* **11**: 3311-3319.

Dunphy, W. e Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**: 177-187.

Edgar, B. e O'Farrell, P. (1989). Genetic control of the cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**: 177-187.

Edgar, B. e O'Farrell, P. (1990). The three post-bastoderm cell cycles of *Drosophila* are regulated by *string. Cell* **62**: 469-480.

Edgar, B., Sprenger, F., Duronio, R., Leopold, P e O'Farrell, P. (1994). Distinct molecular mechanisms time mitosis at four sucessive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes & Dev.* **8**: 440-

Eipper, B.A. (1972) Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2283-2287.

Eipper, B.A. (1974) Rat brain tubulin and protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **249**,1398-1406.

Enoch,T., Carr,A. e Nurse, P. (1992). Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes & Dev.* **6**: 2035-2046.

Errabolu, R., Sanders, M. e Salisbury, J. (1994). Cloning of a cDNA encoding centrin, an EF-hand protein of the centrosome and mitotic spindle poles. *J. Cell Sci.* **107**:9-16.

Evans,T., Rosenthal,E., Youngblom,J., Distel,D. e Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed with each cleavage division. *Cell* **33**: 389-397.

Fang, F. e Newport,J. (1991) Evidence that the G1-S and the G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* **66**: 731-742.

Featherstone, C. e Russell, P. (1991). Fission yeast $p107^{wee1}$ mitotic inducer is a tyrosine/serine kinase. *Nature* **349**: 808-811.

Fenton, B. and Glover, D. (1993). A conserved mitotic kinase active at late anaphase-telophase in syncytial *Drosophila* embryos. *Nature* **363**, 637-640.

Foe, V. (1989). Mitotic Domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* development. *Development* **107**: 1-22.

Foe, V. e Alberts, B. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci.* **61**: 31-

Freeman, M e Glover, D. (1987). The *gnu* mutation of *Drosophila* causes inapropriate DNA synthesis in unfertilized and fertilized eggs. *Genes & Dev.* **1**: 924-930

Freeman, M., Nusslein-Volhard, C. e Glover, D. (1986). The dissociation of nuclear and centrosomal division in *gnu*, a nuclear replication mutant of *Drosophila*. *Cell* **46**: 457-468.

Friedman, D., Sundberg, H., Huang, E., e Davies, T. (1996). The 110kDa spindle pole body component of *S. cereviseae* is a phosphoprotein that is modified in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Biol.* **132**:903-914.

Funabiki, H., Yamano,H., Kumada, K., Nagao,K., Hunt,T. e Yanagida,M. (1996). Cut2 proteolyis required for sister-chromatid separation in fission yeast. Nature *381*, 438-441

Galaktionov, K e Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* **67**: 1181-1194.

Gard, L.A. and Kirschner, M. (1985) A polymer-dependent increase in phosphorylation of β-tubulin accompanies differentiation of mouse neuroblastoma cell line. *J. Cell Biol.* **100**, 764-774.

Gatti,M. e Baker,B. (1989). Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **3**:438-453.

Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. e Maller, J. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60** : 487-494.

Gautier, J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F., and Kirschner, M.W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. Cell *67*, 197-211.

Gliksman,N., Parsons,S. e Salmon,E. (1992). Okadeic acid induces interphase to mitotic-like microtubules dynamic instability by inactivating rescue. *J. Cell Biol.* **119**:1271-1276.

Glotzer, M. (1995). The only way out of mitosis. *Curr. Biol.* **5**:970-972.

Glotzer,M., Murray,A. e Kirschner,M. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138.

Glover, D. (1989). Mitosis in Drosophila. *J. Cell Sci.* **92**: 137-146.

Glover, D. (1991). Mitosis in the *Drosophila* embryo - in and out of control. *Trends Genet.* **7**: 125-132.

Glover, D., Leibowitz, M., McLean, D. e Parry, H. (1995). Mutations in *aurora* prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**: 95-105.

Goldstein, L. (1993a). With apologies to Scheherazade: tails of 1001 kinesin motors. *Ann. Rev. Gen.* **27**:319-351.

Goldstein, L. (1993b). Functional redundancy in mitotic force generation. *J. Cell Biol.* **120**:1-3.

Goldstein,L., Laymon,R., e McIntosh,J. (1986). "A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization, and isolation of coding sequences". *J. Cell Biol.* **102**:2076-2087.

Golsteyn, R., Mundt, K., Fry, A. and Nigg, E. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of PLK1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.*

Golsteyn, R., Schultz, S., Bartek, J., Ziemiecki, A., Ried, T. and Nigg, E. (1994). Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. J. Cell Sci. *107*, 1509-1517.

Gomes,R., Karess,R., Ohkura,H., Glover,D., e Sunkel,C. (1993). *abnormal anaphase resolution (aar)*: a locus required for progression through mitosis in *Drosophila. J. Cell Sci.* **104**:583-593.

Gonzalez,C., Alphey,L. e Glover,D. (1994) "Cell cycle genes of *Drosophila*" *Adv. in Genetics* **31**:79-138.

Gonzalez,C., Casal, J. e Ripoll, P. (1988). Functional monopolar spindles caused by mutation in *mgr*, a cell division gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* **89**:39-47.

Gonzalez,C., Saunders, R., Casal, J., Molina, I., Carmena, M., Ripoll, P. e Glover, D. (1990). Mutations at the *asp* locus of Drosophila lead to multiple free centrossomes in synciatial embryos, but restrict centrosome duplication in larval neuroblasts. *J. Cell. Sci.* **96**: 605-616.

Gorbsky,G. e Ricketts,W. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J. Cell Biol.* **122**:1311-1321.

Gotoh, Y., Nishida, E., Matsuda, S., Shiina, N., Kosako,, H., Shiokawa, K., Akiyama, T., Ohta, K. e Sakai, H. (1991). *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature* **349**:251-254.

Gould, K. (1994). Cyclin-dependent protein kinases. in *Protein Kinases,* Editor: Woodgett, J., IRL Press, Frontiers in Molecular Biology series, pp 149-177.

Gould, K., Moreno, S., Owen, D., Sazer, S. e Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizossaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO J.* **11**: 3297-3309.

Gu, Y., Rosenblatt, J., e Morgan, D. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11**: 3995-

Hamaguchi,J., Tobey,R., Pines, J., Crissman, H., Hunter,T. e Bradbury,E. (1992). Requirement for p34cdc2 kinase is restricted to mitosis in the mammalian cdc2 mutant Ft210. *J. Cell Biol.* **117**: 1041-1053.

Hamanaka, R., Maloid, S., Smith, M., O'Connell, C., Longo, D. and Ferris, D. (1994). Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila* polo serine-threonine kinase. *Cell Growth and Differentiation* **5** : 249-257.

Hamanaka,R. Smith,M., O'Connor,P.,Maloid,S., Mihalic,K.,Spivak,J., Longo,D. and Ferris,D. (1995). Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J. Biol. Chem.* **270** : 21086-21091.

Hanks,S. e Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9** : 576-596.

Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J., and Culotti, M. (1973). Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* **74** : 267-286.

Hartwell, L., Cultti, J., Pringle, J. e Reid, B. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183** : 46-51

Hartwell, L. e Weinert, T. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**:629-634.

Hatsumi,M. e Endow,S. (1992). Mutants of the microtubule protein, *non claret disjunctional*, affect spindle structure and chromosome movement in meiosis and mitosis. *J. Cell Sci.* **101**: 547-559.

Hayles, J., Fisher,D., Woolard, A. e Nurse, P. (1994). Temporal order of S-phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2- cyclin B complex. *Cell* **78**:813-822.

Heck,M., Hittleman,W. e Earnshaw, W. (1988). Differential expression of DNA topoisomerases I and II during eukaryotic cell cycle. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **85**:1086-1090.

Heck, M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoii, Y. Spradling, A. e Goldstein, L. (1993). The kinesin-like protein KLP61F is essencial for mitosis in *Drosophila. J. Cell Biol.* **123**: 665-679.

Heichman,K. e Roberts, J. (1995). Rules to replicate by. *Cell* **79**: 557-562.

Hershko,A., Ganoth,D., Pehrson,D., Palazzo, R. e Cohen, L.H. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**:16376-16379.

Hime,G. e Saint,R. (1992). Zygotic expression of the *peeble* locus is required for cytokinesis during the postblastoderm mitosis of *Drosophila. Development* **114**: 165-171.

Hoffman,I., Draetta,G. e Karsenti,E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* **13**: 4302-4310.

Holloway, S. (1995). Sister chromatid separation *in vivo* and *in vitro. Curr. Biol.* **5**: 243-248.

Holloway,S., Glotzer,M., King, R. e Murray,M. (1993). Anaphase is iniciated by proteolysis rather than by the inactivation of the maturation promoting factor. *Cell* **73**: 1393-1402.

Holm, C. (1994). Coming undone: how to untangle a chromosome. *Cell* **77**:955-957.

Holm, C., Stearns, T. e Botstein, D. (1989). DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol. Cell. Biol.* **9**:159-168.

Holtrich, U., Wolf, G., Brauninger,A., Karn, T., Bohme, B., Rubsamen-Waigmann, H. and Strebhardt, K. (1994). Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1736-1740.

Hoyle,H. e Raff,E. (1990). Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J. Cell Biol.* **111**: 1009-1026.

Hoyt, M.A. (1994). Cellular roles of kinesin and related proteins. *Curr Opin. Cell. Biol.* **6**: 63-68.

Hunter,T. e Pines,J. (1995). Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**: 573-582.

Hyman, A. e Karsenti, E. (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* **84**:401-410.

Irniger,S., Piatti, S., Michaelis,C. e Nasmyth,K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**:269-277.

Izumi, T., Walker, D. e Maller, J. (1992). *Cell* **3**: 397-

Izumi, T. e Maller, (1995). Phosphorylation and activation of the xenopus cdc25 phosphatase in the absence of cdc2 and cdk2 kinase activity. *Mol. Biol. Cell* **6**:215-226

Jimenez, J., Alphey, L., Nurse, P. e Glover, D. (1990). Complementation of fission yeast *cdc2ts* and *cdc25ts* mutants identifies two cell cycle genes from *Drosophila*: a *cdc2* homologue and *string*. *EMBO J.* **9**: 3565-3571.

Jinno, J., Suto, S., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. e Okayama, H. (1994). Ccdc25A is a novel phosphatase functionoing early in the cell cycle. *EMBO J.* **13**: 1549-1556.

Johnson, R. e Rao, P. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* **266**: 717-722.

Jordan, M., Thrower, D., e Wilson, L. (1992) Effects of vinblastin, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles: implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell. Sci.* **102**: 401-416.

Joshi, H. (1993). γ-tubulin: the hub of cellular microtubule assemblies. *BioEssays* **15**: 637-643.

Joshi, H. (1994). Microtubule organizing centers and γ-tubulin. *Curr. Opi. Cell Biol.* **6**: 55-62.

Joshi,H., Palacios,M., McNamara,L. e Cleveland,D. (1992). Gamma tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**: 80-83.

Kalt, A. e Schliwa, M. (1993). Molecular components of the centrosome. *Trens Cell Biol.* **3**:118-128.

Karess,R. e Glover,D. (1989). *rough deal*: a gene required for proper mitotic segregation in *Drosophila. J. Cell Biol.* **109**: 2951-2961.

Karess,R., Chang,X., Edwards,K., Kuckarni,S., Aguilera,I. e Kiehart,D. (1991). The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by *spaghetti squash*, a gene required for cytokinesis in *Drosophila. Cell* **64**: 49-62.

Karsenti, E., Boleti, H. e Vernos, I. (1996). The role of microtubule dependent motors in centrosome movements and spindle pole organization during mitosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **7**: 367-378.

Kato, J., Matsuoka, M:, Polyak, K., Massague, J., e Sherr, C. (1994). *Cell* **79**: 487-496.

Kellogg,D. e Alberts,B. (1992). Purification of a multiprotein complex containing centrosomal proteins from the *Drosophila* embryo by chromatography with low affinity polyclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1-11.

Kellogg,D., Field,C. e Alberts,B. (1989). Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome,spindle and kinetochore of the early *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* **109**: 2977-2991.

Kellogg, D., Moritz, M. e Alberts, B. (1994). The centrossome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:639-674.

Kelly,T., Martin,G., Forsburg,S., Stephen,R., Russo,A., e Nurse,P. (1993). The fission yeast cdc18+ gene product couples S phase to start and mitosis. *Cell* **74**: 371-382.

Kerrebrock, A., Miyazaki, W., Birnby, D. e Orr-Weaver, T. (1992). The *Drosophila mei-S322* gene promotes sister chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. *Genetics* **130**:827-841.

King, R., Peters, J.-M., Tugendreich,S., Rolfe,M., Hieter, P., e Kirschner, M. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalysis the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**:279-288.

Kirsch *et al.* (1990). *J. Neurochem.* **55**: 1031-1040.

Kitada, K., Johnson, A., Johnston, L. and Sugino, A. (1993). A multicopy supressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4*

encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol. Cell. Biol.* **13:** 4445-4457.

Knoblich,J. e Lehner,C. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclin A and cyclin b during the G2-M transition. *EMBO J.* **12**: 65-74.

Knoblich,J., Sauer,K., Jones,L., Richardson, H., Saint,R. e Lehner,C. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**: 107-120.

Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T. e Newport, J. (1994). *Molec. Biol. Cell* **5**: 273-282.

Krek, W. e Nigg, E. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **19**: 305-316.

Kuang, J. e Ashorn, C. (1993). At least two kinases phosphorylate the MPM-2 epitope during *Xenopus* oocyte maturation. *J. Cell Biol.* **123**:859-868.

Kuang, J., Ashorn, C., Gonzalez-Kuyvenhoven, M. e Penkala, J. (1994). cdc25 is one of the MPM-2 antigens in the activation of maturation-promoting factor. *Mol. Biol. Cell.* **5**:135-145.

Kuang, J., Zhao, J-Y., Wright, D., Saunders, G. e Rao, P. (1989). Mitosis-specific monoclonal antibody MPM-2 inhibits *Xenopus* oocyte maturation and depletes maturation-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4982-4986.

Kumagai, A. e Dunphy, W. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell free system. *Cell* **64**: 903-914.

Kumagai, A. e Dunphy, W. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *xenopus* extracts. *Cell* **70**: 139-151

Kyriakis,J. e Avruch, J. (1994). S6 kinases and MAP kinases: sequential intermediates in insulin/mitogen-activated protein kinase cascades. in *Protein Kinases,* IRL Press, Frontiers In Molecular Biology series, pp 85-149.

Labbe, J., Caony, J., Caput, D., Cavadore, J., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J., Picard, A. e Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic anaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* **8** : 3053-3058.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lake, R. and Jelinek, W. (1993). Cell cycle- and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13:**7793-7801.

Larsson, N., Melander, H., Marklund, U., Osterman, O. e Gullberg, M. (1995). G2/M transition requires multisite phosphorylation of oncoprotein 18 by two distinct protein kinase systems. *J. Biol. Chem.* **270**:14175-14183.

Lee, M.G. and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* **327**: 31-35.

Lee, M.S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L.L., Donoghue, D.J., Maller, J.L., and Piwnica-Worms, H. (1992). cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol. Biol. Cell* **3**:73-84.

Lee, K., Yuan, Y., Kuriyama, R. & Eriksson, R. (1995).Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP1. *Mol. Cell. Biol.* **15**:7143-7151.

Lehner,C. (1992). The peeble gene is required for cytokinesis in *Drosophila. J. Cell Sci.* **103**: 1021-1030.

Lehner,C. e O´Farrell,P. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and in mitotic control. *Cell* **61**: 535-547.

Lewin, B. (1990). Driving the cell cycle: M-phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* **61**:743-752.

Li, H. e Joshi, H. (1995). γ-tubulin is a minus end-specific microtubule binding protein. *J. Cell Biol.***131**: 207-214.

Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B., Gonzalez, C., Karess, R., Glover, D. e Sunkel, C. (1991). *polo* encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila. Genes & Dev.* **5**: 2153-2165.

Lorca, T., Labbe, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Capone, J.-P., Cavadore, J.-C. *et al.* (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J.* **11**: 2381-

Lu, K. e Hunter, T. (1995). Evidence for a NIM A-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell* **81**:413-424.

Luduena, R. (1993). Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol. Biol. Cell* **4**:445-457.

Lundgren,K., Walworth,N., Booher,B., Dembski,M., Kirschner,M. e Beach, D. (1991). *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell* **64**: 1111-1122.

Luo, X., Mookerjee, B., Ferrari, A., Mistry, S. e Atweh, G. (1994). Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells: cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* **269**:10312-10318.

MacRae, T. e Landgdon, C. (1989). Tubulin synthesis, structure, and function: what are the relationships ? *Biochem. Cell Biol.* **67**:770-790.

Mandelkow, E. and Mandelkow, E.M. (1995). Microtubules and microtubules-associated proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* **7**: 72-81.

Margolis, R. e Job, D. (1994). Microtubule stabilization. Em "Microtubules": Hyman, J. e Lloyd, C. (Eds), New York: Wiley-Liss Inc., pp221-227.

Marie-Cardine, A., Kirchgessner,H. Eckerskorn, C., Meuer, S. e Schraven, B. (1995). Human T lymphocyte activation induces tyrosine phosphorylation of alpha-tubulin and its association with the SH2 domain of the p59fyn protein tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* **25**:3290-3297.

Marklund, U., Brattsand, G., Shingler, V. e Gullberg, M. (1993). Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **268**:15039-15047.

Marklund, U., Osterman, O., Melander, H., Bergh, A. e Gullberg, M. (1994). The phenotype of a "cdc2 target site-deficient" mutant of oncoprotein 18 reveals a role of this protein kinase in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* **269**:30626-30635.

Marshall, C.J. (1994) Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature* **367**: 686.

Masuda, H., Sevik, M. e Candle, W. (1992). *In vitro* microrubule-nucleating activity of spindle pole bodies in fission yeast *S. pombe*: cell-cycle-dependent activation in *Xenopus cell free extracts.* J. Cell Biol. **117**: 1055-1066.

Masuda, H. e Shibata, T. (1996). Role of γ-tubulin in mitosis-specific microtubule nucleation from the *Schizosaccharomyces pombe* spindle pole body. *J. Cell Sci.* **109**:165-177.

Masui, Y. e Markert, C. (1971). Cytoplasmic control of of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177** : 129-146.

Mayer-Jaekel,R., Ohkura,H., Gomes,R., Sunkel,C., Baumgartner,S., Hemmings,B. e Glover,D. (1993). The 55kDa regulatory subunit of *Drosophila* protein phosphatase 2A is required for anaphase. *Cell* **72**: 621-633.

McDonald, H. e Goldstein,L. (1990). Identification and characterization of a gene encoding a kinesin-like protein in *Drosophila. Cell* **61**: 991-1000.

McGowan, C. e Russell, P. (1993). Human Weel kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on tyr15. *EMBO J.* **12**: 75-85.

McIntosh, J. (1991). Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **56**:613-619.

McIntosh, J. e Koonce, M. (1989). Mitosis. *Science* **246**: 622-628.

Millar, J., McGowan, C., Lenaers, G., Jones, R., and Russell, P. (1991). p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J.* **10:** 4301-4309.

Mitchison, T. e Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**: 237-242.

Miyazaki, W. e Orr-Weaver, T. (1994). Sister-cromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Ann. Rev. Gen.* **28**:167-187.

Moore, J. e Endow, S. (1996). Kinesin proteins: a phylum of motors for microtubule-based motility. *BioEssays* **18**: 207-219.

Moreno, S., Nurse,P. e Russell,P. (1990). Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* **344**: 549-552.

Moreno, S. e Nurse, P. (1991). Clues to the action of cdc25 protein. *Nature* **351**: 194.

Moritz, M., Braunfeld, M., Fung, J., Sedat, J., Alberts, B. e Agard, D. (1995). Three-dimentional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* **130**:1149-1159.

Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374:** 131-134.

Morgan, D. e De Bondt, H. (1994). *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** : 239-246.

Mueller, P., Coleman,T., Kumagai,A. e Dunphy,W. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.

Murray, A. e Kirshner, M. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**: 275-280.

Murthy, A.S.N. and Flavin, M. (1993) Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase. *Eur. J. Biochem. 137*: 37-46.

Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 166-179.

Nigg, E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Op. Cell Biol.* ***5***:187-193.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* **17**: 471-480.

Nishida, E. e Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci* **18**: 128-131.

Nislow, C., Lombillo, V., Kuriyama, R. & MacIntosh, J. (1992). A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules *in vitro* localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature* **359**:543-547.

Norbury, C., Blow, J. e Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO. J.* **11**: 3321-3329.

Norbury, C. e Nurse,P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 441-470.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* ***344***: 503-508.

Nurse, P., Thuriaux, P. e Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the division cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Molec. Gen. Genet.* **146** : 167-178.

Oakley,C. e Oakley,B. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by the *mipA* gene of *Aspergillus nidulans. Nature* **338**: 662-664.

O´Connell, M., Norbury, C. e Nurse, P. (1994). Premature chromatin condensation upon accumulation of NIM A. *EMBO J.* **13**:4926-4937.

Ohkura, H., Hagan, I. and Glover, D.M. (1995). The conserved *S. pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes & Dev.* **9**:1059-1073.

Ohta, K., Shiina, N., Okumura, E., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Endo, S., Gotoh, Y., Nishida, E. & Sakai, H. (1993). Microtubule nucleating activity of centrosomes in cell-free extracts from *Xenopus* eggs: involvement of phosphorylation and accumulation of pericentriolar material.

Pereira, A., Doshen, J., Tanaka,E. e Goldstein,L. (1992). Genetic analysis of a *Drosophila* microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* **116**: 377-383.

Philp, A., Axton,J., Saunders,R. e Glover,D. (1993). Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene *three rows* permit aspects of mitosis to continue in the absence of chromatid segregation.*J. Cell Sci.* **106**: 87-98.

Poon, R. e Hunter,R. (1995). Dephosphorylation of cdk2 thr-160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-93.

Price, C. e Pettijohn, D. (1986). Redistribution of the nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) during mitosis and nuclear assembly. *Exp. Cell Res.* **166**:295-311.

Pu, R. e Osmani, S. (1995). Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* is required for mitotic exit. *EMBO J.* **14**:995-1003.

Raff, E. (1994). The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. Em "Microtubules": Hyman, J. e Lloyd, C. (Eds), New York: Wiley-Liss Inc., pp221-227.

Raff, J., Kellogg, D. e Alberts, B. (1993). *Drosophila* gamma-tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *J. Cell Biol.* **121**:823-835.

Rao, P e Johnson, R. (1970). Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* **225**: 159-164.

Richardson, H., O'Keefe,L., Reed,S. e Saint,R. (1993). A *Drosophila* G1-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development* **119**: 673-690.

Rieder, C., Schultz, A., Cole, R. e Sluder,G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.* **127**, 1301-1310.

Ripoll, P., Pimpinelli, S., Valdivia, M. e Avila,J. (1985). A cell division mitant of *Drosophila* with a functionally anormal spindle. *Cell* **41**: 907-912.

Roberge, M. (1992). Checkpoint controls that couple mitosis to completion of DNA replication. *Trends Cell Biol.* **2**:277-281.

Rose, M., Biggins, S. e Satterwhite, L. (1993). Unravelling the tangled web at the microtubule-organizing center. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 105-115.

Rudiger, M. e Weber,K. (1993). Characterization of the post-translationl modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **218**:107-116.

Russell, P. e Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**: 145-153.

Russell, P. e Nurse, P. (1987a). The mitotic inducer *nim1+* functions in a regulatory network of protein kinase homologues. *Cell* **49**: 569-596.

Russell, P. e Nurse, P. (1987b). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homologue. *Cell* **49**: 559-567

Sadhu, K, Reed, S., Richardson, H. e Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5139-5149.

Saka.Y., e Yanagida, M. (1993). Fission yeast cut5+, required for S phase onset and M phase restraint is identical to the radiation damage repair gene rad4+. *Cell* **74** :383-393.

Salmon, E., McKeel, M. e Hays, T. (1984). Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle *in vivo* measured by bloking polymerization with colchicine. *J. Cell Biol.* **99**: 1066-1075.

Sambrook, J., Fritsch, E. e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. 2°edição, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sandoval, I.V. e Cuatrecasas, P. (1976) Protein kinase associated with tubulin: affinity chromatography and properties. *Biochemistry* **15**:3424-3432.

Sawin, K. e Endow,S. (1993). Meiosis, mitosis and microtubule motors. *BioEssays* **15**: 399-407.

Schiebel, E. e Boenens, M. (1995). In search of centrins. *Trends Cell Biol.* **5**: 197-201.

Schild, D. e Byers, B. (1980). Diploid spore formation and other meiotic effects of two cell-division-cycle mutations of *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* **96**: 859-876.

Serrano, L., Diaz-Nido, J., Wandosell, F. and Avila, J. (1987). Tubulin phosphorylation by casein kinase II is similar to that found in vivo. *J. Cell Biol.* **105**, 1731-1739.

Serrano,L., Hernadez, M.A., Diaz-Nido, J. and Avila,J. (1989). Association of casein kinase II with microtubules. *Exp. Cell Res.* **181**, 263-272.

Shamanski, F. e Orr-Weaver, T. (1991). The Drosophila *plutonium* and *pan gu* genes regulate entry into S-phase at fertilization. *Cell* **66**: 1289-1300.

Shamu, C. e Murray, A. (1992). Sister chromatin separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J. Cell Biol.* **117**:921-934.

Shaw, G. e Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**:659-667.

Sherr,C. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.

Sherr,C. (1995). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**: 551-555.

Shiina, N., Moriguchi, T., Ohta, K., Gotoh, Y. and Nishida, F. (1992). Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *EMBO J.* **11**:3977-3984.

Shu,H-B., Li,Z. Palacios,M. Li,Q. e Joshi,H. (1995). A transient association of g-tubulin at the midbody is required for the completion of cytokinesis during the mammalian cell division. *J. Cell Sci.* **108**, 2955-2962.

Shuttleworth, J., Godfrey, R. e Colman, A. (1990). $p40^{MO15}$, a cdc2-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **9**: 3233-3240.

Sigrist,S., Jacobs, H., Stratmann, R. e Lehner, C. (1995). Exit from mitosis is regulated by *Drosophila fizzy* and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *EMBO J.* **14**:4827-4838.

Simmons, D., Neel, B., Stevens, R., Evett, G. and Erikson, R. (1992). Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. Mol. Cell. Biol. *12*, 4164-4169.

Smythe, C. e Newport, J. (1992). Coupling of mitosis to the completion of S-phase in *Xenopus* occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2. *Cell* **68**: 787-797.

Sobel, S. e Snyder, M. (1995). A higly divergent γ-tubulina gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol.* **131**: 1775-1788.

Solomon,M. (1993). Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:180-186.

Solomon, M., Lee, T. e Kirschner, M. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell* **3**: 13-27.

Sparks, C., Fey, E., Vidair, C. e Doxey, S. (1995). Phosphorylation of NuMA occurs during nuclear breakdown and not mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* **108**:3389-3396.

Stern, B., Ried, G., Clegg, N., Grigliatti, T. e Lehner,C. (1992). Genetic analysis of the *Drosophila* cdc2 homologue. *Development* **117**: 219-232.

Stearns, T. e Kirschner, M. (1994). *In vitro* reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of γ-tubulin. *Cell* **76**: 623-637.

Stone,E., Yamano,H., Kinoshita,N. e Yanagida,M. (1993). Mitotic regulation of protein phosphatases by the fission yeast sds22 protein. *Curr. Biol.* **3**:13-26.

Stratmann, R. e Lehner, C. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the Drosophila *pimples* product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* **84**:25-35.

Sudakin,V., Ganoth,D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F., Ruderman, J. e Hershko, A. (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6**:185-198

Sunkel, C. and Glover, D. (1988). *polo*, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* **89**: 25-38.

Surana,U., Amon,A., Dowzer,C., McGrew,J., Byers,B. e Nasmyth,K. (1993). Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* **12**: 1969-1978.

Taagepera, S., Dent, P., Her, J'H., Sturgill, T. e Gorbsky, G. (1994). The MPM-2 antibody inhibits mitogen-activated protein kinase activity by binding to an epitope containing phosphothreonine-183. *Mol. Biol. Cell* **5**:1243-1251.

Taagepera, S., Rao, P., Drake, F. e Gorbsky, G. (1993). DNA topoisomerase Iia is the major chromosome protein recognized by mitotic phsphoprotein antibody MPM-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8407-8411.

Tavares, Á. (1991). Estrutura molecular do gene *polo* em *Drosophila melanogaster*. Tese de Mestrado, Univeridade Nova de Lisboa.

Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W., e Hieter, P. (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* **81**:261-268.

van den Heuvel,S. e Harlow,E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in the cell cycle control. Science **262**: 2050-2054.

Van der Geer, P., Luo, K., Sefton, B. and Hunter, T. (1993) in Protein Phosphorylation - a pratical approach, Editor G. Hardie, IRL press, pp61-84.

Vandré, D., Davis, F., Rao, P. e Borisy, G. (1984). Phosphoproteins are components of microtubule organizing centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4439-4443.

Vandre, D. e Borisy, G. (1989). Anaphase onset and dephosphorylation of mitotic phosphoproteins occur concomitantly. *J. Cell Sci.* **94**: 245-258.

Vandre, D., Davis, F., Rao, P. e Borisy, G. (1984). Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4439-4443.

Vandré,D. e Willis,V. (1992). Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *J. Cell Sci.* **101**:79-91.

Vasquez, R.J., Gard, D.L. and Casimeris, L. (1994). XMAP from Xenopus eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.* **127**:985-993.

Verde,F., Dogterm,M., Stelzer,E., Karsenti,E. e Leibler,S. (1992). Control of microtubule dynamics and lenght by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* **118**:1097-1108.

Verlhac, M., Kubiak, J., Clarke, H. e Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF during meiosis in mouse oocytes. *Development* **120**:1017-1022.

Vernos, I, Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E. e Wyllie, C. (1995). Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosomal positioning. *Cell* **81**: 117-127.

Walczak, C. e Mitchison, T. (1996). Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation. *Cell* **85**: 943-946.

Walczak,C., Mitchison, T. e Desai, A. (1996). Xkcm1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* **84**: 37-47.

Wandosell, F., Serrano, L., Hernandez, M. and Avila, J. (1986) Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **261**:10332-10339.

Wandosell, F., Serrano, L. e Avila, J. (1987). Phosphorylation of a-tubulin carboxyl-terminal tyrosine prevents its incorporation into microtubules. *J. Biol. Chem.* **262**:8268-8273.

Waters, J., Cole, R. e Rieder, C. (1993). The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster. *J. Cell Biol.* **122**: 361-372.

Weinert,T., Kiser,G. e Hartwell,L. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes & Dev.* **8**: 652-665.

White-Cooper, H. (1994). Drosophila cell cycle mutants, and their interactions. Tese de doutoramento. Universidade de Dundee. Escócia.

Williams, B., Karr, T., Montgomery, J. e Goldberg, M. (1992). The Drosophila *L(L)zw10* gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *J. Cell Biol.* **118**: 759-773.

Williams, B., Riedy, M., Williams, E., Gatti, M e Goldberg, M. (1995). The *Drosophila* kinesin-like protein KLP3a is a midbody component required for central spindle assembly and initiation of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **129**: 709-723.

Wood, J.S. and Hartwell, L.H. (1982). A dependent pathway of gene functions leading to chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Biol.* **94**:718-726.

Worderman, L. e Mitchison, T. (1994). Dynamics of microtubule assembly. Em "Microtubules": Hyman, J. e Lloyd, C. (Eds), New York: Wiley-Liss Inc., pp221-227.

Yang,C. e Snyder,M. (1992). The Nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1259-1267.

Ye, X., Xu, G., Pu, R., Fincher, R., McGuire, S., Osmani, A., Osmani, S. (1995) The NIMA protein kinase is hyperphosphorylated and activated downstream of p34cdc2/cyclin B: coordination of two mitosis promoting kinases. *EMBO J.* **14**:986-994.

Yen, T., Compton, D., Wise, D., Zinkowski, R., Brinkley, Earnshaw, W. e Cleveland, D. (1991). CENP-E, a human centromere associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J.* **10**:1245-1254.

Yen, T., Li, G., Schaar, B., Szilak, I. e Cleveland, D. (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that acumulates just before mitosis. *Nature* **359**:536-539.

Zheng, Y., Wong, M., Alberts, B. e Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ-tubulin containing ring complex. *Nature* **378**: 578-583.

Zhou,R., Oskarsson, M., Paules, R., Schulz, N. Cleveland, D. e Woude, G. (1991). Ability of the *c-mos* product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science* **251**:671-675.

Zhu,X., Mancini,M., Chang,K-H., Liu, C., Chen,C., Shan, B., Jones, D., Yang-Feng,T., e Lee, H. (1995). Characterization of a novel 350'kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5017-5029.

oferta 97 11 19
3.000$00

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS