

Catarina Lúcia de Almeida Rodrigues Lemos

**Caracterização fenotípica e molecular  
do mutante *mast* (v40):  
um gene envolvido na divisão celular**

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Porto, 2004

Catarina Lúcia de Almeida Rodrigues Lemos

**Caracterização fenotípica e molecular  
do mutante *mast (v40)*: um gene  
envolvido na divisão celular**



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Porto, 2004

Catarina Lídia de Almeida Rodrigues Lemos

**Caracterização fenotípica e molecular  
do mutante *mast (v40)*: um gene  
envolvido na divisão celular**

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em  
Ciências Biomédicas, submetida ao Instituto de  
Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Orientador: Professor Doutor Claudio Enrique Sunkel

**Este trabalho foi financiado pela  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia**

## Declaração

De acordo com o disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados das publicações abaixo indicadas. No cumprimento do disposto no referido Decreto-Lei, a autora desta dissertação declara que interveio na concepção e na execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados ou em preparação, sob o nome de Lemos, C. L.

Lemos, C. L.; Sampaio, P.; Maiato, H.; Costa, M.; Omel'yanchuk, L. V.; Liberal, V. e Sunkel, C. (2000). Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organisation. *EMBO J.* **19**: 3668-3682.

Maiato, H.; Sampaio, P.; Lemos, C. L.; Findlay, J.; Carmena, M.; Earnshaw, W. C. e Sunkel, C. E. (2002). Mast/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J. Cell Biol.* **157**: 749-760.

Gouveia, S.; Reis, R.; Lemos, C. L.; Sampaio, P. e Sunkel, C. E. (2005). Characterization of the microtubule binding ability of the GTPase MAST/Orbit. (Em preparação).

**Aos meus avós,  
com profunda saudade**

## Agradecimentos

O trabalho aqui apresentado é fruto de um longo percurso, de muita dedicação e persistência. Valeu a pena. Sozinha não o conseguiria nunca, pelo que desejo manifestar o meu mais vivo reconhecimento a todos quantos contribuíram para a sua realização.

Ao Professor Doutor Claudio Sunkel, pela oportunidade de trabalhar sob a sua orientação e pela confiança em mim depositada. Pelo entusiasmo e gosto pela Ciência que sempre me transmitiu, bem como pelo incentivo constante.

A todos os professores que, ao longo do meu percurso académico, me incutiram o espírito científico e estimularam o gosto pela investigação.

Ao Helder Maiato e à Paula Sampaio, pela importante colaboração neste projecto e pelas discussões construtivas.

Ao Hassan Bousbaa, por me ter ajudado a dar os primeiros passos no trabalho laboratorial. Pela paciência. Pelo sentido de humor e amizade.

À Elsa Logarinho, Madalena Costa e Isabel Amorim, pela amizade, apoio e encorajamento.

À Joana Branco e Joana Machado, pelo equilíbrio e confiança que me transmitiram. À Carla Lopes, Paula Coelho e Tatiana Moutinho, pelo espírito crítico, pela boa companhia nos *overnights* e pela disponibilidade. À Elsa Bronze, Daniel Perez, Pedro Pinto e Siegrun Herrmann, pelos bons momentos de convívio.

À Susana Gouveia, pelo prazer que foi orientá-la e por me conseguir ler nas entrelinhas.

A todos os colegas do laboratório, pelas críticas pertinentes, boas sugestões e agradável companhia ao longo destes anos.

À D. Adelaide Santos, D. Maria João e D. Teresa, pela boa disposição e apoio técnico.

À Helena Baptista, pela ajuda e encorajamento.

Às minhas amigas, Ana Margarida, Dália, Luísa, Madalena, Olides, Paula, Teresa e Vera, pela amizade, pela partilha, pelos risos e lágrimas...

Ao Raul, pelos bons momentos e por, apesar de tudo, me ter ajudado a acreditar em mim.

Aos meus irmãos, pela entreaajuda e cumplicidade.

A minha imensa gratidão aos meus pais, por todo o apoio e pelo amor incondicional.

Ao Francisco, pelo seu sorriso e por, simplesmente, existir.



# Índice

<b>Sumário</b>	i
<b>Abstract</b>	iii
<b>Résumé</b>	v
<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
1. O ciclo celular	3
1.1. A mitose	5
1.2. Regulação do ciclo celular	7
1.3. Controlo do ciclo celular	10
1.3.1 <i>Spindle-assembly checkpoint</i>	11
2. O aparelho mitótico	13
2.1. Os microtúbulos	15
2.1.1. A dinâmica dos microtúbulos e o ciclo celular	19
2.2. O centrossoma	19
2.2.1. Ciclo centrossomal	23
2.2.2. Papel dos centrossomas no ciclo celular	26
2.2.3. Os centrossomas e o cancro	28
2.3. O cinetocoro	29
2.3.1. Função dos cinetocoros	32
2.4. Matriz do fuso	32
2.5. Proteínas reguladoras dos microtúbulos	32
2.5.1. Motores dependentes dos microtúbulos	33
2.5.2. Factores desestabilizadores dos microtúbulos	34
2.5.3. MAPs	35
2.5.4. Proteínas que se ligam às extremidades (+) dos microtúbulos	37
2.6. Formação do fuso mitótico	39
2.7. Movimento dos cromátídeos em metafase e anafase	41
3. Objectivos deste trabalho	42
<b>II. Resultados</b>	<b>45</b>
1. O mutante <i>v40 (mast<sup>P1</sup>)</i>	47
1.1. Caracterização do fenótipo do mutante <i>v40 (mast<sup>P1</sup>)</i>	47
1.2. Localização citológica do gene afectado	49
1.3. Análise genética da mutação <i>mast<sup>P1</sup></i>	49
1.4. Os mutantes <i>mast<sup>P2</sup></i> e <i>mast<sup>P3</sup></i>	51

2. A proteína Mast	52
2.1. Identificação do gene <i>mast</i>	52
2.2. Caracterização do cDNA LD11488	54
2.3. A proteína Mast	56
2.4. Análise computacional da sequência proteica da Mast	56
2.4.1. Domínios e motivos	56
2.4.2. Modificações pós-traducionais	60
a) FOSFORILAÇÃO	60
b) GLICOSILAÇÃO	62
c) OUTRAS MODIFICAÇÕES	63
2.4.3. Localização subcelular	64
2.4.4. Estrutura secundária	64
2.4.5. Estrutura terciária	66
2.4.6. Homologias	66
3. Caracterização da Mast	70
3.1. Produção de anticorpos anti-Mast	70
3.2. Expressão da Mast ao longo do desenvolvimento	72
3.3. Expressão da Mast nos diferentes alelos	73
3.4. Imunolocalização da Mast ao longo do ciclo celular	74
3.4.1. Em células S2	74
3.4.2. Em neuroblastos	76
a) FIXAÇÃO COM FORMALDEÍDO	76
b) FIXAÇÃO COM METANOL	76
3.4.3. Após tratamento com colchicina	80
a) EM CÉLULAS S2	80
b) EM CROMOSSOMAS ISOLADOS	80
3.5. A Mast é uma MAP	82
4. Mobilização do elemento P	83
4.1. O alelo <i>mast</i> <sup>P4</sup>	83
4.1.1. Caracterização	83
4.1.2. Fenótipo	84
4.2. O alelo <i>mast</i> <sup>P5</sup>	85
4.2.1. Caracterização	85
4.2.2. Fenótipo	85
4.2.2.1. Visualização <i>in vivo</i> da GFP-Polo em embriões <i>mast</i> <sup>P5</sup>	85
5. Transfecção de células	88
5.1. Construção dos vectores EGFP-Mast	88
5.2. Transfecção em S2 e em HeLa	88
5.3. Outros construtos	92
5.3.1. EGFP-Mast <sub>Δ320-1354</sub>	93
5.3.2. EGFP-Mast <sub>1-445</sub>	93

5.3.3. EGFP- Mast <sub>1-922</sub>	94
5.3.4. EGFP- Mast <sub>446-1491</sub>	94
5.3.5. EGFP- Mast <sub>930-1491</sub>	96
5.3.6. EGFP- Mast <sub>Δ652-733</sub>	97
5.3.7. EGFP- Mast <sub>446-872</sub>	97
5.3.8. EGFP- Mast <sub>234-886</sub>	98
5.4. Delimitação dos domínios de localização da Mast	98
6. Visualização da EGFP- Mast <i>in vivo</i>	101
6.1. O elemento de transposição pP{UASp} <i>egfp-mast</i>	101
6.2. Produção de linhas transgênicas <i>egfp-mast</i>	101
6.3. Expressão da EGFP-Mast	101
6.3.1. Expressão em neuroblastos	103
6.3.2. Expressão em embriões	104
<b>III. Discussão</b>	109
1. Mutações no gene <i>mast</i> causam defeitos na segregação cromossômica	111
2. A Mast é essencial para a manutenção da bipolaridade do fuso mitótico	113
3. O <i>locus mast</i>	115
4. Análise computacional da sequência nucleotídica da Mast	115
5. A Mast pertence a uma família conservada de proteínas	116
6. A Mast localiza-se em vários compartimentos do aparelho mitótico	117
7. A Mast localiza-se nos centrossomas e centrômeros na ausência de microtúbulos	117
8. A Mast é uma MAP	118
9. Delimitação dos domínios de localização da Mast	118
10. A Mast parece estabilizar os microtúbulos	120
11. A Mast acompanha o crescimento dos microtúbulos na extremidade (+)	121
12. Conclusão	122
<b>IV. Materiais e Métodos</b>	123
1. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> e condições de cultura	125
1.1. Estirpes de <i>Drosophila</i> utilizadas	125
1.2. Genótipo dos balaceadores de <i>Drosophila</i> utilizados	125
1.3. Condições de cultura	125
2. Estirpes Bacterianas	126
3. Vectores	126
3.1. O pBluescript II SK e KS (+)	126
3.2. O Lambda DASH	127
3.3. O Uni-ZAP XR	127

3.4. O pET-23	127
3.5. O pQE-32	128
3.6. O pMT/EGFP-C1	129
3.7. O pEGFP-C1	129
3.8. O P{1ArB}	130
3.9. O P{EP}	130
3.10. O pP{UASp}	130
4. Oligonucleotídeos utilizados	131
5. Anticorpos utilizados	131
6. Análise citológica dos mutantes	132
7. Hibridação <i>in situ</i> em cromossomas politénicos de <i>Drosophila</i>	133
8. Obtenção de DNA plasmídico	134
8.1. Preparação de células competentes	134
8.2. Transformação de células competentes	134
8.3. Preparação de DNA plasmídico	135
8.3.1. <i>Boiling Method</i>	135
9. Digestões enzimáticas	135
10. PCR ( <i>polimerase chain reaction</i> , reacção em cadeia da polimerase)	136
11. Subclonagens	136
11.1. Reparação do DNA criando extremidades <i>blunt</i>	136
11.2. Preenchimento das extremidades dos produtos de PCR	137
12. Sequenciação de DNA	137
12.1. Electroforese em gel de poliacrilamida	137
13. Rastreios de bibliotecas de DNA genómico e de cDNA	138
14. Identificação do <i>locus mast</i>	138
15. Análise computacional da sequência da Mast	139
16. Produção de anticorpos policlonais anti-Mast	140
16.1. Produção do anticorpo CH-R1	140
16.2. Produção dos anticorpos Rb726 e Rb727	140
16.3. Purificação do Rb726 em coluna de proteína A	140
17. Preparação de extractos proteicos de <i>D. melanogaster</i>	141
18. Quantificação de proteínas pelo método dos padrões de BSA	141
19. <i>Western blot</i>	142
20. Imunofluorescência em células S2	142
21. Imunofluorescência em <i>squashes</i> de neuroblastos	143
21.1. Fixação com formaldeído	143
21.2. Fixação com metanol	143
22. Ensaio de ligação aos microtúbulos	144
23. Mobilização do elemento P	145
24. Preparação de DNA genómico de moscas adultas	146
24.1. Método convencional	146

24.2. Método a partir de uma só mosca	146
25. <i>Southern blot</i> e <i>colony screening</i>	147
25.1. Transferência alcalina de DNA para membrana de nylon ( <i>Southern blot</i> )	147
25.2. <i>Colony screening</i>	147
25.3. Hibridação de DNA por métodos radioactivos	148
25.3.1. Preparação da sonda radioactiva	148
25.3.2. Hibridação e lavagens	148
25.4. Hibridação de DNA por métodos não-radioactivos	149
26. Obtenção da estirpe <i>gfp-polo; mast<sup>P5</sup></i>	149
27. Estudo da localização da EGFP-Mast e das suas variantes em células S2 e HeLa	149
27.1. Subclonagens efectuadas nos vectores de transfecção	149
27.1.1. Subclonagem do cDNA <i>mast</i> no pMT/EGFP-C1	149
27.1.2. Subclonagem do cDNA <i>mast</i> no pEGFP-C1	150
27.1.3. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{\Delta 320-1354}$	150
27.1.4. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{1-445}$	150
27.1.5. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{1-922}$	150
27.1.6. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{446-1491}$	150
27.1.7. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{930-1491}$	150
27.1.8. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{\Delta 652-733}$	151
27.1.9. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{446-872}$	151
27.1.10. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast $_{234-866}$	151
27.2. Transfecção de células em cultura	151
28. Visualização da GFP-Mast em embriões e neuroblastos <i>in vivo</i>	152
28.1. Construção do elemento de transposição pP{UASp}/ <i>egfp-mast</i>	152
28.2. Produção de linhas transgénicas <i>egfp-mast</i>	152
28.3. Cruzamentos com estirpes GAL4	153
28.4. Preparação de embriões e neuroblastos para observação <i>in vivo</i>	153

## V. Referências Bibliográficas 155

## VI. Abreviaturas 179

## Sumário

Erros na segregação cromossômica podem conduzir à formação de células aneuplóides, uma das causas principais para o desenvolvimento de um cancro. Para que esta etapa do ciclo celular ocorra devidamente, é necessária a formação de um fuso mitótico bipolar e a sua adequada ligação aos cinetocoros, de modo a que o material genético seja dividido equitativamente por ambas as células filhas. Nestes mecanismos, estão envolvidos os componentes do aparelho mitótico, entre os quais os microtúbulos e as proteínas a eles associadas.

Neste trabalho foi estudado um mutante de *Drosophila melanogaster* com alterações mitóticas como fusos monopolares, fusos desorganizados, aneuploidia e poliploidia. O gene mutado, denominado *mast*, foi identificado e a proteína por ele codificada verificou-se pertencer a uma família altamente conservada nos eucariotas. A produção de um anticorpo policlonal permitiu analisar a expressão e localização intracelular da Mast em *Drosophila*. Observou-se que a Mast está presente durante todas as fases do desenvolvimento e que, a nível intracelular, se associa aos centrossomas, fuso mitótico, centrómero, zona média do fuso, corpo médio do fuso e microtúbulos interfásicos. Determinou-se que a Mast é uma Proteína Associada aos Microtúbulos (MAP), sendo, no entanto, a sua acumulação nos centrossomas e centrómeros independente da presença de microtúbulos.

A transfecção de um plasmídeo contendo o cDNA *mast* fundido com o da EGFP permitiu visualizar a expressão da proteína quimérica em células S2, de *Drosophila*, e HeLa, humanas, comprovando o padrão de localização previamente observado por imunofluorescência e sugerindo uma conservação funcional da proteína. Foram também construídas várias versões da EGFP-Mast truncadas, de maneira a delimitar os domínios responsáveis pela localização da Mast nas diferentes estruturas celulares. Finalmente, utilizando ainda uma quimera *egfp-mast*, foram produzidas estirpes transgênicas de *Drosophila*, que possibilitaram a observação da proteína expressa *in vivo*.

Com base neste estudo, pode-se inferir que a Mast exerce importantes funções mitóticas, como na manutenção da bipolaridade do fuso e na congregação cromossômica, provavelmente devidas a um papel na estabilização dos microtúbulos.

---

## Abstract

Abnormal chromosome segregation can lead to the development of aneuploid cells, one of the major causes in cancer development. The successful accomplishment of this stage of the cell cycle requires the formation of a bipolar spindle and its appropriate association to the kinetochores, so that an equal segregation of the genomic material between daughter cells can occur. The components of the mitotic apparatus are involved in these mechanisms, namely microtubules and its associated proteins.

This study reports the characterisation of a *Drosophila melanogaster* mutant, which exhibits a mitotic phenotype including monopolar spindles, disorganised bipolar spindles, aneuploidy and polyploidy. The mutated gene, named *mast*, was identified and the coded protein was shown to belong to a highly conserved protein family in eukaryotes. A polyclonal antibody was generated, which allowed the analysis of Mast expression and intracellular localisation in *Drosophila*. Mast was found to be present throughout all the stages of development and to be associated to centrosomes, mitotic spindle, centromeres, spindle midzone, midbody and interphasic microtubules. Mast was also shown to be a Microtubule Associated Protein (MAP), even though its accumulation to centrosomes and centromeres is microtubule-independent.

A *gfp-mast* chimera was constructed and used to transfect both *Drosophila* S2 and mammalian HeLa cells. This chimera was also used in the generation of *Drosophila* transgenic strains. These studies supported the localization pattern previously observed by immunostaining and allowed the observation of Mast expression *in vivo*. Furthermore, Mast appears to be functionally conserved. Truncated GFP-Mast chimeras were additionally constructed in order to identify the domains responsible for Mast localisation to distinct intracellular structures.

Based on this investigation, a new microtubule-associated protein was found which is required for the maintenance of spindle bipolarity as well as for chromosome congression, probably due to a role in microtubule stabilisation.



## Résumé

Des erreurs dans la ségrégation chromosomique peuvent conduire à la formation de cellules aneuploïdes, une des causes principales du développement du cancer. Pour que cette étape du cycle cellulaire se déroule correctement, garantissant une ségrégation équitable du matériel génétique entre les deux cellules filles, il faut la formation d'un fuseau mitotique bipolaire et l'attachement parfait de ce dernier aux kinétochores. Dans ces processus, sont engagés les éléments de l'appareil mitotique, dont les microtubules et les protéines qui leur sont associées.

Dans ce travail on a étudié un mutant de *Drosophila melanogaster* présentant des altérations mitotiques tels que des fuseaux monopolaires ou désorganisés, aneuploïdie et polyploïdie. Le gène affecté, appelé *mast*, a été identifié et on a vérifié que la protéine codée appartient à une famille très conservée parmi les eucaryotes. La production d'un anticorps polyclonal a permis de caractériser l'expression et la localisation intracellulaire de Mast chez *Drosophila*. Ainsi, on a observé l'expression de Mast au niveau de tous les stades du développement et, au niveau intracellulaire, son association aux centrosomes, au fuseau mitotique, au centromère, à la zone médiane du fuseau, au corps médian du fuseau et aux microtubules interphasiques. On a aussi déterminé que Mast est une Protéine Associée aux Microtubules (MAP), mais que son accumulation dans les centrosomes et dans les centromères est indépendante de la présence des microtubules.

Par transfection d'une séquence hybride de cDNA de Mast et de EGFP, il a été possible de visualiser l'expression de la protéine chimérique dans les cellules S2, de *Drosophila*, et HeLa, humaines, confirmant la distribution intracellulaire de Mast et suggérant une conservation fonctionnelle. En outre, la construction de protéines de fusion EGFP-Mast tronquées a permis de délimiter les domaines de la protéine responsables de la localisation de Mast dans les différentes structures cellulaires. Finalement, en utilisant aussi la chimère *gfp-mast*, on a produit des

lignées transgéniques de *Drosophila*, ce qui a permis l'étude de l'expression de la protéine *in vivo*.

Avec cette investigation, on peut inférer que la protéine Mast joue d'importants rôles durant la mitose, tels que la manutention de la bipolarité du fuseau et la congrégation chromosomique, probablement dues à une fonction dans la stabilisation des microtubules.

## **I. Introdução**

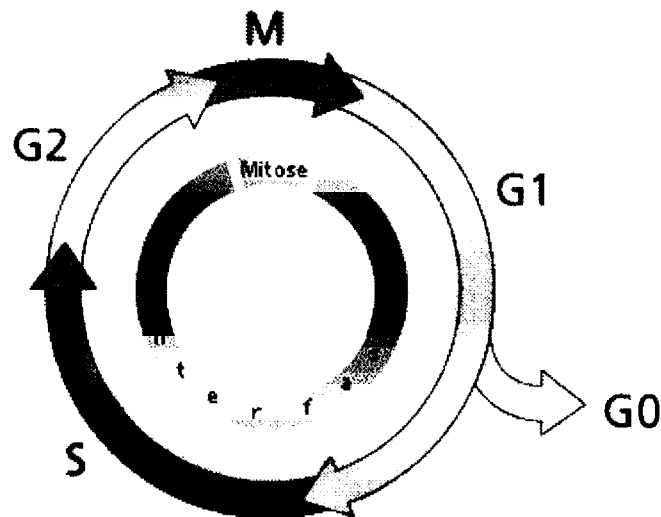
Robert Hook, no seu livro *Micrographia* (1665), utilizou pela primeira vez o termo célula, do latim *cella*, para descrever a estrutura da cortiça observada ao microscópio óptico. Mas foi só em 1838 que Theodor Schwann e Matthias Schleiden formularam oficialmente a chamada teoria da célula, que postula que todos os organismos são constituídos por células. Um pouco mais tarde (1850), Barthelemy Dumortier, Albert Kölliker, Robert Remak e Rudolf Virchow mostraram que as células são formadas a partir de células preexistentes, através de um processo de fissão binária e, em 1858, Rudolf Virchow, no seu livro *Cellularpathologie*, promoveu esta ideia através da sua célebre frase "*Omnis cellula est cellula*", isto é, todas as células provêm de células (para revisão, consultar Mazzarello, 1999; Nurse, 2000a; Nurse, 2000b). A partir desta altura, o ciclo celular começou a ser uma das áreas de estudo mais importantes da biologia celular.

## 1. O ciclo celular

O ciclo celular é o processo universal pelo qual as células se reproduzem. Constitui a base do crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos e assegura a continuidade da vida. Permite a transmissão da informação genética das células parentais para as células filhas e, em última análise, de geração em geração. Os seus mecanismos moleculares estão altamente conservados em todos os eucariotas (Nurse, 2000a), sendo possível utilizar diversos modelos para o seu estudo. A precisão com que os mecanismos do ciclo celular são executados, ordenados e regulados assegura a sobrevivência dos seres vivos, enquanto as falhas nesta precisão aumentam a instabilidade genómica, um factor muito importante na formação do cancro.

Nas células somáticas dos eucariotas, o ciclo celular é complexo e, geralmente, pode dividir-se morfologicamente em duas fases distintas, a mitose e a interfase (Fig. 1 e 2). A duração relativa de cada uma das etapas é variável, dependendo do organismo, do seu estágio de desenvolvimento e do tipo de células em questão. A mitose, ou fase M, é a fase mais dramática do ciclo celular, consistindo na segregação equitativa dos cromossomas, previamente replicados, por núcleos distintos (divisão nuclear ou cariocinese) e geralmente culminando com a divisão celular, ou citocinese, que consiste na cisão do citoplasma pelas células filhas. Durante a interfase, que ocupa a maior parte do ciclo, os cromossomas estão descondensados e distribuídos por todo o núcleo, tendo este uma aparência morfológica uniforme. Todavia, a replicação do DNA ocorre durante uma etapa da interfase, chamada fase S, dividindo a interfase em três fases importantes do ciclo celular: G1, S e G2 (Fig. 1).

Durante a fase G1, o intervalo entre a conclusão da mitose e o início da síntese de DNA, a célula tem uma actividade metabólica intensa, produzindo ribossomas, proteínas e organelos. Nesta etapa, a célula monitoriza o seu meio ambiente e o seu tamanho e, de acordo com isso, inicia a replicação do DNA e prossegue o ciclo celular ou sai do ciclo e entra num estado de quiescência, denominado de fase G0 (Fig. 1). Esta etapa ocorre em células privadas de nutrientes ou que estão num estado final de desenvolvimento e diferenciação, permanecendo metabolicamente activas sem, no entanto, proliferar. As células em G0 podem manter-se em repouso indefinidamente ou até receber sinais extracelulares apropriados que as estimulem a regressar a G1 e ao ciclo celular. Na fase S ocorre a replicação semi-conservativa do DNA e do centrossoma e a célula, no final desta etapa, possui duas cópias idênticas de ambos. Durante a fase G2, o período entre a finalização da duplicação do DNA e o começo da mitose, o crescimento celular continua e são sintetizadas proteínas essenciais para a mitose. Este também é um período de espera que assegura a conclusão da replicação do DNA antes da entrada na fase M.

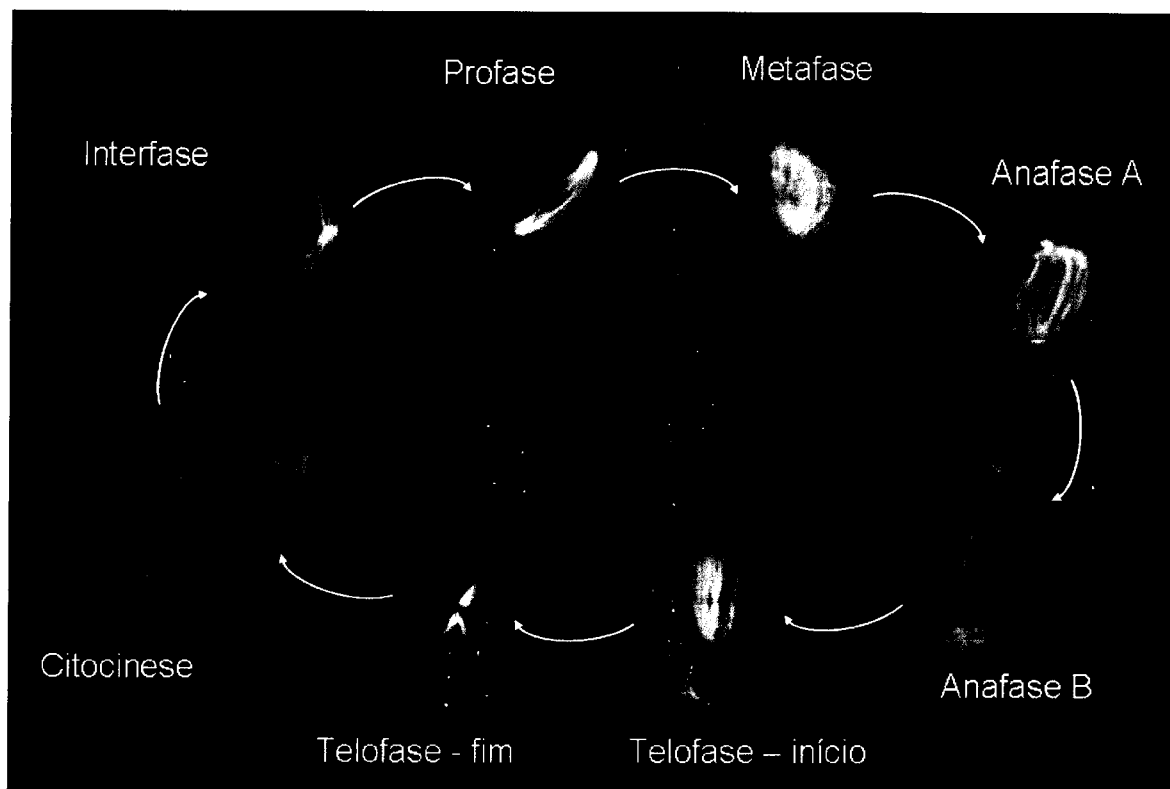


**Figura 1.** Esquema representativo das diferentes etapas do ciclo celular. (Adaptado de Purves et al., 1998).

### 1.1. A mitose

A mitose começou a ser descrita em 1842 por Carl Nägeli, que, inicialmente, pensou tratar-se de um evento anómalo. Walther Flemming, em 1882, no seu livro *Zell-substanz, Kern und Zelltheilung* (Substância Celular, Núcleo e Divisão Celular), introduziu pela primeira vez o termo mitose, do grego *mitos* (filamento), referindo-se à forma condensada dos cromossomas mitóticos. Flemming foi também o primeiro a descrever detalhadamente os movimentos cromossomais durante esta etapa do ciclo celular.

O objectivo da mitose, ou fase M, é a separação fidedigna do material genético e a distribuição dos organelos pelas duas células filhas. Uma adequada segregação cromossómica é essencial para assegurar a estabilidade genómica, uma vez que a aneuploidia resultante de erros neste processo contribui para o desenvolvimento do cancro. A extraordinária eficácia da mitose requer a utilização de uma maquinaria complexa e a ordenação precisa de todas as etapas, que, salvaguardando pequenas variações, são bastante similares em todos os eucariotas.



**Figura 2.** O ciclo celular em células de cultura de *Drosophila S2*. As imagens foram obtidas utilizando a técnica de imunofluorescência. O DNA está representado a azul e os microtúbulos a verde.

A fase M, cujas várias etapas se podem visualizar na Figura 2, inicia-se com a profase, durante a qual, nas células animais, os centrossomas previamente duplicados migram para locais opostos da célula, iniciando a formação do fuso mitótico. A cromatina começa a condensar até formar estruturas bem definidas, os cromossomas, compostos por dois cromatídeos irmãos geneticamente idênticos, adjacentes pelo centrómero e outros pontos ao longo do seu comprimento. Estes adoptam uma posição no núcleo cada vez mais periférica, que culmina, nos eucariotas superiores, na desagregação do invólucro nuclear aquando do início da prometáfase. Nesta altura, os cromossomas ficam livres no citoplasma, permitindo que os microtúbulos do fuso os capturem, através da sua ligação aos cinetocoros, formando o fuso bipolar mitótico. Após a captura de cada um dos cinetocoros irmãos por microtúbulos de pólos opostos ocorre, em metafase, a congregação dos cromossomas no plano equatorial, ou placa metafásica. No

início da anafase, denominado de anafase A, perde-se a coesão entre os cromátídeos irmãos, permitindo a sua separação e segregação sincronizada em direcção aos pólos opostos do fuso. No fim da anafase, ou anafase B, os microtúbulos interpolares sobrepostos deslizam sobre si próprios, alongando o fuso e aumentando a distância entre os pólos. Nas células animais, inicia-se a contracção do anel contráctil de actina e miosina, principiando a formação do sulco de clivagem. Com a chegada dos cromossomas aos pólos do fuso inicia-se a telofase. Nesta fase, a maior parte do fuso mitótico desorganiza-se, ficando só a zona central, os cromátídeos segregados começam a descondensar e o invólucro nuclear reconstitui-se em volta de cada conjunto de cromossomas, formando dois núcleos. O sulco de clivagem contrai-se mais sobre a zona central do fuso, dando origem ao corpo médio do fuso (*midbody*), uma estrutura formada por microtúbulos em feixe. No final ocorre a citocinese, na qual se dá a constricção completa do sulco de clivagem, a divisão do citoplasma e a separação das células filhas.

## **1.2. Regulação do ciclo celular**

O ciclo celular é altamente regulado a nível temporal e espacial, condição crucial para a obtenção de células filhas viáveis e para o desenvolvimento normal de organismos multicelulares. Relativamente à regulação temporal, é necessário que a célula progrida correctamente no ciclo celular, ou seja, tem que assegurar que os seus eventos, como a replicação do DNA, a formação do fuso mitótico, a divisão nuclear e a citocinese, ocorram numa sequência ordenada. Esta coordenação do ciclo celular é conseguida através da síntese e destruição de reguladores específicos do ciclo celular nas alturas apropriadas. Em termos espaciais, a célula coordena reorganizações dramáticas na arquitectura subcelular na entrada e saída da mitose, frequentemente através da actividade de cinases e fosfatases localizadas em estruturas celulares específicas (para revisão, consultar Pines, 1999). Existem ainda evidências que sugerem que a



organização espacial dos reguladores do ciclo celular é importante no controlo temporal do ciclo celular (revisto em Pines, 1999).

Os principais reguladores temporais específicos do ciclo celular são as Cinases Dependentes de Ciclinas (CDKs). Estas cinases, do tipo serina/treonina, são inactivas como monómeros, necessitando de ser activadas por ligação às suas subunidades reguladoras, as Ciclinas (Sherr, 1994; Morgan, 1995; Sherr e Roberts, 1999). Estas últimas são assim denominadas por sofrerem um ciclo de síntese e de degradação em cada ciclo celular. A formação, activação e dissociação/inactivação dos vários complexos Ciclina-CDK são eventos cíclicos e centrais que propulsionam o ciclo celular. As oscilações na actividade das CDKs durante o ciclo celular podem ser devidas a vários factores:

- a alterações na quantidade da Ciclina associada. Os níveis de Ciclina são controlados por diversos mecanismos, como a regulação da transcrição dos seus genes e a destruição proteolítica das proteínas.
- à fosforilação da CDK no resíduo de treonina localizado no seu *T-loop*, necessária para a sua acção catalítica. Esta fosforilação é realizada por uma cinase activadora da CDK (CAK) e o grupo fosfato é removido pela fosfatase KAP após a degradação da Ciclina associada.
- à fosforilação de um ou dois resíduos do local de ligação ao ATP da CDK. Esta fosforilação mantém o complexo Ciclina-CDK inactivo.
- à inactivação por inibidores específicos (CKIs).

As subunidades Ciclina dos complexos Ciclina-CDK são as responsáveis pelo reconhecimento das proteínas que as subunidades catalíticas, as CDKs, irão fosforilar. Existem diferentes tipos de Ciclinas (mitóticas e das fases G1 e S); cada uma apresenta uma associação preferencial com uma CDK, havendo, no entanto, uma certa redundância nas suas funções (Murray, 2004). A progressão no ciclo celular envolve modificações na abundância de cada uma das Ciclinas, com consequentes alterações nos substratos das CDKs. Ao longo do ciclo celular, encontram-se activos diferentes complexos Ciclina-CDK: o complexo Ciclina D-

CDK4/6, na progressão da fase G1; o complexo Ciclina E-CDK2, na transição G1-S; o complexo Ciclina A-CDK2, na progressão das fases S e G2; e o complexo Ciclina B-CDK1, no início da mitose (para revisão, ver Pines, 1999; Poon, 2002). A activação do complexo Ciclina B-CDK1 (primeiramente denominado MPF - *Maturation Promoting Factor*), que desencadeia a entrada em mitose, encontra-se a cargo da fosfatase Cdc25.

A regulação do ciclo celular pelos complexos Ciclina-CDK é feita através da fosforilação reversível de proteínas. Como complemento, e de modo a impor a irreversibilidade dos eventos do ciclo, ocorre a degradação regulada de proteínas. Este tipo de proteólise é levado a cabo pelo sistema Ubiquitina-Proteossoma, o qual usa o polipeptídeo Ubiquitina como marca para endereçar as proteínas para a degradação pelo Proteossoma 26S. A ubiquitinação requer a formação de cadeias de poliubiquitina nos substratos, através da acção combinada de enzimas transportadoras da ubiquitina (E2s ou UBCs) e de ligases ubiquitina-proteína (E3s) (para revisão, consultar Pickart, 2001). As enzimas E3 são as responsáveis pela especificidade da proteólise dependente da ubiquitina, uma vez que são elas as responsáveis pelo reconhecimento dos substratos a modificar, sendo de destacar os complexos APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) e SCF (*Skp1/Cullin/F-box protein*), que têm papéis proeminentes no controlo do ciclo celular. Estas ligases Ubiquitina-proteína também estão, por sua vez, sujeitas a controlo proteolítico e a sua actividade está dependente da fosforilação (revisto em Vodermaier, 2004). Os complexos SCF parecem ser bastante versáteis, com uma grande variedade de funções em diversas fases do ciclo celular.

O APC/C é um complexo multiproteico que, após a associação com os seus activadores Cdc20/*Fizzy* e Cdh1/*Hct1/Fizzy-related*, ubiquitina reguladores-chave da mitose, endereçando-os para a degradação. Na transição metafase-anafase, o APC/C, em associação com a Cdc20, é responsável pela ubiquitinação da Ciclina B e da Securina. Esta última sequestra a protease Separase, mantendo-a inactiva (Nasmyth, 2002; Peters, 2002). Após a sua degradação, a

Separase é libertada e torna-se activa, clivando a Scc1, uma subunidade do complexo de coesinas que mantém os cromátídeos irmãos juntos (Peters, 2002). Nessa altura, a tensão aplicada pelo fuso bipolar passa a ser suficiente para separar os cromátídeos irmãos, que se deslocam para os pólos opostos da célula.

As famílias de cinases Aurora, Polo e NIMA parecem, igualmente, ser importantes reguladores de numerosos eventos mitóticos (Nigg, 1998; Ke *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2004; Ducat e Zheng, 2004). A pequena GTPase Ran está envolvida na regulação de todo o ciclo celular, funcionando como transportador nucleocitoplasmático durante a interfase (Moore e Blobel, 1993) e sendo necessária para a nucleação e organização dos microtúbulos durante a mitose (Gruss *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001; Wilde *et al.*, 2001).

### 1.3. Controlo do ciclo celular

O sistema de controlo do ciclo celular é responsável pela monitorização da finalização dos seus eventos. Se a célula encontra dificuldade em completar um processo (por exemplo, a replicação do DNA), é enviado um sinal negativo ao sistema de controlo, que adia a iniciação dos eventos posteriores (por exemplo, a mitose). Estes sinais negativos bloqueiam o ciclo celular em transições denominadas de *checkpoints*. Estes pontos de controlo não são essenciais para que o ciclo celular ocorra nem são activados se ele funcionar normalmente. São necessários, apenas, em situações de *stress*, em caso de danos ou de actividades inacabadas (Elledge, 1996) e existem para assegurar a estabilidade genómica (Sherr, 1996).

Os sistemas de controlo do ciclo celular são muito conservados nos diferentes organismos. Existem três *checkpoints* principais:

- *G1/S checkpoint* - equivalente ao START em levedura e ao ponto de restrição em células animais. Provoca a paragem no ciclo celular se as condições

ambientais são inapropriadas, se o crescimento celular é insuficiente ou se existem danos no DNA.

- *DNA damage checkpoint* ou *G2/M checkpoint* - não permite a entrada em mitose se o DNA tiver sofrido danos ou se a sua replicação estiver incompleta. Recentemente, surgiram dados que indicam que este *checkpoint* também é activado quando ocorre a despolimerização dos microtúbulos no final da fase G2 (Rieder e Cole, 2000) ou na ausência de separação dos centrossomas (Scolnick e Halazonetis, 2000). A sua actuação é baseada no bloqueio da activação do complexo Ciclina B-CDK1.

- *Spindle-assembly checkpoint*, *MIG1 checkpoint*, *checkpoint* da ligação dos cinetocoros ou *mitotic checkpoint* - este ponto de controlo encontra-se na transição metafase-anafase e impede a entrada em anafase até todos os cromossomas estarem bipolarmente ligados ao fuso mitótico (Rieder *et al.*, 1994; Rieder *et al.*, 1995) e sob tensão (Li e Nicklas, 1995).

### **1.3.1. Spindle-assembly checkpoint**

Para uma segregação adequada dos cromossomas durante a mitose, é essencial uma ligação biorientada apropriada aos microtúbulos do fuso, que gera tensão nos cinetocoros irmãos e permite o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica. O *spindle-assembly checkpoint* é uma cascata de transdução do sinal que leva à paragem do ciclo celular quando ocorrem erros na interacção dos microtúbulos com os cinetocoros (revisto em Musacchio e Hardwick, 2002). Para o desactivar, os cinetocoros têm de estar ligados aos microtúbulos do fuso e, simultaneamente, sob tensão, para o que é necessário que os pares de cinetocoros estejam correctamente ligados a microtúbulos emanados por pólos opostos (Li e Nicklas, 1995; Rieder *et al.*, 1995; Shonn *et al.*, 2000; Stern e Murray, 2001). Portanto, este ponto de controlo inibe o início da anafase e é suficientemente sensível para que um único cinetocoro não ligado possa gerar o sinal de espera (revisto em Gorbsky, 2001; Yu, 2002). Vários componentes

moleculares deste *checkpoint* foram já identificados, nomeadamente, nos eucariotas superiores, as proteínas Mps1, Bub1, BubR1, Bub3, Mad1, Mad2, CENP-E, Zw10 e Rod. A nível do cinetocoro, são formados diferentes complexos: as proteínas Mad1, Mad2, BubR1, Bub3 e CENP-E localizam-se nesta estrutura, durante a mitose, independentemente da Zw10 e da Rod (Basu *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 1999). Estudos recentes indicam que as proteínas Bub1 e Mad2 parecem sinalizar os cromossomas não ligados, enquanto a BubR1 e a Bub3 são capazes de se localizar em cinetocoros ligados que não estejam sob tensão (Logarinho *et al.*, 2004). Estas proteínas, quando presentes em pelo menos um dos cinetocoros de uma célula, funcionam como sinais, desencadeando a activação do ponto de controlo do fuso. Tal facto vai provocar a inibição do APC/C, que, deste modo, permite que o complexo Ciclina-CDK1 e a Securina se mantenham activos, impedindo a segregação dos cromossomas (Millband *et al.*, 2002). Sabe-se que a Mad2 interacciona directamente e inibe a Cdc20 e, conseqüentemente, o APC/C (Fang *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Wassmann e Benezra, 2001) e as proteínas BubR1 e Bub3 parecem fazer parte do mesmo complexo (Fraschini *et al.*, 2001; Sudakin *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001).

Após estabelecida a biorientação e a tensão em todos os cinetocoros, é necessário inactivar o *spindle-assembly checkpoint*. Nesta altura, a Mad1, a Mad2 e a maior parte das proteínas Bub1, BubR1 e Bub3 deixam de se localizar no cinetocoro (Musacchio e Hardwick, 2002). A proteína motora dos microtúbulos Dineína citoplasmática parece ser responsável pelo transporte de alguns dos componentes dos cinetocoros para os centrossomas (Howell *et al.*, 2001).

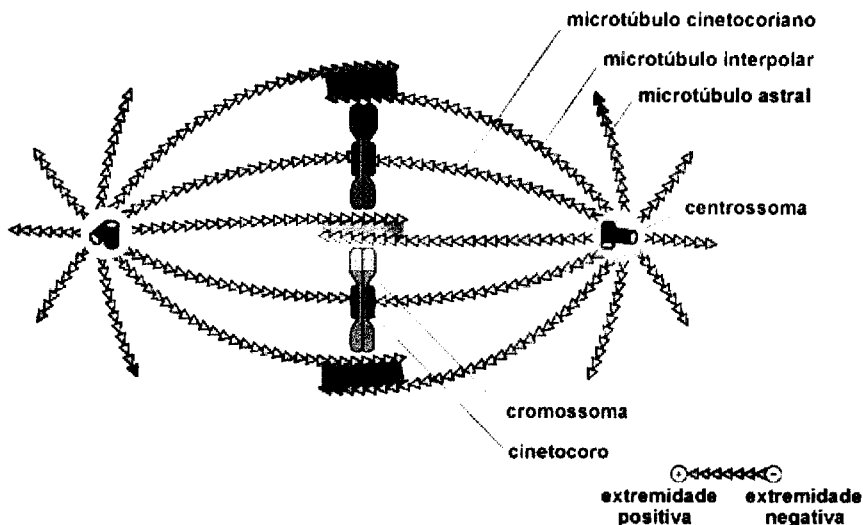
As proteínas passageiras cromossomais Aurora B, INCENP e Survivina formam um complexo (Bolton *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2003) que tem um papel auxiliar importante no *spindle checkpoint*. Este complexo não constitui um componente integral do *checkpoint* mitótico, mas permite à célula comunicar a falta de tensão aos microtúbulos ligados (Biggins e Murray, 2001; Lens *et al.*, 2003). Existem, ainda, evidências em como o complexo Survivina/Aurora

B/INCENP influencia a afinidade da BubR1 para os cinetocoros (Lens *et al.*, 2003) e é necessário para corrigir interações inadequadas microtúbulo-cinetocoro (Stern, 2002; Tanaka, 2002).

## 2. O aparelho mitótico

No início da mitose há profundos rearranjos em todo o citosqueleto. Os microtúbulos interfásicos despolimerizam e os microtúbulos mitóticos são nucleados a partir dos dois centrossomas e começam a alongar-se, interagindo com os cinetocoros e formando o fuso mitótico (Fig. 3). O fuso é uma estrutura bipolar constituída por vários tipos de microtúbulos: os microtúbulos astrais, que ligam os pólos do fuso ao córtex celular; os microtúbulos cromossomais, que ligam os braços dos cromossomas aos pólos; os microtúbulos cinetocorianos, que ligam os pólos aos cinetocoros; e os microtúbulos interpolares, que ligam os dois pólos (Fig. 3). Aos microtúbulos associam-se muitas proteínas, essenciais para a formação e função do fuso mitótico (para revisão, ver Merdes e Cleveland, 1997; Karsenti e Vernos, 2001; Wittmann *et al.*, 2001). O fuso tem um papel fundamental na segregação dos cromossomas (Thyberg e Moskalewski, 1998; Nasmyth, 2002) e a sua integridade estrutural é essencial para a finalização da citocinese (Wheatley e Wang, 1996).

Durante a anafase, os microtúbulos polares antiparalelos sobrepostos do fuso mitótico formam uma estrutura denominada de zona média do fuso ou fuso central, localizada entre os cromátídeos separados (Severson e Bowerman, 2002), que contém um depósito amorfo de materiais electronodensos (McIntosh e Landis, 1971) que impede a ligação de anticorpos anti-Tubulina. Acumula-se no fuso central um grande número de proteínas essenciais para a citocinese, incluindo motores do tipo cinesina e proteínas passageiras cromossomais (*chromosomal passenger proteins*) (Cooke *et al.*, 1987; Earnshaw e Bernat, 1991; Adams *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2001; Matulienė e Kuriyama, 2002).



**Figura 3.** Representação esquemática do fuso mitótico e dos seus constituintes. (Adaptada de Alberts *et al.*, 1994).

Quando ocorre a ingressão do sulco de clivagem, a zona média do fuso é constricta, formando o corpo médio do fuso, que constitui uma barreira entre as células filhas. Mutações em proteínas que se localizam na zona média ou no corpo médio do fuso resultam em defeitos na citocinese, originando células binucleadas (Matulienė e Kuriyama, 2002).

O sulco de clivagem é formado perpendicularmente ao eixo do fuso mitótico, quer nas divisões simétricas, quer nas assimétricas (Rappaport, 1986; O'Connell e Wang, 2000; Doe e Bowerman, 2001). O posicionamento correcto do sulco de clivagem é indispensável para a repartição igualitária dos cromossomas segregados e dos demais constituintes celulares pelas células filhas. Todavia, ainda não está esclarecido que parte do aparelho mitótico o determina. Foram propostos dois mecanismos para o estabelecimento desta orientação (Oegema e Mitchison, 1997). O primeiro, mais comum, atribui o papel à zona de interdigitação entre os microtúbulos astrais (Rappaport, 1961; Devore *et al.*, 1989; Salmon e Wolniak, 1990; Eckley *et al.*, 1997; Rieder *et al.*, 1997; Larkin e Danilchik, 1999; Ministrini *et al.*, 2003; Verbrugghe e White, 2004). O segundo mecanismo parece ser dominante em vários tipos de células somáticas, incluindo humanas e de *Drosophila*, e sugere que o fuso central seja o responsável pelo posicionamento e

formação do sulco de clivagem (Cao e Wang, 1996; Oegema e Mitchison, 1997; Bonaccorsi *et al.*, 1998; Giansanti *et al.*, 1998). Recentemente, foi proposta uma teoria unificadora, segundo a qual os microtúbulos, quer astrais, quer do fuso central, quer mesmo de um fuso colapsado sem ásteres nem cromossomas, são o único componente estrutural do aparelho mitótico necessário para manter a ingressão do sulco e induzir a clivagem da célula (Alsop e Zhang, 2003). Os microtúbulos parecem ser requeridos ao longo de toda a ingressão do sulco, uma vez que a perda de microtúbulos durante a citocinese pode resultar na regressão do sulco de clivagem (Wheatley e Wang, 1996; Danilchik *et al.*, 1998).

## 2.1. Os microtúbulos

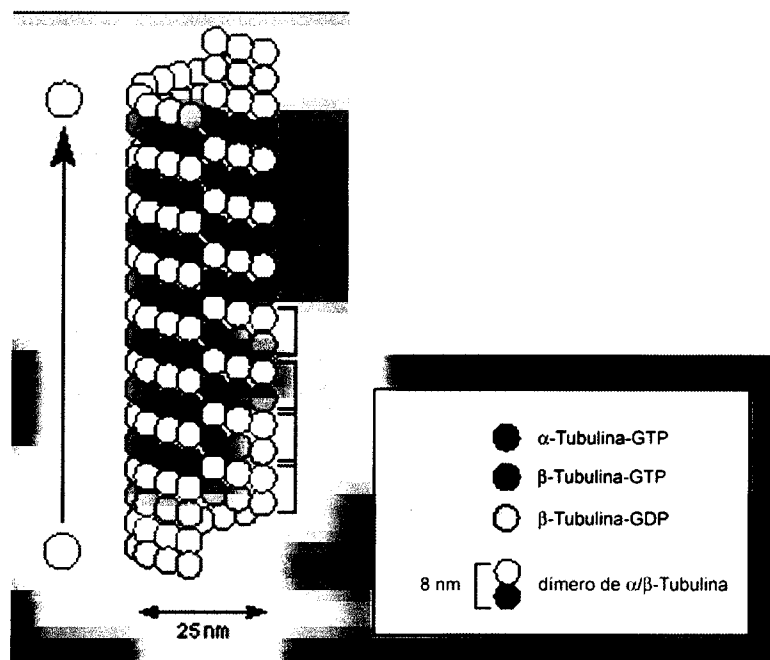
Os microtúbulos constituem um dos principais componentes do citoesqueleto das células eucariotas e estão envolvidos em muitos processos essenciais, incluindo a divisão celular, a organização e transporte intracelulares e a mobilidade ciliar e flagelar.

Os microtúbulos são polímeros não covalentes, constituídos por vários protofilamentos associados lateralmente de modo a formar uma estrutura cilíndrica de 25 nm de diâmetro (Fig. 4). A maioria dos microtúbulos *in vivo* e dos nucleados *in vitro* a partir de centrossomas tem 13 protofilamentos, enquanto os microtúbulos polimerizados sem a colaboração do centrossoma têm um número variável de protofilamentos (entre 10 e 15), sugerindo que este centro organizador de microtúbulos determina directamente a estrutura do microtúbulo (Evans *et al.*, 1985). Estudos de genética indicam que o número de protofilamentos de um microtúbulo também pode ser controlado por isoformas específicas de  $\beta$ -Tubulina (Savage *et al.*, 1989; Raff *et al.*, 1997).

Cada protofilamento linear é constituído por heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Tubulina (Amos e Klug, 1974) (Fig. 4). Os heterodímeros estão orientados segundo um padrão molecular intrínseco, que define a polaridade dos microtúbulos e propriedades diferenciais das extremidades, com a  $\beta$ -Tubulina



exposta na extremidade (+) (*plus-end*) (Mitchison, 1993) e a  $\alpha$ -Tubulina exposta na extremidade (-) (*minus-end*) (Fan *et al.*, 1996) (Fig. 4). Os microtúbulos do fuso mitótico têm polaridade uniforme; as extremidades (-) estão nos pólos ou na sua proximidade e as extremidades (+) estendem-se na direcção do córtex da célula ou dos cromossomas (Heidemann e McIntosh, 1980; McIntosh e Euteneuer, 1984).

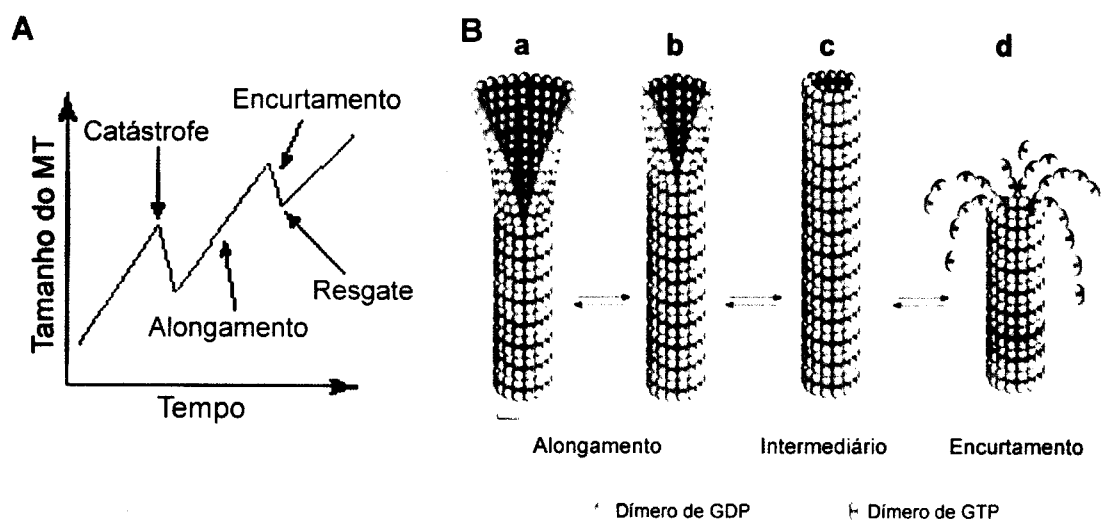


**Figura 4.** Os microtúbulos são constituídos por treze protofilamentos associados lateralmente, cada um composto por heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Tubulina orientados uniformemente, de modo que a  $\alpha$ -Tubulina se encontra na direcção da extremidade (-) e que a  $\beta$ -Tubulina se dirige para a extremidade (+). (Adaptado de Dammermann *et al.*, 2003).

As Tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  são proteínas altamente homólogas, cerca de 50% idênticas ao nível aminoacídico (Burns, 1991), e ambas ligam GTP. Durante a polimerização dos dímeros de Tubulina, a  $\beta$ -Tubulina hidroliza o GTP a ela ligado em GDP (David-Pfeuty *et al.*, 1977; MacNeal e Purich, 1978), em contraste com a  $\alpha$ -Tubulina, que liga o GTP mas não o hidroliza (Spiegelman *et al.*, 1977) (Fig. 4). A energia libertada pela hidrólise de Tubulina-GTP é essencial para desestabilizar a estrutura do microtúbulo e permite a sua despolimerização rápida (Hyman *et al.*, 1992).

As extremidades dos microtúbulos alternam estocasticamente, ou seja, abruptamente, entre fases de lenta polimerização, ou alongamento, e rápida despolimerização, ou encurtamento (Fig. 5A). Deste modo, numa população de

microtúbulos, alguns estão em crescimento enquanto, simultaneamente, outros estão a encurtar, uma propriedade conhecida como instabilidade dinâmica (Mitchison e Kirschner, 1984a; Walker *et al.*, 1988). A polimerização dos microtúbulos é uma reacção bimolecular, dependente da concentração de Tubulina livre, enquanto a despolimerização é uma reacção unimolecular, independente da concentração de Tubulina livre (Walker *et al.*, 1988). A transição entre o crescimento e o encurtamento é designada por catástrofe e a conversão inversa por resgate (Fig. 5A). Por vezes, os microtúbulos atravessam fases de quiescência, ou de pausa, nas quais não polimerizam nem despolimerizam. Estas pausas são frequentes *in vivo* (Shelden e Wadsworth, 1993) e também *in vitro*, apesar de, neste caso, ocorrerem com uma frequência muito menor (Walker *et al.*, 1988).



**Figura 5.** Alterações no tamanho e na estrutura do microtúbulo devidas à instabilidade dinâmica. **A** - Representação gráfica do tamanho de um microtúbulo ao longo do tempo e identificação das várias fases. **B** - (Adaptada de Hyman e Karsenti, 1996) Representação da estrutura da extremidade do microtúbulo nas fases de alongamento (a e b), transição (c) e encurtamento (d).

Durante a alongação, as extremidades dos microtúbulos formam uma folha aberta e ligeiramente curvada que, a velocidade variável, vai fechando, compondo um cilindro (Simon e Salmon, 1990; Mandelkow *et al.*, 1991; Chrétien *et al.*, 1995) (Fig. 5B(a) e (b)). Esta alteração conformacional parece conduzir à hidrólise do GTP (Chrétien *et al.*, 1995; Hyman e Karsenti, 1996). Bastam apenas algumas

subunidades de Tubulina-GTP para manter estáveis as extremidades dos microtúbulos (Drechsel e Kirschner, 1994; Caplow e Shanks, 1996). No entanto, logo que o GTP é hidrolisado, forma-se uma estrutura intermediária instável de extremidades lisas (Arnal *et al.*, 2000) (Fig. 5B(c)). Este intermediário pode continuar a crescer ou, mais provavelmente, transita para uma fase de encurtamento, pois, devido à fraca interacção lateral entre a Tubulina-GDP, o cilindro tem tendência a abrir, ficando os protofilamentos separados e curvados para fora, começando, então, a ocorrer a libertação de oligómeros de Tubulina (Mandelkow *et al.*, 1991; Arnal *et al.*, 2000) (Fig. 5B(d)).

As duas extremidades de cada microtúbulo têm características muito diferentes. A extremidade (+) tem uma velocidade de alongação bastante superior e uma frequência de catástrofe ligeiramente maior que a extremidade (-), que, por seu lado, possui uma frequência de resgate mais elevada (Horio e Hotani, 1986). No entanto, a velocidade de encurtamento, independente da concentração de Tubulina, é similar em ambas as extremidades (Horio e Hotani, 1986). Devido a estas diferenças, os microtúbulos do fuso mitótico estão constantemente a polimerizar nas extremidades (+) e a despolimerizar nas extremidades (-), causando um fluxo contínuo de microtúbulos na direcção dos pólos e um efeito de *treadmilling* (Mitchison, 1989; Sawin e Mitchison, 1991a).

A célula é capaz de modular a relação entre as velocidades de alongação, encurtamento e catástrofe. Os microtúbulos *in vivo* polimerizam cerca de cinco vezes mais depressa do que *in vitro*, para uma concentração equivalente de Tubulina (Sammak e Borisy, 1988; Belmont *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1992; Verde *et al.*, 1992). A estimulação da velocidade de crescimento é devida à ligação de Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAPs) às paredes dos microtúbulos e pode ser mimetizada por adição deste género de proteínas à Tubulina pura (Drechsel *et al.*, 1992; Pryer *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1994; Vasquez *et al.*, 1994). No entanto, a elevada velocidade de alongamento *in vivo* é acompanhada por um aumento da frequência de catástrofe, um tipo de comportamento nunca observado nas soluções de tubulina pura.

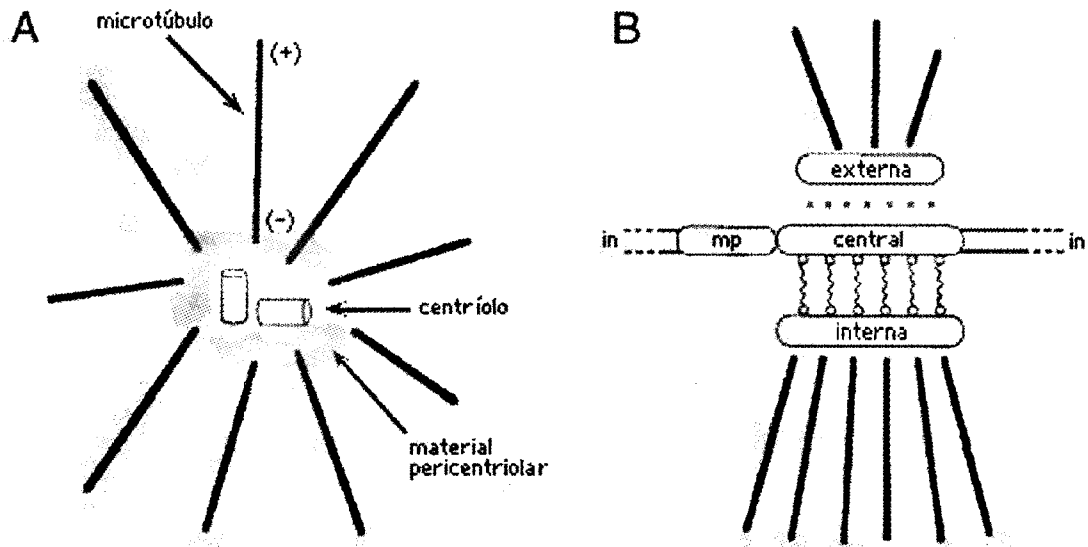
### 2.1.1. A dinâmica dos microtúbulos e o ciclo celular

A instabilidade dinâmica permite rápidas alterações espaciais do citoesqueleto de microtúbulos ao longo do ciclo celular, sendo a mais dramática a reorganização dos microtúbulos durante a transição interfase-mitose (Hyman e Karsenti, 1996). Nesta transição a dinâmica dos microtúbulos também é drasticamente alterada: os extractos mitóticos têm uma frequência de catástrofe 5 a 10 vezes superior à dos extractos interfásicos (Saxton *et al.*, 1984; Belmont *et al.*, 1990; Zhai *et al.*, 1996; Rusan *et al.*, 2001). De facto, a adição de CDK1, o principal controlador do ciclo celular, a um extracto citoplasmático interfásico de *Xenopus* desencadeia a iniciação da mitose, resultando num rápido aumento das catástrofes microtubulares (Belmont *et al.*, 1990; Verde *et al.*, 1992). A instabilidade dinâmica é extremamente importante para a captura dos cinetocoros e do córtex celular pelos microtúbulos do fuso mitótico, permitindo um correcto posicionamento do fuso e uma adequada segregação dos cromossomas (Holy e Leibler, 1994). Porém, quando os microtúbulos se associam aos cromossomas, são rapidamente estabilizados, tornando-se mais longos, enquanto aqueles que não se ligam permanecem altamente dinâmicos (Sawin e Mitchison, 1991b; Zhang e Nicklas, 1995).

### 2.2. O centrossoma

A extremidade (-) do microtúbulo está localizada, normalmente, num centro de organização de microtúbulos (MTOC), cuja forma e arquitectura varia de célula para célula e de organismo para organismo. O MTOC é o principal local de nucleação de microtúbulos nas células. MTOCs isolados conseguem nuclear a formação de microtúbulos em condições em que não ocorre a sua formação espontânea (Mitchison e Kirschner, 1984b). Nas plantas superiores, está ausente um MTOC bem definido; em vez disso, a superfície do núcleo parece ser um local importante de nucleação (Lambert, 1993).

Entre os MTOCs encontram-se os centrossomas, nos eucariotas superiores (Fig. 6A e 7A), os corpos polares do fuso (*spindle pole bodies*, SPBs), nos fungos e em algumas plantas (Fig. 6B), e os corpos basais flagelares. Todos estes MTOCs têm funções similares e contêm proteínas homólogas, pelo que se pensa terem evoluído a partir de um ancestral comum.

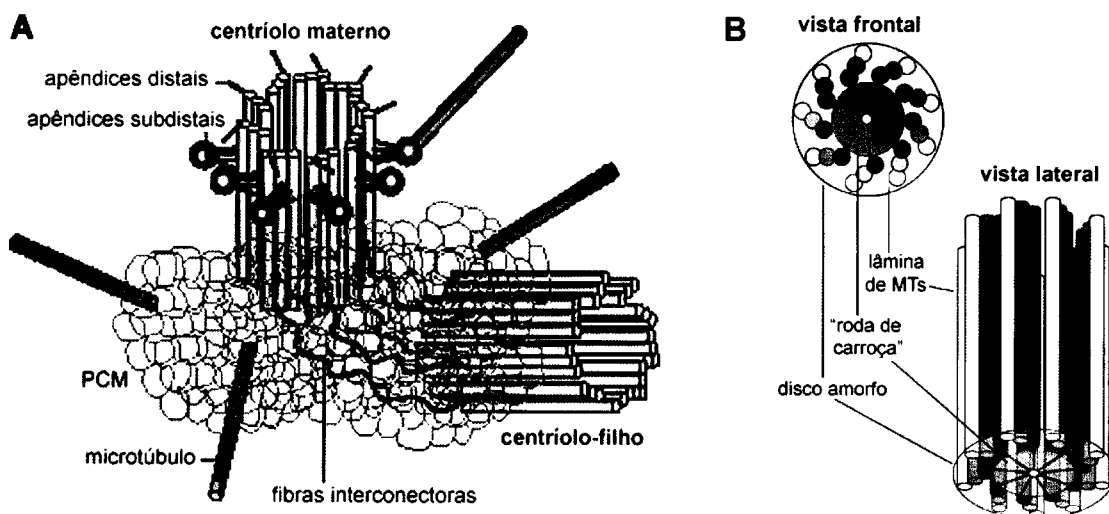


**Figura 6.** Esquemas representativos de um centrossoma (A) e de um corpo polar do fuso (SPB) (B). O centrossoma tem cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro e o SPB tem cerca de 100 nm. Em B: externa, central e interna indicam, respectivamente, a placa externa, a placa central e a placa interna do SPB; in - invólucro nuclear; mp - meia-ponte (*half-bridge*). (Adaptado de Stearns e Winey, 1997).

O centrossoma foi descrito pela primeira vez por Walther Flemming e denominado por Theodor Boveri ainda no século XIX (Flemming, 1875; Boveri, 1888). É um organelo complexo que inclui mais de setenta proteínas diferentes (Andersen *et al.*, 2003). Algumas destas proteínas localizam-se no centrossoma independentemente dos microtúbulos, enquanto outras necessitam dos últimos para se localizarem. É usual considerar somente as primeiras como verdadeiros componentes do centrossoma (Urbani e Stearns, 1999).

Morfologicamente, o centrossoma é composto por dois centríolos, conectados por fibras interconectoras e rodeados por uma matriz electronodensa de material pericentriolar (PCM) (Para revisão, consultar Brinkley, 1985; Vorobjev

e Nadezhdina, 1987; Kimble e Kuriyama, 1992; Kalt e Schliwa, 1993; Kellogg *et al.*, 1994; Lange e Gull, 1996) (Fig. 7A). O chamado centríolo materno, ou maturo, possui dois tipos de apêndices extra, os distais e os subdistais (Fig. 7A). Ambos os centríolos são capazes de nuclear microtúbulos, mas só o materno retém a sua extremidade (-), mantendo um rearranjo de microtúbulos focados (Piel *et al.*, 2000). Isto deve-se aos seus apêndices, onde a Nineína, uma proteína requerida para a ancoragem (ligação e estabilização) das extremidades (-) dos microtúbulos, está localizada (Mogensen *et al.*, 2000). Apenas os apêndices subdistais parecem ancorar os microtúbulos. O centríolo materno é relativamente estático, enquanto que o centríolo filho se move rápida e irregularmente à sua volta.



**Figura 7.** Representação esquemática da estrutura do centrossoma (A) e do centríolo (B). ((A) Adaptada de Doxsey, 2001; (B) Adaptada de Feldman e Marshall, 2004)).

O centríolo é a unidade fundamental do centrossoma. Cada centríolo é um pequeno cilindro altamente organizado, constituído por nove lâminas de tripletos de microtúbulos num arranjo rotacionalmente simétrico (Fig. 7A e B). As lâminas de tripletos rodeiam uma zona central de nove raios denominada de *cartwheel* ("roda de carroça") (Fig. 7B). No entanto, os centríolos dos embriões de *Drosophila* têm dupletos de microtúbulos (Callaini *et al.*, 1997) e os das células de

*C. elegans* apenas contêm singletos (O'Connell, 2000). De facto, nenhum destes organismos possui  $\delta$ - ou  $\epsilon$ -tubulina (Chang e Stearns, 2000), pelo que a necessidade da sua função talvez se restrinja aos centríolos com tripletos de microtúbulos (Delattre e Gonczy, 2004). Os microtúbulos que compõem os centríolos são muito estáveis, possivelmente devido às modificações pós-traducionais que sofre a sua Tubulina, como a acetilação (Piperno e Fuller, 1985; Schulze *et al.*, 1987) e a glutamilação (Eddé *et al.*, 1990; Bobinnec *et al.*, 1998). A estrutura microtubular dos centríolos é semelhante à dos corpos basais, nucleadores de cílios e de flagelos.

O material pericentriolar (PCM) consiste numa rede de filamentos de 12 a 15 nm, aos quais os outros componentes se associam. No PCM encontra-se em elevada quantidade um grande complexo multiproteico, do qual faz parte a  $\gamma$ -Tubulina (Stearns e Kirschner, 1994; Moritz *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995; Dichtenberg *et al.*, 1998), também existente no citoplasma (Moudjou *et al.*, 1996). Este complexo, denominado  $\gamma$ -TuRC (*gama-Tubulin Ring Complex*), está organizado em forma de um anel aberto de cerca de 25 nm de diâmetro, dimensão semelhante à de um microtúbulo (Oakley *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1995; Oegema *et al.*, 1999). No  $\gamma$ -TuRC, a  $\gamma$ -Tubulina está complexada com a Pericentrina (Dichtenberg *et al.*, 1998), com proteínas homólogas das Spc97p e Spc98p da levedura de gemulação (Geissler *et al.*, 1996; Knop *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1998) e com ortólogas dessas (Gunawardane *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2001). Vários estudos *in vitro* apontam para um papel do  $\gamma$ -TuRC na formação do centrossoma e na nucleação da maioria dos microtúbulos da célula, quer em interfase, quer em mitose (Felix *et al.*, 1994; Stearns e Kirschner, 1994; Zheng *et al.*, 1995; Moritz *et al.*, 1998; Schnackenberg *et al.*, 1998; Oegema *et al.*, 1999). Foram propostos dois modelos para explicar o modo como o  $\gamma$ -TuRC deverá estar envolvido na nucleação do microtúbulo ao nível molecular (para revisão, consultar Erickson, 2000). O modelo “padrão” defende que o  $\gamma$ -TuRC funciona como a primeira volta da hélice do microtúbulo, possivelmente devido à sua semelhança com a extremidade (+)

microtubular, iniciando-se cada um dos 13 protofilamentos através de contactos longitudinais com as subunidades de  $\gamma$ -Tubulina (Zheng *et al.*, 1995; Keating e Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese e Zheng, 2000). No modelo do protofilamento, a  $\gamma$ -Tubulina fornece um pequeno segmento de um protofilamento pré-formado, nucleando um segundo protofilamento a partir de ligações laterais com a  $\alpha$ -Tubulina, com a  $\beta$ -Tubulina ou com ambas (Erickson e Stoffler, 1996; Leguy *et al.*, 2000).

A levedura de gemulação tem um complexo de  $\gamma$ -Tubulina mais pequeno e mais simples que o  $\gamma$ -TuRC (Schiebel, 2000), enquanto outros organismos, como a *Drosophila*, possuem ambos (Moritz *et al.*, 1998; Oegema *et al.*, 1999). O complexo menor de  $\gamma$ -Tubulina, e mesmo a  $\gamma$ -Tubulina sozinha, é capaz, igualmente, de nuclear microtúbulos, mas com menor eficiência.

Alguns estudos sugerem que a MAP XMAP215, da família Dis1-TOG, também é importante para a nucleação dos microtúbulos nos centrossomas (Popov *et al.*, 2002). Talvez o  $\gamma$ -TuRC e a XMAP215 tenham papéis complementares, estabilizando, respectivamente, as ligações laterais e longitudinais entre as subunidades (Popov *et al.*, 2002).

### **2.2.1. Ciclo centrossomal**

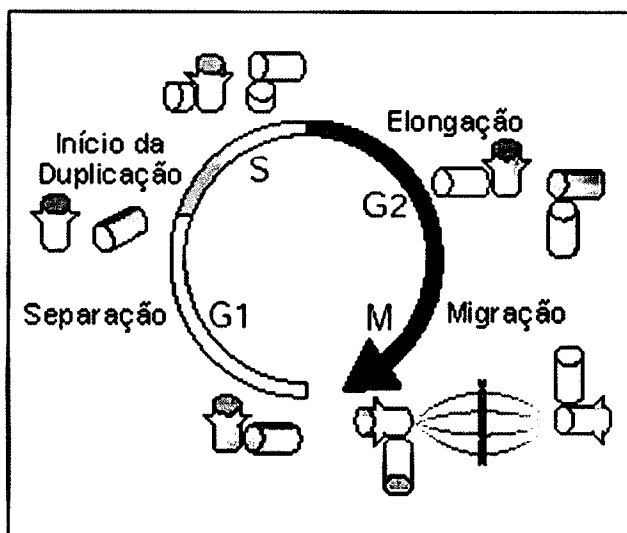
A estrutura e a função do centrossoma são reguladas de um modo dependente do ciclo celular (Para revisão ver Mazia, 1987; Kellogg *et al.*, 1994). A duplicação do centrossoma ocorre uma vez em cada ciclo celular (Kuriyama e Borisy, 1981a; Vorobjev e Chentsov, 1982; Kochanski e Borisy, 1990; Chrétien *et al.*, 1997). Se o centrossoma não for duplicado, a célula forma um fuso monopolar, não se divide e torna-se poliplóide. Se ocorrer mais do que uma duplicação por ciclo celular, pode originar-se um fuso multipolar, o que levará a uma distribuição desigual dos cromossomas pelas células filhas. Em qualquer dos casos, os erros na reprodução do centrossoma poderão acarretar instabilidade genómica, característica das células de muitos cancros humanos (revisado em



Brinkley, 2001). A multipolaridade do fuso é particularmente problemática, uma vez que as células não têm maneira de se libertar dos centrossomas extra nem possuem um *checkpoint* que, como resposta, aborte a mitose (Sluder *et al.*, 1997). Assim, de modo a assegurar que um único novo centrossoma seja formado por ciclo celular, a célula necessita de coordenar rigorosamente os ciclos centrossomal e celular. Quer a duplicação dos centríolos, quer a replicação do DNA requerem a hiperfosforilação da proteína do retinoblastoma (RB) e a activação da CDK2 (Hinchcliffe *et al.*, 1999; Lacey *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Meraldi *et al.*, 1999), pelo que parecem ser estes os mecanismos que asseguram a coordenação entre os dois eventos.

Na fase G1 só existe um centrossoma por célula. O processo de duplicação começa na transição G1-S (Fig. 8), aproximadamente ao mesmo tempo em que é principiada a replicação do DNA. Morfologicamente, o primeiro evento discernível ocorre quando o par de centríolos perde o seu rearranjo ortogonal e eles se separam ligeiramente. Seguidamente, forma-se um procentríolo precursor na extremidade proximal de cada centríolo e o seu crescimento continua ao longo do resto do ciclo celular, até se completar a constituição do novo centríolo (Rattner e Phillips, 1973) (Fig. 8). Existem proteínas que são requeridas especificamente para a duplicação dos centríolos, incluindo as Centrininas (Spang *et al.*, 1993; Salisbury *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2003), a  $\epsilon$ -Tubulina, em vertebrados (Dutcher *et al.*, 2002), a Zig-1 (O'Connell *et al.*, 2001), a SAS-4 (Kirkham *et al.*, 2003; Leidel e Gonczy, 2003) e a Bld10p (Matsuura *et al.*, 2004). Em G2 há, portanto, dois centrossomas situados lado a lado na mesma célula, cada um deles contendo um par de centríolos (Fig. 8). A duplicação dos centrossomas é semi-conservativa, isto é, cada centrossoma do par duplicado tem um centríolo antigo e um novo. Na transição G2-M, os centrossomas movem-se para lados opostos do invólucro nuclear (Fig. 8). Esta migração depende da acção de proteínas motoras dos microtúbulos, como a Dineína e as cinesinas, localizadas no córtex e nas extremidades (+) dos microtúbulos, que parecem fornecer as forças de tracção e compressão necessárias à separação dos ásteres

e, conseqüentemente, dos centrossomas (Heck *et al.*, 1993; Blangy *et al.*, 1995; Sharp *et al.*, 1999a; Sharp *et al.*, 2000a). Concomitantemente, a actividade centrossomal de nucleação dos microtúbulos aumenta dramaticamente, como preparação para a formação do fuso (McGill e Brinkley, 1975; Snyder e McIntosh, 1975; Gould e Borisy, 1977). Na realidade, os centrossomas mitóticos nucleiam cinco vezes mais microtúbulos que os interfásicos (Kuriyama e Borisy, 1981b). A fosforilação de proteínas centrossomais parece ter o principal papel nesta mudança (Vandré *et al.*, 1984; Vandré *et al.*, 1986; Centonze e Borisy, 1990; Verde *et al.*, 1990; Buendia *et al.*, 1992; Verde *et al.*, 1992; Blangy *et al.*, 1995; Sawin e Mitchison, 1995). Quando, no início da prometáfase, ocorre a desintegração do invólucro nuclear, os microtúbulos nucleados pelos centrossomas interactivam com os cromossomas e com microtúbulos sobrepostos vindos do pólo oposto, formando o fuso bipolar (Fig. 8). A segregação dos cromossomas, seguida da citocinese, resulta em duas células filhas possuidoras de um único centrossoma cada (Fig. 8).



**Figura 8** - O ciclo centrossomal. Após a divisão celular, cada célula tem um centrossoma contendo dois centríolos (representados a verde e azul). Os centríolos começam a separar-se na fase G1. Durante a fase S, forma-se um procentríolo (verde claro e azul claro) ortogonalmente a cada centríolo, que continua a crescer em G2 (elongação). No início da mitose, os centrossomas migram para formar os pólos do fuso mitótico e, no final,

cada uma das células filhas herda um. (Adaptado de Urbani e Stearns, 1999).

Os novos centríolos só sofrem maturação antes da fase M do ciclo celular seguinte, adquirindo apêndices (*appendages*),  $\epsilon$ -Tubulina (Chang e Stearns,

2000), Nineína (Piel *et al.*, 2000), Cenexina e, provavelmente, outros componentes pericentriolares (Lange e Gull, 1996).

Ao longo do ciclo celular, também se dão alterações no PCM que rodeia os centríolos. Estas transformações parecem fornecer a base estrutural para a formação dos extremamente diferentes microtúbulos interfásicos e mitóticos. Em células em cultura interfásicas, o PCM contém pequenos agregados electronodensos, ou satélites, que circundam o centríolo parental. Durante a profase, os satélites desaparecem e são substituídos por um halo difuso, de marcação mais clara, que envolve o centríolo parental (Robbins *et al.*, 1968; Rieder e Borisy, 1981; Vorobjev e Chentsov, 1982).

### **2.2.2. Papel dos centrossomas no ciclo celular**

Estudos iniciais mostraram que as células animais são incapazes de se dividir na ausência de centrossomas (Maller *et al.*, 1976; Bornens *et al.*, 1987) e que, inversamente, uma célula possuidora de vários centrossomas, procura dividir-se a meio caminho entre todos eles (Rappaport, 1986). Assim, apesar de as células das plantas superiores e de alguns sistemas meióticos animais não apresentarem centrossomas, estes pareciam ser elementos chave na divisão celular mitótica das células animais, nomeadamente na formação do fuso bipolar mitótico. Mais recentemente, no entanto, diversas experiências têm questionado este papel. As primeiras suspeitas de que talvez os centrossomas não fossem requeridos para a mitose das células animais surgiram com os estudos de Berns e de Sawin (Berns e Richardson, 1977; Sawin e Mitchison, 1991b). Mais tarde, estes indícios foram cimentados por diversos trabalhos. Heald e os colegas demonstraram que, em extractos de oócitos de *Xenopus*, era possível formar fusos bipolares aparentemente normais à volta de *beads* de cromatina na ausência de centrossomas (Heald *et al.*, 1996). Khodjakov e o seu grupo mostraram que se podiam formar fusos bipolares normais em células vertebradas em cultura nas quais os centrossomas tinham sido destruídos por ablação por laser (Khodjakov *et al.*, 2000). A equipa de Megraw estudou uma estirpe de

*Drosophila* com uma mutação nula para a Centrossomina que, apesar de não possuir centrossomas mitóticos completamente funcionais, se desenvolvia normalmente até ao estágio adulto, sendo, todavia, estéril (Megraw *et al.*, 2001). Hinchcliffe e os seus colegas mostraram que, mesmo após a remoção microcirúrgica dos centrossomas de células do fígado do macaco verde africano, estas organizavam um fuso bipolar funcional e completavam a segregação cromossómica (Hinchcliffe *et al.*, 2001). Assim, apesar de o centrossoma ser o mais importante centro de nucleação dos microtúbulos, de os orientar e organizar e de manter os pólos do fuso focados, não parece ser essencial para a formação de um fuso bipolar mitótico, pelo menos em alguns tipos celulares. O mecanismo alternativo parece ser dependente da capacidade da cromatina de estabilizar localmente os microtúbulos e de várias proteínas motoras dos microtúbulos (para revisão, consultar Hyman e Karsenti, 1996; Karsenti e Vernos, 2001). De facto, os fusos acentrossomais parecem conter “pseudo-centrossomas”, que consistem em complexos de várias MAPs importantes para a formação e estabilidade dos pólos do fuso (Cullen e Ohkura, 2001; Theurkauf, 2001).

Por outro lado, os fusos que não possuem centrossomas convencionais são, invariavelmente, anastrais e, portanto, os centrossomas parecem ser necessários para nuclear os microtúbulos astrais e, além disso, ambos parecem ser importantes na determinação do posicionamento do fuso (Doe e Bowerman, 2001; Schuyler e Pellman, 2001; Segal e Bloom, 2001; Matsuura *et al.*, 2004). O posicionamento do fuso na célula é importante para vários processos fundamentais, incluindo a segregação adequada dos cromossomas, a distribuição assimétrica de determinantes do destino da célula, durante o desenvolvimento e divisões assimétricas, e a definição do plano da citocinese. No entanto, também existem estudos que indicam a existência de mecanismos não-centrossomais para a orientação do fuso (Giansanti *et al.*, 2001; Megraw *et al.*, 2001; Roegiers *et al.*, 2001).

Recentemente, quatro artigos, usando diferentes aproximações experimentais, forneceram evidências que associam a actividade do centrossoma

à finalização da citocinese e à progressão entre as fases G1 e S do ciclo celular (Khodjakov *et al.*, 2000; Hinchcliffe *et al.*, 2001; Khodjakov e Rieder, 2001; Piel *et al.*, 2001). Em geral, quando os centrossomas são eliminados, a maioria das células, apesar de formar fusos bipolares funcionais, atrasa a mitose antes da segregação cromossómica. Depois desta, muitas das células são incapazes de completar a citocinese, permanecendo ligadas por pontes intercelulares ou abortando a citocinese e formando células binucleadas. Parece haver dois mecanismos possíveis para o envolvimento dos centrossomas na citocinese: a activação directa das etapas finais da clivagem, proposta por Piel *et al.* (2001), baseada no facto de o centríolo materno se mover até à ponte intercelular antes de esta se estreitar e de os seus microtúbulos serem despolimerizados, ou a necessidade da presença dos centrossomas para a célula ultrapassar um ponto de controlo (*checkpoint*) monitorizador da conclusão da mitose, que seria activado na sua ausência.

Em conclusão, o centrossoma parece ter um papel fundamental na ulatimação da citocinese. Quanto às funções de nucleação dos microtúbulos e formação, organização e posicionamento do fuso mitótico, apesar de poderem ser efectivadas por processos não centrossomais, sempre que os centrossomas estão presentes são, preferencialmente e com maior precisão, realizadas através de mecanismos em que estes estão envolvidos.

### **2.2.3. Os centrossomas e o cancro**

No início do século XX, Theodor Boveri especulou que os centrossomas poderiam contribuir para a deficiente segregação cromossómica e aneuploidia vulgarmente observadas nas células tumorais (Bovery, 1914). De facto, quase todos os tumores humanos possuem centrossomas supernumerários e aberrantes, com alterações dramáticas no tamanho e forma, mas só recentemente se começaram a identificar alterações em determinantes moleculares centrossomais relacionadas com a tumorigénese. Vários componentes centrossomais parecem ser sobre ou subexpressos e/ou localizar-

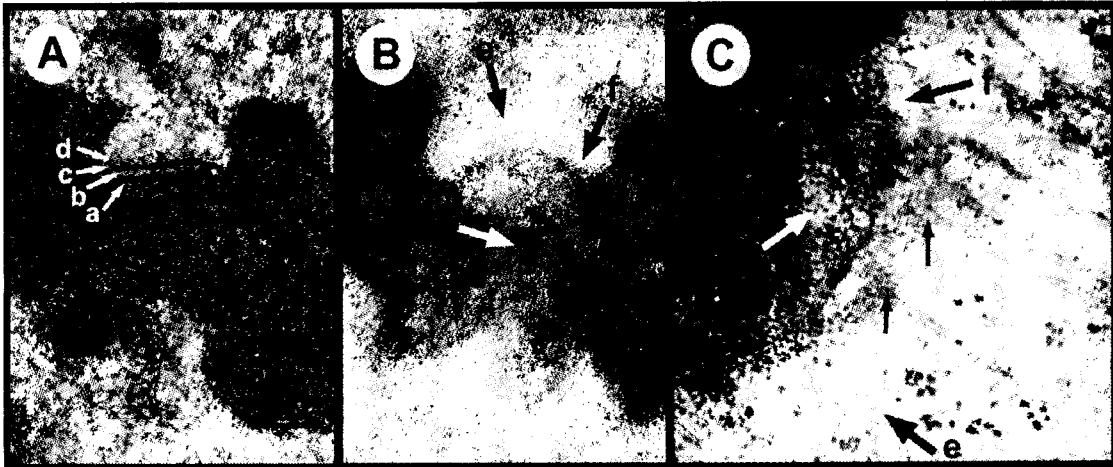
se ectopicamente em muitos tumores malignos, como a Pericentrina (Pihan *et al.*, 1998), a  $\gamma$ -Tubulina (Lingle *et al.*, 1998), a Centrina (Lingle *et al.*, 1998), as TACCs (Still *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000), a *Polo-like kinase* (Wolf *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1997; Knecht *et al.*, 1999; Tokumitsu *et al.*, 1999) e a Aurora A (Bischoff *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2000). O aparecimento de centrossomas supernumerários pode ter várias causas, entre elas a divisão celular abortada ou a fusão de células (Meraldi *et al.*, 2002) e a descoordenação entre a duplicação do centrossoma e a replicação do DNA (para revisão, consultar Duensing e Munger, 2002). No entanto, a progressão dos desarranjos centrossomais para a aneuploidia e desta para o cancro não está firmemente estabelecida e, além disso, parecem existir mais mecanismos conducentes à aneuploidia (este tema foi revisto por Marx, 2001; Nigg, 2002; Raff, 2002; Kong *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

### 2.3. O cinetocoro

A segregação dos cromátídeos, quer em mitose, quer em meiose, implica a sua interacção com os microtúbulos do fuso mitótico, mediada pelos cinetocoros (Fig. 3). Estes são estruturas elaboradas que se formam durante a profase e que contêm muitos tipos de proteínas, incluindo reguladores do ciclo celular e proteínas motoras dos microtúbulos. Análises proteómicas sugerem que este complexo contém mais de 65 proteínas e que ultrapassa o tamanho de um ribossoma. Os cinetocoros maduros têm uma organização semelhante a uma placa e encontram-se localizados à superfície dos centrómeros, que, na maioria das espécies, correspondem às constricções primárias dos cromossomas condensados. Porém, algumas espécies, como *C. elegans*, possuem cromossomas holocêntricos, nos quais os cinetocoros não se formam num local específico, mas ao longo do comprimento do cromossoma. O DNA centromérico é composto por sequências altamente repetitivas mas pouco homólogas entre os vários organismos. Contudo, os centrómeros e cinetocoros são estruturalmente

bastante similares entre espécies tão evolutivamente distantes como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster* e o Homem (revisito em Pidoux e Allshire, 2000; Bjerling e Ekwall, 2002; Blower *et al.*, 2002).

Até há pouco tempo, considerava-se que, a nível ultraestrutural, os cinetocoros dos vertebrados possuíam três camadas distintas, uma placa interna, uma camada central translúcida e uma placa externa (Brinkley e Stubblefield, 1966; Jokelainen, 1967). Por outro lado, Earnshaw mostrou que os cinetocoros dos mamíferos continham uma quarta camada, a coroa fibrosa, exterior a todas as outras, difícil de detectar na presença de microtúbulos (Earnshaw, 1994) (Fig. 9A). No entanto, mais recentemente, o grupo de McEwen e Rieder analisou a estrutura cinetocoriana, em células PtK1, utilizando métodos de preservação estrutural otimizados, nos quais se submetem as células a um congelamento a elevada pressão seguido de substituição do gelo. Estes estudos mostraram que o cinetocoro apresenta uma matriz de 50-75 nm de espessura, composta por um material fibroso claro, que se encontra directamente conectada à superfície da heterocromatina centromérica, mais electronodensa (McEwen *et al.*, 1998) (Fig. 9B e C). Esta matriz fibrosa corresponde à placa externa das preparações convencionais e está rodeada, na sua superfície citoplasmática, por uma extensa região, de 100-150 nm, que exclui os ribossomas e outros componentes citoplasmáticos. Esta zona de exclusão contém uma rede solta e muito clara de fibras finas (< 9 nm de diâmetro), análogas às da coroa fibrosa das preparações convencionais (McEwen *et al.*, 1998) (Fig. 9B e C). Também aqui, esta é mais difícil de visualizar na presença de microtúbulos (Fig. 9C). Estes autores defendem que a anterior observação da denominada camada central era devida a um artefacto produzido durante os procedimentos de fixação ou desidratação habituais (McEwen *et al.*, 1998). É de notar ainda que, com o método de congelamento a alta pressão, a heterocromatina centromérica apresenta uma aparência manchada, contrastando com o resto do cromossoma, mais electronodenso e uniforme (Fig. 9B e C).



**Figura 9.** Comparação da estrutura do cinetocoro em células PtK1, tratadas com colcemida (A e B) ou não tratadas (C), quando preparadas pelos métodos convencionais (A) ou através de congelamento a elevada pressão seguido de substituição do gelo, procedimento que minimiza as alterações estruturais (B e C). a - placa/lâmina interna; b - camada central; c - lâmina externa; d - coroa fibrosa; e - zona de exclusão citoplasmática; f - matriz fibrosa; setas brancas grandes - heterocromatina centromérica, de aparência manchada e mais clara que o resto do cromossoma; setas pretas pequenas - extremidades (+) de microtúbulos cinetocorianos. (Imagens retiradas de [www.wadsworth.org/BMS/SCBlinks/mcewen/](http://www.wadsworth.org/BMS/SCBlinks/mcewen/)).

O centrómero interno possui proteínas como a Aurora B, a CENP-B, a MCAK e a INCENP (Biggins e Walczak, 2003). A placa interna do cinetocoro encontra-se enriquecida num grupo de proteínas específicas de ligação ao DNA, as CENPs. Estas incluem a CENP-A (ou CenH3), parecida com a Histona H3, a CENP-B e a CENP-C (revisto em Cleveland *et al.*, 2003). Também a MCAK se localiza nesta zona. Da placa externa fazem parte as proteínas motoras dos microtúbulos CENP-E (proteína relacionada com as cinesinas) e Dineína citoplasmática (Biggins e Walczak, 2003). A coroa fibrosa envolve a CENP-E, a Dineína citoplasmática e proteínas com ela complexadas, como a Dinactina, a Zw10, a Rod, a LIS1 e a CLIP-170, e as proteínas do ponto de controlo do fuso Mad1, Mad2, Bub1, BubR1 e Bub3 (para revisão, ver Rieder e Salmon, 1998; Maney *et al.*, 2000; Shah e Cleveland, 2000; Hoyt, 2001).



### 2.3.1. Função dos cinetocoros

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a interacção dos cinetocoros com os microtúbulos aumenta a sua estabilidade (Mitchison *et al.*, 1986; Zhai *et al.*, 1995; Hunt e McIntosh, 1998). Por outro lado, uma apropriada ligação dos cinetocoros aos microtúbulos do fuso é necessária para a geração, por proteínas motoras neles situadas, de forças nos cromossomas que, conjuntamente com as forças de ejeção polar e a resistência entre os cromatídeos irmãos, são essenciais para a mobilidade dos centrómeros, a congregação na placa metafásica e a segregação cromossómica (Nicklas, 1989; Skibbens *et al.*, 1993; Inoue e Salmon, 1995; Dogterom e Yurke, 1997; Rieder e Salmon, 1998; Khodjakov *et al.*, 1999; McIntosh *et al.*, 2002; Scholey *et al.*, 2003). A última função dos cinetocoros, não menos importante, é monitorizar a sua correcta ligação aos microtúbulos, através das proteínas *spindle-assembly checkpoint*.

### 2.4. Matriz do fuso

Mantém-se controversa a existência ou não de um elemento estrutural do aparelho mitótico que se supõe constituir uma “armação” (*scaffold*) distinta dos microtúbulos, a designada matriz do fuso (revisto em Scholey *et al.*, 2001; Wells, 2001). Várias proteínas parecem fazer parte desta matriz, como a Skeletor (Walker *et al.*, 2000), o motor Eg5 (Kapoor e Mitchison, 2001) e a Megator (Qi *et al.*, 2004).

### 2.5. Proteínas reguladoras dos microtúbulos

Como referido anteriormente, os microtúbulos *in vivo* alongam mais rapidamente e sofrem maior número de catástrofes do que os microtúbulos polimerizados a partir de Tubulina pura à mesma concentração, sugerindo a existência, nas células, de promotores e desestabilizadores do seu crescimento. Entre as proteínas envolvidas na regulação da dinâmica dos microtúbulos,

encontram-se os motores baseados nos microtúbulos, as proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) e os factores desestabilizadores de microtúbulos. Muitos destes factores são, por sua vez, regulados temporal e espacialmente por cinases e fosfatases. Por exemplo, sabe-se que a fosforilação inactiva a maioria das MAPs (Ebner *et al.*, 1999), assim como o factor desestabilizador dos microtúbulos Op18/Statmin1 (Cassimeris, 2002).

### **2.5.1. Motores dependentes dos microtúbulos**

Os motores dependentes dos microtúbulos são ATPases capazes de mover os microtúbulos na direcção da sua extremidade (+) ou (-). São essenciais para a formação e função do fuso mitótico. Existem três classes principais destes motores: a Dineína citoplasmática, as cinesinas bipolares e as cinesinas C-terminais.

As dineínas constituem os maiores e mais complexos motores celulares. A Dineína citoplasmática está envolvida em múltiplas actividades, tais como o transporte intracelular, a migração nuclear e a formação e orientação do fuso mitótico (revisto em Karki e Holzbaumer, 1999). Trata-se, também, de um motor direccionado para a extremidade (-) dos microtúbulos, que parece agir coordenada e interdependentemente com as cinesinas direccionadas para a extremidade (+) (Martin *et al.*, 1999; Duncan e Warrior, 2002; Gross *et al.*, 2002).

As cinesinas e proteínas com elas relacionadas formam uma grande família de motores moleculares que transportam vesículas, organelos (mitocôndrias, peroxissomas, lisossomas), complexos proteicos e mRNAs de um modo dependente dos microtúbulos. Entre elas encontram-se as cinesinas bipolares e as cinesinas C-terminais.

As cinesinas bipolares ou tetraméricas, que incluem os motores BimC/Eg5/KLP61F, são direccionadas para a extremidade (+) dos microtúbulos e têm uma morfologia bipolar, com domínios motores de ambos os lados de uma haste central (Cole *et al.*, 1994; Kashina *et al.*, 1996; Gordon e Roof, 1999).

Funcionalmente, parecem ser essenciais na separação dos pólos do fuso e na organização dos microtúbulos de uma forma bipolar (Hagan e Yanagida, 1990; Hoyt *et al.*, 1992; Sawin *et al.*, 1992; Heck *et al.*, 1993). Pensa-se que estas funções sejam devidas a uma actividade de ligação cruzada (*cross-linking*), que dispõe os microtúbulos paralelos em feixe e afasta os microtúbulos antiparalelos, fazendo-os deslizar entre si (Hoyt *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 1999b). As que se localizam nos braços dos cromossomas contribuem para a interacção dos cinetocoros com os microtúbulos e para o movimento em direcção à placa metafásica (Heald, 2000).

As cinesinas C-terminais, que incluem a proteína Ncd/Kar3p, são motores direccionados para a extremidade (-) e exercem forças que antagonizam a actividade das cinesinas bipolares durante a mitose (Endow *et al.*, 1990; McDonald e Goldstein, 1990; McDonald *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1990; Saunders e Hoyt, 1992; Hoyt *et al.*, 1993; O'Connell *et al.*, 1993; Endow *et al.*, 1994; Pidoux *et al.*, 1996; Saunders *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1999a). Têm um papel relevante na focagem das extremidades (-) dos microtúbulos nos pólos do fuso mitótico (Gaglio *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2000a) e, tal como as cinesinas bipolares, actuam através da ligação cruzada dos microtúbulos (McDonald *et al.*, 1990; Chandra *et al.*, 1993; Pidoux *et al.*, 1996; Karabay e Walker, 1999).

A morfogénese do fuso mitótico é dirigida por um balanceamento entre as actividades opostas dos vários motores.

### **2.5.2. Factores desestabilizadores dos microtúbulos**

Como desestabilizadores dos microtúbulos, conhecem-se a Catanina (McNally e Vale, 1993), a Op18/Statmina (Belmont e Mitchison, 1996) e alguns motores da subfamília KinI de cinesinas, como a MCAK/XKCM1/Klp5/6 (Wordeman e Mitchison, 1995; Walczak *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2002) e a XKIF2 (Desai *et al.*, 1999). De entre estes, os membros da subfamília KinI

parecem ser os principais reguladores negativos da polimerização dos microtúbulos (Maney *et al.*, 2001; Kline-Smith e Walczak, 2002).

A Catanina foi o primeiro factor desestabilizador dos microtúbulos a ser descoberto (Vale, 1991; McNally e Vale, 1993). É uma ATPase que funciona como um factor de cisão (*severing factor*), gerando novas extremidades dos microtúbulos, cujas subunidades de Tubulina não estão ligadas ao GTP e, conseqüentemente, começam a despolimerizar (McNally e Vale, 1993; McNally, 2000).

A Op18/Statmina é uma proteína citosólica que aumenta a frequência de catástrofes; pensa-se que sequestre os dímeros de Tubulina, que promova a hidrólise do GTP e/ou que estabilize a conformação curva dos protofilamentos em estado de despolimerização (Belmont e Mitchison, 1996; Curmi *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1999; Gigant *et al.*, 2000).

As cinesinas da família KinI actuam estabilizando a estrutura curva e aberta para fora dos protofilamentos das extremidades dos microtúbulos que estão a despolimerizar (Ogawa *et al.*, 2004). A MCAK parece funcionar como desestabilizador das ligações inadequadas entre os microtúbulos e os cinetocoros (Kline-Smith *et al.*, 2004) e a sua localização e actividade são reguladas pela cinase Aurora B (Andrews *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2004; Ohi *et al.*, 2004). A XKCM1 parece ser necessária para a formação do fuso mitótico (Walczak *et al.*, 1996; Kline-Smith e Walczak, 2002). Outras cinesinas KinI parecem ter particular importância no movimento dos cromátídeos durante a anafase.

### **2.5.3. MAPs**

Tradicionalmente, são denominadas de Proteínas Associadas aos Microtúbulos, ou MAPs, as proteínas não motoras estabilizadoras dos microtúbulos. No entanto, recentemente, descobriu-se que algumas das proteínas pertencentes a este grupo têm uma função contrária, desestabilizando estas estruturas. A maioria das MAPs ligam-se à superfície do microtúbulo,

interactuando com várias subunidades de Tubulina e, possivelmente, neutralizando a carga negativa repulsiva da superfície do microtúbulo.

A família MAP4/XMAP230/DMAP205 foi a primeira a ser descrita como estimuladora da polimerização da Tubulina (Bulinski e Borisy, 1980; Goldstein *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1994). A MAP4/XMAP230 localiza-se nos microtúbulos interfásicos e mitóti-cos (Bulinski e Borisy, 1980; Andersen *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1995). A MAP4 parece actuar especificamente através da promoção do resgate (Ookata *et al.*, 1995), enquanto a XMAP230 reduz, sobretudo, a frequência de catástrofe (Andersen *et al.*, 1994) e inibe a actividade da Catanina (McNally *et al.*, 2002). Estas MAPs são requeridas para a formação do fuso mitótico (Cha *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 1999; Holmfeldt *et al.*, 2003) e a sua actividade é regulada através da fosforilação (Andersen *et al.*, 1994; Ookata *et al.*, 1995; Shiina e Tsukita, 1999; Chang *et al.*, 2001).

Conhecem-se várias outras MAPs. A Tau é uma proteína multifuncional, presente em células neuronais e não-neuronais, e mutações no seu gene estão relacionadas com diferentes tipos de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (revisto em Johnson e Bailey, 2002). A XMAP310 aumenta a frequência de resgate (Andersen e Karsenti, 1997). A TPX2 está implicada na nucleação e estabilização dos microtúbulos (Wittmann *et al.*, 2000) e medeia a ligação aos microtúbulos da cinesina Xklp2 (Wittmann *et al.*, 1998) e da cinase Aurora A (Kufer *et al.*, 2002). Algumas MAPs, denominadas de +TIPs, ligam-se essencialmente às extremidades dos microtúbulos (ver subcapítulo 2.5.4).

A família de MAPs ch-TOG/XMAP215/Msps/Zyg-9/Dis1/Stu2p é uma das mais bem estudadas. A XMAP215, de *Xenopus laevis*, foi descoberta como um factor promotor da polimerização dos microtúbulos nas extremidades (+) (Gard e Kirschner, 1987) e tem a capacidade inusitada de aumentar as velocidades de alongamento e de encurtamento sem afectar as frequências de resgate e de catástrofe (Vasquez *et al.*, 1994). Ela e a Stu2p, de *S. cerevisiae*, parecem actuar impedindo os microtúbulos de entrar num estado de pausa (Kosco *et al.*, 2001; Shirasu-Hiza *et al.*, 2003). A XMAP215 protege as extremidades (+) da actividade

promotora de catástrofes da cinesina XKCM1, da subfamília KinI (Tournebize *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001). Evidências recentes indicam que a XMAP215 também é capaz de promover a despolimerização dos microtúbulos em extractos de oócitos de *Xenopus* (Shirasu-Hiza *et al.*, 2003). Apesar de esta actividade parecer ser específica das extremidades (+), pensa-se que, nos centrossomas, a XMAP215 ajude, possivelmente, a despolimerizar os microtúbulos que estão mal orientados, isto é, com a extremidade (-) virada para fora (Bellanger e Gonczy, 2003). Nos outros organismos, os homólogos da XMAP215 podem ou estabilizar ou desestabilizar os microtúbulos. A ch-TOG, de *Homo sapiens*, estimula a formação de microtúbulos (Charrasse *et al.*, 1998), sendo necessária para a formação dos ásteres em extractos de HeLa (Dionne *et al.*, 2000). Mutações na Zyg-9, de *C. elegans* (Matthews *et al.*, 1998; Bellanger e Gonczy, 2003; Srayko *et al.*, 2003), ou na MOR1, de *Arabidopsis* (Whittington *et al.*, 2001), resultam em microtúbulos mais curtos que o normal. Em contraste, a Stu2p, de *S. cerevisiae*, diminui a polimerização e promove as catástrofes nos microtúbulos (Kosco *et al.*, 2001; van Breugel *et al.*, 2003) e os homólogos de *S. pombe*, Dis1 e Alp14, funcionam sinergicamente com as proteínas Klp5/6, cinesinas do tipo KinI, pelo que também parecem desestabilizar os microtúbulos (Garcia *et al.*, 2002). Todos os membros da família XMAP215/Dis1 se localizam nos centrossomas/corpos polares do fuso (Nabeshima *et al.*, 1995; Wang e Huffaker, 1997; Charrasse *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 1998; Cullen *et al.*, 1999; Gräf *et al.*, 2000), onde poderão contribuir para a nucleação (Lee *et al.*, 2001; Popov *et al.*, 2002) ou ancoragem (Usui *et al.*, 2003) dos microtúbulos ou para a biogénese do centrossoma (Cullen *et al.*, 1999; Gräf *et al.*, 2000; Gergely *et al.*, 2003; Gräf *et al.*, 2003).

#### **2.5.4. Proteínas que se ligam às extremidades (+) dos microtúbulos**

As proteínas que se ligam às extremidades (+) dos microtúbulos (+TIPs) constituem uma população de proteínas bastante heterogénea, a qual inclui diversas MAPs. Em geral, pensa-se que co-polimerizem com as novas subunidades de Tubulina ou que se liguem especificamente a uma conformação

especial da extremidade do microtúbulo (Rickard e Kreis, 1990; Diamantopoulos *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999). Podem-se atribuir quatro funções, não mutuamente exclusivas, às proteínas que se concentram nas extremidades dos microtúbulos: regulação da dinâmica dos microtúbulos, ligação dos microtúbulos à periferia da célula, regulação da proteína motora Dineína e interacção dos microtúbulos com os cinetocoros (Galjart e Perez, 2003).

A primeira proteína documentada com este tipo de localização foi a CLIP-170 (Perez *et al.*, 1999), que permite a ligação das extremidades (+) aos cinetocoros, a vesículas de endocitose ou à membrana celular (Pierre *et al.*, 1992; Rickard e Kreis, 1996; Howard e Hyman, 2003). Esta +TIP promove o resgate e a nucleação dos microtúbulos (Arnal *et al.*, 2004). A CLIP-170 de mamíferos parece ligar-se directamente às extremidades em crescimento e “caminhar”, depois, ao longo delas para manter a sua associação. Por outro lado, as homólogas Bik1, de *S. cerevisiae*, e tip1p, de *S. pombe*, formam complexos, respectivamente, com as cinesinas Kip2 e tea2p, que as transportam para as extremidades (+) (Busch *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004). Este mecanismo de transporte é comum a outras +TIPs, sendo esta uma das formas como as cinesinas contribuem para a estabilização dos microtúbulos (Browning *et al.*, 2003). A CLIP-170 altera a dinâmica dos microtúbulos através do processo de resgate, estabilizando-os, e só se localiza nas extremidades em crescimento (Perez *et al.*, 1999; Komarova *et al.*, 2002a). Adicionalmente, está demonstrado que a CLIP-170 recruta, para as extremidades (+), a Dinactina, que por sua vez associa a proteína motora Dineína (Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). A LIS1 é outra +TIP, que contribui para a redução do número de catástrofes *in vitro* (Sapir *et al.*, 1997) e que interacciona com a Dineína (Tai *et al.*, 2002). Através da ligação da LIS1, a Dineína consegue libertar da CLIP-170, podendo depois ligar-se directamente aos microtúbulos e exercer o seu papel de transportadora na direcção das extremidades (-) (Tai *et al.*, 2002). A actividade da CLIP-170 é regulada por fosforilação (Rickard e Kreis, 1991; Choi *et al.*, 2002).

A CLIP-115 é outra CLIP, mais abundante nas dendrites neuronais. Compete com a CLIP-170 para a ligação às extremidades (+) dos microtúbulos, o que pode interferir na regulação da Dineína (Hoogenraad *et al.*, 2002).

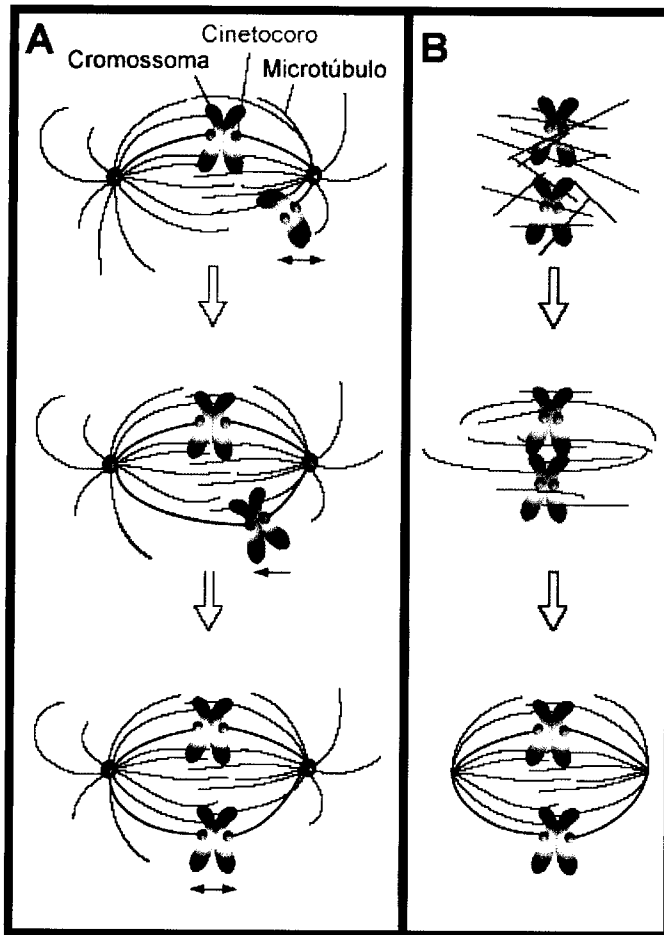
A família de proteínas EB1/Bim1p/mal3p é muito conservada (Beinhauer *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001; Rehberg e Graf, 2002) e localiza-se ao longo dos microtúbulos interfásicos e mitóticos, acumulando-se nas extremidades em crescimento (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000; Rehberg e Graf, 2002). A sua associação às extremidades dos microtúbulos não depende de proteínas motoras e pode ser explicada por uma afinidade preferencial por uma propriedade estrutural ou química específica das extremidades (+) (Tirnauer *et al.*, 2002). A EB1 parece provocar um aumento da frequência de resgate e uma diminuição dos estados de pausa, das catástrofes e da velocidade de despolimerização (Tirnauer *et al.*, 2002).

A APC localiza-se nas extremidades dos microtúbulos, necessitando, para isso, de uma ligação indirecta às cinesinas KIF3A e KIF3B (Cui *et al.*, 2002; Jimbo *et al.*, 2002). Promove a polimerização dos microtúbulos, estabilizando-os (Munemitsu *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Zumbunn *et al.*, 2001).

## 2.6. Formação do fuso mitótico

Em vertebrados, o modelo predominante para explicar a formação do fuso bipolar mitótico é o chamado “procura e captura” (Kirschner e Mitchison, 1986) (Fig. 10A). De acordo com ele, a extremidade (+) do microtúbulo em crescimento sonda o espaço até ser capturada pelo cinetocoro (Holy e Leibler, 1994). A ligação inicial do cromossoma aos microtúbulos de um dos pólos realiza-se por conexões laterais, causando o seu rápido movimento na direcção desse pólo. A partir do momento em que se forma uma conexão estável com a ponta do microtúbulo, o cromossoma mono-orientado começa a oscilar, alcançando a biorientação através da interacção com os microtúbulos que emanam do pólo oposto do fuso (Fig. 10A).





**Figura 10.** Formação do fuso bipolar. **A** - modelo "procura e captura"; **B** - modelo de auto-organização do fuso. (Adaptada de Biggins e Walczak, 2003).

Na ausência de centrosomas, quer em sistemas meióticos, quer quando estes são extraídos, o mecanismo de formação do fuso bipolar não pode ser explicado por este modelo. Durante este processo de auto-organização do fuso, parece que os microtúbulos são nucleados a partir da cromatina, mesmo na ausência de cinetocoros, e depois organizados por proteínas motoras dos microtúbulos, de modo a formarem um arranjo bipolar (Heald *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1998) (Fig. 10B). Parece desenvolver-se um gradiente espacial de Ran-GTP activa em volta dos cromossomas (Walczak, 2001), responsável pela promoção da formação do fuso nessa zona (Walczak *et al.*, 1998; Kalab *et al.*, 2002). Existe, ainda, um terceiro caso, em que o fuso bipolar é formado a partir dos centrosomas e na ausência de quaisquer cromossomas, como acontece em espermátocitos de alguns mutantes de *Drosophila* (Bucciarelli *et al.*, 2003). Em conclusão, parece haver vários mecanismos a promover a formação do fuso, funcionando combinadamente na maior parte dos casos (Gadde e Heald, 2004).

Comum a todos eles é a necessidade da participação das proteínas associadas aos microtúbulos.

## 2.7. Movimento dos cromátídeos em metafase e anafase

Após a interacção com o cinetocoro, a fibra cinetocoriana, um feixe de aproximadamente vinte microtúbulos, exhibe polimerização e despolimerização coordenadas, conduzindo à congregação dos cromossomas na placa metafásica. O fuso metafásico é uma estrutura dinâmica, na qual existe um balanceamento entre as forças produzidas pelo deslizamento dos microtúbulos antiparalelos, pela polimerização nas extremidades (+) dos microtúbulos e pela despolimerização perto dos pólos (Mitchison, 1989; Sawin e Mitchison, 1991a; Brust-Mascher e Scholey, 2002; Maddox *et al.*, 2002). Logo que todos os cromossomas se encontram adequadamente ligados aos microtúbulos e alinhados, inicia-se a anafase.

Após a separação, os cromátídeos irmãos são transportados para os pólos opostos do fuso à medida que as fibras cinetocorianas vão encurtando. Uma questão ainda por resolver diz respeito ao local de despolimerização dos microtúbulos durante esta fase, tendo sido propostos dois modelos. Segundo o modelo *Pac-Man*, a deslocação dos cromátídeos em direcção ao pólo é devida à despolimerização nas extremidades (+) dos microtúbulos cinetocorianos (Mitchison *et al.*, 1986; Gorbsky *et al.*, 1987). No modelo *poleward flux* ou *traction fiber*, os cinetocoros ancoram os microtúbulos cinetocorianos e os cromátídeos são puxados para os pólos através da despolimerização das extremidades (-) destes microtúbulos (Mitchison, 1989). Variados trabalhos têm surgido a apoiar cada um dos modelos. Resultados recentes mostram que, em anafase, as kinesinas KLP59C e KLP10A, dois motores da família KinI de *Drosophila*, são funcionalmente distintas (Rogers *et al.*, 2004). A KLP59C é necessária para a despolimerização das extremidades (+) dos microtúbulos cinetocorianos, contribuindo para a mobilidade dos cromátídeos através de um mecanismo do

tipo *Pac-Man* (Rogers *et al.*, 2004). Por outro lado, a KLP10A é requerida para a despolimerização dos microtúbulos nas suas extremidades (-), permitindo a migração dos cromátídeos através de um *poleward flux* (Rogers *et al.*, 2004). Sabe-se, também, que a Eg5 está envolvida no *poleward flux* (Miyamoto *et al.*, 2004) e que o movimento dos cromátídeos na direcção dos pólos requer, ainda, a presença, nos cinetocoros, da Dineína, complexada com a Dinactina, a Zw10 e a Rod (Savoian *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2000b). Baseadas nestes e noutros dados, Gadde e Heald (2004) propuseram o modelo *feeder and chipper* (“alimentador e cinzelador”), segundo o qual o deslocamento dos cromátídeos em direcção aos pólos em Anafase A depende das despolimerizações combinadas em ambas as extremidades dos microtúbulos cinetocoríacos. Ao nível do cinetocoro, a Dineína citoplasmática (um “alimentador”) dirige os microtúbulos cinetocoríacos na direcção da extremidade (+), ao encontro da cinesina MCAK/KLP59C (um “cinzelador”) e, nos pólos do fuso, a Eg5/KLP61F funciona como “alimentador”, direccionando os microtúbulos para a extremidade (-), onde se encontra o “cinzelador” KIF2/KLP10A (Gadde e Heald, 2004). As mesmas autoras defendem, ainda, a contribuição destes mecanismos para o movimento dos cinetocoros durante o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica (Gadde e Heald, 2004).

### 3. Objectivos deste trabalho

O organismo utilizado neste trabalho foi a *Drosophila melanogaster*, modelo ideal para a investigação dos mecanismos envolvidos no ciclo celular, uma vez que estes são extremamente bem conservados nos eucariotas superiores. Além disso, este organismo-modelo apresenta outras vantagens, como ter um ciclo de vida curto, estar muito bem caracterizado, quer a nível genético, quer molecular, e, presentemente, ter o seu genoma sequenciado. Adicionalmente, existe uma extensa colecção de mutantes de *Drosophila* provocados pela inserção de elementos de transposição, que permitem, após a

selecção dos possuidores de determinadas alterações, por exemplo mitóticas, uma fácil identificação das proteínas lesadas, através da clonagem das regiões genómicas que flanqueiam o elemento P (Rubin e Spradling, 1982; Spradling e Rubin, 1982; Cooley *et al.*, 1988).

A investigação subjacente a esta tese de doutoramento tinha como objectivos a análise fenotípica do mutante *v40*, ou *mast*, e a identificação e caracterização da proteína nele afectada. Nesse intuito, examinaram-se *in situ* e *in vivo* as alterações mitóticas ocorridas em alelos *mast* e identificou-se a proteína neles lesada, a Mast. Verificou-se que a Mast pertence a uma família altamente conservada nos eucariotas. Estudou-se a sua expressão ao longo do desenvolvimento e a sua localização intracelular *in situ* e *in vivo*. Delimitaram-se os domínios responsáveis pela sua localização nas diferentes estruturas celulares e mostrou-se que a Mast é uma MAP.

## **II. Resultados**

## 1. O mutante *v40* (*mast*<sup>P1</sup>)

O alelo *v40* (*mast*<sup>P1</sup>) de *Drosophila melanogaster* foi produzido por mutagénese através da inserção do elemento P{1ArB} (ver "Material e Métodos"), por Omel'yanchuk *et al.* (1997). Trata-se de um mutante recessivo e a estirpe encontra-se balanceada com *TM6, Tb* e. Foi identificado como tendo um fenótipo mitótico (Omel'yanchuk *et al.*, 1997) e descrito como possuindo fusos mitóticos monopolares, figuras mitóticas circulares e células poliplóides (Fedorova *et al.*, 1997).

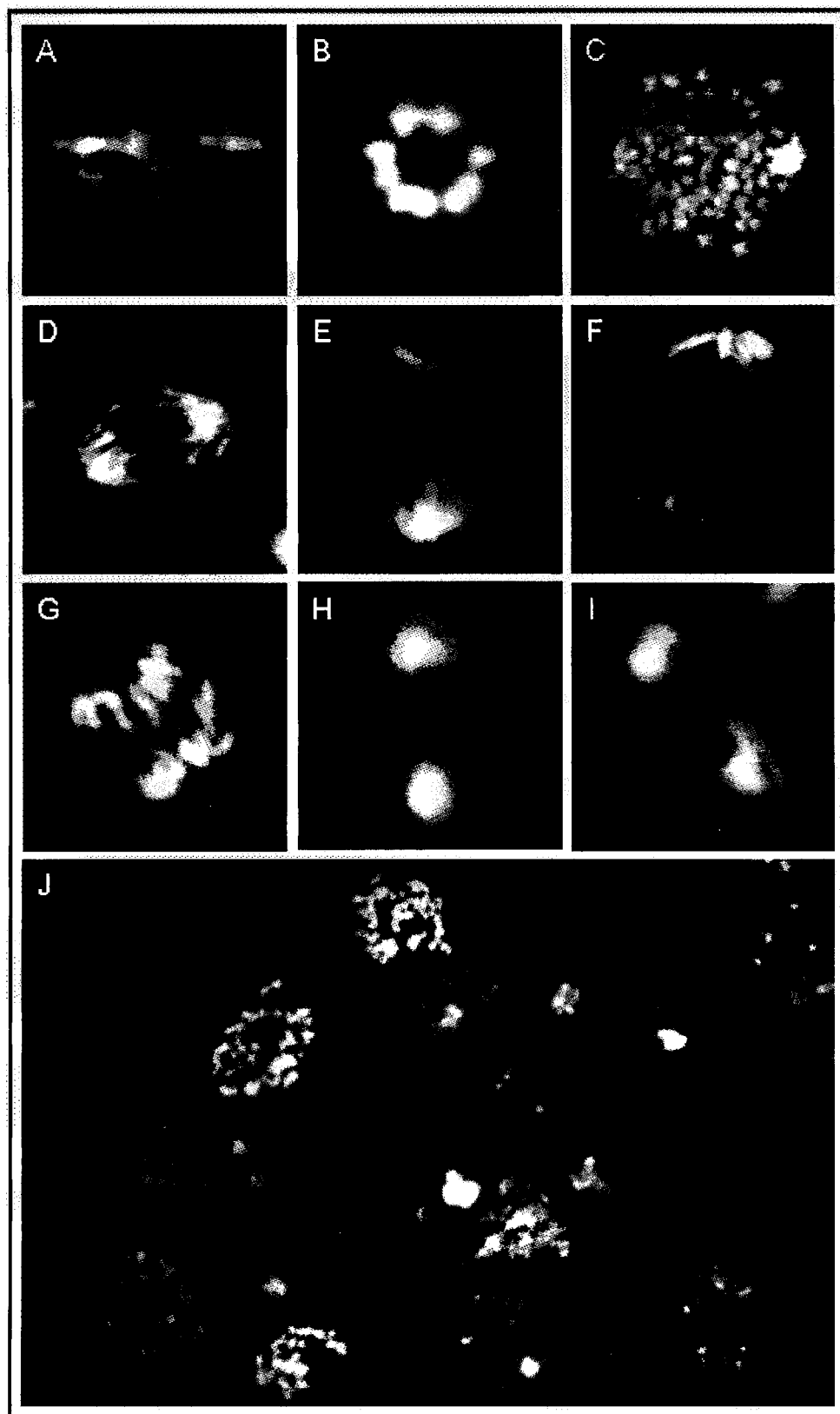
### 1.1. Caracterização do fenótipo do mutante *v40* (*mast*<sup>P1</sup>)

Os indivíduos homozigóticos *v40* morrem, na sua maioria, no final da fase pupal. Alguns alcançam o estado adulto, sendo, no entanto, inférteis e com dificuldades locomotoras e falecendo pouco depois da eclosão. Como mostrado na secção 3.1.2., é provável que se trate de um alelo hipomórfico causado por uma diminuição na expressão da proteína afectada, sendo este nível de expressão aparentemente suficiente para permitir uma sobrevivência bastante prolongada dos indivíduos afectados.

O fenótipo mitótico do mutante *v40* foi estudado através da análise citológica de cérebros de larvas homozigóticas da terceira fase. Na Figura 1 estão alguns exemplos de neuroblastos característicos deste mutante, com alterações tais como cromossomas muito condensados (B,C,J), aneuploidia (E,F,G), poliploidia (C,J), cromossomas em arranjo circular (B), pólos desorganizados (F,G), fusos desorganizados (H) e cromossomas em atraso (*lagging*) em anafase e telofase (I).

Também são frequentes figuras mitóticas com vários centrossomas, de cada um dos quais irradiam ásteres (Lemos *et al.*, 2000), pelo que este *locus* foi denominado *mast* (*multiple asters*) e este alelo *mast*<sup>P1</sup>.

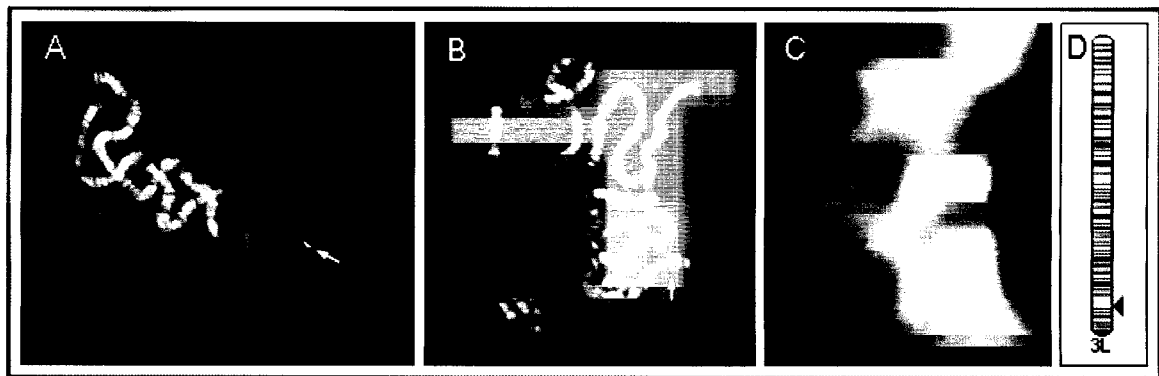
## II. Resultados



**Figura 1.** Análise citológica do fenótipo mitótico em neuroblastos larvares do mutante *mast<sup>P1</sup>* (B-C e E-J) e da estirpe selvagem Oregon-R (A e D). J - panorama geral de uma parte de um cérebro. O DNA foi corado com iodeto de propídeo.

## 1.2. Localização citológica do gene afectado

Através de hibridação *in situ*, em cromossomas politénicos de glândulas salivares de larvas de *Drosophila* da terceira fase homocigóticas para o alelo *mast*<sup>P1</sup>, e usando como sonda o vector pBluescript II KS, cuja sequência se encontra contida no P{1ArB}, verificou-se que este mutante possui uma única inserção do transposão (Fig. 2A). Esta foi mapeada na região citológica 78C1-C2, no braço L do cromossoma 3. Mais tarde, o cDNA *mast*, à frente identificado como LD11488, também foi utilizado na produção de uma sonda que, por hibridação na estirpe selvagem, confirmou essa localização (Fig. 2B).



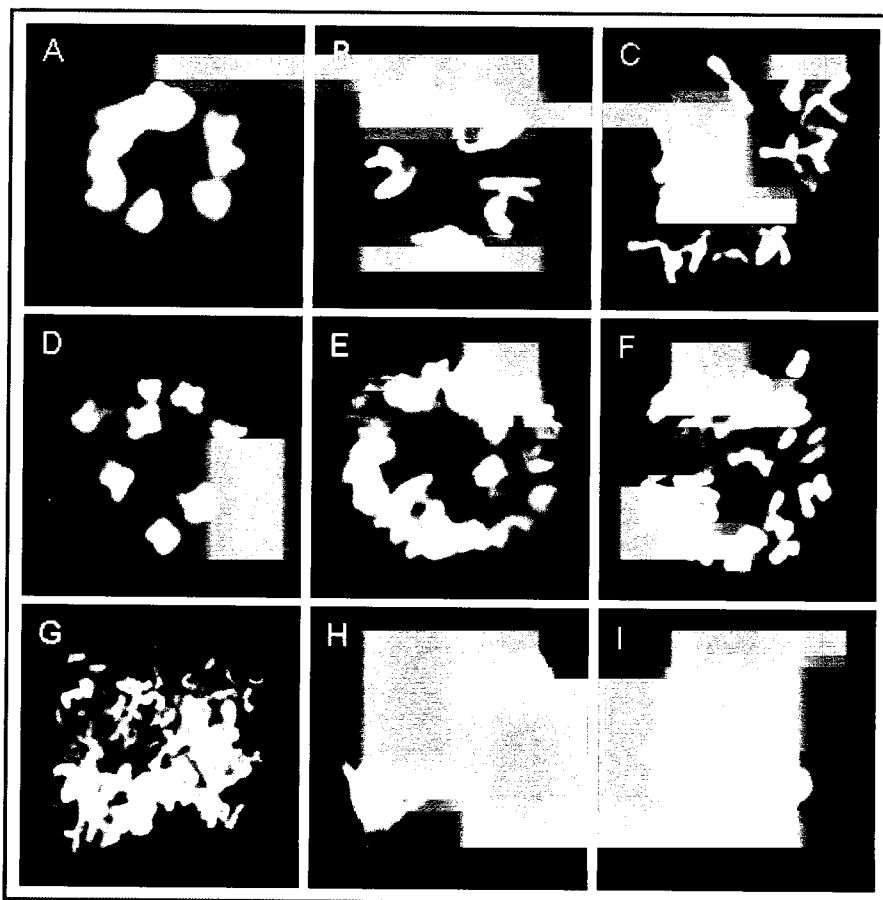
**Figura 2.** Localização citológica do gene *mast* em cromossomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. O DNA, corado com iodeto de propídeo, está a vermelho e as bandas marcadas, assinaladas com setas em A e B, a verde/amarelo. Mapeou-se o *locus* em 78C1-C2 através da utilização de sondas de: **A** - vector pKS (parte do elemento P), em cromossomas de glândulas salivares de larvas *mast*<sup>P1</sup> homocigóticas; **B** - cDNA *mast* (LD11488), numa estirpe selvagem; **C** - cDNA *mast* (LD11488), em hemizigóticos *Oregon-R/Df(3L)31A* (ampliação); **D** - representação esquemática da localização citológica do gene *mast* no cromossoma 3L (adaptado de <http://www.ensembl.org>).

## 1.3. Análise genética da mutação *mast*<sup>P1</sup>

No intuito de confirmar se o fenótipo do mutante era causado pela inserção do elemento P indicado, foi realizado um cruzamento com a estirpe *Df(3L)31A*, na qual, segundo a descrição, foi eliminada a região genómica 78A-E (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), devendo incluir o *locus mast*. Os indivíduos



hemizigóticos *mast<sup>P1</sup>/Df(3L)31A* apresentam um fenótipo semelhante, apesar de ligeiramente mais severo, ao dos homozigóticos para a mutação (Fig. 3), pelo que parece ser a alteração desta zona a responsável pelo fenótipo observado. Assim, também se encontram neuroblastos de larvas hemizigóticas *mast<sup>P1</sup>/Df(3L)31A* com cromossomas altamente condensados (Fig. 3A e D-F), aneuploidia (Fig. 3B-D), poliploidia (Fig. 3E-G), cromossomas em arranjo circular (Fig. 3A e E), pólos desorganizados (Fig. 3I), fusos desorganizados (Fig. 3H) e cromossomas em atraso (*lagging*) (Fig. 3I).



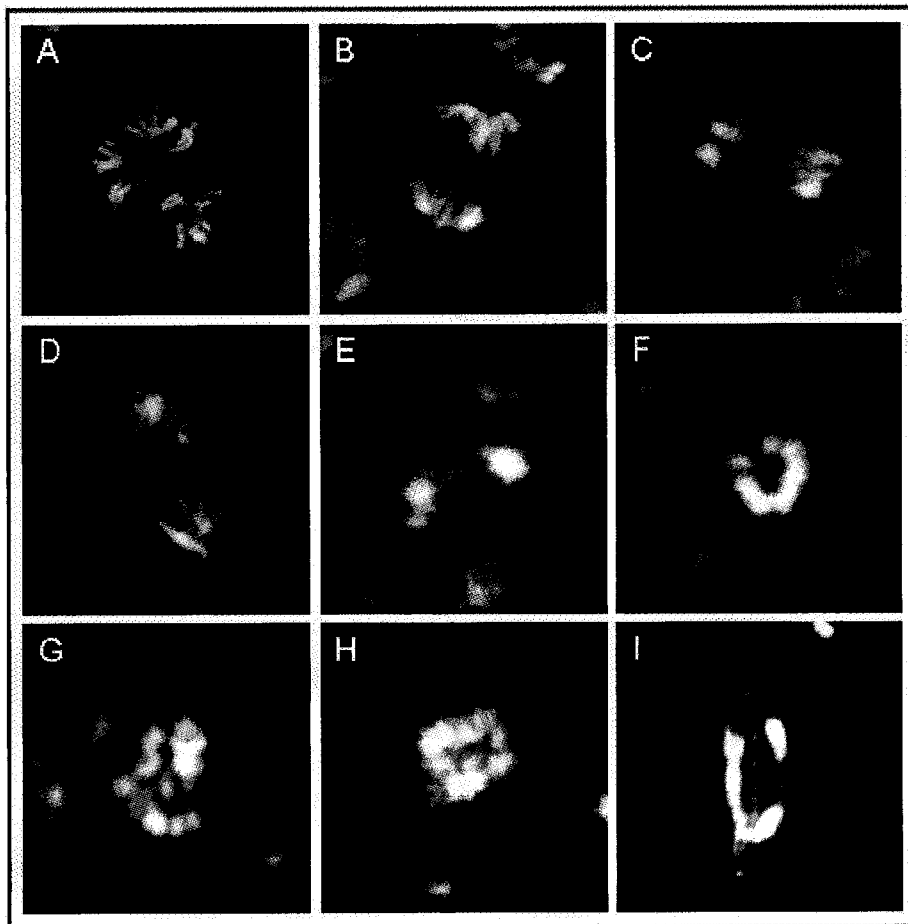
**Figura 3.** Fenótipo mitótico dos neuroblastos de larvas hemizigóticas *mast<sup>P1</sup>/Df(3L)31A*. O DNA foi corado com iodeto de propídeo.

Também foi mapeado o *locus mast* em cromossomas de glândulas salivares de larvas hemizigóticas *Oregon-R/Df(3L)31A*, utilizando a sonda de cDNA *mast* (LD11488). Nesta estirpe, como foi eliminada a região 78A-E num dos

cromossomas, apenas a metade da banda correspondente ao alelo do tipo selvagem possui o gene *mast* e se encontra marcada (Fig. 2C).

#### 1.4. Os mutantes *mast*<sup>P2</sup> e *mast*<sup>P3</sup>

Os alelos *mast*<sup>P2</sup> (EP3515) e *mast*<sup>P3</sup> (EP3403) foram identificados através da base de dados do Projecto de Sequenciação do Genoma de *Drosophila*, de Berkeley (BDGP). Estas mutações são devidas à inserção do transposão P{EP} (ver "Material e Métodos") a, respectivamente, 1679 e 2317 pb a montante do codão de iniciação (Fig. 5).



**Figura 4.** Análise do fenótipo mitótico nos neuroblastos de larvas *mast*<sup>P2</sup> homocigóticas (A-C), *mast*<sup>P2</sup>/Df(3L)31A (D e E), *mast*<sup>P3</sup>/Df(3L)31A (F-H) e *mast*<sup>P1</sup>/*mast*<sup>P3</sup> (I). O DNA foi corado com iodeto de propídeo.

O alelo *mast*<sup>P2</sup> é semi-letal, uma vez que os indivíduos com esta mutação em homozigotia sobrevivem até ao estado adulto, no entanto, possuem ovários e testículos rudimentares e são estéreis. A análise citológica de cérebros larvares homozigóticos do terceiro estágio permite observar neuroblastos aneuplóides (Fig. 4A-C) e pólos anafásicos desorganizados (Fig. 4B e C). Em hemizigotia com a *Df(3L)31A*, mostram ocasionalmente cromossomas em atraso e pontes de cromatina (Fig. 4D e E).

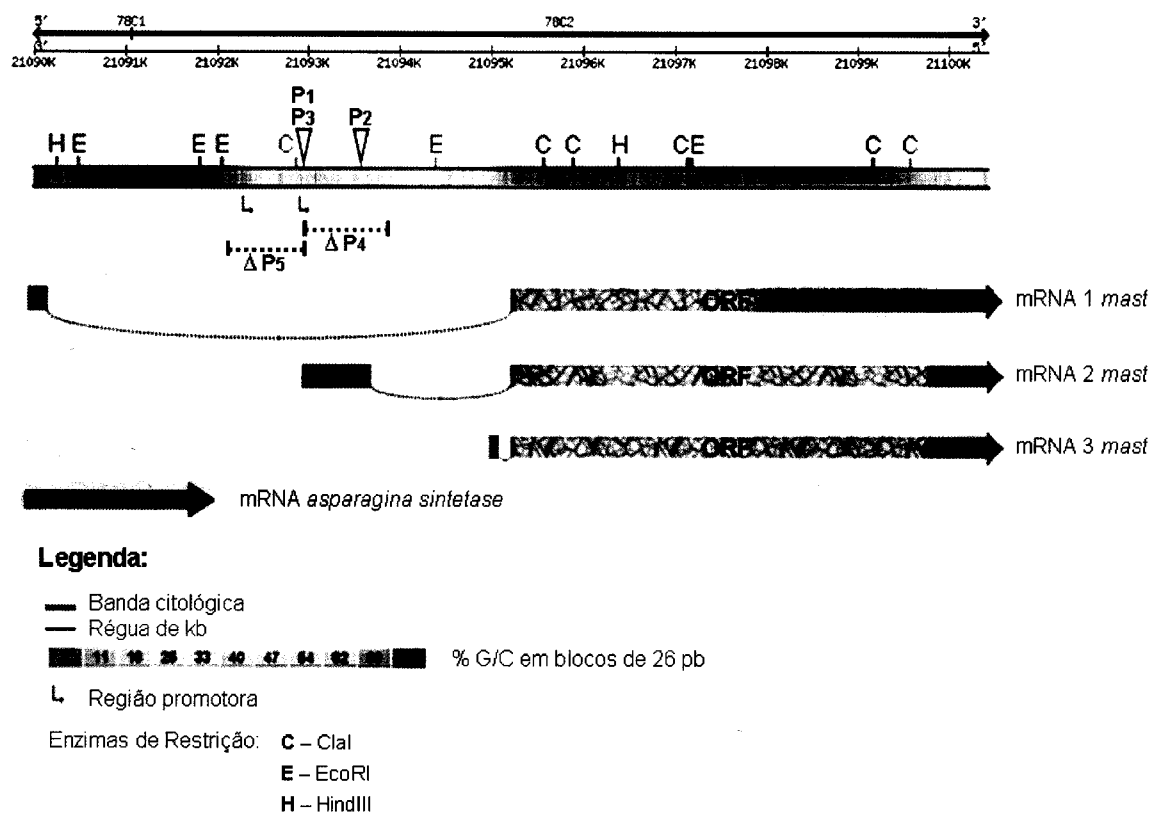
Os indivíduos homozigóticos *mast*<sup>P3</sup> morrem no estágio embrionário. No entanto, os hemizigóticos *mast*<sup>P3</sup>/*Df(3L)31A* sobrevivem até ao final da fase larvar/pupal, o que sugere a existência de uma segunda mutação neste mutante. Os neuroblastos das larvas hemizigóticas apresentam cromossomas condensados (Fig. 4F e G), figuras circulares (Fig. 4F) e poliploidia (Fig. 4G e H). Em transheterozigotia com o alelo *mast*<sup>P1</sup>, exhibe também anáfases anormais e com pontes de cromatina (Fig. 4I).

## 2. A proteína Mast

### 2.1. Identificação do gene *mast*

De modo a identificar o gene mutado, foi realizada a sua caracterização a nível molecular. As regiões genómicas adjacentes às extremidades 5' e 3' do P{1ArB} foram obtidas por PCR inverso e *plasmid rescue*, respectivamente. O clone obtido por *plasmid rescue* não mostrou semelhanças significativas com nenhuma sequência das bases de dados. O fragmento amplificado por PCR inverso foi clonado no fagemídeo pBluescript II KS (pKS) digerido com *Sma*I. Este fragmento genómico foi utilizado em rastreios de bibliotecas de cDNA e de DNA genómico (respectivamente, Uni-ZAP<sup>TM</sup> XR e Lambda DASH, Stratagene, USA). Simultaneamente, o fragmento amplificado foi sequenciado e utilizado em pesquisas em bancos de dados, verificando-se possuir total homologia com a

parte sequenciada de um clone de cDNA, denominado LD11488, disponível no BDGP. A caracterização deste cDNA, proveniente de uma biblioteca feita a partir de embriões, está descrita nos subcapítulos seguintes. Mais tarde, aquando da completa sequenciação do genoma de *Drosophila*, ficaram também acessíveis as seqüências nucleotídicas do gene *mast* e de outros dois cDNAs, correspondentes a RNAs mensageiros cujos locais de transcrição não são conhecidos e que devem ser o resultado de *splicing* alternativo. A organização molecular do locus *mast* está representada na Figura 5, na qual também se pode observar a localização do cDNA da Asparagina Sintetase, uma enzima cuja função não parece estar relacionada com a da Mast, mas cujo mRNA é transcrito a partir de uma fracção do gene *mast*, possuindo, inclusive, um fragmento em comum com um dos seus transcritos.



**Figura 5.** Organização molecular do locus *mast*, localizado na região citológica 78C1-C2, entre 21,09 Mb e 21,10 Mb. Na representação, o gene *mast* está dividido em blocos de 26 pb, coloridos de acordo com a percentagem de bases de guanina ou citosina que contêm (ver legenda), e tem indicados os locais de restrição das enzimas *Clal* (C), *EcoRI* (E) e *HindIII* (H). Os lugares assinalados com P1, P2 e P3 correspondem, respectivamente, às inserções: P{1ArB}, no mutante

*mast*<sup>P1</sup>, e P{EP}, nos alelos *mast*<sup>P2</sup> e *mast*<sup>P3</sup>. As barras a tracejado, por baixo, com as indicações ΔP4 e ΔP5, demarcam as zonas eliminadas nos mutantes *mast*<sup>P4</sup> e *mast*<sup>P5</sup> aquando da excisão do P{1ArB} (descritos no capítulo 4.). Os três transcritos *mast*, de 5375, 5911 e 5264 pb, respectivamente, estão representados com setas cinzentas interrompidas por caixas rosa, que indicam a grelha de leitura aberta (ORF), comum a todos. O cDNA caracterizado, LD11488, corresponde à segunda representação (mRNA 2 *mast*). As setas pequenas verdes assinalam duas regiões previstas como promotoras da transcrição (<http://www.flybase.org>). A seta a azul sinaliza o mRNA *asparagina sintetase*.

### 2.2. Caracterização do cDNA LD11488

A partir do cDNA *mast* LD11488, que se encontrava clonado no plasmídeo pSK, foram feitas diversas subclonagens e desenhados vários iniciadores (ver “Material e Métodos”), que permitiram a sua completa sequenciação manual. Verificou-se que este cDNA possui 5938 pb; a sua sequência foi submetida às bases de dados DDBJ/EMBL/GenBank, com o código de acesso AF250842, e está representada na Figura 6.

Por comparação da sequência do cDNA LD11488 com as obtidas anteriormente por *plasmid rescue* e PCR inverso a partir do mutante *mast*<sup>P1</sup>, verificou-se que o P{1ArB} se encontra inserido, nesta estirpe, na direcção 3'-5' e a 2317 pb do início da região codificante (Fig. 5). Relativamente ao cDNA, a distância entre o P{1ArB} e o codão de iniciação da tradução é de 749 pb (Fig. 6). Aquando da sua inserção houve, como é usual, a repetição de 8 nucleótidos em cada extremidade do elemento P (O'Hare e Rubin, 1983; Engels *et al.*, 1990; Gloor *et al.*, 1991), cuja sequência foi identificada e está sinalizada na Figura 6 a vermelho. A análise da sequência do LD11488 também permitiu identificar uma região 5' não codificante de 769 pb, seguida pelo codão de iniciação ATG e por uma região codificante de 4473 pb. No final, encontra-se uma região 3' não codificante composta por 693 nucleótidos, iniciada a partir do codão de terminação TGA e finalizada na cauda poliadenilada (cauda poli(A)) típica do mRNA eucariota, pelo que o cDNA está completo a 3'. Foi também encontrada a sequência-consenso AATAAA, local de sinalização da poliadenilação nos

eucariotas, à distância devida do início da cauda poli(A): 20-30 nucleótidos a montante (Fig. 6).

1 TTTTITTTTG CAACGCAACG **GGCTGGCGAA** TCGCTGCTGA AATTAAGCTA AAAACCGTGT AATAAACCGC AGGCCGTGGC AAAACCCAGCT CACCGATGCC  
 101 GAGACGCAGC AAAATGTGAT GTTTCGCCGG TGCTGCAAAC GCTCGCGCAG CGCAAACGAA GTGCAAGACC TAAACCTCTT GACCCCAAGC GCGTCACCCA  
 201 GCAGAAGGAT AGAGCGAGAC GGACAGATAG GAGTGACTGA GGCAGGGAGA AAAAATAGC ACTGGCCCCA AGACGTTGGA ATTTTGTGAA TTGTTGTTGC  
 301 TGAGCCCGAC CAATAACGGT ACAGAGGACA ACAGTATCAG CAACAATATC AACAAAAGG AATGACAAAG TGAACCCGAC TCGCTGCCCC CACAAACTAC  
 401 GACAACATTA ATAACAATAA TAACAAAACG AAATAGGAAG AGCAAAACTG TGATCTCTGC TTAACCTTTT TTAATTTTGG GGCAATTGTT CAATTTGGCT  
 501 GTGCTCAAAA GTAATTAAG TCAACTCGTT ACGCGTATTT CGCGGTGTTT GCACCGCTTT TTCCAACCGA CGACTGGAAA ATCAATTCCT CGGATTGCCA  
 601 AAGGGGAACA ACAACTAGCA GTTGTGAAG TTTTCCTTTA TATTTTTTGC GGCCCGCCCG AAAACAAAAG GCAAAGTAAA AGAAGAAGAG AAAGAGGAAG  
 701 AAGAAGAAGC AGCCGACCGG GATTTGCAAA TAGTTGCCGC AGAACGAAGG ACGAATAGAC ATTGCAACG **CCCTATGC** GAAGCCAGC GACCTGGATG  
 M A Y R K P S D L D G  
 801 GCTTTATCCA GCAATGGCCC AAGCGGGACA TCGTGTGAA GGTACAGCTC GCGCAGGATC TGGTGACATT CCTTAGSD GACACAACT CAATTTGCTG  
 F I Q M P K A E D L V T F L S D D T N S I V C  
 901 CACGGACATG GAATTCCTTA TTGACGGTTT GATGCCATGG CTGACGGGCA GCCACTTTAA GATTGCACAA AGTCCCTGG AGCGTTCCT GGAGCTAATA  
 T D M G F L I D G L M P W L T G S H F K I A Q K S L E A F S E L I  
 1001 AAGCGATTGG GCAGCGAATT TAATGCATAC ACGGCTACCG TTCTGCACCA TGTGATCGAT CGGCTGGGAG ACAGACGGGA CACACTCCGC GAGAAGCGGC  
 K R L G S D F K A D M A L H E Y G T Q Q L S V R V Y I P P V C T V R E L R M D  
 1101 AACTTCTGCT GCGCGACCTC ATGAGGACACA GAGTGCTTCC GCCCCAGGCG CTGATGACGA AGCTGGCCAC TAGCTGCTTC AAGCACAGA ACGCCAAGT  
 L L L R D L M E H R V L P P Q A L I D K L A T S C F K H K N A K V  
 1201 GCGCGAGGAG TTCCTTCAGA CGATTGTGAA CGCTCTTCAT GAGTAOGGCA CCCAGCAGCT TAGTGTTCGC GTCTATATAC CACCAAGTTG TGCATCTCTC  
 R E E F L Q T I V N A L H E Y G T Q Q L S V R V Y I P P V C T V R E L R M D  
 1301 GGAGATCCCA CAGTTAATGT GAGGGAGCGC GCCATCCAAA CGCTAGTGG AATCTACAAG CATGTAGGG ATCGATTGGC CCCAGACCTC CGTCCGATGG  
 G D P T V N V R E A A I Q T L V E I Y K H V G D R L R P D L R R M D  
 1401 ACGATGTTC TGCCCTCGAAA TTGCTATGT TGGACGAAA GTTCGACCG GTCAAACAGG AGGCTTACT GCTACCTTCA GCCCTTAAA ACAGCAATGG  
 D V P A S K L A M L E Q K F D Q V K Q E G L L L P S A L K N T N G  
 1501 CAATGGAGTG GCGTTGGACG AGGCCGACAA TATTGGGTG AGGGAGCGAC CCACAGGAT GATTAGCGG CCACTACACT CGGCCGTTTC GTCATCACTG  
 N G V G L D E A D N I G L R E R P T R M I K R P L H S A V S S L  
 1601 CGCCAAAAC CCAATGTGAA CGATGTGACC GGTGATGCG GCGCGTAAC CATGGAATCT TTCGAATCTA GCTTTGAGT GGTCCCGCAA TTGAACATCT  
 R P K P N V N D V T G D A G A V T M E S F E S S F E V V P Q L N I F  
 1701 TCCACGCTAA GCACATGGAC GATATCTACA AGCAAGTACT AGTGATCATC AGTGATAAAA ACGCAGACTG GGAGAAACGT GTGGATGCTC TCAAGAAGAT  
 H A K D M D I Y K T A T V L V I I S D K N A D W E K R V D A L K K I  
 1801 CAGGGCATTG CTCATTCTCA GCTATCACAC TCAGCCGACG TTTGTGCTG TAGAGTAAA GGAATGTGCG TTAAGCTTGG TGGACATCCT CAAGGAGGAA  
 R A L L I L S Y H T Q P Q F V A V Q L K E L S L S F V D I L K E E  
 1901 CTACGATCAC AGGTGATCCG CGAGCCGTGC ATCACCATCG CCTACTGTGC TAAGACGCTG AGAAATAAAC TAGATGCCTT CTGCTGGAGC ATTTTGGAGC  
 L R S Q S M D I Y K I T I A Y M S T K T L R N K L D A F C W S I L E H  
 2001 ACCTGATTTA TTTAATACAG AACAGCGGCA AGGTCAATGC ATCCGCTTCC ACAATAGCTC TGAATATAT CATTAGTAT ACACATGCAC CAAGCTGCT  
 L I N L I Q N S A K V I A S A S T I A L K Y I I K Y T H A P K L L  
 2101 CAAGATCTAC ACAGACACTC TGAATCAATG AAATCGAAG GACATAAGT CCACACTGTG TGAGCTGATG GTGCTGCTCT TCGAGGATG GCACGAGAG  
 K I Y T D T L N Q S K S K D I R S T L C E L M V L L F E E W Q T K  
 2201 GCGTTGAAA GGAATGCAC CGTATCAAG GACACCTTAA AAAATKCTT TGCGATGCA GACTCGGATG CAGCCGCCCA TTCCAGATAC GCCTATTGGG  
 A L E R N A T V L R N D L K K S I G D A D C D A R R H C S R Y A Y W A  
 2301 CTTTCAGGCG TCACTTTCCA GAGCTGGCG ATCAATATA TGAACATTA GACATCCTG CCGAGCGCGC ATTAGAAGG GAACGAGAGG GCGCGGAGG  
 F R R H F P E L A D Q I Y G T L D I A A Q R A L E R E R E G G G G  
 2401 AGGAGAACT GGTACTGGGA CTGGGACTGC ACCTGAAACG AGACGCACTG TATCCGCGAT TGGCCGAAAC CCGTGAACCC TGCAAAAGCC CACGCTAGT  
 G G T G T G T A G T A G R T V S R I G R T P G T P G T P S  
 2501 ATGAGATCCA TTTACAGCGT GCACACTGCG GCTGCTCAAC GAGCCAAAGT TAGAGCGCAA TATCACTAT ATTCCAGCCA AAGAAACCT TTAGACCTA  
 M R S I S A V D T A A A Q R A K V R A Q Y T L Y S R Q R K P L G P N  
 2601 ATAAITCCAA CCAGGCTATG ATGACAGGAG CAGCAGCCAG TGGATCACTG CCCAGCCTC GCTGAATTC CAATAGCGGT GGCACCCAC CTACACCGCC  
 N S N Q A S M T G A A A S G S L P R P R L N S N S G G T P A T T P  
 2701 GGGATCGGTT ACACCAGGC CCGGGGAGC GGCAGGATA TCTCAGTCA AGCCAGGATC GAGATCCACC TCGCCAGCA CAAAAGTGA GGCATCACTC  
 G S V T P R R G R A G V S Q S P G S R S T S P S T K L R D Q Y  
 2801 GGTGTATTG GTAATTACTA TCGTGGGGCC TACCCAAAAG GGCTCCGGA ATACCCGGA GCACAGCCAG CTTAGGAA ACAGTCCAA  
 G G I G N Y Y R G A T G A I P K K A S G I P R S T A S S R E T S P T  
 2901 CTAGCTCAGG TGGTGGCTG ATGAAACGCA GTATGTACTC TACAGTGGC GGTCTCGAC GTACGCCGA GAGGAACAC CCAGTAAGC CATCGCGCGC  
 R S G G G L M K R S M Y S T G A G S R R T P E R N N P V R P S A A  
 3001 GGCACGACTG CTGGCGCAAT CCCGTGAAGC AGAACATATA TTAGCGCTCG GAGATGATGG ACAGCCAGAC TATGTTCCG GGGACTACAT GCGCAGCGC  
 A R L L A Q S R E A E H T L G V G D D G Q P D Y V S G D Y M R S G  
 3101 GGAATGCGGA TGGTAGGAA GCTCATGGGA CGTGTGAGT CTGATGACAT CGACTCCGAG GCGAGTCTG TGTGTTGAGA ACGATCTTTC GACTCCAGCT  
 G M R M G R K L M G R D E S D D I D S E A S S V C S E R S F T D S S Y  
 3201 ACACAGAGG TAATAAATCG AACTACTCAC TTAGCGGGAG CCACACCCGC TTGACTGGA GCACGAGCG GCGCCATT TACACATCG ACAGATTAT  
 T R G N K S N Y S L S G S H T R L D W S T Q R A P F D D I E T I I  
 3301 TCAATCTGCG GCATCGACC ATTGGTCTGA AAGGAAGGAT GGCTGATCA GCCTCACACA GTATCTGGCC GATGCAAAAG AGCTCACTCA GCACCACTT  
 Q F C A S T H W S E R K D G L I S L T Q Y L A D G K E L T Q Q L  
 3401 AAATGCGTTC TGGACATGTT CCGCAAGATG TTCATGGATA CACACACCAA GGTGTACTGA CTGTTTTGG ACACGGTCA CCACTGATT CTGTTGATG  
 K C V L D M F R K M F M D T H T K V Y S L F L D T V T T E L I L V H A  
 3501 CGAACACTC TCACGAATGG CTCCTCATCT TGTTCAGCG GTTGTCAAC AAATGGGCA CCGATCTACT CAATTCGATG CACAGCAAGA TTTGGAAGC  
 N E L H E W L F I L L T R L F N K L G T D L L N S M H S K I W K T  
 3601 GCTACAGGTC GTCCACGAAT ATTTCCCCAC GCAGTTCGAG CTTAAAGAAC TATTTAGAT CATATCGGAT TCTACTCAA CGCAACTAC CAAGACCGCC  
 L Q V V H E Y F P T Q L Q L K E L F R I I S D S T Q T P T K T R  
 3701 ATCGCCATTC TCGGCTTCT TACGGATCTG GCCAATACAT ACTGCAAAAG CAGCGACTTT CCCAGCGACC AGAGCCAGGC CTGGAGCGG ACGTCTCTAA  
 I A I L R F L T D L A N T Y C K S S D F P S D Q S Q A C E R T V L K  
 3801 AGCTGGCCCA GCTGGCGCGC GATCAGAAGT CGATGGAGCT GCGTCCAG GCCAGGAGCT CCGTGTGGC CCGTGTATAAC CTGAATCCC CGCAATGCA  
 L A Q L A A D Q K S M E L R S Q C A R G S C L V A L Y N L N T P Q M T

## II. Resultados

```
3901 CCTTTTACTG GCCGACCTGC CAAAGGTATA TCAGGACTCT GCCCGATCCT GCATCCATTC GCACATGAGG CGGCAAAGCC AAAGTTGCAA TTGGGGTGCC
   L L L A D L P K V Y Q D S A R S C I H S H M R R Q S Q S C N S G A
4001 AATTGCGCTA GTAGCTCTCC ATTGAGCAGT AGCAGTCCCA AGCCTTTGCA AAGTCCCTCT GTGGTCCAT TTGCCTCGCT TCAGAGCCAC CACCACCAAC
   N S P S S S P L S S S S P K P L Q S P S V G P F A S L Q S H H H Q L
4101 TTAGCATCAG CTCTACTAGT CCACGCTCCC GGCAGTCTTC CGTGGAGCAG GAGTGTCTCT TTTCCTCGGA GCTGGACATT CAGCACAACA TTCAGAAGAC
   S I S S T S P R S R Q Q S V E Q E L L F S S E L D I Q H N I Q K T
4201 GTCGGAGGAG ATCCGGCACT GCTTCGGGGG TCAGTACCAG ACGCGCTGG CGCCCAATGG CTTCAATGGA CACTTGCAGT ATCAGCATCA GGGCCAACAG
   S E E I R H C F G G Q Y Q T A L A P N G F N G H L Q Y H D Q G Q Q
4301 GATTCTGTGT CATCCCTGTC TTCCAATCC AAGACGCAAT CGTCGGCCAA CACTACCOCAG TCAAATACAC CTGAGTCAGC AACCAATGAGG CTGGATAATC
   D S C A S L S S N S K T Q S S A N T T Q T C A A T A C A C E S A T M R L D N L
4401 TGGAGCGGGA AAGGACCACT CAGAACGCCA AGTCACCAAC TGAAGATGCC AAGGTGATCA CGGTCTCGAT AAATATGGCT GAAAATGGAG AGCTGATACT
   E R E R T T Q N A K S P T D D A K V I T V S I N M A E N G E L I L
4501 GGCAGCAAC CTGATGGAGA GCGAAGTGGT GCGTGTGGCC TTGACGCTAA CAAGGATCA GCGGTCGAG TTGCTTCAGA CGTCACTTAC TAACCTGGGG
   A S N L M E S E V V R V A L T L T K D Q P V E L L Q T S L T N L G
4601 AATTGGATCA AGGGCGGAAA CTGTGAGCTG CCAATAAGC ACTTTAGATC GATCATGCGA ATGCTGTCTA ACATTTCTGA GCGGAGCAT ACGGAGCTGG
   I C I K G G N C E L P N K H F R S I M R M L L N I L E A E H T D V V
4701 TCATCGCTGG CTTGCAGTGG CTGCAAGA TTATGAGGAG CAACAAATG CGTCACAAC GGATGCACCT TCTAGAGCTG ATTTGTGTA AGATCATCCA
   I A G L H V L S K I M R S N K M R H N W M H F L E L I L L K I I Q
4801 GTGCTATCAA CACAGCAAGG AGGCTTTGCG GGATATCGAC TCGATGATC CAAGGATAGC ACCATCCTTG CCTCTGGATC TGTCCATCAA CATTTGCAAT
   C Y Q H S K E A L R S A D D S M I P R I A P S L P L D L S I N I V N
4901 CCGTAATITG CGACGGTGA GTTTCOCACA AATTTGTGCG CCATCAAGAT CTTGCTGGAG GTGACCGAAC ACCATGCTTC GGAGATCAGA GACCCCACT
   P V I A T G E F P T N L C A I K I L L E V T E H H G S E I T D A H L
5001 TGGACATTTG GTTCCCAAT CTGGGCGGAT CGGCGGACGA CAGCCAATCG ATGTTTCGCA AAGCGGGGT CTTCTGCATC GTAAGCTGT ACTTTGTTCT
   D I V F P N L A R S A D D T Q S M V R K A A V F C I V K L Y F V L
5101 GGCAGGAGG AAGTCAAGC CGAAGCTGC AGTCTAAAT CCCAGCAAG TTAGGCTCCT CAACGTGTAC ATCAGAAGC AGCGGAAGT CATCAGTGGG
   G E E K V K P K L S V L N P S K V R L L N V Y I E K Q R N C I S G
5201 GGAGGAAGCT CTACCAAGAA CTCTCCCGG GCATCGTCT CATGATGCGG GGAGCCCTTA ATAGGATTCC TGCATCAGCA CCACCACAAA CAAGACACAG
   G G S S T K N S S A A S S S *
5301 ACGCGGTTGC TTCCCTCGGC CTGAGAAGGA AGTGAGGAGC GCGGACATT AAATAATATA TTATTACATT AACTAATTAT TTATAACTAA TTATTACGA
5401 TCATCGGTTA CTTGTGTAAC TGCTCGATGC ATATATTCAG CAGATGCAAA TGCGGCCCGA AAGAAAGTCA AGGGCCATCG CCCATCTAAT GTGAGCAGAA
5501 AAACATTTTA TACATAAAGC GGAAGTAAAG CGAGTAAATC CGCAAGTGT ACTAAAATTG TAGCCAACCT CGCAATCCTC ACTTCTCACA TCAGTTGTAC
5601 GTCTTTTAC CAGCTCCTAA CTATTAAAGC TGATTCTGTT TAATTTGTAA GCCTATATAC CGCTCTTAT GGAAGTCTAG ACGTGTGCTT TTCTACCTTT
5701 GTTTCAGGCG ACTTTGTATC CTTATTCTGT TTCCGCTCAA CTAATTTCTA ATTACTATTA TTAATACGAT TCTGCTCTTA CAACTGAAGT ATTTTGTGTA
5801 TTAATTTAAA TACACAAGCC CACACAAAGG ATTAATAATCA ATAAAAACA CTTATAGGTT ATGTAATAAT ATTTATAAAT TAATTAACG ATAAAACAG
5901 TTAACAAAA GTCCAAAA AAAACAAA AAAAAA
```

**Figura 6.** Representação da sequência nucleotídica do LD11488, correspondente, na Figura 5, ao segundo transcrito *mast*, e tradução da grelha de leitura aberta (ORF). A vermelho está sinalizada a sequência alvo de 8 nucleótidos, que é seguida pela inserção do elemento P e duplicada após este no mutante *mast*<sup>P1</sup>. O codão de iniciação encontra-se evidenciado a laranja e o de terminação a verde. O sinal de poliadenilação está assinalado a azul e a cauda poli(A) a violeta.

### 2.3. A proteína Mast

A tradução da região codificante, comum aos três cDNAs *mast*, resulta numa proteína de 1491 aminoácidos (Fig. 7), possuindo um peso molecular previsto de 165.6 kDa e um ponto isoelétrico de 9.08.

### 2.4. Análise computacional da sequência proteica da Mast

#### 2.4.1. Domínios e motivos

A proteína foi analisada, para nela identificar domínios e motivos putativos, através de vários programas da Internet. Um resumo dos resultados obtidos encontra-se na Tabela 1.

```

1  MAYRKPSDLGFIQQMPKADM RVK VQLAEDLVTFLSDDTNSIVCTDMGFLIDGLMPWLTGSHFKIAQKSLEAFSELIKRL
81  GSDFNAYTATVLP H MIDRLGDSRDTVREKAQLLLRDLMEHRVLPQALIDKLATSCFKHKNAKVREEF LQTIVNALHEYG
161  TQQLSVRV ██████████ RRMDDVPASKLAMLEQKFDQVKQEGLLLP SALK
241  NTNGNGVGLDEADNIGLRERPTRMIKRPLHSAVSSSLRPKPNVNDVTGDAGAVTMESFESSFEVVPQLNIFHAKDMDDIY
321  KQVLVIISDKNADWEKRVDALKKIRALLILSYHTQPQFVAVQLKELSLSFVDILKEELRSQVIREACITIA YMSKTLR NK
401  LDAFCWSILEHLINLIQNSAKVIASASTIALKYI KYTHAPKLLKIYDTLNQSKSKDIRSTLCELMVLLFE EWQTKALE
481  RNATVLRDTLKKSIGDADCDARRHSRYAYWAFRRHFPELADQIYGTLDIAAQRALEREREGGGGGTGTGTGTAPETRRT
561  VSRIGRTPGTLQKPTSPMRSISAVDTAA A QRAKVRAQYTLYSRQRKPLGPNNSNQASMTGAAASGSLPRPRLNSNSGGTP
641  ATTPGSVTPRPGRAGVVSQSQPSRSTSPSTKLRDQYGGIGNYR GATGAIPKKASGIPRSTASS * SGGGLMKR
721  SMYSTGAGSRRTPERINPVPSAAARLLAQSREAEHTLVGDDGQPDYVSGDYMRSGGMRMGRKLMGRDESDDIDSEASS
801  VCSERSFDSSYTRGNKSNYSLSGSHTRLDWSTQRAPFDIETIIQFCASTHWSERKDG L ISLTQYLADGKELTQQQLKCV
881  LDMFRKMFMDHTK VYSLFLDTVTELILVHANELHEWLFILLTRLFNKLGTDLLNSMHSKMKTQWVHEYFPTQLQLKE
961  LFRIISDSTQPTTKTRIAILRFLDLANTYCKSSDFPSDQSQACERTVLKLAQLAADQKSMELRSQARSCLVALYNLNT
1041  PQMTLLLADLPK VYQDSARS CIHSHMRROSQSCNSGANS P SSSPL SSSSPKPLQSPSVGPFASLQSHHHQLSISSTSPRS
1121  RQSSVEQELLFSS ELDIQHNIQKTSEEIRHCFGGQYQTALAPNGFNHGLQYHDQGGQDSCASLSSNSKTQSSANTQSNT
1201  PESATMRDLNERERTQNAKSPTDDAKVITVSINMAENGELILASNLMESEVVRVALTLTKDQPVELLQTSLTNLGICI
1281  KGNCELPNKHFRSIRMLLNILEAEHTDVVIAGLHVLSKIMRSNKMRHMWMHFLEILLKIIQCYQHSKEALRDIDSMI
1361  PRIAPSLPLDLSINIVNPVIATGEFPTNLCAIKILLEVTEHHGSEITDAHLDI ██████████ NLARSADDTQSMVRKAAVFCI ██████████
1441  TVLGEEKVKPKLSVLNPSKVRLNVYIEKQRNCISGGGSSTKNSSAASSS

```

**Figura 7.** Sequência aminoacídica da Mast. Os motivos HEAT e a região rica em serinas estão sinalizados a vermelho e a verde, respectivamente. A zona homóloga ao domínio Pro-rich da MAP4 está indicada a azul. As sequências putativas de serem reconhecidas e fosforiladas pelas CDKs estão a amarelo e sublinhadas, com asteriscos sobre os resíduos fosforiláveis.

O domínio MAP65 é representativo da família de proteínas associadas aos microtúbulos MAP65/ASE1 e foi detectado na Mast pelo programa ProfileScan, se bem que com um *E-value* bastante elevado (Tabela 1).

O programa InterProScan prevê para a Mast três  *folds* do tipo ARM *repeat*, com *E-values* bastante baixos ( $3.0e-51$  em todos os casos). O motivo ARM *repeat* pode conter vários *repeats* ou domínios, como o domínio *Armadillo*, o HEAT *repeat*, o domínio MAST-C, etc. No caso da Mast, o primeiro ARM *repeat* inclui um HEAT *repeat* e o terceiro, o outro HEAT *repeat* e o domínio Mast-C (ver Tabela 1).



Nome	Tipo	Programa	<i>E-value</i>	Região (a.a.)
MAP65	Domínio	ProfileScan	4.1	110-715
ARM repeat	Motivo	InterProScan	3.0e-51	46-247
			3.0e-51	315-476
			3.0e-51	1289-1460
HEAT repeat	Motivo	ProfileScan	0.021	169-207
			0.21	1414-1452
		Motif Scan	3.6e-05	85-121
			1.8	122-159
			9.6e-08	170-199*
			1.7	403-438
			1.1	875-910
			1.6	1007-1039
			0.21	1289-1325
			1.4e-07	1408-1444*
Bromo	Domínio	SMART	4.0e-04	607-736
APC basic	Domínio	NCBI CD	0.007	627-750
Região rica em Serinas	Motivo	ProfileScan	0.00021	1057-1133
Mast-C	Domínio	InterProScan	7.6e-72	1340-1474

**Tabela 1.** Domínios e motivos putativos de se encontrarem na proteína Mast. Notas: quanto maior o *E-value*, maior probabilidade existe de um determinado domínio ou motivo previsto ser um falso positivo; os *E-values* não podem ser comparados directamente entre os resultados obtidos por diferentes programas.

O HEAT repeat, de 37-47 aminoácidos, encontra-se geralmente repetido em série e ocorre em várias proteínas citoplasmáticas, incluindo as quatro proteínas às quais deve o seu nome: a Huntingtina, o Factor de Elongação 3 (EF3), a subunidade reguladora A da proteína fosfatase 2A (PP2A) e a cinase IOR1 (Hemmings *et al.*, 1990; Andrade e Bork, 1995). Duas famílias de MAPs (Microtubule-associated Proteins) também contêm vários HEAT repeats: a dis1-

TOG (Neuwald e Hirano, 2000; Tounebize *et al.*, 2000) e a cofactor D-Alp1 (Neuwald e Hirano, 2000). Este último grupo de proteínas funciona na formação *in vitro* de heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -Tubulina competentes para a montagem dos microtúbulos (revisto em Lewis *et al.*, 1997). Os motivos HEAT parecem funcionar como superfícies de interacção proteína-proteína. O programa ProfileScan, assim como vários outros, detectou na Mast dois HEAT *repeats* próximos de cada uma das extremidades da proteína (ver Tabela 1), que se encontram assinalados na Figura 7 a vermelho. O programa Motif Scan encontrou, igualmente, dois motivos HEAT semelhantes aos supracitados, sinalizados com asterisco na Tabela 1. No entanto, além desses, descobriu mais outros, mas com *E-values* comparativamente bastante superiores (Tabela 1).

O domínio Bromo pode ocorrer como cópia única ou em duplicado. Existe em várias proteínas que se ligam ao DNA (Haynes *et al.*, 1992) e também pode interagir com as lisinas acetiladas (Jeanmougin *et al.*, 1997). A sua função precisa ainda não está definida, mas poderá participar nas interacções proteína-proteína e ter um papel na montagem ou actividade de complexos envolvidos na activação da transcrição (Tamkun, 1995). A Mast parece ter um destes domínios, cuja localização está indicada na Tabela 1.

Numa região praticamente sobreposta àquela onde está previsto o domínio Bromo, foi detectada igualmente uma homologia, embora menos significativa, com o domínio básico APC (Tabela 1). Este corresponde a uma região da família de proteínas APC (*adenomatous polyposis coli*), conhecida como domínio básico, que contém uma elevada proporção de aminoácidos positivamente carregados e que interage com os microtúbulos (Deka *et al.*, 1998).

Os programas de análise de proteínas assinalaram também a presença de uma zona rica em Serinas, da qual não se sabe o significado biológico.

O domínio Mast-C (Tabela 1), correspondente à extremidade carboxilo da Mast, é uma região com elevada homologia entre os elementos da família Mast e

constitui uma espécie de “impressão digital”, uma vez que é característico desta família (ver a marcação a vermelho no alinhamento na Fig. 10).

O programa ELM detectou vários motivos de ligação a domínios SH2 (*Src Homology 2*) e SH3 (*Src Homology 3*). Estes domínios estão presentes num elevado número de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização, na organização do citoesqueleto ou na formação de organelos. A sua ligação a motivos como os encontrados na Mast permite a propagação do sinal, promovendo interacções proteína-proteína e/ou modificando actividades enzimáticas. No caso dos domínios SH2, os motivos a que se ligam necessitam de ter o resíduo de tirosina fosforilado.

### 2.4.2. Modificações pós-traducionais

#### a) FOSFORILAÇÃO

O programa ELM identificou na Mast diversos locais putativos de fosforilação, entre os quais se destacam os presentes na Tabela 2, por serem passíveis de modificação pelas cinases CDKs, CK1, CK2 e Polo, que estão envolvidas no ciclo celular.

As sequências-consenso reconhecidas pelas CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) estão identificadas na Tabela 2 e sinalizadas nas Figuras 7 e 27. Estas enzimas são essenciais para a regulação do ciclo celular e consistem num domínio cinase catalítico, dependente das Ciclinas para se tornar activo e fosforilar os seus substratos. De acordo com Takeda e os seus colegas, estes substratos necessitam de possuir, além da sequência-consenso para a fosforilação pelas CDKs, motivos de interacção com as Ciclinas na imediação, pois os complexos Ciclina-Cdk ligam-se simultaneamente aos dois sítios (Takeda *et al.*, 2001). O programa ELM também detectou na Mast vários sítios semelhantes a uma sequência-consenso de ligação às Ciclinas. Entre estes, distinguem-se os locais KPLGP (a.a. 606-610) e RKLM (a.a. 783-786), por serem os únicos próximos dos lugares susceptíveis de sofrerem fosforilação pelas

CDKs. É de notar que, possivelmente, as variantes existentes na sequência-consenso de ligação às Ciclinas serão responsáveis pelo reconhecimento específico pelos diferentes tipos destas proteínas.

Cinase	Zona de reconhecimento	Sequência	Zona de reconhecimento	Sequência
<b>CDK</b>	706-712	RETSPTR	729-735	SRRTPER
<b>CK1</b>	36-39	SDDT	102-105	SRDT
	271-274	SAVS	297-300	SFES
	351-354	SYHT	425-428	SAST
	577-580	SMRS	636-639	SGGT
	664-667	SRST	668-671	SPST
	701-704	STAS	705-708	SRET
	721-724	SMYS	729-732	SRRT
	796-799	SEAS	800-803	SVCS
	803-806	SERS	806-809	SFDS
	809-812	SSYT	817-820	SNYS
	936-939	SMHS	966-969	SDST
	968-971	STQT	999-1002	SDQS
	1057-1060	SARS	1072-1075	SCNS
	1079-1082	SPSS	1083-1086	SPLS
	1086-1089	SSSS	1103-1106	SLQS
	1112-1115	SISS	1114-1117	SSTS
	1117-1120	SPRS	1120-1123	SRQS
	1179-1182	SCAS	1182-1185	SLSS
1184-1187	SSNS	1192-1195	SANT	
1404-1407	SEIT	1486-1489	SAAS	
<b>CK2</b>	105-108	TVRE	191-194	TLVE
	300-303	SSFE	407-410	SILE
	462-465	TLCE	553-556	TAPE
	704-707	SSRE	902-905	TVTE
	1123-1126	SSVE	1144-1147	TSEE
<b>PLK</b>	179-182	DPTV	299-302	ESSF
	365-368	ELSL	755-758	EHTL
	804-807	ERSF	1006-1009	ERTV
	1370-1373	DLSI		

**Tabela 2.** Locais putativos de serem fosforilados pelas cinases CDK (*Cyclin-dependent kinase*), CK1 (*Casein Kinase I*), CK2 (*Casein Kinase II*) e PLK (*Polo-like kinase*).

As Cinasas da Caseína I e II (CK1 e CK2) são ubiquamente expressas e têm actividade de cinases de serina e treonina num elevado número de substractos. A CK1 parece ter funções na divisão celular, na reparação do DNA e no metabolismo do glicogénio. A CK2 é essencial para a manutenção da viabilidade celular e também parece estar implicada na progressão do ciclo celular, na transformação celular, na síntese do tRNA e do rRNA e na apoptose.

A cinase Polo é um regulador mitótico envolvido em vários eventos, como a transição G2/M, a maturação do centrosoma, a formação do fuso bipolar, a separação dos cromossomas e a citocinese.

### **b) GLICOSILAÇÃO**

Foram encontrados na Mast vários resíduos susceptíveis de sofrer O-glicosilação através do programa YinOYang 1.2. No entanto, esta não parece conter nenhum peptídeo-sinal, pelo que não deverá estar exposta à maquinaria de O-glicosilação e, portanto, não poderá sofrer este tipo de modificação.

As asparaginas putativas de sofrer N-glicosilação estão descritas na Tabela 3. É de salientar que a presença desta sequência-consenso não é suficiente para concluir que haja N-glicosilação, devido ao facto de o enrolamento da proteína ter um papel importante na regulação desta modificação pós-traducional (Pless e Lennarz, 1977). Como uma glicosilação eficiente ocorre, normalmente, a uma distância de mais de 60 aminoácidos da extremidade C, podemos eliminar o último resíduo identificado, inserido na zona 1484-1487.

Os proteoglicanos são complexos glicoconjugados, contendo uma proteína central à qual um número variável de cadeias de glucosaminoglicano está ligado covalentemente (Hassell *et al.*, 1986). Existe uma sequência-consenso para o local de ligação do glucosaminoglicano (Bourdon *et al.*, 1987), tendo sido detectadas duas cópias na Mast através do programa ProfileScan (Tabela 3).

Modificação	Programa	Zona de reconhecimento	Sequência
N-GLC	PROSCAN	452-455	NQSK
		482-485	NATV
		611-614	NNSN
		815-818	NKSN
		1194-1197	NTTQ
		1484-1487	NQSK
GlcNHglycan	ProfileScan	713-716	SGGG
		1476-1479	SGGG
MOD_SUMO	ELM	17-20	PKAD
		228-231	VKQE
		265-268	IKRP
		279-282	PKPN
		374-377	LKEE
		1220-1223	AKSP
		1280-1283	IKGG

**Tabela 3.** Outros locais susceptíveis de serem modificados pós-traducionalmente. N-GLC: locais susceptíveis de sofrer N-glicosilação; GlcNHglycan: locais putativos de ligação do glucosaminoglicano; MOD\_SUMO: motivos passíveis de serem modificados pela SUMO-1.

### c) OUTRAS MODIFICAÇÕES

O programa ELM encontrou ainda vários motivos putativos de serem modificados pela proteína SUMO-1 (de *small ubiquitin-related modifier*) (Tabela 3). Esta proteína funciona ligando-se covalentemente às outras de um modo reversível e controlado por um processo enzimático análogo à via da ubiquitina. No entanto, em contraste com a ubiquitinação, a SUMO não leva à formação de cadeias poli-SUMO e não endereça as proteínas para a sua degradação, parecendo, pelo contrário, que aumenta a sua estabilidade, nomeadamente por bloquear os locais de ligação à ubiquitina. Além disso, tem muito menos substratos que esta última, sendo a maioria reguladores celulares importantes (revisto em Müller *et al.*, 2001). A modificação pós-traducional pela SUMO pode alterar a interacção do substrato com outras proteínas ou com o DNA ou modular a sua compartimentação celular (Wilson e Rangasamy, 2001). Um exemplo desta última é a associação da RanGAP1 ao cinetocoro, que está dependente da







### 2.4.5. Estrutura terciária

Não foi possível encontrar programas que realizassem previsões acerca da estrutura terciária da proteína Mast completa devido ao seu grande tamanho. No entanto, o programa InterProScan prevê para a Mast três ARM *repeats*, como referido anteriormente (secção 2.4.1. e Tabela 1), e sabe-se que cada um destes domínios forma uma super-hélice alfa *right-handed* (Graham *et al.*, 2000; Pacold *et al.*, 2000).

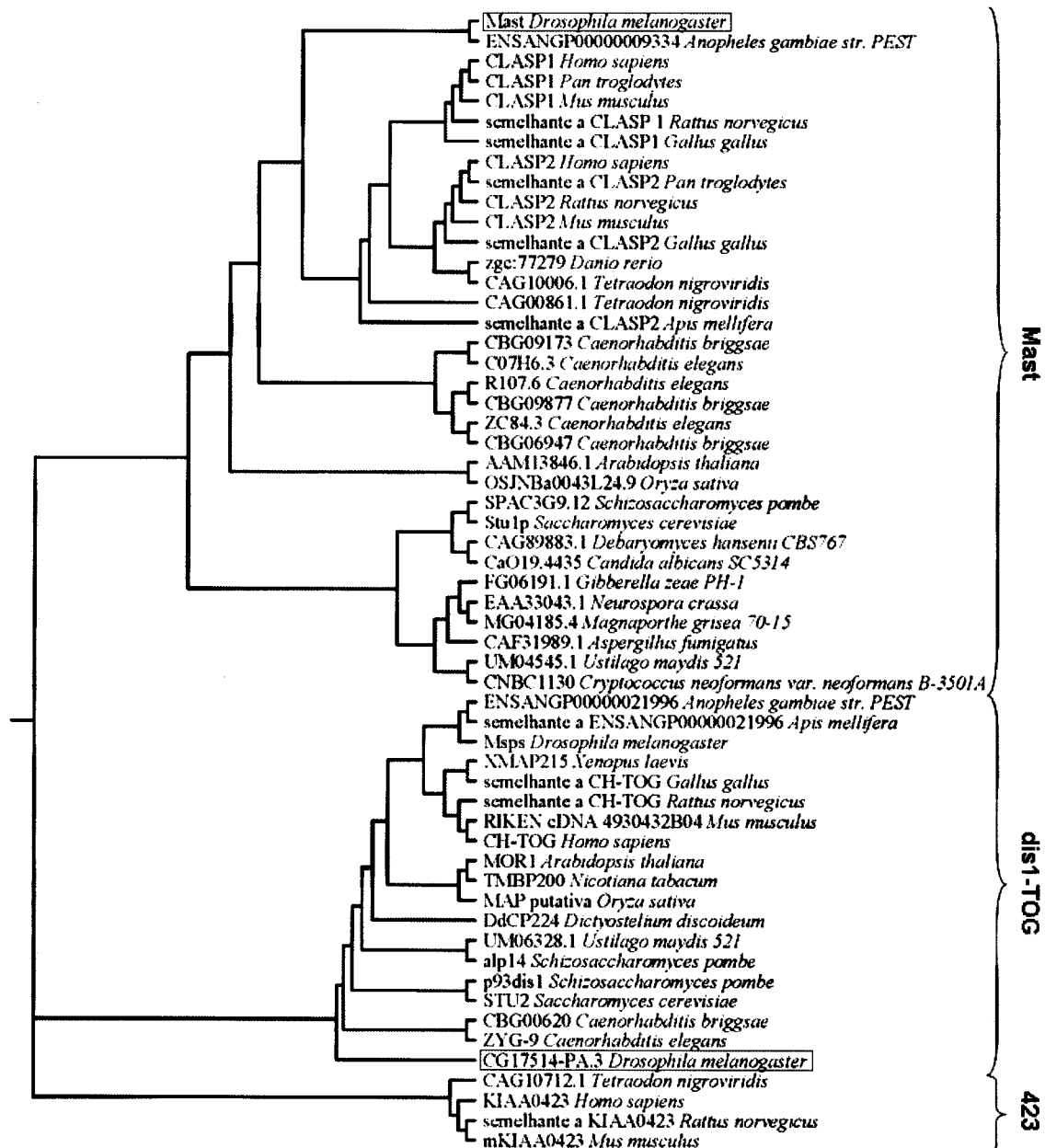
É de referir ainda que, segundo os programas MEMSAT2, GLOBE, NCOILS e ZZIP, a Mast não é uma proteína transmembranar nem globular e não tem domínios *Coiled Coil* nem *Leucine Zipper*, respectivamente.

### 2.4.6. Homologias

A pesquisa de homologias mostrou que Mast é uma proteína altamente conservada: *Homo sapiens* (2 proteínas, CLASP1 e CLASP2, Akhmanova *et al.*, 2001), *Pan troglodytes* (2), *Mus musculus* (2, CLASP1 e CLASP2, Akhmanova *et al.*, 2001), *Rattus norvegicus* (2), *Gallus gallus* (2), *Caenorhabditis elegans* (3), *Caenorhabditis briggsae* (3), *Anopheles gambiae* (1), *Apis mellifera* (1), *Danio rerio* (1), *Neurospora crassa* (1), *Candida albicans* (1), *Debaryomyces hansenii* (1), *Aspergillus fumigatus* (1), *Magnaporthe grisea* (1), *Tetraodon nigroviridis* (2), *Ustilago maydis* (1), *Gibberella zeae* (1), *Arabidopsis thaliana* (1), *Oryza sativa* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1 proteína, Stu1p, Pasqualone e Huffaker, 1994), *Schizosaccharomyces pombe* (1), *Cryptococcus neoformans* (1) (Fig. 9).

Portanto, a proteína Mast pertence a uma nova família proteica que está evolutivamente conservada. Na Figura 10 pode-se ver o alinhamento das três regiões mais conservadas de alguns membros representativos da família Mast. A última zona compreende o domínio Mast-C, indicado na figura a vermelho. É possível observar que as CLASP2 do galo e da abelha possuem pequenas inserções dentro deste domínio que não são conservadas, sendo as restantes áreas muito conservadas em todos os membros da família Mast apresentados. É

de notar que as sequências das proteínas ENSANGP00000009334 de *Anopheles* e CLASP1 do chimpanzé ainda estão incompletas.



**Figura 9.** Cladograma das famílias Mast, dis1-TOG e KIAA0423 (423), obtido através do programa Phylip com base nos alinhamentos efectuados no ClustalX. A Mast e a CG17514-PA.3, de *Drosophila*, encontram-se assinaladas, respectivamente, a vermelho e a azul.

A família de proteínas Mast está evolutivamente bastante próxima da família dis1-TOG, da qual fazem parte, entre outras, as proteínas CH-TOG humana (Charrasse *et al.*, 1998), XMAP215 de *Xenopus laevis* (Vasquez *et al.*, 1994), MspS de *Drosophila melanogaster* (Cullen *et al.*, 1999), DdCP224 de



*Dictyostelium discoideum* (Gräf *et al.*, 2000), MOR1 de *Arabidopsis thaliana* (Whittington *et al.*, 2001), TMBP200 de *Nicotiana tabacum* (Yasuhara *et al.*, 2002), Zyg-9, de *Caenorhabditis elegans* (Matthews *et al.*, 1998), Stu2p de *Saccharomyces cerevisiae* (Wang e Huffaker, 1997) e p93<sup>dis1</sup> e alp14 de *Schizosaccharomyces pombe* (Nabeshima *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2001) (Fig. 9). Segundo este cladograma, esta família parece possuir ainda um novo membro, até agora não caracterizado, de *Drosophila melanogaster*, além da já mencionada Msps: a proteína CG17514-PA.3, identificada através do BDGP (sinalizada a azul na Fig. 9).

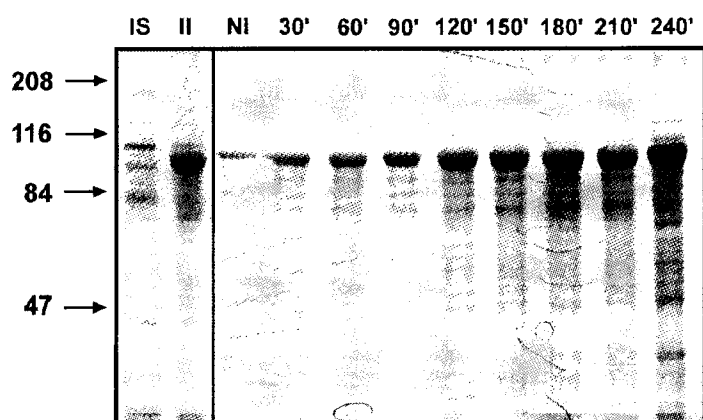
Existe também uma grande proximidade da família Mast com um grupo de proteínas ainda não estudado, denominado KIAA0423 em referência ao gene humano (indicado como 423 no cladograma da Fig. 9).

São de destacar, ainda, as semelhanças encontradas entre algumas zonas da Mast e de outras proteínas. A região entre os aminoácidos 609 e 742 da Mast tem 26% de identidade e 43% de similaridade com o domínio básico da APC, responsável pela interacção desta proteína com os microtúbulos (Deka *et al.*, 1998). Este domínio já tinha sido detectado através do programa NCBI CD (subcapítulo 2.4.1.). A parte da Mast compreendida entre os aminoácidos 535 e 736 possui 25% de identidade e 39% de similaridade com a região rica em prolinas (*Pro-rich*) do domínio básico da MAP4 (Aizawa *et al.*, 1990), que inclui um dos domínios de ligação à tubulina análogos aos existentes nas proteínas Tau e MAP2 (Matus, 1994) e foi descrita como possuindo elevada afinidade para os microtúbulos (Aizawa *et al.*, 1991). Esta zona, putativa de se ligar aos microtúbulos, está sinalizada na Figura 7 a azul e na Figura 27 a rosa.

### 3. Caracterização da Mast

#### 3.1. Produção de anticorpos anti-Mast

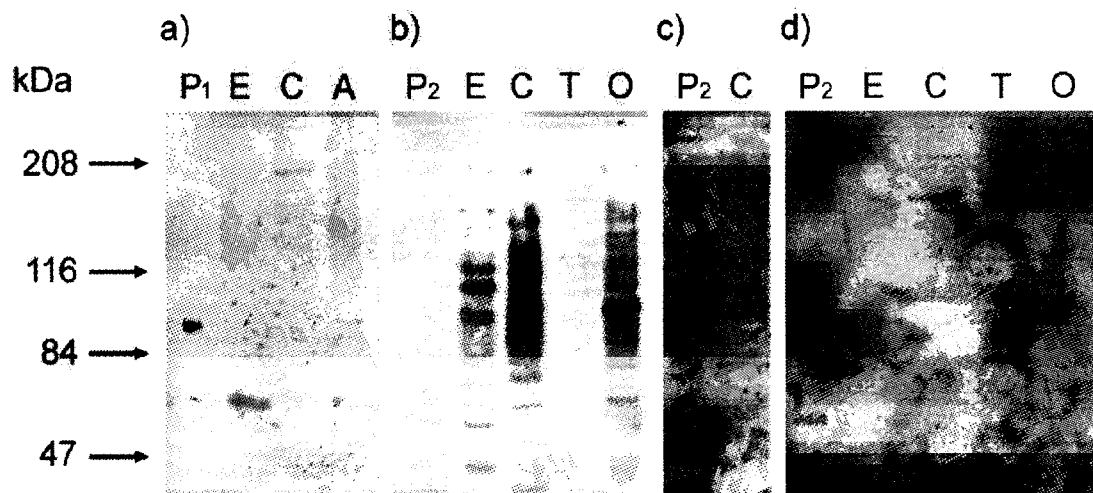
No intuito de produzir um anticorpo policlonal anti-Mast, o cDNA *mast* correspondente à metade C-terminal da Mast foi subclonado no vector de expressão pET-23b (Novagen, USA) (ver "Material e Métodos"). A expressão da Mast<sub>rec1</sub> foi induzida na estirpe de *E. coli* BL21(DE3) e verificou-se ser otimizada por adição ao meio de cultura de 0.4 mM de IPTG durante 2 horas (Fig. 11). A Mast<sub>rec1</sub> possui um peso molecular aparente de cerca de 100 kDa e é expressa nos corpos de inclusão (Fig. 11), pelo que uma separação das fracções solúvel e insolúvel do lisado bacteriano permitiu a sua purificação parcial.



**Figura 11.** Expressão da Mast<sub>rec1</sub> em extractos de *E. coli*. À esquerda: marcadores de elevado peso molecular, em kDa. IS: fracção solúvel após indução; II: fracção insolúvel após indução; NI: fracção insolúvel de extracto não induzido; 30' - 240': fracções insolúveis de extractos

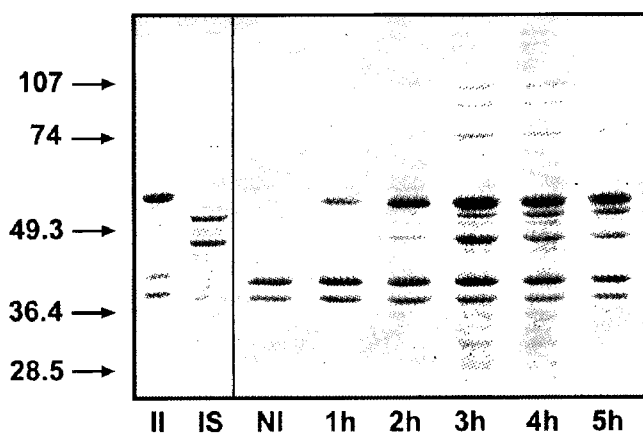
bacterianos sujeitos a vários tempos de indução, em minutos.

A Mast<sub>rec1</sub> foi submetida a SDS-PAGE e cortada a banda correspondente, a qual foi utilizada na imunização de um coelho (Eurogentec, Bélgica), para a produção de um anticorpo policlonal. Contudo, o anticorpo obtido (CH-R1), quando utilizado em *Western blot*, reconhecia a Mast<sub>rec1</sub>, mas em extractos proteicos de *Drosophila* não assinalava a proteína Mast (Fig. 12a).



**Figura 12.** *Western blots* de extractos proteicos em que foram utilizados os anticorpos: a) CH-R1; b) Rb727; c) Rb726 - pré-imune; d) Rb726. P1 - Mast<sub>rec1</sub>; P2 - Mast<sub>rec2</sub>; E - embriões; C - cérebros de larvas da 3ª fase; A - adultos; T - testículos de adultos; O - ovários de adultos.

Deste modo, optou-se por produzir outra proteína recombinante, Mast<sub>rec2</sub>, desta vez correspondente à região mais imunogénica da Mast. Assim, subclonou-se, no vector de expressão pQE-32 (QIAGEN, Germany), a região do cDNA *mast* compreendida entre os aminoácidos 442 e 868 (ver “Material e Métodos”). A proteína recombinante possui um segmento de 6 histidinas a N-terminal e a sua expressão, na estirpe de *E. coli* M15[pREP4], verificou-se ser otimizada por adição ao meio de cultura de 2 mM de IPTG durante 3 horas (Fig. 13). A Mast<sub>rec2</sub> possui um peso molecular aparente de 54 kDa e também é expressa nos corpos de inclusão. Como a separação e a lavagem dos corpos de inclusão permitiram uma purificação bastante razoável da proteína e sem muitos desperdícios, optou-se por este método de purificação, submetendo-se posteriormente a SDS-PAGE. A banda correspondente à Mast<sub>rec2</sub>, após liofilização, foi enviada para a companhia SAPU (*Scottish Antibody Production Unit*, UK), para a imunização de dois coelhos, 726 e 727. Os anticorpos policlonais obtidos, denominados Rb726 e Rb727, foram testados inicialmente por *Western blot*, verificando-se que o Rb727 detectava limitadamente a proteína recombinante e apenas marcava bandas inespecíficas em extractos de *Drosophila* (Fig. 12b)).



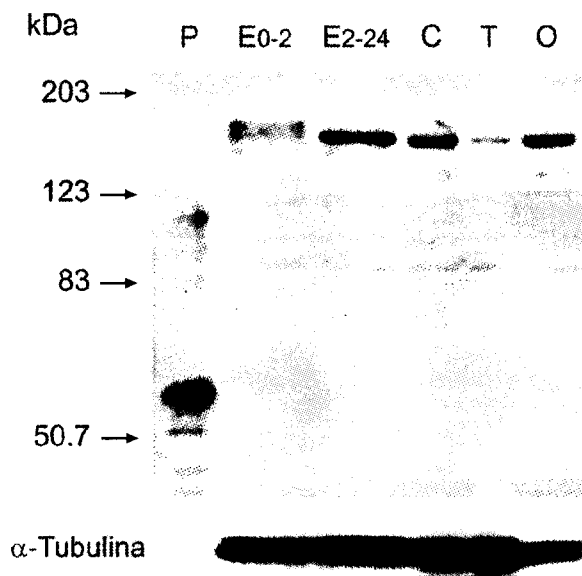
**Figura 13.** Expressão da Mast<sub>rec2</sub> em extractos de *E. coli*. À esquerda: marcadores de baixo peso molecular, em kDa. II: fracção insolúvel após indução; IS: fracção solúvel após indução; NI: fracção insolúvel de extracto não induzido; 1h - 5h: fracções insolúveis de extractos bacterianos sujeitos a vários tempos de indução.

O soro pré-imune do Rb726 não identifica a Mast<sub>rec2</sub> nem as proteínas de extractos de cérebros de larvas de *Drosophila* (Fig. 12c). O Rb726 reconhece a Mast, apresentando, no entanto, muito *background* (Fig. 12d), pelo que teve de ser purificado utilizando uma coluna de proteína A (ver "Material e Métodos"). O anticorpo purificado obtido reconhece a Mast<sub>rec2</sub> (Fig. 14) e, em diversos extractos de *Drosophila*, uma proteína que, nos mutantes *mast*, diminui de intensidade (verificar na Fig. 15), pelo que parece reconhecer especificamente a proteína Mast.

### 3.2. Expressão da Mast ao longo do desenvolvimento

Para caracterizar a expressão da Mast ao longo das várias fases do desenvolvimento, utilizou-se o Rb726 purificado, à frente designado como anti-Mast, que reconhece uma proteína de cerca de 165 kDa, peso molecular semelhante ao anteriormente previsto para a Mast (165.5 kDa), em extractos proteicos de embriões de 2 a 24 horas, cérebros de larvas da terceira fase, testículos e ovários de adultos de *Drosophila melanogaster* (Fig. 14). Em extractos de embriões de 0 a 2 horas, o anticorpo anti-Mast reconhece um conjunto de bandas de peso molecular entre cerca de 165 e 170 kDa (Fig. 14), pelo que parecem ocorrer clivagens ou modificações pós-traducionais da Mast nesta fase. A proteína encontra-se, portanto, em todas as etapas do

desenvolvimento, apesar de ser menos evidente em embriões de 0 a 2 horas e em testículos de adultos (Fig. 14).

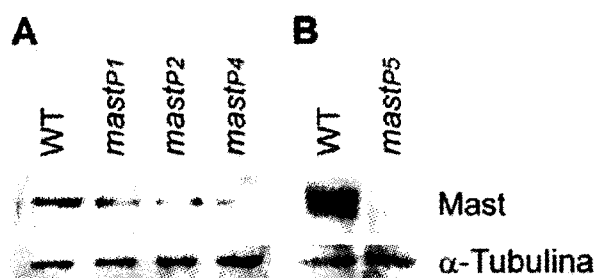


**Figura 14.** Expressão da Mast ao longo do desenvolvimento em *Drosophila melanogaster*, através da utilização do anticorpo Rb726 purificado em diversos extractos proteicos. P - Mast<sup>rec2</sup>; E<sub>0-2</sub> - embriões de 0 a 2 horas; E<sub>2-24</sub> - embriões de 2 a 24 horas; C - cérebros de larvas da 3ª fase; T - testículos de adultos; O - ovários de adultos. Em baixo - controlo utilizando um anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina para confirmar a utilização da mesma quantidade de proteínas totais em todas as amostras.

### 3.3. Expressão da Mast nos diferentes alelos

De modo a poder analisar quais as alterações na expressão da Mast nos diferentes alelos, prepararam-se extractos proteicos dos vários mutantes em homozigotia, submetem-se a SDS-PAGE e, seguidamente, a *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-Mast purificado e, como controlo da quantidade de proteínas em cada uma das colunas, um anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina. Os extractos foram preparados a partir de cérebros de larvas da terceira fase, no caso dos alelos *mast*<sup>P1</sup>, *mast*<sup>P2</sup> e *mast*<sup>P4</sup>, ou a partir de embriões de 0-24 h, quando se tratava do alelo *mast*<sup>P5</sup>. Como referência, utilizaram-se sempre extractos da estirpe selvagem *Oregon-R*. Verificou-se que em todos os alelos estudados ocorria a expressão da Mast com o peso molecular correcto (Fig. 15), ou seja, esta proteína não estava truncada. No entanto, os níveis de expressão eram, em todos os casos, inferiores ao normal, tendo os alelos *mast*<sup>P4</sup> e o *mast*<sup>P5</sup> graus de expressão dificilmente detectáveis (Fig. 15).





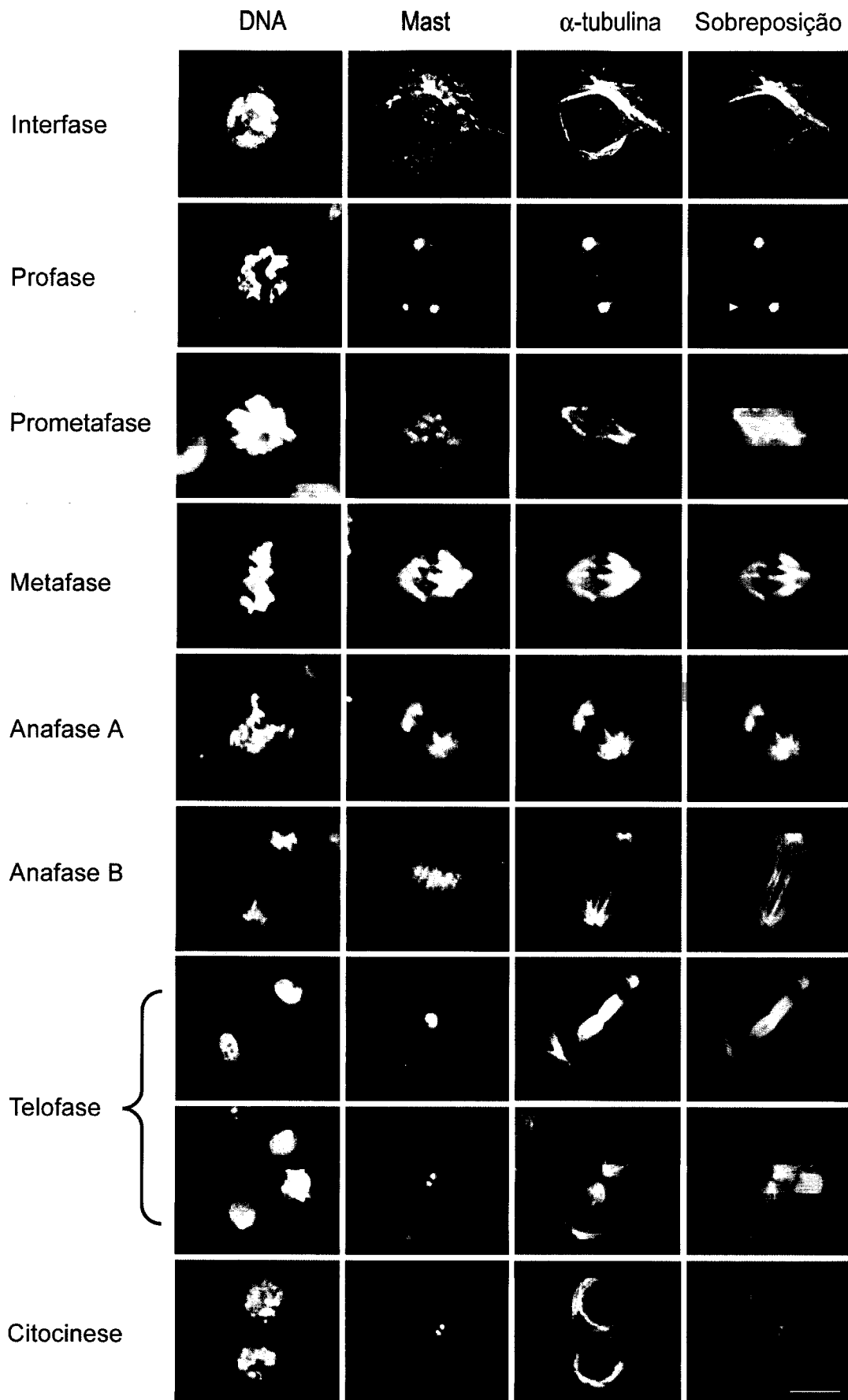
**Figura 15.** Expressão da Mast nas estirpes selvagem (WT), *mast<sup>P1</sup>*, *mast<sup>P2</sup>*, *mast<sup>P4</sup>* e *mast<sup>P5</sup>*. A: extractos de cérebros de larvas da terceira fase; B: extractos de embriões. Em baixo - controlo utilizando um anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina para confirmar a utilização da mesma quantidade de proteínas totais em todas as amostras.

### 3.4. Imunolocalização da Mast ao longo do ciclo celular

#### 3.4.1. Em células S2

O anticorpo anti-Mast purificado também foi utilizado na imunolocalização da Mast em células de cultura de *Drosophila* S2. Estas células foram submetidas a *cytospin*, fixadas com formaldeído, permeabilizadas com 1% de Triton e, finalmente, preparadas pela técnica de imunofluorescência. Os resultados mostram que a Mast está presente nos centrossomas, co-localizando com a  $\alpha$ -Tubulina, ao longo de todo o ciclo celular, apesar da intensidade desta marcação diminuir a partir da anafase até à citocinese (Fig. 16). Além disso, em interfase mostra um padrão de localização pontuado que coincide com os microtúbulos interfásicos, marcados com o anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina (Fig. 16). Frequentemente, tanto durante a mitose como na interfase, aparecia uma marcação desconhecida (indicada com a seta branca na Fig. 16 - profase). A estrutura em questão poderia, no entanto, ser resultante do corpo médio após a citocinese.

Em prometáfase e metafase, a Mast encontra-se no fuso mitótico e na região centromérica (Fig. 16). A proteína mantém a sua localização no fuso mitótico em anafase A, mas em anafase B começa a ser recrutada para a zona média do fuso, situando-se no corpo médio em telofase (ver Fig. 16). No final da telofase encontra-se de ambos os lados do corpo médio, assim como em citocinese (Fig. 16).



**Figura 16.** Imunolocalização da Mast em células de cultura de *Drosophila* S2 ao longo do ciclo celular. O DNA foi corado com iodeto de propídeo. Nas sobreposições, o DNA está representado a azul, a Mast a vermelho e a  $\alpha$ -Tubulina a verde. A barra corresponde a 10  $\mu$ m.

### 3.4.2. Em neuroblastos

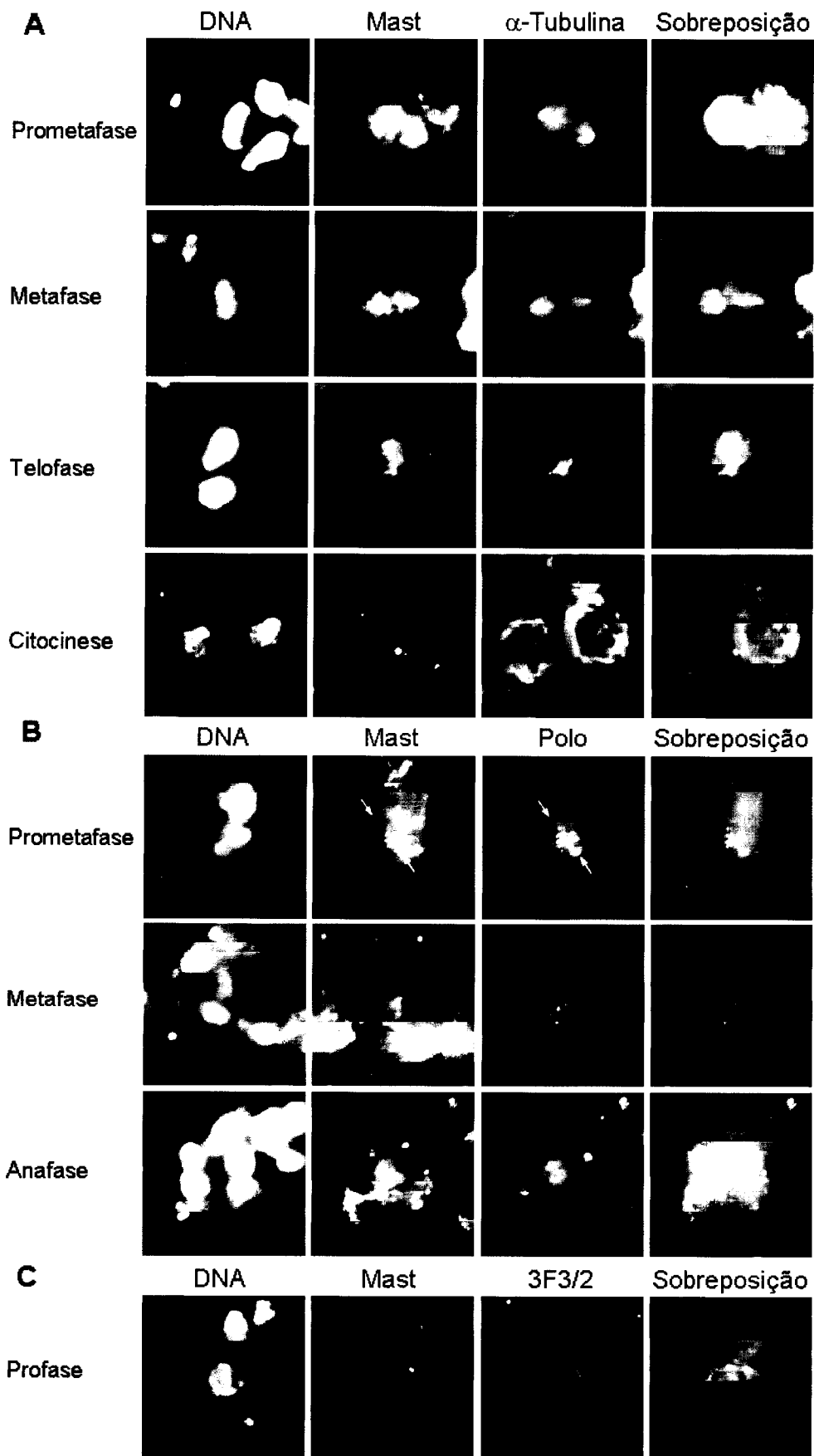
Efectuou-se a técnica de imunofluorescência em cérebros de larvas do terceiro estadio de *Drosophila*, utilizando o anticorpo anti-Mast purificado, possibilitando a caracterização da localização intracelular da Mast neste tecido.

#### a) FIXAÇÃO COM FORMALDEÍDO

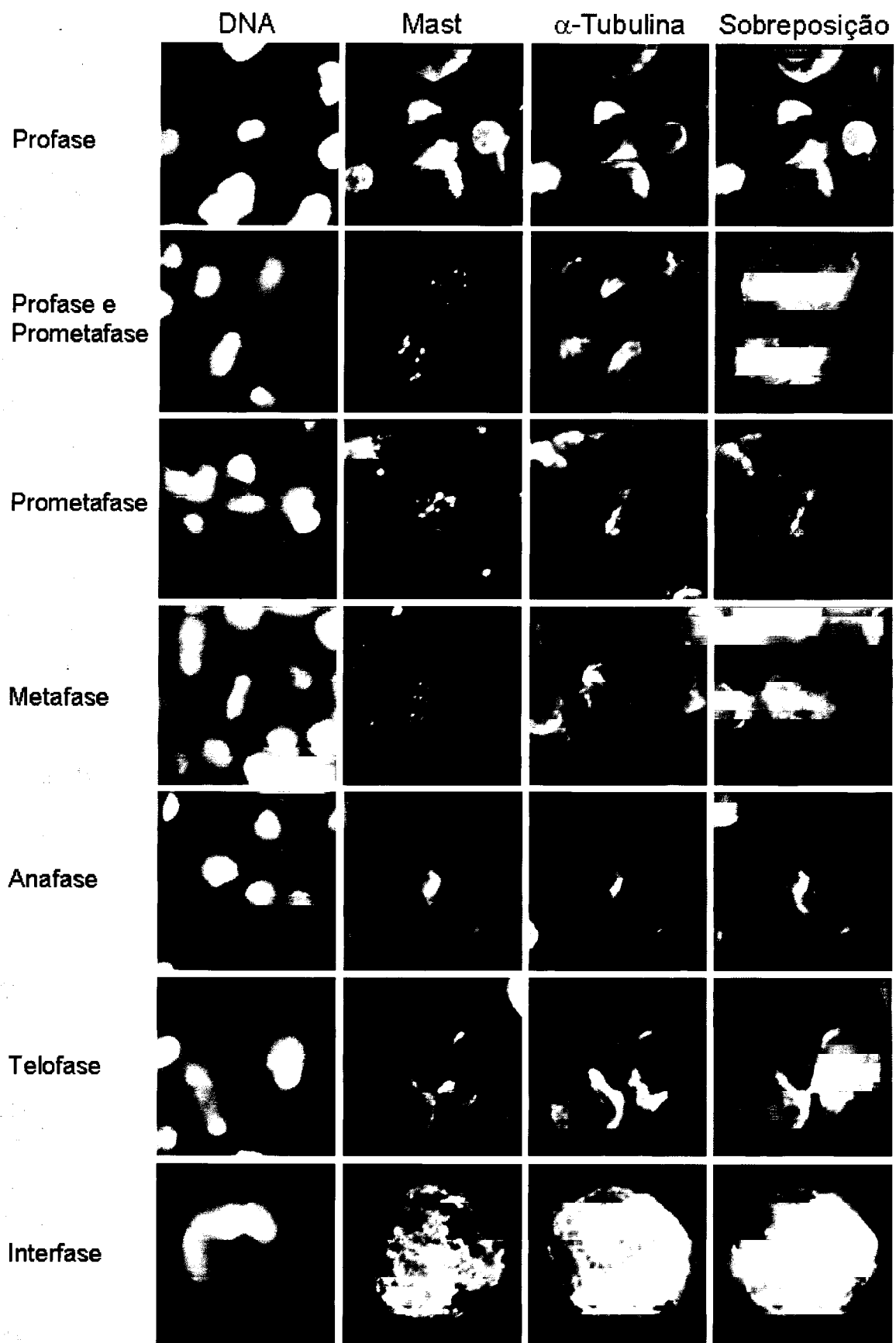
Quando se fixavam os *squashes* de cérebros com formaldeído, só utilizando uma concentração de 2% de Triton X-100 se conseguia visualizar a marcação e, mesmo assim, só na periferia das preparações, devido, talvez, a uma deficiente acessibilidade do anticorpo ao antigénio quando se utilizavam concentrações mais baixas do detergente e no centro da lâmina. Nestas condições, o anticorpo anti-Mast liga-se ao fuso mitótico em prometáfase e metafase (Fig. 17). No entanto, esta marcação é fraca e só raramente se consegue visualizar. A Mast encontra-se nos centrómeros em prometáfase e metafase (Fig. 17A e B); acumula-se próximo da cinase Polo, mas não co-localiza inteiramente com ela (Fig. 17B). Em profase, não é visível qualquer marcação centromérica (na Fig. 17C não há co-localização com os fosfoepítos cinetocorianos 3F3/2). A localização da Mast nos centrossomas nem sempre é observável. Por exemplo, é evidente a associação centrossomal na profase da Figura 17C, mas esta não existe, ou é extremamente fraca, na prometáfase da Figura 17B (setas amarelas na Fig. 17B - pode-se confirmar a inexistência de co-localização com a Polo nos centrossomas). Em anáfase, a Mast situa-se na zona média do fuso (Fig. 17B) e, em telófase e citocinese, no corpo médio do fuso (Fig. 17A).

#### b) FIXAÇÃO COM METANOL

Quando se utilizou a fixação com metanol, uma vez que este álcool permeabiliza bastante as membranas, não foi necessário usar uma concentração tão elevada de detergente. No entanto, com este tipo de fixação o DNA fica com



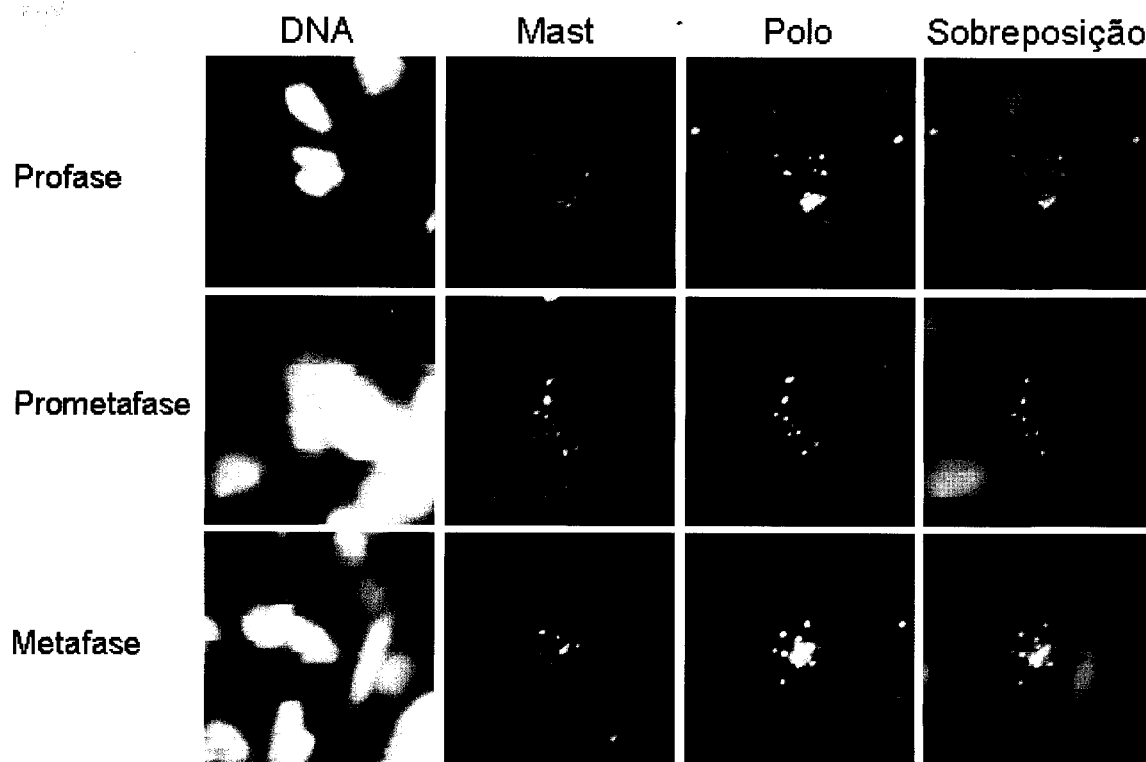
**Figura 17.** Imunofluorescências em *squashes* de cérebros de *Drosophila* fixados com formaldeído. O DNA foi corado com DAPI. Nas sobreposições o DNA está representado a azul, a Mast a vermelho e a  $\alpha$ -Tubulina (A), a Polo (B) ou os fosfoepítos reconhecidos pelo anticorpo 3F3/2 (C) a verde.



**Figura 18.** Imunofluorescências em *squashes* de cérebros de larvas de *Drosophila* fixados com metanol. O DNA foi corado com DAPI. Nas sobreposições, o DNA está representado a azul, a Mast a vermelho e a  $\alpha$ -Tubulina a verde.

uma má morfologia e a associação do anti-Mast aos microtúbulos do fuso é ainda mais difícil de visualizar do que quando se utiliza o formaldeído como fixador. Na Figura 18 é possível observar as marcações da Mast e da  $\alpha$ -Tubulina nos neuroblastos fixados com metanol. A Mast localiza-se nos centrossomas e ásteres em profase, nos centrómeros em profase, prometáfase e metafase, na zona média do fuso em anáfase, no corpo médio em telófase e nos microtúbulos interfásicos (Fig. 18).

Na Figura 19 pode-se ver a acumulação conjunta das proteínas Mast e Polo na região centromérica de neuroblastos fixados com metanol em profase, prometáfase e metafase. Mais uma vez se pode verificar que não existe uma co-localização exacta entre estas duas proteínas (Fig. 19). Em geral, observa-se uma localização similar da Mast nos neuroblastos e nas células S2.



**Figura 19** - Imunofluorescências em *squashes* de cérebros de *Drosophila* fixados com metanol. O DNA foi corado com DAPI. Nas sobreposições, o DNA está representado a azul, a Mast a vermelho e a Polo a verde.

### 3.4.3. Após tratamento com colchicina

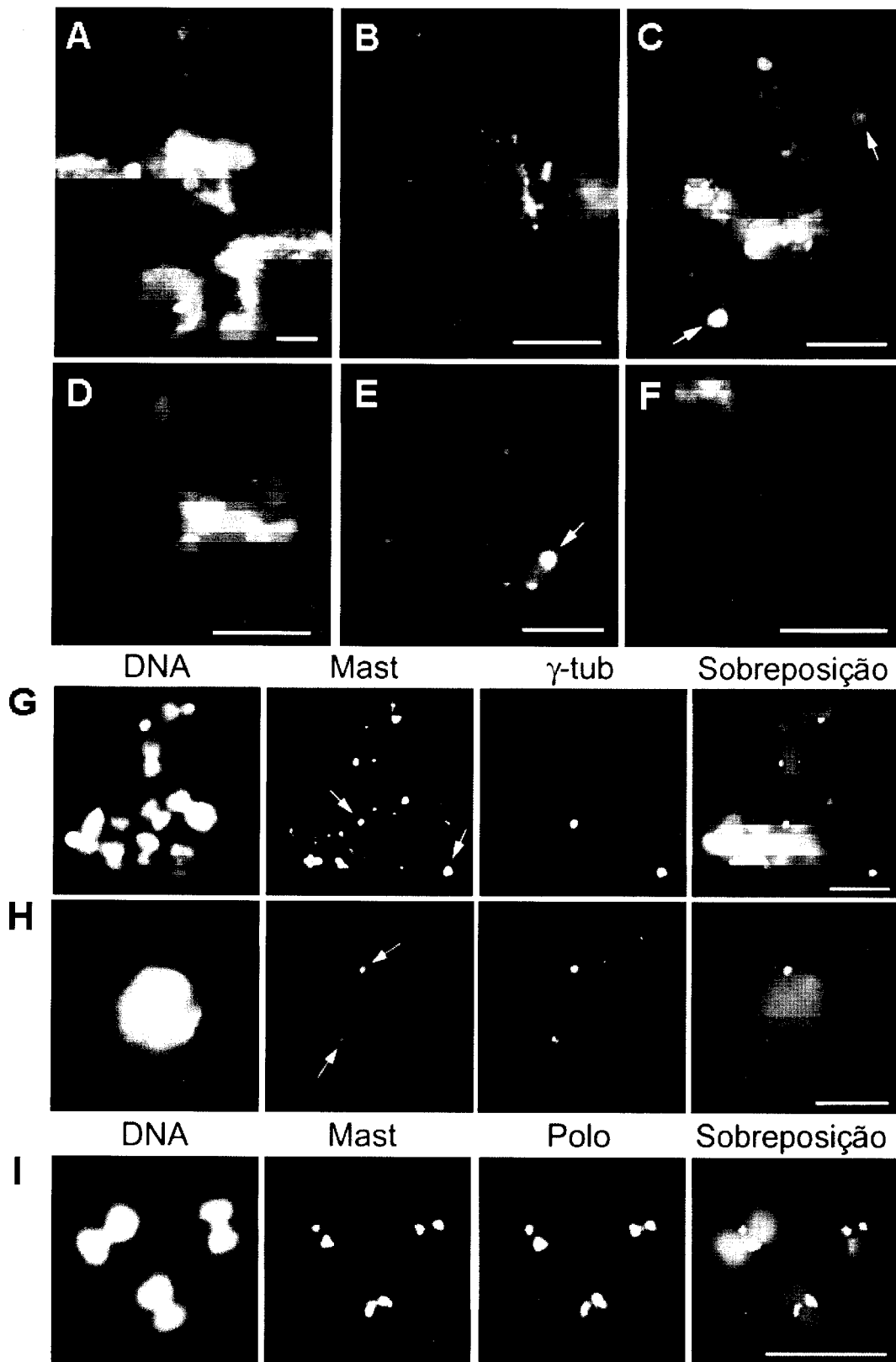
De modo a determinar se a localização da Mast nos centrossomas e centrómeros era dependente da existência de microtúbulos, a localização da proteína foi determinada após incubações com colchicina, um despolimerizador dos microtúbulos, durante diversos períodos de tempo.

#### a) EM CÉLULAS S2

Após o tratamento das células S2 em cultura com colchicina, procedeu-se à imunofluorescência como anteriormente, tendo sido utilizados, simultaneamente, os anticorpos anti-Mast purificado e anti- $\alpha$ -Tubulina (Fig. 20A-F) ou anti- $\gamma$ -Tubulina (Fig. 20G e H). Após 2 horas de incubação com colchicina, ainda restavam alguns microtúbulos, nomeadamente interfásicos, por serem mais estáveis (Fig. 20B). Decorridas 8 (Fig. 20C e D) ou 16 horas (Fig. 20E-H) de tratamento, aparentemente todos os microtúbulos foram despolimerizados, uma vez que não é visível a sua marcação pelo anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina (Fig. 20E e F). No entanto, a Mast mantém-se associada aos centrossomas e às constrições primárias dos cromossomas (Fig. 20C-F). De facto, a Mast co-localiza com a  $\gamma$ -Tubulina nos centrossomas (Fig. 20G e H). Parece, portanto, que os microtúbulos não são necessários para manter a Mast neste organelo.

#### b) EM CROMOSSOMAS ISOLADOS

Na ausência de microtúbulos, a Mast encontra-se nas constrições primárias dos cromossomas. De modo a determinar se esta localização correspondia aos centrómeros, realizou-se uma imunofluorescência em cromossomas isolados a partir de células S2 previamente incubadas com colchicina, usando, conjuntamente com o anticorpo anti-Mast, um monoclonal anti-Polo (Fig. 20I). A Polo é uma cinase mitótica que se acumula no centrómero (Logarinho e Sunkel, 1998). Os resultados mostraram uma localização muito próxima, embora não sobreponível (Fig. 20I), indicando que a Mast se situa no centrómero independentemente da presença de microtúbulos.

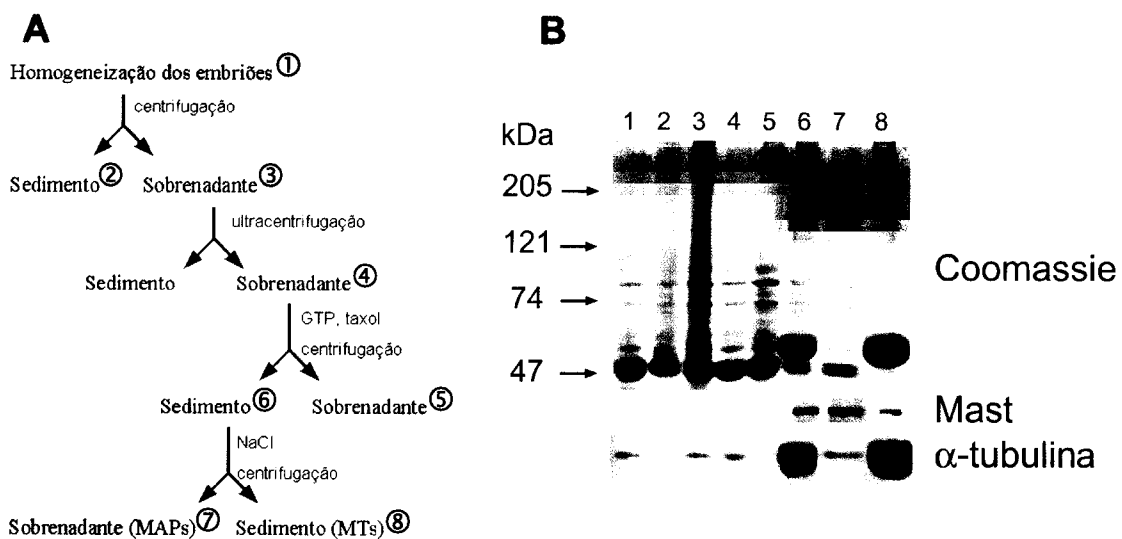


**Figura 20.** Imunolocalização da Mast após a despolimerização dos microtúbulos por tratamento das células S2 com colchicina. A, B, C e D - células S2 incubadas em colchicina durante 0, 2, 8 e 8 horas, respectivamente; E-H - células S2 tratadas com colchicina durante 16 horas; I - cromossomas isolados. As setas sinalizam os centrosomas. O DNA foi corado com iodeto de propídeo. Nas sobreposições, o DNA está representado a azul, a Mast a vermelho e a  $\alpha$ -Tubulina (A-F), a  $\gamma$ -Tubulina (G e H) ou a Polo (I) a verde. As barras correspondem a 5  $\mu$ m.



### 3.5. A Mast é uma MAP

Uma vez que a localização da Mast mostra uma associação aos microtúbulos, foi realizado um ensaio de ligação aos microtúbulos *in vitro*, para confirmar se se tratava, realmente, de uma Proteína Associada aos Microtúbulos (MAP). Assim, purificaram-se microtúbulos a partir de extractos de embriões de 0 a 3 horas de *Drosophila* e, posteriormente, procedeu-se à dissociação das MAPs por aumento da concentração salina, separando-as seguidamente da fracção microtubular por centrifugação (Fig. 21A e “Material e Métodos”). Foram preparados extractos proteicos das várias fracções obtidas ao longo da purificação, que foram submetidos a um *Western blot* e incubados, quer com o anticorpo anti-Mast imunopurificado, quer com um anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulina, que permite monitorizar o procedimento (Fig. 21B). Os resultados mostraram que a Mast se mantém ligada aos microtúbulos polimerizados, libertando-se parcialmente só quando se aumenta a concentração salina (Fig. 21B). Estes resultados estão de acordo com os obtidos através da localização intracelular da Mast, indicando que a Mast é uma MAP.



**Figura 21.** Ensaio de ligação aos microtúbulos *in vitro*. A: esquema do procedimento. B: SDS-PAGE de 30  $\mu$ g de cada um dos extractos obtidos, corado com *coomassie blue* ou submetido a *Western blot* e incubado com anticorpos anti-Mast ou anti- $\alpha$ -Tubulina; cada uma das colunas está identificada com um número correspondente ao do esquema A.

## 4. Mobilização do elemento P

De maneira a demonstrar definitivamente que o fenótipo mitótico existente na estirpe de *Drosophila melanogaster* homocigótica para o alelo  $mast^{P1}$  era devido à inserção do P{1ArB}, procedeu-se à re-mobilização deste elemento P. Era de esperar, também, que a excisão imperfeita do elemento levasse à produção de novos alelos, quer mais, quer menos severos que o  $mast^{P1}$ . Para isso, cruzaram-se fêmeas virgens da estirpe mutante  $mast^{P1}$  com machos de uma estirpe contendo um elemento P defeituoso, o P[Δ2-3], que expressa a enzima transposase embora não funcione como transposição. Esta enzima possibilita a mobilização do elemento P nas células germinais masculinas ou femininas (Greenspan, 1997).

Numa primeira fase, separaram-se 39 alelos aparentemente normais, cujos indivíduos possuíam um índice de sobrevivência semelhante ao da estirpe selvagem, e 51 novas mutações, que provocavam morte prematura ou infertilidade. A análise citológica e molecular dos primeiros mostrou que possuíam fenótipo e parâmetros mitóticos normais e uma excisão perfeita ou quase perfeita do elemento P. Esta reversão do fenótipo mutante por mobilização do elemento P mostra, em definitivo, que este era devido à inserção do P{1ArB} no gene *mast*. Os segundos apresentavam fenótipos com diversos graus de severidade, consoante a região excluída ou deixada pelo elemento P mobilizado. Entre estes encontravam-se indivíduos que morriam nos estádios larvar ou pupal e indivíduos que sobreviviam até ao estado adulto. Obteve-se, portanto, uma colecção de alelos *mast*, incluindo o  $mast^{P4}$  e o  $mast^{P5}$ , referidos nas secções seguintes.

### 4.1. O alelo $mast^{P4}$

#### 4.1.1. Caracterização

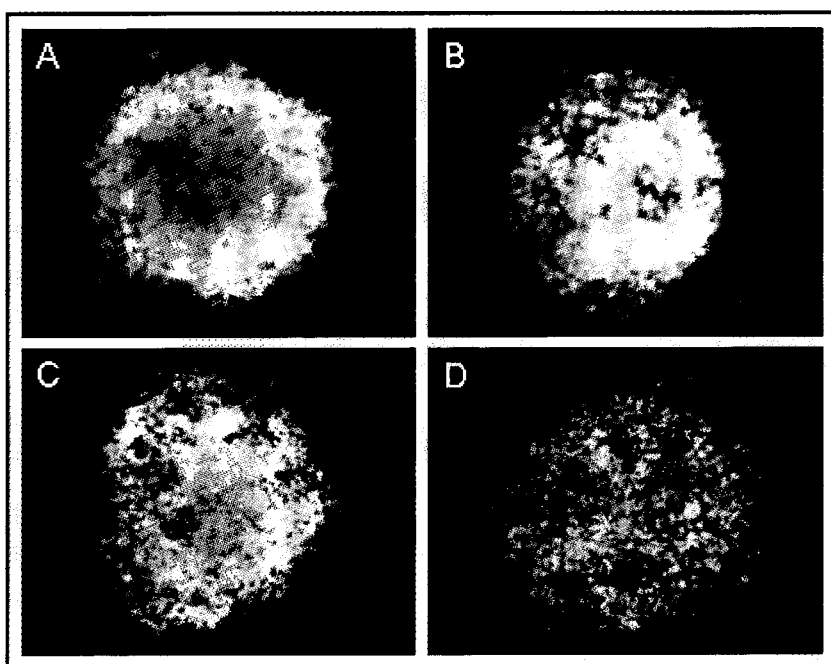
Os indivíduos  $mast^{P4}$  homocigóticos morrem no final da fase larvar ou no início da pupal. A análise por *Southern blot* do DNA genómico dos heterocigóticos

adultos, digerido com várias enzimas de restrição e utilizando sondas para o elemento P e para as regiões a 5' e a 3' deste, mostrou que esta estirpe perdeu parte do P{1ArB}, incluindo o gene *ry*<sup>+</sup>, mantendo inalterado o gene *mast* a 5' da inserção. A 3' foi suprimida uma zona de cerca de 1 kb, correspondente a uma parte da região 5' não codificante do transcrito *mast* estudado, LD11488 (Fig. 5).

O estudo por *Western blot* mostrou que, nos cérebros das larvas homozigóticas *mast*<sup>P4</sup> da terceira fase, é expressa a proteína Mast numa quantidade muito inferior aos níveis normais de expressão (Fig. 15A).

#### 4.1.2. Fenótipo

O alelo *mast*<sup>P4</sup> é o que manifesta um fenótipo mitótico mais severo. Preparações de cérebros de larvas homozigóticas da terceira fase mostram uma grande percentagem de células com cromossomas muito condensados e elevados níveis de poliploidia (Fig. 22). Este alelo apresenta um índice mitótico muito elevado, devido a uma paragem acentuada em prometáfase/metáfase (Lemos *et al.*, 2000).



**Figura 22.** Análise do fenótipo mitótico nos neuroblastos de larvas *mast*<sup>P4</sup> homozigóticas. O DNA foi corado com iodeto de propídeo.

## 4.2. O alelo *mast*<sup>P5</sup>

### 4.2.1. Caracterização

Outro dos alelos obtidos com a mobilização do elemento P foi o *mast*<sup>P5</sup>. Neste, os indivíduos homozigóticos sobrevivem até à fase adulta, mas as fêmeas são estéreis, uma vez que os seus ovos morrem ainda durante o estadio embrionário. É, portanto, dos mutantes *mast* estudados, o que revela um fenótipo menos grave. A análise por *Southern blot* do DNA genómico dos homozigóticos adultos, utilizando as mesmas condições referidas anteriormente (4.1.1.), mostrou que esta estirpe perdeu parte do P{1ArB}, incluindo o gene *ry*<sup>+</sup>, mantendo inalterado o gene *mast* a 3' da inserção. A 5' foi eliminada uma zona de cerca de 1 kb, não atingindo o gene da Asparagina Sintetase (Fig. 5).

Caracterizou-se a expressão da Mast nos embriões postos por fêmeas *mast*<sup>P5</sup> através da análise por *Western blot*, verificando-se ser quase nula (Fig. 15B).

### 4.2.2. Fenótipo

Os embriões *mast*<sup>P5</sup> possuem, além de fusos bipolares normais, fusos monopolares organizados a partir de um ou dois centrossomas, fusos bipolares pequenos com os pólos próximos dos centrossomas e, nos mais tardios, células altamente poliplóides (Maiato *et al.*, 2002).

#### 4.2.2.1. Visualização *in vivo* da GFP-Polo em embriões *mast*<sup>P5</sup>

No intuito de perceber qual o modo de formação dos fusos monopolares no mutante *mast*<sup>P5</sup>, procedeu-se ao seu cruzamento com a estirpe *gfp-polo*, possibilitando o estudo dos embriões *mast*<sup>P5</sup> *in vivo*.

A proteína fluorescente verde (GFP, de *green fluorescent protein*), inicialmente descoberta na alforreca *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962), é uma das mais estudadas e utilizadas em bioquímica e biologia celular, devido às

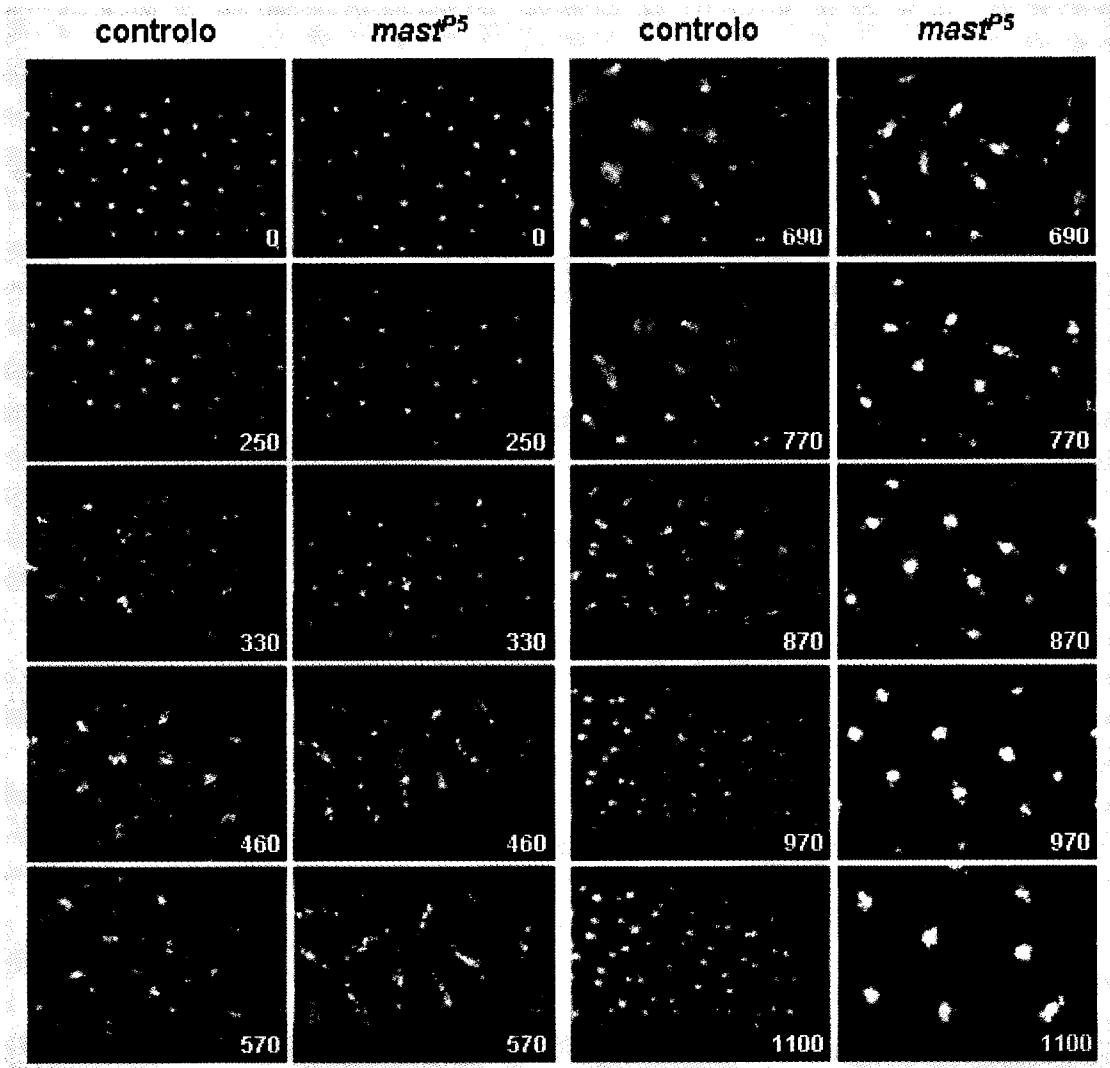
suas propriedades quimioluminescentes e à sua grande resistência e inocuidade. Quando em fusão, numa das extremidades, com outra proteína, permite a análise da sua localização, pois a proteína quimérica também é fluorescente. A quimioluminescência da GFP possibilita a visualização directa por microscopia de fluorescência, sendo ideal para observar e seguir, ao longo do tempo, as proteínas de fusão *in vivo*, pois não compromete a viabilidade celular. Com o seu auxílio, podem-se estudar também células ou tecidos fixados, uma vez que a sua fluorescência se mantém nestas condições, diminuindo apenas um pouco de intensidade. Actualmente existem muitas variantes da GFP, entre as quais a EGFP (de *enhanced green fluorescent protein*), utilizada em experiências descritas nos subcapítulos seguintes, que tem um comprimento de onda de emissão desviado para a zona do vermelho, tornando mais brilhante a sua fluorescência.

A estirpe transgénica *gfp-polo* é estável e expressa uma proteína quimérica completamente funcional, permitindo a sua visualização em embriões *in vivo* nos mesmos locais que a cinase Polo: centrossomas, cinetocoro e corpo médio do fuso, funcionando como um marcador fluorescente (Moutinho-Santos *et al.*, 1999). A linha transformante utilizada possui a inserção no cromossoma 2.

Observaram-se ao microscópio confocal, ao longo do tempo, os embriões postos pelas fêmeas *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>* homozigóticas e, como controlo, embriões resultantes de fêmeas *gfp-polo; +*, tendo-se feitos filmes que permitiram a observação e comparação da progressão mitótica em ambos os tipos. Imagens representativas dos filmes encontram-se na Figura 23.

A GFP-Polo localiza-se nos cinetocoros aquando da desintegração do invólucro nuclear, o que possibilitou seguir o movimento dos cromossomas a partir da prometáfase (Fig. 23, 250 s). Nos embriões de controlo, os cromossomas associam-se rapidamente aos microtúbulos do fuso e constituem a placa metafásica (Fig. 23, 330-570 s). Nos embriões mutantes, no início da mitose ocorre a separação normal dos centrossomas e, após a desagregação do invólucro nuclear, a formação do fuso bipolar (Fig. 23, 0-330 s). No entanto, os

cromossomas não conseguem alcançar um alinhamento metafásico, movimentando-se para trás e para a frente ao longo dos microtúbulos do fuso (Fig. 23, 330-570 s). Estes resultados evidenciam que, na ausência da Mast, há problemas na congregação dos cromossomas, que não conseguem formar uma placa metafásica.



**Figura 23.** Imagens representativas da análise *in vivo* de embriões *gfp-polo* (controle) e *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>* (*mast<sup>P5</sup>*) durante o ciclo 12. O tempo decorrido, assinalado na margem inferior direita de cada imagem, está em segundos.

Além disso, também ocorrem defeitos na alongação do fuso. Ainda durante a prometáfase, os fusos dos embriões *mast<sup>P5</sup>* não alongam tanto como os dos controles (Fig. 23, 330-570 s). Em metafase, estes fusos começam a encurtar e

acabam por colapsar na região equatorial, formando fusos monopolares (Fig. 23, 690-1100 s).

### 5. Transfecção de células

A transfecção de células de *Drosophila* e humanas foi realizada com a finalidade de confirmar a imunolocalização da Mast e de averiguar se a proteína de *Drosophila* era capaz de se ligar aos microtúbulos e outras estruturas nas células humanas, ou seja, se teria uma localização conservada.

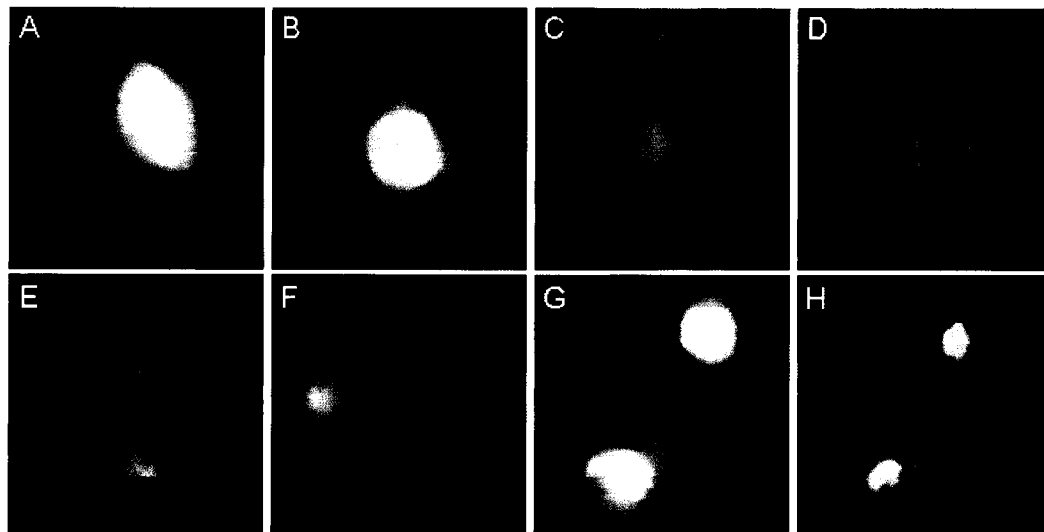
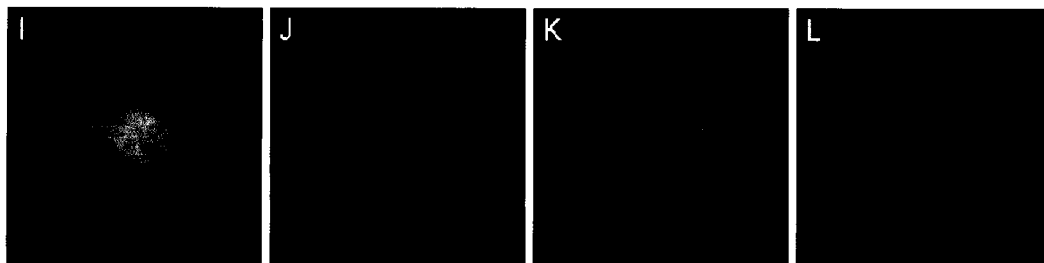
#### 5.1. Construção dos vectores EGFP-Mast

Procedeu-se à clonagem da região codificante completa do cDNA *mast* nos vectores de transfecção pMT/EGFP-C1 (para células S2, de *Drosophila*) e pEGFP-C1 (para células HeLa, humanas) ("Material e Métodos"). Estes vectores permitem a clonagem, a jusante do cDNA *egfp* e no mesmo quadro de leitura, de outros cDNAs, possibilitando a visualização da proteína de fusão expressa. O vector pEGFP-C1 tem uma expressão constitutiva, porém, o pMT/EGFP-C1 necessita de indução por sulfato de cobre II.

#### 5.2. Transfecção em S2 e em HeLa

As células S2 e HeLa foram transfectadas com os construtos correspondentes. Nas células de *Drosophila*, a expressão foi induzida 24 horas após a transfecção e, algum tempo depois, foram submetidas a *cytospin*. Ambos os tipos celulares foram fixados com formaldeído.

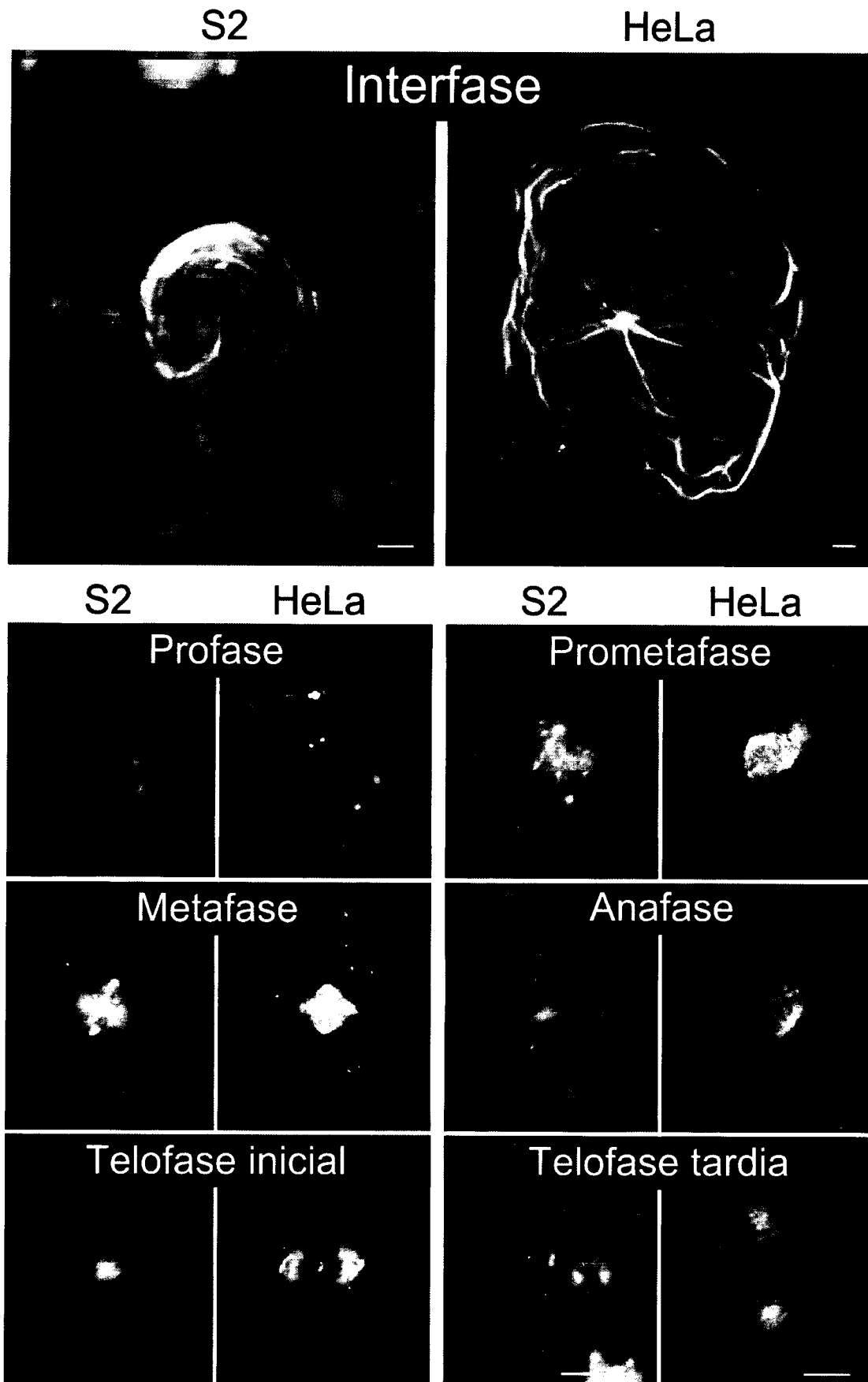
Como controlo, foram transfectados os vectores iniciais, que contêm e expressam só a EGFP. Nos dois casos, a proteína EGFP expressa mostrou uma distribuição homogénea ao longo do ciclo celular (Fig. 24).

**S2****HeLa**

**Figura 24.** Distribuição da proteína EGFP em células S2 e HeLa. O DNA está representado a vermelho e a EGFP a verde. A e I - interfase; B e J - profase; C e K - prometafase; D e L - metafase; E - anafase A; F - anafase B; G - telofase; H - citocinese.

A localização da proteína quimérica EGFP-Mast nas células S2 ou HeLa transfectadas (Fig. 25) mostrou-se, em geral, coincidente com a obtida por imunofluorescência em células S2 (Fig. 16) e em neuroblastos (Fig. 17, 18 e 19). No entanto, nas células interfásicas transfectadas, além da localização centrossomal, visualiza-se uma grande acumulação da proteína nos microtúbulos do citosqueleto, em ambos os tipos celulares (Fig. 25). Estes microtúbulos apresentam-se em feixes, parecendo estar mais estabilizados que habitualmente. É de realçar que o índice mitótico diminui muito nas células transfectadas com este construto, encontrando-se na sua grande maioria em interfase. A rede microtubular interfásica onde se encontra a EGFP-Mast começa a despolimerizar, apesar de lentamente, quando se incubam as células transfectadas com colchicina (Fig. 26A-C).

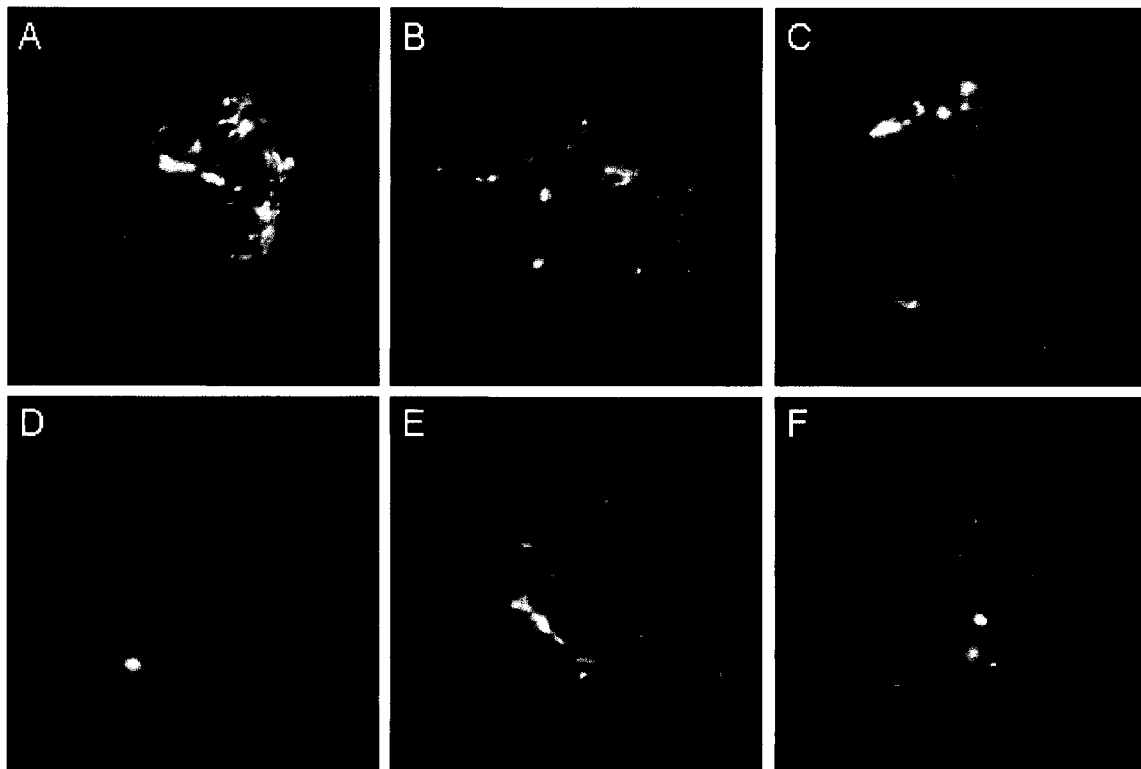




**Figura 25.** Visualização da proteína quimérica EGFP-Mast em células S2 e HeLa transfectadas. O DNA foi corado com iodeto de propídeo e está representado a vermelho e a proteína de fusão a verde.

Quer nas células humanas, quer nas de *Drosophila*, a EGFP-Mast localiza-se, em profase, preferencialmente ao nível dos centrossomas, enquanto que em prometáfase e metafase também se associa aos microtúbulos do fuso e à região centromérica (Fig. 25). Em anafase e telofase, nas células S2, além dos centrossomas, começa a visualizar-se a ligação da EGFP-Mast à zona média e ao corpo médio do fuso, respectivamente (Fig. 25). Nas células HeLa acontece o mesmo, apesar de não ser tão evidente em anafase (Fig. 25).

Em conclusão, os resultados da transfecção das células de cultura de *Drosophila* vieram confirmar a localização intracelular da Mast obtida por imunofluorescência. Adicionalmente, a transfecção das células HeLa permitiu mostrar que a Mast tem um padrão de localização muito semelhante nas células humanas.

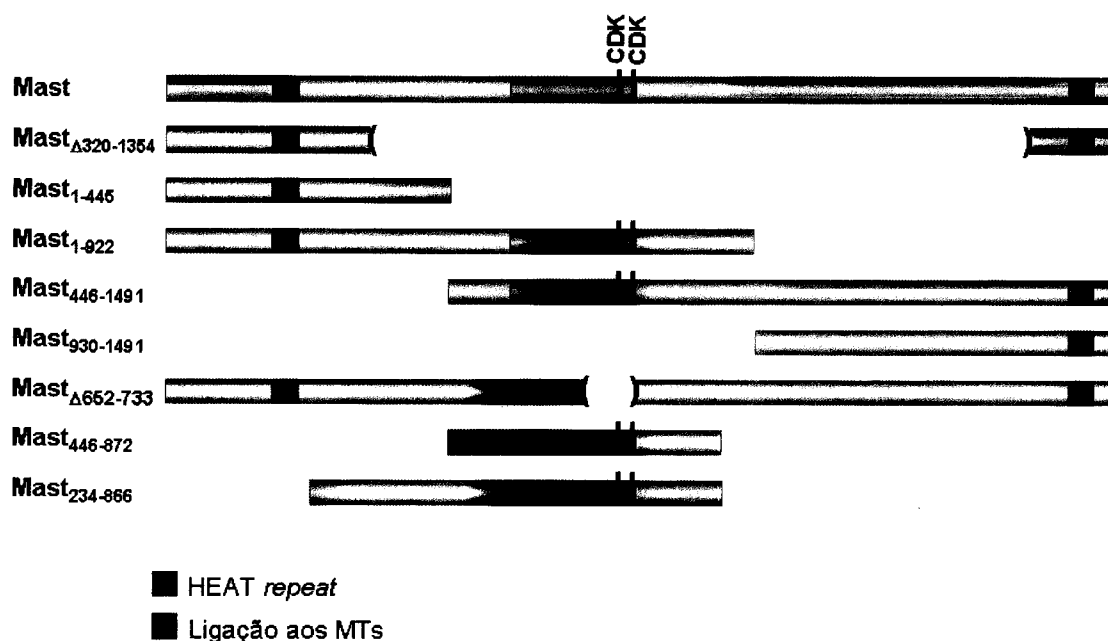


**Figura 26.** Efeito do tratamento com colchicina na proteína de fusão EGFP-Mast expressa em células S2. O DNA foi corado com iodeto de propídeo e está representado a vermelho e a proteína de fusão a verde. A-D - células fixadas com formaldeído; E-F - células fixadas com metanol.

Também se sujeitaram células S2 transfectadas ao tratamento com colchicina, de modo a poder observar o efeito deste despolimerizador de microtúbulos na localização da proteína quimérica EGFP-Mast e comparar com os resultados obtidos anteriormente. Após a incubação, os microtúbulos começaram a despolimerizar, observando-se a localização da EGFP-Mast nos microtúbulos restantes (Fig. 26A-C e E). Na ausência de microtúbulos, a EGFP-Mast parece manter a sua localização nos centrossomas (Fig. 26D) e na região centromérica (Fig. 26F). Estes resultados são análogos aos previamente obtidos (subcapítulo 3.4.3. e Fig. 20).

### 5.3. Outros construtos

Para poder analisar quais os domínios da Mast responsáveis pela sua localização nos diferentes compartimentos celulares, fizeram-se vários construtos truncados no vector pMT/EGFP-C1. Na Figura 27 estão representadas as zonas da Mast expressas por cada um dos construtos.

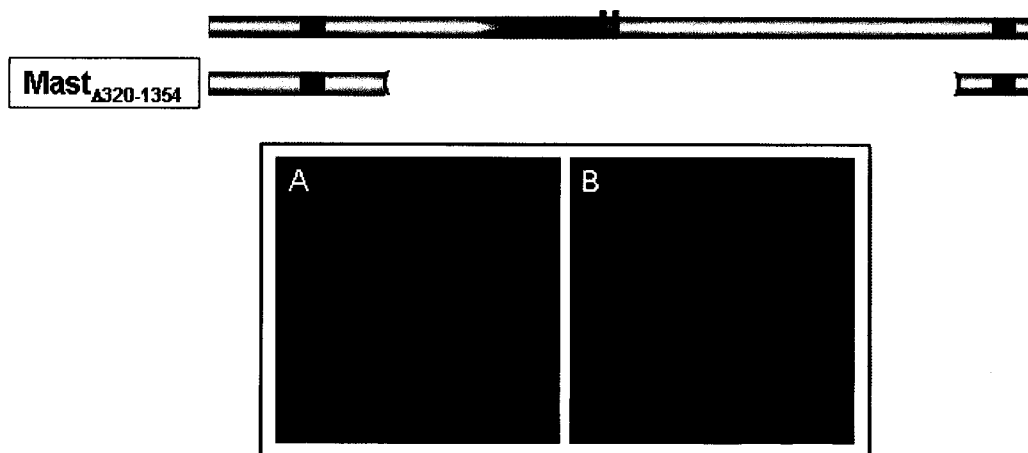


**Figura 27.** Representação da proteína Mast e das regiões expressas por cada um dos construtos efectuados no vector pMT/EGFP-C1. CDK: locais susceptíveis de serem fosforilados pelas CDKs; HEAT repeat: motivos putativos do tipo HEAT repeat; Ligação aos MTs: zona semelhante ao domínio Pro-rich da MAP4, que interacciona com os microtúbulos.

Cada um dos construtos foi utilizado na transfecção de células S2 de *Drosophila*, que, após a indução, foram sujeitas a *cytospin* e, conforme indicado, fixadas com formaldeído ou metanol e analisadas por imunofluorescência. Devido a diversos problemas, nomeadamente a índices muito baixos de transfecção, obtiveram-se apenas resultados preliminares no estudo da sua localização, que estão apresentados nos subcapítulos seguintes.

### 5.3.1. EGFP-Mast $\Delta$ 320-1354

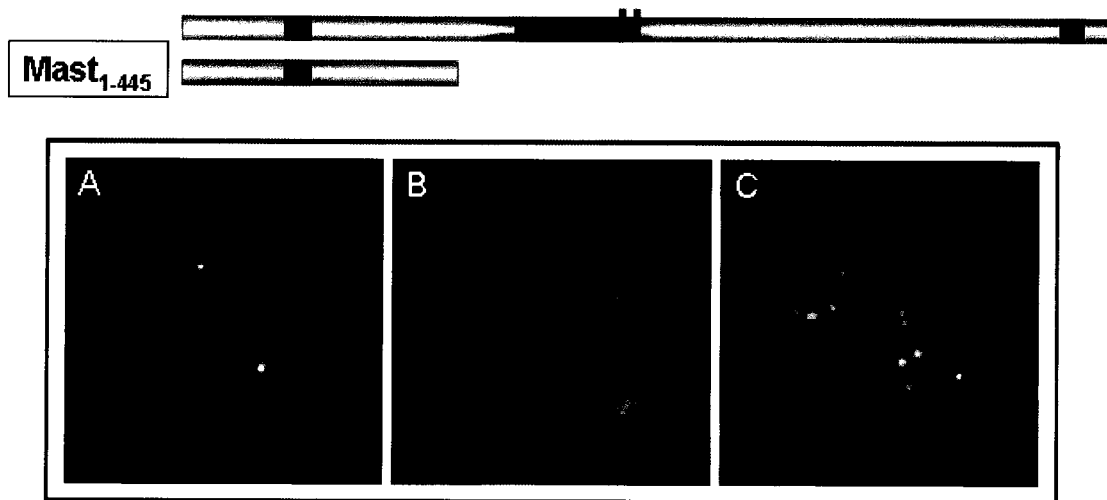
Na proteína de fusão EGFP-Mast $\Delta$ 320-1354 são expressas ambas as extremidades da Mast, incluindo os motivos HEAT. Esta proteína quimérica parece acumular-se apenas nos centrossomas (Fig. 28A), tendo, de resto, uma distribuição homogénea (Fig. 28B), semelhante à da EGFP sozinha.



**Figura 28.** Representação da EGFP-Mast $\Delta$ 320-1354 e sua localização em células S2. O DNA, corado com DAPI, está representado a azul e a proteína quimérica a vermelho.

### 5.3.2. EGFP-Mast $_1$ -445

Na EGFP-Mast $_1$ -445 é expresso 1/3 da parte N-terminal da Mast. Esta proteína de fusão parece associar-se apenas aos centrossomas (Fig. 29A e B). Não se localiza nos microtúbulos nem no corpo médio do fuso (Fig. 29B). Forma frequentemente agregados que se distribuem pelo citoplasma das células transfectadas (Fig. 29C).



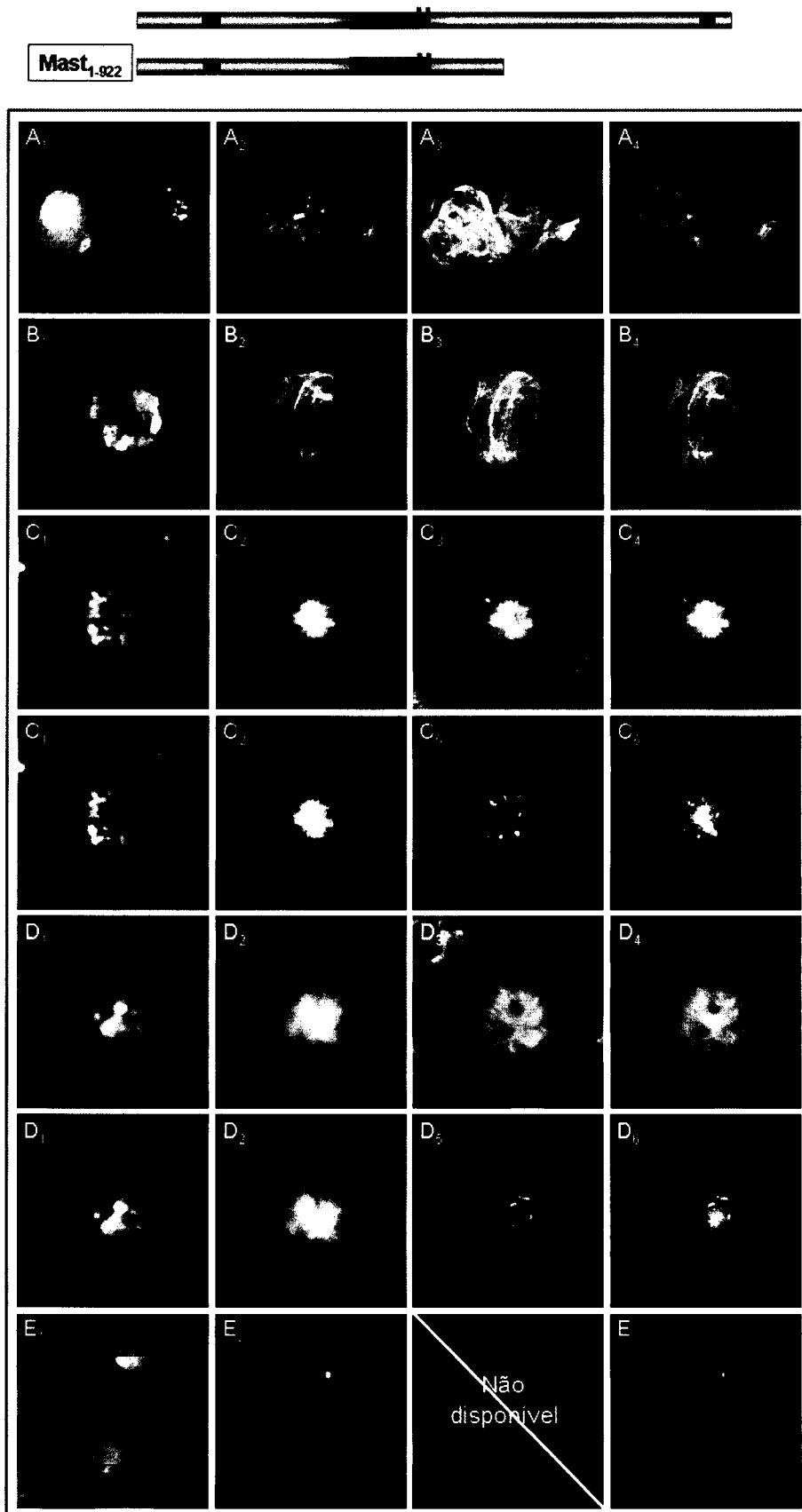
**Figura 29.** Esquema representativo da EGFP-Mast<sub>1-445</sub> e sua observação em células S2 transfectadas. O DNA, corado com DAPI, está representado a azul e a proteína de fusão a vermelho.

### 5.3.3. EGFP-Mast<sub>1-922</sub>

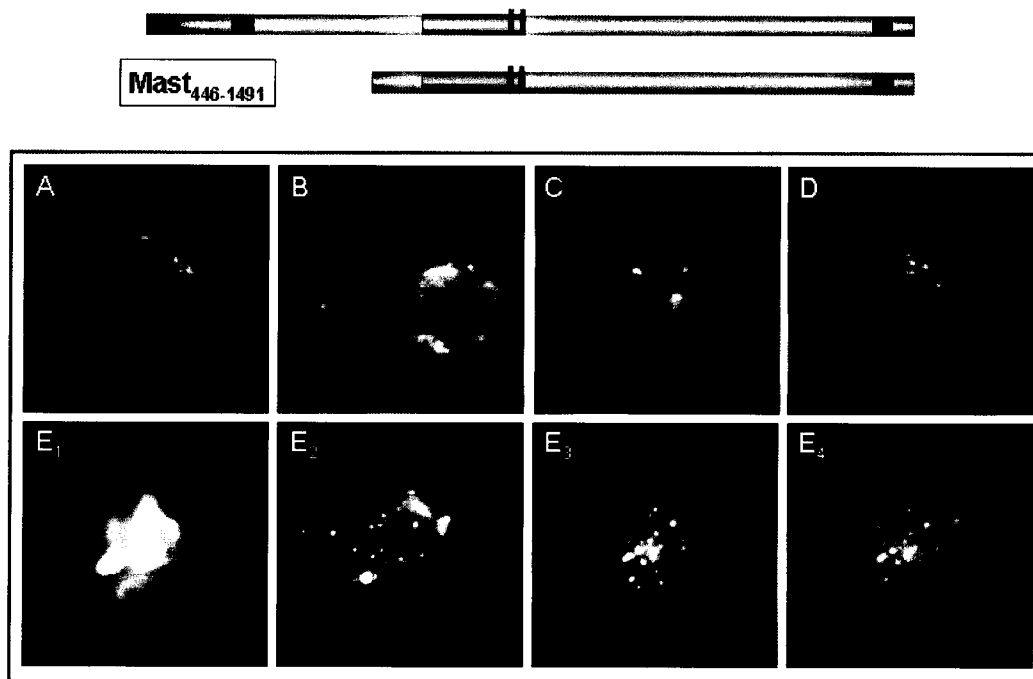
Na EGFP-Mast<sub>1-922</sub> são expressos 2/3 da parte N-terminal da Mast. Esta proteína quimérica parece localizar-se nos centrossomas (Fig. 30E), nos microtúbulos do fuso e interfásicos (Fig. 30A, B e C) e no corpo médio do fuso (Fig. 30A). As células transfectadas formam frequentemente arranjos monopolares, com os cromossomas situados perto da extremidade dos microtúbulos (Fig. 30C) ou mergulhados no meio destes, perto da região centrossomal (Fig. 30D).

### 5.3.4. EGFP-Mast<sub>446-1491</sub>

Na EGFP-Mast<sub>446-1491</sub> são expressos 2/3 da parte C-terminal da Mast. Esta proteína de fusão associa-se aos centrómeros, próximo da cinase Polo (Fig. 31E). Localiza-se também na zona dos microtúbulos, mas com um tipo de acumulação pontuado diferente do habitual (Fig. 31A e B). As células transfectadas apresentam, igualmente, marcação do corpo médio do fuso, que é, no entanto, muito fraca (Fig. 31B). Frequentemente aparecem células em que a EGFP-Mast<sub>446-1491</sub> forma agregados situados numa zona específica do citoplasma (Fig. 31C e D).



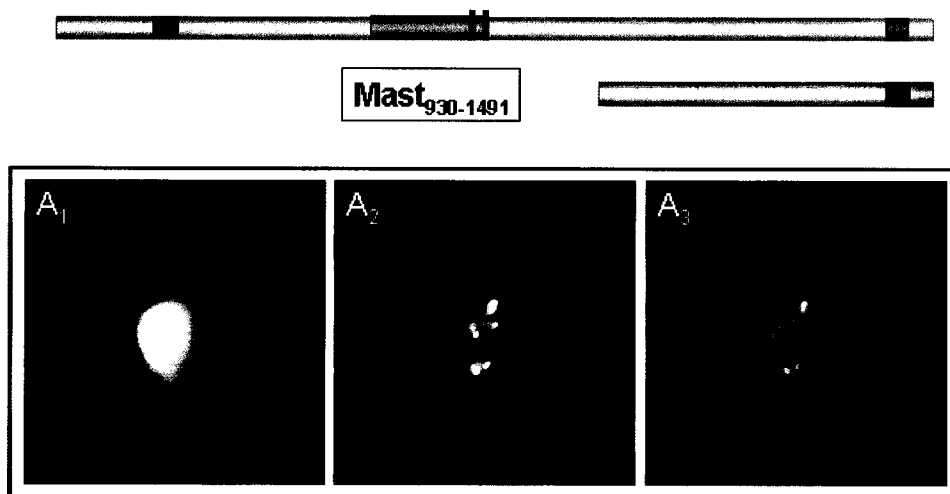
**Figura 30.** Representação da EGFP-Mast<sub>1-922</sub> e sua visualização em células S2 transfectadas. O DNA foi corado com DAPI. A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>1</sub>: DNA; A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> e E<sub>2</sub>: EGFP-Mast<sub>1-922</sub>; A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> e D<sub>3</sub>:  $\alpha$ -Tubulina; C<sub>5</sub> e D<sub>5</sub>: BubR1. Nas sobreposições (A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>6</sub> e E<sub>3</sub>), o DNA está representado a azul, a proteína quimérica a vermelho e a  $\alpha$ -Tubulina (A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub>) ou a BubR1 (C<sub>6</sub> e D<sub>6</sub>) a verde.



**Figura 31.** Representação da EGFP-Mast<sub>446-1491</sub> e sua localização em células S2. A-D: preparações fixadas com formaldeído; E: célula fixada com metanol. O DNA foi corado com DAPI. A-D e E<sub>4</sub>: o DNA está representado a azul e a proteína de fusão a vermelho; E<sub>1</sub>: DNA; E<sub>2</sub>: EGFP-Mast<sub>446-1491</sub>; E<sub>3</sub>: Polo; E<sub>4</sub>: a Polo está sinalizada a verde.

### 5.3.5. EGFP-Mast<sub>930-1491</sub>

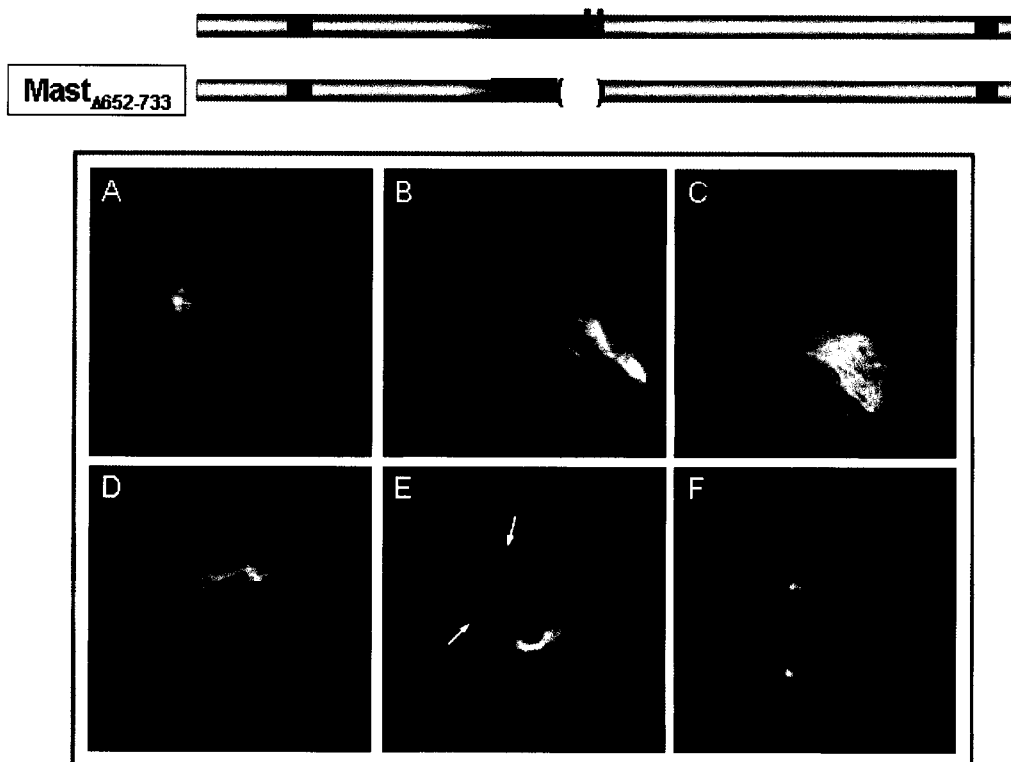
Na EGFP-Mast<sub>930-1491</sub> é expresso 1/3 da parte C-terminal da Mast. Esta proteína quimérica parece localizar-se apenas nos centrómeros (Fig. 32A).



**Figura 32.** Esquema representativo da EGFP-Mast<sub>930-1491</sub> e sua observação em células S2 transfectadas fixadas com metanol. O DNA foi corado com DAPI. A<sub>1</sub>: DNA; A<sub>2</sub>: EGFP-Mast<sub>930-1491</sub>; A<sub>3</sub>: sobreposição, na qual o DNA está representado a azul e a proteína quimérica a vermelho.

### 5.3.6. EGFP-Mast $\Delta$ 652-733

Na EGFP-Mast $\Delta$ 652-733, a proteína Mast encontra-se truncada em parte da região anteriormente prevista como putativa de ligação aos microtúbulos. Esta proteína de fusão parece ligar-se aos centrómeros (Fig. 33A), aos microtúbulos (Fig. 33A, B, C e D), ao corpo médio do fuso (Fig. 33B) e aos centrossomas (Fig. 33E). Também forma agregados citoplasmáticos (Fig. 33F), tal como algumas das outras proteínas quiméricas estudadas.

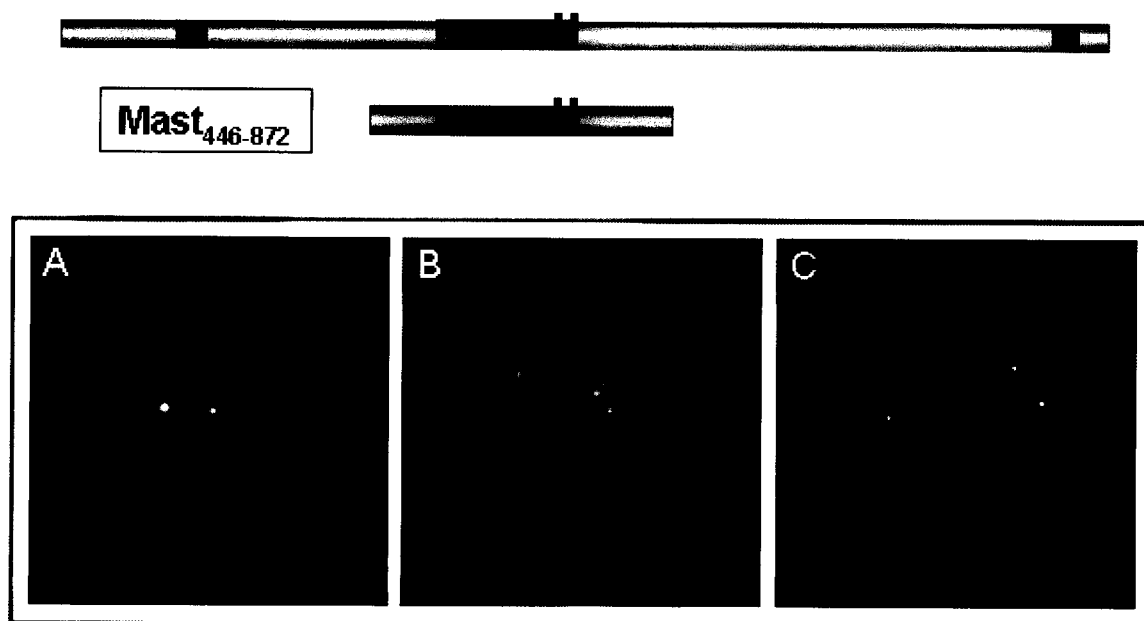


**Figura 33.** Representação da EGFP-Mast $\Delta$ 652-733 e sua visualização em células S2. As setas amarelas estão a indicar os centrossomas. O DNA, corado com DAPI, está representado a azul e a proteína de fusão a vermelho.

### 5.3.7. EGFP-Mast $\Delta$ 446-872

Na EGFP-Mast $\Delta$ 446-872 é expressa a zona previamente detectada como potencial local de ligação aos microtúbulos. A parte do cDNA *mast* subclonada neste construto é idêntica à utilizada na produção da proteína recombinante Mast<sub>rec2</sub> (subcapítulo 3.1). A proteína de fusão EGFP-Mast $\Delta$ 446-872, bem como a Mast<sub>rec2</sub>, é insolúvel, tendo sido possível observar unicamente a sua localização em agregados citoplasmáticos (Fig. 34A-C).





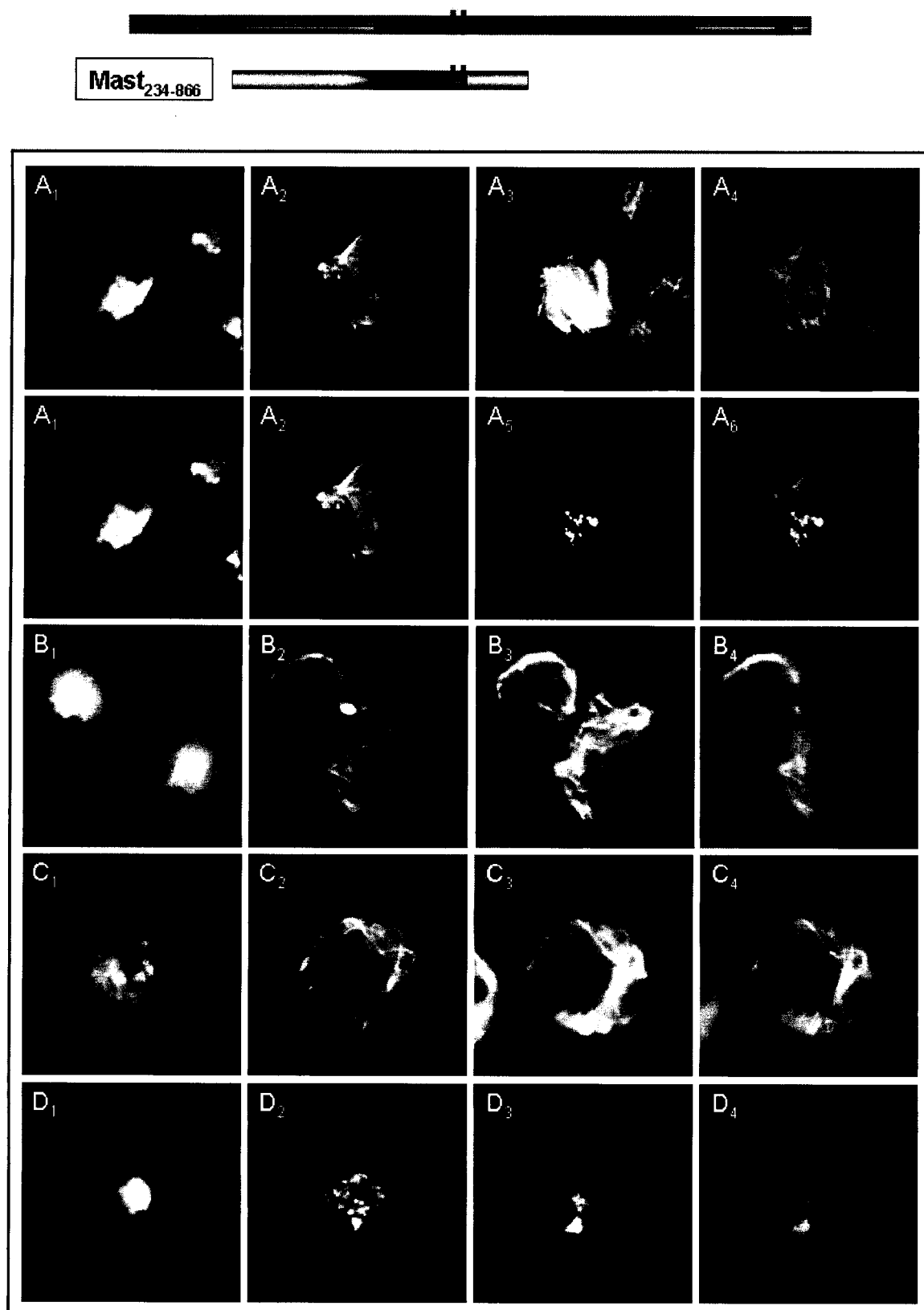
**Figura 34.** Esquema representativo da EGFP-Mast<sub>446-872</sub> e sua localização em células S2. O DNA, corado com DAPI, está representado a azul e a proteína quimérica a vermelho.

#### **5.3.8. EGFP-Mast<sub>234-866</sub>**

Na EGFP-Mast<sub>234-866</sub> é expressa a região inicialmente prevista como susceptível de se ligar aos microtúbulos e uma parte a montante, não incluindo o primeiro motivo HEAT. Esta proteína de fusão associa-se aos microtúbulos (Fig. 35A, B e C) e ao corpo médio do fuso (Fig. 35B). Tal como a EGFP-Mast<sub>9-922</sub>, que expressa 2/3 da parte N-terminal da Mast (secção 5.3.3.), a EGFP-Mast<sub>234-866</sub> provoca a formação de fusos desorganizados e de arranjos monopolares nas células transfectadas (Fig. 35A e D, respectivamente).

#### **5.4. Delimitação dos domínios de localização da Mast**

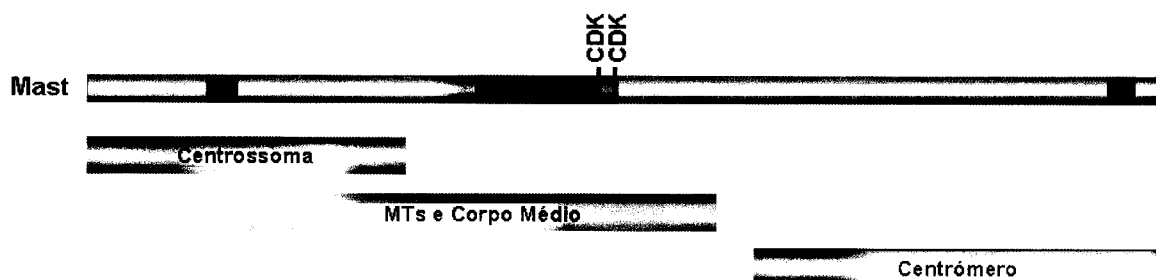
Na Tabela 4 encontra-se um resumo dos resultados obtidos na localização das diferentes proteínas quiméricas ao nível dos microtúbulos, corpo médio do fuso, centrossomas e centrómeros.



**Figura 35.** Representação da EGFP-Mast<sub>234-866</sub> e sua observação em células S2 transfectadas. O DNA foi corado com DAPI. A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub>: DNA; A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>: EGFP-Mast<sub>234-866</sub>; A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> e D<sub>3</sub>: α-Tubulina; A<sub>5</sub>: BubR1. Nas sobreposições (A<sub>4</sub>, A<sub>6</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub>), o DNA está representado a azul, a proteína de fusão a vermelho e a α-Tubulina (A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub>) ou a BubR1 (A<sub>6</sub>) a verde.

Parte da Mast expressa	Microtúbulos	Corpo médio	Centrossomas	Centrómeros
Δ320-1354	—	—	✓	—
1-445	—	—	✓	—
1-922	✓	✓	✓	—
446-1491	+/-	+/-	—	✓
930-1491	—	—	—	✓
Δ652-733	✓	✓	✓	✓
446-872	a)	a)	a)	a)
234-866	✓	✓	✓	—

**Tabela 4.** Localização de cada uma das proteínas expressas nas células S2 transfectadas em fusão com a EGFP. ✓: localiza; —: não localiza; +/-: localização deficiente; a) a proteína é insolúvel, formando agregados.



**Figura 36.** Representação esquemática dos domínios suficientes para a ligação da Mast aos centrossomas, microtúbulos, corpo médio do fuso e centrómeros, delimitados com base na análise da localização das várias proteínas quiméricas.

Com base na tabela, foi possível delimitar domínios suficientes para uma apropriada acumulação da Mast nos diversos locais (Fig. 36). Pode constatar-se que os domínios de ligação aos microtúbulos e ao corpo médio do fuso são semelhantes, provavelmente devido à composição microtubular do último.

## 6. Visualização da EGFP-Mast *in vivo*

Fizeram-se linhas transgênicas *egfp-mast* para poder observar a distribuição da Mast *in vivo* em neuroblastos e embriões de *Drosophila melanogaster*.

### 6.1. O elemento de transposição pP{UASp} *egfp-mast*

Procedeu-se à construção de um elemento P, utilizando o vector pP{UASp}, no qual foram clonados os cDNAs *egfp* e *mast* em contíguo, aproveitando a subclonagem realizada anteriormente de toda a região codificante *mast* no vector de transfecção pMT/EGFP-C1. A descrição pormenorizada pode ser consultada no capítulo “Material e Métodos”. O construto foi microinjectado em embriões da estirpe  $w^{1118}$  de *Drosophila melanogaster*, juntamente com plasmídeo *helper*, como fonte de transposase.

### 6.2. Produção de linhas transgênicas *egfp-mast*

Os indivíduos microinjectados sobreviventes foram cruzados com os pares da estirpe *w;Ifl/CyO;MKRS/TM2, Ubx*. Foi seleccionada a progenia de olhos amarelos ou laranja, cores resultantes da presença do gene *white* selvagem ( $w^+$ ) no P{UASp}, que se cruzou novamente com adultos *w;Ifl/CyO;MKRS/TM2, Ubx*, de modo a poder mapear e a estabelecer *stocks* de cada uma das inserções. Obtiveram-se 11 linhas transgênicas independentes, 2 no cromossoma X, 4 no segundo, 3 no terceiro e 2 no quarto.

### 6.3. Expressão da EGFP-Mast

O P{UASp} contém vários locais de ligação à GAL4, denominados UAS (de *upstream activation sequence*), no início da região promotora que antecede o

local de clonagem (“Material e Métodos”). Quando o construto é combinado com uma fonte de GAL4, ativador da transcrição oriundo da levedura, ocorre a indução da expressão do gene a jusante (neste caso a fusão *egfp-mast*) (Fig. 37). A fonte de GAL4 é fornecida por estirpes que contêm um transposão com um promotor endógeno de um gene, expresso em determinadas fases do desenvolvimento ou em tecidos de interesse, seguido do gene da GAL4, cuja expressão vai ser induzida nessas mesmas fases ou tecidos (Fig. 37). É necessário cruzar a linha transgênica contendo o construto P{UASp}/*egfp-mast* com as linhas GAL4 convenientes, mas somente a progenia que contém ambos os transposões expressa a proteína quimérica.

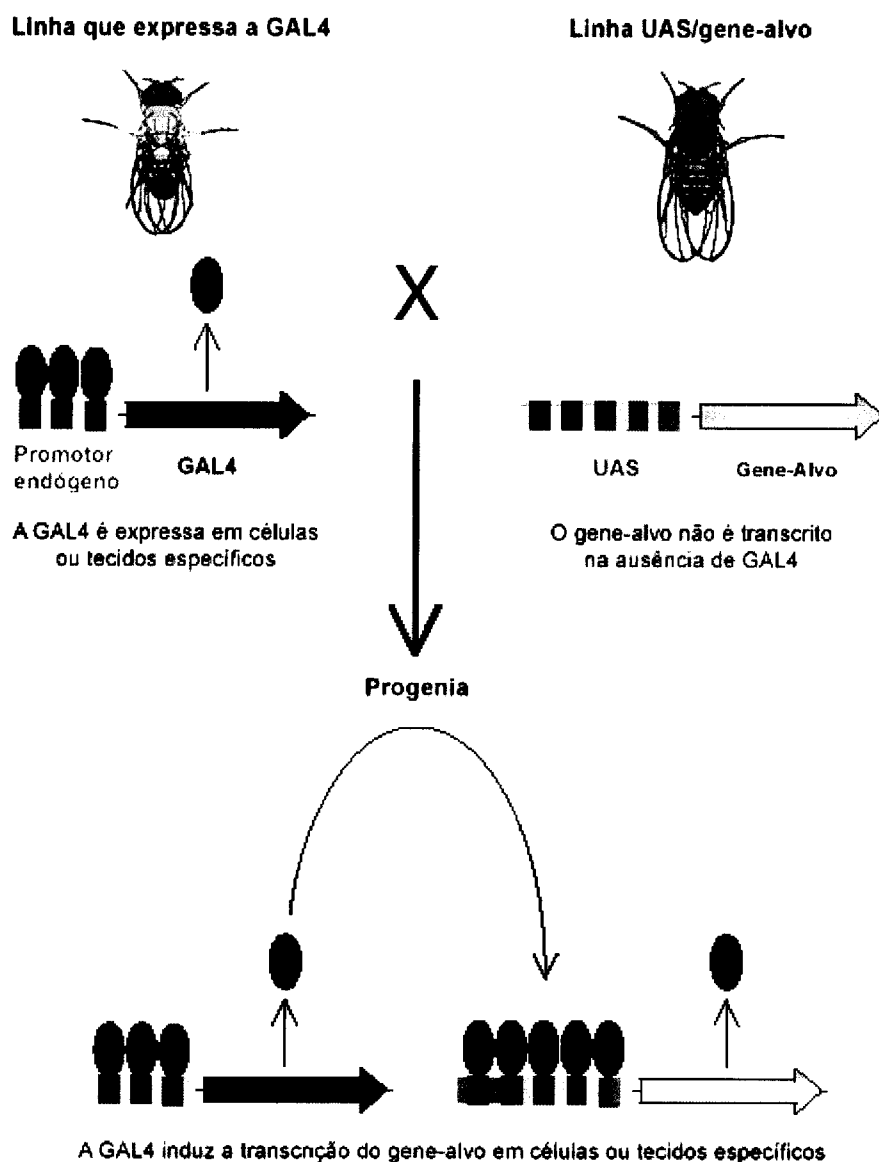
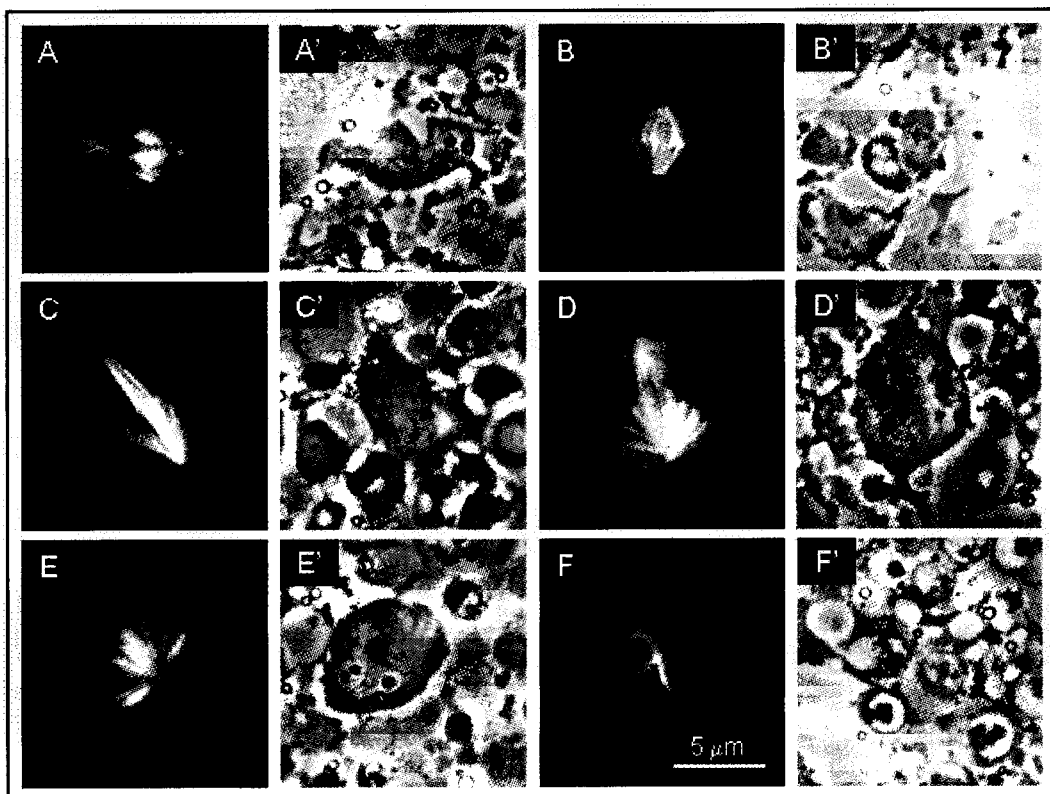


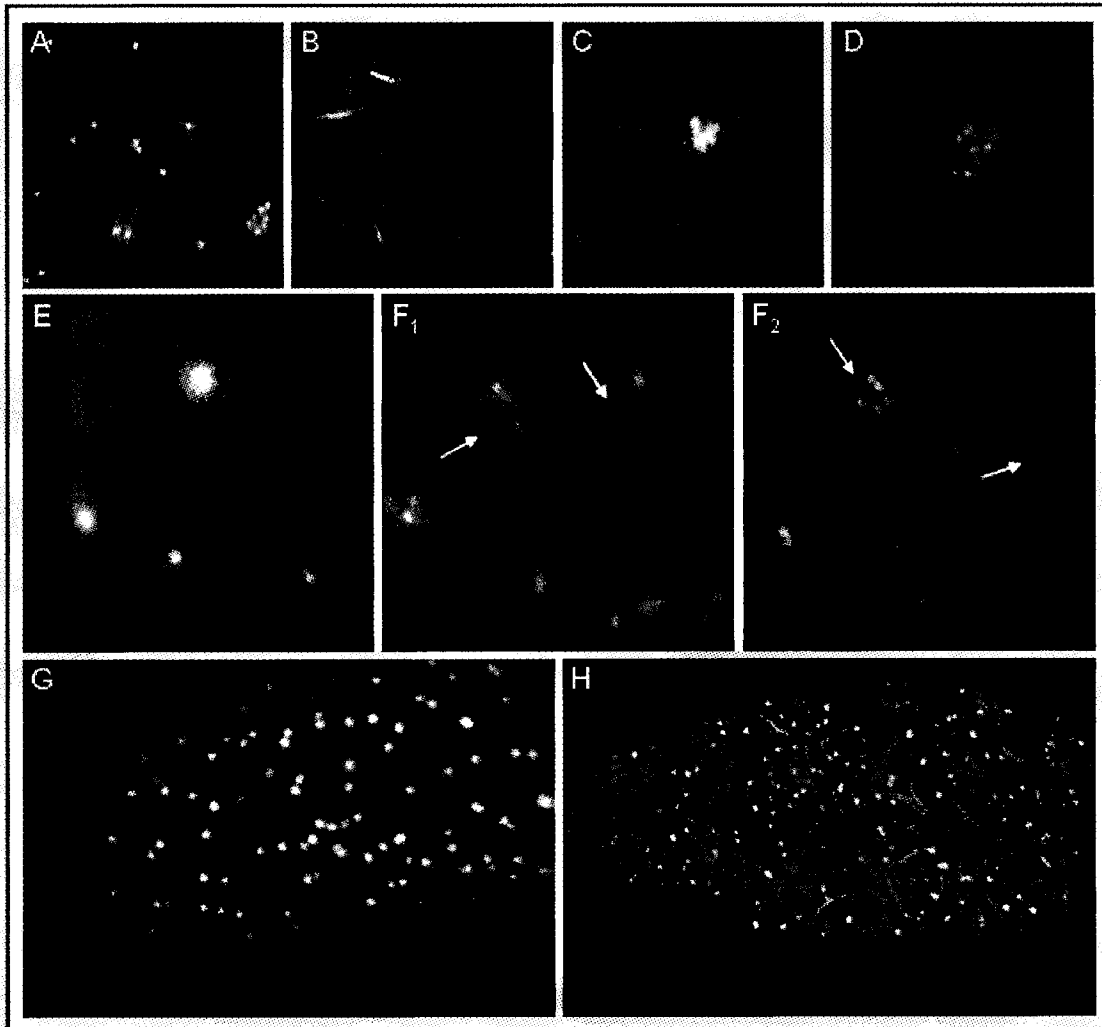
Figura 37. O sistema GAL4 (adaptado de Phelps e Brand, 1998).

### 6.3.1. Expressão em neuroblastos

Para a expressão em neuroblastos, cruzaram-se indivíduos transformantes homocigóticos *egfp-mast* e Mz1061. Estes últimos pertencem a uma linha GAL4 cujo promotor induz a transcrição nos cérebros larvares. Portanto, metade da progenia resultante expressa a GAL4 nestes tecidos, activando a expressão da EGFP-Mast. Todas as linhas *egfp-mast*/Mz1061 testadas sobreexpressavam a proteína quimérica, causando paragem do ciclo celular da maioria dos neuroblastos, de modo que não foi possível observar a sua progressão ao longo do ciclo celular. As imagens foram recolhidas *in vivo*, em preparações temporárias sem fixação. Visualizou-se a expressão da EGFP-Mast no fuso mitótico (Fig. 38A a E), no centrossoma (Fig. 38A a D), na região centromérica ou nas extremidades mais dos microtúbulos (Fig. 38A-B e 40D, respectivamente) e no corpo médio do fuso (Fig. 38F). É de salientar que os microtúbulos parecem mais estabilizados que o normal e que ocorre o aparecimento de fusos monopolares, como o da Figura 38E.



**Figura 38.** Visualização *in vivo* de neuroblastos larvares que expressam a proteína de fusão EGFP-Mast. A-F: EGFP-Mast; A'-F': contraste de fase.



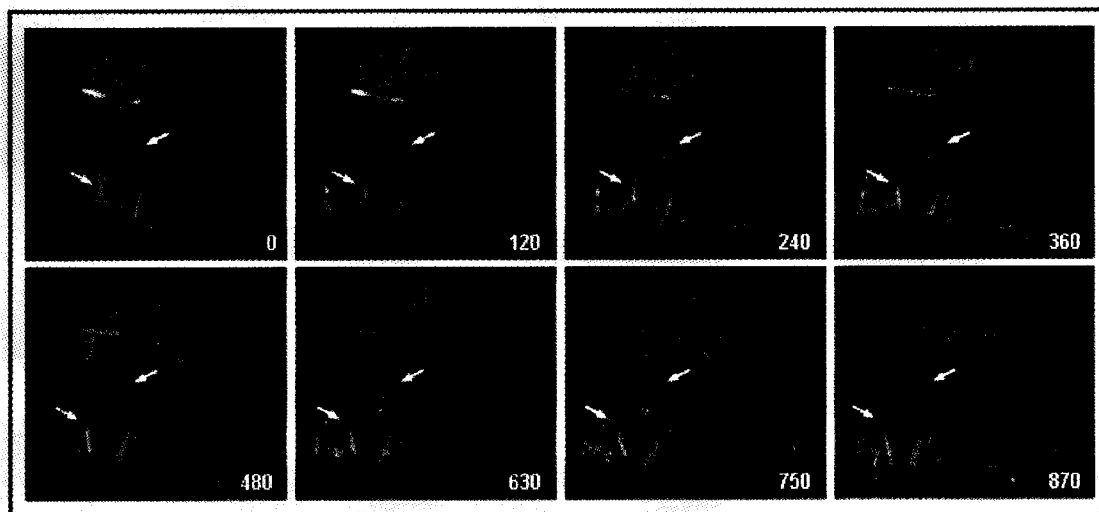
**Figura 39.** Imagens de embriões *egfp-mast* recolhidas *in vivo*. Em  $F_2$  pode-se visualizar o mesmo embrião que em  $F_1$ , mas 100 minutos depois. As setas indicam os centrossomas separados em  $F_1$  e próximos em  $F_2$ .

### 6.3.2. Expressão em embriões

Cruzaram-se em massa indivíduos homozigóticos VP16, transgênicos com expressão da GAL4 em embriões, e *egfp-mast*. Os embriões resultantes foram descorionados e montados em óleo Voltalef, de modo a poderem ser observados *in vivo*. Aparentemente, havia alguma variação nos níveis de expressão da proteína quimérica entre os diversos embriões, com sobreexpressão e paragem do ciclo celular na maior parte deles. Alguns exemplos de embriões característicos incapazes de progredir estão na Figura 39. A EGFP-Mast localiza-se nos centrossomas (Fig. 39A-H) e nos microtúbulos que irradiam destes, muito

mais longos que o habitual (Fig. 39A e B). Parece, então, que a proteína de fusão estabiliza os microtúbulos. Também aparecem frequentemente agregados centrossomais (Fig. 39C-E e F<sub>2</sub>). É de assinalar que as Figuras 39F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> mostram o mesmo embrião, com um intervalo de 100 minutos. Os centrossomas, que se encontravam separados em 39F<sub>1</sub>, começaram, aos poucos e com movimentos para trás e para a frente, a juntar-se cada vez mais, apresentando-se praticamente colapsados em 39F<sub>2</sub>. De facto, o fenómeno é bastante semelhante ao que ocorre na ausência da Mast (ver embriões *gfp-polo/mast*<sup>5</sup> no subcapítulo 4.2.2.1.). Também aqui, deve ser esta a causa dos agregados centrossomais.

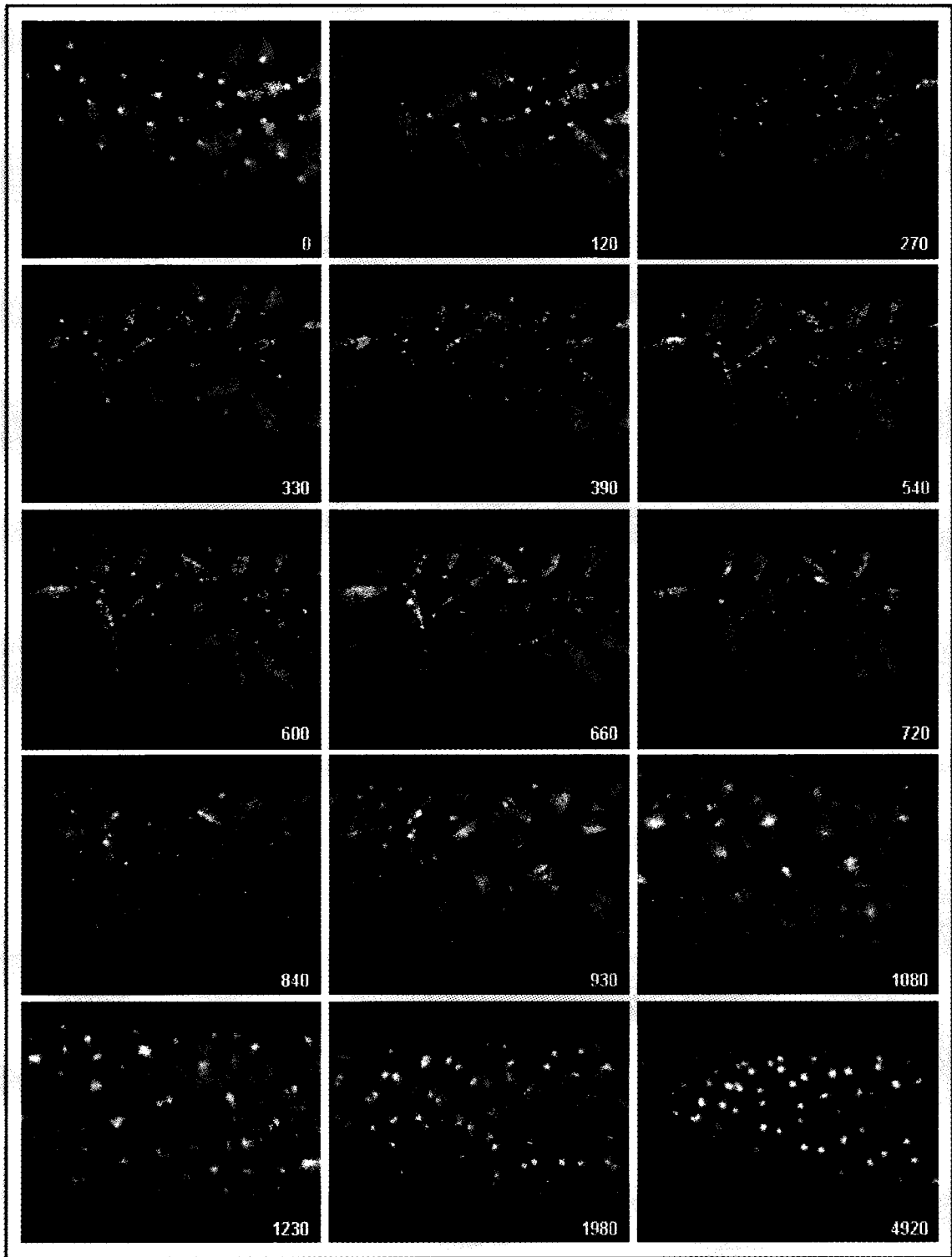
Na sequência de imagens da Figura 40 é possível observar o movimento da EGFP-Mast ao longo dos microtúbulos. Este tipo de movimento ocorre na direcção das extremidades microtubulares em crescimento nas proteínas humanas CLASP1 e CLASP2, homólogas da Mast (Akhmanova *et al.*, 2001; Maiato *et al.*, 2003).



**Figura 40.** Imagens representativas da análise *in vivo* de embriões *egfp-mast*. As setas indicam microtúbulos em movimento e estão colocadas sempre nas mesmas posições. O tempo decorrido, assinalado nas margens inferiores direitas, está em segundos.

Alguns dos embriões conseguiram concretizar normalmente o seu ciclo celular, devido, provavelmente, a terem níveis mais baixos de expressão da proteína quimérica. Na Figura 41 pode-se observar a progressão de um embrião





**Figura 41.** Progressão no ciclo celular de embriões *egfp-mast*. O tempo decorrido, assinalado nas margens inferiores direitas, está em segundos.

ao longo do tempo. A EGFP-Mast tem uma forte acumulação nos centrossomas durante todo o ciclo celular (Fig. 41). Em profase, a proteína quimérica começa a localizar-se na região centromérica (Fig. 41 0-270 s), aí permanecendo até anafase (Fig. 41 330-660 s). A sua ligação aos microtúbulos do fuso é visível desde a prometáfase até ao final da anafase (Fig. 41 270-840 s). Em anafase, a EGFP-Mast inicia a sua deslocação para a zona média do fuso (Fig. 41 720-930 s), concentrando-se, em telófase, no corpo médio do fuso (Fig. 41 1080-1230 s). É de salientar que o embrião representado na Figura 41, após a separação centrossomal (Fig. 41 1980 s), também não tenha sido capaz de entrar em mitose, pois, passados cerca de 50 minutos, continuava a manter um posicionamento semelhante dos centrossomas (Fig. 41 4920 s).

### **III. Discussão**

A investigação subjacente a esta tese conduziu à descoberta de uma nova proteína de *Drosophila melanogaster* que exerce importantes funções mitóticas, nomeadamente na organização e função do fuso bipolar mitótico. Devido à ocorrência frequente, nos alelos mutantes para esta proteína, de fusos multipolares dos quais irradiam ásteres (Lemos *et al.*, 2000), este *locus* foi denominado de *mast* (*multiple asters*). Simultaneamente ao trabalho inicial, um estudo independente levou à identificação e caracterização da mesma proteína, no qual foi nomeada de Orbit, tendo sido ambos publicados na mesma altura (Lemos *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2000). Os resultados obtidos nos dois casos irão ser comparados ao longo da discussão. Mais recentemente, foram, também, caracterizadas as duas homólogas da Mast, CLASP1 e CLASP2, existentes em *H. sapiens* e em *Mus musculus* (Akhmanova *et al.*, 2001).

### 1. Mutações no gene *mast* causam defeitos na segregação cromossómica

A análise fenotípica dos diferentes alelos *mast* revelou a existência de variadas alterações mitóticas, como cromossomas muito condensados, cromossomas em arranjo circular, aneuploidia, poliploidia, pólos desorganizados, cromossomas em atraso e pontes de cromatina. Um fenótipo análogo foi descrito para os alelos *orbit* (Inoue *et al.*, 2000). O facto de os hemizigóticos *mast<sup>P1</sup>IDf(3L)31A*, *mast<sup>P2</sup>IDf(3L)31A* e *mast<sup>P3</sup>IDf(3L)31A* possuírem aberrações mais graves que os respectivos homozigóticos confirma tratar-se de alelos hipomórficos. O alelo *mast<sup>P4</sup>* é bastante mais severo que os outros, praticamente um mutante nulo, pois possui apenas um nível de expressão residual da proteína Mast, e apresenta células extremamente poliplóides.

A presença de cromossomas com um elevado nível de condensação indica que as células *mast* demoram em mitose mais do que o período normal de tempo. De facto, a quantificação dos parâmetros mitóticos nos vários alelos *mast* mostrou

um índice mitótico elevado, principalmente no *mast*<sup>P3</sup> e no *mast*<sup>P4</sup> (Lemos *et al.*, 2000).

A análise por imunofluorescência, utilizando anticorpos contra a  $\alpha$ -Tubulina e a CNN (proteína centrossomal), permitiu o estudo do aparelho mitótico nestes mutantes (Lemos *et al.*, 2000). Na generalidade dos casos, observam-se fusos irregulares e desorganizados e as células que, como previamente observado, têm os cromossomas em arranjo circular possuem um fuso monopolar, com dois ou mais centrossomas no único pólo existente (Lemos *et al.*, 2000). Algumas células aneuplóides e poliplóides conseguem estabelecer um fuso bipolar aparentemente normal, mas com agregados constituídos por diversos centrossomas em cada pólo (Lemos *et al.*, 2000). A grande maioria das células poliplóides apresenta vários centrossomas, localizados no meio dos cromossomas condensados, a partir dos quais emanam microtúbulos (Lemos *et al.*, 2000). É de notar que muitas das estruturas centrossomais possuem uma forma difusa (Lemos *et al.*, 2000).

A existência, principalmente nos hemizigóticos *mast*<sup>P2</sup>*Idf(3L)31A*, de cromossomas em atraso e de pontes de cromatina sugere uma deficiente segregação cromossómica, talvez devida à desorganização do fuso mitótico. Também a aneuploidia aponta para este tipo de problemas.

De surpreender é a ocorrência, sobretudo nos homozigóticos *mast*<sup>P4</sup>, de células com um grau extremamente elevado de poliploidia. Estas possuem inúmeros centrossomas e agregados centrossomais espalhados por toda a massa cromossómica (Lemos *et al.*, 2000) e os seus cromossomas apresentam-se, normalmente, altamente condensados. Nestas células, o *spindle checkpoint* encontra-se activo, pois o tratamento com colchicina provoca paragem em prometáfase, sem separação prematura das cromátidas irmãs, e os cromossomas condensados mostram, consistentemente, uma forte acumulação da Bub1 na região centromérica (Lemos *et al.*, 2000). Apesar disso, as células devem, ao fim de um certo tempo, adaptar-se à situação, uma vez que sofrem vários ciclos celulares, aparentemente sem segregação cromossómica e/ou sem citocinese, para atingirem este grau de poliploidia. Na realidade, os espermátides dos

mutantes *orbit/mast* exibem graves defeitos na cariocinese e na citocinese (Inoue *et al.*, 2004).

Relativamente aos centrossomas supernumerários, estes são uma característica das células tumorais. É, porém, objecto de discussão se são uma causa ou uma consequência da carcinogénese (Lingle *et al.*, 2002; Nigg, 2002). Os centrossomas supernumerários contribuem para a formação de fusos multipolares e, portanto, para uma segregação cromossómica deficiente. No entanto, têm-se vindo a acumular evidências em como a poliploidia precede frequentemente a aneuploidia nos tumores humanos, em concordância com o modelo segundo o qual as divisões abortadas originam, simultaneamente, tetraploidia e centrossomas supernumerários (Shackney *et al.*, 1989; Galipeau *et al.*, 1996; Southern *et al.*, 1997) e com o postulado de que a poliploidia gera instabilidade genética (Lengauer *et al.*, 1998). Alguns resultados sugerem que as células que falham a citocinese activam o designado *checkpoint* tetraplóide, parando, em consequência disso, na fase G1 seguinte (Andreassen *et al.*, 2001). No entanto, trabalhos recentes mostram células poliplóides, binucleadas ou com múltiplos centrossomas que não param em G1, pondo em questão a existência deste ponto de controlo (Uetake e Sluder, 2004). As células *mast* altamente poliplóides não param o seu ciclo celular, continuando a duplicar de novo, constituindo um argumento a favor da inexistência deste *checkpoint*.

## 2. A Mast é essencial para a manutenção da bipolaridade do fuso mitótico

O alelo *mast<sup>P5</sup>* é o mais fraco da série estudada. Os homozigóticos sobrevivem até ao estado adulto e só na sua progenia se notam as consequências da diminuição dos níveis de expressão da Mast. É, portanto uma mutação de efeito materno. Em *Drosophila*, o embrião sincicial praticamente não expressa proteínas, usufruindo das que lhe são deixadas pela mãe. Neste caso, as fêmeas adultas já possuem um nível mais baixo de Mast, pelo que transmitem muito pouca à sua descendência, levando às alterações nela encontradas. Estes

embriões são ideais para a análise dos mecanismos causadores dos fenótipos mitóticos mais severos, pois neles se podem observar os erros iniciais ocorridos.

O estudo dos embriões *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>* possibilitou a avaliação das causas da formação de fusos monopolares em mutantes *mast*. Previamente, já se haviam observado agregados centrossomais na ausência de Mast e uma das possibilidades era que os centrossomas não se conseguissem separar, logo à partida. Contudo, o que se verificou foi que eles são capazes de se distanciar no início da mitose, permitindo, inclusive, a formação de um fuso bipolar aparentemente normal. Apesar disso, há problemas na congregação dos cromossomas, que não se conseguem alinhar devidamente na placa metafásica. Em metafase, contrariamente ao habitual, os fusos começam a encurtar e os centrossomas finalizam colapsados na zona equatorial, levando à formação de fusos monopolares. Estes dados mostram que a Mast é indispensável para uma correcta congregação dos cromossomas na placa metafásica e para a estabilização do fuso bipolar durante a transição metafase-anafase. Um efeito semelhante de colapso do fuso mitótico ocorre na ausência da cinesina bipolar de *Drosophila* KLP61F (Heck *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 2000a), apesar de pequenas diferenças do momento exacto em que os centrossomas começam a colapsar e da velocidade a que o fazem (Maiato *et al.*, 2002). No entanto, estas variações poderão ser explicadas por diferentes graus de inactivação das proteínas em questão (Sharp, 2002). Várias hipóteses poderão explicar este fenómeno de colapso dos centrossomas nos mutantes *mast*, tais como: o envolvimento da Mast na manutenção da separação dos centrossomas, mediando o exercício de forças centrífugas entre eles, eventualmente através da sua interacção com cinesinas, como a KLP61F; a implicação da Mast na estabilização das extremidades (+) dos MTs, através da sua actividade como MAP; a sua participação no mecanismo de ligação entre os MTs e os cinetocoros, nomeadamente na sua estabilização.

Yin *et al.* obtiveram resultados idênticos aos apresentados numa análise funcional do homólogo da Mast de *S. cerevisiae* Stu1p, mostrando, adicionalmente, que o fenótipo causado pela inactivação da Stu1p era resgatado

através do aumento da quantidade da Cin8p, homóloga da KLP61F (Yin *et al.*, 2002). Estes dados favorecem a hipótese apresentada de a Mast interagir com esta cinesina.

### 3. O locus *mast*

A comparação da sequência nucleotídica do cDNA *mast* com as existentes nas bases de dados permitiu a identificação de outros dois transcritos, possivelmente devidos a *splicing* alternativo, cujos locais de transcrição não eram indicados em nenhum dos casos. É de notar que os três transcritos só divergem nas regiões 5' não codificantes, conduzindo à tradução de uma mesma proteína.

Inoue e os colegas, através da análise por *Northern blot* de vários tecidos e fases do desenvolvimento de *Drosophila*, descreveram a existência de dois transcritos *orbit (mast)*, um de 6.5 kb e o outro de 6.0 kb (Inoue *et al.*, 2000). O transcrito de 6.5 kb, presente em todas as fases do desenvolvimento (Inoue *et al.*, 2000), equivale, provavelmente, ao cDNA *mast*, cuja sequência possui 5938 pb. O alegado mRNA de 6.0 kb deverá corresponder aos transcritos de 5375 e 5264 nucleótidos, cujos tamanhos próximos deverão ter impedido a identificação de ambos. Estes investigadores apenas referem a existência do último transcrito em machos (Inoue *et al.*, 2000), no entanto, uma observação cuidada da Figura 3A do seu artigo parece indicar a presença, embora menos abundante, de um transcrito com um tamanho similar em embriões de 4 a 8 horas. Assim sendo, ocorrerá, possivelmente, a transcrição de um dos RNAs menores em machos e do outro em embriões de 4 a 8 horas.

### 4. Análise computacional da sequência nucleotídica da Mast

A procura de domínios e motivos na sequência da Mast, através de programas disponíveis na Internet, permitiu conhecer um pouco melhor a proteína



com que se estava a lidar. São de realçar os vários domínios de ligação aos microtúbulos encontrados, todos localizados mais ou menos na mesma zona da Mast, que levantaram a suspeita de se estar perante uma MAP.

Diversos outros domínios e motivos foram detectados, na sua maior parte responsáveis por interacções do tipo proteína-proteína. A ligação de outras proteínas poderá possibilitar a activação ou inactivação da Mast ou modular a sua localização dinâmica ao longo do ciclo celular. Ou, inversamente, poderá ser a Mast a reguladora de outras proteínas. Existe ainda a hipótese de a Mast actuar como parte de um complexo proteico.

Similarmente, foram identificados na Mast vários locais putativos de serem fosforilados por cinases envolvidas no ciclo celular. Estes também poderão ser responsáveis pela modulação da actividade desta proteína. É de salientar que a maioria das MAPs é inactivada por fosforilação (Ebner *et al.*, 1999).

A detecção de motivos susceptíveis de serem modificados pela SUMO sugere ainda que poderá ser a ligação desta proteína à Mast que permite a sua diferente compartimentação intracelular ao longo do tempo. A SUMO poderá ainda estar envolvida na estabilidade da Mast, nomeadamente por bloquear a sua ubiquitinação.

#### **5. A Mast pertence a uma família conservada de proteínas**

A pesquisa de homologias nas bases de dados permitiu descobrir que a Mast pertence a uma nova e conservada família de proteínas que inclui membros de vertebrados, invertebrados, fungos e plantas. Esta ocorrência ubíqua indica que a Mast e as proteínas homólogas devem ter funções celulares indispensáveis. É de assinalar, também, que a proteína quimérica EGFP-Mast mostra, em células de cultura HeLa, humanas, e S2, de *Drosophila*, um padrão de localização muito idêntico ao longo do ciclo celular. Estes dados confirmam a proximidade evolutiva e sugerem uma analogia funcional da Mast em ambas as

espécies. Na realidade, a CLASP1 humana acumula-se nas mesmas estruturas intracelulares que a Mast (Maiato *et al.*, 2003).

## **6. A Mast localiza-se em vários compartimentos do aparelho mitótico**

Neste trabalho, foi localizada a proteína Mast endógena *in situ*, através de imunofluorescências em neuroblastos e células S2, e a EGFP-Mast *in situ*, em células S2, e *in vivo*, em embriões e neuroblastos. Em qualquer dos casos, a Mast localiza-se nos microtúbulos interfásicos e, durante a mitose, nos centrossomas, fuso mitótico, centrómeros, fuso central e corpo médio do fuso. Também a CLASP1 parece acumular-se nestas estruturas (Maiato *et al.*, 2003). A Mast apresenta, portanto, uma localização dinâmica ao longo do ciclo celular e a sua presença em todos estes locais indica dever tratar-se de uma proteína com funções muito importantes para a célula.

## **7. A Mast localiza-se nos centrossomas e centrómeros na ausência de microtúbulos**

A Mast endógena e a EGFP-Mast acumulam-se nos centrossomas e centrómeros na presença e na ausência de microtúbulos. A CLASP1 humana também possui essa capacidade (Maiato *et al.*, 2003). O facto de não necessitar dos microtúbulos para se localizar nestes sítios sugere que a Mast possa ser um componente estrutural do centrossoma e/ou do centrómero. De acordo com estas hipóteses, a CLASP1 foi purificada juntamente com outros componentes do centrossoma humano (Andersen *et al.*, 2003) e verificou-se localizar-se na parte mais externa da coroa fibrosa do cinetocoro, a coroa externa (Maiato *et al.*, 2003).

## 8. A Mast é uma MAP

A localização da Mast ao nível dos microtúbulos interfásicos e mitóticos, a sua proximidade evolutiva com a família de MAPs Msps/ch-TOG/XMAP215 e a existência, na sua sequência nucleotídica, de regiões com elevado grau de homologia com domínios de ligação aos microtúbulos pertencentes a proteínas como a MAP65, a APC e a MAP4, fez suspeitar que se trataria de uma MAP. Assim, realizou-se um ensaio de ligação aos microtúbulos *in vitro*, através do qual se verificou que a Mast é uma Proteína Associada aos Microtúbulos (MAP). Outros dados fundamentam esta hipótese. Inoue e os colegas (2000) obtiveram, com experiências um pouco diferentes, resultados idênticos, mostrando, adicionalmente, que a interacção da Mast necessita da ligação prévia de GTP hidrolisável. Foi também mostrado que a Stu1p interacciona com os microtúbulos (Pasqualone e Huffaker, 1994), assim como as homólogas humanas (Akhmanova *et al.*, 2001). É, ainda, de salientar que os resultados de Akhmanova *et al.* (2001) indicam que as formas fosforiladas das CLASPs têm menor afinidade para os microtúbulos. Como referido anteriormente, a Mast possui diversos locais putativos de fosforilação por importantes reguladores mitóticos. Assim, a desfosforilação e fosforilação da Mast deverão ser responsáveis pela maior ou menor afinidade da Mast para os microtúbulos ao longo do ciclo celular.

## 9. Delimitação dos domínios de localização da Mast

Relativamente ao estudo efectuado com o objectivo de identificar os domínios responsáveis pela localização da Mast nas diversas estruturas celulares, são de destacar os seguintes aspectos:

Para a ligação aos centrossomas e aos centrómeros são necessárias e suficientes as regiões da Mast compreendidas entre os aminoácidos 1-445 e 930-1491, respectivamente. Como cada uma destas zonas abrange um dos HEAT *repeats* detectado, possivelmente serão estes os responsáveis por estas

associações, uma vez que se trata de motivos usualmente envolvidos em interações do tipo proteína-proteína. O domínio de ligação aos centrómeros identificado inclui a zona da CLASP1 descrita como necessária para o mesmo tipo de associação (Maiato *et al.*, 2003).

Os domínios de ligação aos microtúbulos e ao corpo médio do fuso parecem ser semelhantes, provavelmente devido à composição microtubular do último.

Dos domínios identificados, através da análise computacional, como putativos de se ligarem aos microtúbulos, quase todos relativos mais ou menos à mesma zona, foi seleccionado o homólogo da região *Pro-rich* do domínio básico da MAP4, correspondente à parte da Mast compreendida entre os aminoácidos 535 e 736, para as representações esquemáticas utilizadas. No entanto, os resultados obtidos apontam para uma zona de ligação aos microtúbulos um pouco diferente dessa.

Nas células transfectadas em que ocorre a expressão da EGFP-Mast $\Delta$ 652-733, na qual se encontra truncada parte da região prevista como susceptível de ligação aos microtúbulos, não há alteração na associação a estas estruturas, pelo que a zona truncada parece ser dispensável nesta interacção.

A EGFP-Mast $\Delta$ 446-1491, que inclui toda a região homóloga ao domínio da MAP4, apesar de se situar na zona dos microtúbulos, possui um tipo de acumulação pontuado, diferente do habitual. Além disso, a associação desta proteína de fusão ao corpo médio do fuso, a qual parece ser determinada pelo mesmo domínio, é extremamente fraca. Estes dados sugerem ser necessária a região a montante do domínio homólogo ao da MAP4 para a Mast se localizar adequadamente nos microtúbulos e no corpo médio do fuso.

Assim sendo, o domínio responsável pela associação da Mast a estas estruturas é mais parecido com o da MAP65, detectado pelo programa ProfileScan, correspondente à região compreendida entre os aminoácidos 110 e 715. Por outro lado, talvez a ausência, nesta proteína quimérica, do primeiro local

putativo de ligação ao GTP identificado por Inoue *et al.* (2000) (resíduos 400-403) interfira nessa interacção.

As proteínas EGFP-Mast<sup>1-922</sup> e EGFP-Mast<sup>234-866</sup> associam-se aos microtúbulos, mas não aos centrómeros. Aquando da sobreexpressão de qualquer uma delas em células transfectadas, ocorre a formação de fusos desorganizados ou monopolares. Em ambos os casos, nas células em que são expressas parece ocorrer um efeito dominante negativo, não se conseguindo formar um fuso bipolar normal. Também a ligação dos microtúbulos do fuso aos cinetocoros parece estar afectada, uma vez que aparecem arranjos monopolares cujos cromossomas estão mergulhados no meio dos microtúbulos, perto da região centrossomal. Estas observações sugerem um envolvimento da Mast na interacção entre os microtúbulos e o cinetocoro, que poderá ser directo ou indirecto, neste último caso através da modulação da dinâmica dos microtúbulos. Indicam, ainda, que a ligação da Mast à região centromérica é necessária para a sua função na organização do fuso. Maiato *et al.* (2003) transfectaram células HeLa com uma proteína quimérica CLASP1 truncada semelhante à EGFP-Mast<sup>234-866</sup>, verificando-se provocar um efeito análogo ao acima descrito. Os mesmos investigadores mostraram, além disso, que este fenótipo era devido a uma alteração do comportamento dinâmico dos microtúbulos, defendendo a implicação da Mast na regulação da dinâmica dos microtúbulos associados aos cinetocoros. É de salientar que a formação de fusos monopolares com os cromossomas mergulhados no interior ocorre, também, nos mutantes *mast* de *Drosophila*, nas células S2 submetidas a RNAi da Mast e em células humanas microinjectadas com anticorpos anti-CLASP1 (Inoue *et al.*, 2000; Lemos *et al.*, 2000; Maiato *et al.*, 2002; Maiato *et al.*, 2003).

#### **10. A Mast parece estabilizar os microtúbulos**

Todos os resultados apresentados sugerem uma função da Mast na regulação da dinâmica dos microtúbulos e alguns parecem favorecer a hipótese

de a Mast ser uma estabilizadora destas estruturas. Entre eles encontram-se os dados obtidos através da expressão da proteína exógena. A acumulação excessiva da EGFP-Mast nas células interfásicas transfectadas parece ter um efeito estabilizador nos seus microtúbulos, pois estes apresentam-se em feixes muito mais densos que o habitual e o seu tratamento prolongado com colchicina leva apenas a uma despolimerização parcial. Maiato *et al.* (2003) apresentaram resultados similares, relativos à CLASP1 humana. Também a expressão da proteína quimérica exógena em embriões e cérebros de larvas de *Drosophila* parece provocar o aparecimento de feixes microtubulares mais densos e uma paragem do ciclo celular, aparentemente devida à exagerada estabilização dos microtúbulos. Corroborando estes dados, Akhmanova e os colegas (2001) verificaram que a expressão exógena das CLASPs leva a um aumento significativo do nível de microtúbulos destirosinados, mais estáveis. Além disso, as CLASPs do ratinho foram identificadas, num rastreio em que se utilizou o *yeast two-hybrid system*, como proteínas associadas às CLIPs (Akhmanova *et al.*, 2001), que promovem o resgate *in vivo* (Komarova *et al.*, 2002b).

### **11. A Mast acompanha o crescimento dos microtúbulos na extremidade (+)**

A observação *in vivo* da EGFP-Mast expressa em embriões mostrou uma localização da Mast numa zona discreta dos microtúbulos e o seu deslocamento ao longo destes. Tendo em conta os dados conhecidos relativos às homólogas humanas, essa acumulação será, provavelmente, nas extremidades (+) dos microtúbulos e o movimento ocorrerá concomitantemente com essas extremidades em crescimento. De facto, as CLASP1 e CLASP2 humanas são +TIPs, localizando-se nas extremidades (+) dos microtúbulos e migrando, simultaneamente com elas, para a periferia da célula ou na direcção dos cinetocoros (Akhmanova *et al.*, 2001; Maiato *et al.*, 2003). Também as CLIPs, que interactivam com as CLASPs, são +TIPs (Perez *et al.*, 1999; Hoogenraad *et al.*, 2000).

## 12. Conclusão

Este trabalho permitiu determinar que a Mast é uma MAP que parece estar implicada na estabilização dos microtúbulos e/ou da interacção dos microtúbulos com os cinetocoros. Mostrou-se, também, que a ausência da Mast impede uma eficiente congregação e posterior segregação dos cromossomas, pois, nestas condições, a célula é incapaz de manter a bipolaridade do fuso mitótico. Estes problemas conduzem a graves alterações mitóticas, como aneuploidia e elevados níveis de poliploidia, que, em última instância, são factores primordiais no desenvolvimento de um cancro.

## **IV. Materiais e Métodos**



## 1. Estirpes de *Drosophila melanogaster* e condições de cultura

### 1.1. Estirpes de *Drosophila* utilizadas

A estirpe do tipo selvagem utilizada como controlo foi a *Oregon-R* (*Umea Drosophila Stock Center*, Suécia).

O alelo *mast*<sup>P1</sup>, originalmente denominado *v40* (Omel'yanchuk *et al.*, 1997), foi utilizado na mobilização do elemento P, na qual se obtiveram, entre outros, os alelos *mast*<sup>P4</sup> e *mast*<sup>P5</sup>. Os alelos *mast*<sup>P2</sup> e *mast*<sup>P3</sup>, EP3515 e EP3403, respectivamente, foram obtidos a partir do BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*).

A estirpe *Df(3L)31A/TM3, Sb Ser*, que apresenta uma deficiência cromossómica na região 78A-E, foi obtida através do *Bloomington Drosophila Stock Centre*.

A linha transgénica *gfp-polo* (Moutinho-Santos *et al.*, 1999) possui o genótipo *w; P{gfp-polo}*, tendo a inserção no cromossoma 2.

A linha GAL4 *Mz1061*, utilizada para expressar a EGFP-Mast em neuroblastos, tem como genótipo *P{w[+mW.hs]=GawB}Mz1061, w<sup>-</sup>* e contém a inserção no cromossoma X. Esta estirpe foi cedida por Urban.

A linha GAL4 *VP16* (Van Doren *et al.*, 1998), utilizada para expressar a EGFP-Mast em embriões, tem como genótipo *P{nosGAL4:VP16}A42III*, estando a inserção no cromossoma 3. Esta linha foi cedida por Allan Spradling.

O *stock red mbc e/TM3, Sb* foi obtido através da Umea e todos os outros pertenciam ao laboratório onde este trabalho foi realizado.

### 1.2. Genótipo dos balanceadores de *Drosophila* utilizados

*FM7c: In(1)FM7, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> w<sup>a</sup> sn<sup>X2</sup> v<sup>Of</sup> g<sup>4</sup> B*

*CyO: In(2LR)O, Cy dp<sup>lv</sup> pr cn<sup>2</sup>*

*MKRS: Tp(3;3)MKRS, M(3)76A<sup>1</sup> kar<sup>1</sup> ry<sup>2</sup> Sb<sup>1</sup>*

*TM3: In(3LR)TM3, y<sup>+</sup> ri p<sup>p</sup> sep bx<sup>34e</sup>* e (adicionalmente, com *Sb* ou *Ser*)

*TM6: In(3LR)TM6, Hn<sup>P</sup> ss<sup>P88</sup> bx<sup>34e</sup> Ubx<sup>P15</sup> e*

*TM6B: In(3LR)TM6B, Hu Tb e*

### 1.3. Condições de cultura

As culturas de *Drosophila* e os cruzamentos genéticos foram mantidos num meio de cultura adequado e à temperatura de 25 °C.

**Meio de cultura:** 5 g Agar; 60 mL melaço; 28 g extracto de levedura; 70 g farinha de milho; 60 mL solução de Nipagin M (a 10% em etanol absoluto); ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 500 mL.

## 2. Estirpes Bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas para transformar e amplificar DNA plasmídico, nos *screenings* das bibliotecas de cDNA e de DNA genómico e na expressão das proteínas recombinantes estão indicadas na Tabela 1.

Estirpe de <i>E. coli</i>	Genótipo
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)
M15[pREP4]	<i>Nal<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup></i>
SOLR	<i>e14'(mcrA<sup>-</sup>) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC:: Tn5 (Kan<sup>r</sup>) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ<sup>R</sup>(F' proAB lac<sup>f</sup>ZΔM15) Su<sup>-</sup></i>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96(Naf) thi-1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> r<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac<sup>-</sup> [F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>
XL1-Blue MRA (P2)	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac</i> (P2 lysogen)
XL1-Blue MRF <sup>-</sup>	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' proAB lac <sup>f</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

Tabela 1. Genótipo de algumas estirpes de *Escherichia coli*.

## 3. Vectores

### 3.1. O pBluescript II SK e KS (+)

O cDNA *mast* LD11488 veio subclonado no fagemídeo pBluescript II SK (+) (pSK). O pBluescript II KS (+) (pKS) foi utilizado em várias das subclonagens realizadas, nomeadamente com o objectivo de sequenciar o LD11488.

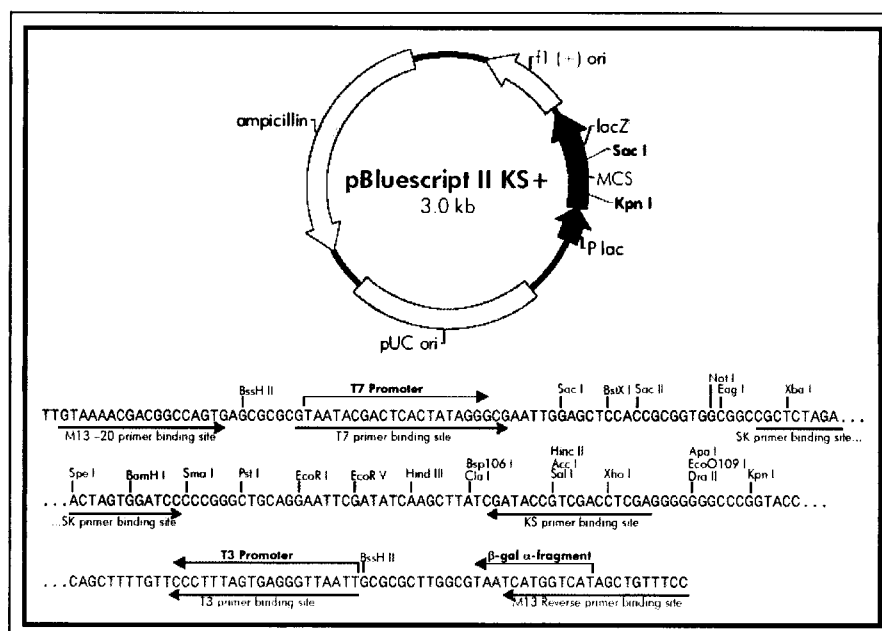
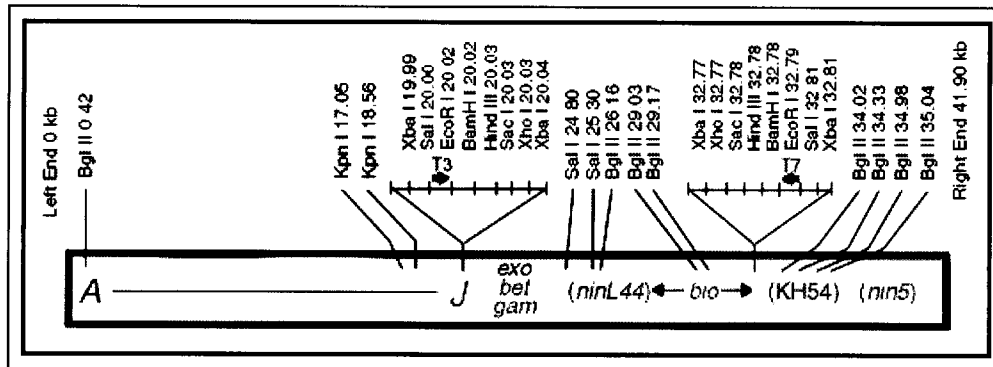


Figura 1. Representação esquemática do fagemídeo pBluescript II KS (+) e sua região de clonagem múltipla (MCS) (adaptados de <http://www.stratagene.com>). O pBluescript II SK (+) é semelhante, apenas possui o MCS na direcção inversa.

### 3.2. O Lambda DASH

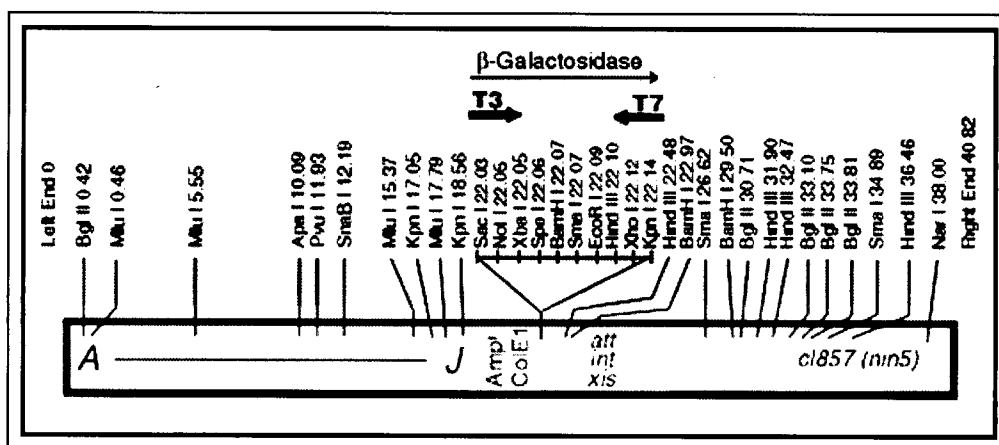
Na biblioteca de DNA genómico de *Drosophila* utilizada, os fragmentos genómicos estavam subclonados em ambos os locais *Bam*HI do fago Lambda DASH.



**Figura 2.** Esquema representativo do vetor fágico Lambda DASH (adaptado de <http://www.stratagene.com>).

### 3.3. O Uni-ZAP XR

Na biblioteca de cDNAs de *Drosophila* utilizada, estes tinham sido clonados no vetor fágico Uni-ZAP XR, com o auxílio de um *primer* UdT, nos locais de restrição *Eco*RI e *Xho*I. Esta biblioteca tinha sido construída a partir de mRNAs de embriões Canton-S, de 2 a 24 horas.



**Figura 3.** Representação esquemática do vetor fágico Uni-ZAP XR (adaptada de <http://www.stratagene.com>).

### 3.4. O pET-23

Na subclonagem efectuada com a finalidade de produzir a proteína recombinante Mast<sub>rec1</sub> foi utilizado o vector de expressão bacteriana pET-23b.



### 3.6. O pMT/EGFP-C1

O vector pMT/EGFP-C1 foi utilizado nos construtos para a transfecção de células de cultura S2, de *Drosophila*.

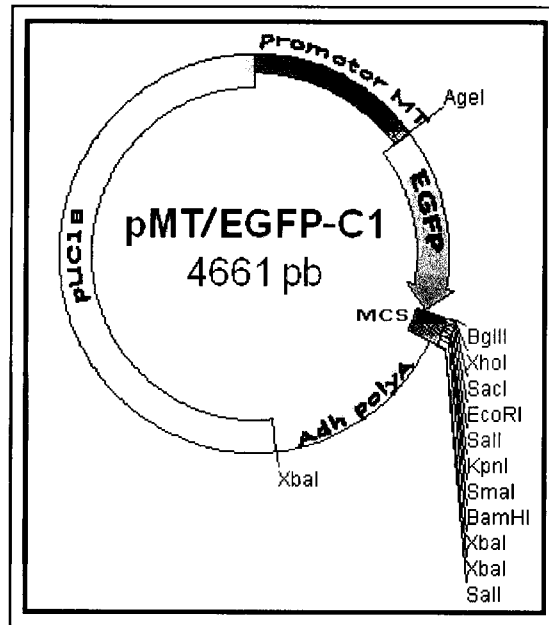


Figura 6. Esquema representativo do vector pMT.

### 3.7. O pEGFP-C1

O vector pEGFP-C1 foi utilizado no construto para a transfecção de células de cultura HeLa, humanas.

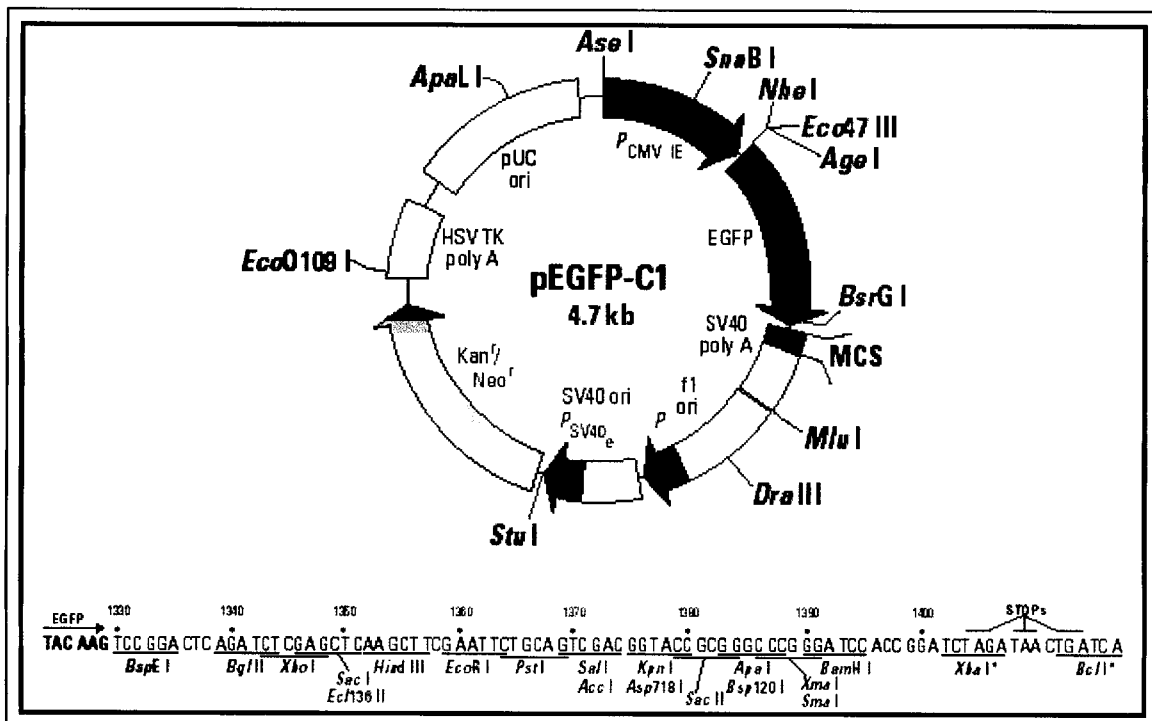


Figura 7. Representação esquemática do vector de transfecção para células de mamífero pEGFP-C1 e sua região de clonagem múltipla (MCS). (Adaptada de <http://www.bdbiosciences.com/clontech/>).

### 3.8. O P{1ArB}

O alelo *mast*<sup>P1</sup> foi produzido através da inserção do elemento P{1ArB} (Omel'yanchuk *et al.*, 1997).

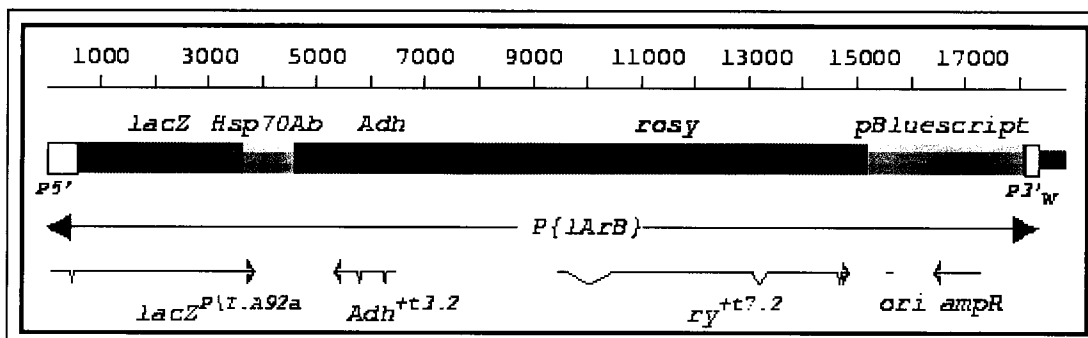


Figura 8. Esquema representativo do transposão P{1ArB} (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

### 3.9. O P{EP}

O elemento P{EP} é o responsável pelo fenótipo observado nos alelos *mast*<sup>P2</sup> e *mast*<sup>P3</sup>.

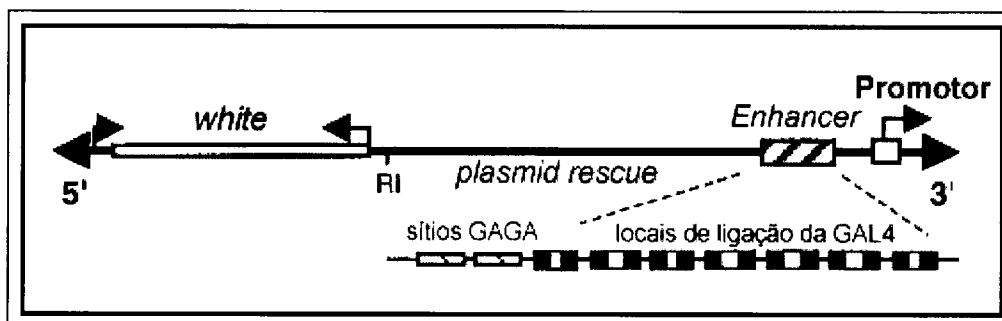


Figura 9. Representação esquemática do transposão P{EP} (adaptada de Rorth, 1996).

### 3.10. O pP{UASp}

O elemento de transposição pP{UASp}, composto pelo P{UASp} inserido no plasmídeo pUC8 (Rorth, 1998), foi utilizado na subclonagem com vista à transformação de embriões de *Drosophila*.

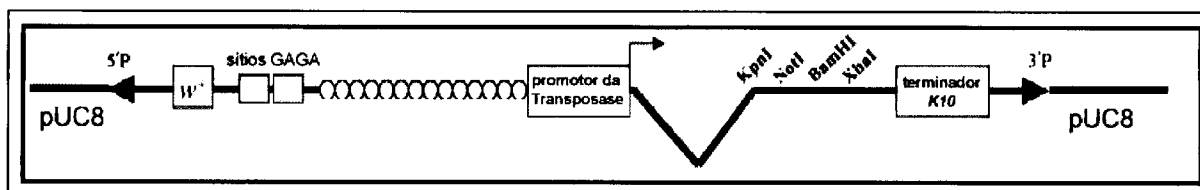


Figura 10. Representação linear do elemento de transposição pP{UASp} (adaptada de Duffy, 2002).

#### 4. Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados como *primers*, para sequenciação ou PCR, e na construção do *linker* 5', para a subclonagem do cDNA *mast* no pMT/EGFP-C1 e no pEGFP-C1, estão indicados na Tabela 2.

Designação	Sequência (5'-3')	Utilização
T7	AATACGACTCACTATAG	Sequenciação do LD11488 (cDNA <i>mast</i> )
Reverso	AACAGCTATGACCATG	
V1	AAGTGAAACCGACTGCG	
V2	ACAACCCAGTAAGACCA	
V3	CTCAAACGCCAACTACCA	
V4	GCTAAGTGAGTAGTTCG	
V5	CAGGTGCAGTCCCAGTCC	
V6	TGAGGCGGCAAAGCAA	
V7	TTCCATAAAGAGCCG	
V8	GCAGTGATGACGAAACG	
V9	ATTTGTGCCGCCATCA	
V10	ACTAGCGTTTGGATGGC	
V11	ACCTTATGTCCTTCGA	
V12	GGCTGATCCTTTGTTAG	
V13	CCCGCAGAACGAAGGA	
V14	CGGGAAAGGACCACTC	
V15	ATGGAGTGGGCTTGGA	
V16	ATGCCTTCTGCTGGAG	
V17	TGGTGACATTCCTTAGC	
V18	GACGATTGTGAACGCTC	
V19	ATCACAGACGCCCACTT	
V20	CATTAGGCGTCGGAGATGATG	
L1	GATCCATGGCCTATCGGAAGCCCAGCGAC	Construção do <i>linker</i> 5'
L2	CTGGGCTTCCGATAGGCCATG	
Mast930	CACCGATCTACTGAATTCGATGCACAGCAAG	PCR para construção do pMT/ <i>egfp-mast</i> <sub>930-1491</sub>
RWMast	GGTGCTGATGCAGGGATCCTATTAAGGGCTCC	PCR para construção do pP{1ArB}/ <i>egfp-mast</i>
FWpMT	CTAAAGGGAATTCTAGAGGTACCGGTCGCCACC	
Mast234	TCAAACAGGAGGCTCGAGTGCTACCTTCAGC	PCR para construção do pMT/ <i>egfp-mast</i> <sub>234-866</sub>
Mast866	GCTCCTTCCGTCGACCAGATACTGTGTGAGG	

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados como *primers* e na construção de um *linker*.

#### 5. Anticorpos utilizados

Os anticorpos primários e secundários usados, para *Western blot* ou para imunofluorescência, estão indicados na Tabela 3.

Nome	Tipo	Hospedeiro	Empresa/Referência	Diluição	Utilização
Anti-Mast (Rb726) (purificado)	primário	coelho	(Lemos <i>et al.</i> , 2000)	1:100	WB
				1:10	IF
Anti- $\alpha$ -Tubulina	primário	ratinho	Amersham	1:500	WB
				1:200	IF
Anti-Polo (MA294)	primário	ratinho	(Logarinho e Sunkel, 1998)	1:50	IF
Anti-BubR1 (R666)	primário	coelho	(Logarinho <i>et al.</i> , 2004)	1:1000	IF
Anti- $\gamma$ -Tubulina (Rb1011)	primário	coelho	(Tavosanis <i>et al.</i> , 1997)	1:200	IF
3F3/2	primário	ratinho	(Cyert <i>et al.</i> , 1988)	1:1000	IF
Anti-GFP	primário	ratinho	Zymed	1:500	WB
Anti-mouse Alexa 568	secundário	cabra	Molecular Probes	1:2000	IF
Anti-mouse Cy5	secundário	cabra	Jackson	1:200	IF
Anti-mouse FITC	secundário	cavalo	Vector	1:500	IF
Anti-mouse Texas Red	secundário	cavalo	Vector	1:500	IF
Anti-mouse HRP	secundário	cavalo	Vector	1:1000	WB
Anti-rabbit Alexa 488	secundário	cabra	Molecular Probes	1:2000	IF
Anti-rabbit Alexa 568	secundário	cabra	Molecular Probes	1:2000	IF
Anti-rabbit Cy3	secundário	burro	Jackson	1:500	IF
Anti-rabbit Cy5	secundário	cabra	Jackson	1:200	IF
Anti-rabbit FITC	secundário	cabra	Vector	1:1000	IF
Anti-rabbit Texas Red	secundário	cabra	Vector	1:1000	IF
Anti-rabbit HRP	secundário	cabra	Vector	1:1000	WB

**Tabela 3.** Anticorpos utilizados e respectivas diluições. IF: imunofluorescência; WB: *Western blot*.

## 6. Análise citológica dos mutantes

A análise do fenótipo mitótico foi efectuada em neuroblastos de larvas da 3ª fase. Cada cérebro foi dissecado em NaCl a 0.7% e colocado em ácido acético a 45%, durante 45 s. Seguidamente, colocou-se, numa lamela, uma gota de ácido acético a 65%, para a qual se transferiu o cérebro. Colocou-se a lâmina no cimo, pressionou-se fortemente com o polegar para esmagar o cérebro e imergiu-se em azoto líquido. Posteriormente, desidratou-se a preparação, utilizando primeiro etanol a 70% e depois etanol a 100%, ambos durante 5 min, e deixou-se secar ao ar. No final, incubou-se com RNase a 0.5 mg/mL, durante 15 min, limpou-se e montou-se em Vectashield (Vector Laboratories, UK) contendo iodeto de propídeo a 5  $\mu$ g/mL. As preparações foram observadas num microscópio de laser confocal MRC600 (BioRad, USA), as imagens recolhidas utilizando o *software* Comos (BioRad, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**RNase:** RNase A pancreática a 25 mg/mL numa solução de Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM e NaCl 15 mM. Ferver durante 15 min para inactivar as DNases e deixar arrefecer à TA. Filtrar por Millipore 0.45  $\mu$ m e fazer alíquotas, que se armazenam a -20°C.



## 7. Hibridação *in situ* em cromossomas politénicos de *Drosophila*

Para preparar os cromossomas politénicos, dissecaram-se as glândulas salivares de larvas da 3ª fase em NaCl a 0.7%. De seguida, transferiram-se as glândulas para uma gota de ácido acético a 45% e deixaram-se fixar durante 1 min, montando-se, depois, numa gota de 8 µL de solução 1:2:3. Percutiu-se a preparação com movimentos circulares suaves, recorrendo ao auxílio do topo de um pincel de madeira, de modo a espalhar os cromossomas. Posteriormente, realizou-se o esmagamento do material, pressionando com firmeza a preparação entre duas folhas de papel 3 MM, durante 10 s. Rapidamente, imergiu-se a lâmina em azoto líquido e retirou-se a lamela com a ajuda de um bisturi. Logo de seguida, procedeu-se à desidratação do material em etanol absoluto durante 30 min, secando-se depois ao ar.

Na preparação da sonda utilizou-se o *BioNick Labelling System* (Gibco-BRL Life Technologies, USA), segundo as indicações do fabricante. Este sistema permite a formação de pequenas sondas (50-500 bases) de DNA marcadas com biotina-14-dATP, através de *nick translation*, utilizando a Polimerase I de DNA de *E.coli*. No final, juntou-se 1 volume de tampão de hibridização (2×) e armazenou-se a -20°C.

As lâminas com os cromossomas politénicos foram incubadas em 2× SSC, a 65°C, durante 30 min e desidratadas por imersão em etanol a 70% e depois em etanol absoluto, em ambos os casos durante 5 min. Após secagem ao ar, desnaturaram-se os cromossomas por submersão em NaOH 70 mM, durante 2 min, à temperatura ambiente (TA). De seguida, procedeu-se novamente à desidratação das preparações por imersão em etanol a 70% e em etanol absoluto, durante 3 min cada, e à secagem ao ar. Incubaram-se então os cromossomas durante a noite, a 58 °C, numa câmara húmida, com 10 µL da sonda marcada, previamente desnaturada a 90 °C.

O excesso de sonda foi removido por várias lavagens consecutivas: em 2× SSC, a 53°C, durante 2 min, e em 4× SSC, 4× SSC + 0.1% de Triton X-100 e 4× SSC, sempre à TA, durante 5 min. As lâminas foram incubadas, de seguida, com uma solução de 2% de avidina-D FITC (Vector Laboratories, UK) e RNase a 0.5 mg/mL em 4× SSC, durante 30 min, à TA. Posteriormente, lavaram-se com 4× SSC, 4× SSC contendo 0.1% de Triton X-100 e 4× SSC, sempre durante 5 min e à TA. Montaram-se, então, as preparações em Vectashield (Vector Laboratories) contendo iodeto de propídeo a 5 µg/mL, e observaram-se num microscópio de laser confocal MRC600 (BioRad, USA). As imagens foram recolhidas utilizando o *software* Comos (BioRad, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**Solução 1:2:3:** 1 volume de ácido láctico a 95%: 2 volumes de água desionizada: 3 volumes de ácido acético glacial.

**Tampão de hibridização (2x):** 8x SSC; 2x Denhardt's; sulfato de dextrano 20%; ssDNA 0.4 µg/µL.

**20x SSC:** NaCl 3 M; citrato trissódico 0.3 M; pH 7.0.

**100x Denhardt's:** BSA 2%; 2% Ficoll 400; polivinilpirrolidona 2%; filtrou-se e armazenou-se a -20°C.

**RNase:** RNase A pancreática a 25 mg/mL numa solução de Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM e NaCl 15 mM. Ferver durante 15 min para inactivar as DNases e deixar arrefecer à TA. Filtrar por Millipore 0.45 µm e fazer alíquotas, que se armazenam a -20 °C.

## 8. Obtenção de DNA plasmídico

### 8.1. Preparação de células competentes

Inocularam-se 10 mL de meio de cultura LB, contendo os antibióticos necessários para a estirpe bacteriana em questão, com uma colónia isolada e deixaram-se crescer ON, a 37 °C, com agitação. Repartiu-se a cultura obtida por dois frascos, com 100 mL de LB cada um, e incubaram-se a 37°C até atingir uma densidade óptica, a 600 nm, de cerca de 0.6. Distribuíram-se as culturas por falcons de 50 mL e arrefeceram-se em gelo. Centrifugaram-se as culturas a 4000 rpm, durante 15 min, a 4°C, e cada sedimento foi ressuspenso em 12.5 mL de solução A, previamente arrefecida em gelo. Centrifugou-se a 4000 rpm durante 8 min, a 4°C e ressuspendeu-se cada precipitado em 2.5 mL de solução B, anteriormente arrefecida em gelo. Estas suspensões foram mantidas em gelo durante 1 hora, tendo-se, posteriormente, dividido em alíquotas de cerca de 0.2 mL e armazenado a -70°C.

**LB:** 10 g bactotripton (LAB M); 5 g extracto de levedura; 10 g NaCl; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L; pH 7.0.

**Solução A:** KCH<sub>3</sub>COO 30 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 15%.

**Solução B:** NaMOPS, pH 7.0, 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; KCl 10 mM; glicerol 15%.

**NaMOPS:** Fazer uma solução stock 1 M, acertar o pH para 7.0 com NaOH e filtrar a solução.

### 8.2. Transformação de células competentes

Descongelaram-se 100 µL de células competentes em gelo, às quais se adicionaram, logo após, 0.5 µL de DNA plasmídico ou 10 µL da mistura de ligação. Incubaram-se em gelo durante 30 min e, seguidamente, a 42°C durante 45 s. Deixaram-se arrefecer em gelo. Mais tarde, adicionaram-se 300 µL de LB e incubou-se a mistura durante 1 h, a 37°C, com agitação. Posteriormente, centrifugou-se a 3500 rpm, durante 2 min, e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de LB. No caso da transformação de DNA plasmídico, plaquearam-se 10 µL da mistura numa placa de L-Agar contendo os antibióticos necessários para a estirpe bacteriana em questão. Quando a transformação foi efectuada com produto de ligação, dividiu-se a mistura por três placas de L-Agar, possuindo cada uma os antibióticos adequados e, no caso de subclonagens em plasmídeos contendo um fragmento do gene *LacZ*, IPTG e X-gal. As placas de L-Agar foram, em todas as situações, incubadas a 37°C ON.

**LB:** 10 g bactotripton (LAB M); 5 g extracto de levedura; 10 g NaCl; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L; pH 7.0.

**L-Agar:** Agar (LAB M) a 15 g/L em LB.

**X-gal:** 50 µg/ml de X-gal dissolvida em dimetilformamida.

**IPTG:** 0.1 mM de IPTG dissolvido em ddH<sub>2</sub>O.

### 8.3. Preparação de DNA plasmídico

O DNA plasmídico bacteriano para uso comum, como digestões enzimáticas e sequenciação manual, foi preparado pelo *Boiling Method*. Para aplicações em que era necessário DNA mais puro, como para transfecção de células e microinjecção de embriões, utilizou-se o *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germany), segundo as instruções do fabricante.

#### 8.3.1. *Boiling Method*

Inoculou-se meio LB, contendo os antibióticos necessários para a estirpe bacteriana em causa, com uma colónia isolada e deixou-se crescer a 37 °C, ON, com agitação. Centrifugaram-se 1.5 mL dessa cultura durante 2 min, ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de STET e deixou-se repousar 5 min à TA. Adicionaram-se 4 µL de Lisozima e incubou-se durante 5 min, à TA, fervendo-se, de seguida, durante 45 s e centrifugando 10 min. O precipitado foi removido com a ajuda de um palito e, ao sobrenadante, foram adicionados 8 µL de CTAB. Centrifugou-se durante 5 min e o precipitado foi ressuspensão em 300 µL de NaCl 1.2 M e o DNA reprecipitado por adição de 750 µL de etanol absoluto. Após uma centrifugação durante 10 min, o sedimento obtido foi lavado com etanol a 70%. O DNA foi seco sob vácuo, ressuspensão em 20 µL de ddH<sub>2</sub>O e armazenado a -20 °C.

**LB:** 10 g bactotripton (LAB M); 5 g extracto de levedura; 10 g NaCl; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L; pH 7.0.

**STET:** sucrose 8%; 0.1% Triton X-100; EDTA 50 mM; Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM.

**Lisozima:** solução de Lisozima a 50 mg/mL em ddH<sub>2</sub>O.

**CTAB:** brometo de cetiltrimetilamónio a 5%.

## 9. Digestões enzimáticas

Na maior parte dos casos, utilizaram-se endonucleases de restrição da New England BioLabs (USA). As digestões foram sempre efectuadas de acordo com as indicações do fabricante. Nos casos de digestões duplas, utilizou-se um tampão compatível com ambas as enzimas ou, alternativamente, fizeram-se restrições sequenciais, começando com o tampão de menor concentração salina e adicionando, para a segunda digestão, os componentes em falta.

## 10. PCR (*polimerase chain reaction*, reacção em cadeia da polimerase)

A técnica de PCR permite a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA. Utilizaram-se, como polimerases do DNA, a Taq (Pharmacia Biotech, UK), em usos correntes, e a Pfu ou a Taq Plus Precision (ambas da Stratagene, USA), quando se pretendia introduzir o mínimo possível de erros na sequência a amplificar. Em geral, juntaram-se 25-100 ng de DNA-molde, 0.2  $\mu$ M de cada *primer*, 5  $\mu$ L de tampão de reacção (10 $\times$ ) (correspondente à enzima utilizada), 200  $\mu$ M de cada nucleotídeo e ddH<sub>2</sub>O até perfazer 49.5  $\mu$ L. Procedeu-se a uma desnaturação inicial, durante 5 min, a 95°C, e depois adicionaram-se 2.5 U de polimerase. Seguidamente, submeteu-se a reacção a vários ciclos, em cada um dos quais se desnaturou o DNA, a 95 °C, se procedeu ao emparelhamento dos dois oligonucleotídeos e, por fim, à polimerização do DNA, a 72 °C. Após o último ciclo, procedeu-se a um prolongamento, durante 10 min, do passo de extensão, de modo a permitir que todas as cadeias sintetizadas fossem completadas.

## 11. Subclonagens

As subclonagens realizadas neste trabalho foram realizadas de acordo com as indicações gerais a seguir descritas. Após a digestão do DNA com as endonucleases de restrição adequadas, estas foram inactivadas por incubação a 65 °C, durante 10 min. De seguida, submeteu-se a mistura a uma electroforese em gel de agarose SeaKem (FMC) de 0.7 a 1.2% e isolou-se a banda contendo o fragmento de interesse. O fragmento de DNA foi extraído da agarose utilizando para o efeito o *JET SORB Gel Extraction Kit* (Genomed, Germany), segundo as instruções do fabricante. Simultaneamente, digeriu-se 1  $\mu$ g do vector com enzimas de restrição compatíveis, verificando-se, no final, por electroforese em gel de agarose de uma pequena quantidade da digestão, se tinha sido bem cortado. Inactivaram-se as enzimas, incubando a mistura a 65 °C, durante 10 min. A mistura de ligação foi efectuada utilizando o vector e o fragmento de inserção numa razão molar de cerca de 1:5, aos quais se adicionaram 2  $\mu$ L de Tampão Ligase (10 $\times$ ) e 1 U de Ligase do bacteriófago T4 (ambos Gibco-BRL Life Technologies, USA), perfazendo o volume final de 20  $\mu$ L com ddH<sub>2</sub>O. Incubou-se a mistura de ligação, durante 4 h ou ON, a 16°C. Foram sequenciados os locais de clonagem de todos os construtos efectuados, de modo a verificar a sua correcção.

### 11.1. Reparação do DNA criando extremidades *blunt*

Nos casos em que se pretendia ligar fragmentos de DNA com extremidades incompatíveis, procedeu-se, previamente, ao seguinte protocolo, de modo a obter

extremidades *blunt*. Juntaram-se, a 2 µg de DNA digerido, separado e extraído da agarose, 2 µL de tampão de reparação (10×), 1 µL de dXTPs e 1 U de Klenow e perfizeram-se 20 µL com ddH<sub>2</sub>O. Incubou-se a mistura, durante 30 min, a 25°C ou à TA, para preencher as extremidades 5' coesivas (como as produzidas pela *EcoRI*). Para digerir as extremidades 3' coesivas, incubou-se a mistura, durante 1h, a 37 °C. Parou-se a reacção por incubação a 65°C durante 5 min, extraiu-se o DNA utilizando fenol-clorofórmio/isoamílico e precipitou-se adicionando 0.1 volumes de NaCl 2 M e 2.5 volumes de etanol absoluto. Incubou-se a mistura a -70°C, durante 20 min, centrifugou-se 5 min e lavou-se o precipitado com etanol a 70%. O DNA foi seco sob vácuo.

**Fenol-clorofórmio/isoamílico:** 1 parte de fenol para 1 parte de clorofórmio/isoamílico.

**Clorofórmio/isoamílico:** 24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico.

**Tampão de Reparação (10×):** Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 10 mM.

**dXTPs 1.25 mM:** 1 µL de cada dXTP a 10 mM; 4 µl de ddH<sub>2</sub>O.

### 11.2. Preenchimento das extremidades dos produtos de PCR

Quando se utilizaram enzimas de baixa fidelidade na obtenção de produtos de PCR, tornou-se necessário fazer uma reacção de preenchimento, para poder subclonar estes fragmentos em plasmídeos digeridos, com as extremidades *blunt*. Assim, adicionaram-se 10 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de uma mistura de dNTPs 10 mM (que contém 2.5 mM de cada nucleotídeo), 1.3 µL de tampão de preenchimento (10×) (*polishing buffer*, da Stratagene, USA) e 0.5 U de polimerase do DNA *Pfu*, clonada (Stratagene), e incubou-se a reacção a 72 °C, durante 30 min.

## 12. Sequenciação de DNA

Para a sequenciação de DNA utilizou-se o *T7 Sequencing Kit* (Pharmacia Biotech, UK), que se baseia no método designado por terminação da cadeia por trifosfatos de 2',3'-didesoxirribonucleosídeos (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977). O protocolo foi executado de acordo com as indicações do fabricante, utilizando 1.5 µg de DNA e 10 ng de um dos *primers* indicados na Tabela 2 por cada conjunto de reacções. Os produtos foram, depois, separados por electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida normal ou com formamida, tendo sido usado o último nos casos em que era necessária a resolução de compressões.

### 12.1. Electroforese em gel de poliacrilamida

Na montagem, utilizaram-se vidros de sequenciação de 40 cm x 30 cm e separadores de 0.4 cm de espessura. Aplicou-se entre os vidros o gel de poliacrilamida, a 5% ou com

formamida, e deixou-se polimerizar o gel. Efectuou-se uma pré-corrída durante 10 min, a 60 W. Como tampão de electroforese, utilizou-se 0.6× TBE, para o gel a 5%, ou 1× TBE, para o gel com formamida. Desnaturaram-se as amostras, fervendo-as durante 2 min e colocando-as depois em gelo, e aplicaram-se, posteriormente, 3.5 µL de cada no gel. A electroforese decorreu a 2000 V, 40 mA e 60 W. O tempo de corrida foi variável, conforme a distância entre o *primer* e a sequência que se pretendia obter. Após a corrida, procedeu-se, no caso do gel com formamida, a uma fixação durante cerca de 20 min. Seguidamente, em ambos os casos, transferiu-se o gel para uma folha de papel 3 MM e secou-se sob vácuo, a 80 °C. Após a secagem, colocou-se em exposição a uma película auto-radiográfica à TA, ON.

**Gel de poliacrilamida a 5%:** 25.2 g ureia; 6 mL acrilamida (*Long Ranger gel solution*, da AT Biochem, USA); 14.4 mL TBE (5×); ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 60 mL; filtrou-se por Millipore 0.45 µm; 300 µL APS 10%; 30 µL TEMED.

**Gel de poliacrilamida com formamida:** 25.2 g ureia; 24 mL formamida; 9.6 mL acrilamida (*Long Ranger gel solution*, da AT Biochem, USA); 12 mL TBE (5×); filtrou-se por Millipore 0.45 µm; 480 µL APS 10%; 72 µL TEMED.

**TBE (5×):** 54 g Trizma-base; 27.5 g ácido bórico; 20 mL EDTA 0.5 M; pH 8.0; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1L.

**Solução fixadora:** etanol 20%; ácido acético 10%.

### 13. Rastreios de bibliotecas de DNA genómico e de cDNA

Os rastreios das bibliotecas de DNA genómico (em fago Lambda DASH) e de cDNA (em fago Uni-ZAP XR), ambas da Stratagene (USA), foram efectuados segundo os protocolos do fabricante, que podem ser consultados, respectivamente, em <http://www.stratagene.com/manuals/943801.pdf> e <http://www.stratagene.com/manuals/937328.pdf>. Em ambos os casos foi utilizada uma sonda radioactiva preparada a partir do fragmento genómico adjacente ao P{1ArB} no *mast<sup>P1</sup>*, previamente amplificado por PCR inverso.

### 14. Identificação do locus *mast*

O fragmento genómico adjacente ao P{1ArB} no *mast<sup>P1</sup>*, que tinha sido amplificado por PCR inverso, foi submetido ao preenchimento das extremidades, segundo o protocolo referido atrás (secção 11.2) e, após isso, clonado no pKS digerido com *Sma*I, sequenciado e utilizado em pesquisas em bancos de dados. Verificou-se possuir total homologia com a parte sequenciada do clone de cDNA LD11488, disponível no BDGP. Este estava identificado como pertencendo a uma biblioteca de cDNAs de embriões de *Drosophila*, de 0 a 24 h, e vinha subclonado nos locais *Eco*RI e *Xho*I do pSK e transformado na estirpe SOLR. Fez-se um *streaking* da cultura numa placa de L-Agar,

contendo ampicilina (50 µg/mL) e kanamicina (50 µg/mL), para obter uma colónia isolada, com a qual se inoculou meio LB e se isolou o DNA plasmídico. Este cDNA, que se denominou *mast*, foi completamente sequenciado, para o que se utilizaram várias subclonagens (Tabela 4) e *primers* (Tabela 2). A sequência do cDNA *mast* (LD11488) foi submetida às bases de dados DDBJ/EMBL/GenBank com o código de acesso AF250842.

Mais tarde, as pesquisas em bancos de dados permitiram identificar o gene *mast* (FBgn0021760) e os outros dois cDNAs (NM\_168882 e NM\_168883), referidos no capítulo “Resultados”.

Enzima(s)	Vector digerido	Tipo	Plasmídeo final
<i>HindIII</i> + <i>XhoI</i>	_____	religação	pSK
<i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	_____	religação	pSK
<i>EcoRI</i>	pKS/ <i>EcoRI</i>	subclonagem	pKS
<i>EcoRI</i>	_____	religação	pSK
<i>SacI</i>	pKS/ <i>SacI</i>	subclonagem	pKS
<i>SacI</i>	_____	religação	pSK
<i>XbaI</i>	pKS/ <i>XbaI</i>	subclonagem	pKS
<i>XbaI</i>	_____	religação	pSK

**Tabela 4.** Subclonagens e religações efectuadas a partir do LD11488 para a sua sequenciação.

## 15. Análise computacional da sequência da Mast

Os programas utilizados na análise da sequência da Mast podem encontrar-se nos seguintes locais da Internet: ELM (<http://elm.eu.org/>); GLOBE (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>); InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>); MEMSAT2 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>); MotifScan ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)); NCBI CD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); NCOILS (<http://speedy.embl-heidelberg.de/cgi-bin/coils-svr.pl>); PHDsec ([http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein\\_query.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein_query.html)); PredictNLS (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>); ProfileScan ([http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)); PSIPRED V2.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>); PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>); SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); SubLoc v1.0 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>); 2ZIP (<http://2zip.molgen.mpg.de/>); YinOYang 1.2. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>).

Os alinhamentos entre as várias sequências proteicas foram efectuados com o programa ClustalX-1.8 (<http://www.icgeb.trieste.it/~netsrv/clustalx/clustalx.html>) e o cladograma com o Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/drawgram.html>).

## 16. Produção de anticorpos policlonais anti-Mast

### 16.1. Produção do anticorpo CH-R1

O anticorpo CH-R1 foi produzido contra a proteína recombinante Mast<sub>rec1</sub>. Para que esta fosse efectuada, digeriu-se o cDNA *mast* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e subclonou-se o fragmento resultante de cerca de 3300 pb, correspondente à metade C-terminal da Mast, no vector de expressão pET-23b (Novagen, USA), nos mesmos locais de restrição. A expressão da Mast<sub>rec1</sub> foi induzida na estirpe de *E. coli* BL21(DE3), segundo as instruções do fabricante, verificando-se ser otimizada por adição ao meio de cultura de 0.4 mM de IPTG, durante 2 h. Submeteu-se esta proteína a SDS-PAGE, corou-se o gel com 0.5% *coomassie blue* R250 dissolvido em água desionizada e descorou-se com água desionizada ON, para não haver fixação da proteína ao gel. Isolou-se, posteriormente, a banda correspondente à proteína recombinante e enviou-se para a companhia Eurogentec (Bélgica) para a obtenção do anticorpo policlonal em coelho.

### 16.2. Produção dos anticorpos Rb726 e Rb727

Os anticorpos Rb726 e Rb727 foram produzidos por imunização de dois coelhos com a proteína recombinante Mast<sub>rec2</sub>. Na obtenção desta, digeriu-se o cDNA *mast* com as enzimas de restrição *BglII* e *SacI* e subclonou-se o fragmento resultante, de 1300 pb, no vector de expressão pQE-32 (QIAGEN, Germany), previamente digerido com *BamHI* e *SacI*. Salienta-se que os locais resultantes da restrição pelas enzimas *BglII* e *BamHI* são compatíveis. A expressão da Mast<sub>rec2</sub>, que possui uma sequência de 6 histidinas a N-terminal, foi induzida na estirpe de *E. coli* M15[pREP4], segundo as instruções do fabricante, verificando-se ser otimizada por adição ao meio de cultura de 2 mM de IPTG, durante 3 h. Esta proteína foi depois processada como a anterior e enviada para a companhia SAPU (UK) para a obtenção dos anticorpos policlonais Rb726 e Rb727 em coelho.

### 16.3. Purificação do Rb726 em coluna de proteína A

Utilizou-se, nesta purificação, proteína A recombinante imobilizada em *beads* de agarose (da Sigma, USA). Lavou-se 1 mL de proteína A com Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, e centrifugou-se a 4000 rpm, durante 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi decantado e a lavagem repetida 3 vezes. Seguidamente, juntaram-se 250 µL de Tris-HCl 1 M, pH 8.0, e 2.5 mL de soro Rb726, previamente centrifugado durante 2 min, a 4 °C, e incubou-se durante 3 h, com agitação, à TA. A mistura foi, então, transferida para uma coluna



descartável de 1 mL (QIAGEN, Germany), que se deixou escoar pela acção da gravidade. Lavou-se a coluna com 10 mL de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, depois com 4 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, e eluíram-se as imunoglobulinas por adição de 3 mL de glicina 100 mM, pH 2.6. O eluído foi imediatamente neutralizado com Tris-HCl 1 M, pH 8.0, concentrado numa coluna Centricon (Millipore), de *cutt-off* 10 kDa, e guardado a 4 °C.

### 17. Preparação de extractos proteicos de *D. melanogaster*

Na preparação de extractos proteicos de embriões, estes foram colectados e lavados com água destilada. Adicionou-se 1 volume de tampão de amostra de Laemmli (2×) e PMSF para uma concentração final de 100 µM. De seguida, homogeneizou-se bem, mantendo a mistura sempre no gelo, centrifugou-se a 14000 rpm durante 2 min, a 4°C, e recolheu-se o sobrenadante para outro tubo. No final, ferveu-se a amostra durante 5 min, colocou-se em gelo e centrifugou-se novamente durante 2 min.

Para preparar extractos proteicos de cérebros de larvas da 3ª fase e de ovários ou testículos de adultos, estes foram dissecados em NaCl a 0.7% e retirados para um tubo, previamente colocado em gelo, contendo tampão de amostra de Laemmli (2×), com PMSF numa concentração final de 100 µM. As amostras foram fervidas, durante 5 min, antes da sua quantificação.

**Tampão de amostra de Laemmli (2×):** Tris-HCl, pH 6.8, 125 mM; SDS 4%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 10%.

**Inibidor de proteases:** PMSF 100 mM em isopropanol; armazenar a -20°C.

### 18. Quantificação de proteínas pelo método dos padrões de BSA

De modo a quantificar aproximadamente as proteínas totais dos extractos, estes foram comparados com padrões de BSA. Prepararam-se vários padrões, de concentrações diferentes, de BSA (Sigma, USA) dissolvida em ddH<sub>2</sub>O. Numa folha de papel de filtro Whatman, colocou-se uma gota de 1 µL de cada padrão e de cada amostra a quantificar. Deixou-se secar o papel à TA e seguidamente corou-se com *coomassie blue*, descorando por imersão em solução de descoloração fixadora e deixando, posteriormente, secar à TA.

**coomassie blue:** 0.125% *coomassie blue* R250; ácido acético 10%; metanol 50%.

**Solução de descoloração fixadora:** metanol 5%; ácido acético 7%.

## 19. Western blot

Separaram-se as amostras proteicas desnaturadas e padrões pré-corados (Bio-Rad, USA) por SDS-PAGE de 7-10%. Seguidamente, foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell), utilizando tampão de transferência (1×), por aplicação de uma corrente de 400 mA, durante 1 h, a 14°C. No final, bloqueou-se a membrana em tampão de bloqueamento, durante 2 h, com agitação, e incubou-se com o anticorpo primário, a uma diluição apropriada (ver Tabela 2), em TBST-LP, durante 1 h, com agitação, à TA. Depois lavou-se 3× 15 min a membrana em TBST-LP. Procedeu-se então à incubação com o anticorpo secundário conjugado com HRP (ver Tabela 2), diluído em TBST-LP, durante 1 h, à TA, com agitação. Posteriormente, procedeu-se a duas lavagens com TBST, durante 15 min, e a outra lavagem com TBS, durante 10 min. Na reacção de detecção, utilizou-se o *ECL Chemiluminescent Detection System* (Amersham Biosciences, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi, no final, envolvida em película transparente e exposta, durante alguns segundos, a uma película auto-radiográfica. Posteriormente, foi necessário proceder-se à retirada dos anticorpos para uma nova incubação da membrana, desta vez com o anticorpo anti- $\alpha$ -Tubulina, como controlo da quantidade dos extractos utilizados. Para isso, incubou-se a membrana em solução *stripping* a 50 °C, durante 30 min, lavando-se, de seguida, com uma grande quantidade de TBST, 2× 10 min.

**Tampão de transferência (10×):** Trizma-base 0.25 M; glicina 1.91M; pH 8.3.

**Tampão de bloqueamento:** 5% leite em pó (Molico) em TBST.

**TBST-LP:** 1% leite em pó (Molico) em TBST.

**TBST:** 0.05% Tween 20 em TBS.

**TBS:** Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; NaCl 150 mM.

**Solução stripping:** 2-mercaptoetanol 100 mM; 2% SDS; Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.7.

## 20. Imunofluorescência em células S2

As células S2 de *Drosophila* foram crescidas em meio Schneider's (Gibco BRL) com 5% FBS, a 25 °C. Nos casos em que se pretendia efectuar a despolimerização dos microtúbulos, as células foram incubadas com 30  $\mu$ M colchicina (Sigma, USA) durante 2, 8 ou 16 horas. As células foram submetidas a um *cytospin* contra uma lâmina a 1000 rpm, durante 5 min, fixadas em 3.7% formaldeído em PHEM durante 12 min e lavadas 3× 5 min com PBS (1×). O bloqueamento foi efectuado em PBS-TF durante 1h, à TA, após o que se procedeu à incubação com os anticorpos primários (ver Tabela 2), diluídos em PBS-TF contendo 0.5 mg/mL RNase, durante 45 min, à TA. De seguida, as células foram lavadas em PBS (1×) e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com

fluorocromos (ver Tabela 2). Lavaram-se novamente as células com PBS (1×) e montaram-se em Vectashield (Vector Laboratories, UK) contendo iodeto de propídeo a 5 µg/mL. As preparações foram observadas com um microscópio de laser confocal MRC600 (BioRad, USA) e as imagens recolhidas utilizando o *software* Comos (BioRad, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**PHEM:** Pipes 60 mM; Hepes 25 mM, pH 7.0; EGTA 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 4 mM.

**PBS (10×):** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L.

**PBS-TF:** PBS (1×) contendo 1% Triton X-100 e 10% FBS.

**RNase:** RNase A pancreática a 25 mg/mL numa solução de Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM e NaCl 15 mM. Ferver durante 15 min para inactivar as DNases e deixar arrefecer à TA. Filtrar por Millipore 0.45 µm e fazer alíquotas, que se armazenam a -20°C.

## 21. Imunofluorescência em *squashes* de neuroblastos

### 21.1. Fixação com formaldeído

Dissecaram-se cérebros de larvas da 3ª fase em NaCl a 0.7% e fixaram-se, sequencialmente, em 2% de formaldeído em PBS-T, durante 1.5 min, e em solução Ac/Form, durante 2.5 min. No fim, montaram-se numa gota de 8 µL da última solução. A preparação foi fortemente pressionada com o polegar, para esmagar o cérebro, e imergida, de imediato, em azoto líquido. Rapidamente, retirou-se a lamela com a ajuda de um bisturi e lavaram-se as lâminas em TBS-T, durante 5 min. De seguida, bloquearam-se em TBS-TB, durante 1 h, e, depois, incubaram-se com o anticorpo primário diluído em TBS-TB, ON, a 4 °C. Lavaram-se as preparações 3× 5 min, em TBS-T, e incubaram-se, posteriormente, com o anticorpo secundário diluído em TBS-TB, durante 1 h, à TA. Os *squashes* foram lavados como anteriormente e montados em Vectashield (Vector Laboratories, UK) contendo 0.1 µg/mL de DAPI. As preparações foram observadas com um microscópio Axioskop (Zeiss, Germany) e as imagens obtidas com uma câmara SPOT2 (Diagnostic Instruments, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**PBS-T:** 2% Triton em PBS (1×).

**PBS (10×):** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L.

**Solução Ac/Form:** 2% formaldeído e 45% ácido acético em ddH<sub>2</sub>O.

**TBS-T:** Tris-HCl 10 mM, pH8.0; NaCl 150 mM; 2% Triton.

**TBS-TB:** Tris-HCl 10 mM, pH8.0; NaCl 150 mM; 2% Triton; 10% FBS.

### 21.2. Fixação com metanol

Os cérebros de larvas da 3ª fase foram dissecados em PBS (1×) e transferidos, posteriormente, para uma gota de glicerol a 5% em PBS (1×), numa lâmina. Colocou-se a lamela por cima e pressionou-se fortemente com o polegar para esmagar o cérebro.

Rapidamente, congelou-se a preparação por imersão em azoto líquido, retirou-se a lamela com a ajuda de um bisturi e procedeu-se a uma fixação por imersão em metanol arrefecido a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min. A rehidratação foi executada por incubação sequencial das lâminas em 66% de metanol em PBS-T, 33% de metanol em PBS-T, em ambos os casos durante 5 min, e, finalmente, 3 $\times$  em PBS-T, durante 10 min. O bloqueamento foi efectuado em PBS-TB durante 1 h, seguindo-se as incubações com os anticorpos primário e secundário, diluídos em PBS-TB, durante, respectivamente, 3 h e 2 h, intercaladas e finalizadas por 3 lavagens com PBS-T, durante 20 min cada. Posteriormente, fez-se uma lavagem em PBS (1 $\times$ ) e procedeu-se à montagem em Vectashield (Vector Laboratories, UK) contendo 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DAPI. As preparações foram observadas com o auxílio de um microscópio Axioskop (Zeiss, Germany) e as imagens obtidas com uma câmara SPOT2 (Diagnostic Instruments, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**PBS (10 $\times$ )**: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L.

**PBS-T**: 0.1% Triton em PBS (1 $\times$ ).

**PBS-TB**: 3% BSA em PBS-T.

## 22. Ensaio de ligação aos microtúbulos

Recolheram-se 3 mL de embriões de 0-3 horas e congelaram-se a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . De seguida, homogeneizaram-se em 2 volumes de TL, em gelo, e retirou-se uma amostra (amostra1). Deixou-se o homogeneizado em gelo durante 15 min, para despolimerizar os microtúbulos, centrifugando-o, depois, a 16000 g, durante 30 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Neste passo, recolheu-se uma amostra de precipitado (amostra 2) e outra de sobrenadante (amostra 3). Posteriormente, centrifugou-se o sobrenadante a 135000 g, durante 90 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e retirou-se uma amostra do sobrenadante (amostra 4). Acrescentou-se, ao último, GTP e Taxol para concentrações finais de 1mM e 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente, deixando incubar à TA durante 30 min, para voltarem a polimerizar os microtúbulos. Colocaram-se, num tubo de centrífuga, 3 mL de uma solução de 15% de sucrose em TL-GT e adicionaram-se, com cuidado, 3 mL da solução anterior. Centrifugou-se a mistura a 54000 g, durante 30 min, a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , retirando-se, depois, uma amostra do sobrenadante (amostra 5). O precipitado, que contém os microtúbulos e as MAPs, foi ressuspensão em 400  $\mu\text{L}$  de TL-GT, recolhendo-se uma amostra (amostra 6) e adicionando-se, posteriormente, NaCl para uma concentração final de 0.5 M, o que provoca a dissociação das MAPs dos microtúbulos. Incubou-se a mistura a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 30 min, e centrifugou-se numa microcentrífuga, à velocidade máxima, durante 15 min. No final, retirou-se uma amostra do sobrenadante, no qual ficam as MAPs (amostra 7), e outra do precipitado, contendo os microtúbulos (amostra 8). As amostras foram armazenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização,

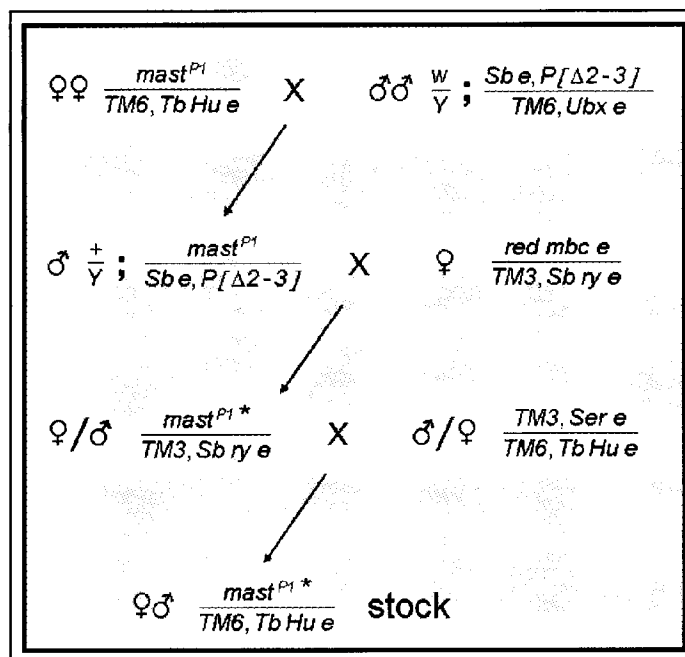
analisando-se, mais tarde, 30  $\mu\text{g}$  de cada uma delas por SDS-PAGE, corado com *coomassie blue*, ou por *Western blot*, usando anticorpos contra a Mast e a  $\alpha$ -Tubulina.

**TL (tampão de lise):** Pipes 0.1 M, pH 6.6; EGTA 5 mM;  $\text{MgSO}_4$  1 mM; glicerol 0.9 M; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; aprotinina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; pepstatina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**TL-GT:** tampão de lise contendo 1mM de GTP e 20  $\mu\text{M}$  de Taxol.

### 23. Mobilização do elemento P

De modo a obter revertentes e outros alelos do gene afectado, procedeu-se à mobilização do elemento P da estirpe  $\text{mast}^{P1}$  (Fig. 11). Inicialmente, cruzou-se um grande número de fêmeas virgens  $\text{mast}^{P1}/\text{TM6B}$  com machos  $\text{Sb e, P}[\Delta 2-3]/\text{TM6}$ . Os machos  $\text{mast}^{P1}/\text{Sb e, P}[\Delta 2-3]$  resultantes foram cruzados individualmente com fêmeas contendo o balanceador  $\text{TM3, Sb ry e}$ , o que permitiu a identificação dos indivíduos nos quais o elemento de transposição tinha sido mobilizado através da perda do  $\text{ry}^+$ . O último cruzamento serviu para balancear os alelos obtidos também com  $\text{TM6B}$ , pois o marcador  $\text{Tb}$  (*Tubby*) permite identificar facilmente as larvas homozigóticas devido a, contrariamente às heterozigóticas, serem compridas e mais finas. De 35000 alelos analisados, obtiveram-se 39 linhas que perderam a inserção (confirmado por *Southern blot* - ver secção 25) e eram viáveis, férteis e sem fenótipo mitótico, os revertentes. Também se conseguiram encontrar 51 novas mutações, que provocavam morte prematura ou infertilidade, entre as quais a  $\text{mast}^{P4}$  e a  $\text{mast}^{P5}$ . Estas também foram examinadas por *Southern blot*, de modo a verificar quais as alterações ocorridas na zona de excisão do elemento P (ver secção 25).



**Figura 11.** Cruzamentos genéticos com vista à mobilização do P{1ArB} da estirpe  $\text{mast}^{P1}$ . ♀ - fêmea; ♂ - macho; \* - indivíduos em que o elemento P foi mobilizado.

## 24. Preparação de DNA genómico de moscas adultas

### 24.1. Método convencional

Congelou-se um tubo de microcentrifuga cheio de moscas adultas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, transferiram-se as moscas para o tubo do homogeneizador e adicionaram-se 5 mL de tampão de homogeneização (TH). Homogeneizou-se bem a mistura, mantendo sempre em gelo o tubo, após o que se centrifugou durante 1 min, a 1000 rpm e  $4^{\circ}\text{C}$ . De seguida, adicionaram-se ao sobrenadante 5 mL de TM e centrifugou-se a 4500 rpm, durante 10 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ , para recuperar os núcleos. Depois, retirou-se o sobrenadante com vácuo de água, aspirando os lípidos, ressuspenderam-se os núcleos em 1 mL de TM e dividiu-se a mistura por dois *ependorfs*, utilizando pontas cortadas. Adicionou-se Proteinase K e SDS para concentrações finais de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1%, respectivamente, misturou-se por inversão e incubou-se durante 45 a 60 min, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Mais tarde extraiu-se o DNA com 1 volume de fenol, duas vezes, e depois com 1 volume de clorofórmio/isoamílico, centrifugando durante 5 min, a 6000 rpm, e retirando a fase aquosa com pontas cortadas. O DNA genómico foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol a 70% e seco ao ar. Posteriormente, foi cuidadosamente ressuspensão em 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$  e armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Tampão de homogeneização (TH):** Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM; NaCl 60 mM; EDTA, pH 8.0, 10 mM; espermidina 150  $\mu\text{M}$ ; espermina 150  $\mu\text{M}$ . Armazenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Clorofórmio/isoamílico:** 24 volumes de clorofórmio para 1 volume de álcool isoamílico.

### 24.2. Método a partir de uma só mosca

Congelou-se uma mosca a  $-70^{\circ}\text{C}$  e homogeneizou-se em 100  $\mu\text{L}$  de HM. Incubou-se, durante 20 min, a  $65^{\circ}\text{C}$  e, mais tarde, adicionaram-se 15  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio 8 M, colocando de seguida em gelo durante 30 min. Posteriormente, centrifugou-se durante 20 min e transferiu-se o sobrenadante para um tubo novo, ao qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, previamente arrefecido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Deixou-se incubar em gelo durante 1 h, centrifugou-se 5 min, rejeitou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado sob vácuo. Ressuspendeu-se o DNA em 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$  e guardou-se a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**HM:** sucrose 200 mM; Trizma-base 100 mM; EDTA, pH 8.2, 50 mM; SDS 5%; NaCl 100 mM. Filtrar.

## 25. Southern blot e colony screening

A técnica de *Southern blot* foi utilizada na análise das estirpes resultantes da mobilização do elemento P. Para isso, preparou-se DNA genómico, a partir de moscas heterozigóticas adultas das várias linhas a estudar, que se digeriu com as enzimas de restrição *Clal* e *PvuII*, separadamente. Como sondas, utilizaram-se: o fragmento de cerca de 2.5 kb resultante da digestão do LD11488 com *EcoRI*, correspondente à zona 5' do cDNA; o fragmento genómico do *plasmid rescue* efectuado com *HindIII*; o gene da ampicilina, que faz parte da constituição do P{1ArB}; o fragmento correspondente à região 5' não codificante do cDNA, obtido a partir da digestão do LD11488 com *BstXI*.

O *colony screening* foi utilizado nos rastreios das subclonagens.

### 25.1. Transferência alcalina de DNA para membrana de nylon (*Southern blot*)

As amostras de DNA digerido foram sujeitas a electroforese em gel de agarose SeaKem (FMC) a 0.7%, durante a noite, a 27 V. Após a electroforese, o gel foi observado sob radiação ultravioleta, fotografado e copiado para uma folha de acetato. Sujeitou-se, então, o gel a depurinação, por imersão em HCl 0.2 N durante 15 min, facilitando a transferência de fragmentos de DNA de tamanho superior a 10 kb. Após uma breve lavagem com água desionizada, procedeu-se à desnaturação, colocando o gel em solução de desnaturação/transferência durante 30 min, com agitação. Entretanto, montou-se o aparato para a transferência, na qual se utilizou a solução de desnaturação/transferência e uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-N<sup>+</sup>, da Amersham Biosciences, UK). A transferência decorreu durante 16 h, aproximadamente. No fim, neutralizou-se a membrana por imersão em solução de neutralização, durante 15 min, com agitação, secou-se durante 30 min, à TA, e depois durante 2 h, a 80°C, para fixar o DNA. A membrana assim preparada foi utilizada para hibridação com a sonda radioactiva.

**Solução de desnaturação/transferência:** NaOH 0.4 N; NaCl 1M.

**Solução de neutralização:** Tris-HCl, pH 7.2, 0.5 M; NaCl 1 M.

### 25.2. Colony screening

Inicialmente, procedeu-se à numeração e marcação da orientação do filtro de nylon (QIAGEN, Germany). Colocou-se a membrana sobre a placa de L-Agar, marcando os triângulos orientadores também no exterior da caixa de Petri, removeu-se e transferiu-se para cima de um papel 3 MM embebido em solução de desnaturação, deixando incubar durante 5 min. A membrana foi depois imergida em solução de neutralização durante 5 min, lavada em 2× SSC e seca ao ar durante 30 min. Seguidamente, procedeu-se à

fixação do DNA por aquecimento a 80 °C, durante 2 h. A membrana assim preparada foi utilizada para hibridação com a sonda radioactiva.

**Solução de desnaturação:** NaCl 1.5 M; NaOH 0.5 M.

**Solução de neutralização:** NaCl 1.5 M; Tris-HCl 1 M; pH 7.4.

**20x SSC:** NaCl 3 M; citrato trissódico 0.3 M; pH 7.0.

### 25.3. Hibridação de DNA por métodos radioactivos

#### 25.3.1. Preparação da sonda radioactiva

Na preparação das sondas radioactivas foi utilizado o kit "*Multiprime DNA Labelling System*" (Amersham Biosciences, UK). O fragmento desejado foi separado por electroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (SeaPlaque, FMC), tendo sido depois retirada a banda de interesse. Este DNA foi dissolvido em ddH<sub>2</sub>O, de modo a ficar a uma concentração de 1 ng/μL, e aquecido a 65 °C, para diminuir a viscosidade da agarose. Pipetaram-se então 31 μL de DNA, que se desnaturou, por aquecimento a 95 °C, durante 5 min, e arrefeceu de seguida em gelo, para não renaturar. Adicionaram-se imediatamente 10 μL de tampão de marcação e 5 μL de mistura de *primers*, retirou-se a mistura do gelo e, seguidamente, juntaram-se 2 μL de [ $\alpha^{32}$ P] dCTP e 2 U do fragmento Klenow da polimerase I de DNA. A reacção de polimerização decorreu durante 1 h, a 37 °C. A sonda radioactiva preparada foi depois filtrada, de modo a remover os nucleotídeos radioactivos não incorporados, numa coluna de Sephadex G50 equilibrada em tampão TNE/SDS, após a adição de 50 μL de TNE/azul de bromofenol, previamente aquecido a 65 °C.

**Tampão de marcação (5x):** Tris-HCl, pH 7.8; MgCl<sub>2</sub>; 2-mercaptoetanol.

**Mistura de *primers*:** hexanucleotídeos aleatórios em solução aquosa, contendo BSA.

**Tampão TNE/SDS:** Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM; NaCl 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 0.1%.

**TNE/azul de bromofenol:** Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM; NaCl 20 mM; EDTA 1 mM; azul de bromofenol 0.025%.

#### 25.3.2. Hibridação e lavagens

A membrana foi colocada a pré-hibridar durante, pelo menos, 2 h, a 65 °C, com agitação, de modo a evitar a hibridação não específica. Depois, a sonda radioactiva foi desnaturada por aquecimento a 95 °C, durante 5 min, arrefecida em gelo e adicionada à solução de hibridação. A hibridação com o DNA retido na membrana ocorreu ON, a 65 °C. Após a hibridação, lavou-se a membrana várias vezes com solução de lavagem aquecida a 50 °C. O sinal foi monitorizado com um contador de cintilações Geiger e a membrana envolvida em película transparente e exposta a uma película de autoradiografia, a -70 °C.

**Solução de hibridação:** SSC 5x; 5x Denhardt's; SDS 0.5%; ssDNA 28 ng/mL, desnaturado.

**20x SSC:** NaCl 3 M; citrato trissódico 0.3 M; pH 7.0.

**100x Denhardt's:** BSA 2%; 2% Ficoll 400; polivinilpirrolidona 2%; filtrou-se e armazenou-se a -20°C.



**Solução de lavagem para colony screening:** SSC 2x; SDS 0.1%.

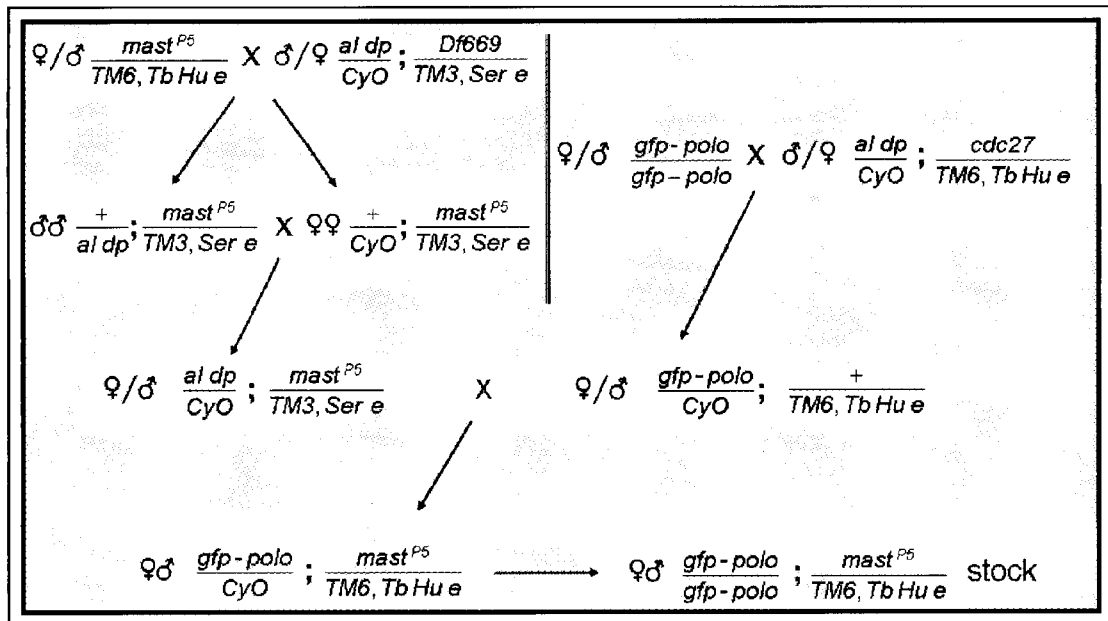
**Solução de lavagem para Southern blot:** SSC 5x, pH 7.0; SDS 0.1%.

#### 25.4. Hibridação de DNA por métodos não-radioactivos

Alternativamente, as sondas de DNA foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP, através do *Random Primed DNA Labeling Kit* (Boehringer Mannheim, Germany), e as membranas processadas segundo as instruções deste fabricante.

#### 26. Obtenção da estirpe *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>*

A estirpe *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>* foi obtida através dos cruzamentos genéticos pormenorizados na Figura 12. A preparação dos embriões para a sua observação *in vivo* foi efectuada de acordo com o protocolo descrito na secção 28.4.



**Figura 12.** Cruzamentos genéticos realizados para obter a estirpe *gfp-polo; mast<sup>P5</sup>*. ♀ - fêmea; ♂ - macho.

#### 27. Estudo da localização da EGFP-Mast e das suas variantes em células S2 e HeLa

##### 27.1. Subclonagens efectuadas nos vectores de transfecção

##### 27.1.1. Subclonagem do cDNA *mast* no pMT/EGFP-C1

Inicialmente, construiu-se um *linker* 5' a partir dos *primers* complementares L1 e L2, descritos na Tabela 2, desfosforilados na extremidade 3' e 5', respectivamente. Para isso,

misturaram-se quantidades idênticas de ambos, desnaturaram-se a 95 °C e depois deixaram-se arrefecer lentamente até à TA, para fazerem o *annealing*. O *linker* assim formado possui uma extremidade coesiva, do tipo 5', compatível com os locais resultantes da restrição pelas endonucleases *Bam*HI e *Bgl*II e uma extremidade coesiva, do tipo 3', compatível com a região resultante da restrição pela endonuclease *Bst*XI.

Simultaneamente, digeriu-se o LD11488 com *Bst*XI e *Xho*I, isolando o fragmento de cerca de 5150 pb, e o pMT/EGFP-C1 com *Bgl*II e *Sal*I. Neste último, subclonou-se o fragmento de cDNA, previamente ligado ao *linker* 5'. É de notar que os locais resultantes das digestões pelas enzimas *Xho*I e *Sal*I são compatíveis.

##### **27.1.2. Subclonagem do cDNA *mast* no pEGFP-C1**

Procedeu-se como descrito na secção anterior, mas a subclonagem foi efectuada no pEGFP-C1 digerido com *Bgl*II e *Sal*I.

##### **27.1.3. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>Δ320-1354</sub>**

Digeriu-se o pMT/*egfp-mast* com *Eco*RV, isolou-se o fragmento maior, contendo o plasmídeo, e religou-se.

##### **27.1.4. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>1-445</sub>**

Digeriu-se o pMT/*egfp-mast* com *Bgl*II e *Sac*II e isolou-se o fragmento maior, que continha o plasmídeo. De seguida, repararam-se as extremidades do fragmento, de modo a tornarem-se compatíveis (ver secção 11.1), e religou-se.

##### **27.1.5. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>1-922</sub>**

Digeriu-se o pMT/*egfp-mast* com *Hin*CI e *Sac*II e isolou-se o fragmento maior, contendo o plasmídeo. De seguida, repararam-se as extremidades do fragmento, de modo a tornarem-se compatíveis (ver secção 11.1), e religou-se.

##### **27.1.6. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>446-1491</sub>**

Digeriu-se o pMT/*egfp-mast* com *Bst*XI e *Bgl*II e isolou-se o fragmento maior, contendo o plasmídeo. De seguida, repararam-se as extremidades do fragmento, de modo a tornarem-se compatíveis (ver secção 11.1), e religou-se.

##### **27.1.7. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>930-1491</sub>**

Submeteu-se o LD11488 a PCR, utilizando os *primers* Mast930 e RWMast, indicados na Tabela 2, e a polimerase do DNA *Pfu* (Stratagene, USA). Após a desnaturação inicial do DNA, fizeram-se 25 ciclos de amplificação (30 s a 95°C, 30 s a 55 °C e 3 min a 72 °C).

No final, prolongou-se o tempo de extensão por 10 min (a 72°C). O fragmento amplificado, de 1700 pb, foi isolado por electroforese em gel de agarose, extraído e digerido com *EcoRI* e *BamHI*. Mais tarde, foi subclonado no pMT/EGFP-C1, previamente digerido com as mesmas endonucleases.

#### 27.1.8. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>Δ652-733</sub>

Digeriu-se o pMT/*egfp-mast* com *SmaI* e, mais tarde, com *AvaI* e isolou-se o fragmento maior, que continha o plasmídeo. De seguida, repararam-se as extremidades do fragmento, de modo a tornarem-se compatíveis (ver secção 11.1), e religou-se.

#### 27.1.9. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>446-872</sub>

Digeriu-se o LD11488 com *BglII* e *SacI* e isolou-se o fragmento de cerca de 1300 pb. De seguida, repararam-se as extremidades deste fragmento (ver secção 11.1), o qual foi subclonado no pMT/EGFP-C1, previamente digerido com *SmaI*.

#### 27.1.10. Subclonagem para expressão da EGFP-Mast<sub>234-866</sub>

Submeteu-se o LD11488 a PCR, utilizando os *primers* Mast234 e Mast866, indicados na Tabela 2, e a polimerase do DNA *Pfu* (Stratagene, USA). Após a desnaturação inicial do DNA, fizeram-se 25 ciclos de amplificação (30 s a 95°C, 1 min a 50 °C e 3 min a 72 °C). No final, prolongou-se o tempo de extensão por 10 min (a 72°C). O fragmento amplificado, de 1900 pb, foi isolado por electroforese em gel de agarose e extracção subsequente. Mais tarde, foi digerido com *XhoI* e *HincII* e subclonado no pMT/EGFP-C1, previamente digerido com *XhoI* e *SmaI*.

### 27.2. Transfecção de células em cultura

Os construtos EGFP-Mast em pMT/EGFP-C1 e pEGFP-C1 foram usados para transfectar células S2, de *Drosophila*, e HeLa, humanas, respectivamente. As células foram transfectadas utilizando 1 µg de plasmídeo, preparado através do *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germany), e o *FuGENE 6 Transfection Reagent* (Boehringer Mannheim, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 h de crescimento, a expressão da EGFP-Mast e das suas derivadas nas células S2 foi induzida pela adição de CuSO<sub>4</sub> 1.0 mM e, 9 h após a indução, as células foram incubadas com 30 µM colchicina (Sigma, USA) durante 4 h, quando pretendia efectuar a despolimerização dos microtúbulos, ou submetidas imediatamente a *cytospin*. Este foi realizado contra uma lâmina, a 1000 rpm, durante 5 min, tendo as células sido depois fixadas em 3.7% formaldeído em PHEM, durante 12 min, e lavadas 3× 5 min com PBS

(1×). Quando desejado, processaram-se as células para imunofluorescência, de acordo com o protocolo atrás referido (secção 20). A expressão nas células HeLa transfectadas é constitutiva e, neste caso, fizeram-se crescer durante 24 h após a transfecção, lavaram-se 2× 5 min com PBS (1×), fixaram-se com formaldeído a 3% em PBS (1×), durante 10 min, e foram lavadas, novamente, como indicado. As preparações de células S2 ou HeLa transfectadas foram, no final, montadas em Vectashield (Vector Laboratories, UK) contendo iodeto de propídeo a 5 µg/mL, observadas num microscópio de laser confocal MRC600 (BioRad, USA) e as imagens recolhidas utilizando o *software* Comos (BioRad, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

**PHEM**: Pipes 60 mM; Hepes 25 mM, pH 7.0; EGTA 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 4 mM.

**PBS (10×)**: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; ddH<sub>2</sub>O q.b.p. 1 L.

## 28. Visualização da GFP-Mast em embriões e neuroblastos *in vivo*

### 28.1. Construção do elemento de transposição pP{UASp}/*egfp-mast*

Procedeu-se à construção de um elemento de transposição, utilizando o vector pP{UASp}, no qual foram clonados os cDNAs *egfp* e *mast* em contíguo, aproveitando a subclonagem, realizada anteriormente, de toda a região codificante *mast* no vector de transfecção pMT/EGFP-C1. Assim, submeteu-se o pMT/EGFP-Mast a PCR, utilizando os *primers* FWpMT e RWMast, indicados na Tabela 2, e a polimerase do DNA *Taq Plus Precision* (Stratagene, USA). Após a desnaturação inicial do DNA, fizeram-se 25 ciclos de amplificação (30 s a 95°C, 30 s a 55 °C e 6 min a 72 °C). No final, prolongou-se o tempo de extensão por 10 min (a 72°C). O fragmento amplificado, de 5900 pb, foi isolado por electroforese em gel de agarose, extraído e digerido com *KpnI* e *BamHI*. Mais tarde, foi subclonado no pP{UASp}, previamente digerido com as mesmas endonucleases.

### 28.2. Produção de linhas transgénicas *egfp-mast*

O DNA plasmídico foi preparado através do *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germany) e depois microinjectado em embriões da estirpe *w<sup>1118</sup>* de *Drosophila melanogaster*, juntamente com plasmídeo *helper*, como fonte de transposase. Os indivíduos microinjectados sobreviventes foram cruzados com os pares da estirpe *w;Ifl/CyO;MKRS/TM2, Ubx*. Foi seleccionada a progenia de olhos amarelos ou laranja, cores resultantes da presença do gene *white* selvagem (*w<sup>+</sup>*) do P{UASp}, que se cruzou novamente com adultos *w;Ifl/CyO;MKRS/TM2, Ubx*, de modo a poder mapear e a estabelecer *stocks* de cada uma das inserções. Obtiveram-se 11 linhas transgénicas independentes, 2 no cromossoma X, 4 no segundo, 3 no terceiro e 2 no quarto.

### **28.3. Cruzamentos com estirpes GAL4**

Para a expressão da EGFP-Mast em neuroblastos ou embriões, as linhas transgênicas obtidas foram cruzadas, respectivamente, com a estirpe Mz1061 ou com a VP16, podendo-se observar a expressão da proteína quimérica na descendência.

### **28.4. Preparação de embriões e neuroblastos para observação *in vivo***

Recolheram-se embriões que expressavam uma proteína quimérica contendo GFP (GFP-Polo ou EGFP-Mast), descorionaram-se utilizando fita adesiva dupla (Scotch) e colocaram-se sobre uma lâmina. Nesta, colocou-se uma lamela de 18 mm x 18 mm de cada lado dos embriões, para impedir que fossem esmagados. De seguida, cobriram-se os embriões com óleo Voltalef 10s (Elf Atochem, France), montaram-se sob uma lamela de 22 mm x 22 mm e visualizaram-se no microscópio de laser confocal MRC600 (BioRad, USA). As imagens foram recolhidas utilizando o *software* Comos (BioRad, USA) e processadas e animadas com o ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os neuroblastos de larvas que expressavam a EGFP-Mast foram dissecados em NaCl a 0.7% e montados do mesmo modo que os embriões. Estas preparações foram observadas utilizando um microscópio Axioskop (Zeiss, Germany) e as imagens obtidas com uma câmara SPOT2 (Diagnostic Instruments, USA) e processadas com o Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, USA).

## **V. Referências Bibliográficas**

- Adams, R.R., Tavares, A.A., Salzberg, A., Bellen, H.J. e Glover, D.M. (1998) *pavarotti* encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev*, **12**, 1483-1494.
- Aizawa, H., Emori, Y., Murofushi, H., Kawasaki, H., Sakai, H. e Suzuki, K. (1990) Molecular cloning of a ubiquitously distributed microtubule-associated protein with Mr 190,000. *J Biol Chem*, **265**, 13849-13855.
- Aizawa, H., Emori, Y., Mori, A., Murofushi, H., Sakai, H. e Suzuki, K. (1991) Functional analyses of the domain structure of microtubule-associated protein-4 (MAP-U). *J Biol Chem*, **266**, 9841-9846.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., *et al.* (2001) Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*, **104**, 923-935.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York.
- Alsop, G.B. e Zhang, D. (2003) Microtubules are the only structural constituent of the spindle apparatus required for induction of cell cleavage. *J Cell Biol*, **162**, 383-390.
- Amos, L. e Klug, A. (1974) Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci*, **14**, 523-549.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A. e Mann, M. (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, **426**, 570-574.
- Andersen, S.S., Buendia, B., Dominguez, J.E., 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.
- Andersen, S.S. e Karsenti, E. (1997) XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle. *J Cell Biol*, **139**, 975-983.
- Andrade, M.A. e Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*, **11**, 115-116.
- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.B. e Margolis, R.L. (2001) Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell*, **12**, 1315-1328.
- Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. e Swedlow, J.R. (2004) Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell*, **6**, 253-268.
- Arnal, I., Karsenti, E. e Hyman, A.A. (2000) Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, **149**, 767-774.
- Arnal, I., Heichette, C., Diamantopoulos, G.S. e Chretien, D. (2004) CLIP-170/Tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol*, **14**, 2086-2095.
- Barr, F.A., Sillje, H.H. e Nigg, E.A. (2004) Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 429-440.
- Basu, J., Logarinho, E., Herrmann, S., Bousbaa, H., Li, Z., Chan, G.K., Yen, T.J., Sunkel, C.E. e Goldberg, M.L. (1998) Localization of the *Drosophila* checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma*, **107**, 376-385.
- Basu, J., Bousbaa, H., Logarinho, E., Li, Z., Williams, B.C., Lopes, C., Sunkel, C.E. e Goldberg, M.L. (1999) Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J Cell Biol*, **146**, 13-28.
- Beinhauer, J.D., Hagan, I.M., Hegemann, J.H. e Fleig, U. (1997) Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol*, **139**, 717-728.
- Bellanger, J.M. e Gonczy, P. (2003) TAC-1 and ZYG-9 form a complex that promotes microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Curr Biol*, **13**, 1488-1498.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Belmont, L.D., Hyman, A.A., Sawin, K.E. e Mitchison, T.J. (1990) Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*, **62**, 579-589.
- Belmont, L.D. e Mitchison, T.J. (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*, **84**, 623-631.
- Berns, M.W. e Richardson, S.M. (1977) Continuation of mitosis after selective laser microbeam destruction of the centriolar region. *J Cell Biol*, **75**, 977-982.
- Biggins, S. e Murray, A.W. (2001) The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, **15**, 3118-3129.
- Biggins, S. e Walczak, C.E. (2003) Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr Biol*, **13**, R449-460.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al. (1998) A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J*, **17**, 3052-3065.
- Bjerling, P. e Ekwall, K. (2002) Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res*, **35**, 499-507.
- Blangy, A., Lane, H.A., d'Hérin, P., Harper, M., Kress, M. e Nigg, E.A. (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.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A. e Karpen, G.H. (2002) Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell*, **2**, 319-330.
- Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L.M., Rieder, C.L., Edde, B. e Bornens, M. (1998) Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol*, **143**, 1575-1589.
- Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McClelland, M.L., Kuang, J. e Stukenberg, P.T. (2002) Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **13**, 3064-3077.
- Bonaccorsi, S., Giansanti, M.G. e Gatti, M. (1998) Spindle self-organization and cytokinesis during male meiosis in asterless mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, **142**, 751-761.
- Bornens, M., Paintrand, M., Berges, J., Marty, M.C. e Karsenti, E. (1987) Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil Cytoskeleton*, **8**, 238-249.
- Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B. e Ruoslahti, E. (1987) Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3194-3198.
- Boveri, T. (1888) Zellenstudien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalcephala*. *Jena Zeit Naturw*, **22**, 685-882.
- Boveri, T. (1914) *The origin of malignant tumours*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Brinkley, B.R. e Stubblefield, E. (1966) The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma*, **19**, 28-43.
- Brinkley, B.R. (1985) Microtubule organizing centers. *Annual Review in Cell Biology*, **1**, 145-172.
- Brinkley, B.R. (2001) Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol*, **11**, 18-21.
- Browning, H., Hackney, D.D. e Nurse, P. (2003) Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol*, **5**, 812-818.
- Brust-Mascher, I. e Scholey, J.M. (2002) Microtubule flux and sliding in mitotic spindles of *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell*, **13**, 3967-3975.



- Bucciarelli, E., Giansanti, M.G., Bonaccorsi, S. e Gatti, M. (2003) Spindle assembly and cytokinesis in the absence of chromosomes during *Drosophila* male meiosis. *J Cell Biol*, **160**, 993-999.
- Buendia, B., Draetta, G. e Karsenti, E. (1992) Regulation of the microtubule nucleating activity of centrosomes in *Xenopus* egg extracts: role of cyclin A-associated protein kinase. *J Cell Biol*, **116**, 1431-1442.
- Bulinski, J.C. e Borisy, G.G. (1980) Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization. *J Biol Chem*, **255**, 11570-11576.
- Burns, R.G. (1991)  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -tubulin: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motility and Cytoskeleton*, **20**, 181-189.
- Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P. e Brunner, D. (2004) Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell*, **6**, 831-843.
- Callaini, G., Whitfield, W.G. e Riparbelli, M.G. (1997) Centriole and centrosome dynamics during the embryonic cell cycles that follow the formation of the cellular blastoderm in *Drosophila*. *Exp Cell Res*, **234**, 183-190.
- Cao, L.G. e Wang, Y.L. (1996) Signals from the spindle midzone are required for the stimulation of cytokinesis in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell*, **7**, 225-232.
- Caplow, M. e Shanks, J. (1996) Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol Biol Cell*, **7**, 663-675.
- Carvalho, P., Gupta, M.L., Jr., Hoyt, M.A. e Pellman, D. (2004) Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell*, **6**, 815-829.
- Cassimeris, L. (2002) The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 18-24.
- Centonze, V.E. e Borisy, G.G. (1990) Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *Journal of Cell Science*, **95**, 405-411.
- Cha, B., Cassimeris, L. e Gard, D.L. (1999) XMAP230 is required for normal spindle assembly in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, **112**, 4337-4346.
- Cha, B.J., Error, B. e Gard, D.L. (1998) XMAP230 is required for the assembly and organization of acetylated microtubules and spindles in *Xenopus* oocytes and eggs. *J Cell Sci*, **111**, 2315-2327.
- Chandra, R., Salmon, E.D., Erickson, H.P., Lockhart, A. e Endow, S.A. (1993) Structural and functional domains of the *Drosophila* ncd microtubule motor protein. *J Biol Chem*, **268**, 9005-9013.
- Chang, P. e Stearns, T. (2000) Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol*, **2**, 30-35.
- Chang, W., Gruber, D., Chari, S., Kitazawa, H., Hamazumi, Y., Hisanaga, S. e Bulinski, J.C. (2001) Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression. *J Cell Sci*, **114**, 2879-2887.
- Charrasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouviere, C., Ango, F., Cassimeris, L., Gard, D.L. e Larroque, C. (1998) The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the *Xenopus* XMAP215. *J Cell Sci*, **111**, 1371-1383.
- Chen, H.M., Schmeichel, K.L., Mian, I.S., Lelievre, S., Petersen, O.W. e Bissell, M.J. (2000) AZU-1: a candidate breast tumor suppressor and biomarker for tumor progression. *Mol Biol Cell*, **11**, 1357-1367.
- Choi, J.H., Bertram, P.G., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H.H. e Zheng, X.F. (2002) The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep*, **3**, 988-994.
- Chrétien, D., Fuller, S.D. e Karsenti, E. (1995) Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol*, **129**, 1311-1328.
- Chrétien, D., Buendia, B., Fuller, S.D. e Karsenti, E. (1997) Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J Struct Biol*, **120**, 117-133.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Cleveland, D.W., Mao, Y. e Sullivan, K.F. (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, **112**, 407-421.
- Cole, D.G., Saxton, W.M., Sheehan, K.B. e Scholey, J.M. (1994) A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. *J Biol Chem*, **269**, 22913-22916.
- Cooke, C.A., Heck, M.M. e Earnshaw, W.C. (1987) The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol*, **105**, 2053-2067.
- Cooley, L., Kelley, R. e Spradling, A. (1988) Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science*, **239**, 1121-1128.
- Cui, H., Dong, M., Sadhu, D.N. e Rosenberg, D.W. (2002) Suppression of kinesin expression disrupts adenomatous polyposis coli (APC) localization and affects beta-catenin turnover in young adult mouse colon (YAMC) epithelial cells. *Exp Cell Res*, **280**, 12-23.
- Cullen, C.F., Deák, P., Glover, D.M. e Ohkura, H. (1999) mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J Cell Biol*, **146**, 1005-1018.
- Cullen, C.F. e Ohkura, H. (2001) Msps protein is localized to acentrosomal poles to ensure bipolarity of *Drosophila* meiotic spindles. *Nat Cell Biol*, **3**, 637-642.
- Curmi, P.A., Andersen, S.S., Lachkar, S., Gavet, O., Karsenti, E., Knossow, M. e Sobel, A. (1997) The stathmin/tubulin interaction in vitro. *J Biol Chem*, **272**, 25029-25036.
- Cyert, M.S., Scherson, T. e Kirschner, M.W. (1988) Monoclonal antibodies specific for thiophosphorylated proteins recognize *Xenopus* MPF. *Dev Biol*, **129**, 209-216.
- Dammermann, A., Desai, A. e Oegema, K. (2003) The minus end in sight. *Curr Biol*, **13**, R614-624.
- Danilchik, M.V., Funk, W.C., Brown, E.E. e Larkin, K. (1998) Requirement for microtubules in new membrane formation during cytokinesis of *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, **194**, 47-60.
- David-Pfeuty, T., Erickson, H.P. e Pantaloni, D. (1977) Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5372-5376.
- Deka, J., Kuhlmann, J. e Muller, O. (1998) A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *Eur J Biochem*, **253**, 591-597.
- Delattre, M. e Gonczy, P. (2004) The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci*, **117**, 1619-1630.
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J. e Walczak, C.E. (1999) Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*, **96**, 69-78.
- Devore, J.J., Conrad, G.W. e Rappaport, R. (1989) A model for astral stimulation of cytokinesis in animal cells. *J Cell Biol*, **109**, 2225-2232.
- Diamantopoulos, G.S., Perez, F., Goodson, H.V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T.E. e Rickard, J.E. (1999) Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol*, **144**, 99-112.
- Dicthenberg, J.B., Zimmerman, W., Sparks, C.A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F.S. e Doxsey, S.J. (1998) Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol*, **141**, 163-174.
- Dionne, M.A., Sanchez, A. e Compton, D.A. (2000) ch-TOGp is required for microtubule aster formation in a mammalian mitotic extract. *J Biol Chem*, **275**, 12346-12352.
- Doe, C.Q. e Bowerman, B. (2001) Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 68-75.
- Dogterom, M. e Yurke, B. (1997) Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science*, **278**, 856-860.

- Doxsey, S. (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 688-698.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H. e Kirschner, M.W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*, **3**, 1141-1154.
- Drechsel, D.N. e Kirschner, M.W. (1994) The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol*, **4**, 1053-1061.
- Ducat, D. e Zheng, Y. (2004) Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*, **301**, 60-67.
- Duensing, S. e Munger, K. (2002) Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*, **21**, 6241-6248.
- Duffy, J.B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, **34**, 1-15.
- Duncan, J.E. e Warrior, R. (2002) The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol*, **12**, 1982-1991.
- Dutcher, S.K., Morrissette, N.S., Preble, A.M., Rackley, C. e Stanga, J. (2002) epsilon-Tubulin is an essential component of the centriole. *Mol Biol Cell*, **13**, 3859-3869.
- Earnshaw, W.C. e Bernat, R.L. (1991) Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, **100**, 139-146.
- Earnshaw, W.C. (1994) Structure and molecular biology of the kinetochore. In *Microtubules*. Wiley-Liss, New York, pp. 393-412.
- Ebneth, A., Drewes, G. e Mandelkow, E. (1999) Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **44**, 209-224.
- Eckley, D.M., Ainsztein, A.M., Mackay, A.M., Goldberg, I.G. e Earnshaw, W.C. (1997) Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells. *J Cell Biol*, **136**, 1169-1183.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F. e Denoulet, P. (1990) Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science*, **247**, 83-85.
- Elledge, S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, **274**, 1664-1672.
- Endow, S.A., Henikoff, S. e Soler-Niedziela, L. (1990) Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. *Nature*, **345**, 81-83.
- Endow, S.A., Kang, S.J., Satterwhite, L.L., Rose, M.D., Skeen, V.P. e Salmon, E.D. (1994) Yeast Kar3 is a minus-end microtubule motor protein that destabilizes microtubules preferentially at the minus ends. *Embo J*, **13**, 2708-2713.
- Engels, W.R., Johnson-Schlitz, D.M., Eggleston, W.B. e Sved, J. (1990) High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell*, **62**, 515-525.
- Erickson, H.P. e Stoffler, D. (1996) Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. *J Cell Biol*, **135**, 5-8.
- Erickson, H.P. (2000) Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? *Nat Cell Biol*, **2**, E93-96.
- Evans, L., Mitchison, T. e Kirschner, M. (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol*, **100**, 1185-1191.
- Fan, J., Griffiths, A.D., Lockhart, A., Cross, R.A. e Amos, L.A. (1996) Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. *J Mol Biol*, **259**, 325-330.
- Fang, G., Yu, H. e Kirschner, M.W. (1998) The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev*, **12**, 1871-1883.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Fedorova, S.A., Chubykin, V.L., Gucachenko, A.M. e Omel'ianchuk, L.V. (1997) Mutation chromosome bows (chbv40), associated with the abnormal chromosome spindle in *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, **33**, 1286-1292.
- Feldman, J.L. e Marshall, W.F. (2004) Centrioles: bad to be bald? *Curr Biol*, **14**, R659-660.
- Felix, M., Antony, C., Wright, M. e Maro, B. (1994) Centrosome assembly in vitro: role of gamma tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J Cell Biol*, **124**, 19-31.
- Flemming, W. (1875) Studien über die Entwicklungsgeschichte der Najaden. *Sitzungsber Akad Wissensch Wien*, **71**, 81-147.
- Fraschini, R., Beretta, A., Sironi, L., Musacchio, A., Lucchini, G. e Piatti, S. (2001) Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *Embo J*, **20**, 6648-6659.
- Gadde, S. e Heald, R. (2004) Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol*, **14**, R797-805.
- Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J.B., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Schroer, T.A. e Compton, D.A. (1996) Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *J Cell Biol*, **135**, 399-414.
- Galipeau, P.C., Cowan, D.S., Sanchez, C.A., Barrett, M.T., Emond, M.J., Levine, D.S., Rabinovitch, P.S. e Reid, B.J. (1996) 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 7081-7084.
- Galjart, N. e Perez, F. (2003) A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 48-53.
- Garcia, M.A., Vardy, L., Koonrugsa, N. e Toda, T. (2001) Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Embo J*, **20**, 3389-3401.
- Garcia, M.A., Koonrugsa, N. e Toda, T. (2002) Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast. *EMBO J*, **21**, 6015-6024.
- Gard, D.L. e Kirschner, M.W. (1987) A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol*, **105**, 2203-2215.
- Geissler, S., Pereira, G., Spang, A., Knop, M., Souès, S., Kilmartin, J. e Schiebel, E. (1996) The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *The EMBO Journal*, **15**, 3899-3911.
- Gergely, F., Draviam, V.M. e Raff, J.W. (2003) The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. *Genes Dev*, **17**, 336-341.
- Giansanti, M.G., Bonaccorsi, S., Williams, B., Williams, E.V., Santolamazza, C., Goldberg, M.L. e Gatti, M. (1998) Cooperative interactions between the central spindle and the contractile ring during *Drosophila* cytokinesis. *Genes Dev*, **12**, 396-410.
- Giansanti, M.G., Gatti, M. e Bonaccorsi, S. (2001) The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Development*, **128**, 1137-1145.
- Gigant, B., Curmi, P.A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A. e Knossow, M. (2000) The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell*, **102**, 809-816.
- Gloor, G.B., Nassif, N.A., Johnson-Schlitz, D.M., Preston, C.R. e Engels, W.R. (1991) Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science*, **253**, 1110-1117.
- Goldstein, L.S., Laymon, R.A. e McIntosh, J.R. (1986) A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J Cell Biol*, **102**, 2076-2087.
- Gorbsky, G.J., Sammak, P.J. e Borisy, G.G. (1987) Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends. *J Cell Biol*, **104**, 9-18.

- Gorbsky, G.J. (2001) The mitotic spindle checkpoint. *Curr Biol*, **11**, R1001-1004.
- Gordon, D.M. e Roof, D.M. (1999) The kinesin-related protein Kip1p of *Saccharomyces cerevisiae* is bipolar. *J Biol Chem*, **274**, 28779-28786.
- Gould, R.R. e Borisy, G.G. (1977) The pericentriolar material in chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol*, **73**, 601-615.
- Gräf, R., Daudeker, C. e Schliwa, M. (2000) *Dictyostelium* DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J Cell Sci*, **113**, 1747-1758.
- Gräf, R., Euteneuer, U., Ho, T.-H. e Rehberg, M. (2003) Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number. *Mol Biol Cell*, **14**, 4067-4074.
- Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D. e Xu, W. (2000) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, **103**, 885-896.
- Greenspan, R.J. (1997) *Fly pushing: the theory and practice of Drosophila genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gross, S.P., Welte, M.A., Block, S.M. e Wieschaus, E.F. (2002) Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J Cell Biol*, **156**, 715-724.
- Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. e Mattaj, I.W. (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, **104**, 83-93.
- Gunawardane, R.N., Martin, O.C., Cao, K., Zhang, L., Dej, K., Iwamatsu, A. e Zheng, Y. (2000) Characterization and reconstitution of *Drosophila* gamma-tubulin ring complex subunits. *J Cell Biol*, **151**, 1513-1524.
- Hagan, I. e Yanagida, M. (1990) Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast cut7+ gene. *Nature*, **347**, 563-566.
- Hassell, J.R., Kimura, J.H. e Hascall, V.C. (1986) Proteoglycan core protein families. *Annu Rev Biochem*, **55**, 539-567.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J. e Dawid, I.B. (1992) The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res*, **20**, 2603.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becke, P., Hyman, A.A. e Karsenti, E. (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*, **382**, 420-468.
- Heald, R. (2000) Motor function in the mitotic spindle. *Cell*, **102**, 399-402.
- Heck, M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y. e Spradling, A.C. (1993) The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biology*, **123**, 665-679.
- Heidemann, S.R. e McIntosh, J.R. (1980) Visualization of the structural polarity of microtubules. *Nature*, **286**, 517-519.
- Hemmings, B.A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. e Stone, S.R. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry*, **29**, 3166-3173.
- Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L. e Sluder, G. (1999) Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science*, **283**, 851-854.
- Hinchcliffe, E.H., Miller, F.J., Cham, M., Khodjakov, A. e Sluder, G. (2001) Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science*, **291**, 1547-1550.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T. e Kitamura, T. (2001) MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J Biol Chem*, **276**, 5821-5828.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Holmfeldt, P., Brattsand, G. e Gullberg, M. (2003) Interphase and monoastral-mitotic phenotypes of overexpressed MAP4 are modulated by free tubulin concentrations. *J Cell Sci*, **116**, 3701-3711.
- Holy, T.E. e Leibler, S. (1994) Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 5682-5685.
- Hoogenraad, C.C., Koekkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, H., Dortland, B., Miedema, M., van Alphen, A., Kistler, W.M., Jaegle, M., Koutsourakis, M., *et al.* (2002) Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat Genet*, **32**, 116-127.
- Horio, T. e Hotani, H. (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature*, **321**, 605-607.
- Howard, J. e Hyman, A.A. (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, **422**, 753-758.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M. e Cassimeris, L. (1999) Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol Biol Cell*, **10**, 105-118.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L. e Salmon, E.D. (2001) Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol*, **155**, 1159-1172.
- Hoyt, M.A., He, L., Loo, K.K. e Saunders, W.S. (1992) Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J Cell Biol*, **118**, 109-120.
- Hoyt, M.A., He, L., Totis, L. e Saunders, W.S. (1993) Loss of function of *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related CIN8 and KIP1 is suppressed by KAR3 motor domain mutations. *Genetics*, **135**, 35-44.
- Hoyt, M.A. (2001) A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol*, **154**, 909-911.
- Hunt, A.J. e McIntosh, J.R. (1998) The dynamic behavior of individual microtubules associated with chromosomes in vitro. *Mol Biol Cell*, **9**, 2857-2871.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A. e Murray, A.W. (1998) Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*, **279**, 1041-1044.
- Hyman, A.A., Salsler, S., Drechsel, D.N., Unwin, N. e Mitchison, T.J. (1992) Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell*, **3**, 1155-1167.
- Hyman, A.A. e Karsenti, E. (1996) Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell*, **84**, 401-410.
- Inoue, S. e Salmon, E.D. (1995) Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell*, **6**, 1619-1640.
- Inoue, Y.H., do Carmo Avides, M., Shiraki, M., Deak, P., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Matsukage, A. e Glover, D.M. (2000) Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, **149**, 153-166.
- Inoue, Y.H., Savoian, M.S., Suzuki, T., Mathe, E., Yamamoto, M.T. e Glover, D.M. (2004) Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression. *J Cell Biol*, **166**, 49-60.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P. e Losson, R. (1997) The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci*, **22**, 151-153.
- Jimbo, T., Kawasaki, Y., Koyama, R., Sato, R., Takada, S., Haraguchi, K. e Akiyama, T. (2002) Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat Cell Biol*, **4**, 323-327.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Johnson, G.V. e Bailey, C.D. (2002) Tau, where are we now? *J Alzheimers Dis*, **4**, 375-398.

- Jokelainen, P.T. (1967) The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *J Ultrastruct Res*, **19**, 19-44.
- Joseph, J., Tan, S.H., Karpova, T.S., McNally, J.G. e Dasso, M. (2002) SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol*, **156**, 595-602.
- Kalab, P., Weis, K. e Heald, R. (2002) Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, **295**, 2452-2456.
- Kalt, A. e Schliwa, M. (1993) Molecular components of the centrosome. *Trends in Cell Biology*, **3**, 118-128.
- Kapoor, T.M. e Mitchison, T.J. (2001) Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. *J Cell Biol*, **154**, 1125-1133.
- Karabay, A. e Walker, R.A. (1999) Identification of microtubule binding sites in the Ncd tail domain. *Biochemistry*, **38**, 1838-1849.
- Karki, S. e Holzbaur, E.L. (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 45-53.
- Karsenti, E. e Vernos, I. (2001) The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*, **294**, 543-547.
- Kashina, A.S., Baskin, R.J., Cole, D.G., Wedaman, K.P., Saxton, W.M. e Scholey, J.M. (1996) A bipolar kinesin. *Nature*, **379**, 270-272.
- Katayama, H., Ota, T., Jisaki, F., Ueda, Y., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., Terada, Y. e Tatsuka, M. (1999) Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1160-1162.
- Ke, Y.W., Dou, Z., Zhang, J. e Yao, X.B. (2003) Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Res*, **13**, 69-81.
- Keating, T.J. e Borisy, G.G. (2000) Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*, **2**, 352-357.
- Kellogg, D.R., Moritz, M. e Alberts, B.M. (1994) The centrosome and cellular organization. *Annual Review of Biochemistry*, **63**, 639-674.
- Khodjakov, A., Gabashvili, I.S. e Rieder, C.L. (1999) "Dumb" versus "smart" kinetochore models for chromosome congression during mitosis in vertebrate somatic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **43**, 179-185.
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R. e Rieder, C.L. (2000) Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*, **10**, 59-67.
- Khodjakov, A. e Rieder, C.L. (2001) Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol*, **153**, 237-242.
- Kim, K.I., Baek, S.H. e Chung, C.H. (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol*, **191**, 257-268.
- Kimble, M. e Kuriyama, R. (1992) Functional components of microtubule-organizing centers. *Int Rev Cytol*, **136**, 1-50.
- Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N. e Hyman, A.A. (2001) Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science*, **294**, 1340-1343.
- Kirkham, M., Muller-Reichert, T., Oegema, K., Grill, S. e Hyman, A.A. (2003) SAS-4 is a *C. elegans* centriolar protein that controls centrosome size. *Cell*, **112**, 575-587.
- Kirschner, M. e Mitchison, T. (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, **45**, 329-342.
- Kline-Smith, S.L. e Walczak, C.E. (2002) The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 2718-2731.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Kline-Smith, S.L., Khodjakov, A., Hergert, P. e Walczak, C.E. (2004) Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell*, **15**, 1146-1159.
- Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C. e Strebhardt, K. (1999) Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*, **59**, 2794-2797.
- Knop, M., Pereira, G., Geissler, S., Grein, K. e Schiebel, E. (1997) The spindle pole body component Spc97p interacts with the gamma-tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *Embo J*, **16**, 1550-1564.
- Kochanski, R.S. e Borisy, G.G. (1990) Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol*, **110**, 1599-1605.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S.-i., Galjart, N. e Borisy, G.G. (2002b) Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol*, **159**, 589-599.
- Komarova, Y.A., Vorobjev, I.A. e Borisy, G.G. (2002a) Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J Cell Sci*, **115**, 3527-3539.
- Kong, Q.Z., Zhang, N. e Zhao, Y.F. (2004) The roles of centrosome in cancer development. *Drug News Perspect*, **17**, 195-200.
- Kosco, K.A., Pearson, C.G., Maddox, P.S., Wang, P.J., Adams, I.R., Salmon, E.D., Bloom, K. e Huffaker, T.C. (2001) Control of microtubule dynamics by Stu2p is essential for spindle orientation and metaphase chromosome alignment in yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 2870-2880.
- Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P. e Nigg, E.A. (2002) Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*, **158**, 617-623.
- Kuriyama, R. e Borisy, G.G. (1981) Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J Cell Biol*, **91**, 814-821.
- Lacey, K.R., Jackson, P.K. e Stearns, T. (1999) Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2817-2822.
- Lambert, A. (1993) Microtubule-organizing centers in higher plants. *Current Opinion in Cell Biology*, **5**, 116-122.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E. e Stukenberg, P.T. (2004) Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*, **14**, 273-286.
- Lange, B.M. e Gull, K. (1996) Structure and function of the centriole in animal cells: progress and questions. *Trends Cell Biol*, **6**, 348-352.
- Larkin, K. e Daniilchik, M.V. (1999) Microtubules are required for completion of cytokinesis in sea urchin eggs. *Dev Biol*, **214**, 215-226.
- Lee, M.J., Gergely, F., Jeffers, K., Peak-Chew, S.Y. e Raff, J.W. (2001) Mps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol*, **3**, 643-649.
- Leguy, R., Melki, R., Pantaloni, D. e Carlier, M.F. (2000) Monomeric gamma-tubulin nucleates microtubules. *J Biol Chem*, **275**, 21975-21980.
- Leidel, S. e Gonczy, P. (2003) SAS-4 is essential for centrosome duplication in *C. elegans* and is recruited to daughter centrioles once per cell cycle. *Dev Cell*, **4**, 431-439.
- Lemos, C.L., Sampaio, P., Maiato, H., Costa, M., Omel'yanchuk, L.V., Liberal, V. e Sunkel, C.E. (2000) Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *Embo J*, **19**, 3668-3682.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. e Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649.



- Lens, S.M.A., Wolthuis, R.M.F., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. e Medema, R.H. (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J*, **22**, 2934-2947.
- Lewis, S.A., Tian, G. e Cowan, N.J. (1997) The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends in Cell Biology*, **7**, 479-484.
- Li, X. e Nicklas, B. (1995) Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature*, **373**, 630-632.
- Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J. e Salisbury, J.L. (1998) Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2950-2955.
- Lingle, W.L., Barrett, S.L., Negron, V.C., D'Assoro, A.B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C.M., Reynolds, C. e Salisbury, J.L. (2002) Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1978-1983.
- Logarinho, E. e Sunkel, C.E. (1998) The *Drosophila* POLO kinase localises to multiple compartments of the mitotic apparatus and is required for the phosphorylation of MPM2 reactive epitopes. *J Cell Sci*, **111**, 2897-2909.
- Logarinho, E., Bousbaa, H., Dias, J.M., Lopes, C., Amorim, I., Antunes-Martins, A. e Sunkel, C.E. (2004) Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J Cell Sci*, **117**, 1757-1771.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L.Y. e Jan, Y.N. (2001) Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature*, **409**, 522-525.
- MacNeal, R.K. e Purich, D.L. (1978) Stoichiometry and role of GTP hydrolysis in bovine neurotubule assembly. *J Biol Chem*, **253**, 4683-4687.
- Maddox, P., Desai, A., Oegema, K., Mitchison, T.J. e Salmon, E.D. (2002) Poleward microtubule flux is a major component of spindle dynamics and anaphase a in mitotic *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, **12**, 1670-1674.
- Maiato, H., Sampaio, P., Lemos, C.L., Findlay, J., Carmena, M., Earnshaw, W.C. e Sunkel, C.E. (2002) MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J Cell Biol*, **157**, 749-760.
- Maiato, H., Fairley, E.A., Rieder, C.L., Swedlow, J.R., Sunkel, C.E. e Earnshaw, W.C. (2003) Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell*, **113**, 891-904.
- Maller, J., Poccia, D., Nishioka, D., Kidd, P., Gerhart, J. e Hartman, H. (1976) Spindle formation and cleavage in *Xenopus* eggs injected with centriole-containing fractions from sperm. *Exp Cell Res*, **99**, 285-294.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. e Milligan, R.A. (1991) Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol*, **114**, 977-991.
- Maney, T., Ginkel, L.M., Hunter, A.W. e Wordeman, L. (2000) The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *Int Rev Cytol*, **194**, 67-131.
- Maney, T., Wagenbach, M. e Wordeman, L. (2001) Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem*, **276**, 34753-34758.
- Martin, M., Iyadurai, S.J., Gassman, A., Gindhart, J.G., Jr., Hays, T.S. e Saxton, W.M. (1999) Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell*, **10**, 3717-3728.
- Martin, O.C., Gunawardane, R.N., Iwamatsu, A. e Zheng, Y. (1998) Xgrip109: a gamma tubulin-associated protein with an essential role in gamma tubulin ring complex (gammaTuRC) assembly and centrosome function. *J Cell Biol*, **141**, 675-687.
- Marx, J. (2001) Cell biology. Do centrosome abnormalities lead to cancer? *Science*, **292**, 426-429.
- Matsumoto, Y., Hayashi, K. e Nishida, E. (1999) Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, **9**, 429-432.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Matsuura, K., Lefebvre, P.A., Kamiya, R. e Hirono, M. (2004) Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first ninefold symmetrical structure appearing during assembly. *J Cell Biol*, **165**, 663-671.
- Matthews, L.R., Carter, P., Thierry-Mieg, D. e Kempfues, K. (1998) ZYG-9, a *Caenorhabditis elegans* protein required for microtubule organization and function, is a component of meiotic and mitotic spindle poles. *J Cell Biol*, **141**, 1159-1168.
- Matuliene, J. e Kuriyama, R. (2002) Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 1832-1845.
- Matus, A. (1994) Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci*, **17**, 19-22.
- Mazia, D. (1987) The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int Rev Cytol*, **100**, 49-92.
- Mazzarello, P. (1999) A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol*, **1**, E13-15.
- McDonald, H.B. e Goldstein, L.S. (1990) Identification and characterization of a gene encoding a kinesin-like protein in *Drosophila*. *Cell*, **61**, 991-1000.
- McDonald, H.B., Stewart, R.J. e Goldstein, L.S. (1990) The kinesin-like *ncd* protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. *Cell*, **63**, 1159-1165.
- McEwen, B.F., Hsieh, C.E., Mattheyses, A.L. e Rieder, C.L. (1998) A new look at kinetochore structure in vertebrate somatic cells using high-pressure freezing and freeze substitution. *Chromosoma*, **107**, 366-375.
- McGill, M. e Brinkley, B.R. (1975) Human chromosomes and centrioles as nucleating sites for the in vitro assembly of microtubules from bovine brain tubulin. *J Cell Biol*, **67**, 189-199.
- McIntosh, J.R. e Landis, S.C. (1971) The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells. *J Cell Biol*, **49**, 468-497.
- McIntosh, J.R. e Euteneuer, U. (1984) Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J Cell Biol*, **98**, 525-533.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L. e West, R.R. (2002) Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 193-219.
- McNally, F. (2000) Capturing a ring of samurai. *Nat Cell Biol*, **2**, E4-7.
- McNally, F.J. e Vale, R.D. (1993) Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, **75**, 419-429.
- McNally, K.P., Buster, D. e McNally, F.J. (2002) Katanin-mediated microtubule severing can be regulated by multiple mechanisms. *Cell Motil Cytoskeleton*, **53**, 337-349.
- Megraw, T.L., Kao, L.R. e Kaufman, T.C. (2001) Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr Biol*, **11**, 116-120.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J. e Nigg, E.A. (1999) Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol*, **1**, 88-93.
- Meraldi, P., Honda, R. e Nigg, E.A. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53(-/-) cells. *Embo J*, **21**, 483-492.
- Merdes, A. e Cleveland, D.W. (1997) Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol*, **138**, 953-956.
- Millband, D.N., Campbell, L. e Hardwick, K.G. (2002) The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol*, **12**, 205-209.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. e Tsukita, S. (2000) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol*, **148**, 505-518.

- Minestrini, G., Harley, A.S. e Glover, D.M. (2003) Localization of Pavarotti-KLP in living *Drosophila* embryos suggests roles in reorganizing the cortical cytoskeleton during the mitotic cycle. *Mol Biol Cell*, **14**, 4028-4038.
- Mitchison, T. e Kirschner, M. (1984b) Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, **312**, 232-237.
- Mitchison, T. e Kirschner, M. (1984a) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237-242.
- Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E. e Kirschner, M. (1986) Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell*, **45**, 515-527.
- Mitchison, T. (1989) Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol*, **109**, 637-652.
- Mitchison, T.J. (1993) Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science*, **261**, 1044-1047.
- Miyamoto, D.T., Perlman, Z.E., Burbank, K.S., Groen, A.C. e Mitchison, T.J. (2004) The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J Cell Biol*, **167**, 813-818.
- Mogensen, M.M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V. e Bornens, M. (2000) Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J Cell Sci*, **113**, 3013-3023.
- Moore, M.S. e Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, **365**, 661-663.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**, 131-134.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B.M. e Agard, D.A. (1995) Microtubule nucleation by gamma tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature*, **378**, 638-640.
- Moritz, M., Zheng, Y., Alberts, B.M. e Oegema, K. (1998) Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J Cell Biol*, **142**, 775-786.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guenebaut, V., Heuser, J. e Agard, D.A. (2000) Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*, **2**, 365-370.
- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. e Bornens, M. (1996) Gamma tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *Journal of Cell Science*, **109**, 875-887.
- Moutinho-Santos, T., Sampaio, P., Amorim, I., Costa, M. e Sunkel, C.E. (1999) In vivo localisation of the mitotic POLO kinase shows a highly dynamic association with the mitotic apparatus during early embryogenesis in *Drosophila*. *Biol Cell*, **91**, 585-596.
- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. e Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 202-210.
- Munemitsu, S., Souza, B., Muller, O., Albert, I., Rubinfeld, B. e Polakis, P. (1994) The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res*, **54**, 3676-3681.
- Murphy, S.M., Urbani, L. e Stearns, T. (1998) The mammalian gamma-tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J Cell Biol*, **141**, 663-674.
- Murphy, S.M., Preble, A.M., Patel, U.K., O'Connell, K.L., Dias, D.P., Moritz, M., Agard, D., Stults, J.T. e Stearns, T. (2001) GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell*, **12**, 3340-3352.
- Murray, A.W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, **116**, 221-234.
- Musacchio, A. e Hardwick, K.G. (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 731-741.
- Nabeshima, K., Kurooka, H., Takeuchi, M., Kinoshita, K., Nakaseko, Y. e Yanagida, M. (1995) p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev*, **9**, 1572-1585.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Nakamura, M., Zhou, X.Z. e Lu, K.P. (2001) Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol*, **11**, 1062-1067.
- Nasmyth, K. (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*, **297**, 559-565.
- Neuwald, A.F. e Hirano, T. (2000) HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res*, **10**, 1445-1452.
- Nicklas, R.B. (1989) The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J Cell Biol*, **109**, 2245-2255.
- Nigg, E.A. (1998) Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 776-783.
- Nigg, E.A. (2002) Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*, **2**, 815-825.
- Nurse, P. (2000a) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, **100**, 71-78.
- Nurse, P. (2000b) The incredible life and times of biological cells. *Science*, **289**, 1711-1716.
- O'Connell, C.B. e Wang, Y.L. (2000) Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol Biol Cell*, **11**, 1765-1774.
- O'Connell, K.F. (2000) The centrosome of the early *C. elegans* embryo: inheritance, assembly, replication, and developmental roles. *Curr Top Dev Biol*, **49**, 365-384.
- O'Connell, K.F., Caron, C., Kopish, K.R., Hurd, D.D., Kempfues, K.J., Li, Y. e White, J.G. (2001) The *C. elegans* zyg-1 gene encodes a regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell*, **105**, 547-558.
- O'Connell, M.J., Meluh, P.B., Rose, M.D. e Morris, N.R. (1993) Suppression of the bimC4 mitotic spindle defect by deletion of klpA, a gene encoding a KAR3-related kinesin-like protein in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, **120**, 153-162.
- O'Connell, M.J., Krien, M.J. e Hunter, T. (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol*, **13**, 221-228.
- O'Hare, K. e Rubin, G.M. (1983) Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, **34**, 25-35.
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y. e Jung, M.K. (1990) Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, **61**, 1289-1301.
- Oegema, K. e Mitchison, T.J. (1997) Rappaport rules: cleavage furrow induction in animal cells. *Proc Natl Acad Sci*, **94**, 4817-4820.
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O.C., Milligan, R.A., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J. e Zheng, Y. (1999) Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol*, **144**, 721-733.
- Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y. e Hirokawa, N. (2004) A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell*, **116**, 591-602.
- Ohi, R., Sapra, T., Howard, J. e Mitchison, T.J. (2004) Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **15**, 2895-2906.
- Olson, K.R., McIntosh, J.R. e Olmsted, J.B. (1995) Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J Cell Biol*, **130**, 639-650.
- Omel'yanchuk, L.V., Volkova, E.I. e Fedorova, S.A. (1997) Characterization of insertion mutations leading to mitosis abnormalities in *Drosophila melanogaster* by means of the reporter gene-containing transposon. *Russian Journal of Genetics*, **33**, 1279-1285.

- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J.C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T.J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K. e Kishimoto, T. (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*, **128**, 849-862.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F. e Williams, R.L. (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*, **103**, 931-943.
- Paoletti, A., Bordes, N., Haddad, R., Schwartz, C.L., Chang, F. e Bornens, M. (2003) Fission yeast cdc31p is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol Biol Cell*, **14**, 2793-2808.
- Pasqualone, D. e Huffaker, T. (1994) STU1, a suppressor of a beta-tubulin mutation, encodes a novel and essential component of the yeast mitotic spindle. *J Cell Biol*, **127**, 1973-1984.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. e Kreis, T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, **96**, 517-527.
- Peters, J.M. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Phelps, C.B. e Brand, A.H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, **14**, 367-379.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pidoux, A.L., LeDizet, M. e Cande, W.Z. (1996) Fission yeast pk1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. *Mol Biol Cell*, **7**, 1639-1655.
- Pidoux, A.L. e Allshire, R.C. (2000) Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 308-319.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L. e Bornens, M. (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol*, **149**, 317-330.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. e Bornens, M. (2001) Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science*, **291**, 1550-1553.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. e Kreis, T.E. (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*, **70**, 887-900.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. e Doxsey, S.J. (1998) Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*, **58**, 3974-3985.
- Pines, J. (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol*, **1**, E73-79.
- Piperno, G. e Fuller, M.T. (1985) Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol*, **101**, 2085-2094.
- Pless, D.D. e Lennarz, W.J. (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 134-138.
- Poon, R.Y. (2002) Cell cycle control. In Bertino, J.R. (ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 393-404.
- Popov, A., Severin, F. e Karsenti, E. (2002) XMAP215 Is Required for the Microtubule-Nucleating Activity of Centrosomes. *Curr Biol*, **12**, 1326.
- Pryer, N.K., Walker, R.A., Skeen, V.P., Bourns, B.D., Soboeiro, M.F. e Salmon, E.D. (1992) Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J Cell Sci*, **103**, 965-976.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. e Heller, H.C. (1998) *Life, the science of biology*. Sinauer Associates; Distributed by W.H. Freeman and Co., Salt Lake City, USA.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Qi, H., Rath, U., Wang, D., Xu, Y.Z., Ding, Y., Zhang, W., Blacketer, M.J., Paddy, M.R., Girton, J., Johansen, J., *et al.* (2004) Megator, an essential coiled-coil protein that localizes to the putative spindle matrix during mitosis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*, **15**, 4854-4865.
- Raff, E.C., Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D. e Turner, F. (1997) Microtubule architecture specified by a  $\beta$ -tubulin isoform. *Science*, **275**, 70-73.
- Raff, J.W. (2002) Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends Cell Biol*, **12**, 222-225.
- Rappaport, R. (1961) Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. *J Exp Zool*, **148**, 81-89.
- Rappaport, R. (1986) Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol*, **105**, 245-281.
- Rattner, J.B. e Phillips, S.G. (1973) Independence of centriole formation and DNA synthesis. *J Cell Biol*, **57**, 359-372.
- Rehberg, M. e Graf, R. (2002) *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol Biol Cell*, **13**, 2301-2310.
- Rickard, J.E. e Kreis, T.E. (1990) Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J Cell Biol*, **110**, 1623-1633.
- Rickard, J.E. e Kreis, T.E. (1991) Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem*, **266**, 17597-17605.
- Rickard, J.E. e Kreis, T.E. (1996) CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol*, **6**, 178-183.
- Rieder, C. e Salmon, E. (1998) The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol*, **8**, 310-318.
- Rieder, C.L. e Borisy, G.G. (1981) The attachment of kinetochores to the pro-metaphase spindle in PtK1 cells. Recovery from low temperature treatment. *Chromosoma*, **82**, 693-716.
- Rieder, C.L., 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.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A. e Sluder, G. (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol*, **130**, 941-948.
- Rieder, C.L., Khodjakov, A., Paliulis, L.V., Fortier, T.M., Cole, R.W. e Sluder, G. (1997) Mitosis in vertebrate somatic cells with two spindles: implications for the metaphase/anaphase transition checkpoint and cleavage. *Proc Natl Acad Sci*, **94**, 5107-5112.
- Rieder, C.L. e Cole, R. (2000) Microtubule disassembly delays the G2-M transition in vertebrates. *Curr Biol*, **10**, 1067-1070.
- Robbins, E., Jentzsch, G. e Micali, A. (1968) The centriole cycle in synchronized HeLa cells. *J Cell Biol*, **36**, 329-339.
- Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y. e Jan, Y.N. (2001) Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage. *Nat Cell Biol*, **3**, 58-67.
- Rogers, G.C., Rogers, S.L., Schwimmer, T.A., Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., Vale, R.D., Scholey, J.M. e Sharp, D.J. (2004) Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature*, **427**, 364-370.
- Romano, A., Guse, A., Krascenicova, I., Schnabel, H., Schnabel, R. e Glotzer, M. (2003) CSC-1: a subunit of the Aurora B kinase complex that binds to the survivin-like protein BIR-1 and the incenp-like protein ICP-1. *J Cell Biol*, **161**, 229-236.

- Rorth, P. (1996) A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12418-12422.
- Rorth, P. (1998) Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev*, **78**, 113-118.
- Rubin, G.M. e Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348-353.
- Rusan, N.M., Fagerstrom, C.J., Yvon, A.M. e Wadsworth, P. (2001) Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell*, **12**, 971-980.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R. e Springett, M. (2002) Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, **12**, 1287-1292.
- Salmon, E.D. e Wolniak, S.M. (1990) Role of microtubules in stimulating cytokinesis in animal cells. *Ann N Y Acad Sci*, **582**, 88-98.
- Sammak, P.J. e Borisy, G.G. (1988) Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, **332**, 724-726.
- Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sapir, T., Elbaum, M. e Reiner, O. (1997) Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *Embo J*, **16**, 6977-6984.
- Saunders, W., Lengyel, V. e Hoyt, M.A. (1997) Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Mol Biol Cell*, **8**, 1025-1033.
- Saunders, W.S. e Hoyt, M.A. (1992) Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell*, **70**, 451-458.
- Savage, C., Hamelin, M., Culotti, J.G., Coulson, A., Albertson, D.G. e Chalfie, M. (1989) *mec-7* is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, **3**, 870-881.
- Savoian, M.S., Goldberg, M.L. e Rieder, C.L. (2000) The rate of poleward chromosome motion is attenuated in *Drosophila* *zw10* and rod mutants. *Nat Cell Biol*, **2**, 948-952.
- Sawin, K.E. e Mitchison, T.J. (1991b) Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *J Cell Biol*, **112**, 925-940.
- Sawin, K.E. e Mitchison, T.J. (1991a) Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro. *J Cell Biol*, **112**, 941-954.
- Sawin, K.E., LeGuellec, K., Philippe, M. e Mitchison, T.J. (1992) Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature*, **359**, 540-543.
- Sawin, K.E. e Mitchison, T.J. (1995) Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4289-4293.
- Saxton, W.M., Stemple, D.L., Leslie, R.J., Salmon, E.D., Zavortink, M. e McIntosh, J.R. (1984) Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J Cell Biol*, **99**, 2175-2186.
- Schiebel, E. (2000) gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 113-118.
- Schnackenberg, B.J., Khodjakov, A., Rieder, C.L. e Palazzo, R.E. (1998) The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9295-9300.
- Scholey, J.M., Rogers, G.C. e Sharp, D.J. (2001) Mitosis, microtubules, and the matrix. *J Cell Biol*, **154**, 261-266.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I. e Mogilner, A. (2003) Cell division. *Nature*, **422**, 746-752.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.C. e Kirschner, M. (1987) Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol*, **105**, 2167-2177.
- Schuyler, S.C. e Pellman, D. (2001) Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J Cell Sci*, **114**, 247-255.
- Schwartz, K., Richards, K. e Botstein, D. (1997) BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol Biol Cell*, **8**, 2677-2691.
- Scolnick, D.M. e Halazonetis, T.D. (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, **406**, 430-435.
- Segal, M. e Bloom, K. (2001) Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol*, **11**, 160-166.
- Severson, A.F. e Bowerman, B. (2002) Cytokinesis: closing in on the central spindle. *Dev Cell*, **2**, 4-6.
- Shackney, S.E., Smith, C.A., Miller, B.W., Burholt, D.R., Murtha, K., Giles, H.R., Ketterer, D.M. e Pollice, A.A. (1989) Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res*, **49**, 3344-3354.
- Shah, J.V. e Cleveland, D.W. (2000) Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell*, **103**, 997-1000.
- Sharp, D.J., McDonald, K.L., Brown, H.M., Matthies, H.J., Walczak, C., Vale, R.D., Mitchison, T.J. e Scholey, J.M. (1999) The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *J Cell Biol*, **144**, 125-138.
- Sharp, D.J., Yu, K.R., Sisson, J.C., Sullivan, W. e Scholey, J.M. (1999) Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol*, **1**, 51-54.
- Sharp, D.J., Brown, H.M., Kwon, M., Rogers, G.C., Holland, G. e Scholey, J.M. (2000) Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell*, **11**, 241-253.
- Sharp, D.J., Rogers, G.C. e Scholey, J.M. (2000) Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol*, **2**, 922-930.
- Sharp, D.J. (2002) Cell division: MAST sails through mitosis. *Curr Biol*, **12**, R585-587.
- Shelden, E. e Wadsworth, P. (1993) Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J Cell Biol*, **120**, 935-945.
- Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, **79**, 551-555.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J. e Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shiina, N. e Tsukita, S. (1999) Mutations at phosphorylation sites of *Xenopus* microtubule-associated protein 4 affect its microtubule-binding ability and chromosome movement during mitosis. *Mol Biol Cell*, **10**, 597-608.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. e Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **59**, 223-239.
- Shirasu-Hiza, M., Coughlin, P. e Mitchison, T. (2003) Identification of XMAP215 as a microtubule-destabilizing factor in *Xenopus* egg extract by biochemical purification. *J Cell Biol*, **161**, 349-358.
- Shonn, M.A., McCarroll, R. e Murray, A.W. (2000) Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science*, **289**, 300-303.
- Simon, J.R. e Salmon, E.D. (1990) The structure of microtubule ends during the elongation and shortening phases of dynamic instability examined by negative-stain electron microscopy. *J Cell Sci*, **96**, 571-582.
- Simon, J.R., Parsons, S.F. e Salmon, E.D. (1992) Buffer conditions and non-tubulin factors critically affect the microtubule dynamic instability of sea urchin egg tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton*, **21**, 1-14.



- Skibbens, R.V., Skeen, V.P. e Salmon, E.D. (1993) Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J Cell Biol*, **122**, 859-875.
- Sluder, G., Thompson, E.A., Miller, F.J., Hayes, J. e Rieder, C.L. (1997) The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J Cell Sci*, **110**, 421-429.
- Snyder, J.A. e McIntosh, J.R. (1975) Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells. *J Cell Biol*, **67**, 744-760.
- Southern, S.A., Evans, M.F. e Herrington, C.S. (1997) Basal cell tetrasomy in low-grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, **57**, 4210-4213.
- Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M. e Schiebel, E. (1993) The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J Cell Biol*, **123**, 405-416.
- Spiegelman, B.M., Penningroth, S.M. e Kirschner, M.W. (1977) Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells. *Cell*, **12**, 587-600.
- Spradling, A.C. e Rubin, G.M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, **218**, 341-347.
- Srayko, M., Quintin, S., Schwager, A. e Hyman, A.A. (2003) *Caenorhabditis elegans* TAC-1 and ZYG-9 form a complex that is essential for long astral and spindle microtubules. *Curr Biol*, **13**, 1506-1511.
- Stearns, T. e Kirschner, M. (1994) In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma tubulin. *Cell*, **76**, 623-637.
- Stearns, T. e Winey, M. (1997) The cell center at 100. *Cell*, **91**, 303-309.
- Stern, B.M. e Murray, A.W. (2001) Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol*, **11**, 1462-1467.
- Stern, B.M. (2002) Mitosis: aurora gives chromosomes a healthy stretch. *Curr Biol*, **12**, R316-318.
- Still, I.H., Vince, P. e Cowell, J.K. (1999) The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines. *Genomics*, **58**, 165-170.
- Sudakin, V., Chan, G.K. e Yen, T.J. (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, **154**, 925-936.
- Tai, C.Y., Dujardin, D.L., Faulkner, N.E. e Vallee, R.B. (2002) Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol*, **156**, 959-968.
- Takahashi, T., Futamura, M., Yoshimi, N., Sano, J., Katada, M., Takagi, Y., Kimura, M., Yoshioka, T., Okano, Y. e Saji, S. (2000) Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res*, **91**, 1007-1014.
- Takeda, D.Y., Wohlschlegel, J.A. e Dutta, A. (2001) A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, **276**, 1993-1997.
- Tamkun, J.W. (1995) The role of brahma and related proteins in transcription and development. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 473-477.
- Tanaka, T.U. (2002) Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 365-371.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. e Yu, H. (2001) Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*, **1**, 227-237.
- Tavosanis, G., Llamazares, S., Goulielmos, G. e Gonzalez, C. (1997) Essential role for gamma-tubulin in the acentriolar female meiotic spindle of *Drosophila*. *Embo J*, **16**, 1809-1819.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Theurkauf, W.E. (2001) TACCing down the spindle poles. *Nat Cell Biol*, **3**, E159-161.
- Thyberg, J. e Moskalewski, S. (1998) Partitioning of cytoplasmic organelles during mitosis with special reference to the Golgi complex. *Microsc Res Tech*, **40**, 354-368.
- Tirnauer, J.S., Grego, S., Salmon, E.D. e Mitchison, T.J. (2002) EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell*, **13**, 3614-3626.
- Tokumitsu, Y., Mori, M., Tanaka, S., Akazawa, K., Nakano, S. e Niho, Y. (1999) Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol*, **15**, 687-692.
- Toumebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A.J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T.U., Walczak, C.E., Karsenti, E. e Hyman, A.A. (2000) Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol*, **2**, 13-19.
- Uetake, Y. e Sluder, G. (2004) Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol*, **165**, 609-615.
- Urbani, L. e Stearns, T. (1999) The centrosome. *Curr Biol*, **9**, R315-317.
- Usui, T., Maekawa, H., Pereira, G. e Schiebel, E. (2003) The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *Embo J*, **22**, 4779-4793.
- Vale, R.D. (1991) Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in *Xenopus* egg extracts. *Cell*, **64**, 827-839.
- Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E. e Schroer, T.A. (1999) Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell*, **10**, 4107-4120.
- van Breugel, M., Drechsel, D. e Hyman, A. (2003) Stu2p, the budding yeast member of the conserved Dis1/XMAP215 family of microtubule-associated proteins is a plus end-binding microtubule destabilizer. *J Cell Biol*, **161**, 359-369.
- Van Doren, M., Williamson, A.L. e Lehmann, R. (1998) Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr Biol*, **8**, 243-246.
- Vandré, D.D., Davis, F.M., Rao, P.N. e Borisy, G.G. (1986) Distribution of cytoskeletal proteins sharing a conserved phosphorylated epitope. *Eur J Cell Biol*, **41**, 72-81.
- Vandré, R.D., Davis, F.M., Rao, P.N. e Borisy, G.G. (1984) Phosphoproteins are components of the mitotic microtubule organizing centers. *Proc Natl Acad Sci*, **81**, 4439-4443.
- Vasquez, R.J., Gard, D.L. e Cassimeris, L. (1994) XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol*, **127**, 985-993.
- Vaughan, K.T., Tynan, S.H., Faulkner, N.E., Echeverri, C.J. e Vallee, R.B. (1999) Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci*, **112**, 1437-1447.
- Verbrugghe, K.J. e White, J.G. (2004) SPD-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *C. elegans* embryos. *Curr Biol*, **14**, 1755-1760.
- Verde, F., Labbé, J., Dorée, M. e Karsenti, E. (1990) Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, **343**, 233-238.
- Verde, F., Dogterom, M., Stelzer, E., Karsenti, E. e Leibler, S. (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, **118**, 1097-1108.
- Vodermaier, H.C. (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol*, **14**, R787-796.
- Vorobjev, I. e Chentsov, Y. (1982) Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J Cell Biol*, **93**, 938-949.
- Vorobjev, I.A. e Nadezhkina, E.S. (1987) The centrosome and its role in the organization of microtubules. *Int Rev Cytol*, **106**, 227-293.

- Walczak, C., Mitchison, T.J. e Desai, A. (1996) XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell*, **84**, 37-47.
- Walczak, C.E., Vernos, I., Mitchison, T.J., Karsenti, E. e Heald, R. (1998) A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol*, **8**, 903-913.
- Walczak, C.E. (2001) Ran hits the ground running. *Nat Cell Biol*, **3**, E69-70.
- Walker, D.L., Wang, D., Jin, Y., Rath, U., Wang, Y., Johansen, J. e Johansen, K.M. (2000) Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. *J Cell Biol*, **151**, 1401-1412.
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P. e Salmon, E.D. (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*, **107**, 1437-1448.
- Walker, R.A., Salmon, E.D. e Endow, S.A. (1990) The *Drosophila* claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature*, **347**, 780-782.
- Wang, P.J. e Huffaker, T.C. (1997) Stu2p: A microtubule-binding protein that is an essential component of the yeast spindle pole body. *J Cell Biol*, **139**, 1271-1280.
- Wang, Q., Hirohashi, Y., Furuuchi, K., Zhao, H., Liu, Q., Zhang, H., Murali, R., Berezov, A., Du, X., Li, B., et al. (2004) The centrosome in normal and transformed cells. *DNA Cell Biol*, **23**, 475-489.
- Wassmann, K. e Benezra, R. (2001) Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 83-90.
- Wells, W.A. (2001) Searching for a spindle matrix. *J Cell Biol*, **154**, 1102-1104.
- Wheatley, S.P. e Wang, Y. (1996) Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. *J Cell Biol*, **135**, 981-989.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C. e Wasteneys, G.O. (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*, **411**, 610-613.
- Wiese, C. e Zheng, Y. (2000) A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol*, **2**, 358-364.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M.S., Adam, S.A., Merdes, A. e Zheng, Y. (2001) Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, **291**, 653-656.
- Wilde, A., Lizarraga, S.B., Zhang, L., Wiese, C., Gliksman, N.R., Walczak, C.E. e Zheng, Y. (2001) Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat Cell Biol*, **3**, 221-227.
- Wilson, V.G. e Rangasamy, D. (2001) Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res*, **271**, 57-65.
- Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E. e Vernos, I. (1998) Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol*, **143**, 673-685.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. e Vernos, I. (2000) TPX2, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol*, **149**, 1405-1418.
- Wittmann, T., Hyman, A. e Desai, A. (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol*, **3**, E28-34.
- Wolf, G., Elez, R., Doermer, A., Holtrich, U., Ackermann, H., Stutte, H.J., Altmannsberger, H.M., Rubsamen-Waigmann, H. e Strebhardt, K. (1997) Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **14**, 543-549.

## V. Referências Bibliográficas

---

- Wordeman, L. e Mitchison, T.J. (1995) Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol*, **128**, 95-104.
- Yasuhara, H., Muraoka, M., Shogaki, H., Mori, H. e Sonobe, S. (2002) TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol*, **43**, 595-603.
- Yin, H., You, L., Pasqualone, D., Kopski, K.M. e Huffaker, T.C. (2002) Stu1p is physically associated with beta-Tubulin and is required for structural integrity of the mitotic spindle. *Mol Biol Cell*, **13**, 1881-1892.
- Yu, H. (2002) Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 706-714.
- Yuan, J., Horlin, A., Hock, B., Stutte, H.J., Rubsamen-Waigmann, H. e Strebhardt, K. (1997) Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am J Pathol*, **150**, 1165-1172.
- Zhai, Y., Kronebusch, P.J. e Borisy, G.G. (1995) Kinetochores microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition. *J Cell Biol*, **131**, 721-734.
- Zhai, Y., Kronebusch, P.J., Simon, P.M. e Borisy, G.G. (1996) Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol*, **135**, 201-214.
- Zhang, D. e Nicklas, B. (1995) The impact of chromosomes and centrosomes on spindle assembly as observed in living cells. *Journal of Cell Biology*, **129**, 1287-1300.
- Zhang, L., Keating, T.J., Wilde, A., Borisy, G.G. e Zheng, Y. (2000) The role of Xgrip210 in gamma-tubulin ring complex assembly and centrosome recruitment. *J Cell Biol*, **151**, 1525-1536.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B.M. e Mitchison, T. (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma tubulin-containing ring complex. *Nature*, **378**, 578-583.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A. e Nathke, I.S. (2001) Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol*, **11**, 44-49.

## **VI. Abreviaturas**

- APC: *adenomatous polyposis coli*
- APC/C: *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*
- APS: persulfato de amónio
- ATP: trifosfato de adenosina
- BDGP: *Berkeley Drosophila Genome Project*
- BSA: *bovine serum albumin*, albumina sérica de bovino
- Bub: *budding uninhibited in benzimidazole*, gemulação inibida em benzimidazol
- C. elegans*: *Caenorabditis elegans*
- Cdc: *cell division cycle*, ciclo de divisão celular
- CDK: *cyclin-dependent kinase*, cinase dependente de ciclinas
- cDNA: DNA complementar
- CENP: *centromeric protein*, proteína centromérica
- CLIP: *cytoplasmic linker protein*
- CNN: Centrossomina
- C-terminal: COOH-terminal ou terminal carboxílico
- DAPI: *4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride*
- ddH<sub>2</sub>O: água destilada, desionizada e autoclavada
- D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*
- dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
- dCTP: 2'-desoxicitosina-5'-trifosfato
- ddNTP: 2',3'-didesoxinucleosídeo-5'-trifosfato
- DNA: *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- dNTP: 2'-desoxinucleosídeo-5'-trifosfato
- dUTP: 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato
- E. coli*: *Escherichia coli*
- EB1: *end-binding protein 1*
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético
- EGFP: *enhanced green fluorescent protein*
- FBS: *fetal bovine serum*, soro bovino fetal
- FITC: *fluorescein isothiocyanate*

## VI. Abreviaturas

---

GDP: difosfato de guanosina

GFP: *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde

GTP: trifosfato de guanosina

*H. sapiens*: *Homo sapiens*

HRP: *horse-radish Peroxidase*

INCENP: *inner centromere protein*

IPTG: isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

kb: kilobases

kDa: kiloDaltons

KIF3: membro 3 da superfamília de cinesinas

KLP: *kinesin-like protein*

LB: meio de cultura de Luria-Bertani

Mad: *mitotic arrest deficient*

MAP: *microtubule-associated protein*, proteína associada aos microtúbulos

*mast*: gene ou cDNA *multiple asters*

Mast: proteína codificada pelo gene *multiple asters*

mRNA: RNA mensageiro

MTOC: centro organizador de microtúbulos

N-terminal: NH<sub>2</sub>-terminal ou amino-terminal

ON: *overnight*, durante a noite

ORF: *open reading frame*

PAGE: electroforese em gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

PBS: *phosphate buffer saline*

PCM: material pericentriolar

PCR: *polymerase chain reaction*, reacção em cadeia da Polimerase

pKS: fagemídeo pBluescript II KS (+)

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride*

pSK: fagemídeo pBluescript II SK (+)

q.b.p.: quanto baste para

RNA: *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

RNAi: *double-stranded RNA-mediated interference*

RNase: ribonuclease

rpm: rotações por minuto

*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

*S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*

SCF: *Skp1/Cullin/F-box protein*

SDS: dodecilssulfato de sódio

SPB: *spindle pole body*

SSC: *saline citrate buffer*

TA: temperatura ambiente

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

U: unidade (enzimática)

UAS: *upstream activating sequence*

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo

+TIP: proteína que se liga à extremidade (+) dos microtúbulos