

PAULA MARIA SAMPAIO FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DA γ -TUBULINA23C
EM *Drosophila melanogaster***

PORTO - 1997

PAULA MARIA SAMPAIO FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DA γ -TUBULINA23C
EM *Drosophila melanogaster***

PORTO - 1997

**Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas
apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
da Universidade do Porto**

Orientador: Professor Doutor Claudio E. Sunkel

(1997)

Declaração

De acordo com o disposto no nº 2 do Decreto-Lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados das publicações abaixo indicadas. No cumprimento do disposto naquele 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 artigos e do manuscrito submetido para publicação, sob o nome de Paula Sampaio.

Sunkel, C.E., Gomes, R., **Sampaio, P.**, Perdigão, J., & González, C. (1995). γ -Tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblasts. *EMBO J.* **14**, 28-36.

Sunkel, C.E., Gomes, R., **Sampaio, P.**, Perdigão, J., & González, C. (1996). Mutations in the γ -Tubulin23C gene affects mitosis and spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Em: A. Abbondandolo, B.K. Vig, R. Roi (eds), *Proceed. on Chromosome Segregation and Aneuploidy*. Instituto Nazionale per la Ricerca Sul Cancro, Genova, Italy, pp317-327.

Sampaio, P., Sunkel, C.E. & Gonzalez, C. (1997). γ TUB23C is essential for the organization of the meiotic spindle in *Drosophila melanogaster* males. Manuscripto submetido para publicação.

A meu Avô Alexandre

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Claudio Enrique Sunkel Cariola, a minha mais profunda gratidão por tudo quanto me transmitiu ao longo de todos estes anos.

Ao Professor Doutor Rui Gomes a quem tive o gosto de suceder no projecto de investigação da γ -tubulina, pela sua paciência em ensinar-me a vida sexual das moscas e por toda a amizade e boa disposição contagiante.

Ao Doutor Cayetano González pela sua colaboração na execução deste projecto.

Ao Professor Doutor Kevin O'Hare pela disponibilidade demonstrada ao receber-me no seu laboratório e ensinar-me as técnicas de RNA.

Ao Professor Doutor Roberto Salema pela sua amabilidade e facilidades concedidas na utilização do microscópio electrónico.

Ao Professor Doutor José Pissara, Dra. Susana Pereira, Sra. D^a Andreia Costa, e aos restantes elementos do Departamento de Fisiologia Vegetal, bem como às Sras. D^a Irene Barros e D^a Paula Macedo pela auxílio dispensado na realização do trabalho de microscopia electrónica.

À Professora Doutora Maria João Saraiva pela disponibilização de meios técnicos para a impressão desta tese.

À Elsa Bronze pela sua incansável ajuda, e pela sua grande amizade.

À Alexandra Moreira, João Almeida Santos, Paula Almeida Coelho, Maria Helena Carvalho, Álvaro Tavares e à Carmo Avides Moreira por tudo quanto me ensinaram e pela paciência e amizade demonstradas ao longo de todos estes anos.

À Tatiana Moutinho dos Santos e ao Vasco Liberal, meus queridos discípulos, pela paciência que tiveram em ouvir os meus ensinamentos, por vezes transmitidos de modo algo sinuoso, e pelo modo brilhante com que os souberam pôr em prática.

Ao Hassan Bousbaa e à Siegrun Herрман pelos sábios conselhos, preciosa ajuda e carinho de ambos.

À Elsa Logarinho, à Inês Lopes Cardoso, Joana Perdigão, Joana Machado, Isabel Amorim, Luis Correia, Catarina Lemos, Orlando Morais, Isabel Salazar, Cristina Machado, e também Jorge Pedrosa, Manuela Flórido e Regina Silva, pelo bom companheirismo e amizade.

À Sras. D^a Adelaide Santos, D^a Maria João Faicão, D^a Teresa Lopes pela prestimosa colaboração na manutenção do laboratório.

À Cristiana Mollinari, Gaia Tavossanis, George Gougliemous, Isabel Pot e á Salud Llamazares pelo apoio na minha estada no EMBL-Heidelberg e pela amizade demonstrada.

Ao Mark Tudor pelo encorajamento que me deu durante a escrita desta tese.

À minha Mãe, que muito me apoiou ao longo de todos estes anos

Desejo igualmente expressar os meus agradecimentos:

Ao Instituto de Biologia Molecular e Celular, na pessoa do seu director Professor Doutor Alexandre Quintanilha, por me ter proporcionado todos os meios para a execução deste projecto.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica pelo financiamento dado através dos programas CIÊNCIA e PRAXIS XXI.

Abreviaturas

- APC - Complexo promotor da anafase
ATP - Trifosfato de Adenosina
BSA - Albumina bovina
cdc - Mutantes do ciclo celular ("*cell division cycle mutants*")
CDK - Cinase dependente da ciclina
cDNA - DNA complementar
dATP - Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP - Trifosfato de desoxicitidina
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP - trifosfato de desoxirribonucleósido
EGF - Factor de crescimento ("*Elongation Grow Factor*")
GTP - Trifosfato de guanidina
 γ TuRC - Complexo do anel de γ -tubulina
IPTG - Isopropil- β -tiogalactopiranosido
kb - 1000 pares de bases
kDa - kilodalton
MAP - Proteínas não motoras associadas aos microtubulos
MPF - Factor de promotor da maturação ("*Maturation Promoting Factor*")
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MTOC - Centro de organização de microtubulos
NEB - Quebra do envelope nuclear
ORC - Complexo de reconhecimento da origem de replicação
pb - pares de bases
PCM - Material pericentriolar
PCR - Reacção de polimerização em cadeia
Pre-RC - Complexo de pré replicação replication Complex
RNA - Ácido ribonucleico
S.S.DNA - DNA de esperma de salmão
SDS - dodecil-sulfato de sódio
SDS - PAGE - electroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SPB - "*Spindle Pole Body*"

Resumo	1
Abstract	2
Résumé	3
Capítulo 1 - Divisão celular e γ-tubulina	4
1.1 - Ciclo Celular	4
1.1.1 - Breve introdução histórica	4
1.1.2 - Mecanismos de regulação do ciclo celular	6
1.1.2.1 - Transição G ₁ -S	7
1.1.2.2 - Transição G ₂ -M	9
1.1.2.3 - Transição M-G ₁	10
1.1.3 - "Checkpoints" ou controlo de qualidade do ciclo celular	11
1.1.4 - O ciclo celular meiótico	13
1.2 - Segregação cromossómica	14
1.2.1 - Cromossomas	15
1.2.2 - Microtúbulos	17
1.2.2.1 - A superfamília das tubulinas	17
1.2.2.2 - Estrutura dos microtúbulos	19
1.2.2.3 - Dinâmica dos microtúbulos	21
1.2.3 - Proteínas motoras associadas aos microtúbulos	22
1.2.4 - Centros de organização de microtúbulos	23
1.2.4.1 - Estruturas com capacidade de organização de microtúbulos	23
1.2.4.2 - Componentes bioquímicos dos MTOC	24
1.2.4.3 - Duplicação dos MTOCs	27
1.2.4.4 - Regulação	28
1.2.4.5 - Mecanismos de acção	29
1.2.5 - Mecanismos de formação do fuso	30
1.3 - γ -tubulina	30
1.3.1 - Identificação da γ -tubulina	30
1.3.2 - Conservação das sequências proteicas	32
1.3.3 - Localização celular	33
1.3.4 - Caracterização bioquímica	35
1.3.5 - Funções da γ -tubulina	36
1.4 - A <i>Drosophila melanogaster</i>	41
1.4.1 - Características como modelo de estudo da divisão celular	41
1.4.2 - O genoma da <i>Drosophila</i>	42
1.4.3 - Ciclo de vida da mosca	42
1.4.4 - A divisão celular em <i>Drosophila</i>	43
1.4.5 - Identificação de mutações que afectam a divisão celular em <i>Drosophila</i>	43
1.4.6 - Elementos P	44
1.4.6 - Espermatogénese	45
1.5 - Antecedentes históricos e objectivos do projecto	49
Capítulo 2 - Caracterização molecular dos genes das γ-tubulinas de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
2.1 - Análise molecular da região genómica que abrange o gene da γ -tubulina 23C	54
2.2 - Análise molecular do cDNA da γ -tubulina 23C	55

2.3 - Caracterização da expressão dos genes de γ -tubulina ao longo do desenvolvimento da <i>Drosophila melanogaster</i>	56
2.4 - Clonagem de um fragmento de DNA genómico de γ tub 37C	58
2.6 - Discussão	60
Capítulo 3 - Expressão de γ-tubulina 23C em <i>E. coli</i> e caracterização de anticorpos anti γ-tubulina	62
3.1 - Expressão de γ -tubulina 23C em <i>E. coli</i>	62
3.1.1 - Proteína de fusão MBP:gTUB23C Δ 19	63
3.1.1 - Proteína de fusão T7:g-GT23CD19:His6	65
3.2 - Análise e purificação de anticorpos anti-g-tubulina	66
3.2.1 - JH46	67
3.2.2 - RbCS1	68
3.2.3 - RbPS1	69
3.2.4 - RbVerol	70
3.3 - Discussão	71
Capítulo 4 - Caracterização genética da linha 141	73
4.1 - Caracterização da linha 141 com uma deficiência da região 23C1-2	74
4.1.1 - Caracterização da deficiência <i>Df(2L)JS17</i>	74
4.1.2 - Caracterização morfológica dos indivíduos hemizigóticos 141/ <i>Df(2L)JS17</i>	77
4.1.2.1 - Fenótipo mitótico de neuroblastos de larvas 141/ <i>Df(2L)JS17</i>	77
4.2 - Recombinação do cromossoma 141 com um cromossoma multi-marcado	80
4.2.1 - Programa de recombinação para "limpeza" do cromossoma 141	80
4.2.2 - Características das linhas recombinantes sem elemento P	82
4.2.3 - Características das linhas recombinantes com elemento P	83
4.3 - Discussão	84
Capítulo 5 - Transformação de linhas germinais com o gene <i>gtub23C</i>	86
5.1 - Construção de vectores de transposição contendo o gene da γ -tubulina 23C	86
5.1.1 - p[w+-gt-23C]	87
5.1.2 - p[w+-gt-23CRI]	87
5.1.3 - p[w+-gt-23C Δ]	87
5.2 - Transformação de linhas germinais	89
5.2.1 - Linhas transformadas com p[w+-gt-23C]	89
5.2.2 - Linhas transformadas com p[w+-gt-23CRI]	90
5.2.1 - Linhas transformadas com p[w+-gt-23C Δ]	90
5.3 - Testes de complementação	92
5.4 - Discussão	92
Capítulo 6 - Análise detalhada da mitose no mutante <i>gtub23C^{PI}</i>	94
6.1 Características da linha 141bs	94
6.2 Fenótipo mitótico	95
6.3 - Expressão de γ -tubulina em neuroblastos e discos imaginais	96
6.4 - Estrutura do aparelho mitótico	99
6.5 - Discussão	108

Capítulo 7 - O papel da γ-tubulina na espermatogénese em <i>Drosophila</i>	113
7.1 - Distribuição da γ -tubulina durante a espermatogénese	113
7.2 - A espermatogénese no alelo <i>gtub23C^{PI}</i>	114
7.2.1 - Expressão da γ -tubulina nos testículos do alelo mutante	115
7.2.2 - Caracterização da mitose gonial	118
7.2.3 - Caracterização do aparelho meiótico	119
7.2.4 - Espermiogénese	125
7.2.5 - Funcionalidade dos centríolos como corpos basais	128
7.3 - Discussão	132
Capítulo 8 - Discussão geral e perspectivas futuras	136
Capítulo 9 - Material e Métodos	139
9.1 - Material biológico	139
9.1.1 - Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	139
9.1.2 - Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	139
9.2 - Clonagem em vectores	139
9.2.1 - Vectores de:	140
9.2.1.1 - Subclonagem simples	140
9.2.1.1.1 - pBluescript [®] KS	140
9.2.1.2 - Expressão em <i>E. coli</i>	140
9.2.1.2.1 - pMALc	140
9.2.1.2.2 - pET23b*	141
9.2.1.3 - Transposição	143
9.2.1.3.1 - pW8	143
9.2.2 - Construção dos plasmídios recombinantes	143
9.2.2.1 - pKGT23C Δ 19	143
9.2.2.2 - pKGTM	143
9.2.2.3 - pMGT23CD19	144
9.2.2.4 - pETGT23C Δ 19	144
9.2.2.5 - pW[gt23C]	144
9.2.2.6 - pW[gt23CRI]	144
9.2.2.7 - pW[gt23C Δ]	144
9.3 - Sequenciação de DNA	145
9.4 - Extracção de ácidos nucleicos	145
9.4.1 - Preparação de DNA plasmídico	145
9.4.1.1 - Micropreparação	145
9.4.1.2 - Macropreparação	145
9.4.2 - Extracção de DNA fágico	146
9.4.3 - Extracção de DNA genómico de <i>Drosophila</i>	146
9.4.4 - Micropreparação de DNA genómico de <i>Drosophila</i>	147
9.4.5 - Preparação de mRNA poli(A)+ de <i>Drosophila</i>	147
9.4.6 - Micropreparação de mRNA poli(A)+ de <i>Drosophila</i>	148
9.5 - Hibridação de sondas radioactivas de DNA com ácidos nucleicos fixados em membranas	148
9.5.1 - Marcação de sondas de DNA com [α - ³² P] dCTP	148
9.5.2 - "Southern blot"	149
9.5.3 - "Northern blot"	149
9.5.4 - Rastreio de colónias	150
9.6 - Hibridação <i>in situ</i> em cromossomas politénicos com sondas biotiniladas de DNA	150
9.6.1 - Marcação com biotina-14-dATP	150

9.6.2 - Hibridação <i>in situ</i> _____	151
9.7 - Amplificação de DNA por PCR _____	151
9.7.1 - Ampliação de um fragmento de <i>γtub37C</i> _____	151
9.7.2 - Identificação da presença do elemento P 141 _____	152
9.8 - Expressão de γ-tubulina em <i>E. coli</i> _____	153
9.8.1 - MBP: γ -TUB23C Δ 19 _____	153
9.8.2 - T7: γ -TUB23C Δ 19:His6 _____	153
9.9 - Separação de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS _____	153
9.10 - Técnicas imunológicas _____	153
9.10.1 - Anticorpos utilizados e respectivas diluições _____	153
9.10.3 - "Immunoblotting" _____	154
9.10.3.1- Preparação dos extractos proteicos _____	154
9.10.3.2 - "Western blot" _____	154
9.10.3.3 - "Dot blot" _____	155
9.10.2 - Imunopurificação _____	155
9.10.5 - Imunofluorescência indirecta em cérebros de larvas _____	155
9.10.6 - Imunofluorescência indirecta em testículos _____	155
9.11 - Análises citológicas _____	156
9.11.1 - Observação da mitose em neuroblastos _____	156
9.11.1.1 - Coloração com orceína _____	156
9.11.1.2 - Coloração com Iodeto de propídio _____	157
9.11.1.3 - Determinação do índice mitótico _____	157
9.11.2 - Observação <i>in vivo</i> da espermatogenese _____	157
9.11.3 - Observação da segregação meiótica dos cromosomas _____	157
9.11.4 - Microscópia electrónica de testículos _____	157
9.12 - Transformação de linhas germinais _____	158
9.12.1 - Preparação do DNA para microinjecção _____	158
9.12.2 - Microinjecção em embriões _____	158
9.12.4 - Cruzamentos para inclusão dos transposões ∇ GTx no genoma das linhas 141 _____	158
Capítulo 10 - Bibliografia _____	160

Resumo

O conhecimento dos mecanismos de segregação dos cromossomas reveste-se da maior importância no estudo da divisão celular. Entre os componentes moleculares envolvidos nesses processos encontra-se a γ -tubulina, uma proteína pertencente à superfamília das tubulinas e implicada na nucleação, organização e estabilidade dos microtúbulos.

O trabalho aqui presente consistiu na caracterização de um alelo mutante de *γ tub23C*, um gene que codifica para uma isoforma de expressão zigótica da γ -tubulina em *Drosophila melanogaster*. Este organismo foi utilizado como modelo de estudo, dado que permite fácil identificação e caracterização de alelos mutantes de genes envolvidos na divisão celular, muito particularmente na mitose.

O alelo mutante caracterizado (*γ tub23C^{PI}*) deriva da linha mutante 141. O trabalho inicial de caracterização desta linha revelou a inserção de um elemento P na região "leader" de *γ tub23C*, que condiciona a expressão do gene. Os neuroblastos de indivíduos homocigóticos 141 exibem um severo fenótipo mitótico e uma organização aberrante do aparelho mitótico com destaque para a estrutura anormal dos centrossomas [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. A continuação do estudo deste mutante foi realizada no âmbito do presente projecto e pretendeu confirmar mediante testes genéticos e moleculares que a linha 141 era um alelo mutante de *γ tub23C*. Os resultados mostraram a existência de outras mutações na linha original 141 com influência sobre o fenótipo mutante. O alelo mutante *γ tub23C^{PI}* foi isolado na linha recombinante 141bs.

A análise de *γ tub23C^{PI}* revelou que este alelo é hipomórfico e semi-letal. O estudo citológico de neuroblastos e discos imaginais de indivíduos homocigóticos confirmou que a mutação em *γ tub23C* causa severas alterações na organização do aparelho mitótico e na estrutura dos centrossomas. O exame da espermatogénese nos testículos dos machos *γ tub23C^{PI}* mostrou que a mutação origina a formação de fusos meióticos totalmente aberrantes e a degenerescência da espermiogénese.

Em conclusão o estudo do alelo mutante *γ tub23C^{PI}* revelou que a isoforma 23C é essencial para a mitose em fases avançadas do desenvolvimento da *Drosophila melanogaster*, bem como para espermatogénese.

Perante o tipo de alterações observadas na estrutura dos aparelhos mitótico e meiótico em consequência da redução dos níveis de γ -tubulina 23C podemos especular que esta proteína é necessária para a estrutura e função dos centrossomas e para a organização de microtúbulos funcionais que permitam a organização de fusos capazes de sustentar a segregação cromossómica.

Abstract

The knowledge of chromosome segregation mechanisms has great importance in the study cell division. One of the molecular components involved in this process is γ -tubulin, a tubulin superfamily protein implied in nucleation, organization and stability of the microtubules.

This thesis describes the characterisation of a mutant allele of $\gamma tub23C$, gene that codifies for a γ -tubulin isoform with zygotic expression in *Drosophila melanogaster*. This organism was used as a study model, because it permits the identification and characterisation of mutant alleles of genes involved in cell division, and in special in mitosis.

The characterized mutant allele ($\gamma tub23C^{PI}$) has been isolated from the *141* mutant line. The initial work with this line detected a P element insertion in the leader region of $\gamma tub23C$, that affects the gene expression. The homozygous neuroblasts display a sever mitotic phenotype and an abnormal mitotic apparatus, specially a very abnormal organization of the centrosomes [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. The aim of this thesis was to confirm by genetic and molecular analysis that *141* line was a $\gamma tub23C$ mutant allele. The results showed that the *141* original line have other mutations that influence the mutant phenotype. The $\gamma tub23C^{PI}$ mutant allele was isolated in the *141bs* recombinant line.

The analysis of $\gamma tub23C^{PI}$ showed that this allele is hypomorphic and hemi-lethal. The cytological study of homozygous neuroblasts and imaginal discs confirmed that the mutation in $\gamma tub23C$ induces severe alterations in the mitotic apparatus organization and centrosome structure. The spermatogenesis analysis in $\gamma tub23C^{PI}$ testes showed that the mutation leads to the formation of abnormal meiotic spindles and spermiogenesis degeneration.

In conclusion, the study of the $\gamma tub23C$ mutant allele indicates that the γ -tubulin 23C isoform is essential for mitosis in later stages of the *Drosophila melanogaster* development, and to the spermatogenesis process.

Given the alterations observed in the structure of the mitotic and meiotic apparatus due to the reduction of γ -tubulin 23C levels we speculate that this protein is required for the structure and function of the centrosomes as for the assembly of functional microtubules that support chromosome segregation.

Résumé

La connaissance des mécanismes de la ségrégation chromosomique est d'une importance majeure dans l'étude de la division cellulaire. Parmi les éléments moléculaires impliqués dans ce processus, on trouve la tubuline g, une protéine de la superfamille des tubulines, impliquée dans la nucléation, l'organisation et la stabilité des microtubules.

Le travail présenté dans cette thèse consiste en la caractérisation d'un allèle mutant de *gtub23C*, un gène codant pour un isoforme de tubuline g d'expression zygotique chez *Drosophila melanogaster*. Cet organisme a été utilisé comme modèle d'étude étant donné qu'il permet une identification facile et une meilleure caractérisation d'allèles mutants des gènes impliqués dans la division cellulaire, dans la mitose en particulier.

L'allèle mutant caractérisé (*gtub23C^{P1}*) provient de la lignée mutante 141. Le travail initial de caractérisation de cette lignée a permis de localiser l'insertion de l'élément P dans la région "leader" de *gtub23C*, qui conditionne l'expression du gène. Les neuroblastes d'individus homozygotes 141 montrent un phénotype mitotique sévère et une organisation aberrante de l'appareil mitotique avec une structure anormale des centrosomes (Gomes, 1994; Sunkel et al., 1995). L'objectif de cette thèse a été de donner continuation à ce projet dans le sens de confirmer que la lignée 141 était effectivement un allèle mutant de *gtub23C* en utilisant des tests génétiques et moléculaires. Les résultats qui en ont découlé ont montré l'existence d'autres mutations de la lignée 141 avec une influence sur le phénotype mutant. L'allèle mutant *gtub23C^{P1}* a été isolé à partir de la lignée recombinante 141bs.

L'analyse de *gtub23C^{P1}* a révélé que cet allèle était polymorphe et semi-lethal. L'étude cytologique des neuroblastes et des disques imaginaux d'individus homozygotes a confirmé que la mutation dans *gtub23C* provoquait des altérations sévères dans l'organisation de l'appareil mitotique et dans la structure des centrosomes. L'examen de la spermatogenèse chez les mâles *gtub23C^{P1}* a montré que la mutation induisait la formation de fuseaux méiotiques complètement aberrants et une dégénérescence dans la spermiogenèse.

En conclusion, l'étude de l'allèle mutant *gtub23C^{P1}* a montré que l'isoforme 23C est essentiel pour la mitose durant des phases avancées du développement de *Drosophila melanogaster*, ainsi que pour la spermatogenèse.

Devant les types d'altérations observées dans la structure des appareils mitotique et méiotique qui résultent de la baisse du niveau de la g-tubuline 23C, on peut penser que cette protéine soit nécessaire pour la structure et la fonction des centrosomes et pour l'organisation de microtubules fonctionnels qui permettent une organisation de fuseaux capables d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes.

Capítulo 1

Divisão celular e γ -tubulina

1.1 - Ciclo Celular

O ciclo celular é sucessão ordenada de acontecimentos que, em geral, culmina na divisão de uma célula em outras duas geneticamente idênticas, sendo um processo altamente regulado [revisão geral em Murray & Hunt, 1993].

1.1.1 - Breve introdução histórica

Os fundamentos do ciclo celular começaram-se a desenhar em 1839 com a proposta da teoria celular por Matthias Jakob Schleiden e Theodor Schwann. Segundo esta, os organismos vivos eram constituídos por uma ou mais células e cada nova célula tinha origem na divisão de outra pré-existente. Em 1878, Walter Flemming observou que a divisão celular era precedida pela duplicação dos cromossomas, de modo que cada um tomava uma aparência de duas linhas (cromátidas) juntas num ponto (centrómero), e por uma série de acontecimentos (mitose) durante os quais os cromossomas condensavam, eram alinhados no meio de um fuso fibrilar e, durante a divisão nuclear, cada cromátida "irmã" movia-se para os pólos opostos do fuso, culminando este processo na descondensação das cromátidas com formação de dois núcleos e finalmente na separação da célula em duas novas células. Os cromossomas foram identificados como os portadores da informação genética num suporte de DNA, os quais tinham de ser replicados e posteriormente segregados equitativamente para a uma fidedigna transmissão da informação [revisão em Darnell *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1988].

A fidelidade da transmissão da informação de uma célula para outras duas geneticamente iguais depende de uma acurada replicação e segregação dos cromossomas. Para que isto aconteça a célula tem que assegurar que certos eventos do ciclo celular estejam completos e sem erros antes de outros começarem [Hartwell & Weinert, 1989].

O ciclo celular divide-se microscopicamente em dois períodos: a **Mitose** durante a qual a célula sofre uma série de alterações morfológicas conducentes à segregação dos cromossomas e divisão celular; e a **Interfase**, período durante o qual não são observadas alterações na célula para além de um eventual crescimento. Estudos bioquímicos e de biologia celular levaram à classificação do ciclo celular em quatro tempos: (**G₁**) durante a qual a célula cresce, (**S**) período de replicação do DNA, (**G₂**) preparação da célula para a entrada em mitose (**M**) e divisão. A duração de cada fase do ciclo celular é variável em função do tipo de célula e do meio que a rodeia. No caso das primeiras células embrionárias, os ciclos de divisão são muito rápidos não sendo perceptíveis as fases G₁ e G₂. Contudo, nas células diferenciadas ou privadas de nutrientes, G₁ é extenso, podendo a célula entrar num estado estacionário **G₀**, no qual pode permanecer largos períodos de tempo.

A cadeia de eventos sucessivos contituíntes do ciclo celular e a fidelidade com que estes devem ocorrer implicam a existência de mecanismos que regulem e controlem todo o processo. Alterações no processo do ciclo celular podem levar à morte celular ou a uma proliferação descontrolada e cancro [Hartwell & Weinert, 1989; Murray, 1992; Elledge, 1997].

O estabelecimento da existência de mecanismos reguladores do ciclo celular adveio de estudos bioquímicos em *Xenopus* [revisão em Murray & Kirschner, 1989] e genéticos em leveduras [revisão em Hartwell, 1991]. Estes estudos identificaram uma de proteína cinase (p34cdc2 ou CDC28) associada a proteínas que apresentavam um perfil ciclico de degradação, as ciclinas, como a chave do funcionamento do mecanismo do ciclo celular [Murray & Kirschner, 1989; Nigg, 1995].

Estudos efectuados em ovos de *Xenopus* identificaram em oócitos suspensos em meiose II, um factor com actividade bioquímica capaz de induzir a maturação de oócitos pré-meióticos [Masui, *et al.*, 1971]. Este factor foi designado por Maturation Promoting Factor (MPF). O MPF apresentava um pico de actividade máximo durante a meiose e mitose [Gerhart, *et al.*, 1984]. Estudos subsequêntes identificaram uma proteína (ciclina) que era acumulada durante a interfase e abruptamente degradada no fim de cada mitose [Evans, *et al.*,

1983] O comportamento da ciclina sugeria um modelo em que a acumulação de ciclina activava o MPF, o que conduziria à entrada da célula em mitose, e a destruição da ciclina originaria a inactivação do MPF e conseqüente saída de mitose [Murray & Kirschner, 1989; Murray, *et al.*, 1989]. A identificação da ciclina como componente do MPF [Gautier *et al.*, 1990] veio reforçar este modelo, que viria a revelar-se como a base do funcionamento do mecanismo do ciclo celular.

A análise de estirpes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* com mutações condicionais termo-sensíveis permitiu a caracterização dos primeiros mutantes do ciclo celular [Hartwell *et al.*, 1970, Nurse, 1975] e o estabelecimento dos seus mecanismos de regulação [revisão em Forsburg & Nurse, 1991]. Os mutantes do ciclo celular foram isolados do conjunto mutantes termo-sensíveis pelo peculiar comportamento que apresentavam quando transferidos para a temperatura restritiva. Em geral, quando culturas assíncronas de mutantes termo-sensíveis eram transferidas da temperatura permissiva de crescimento (23° C) para a restritiva (36° C) as células da população paravam em qualquer ponto do ciclo celular. No entanto, em alguns mutantes todas as células da população paravam com mesmo fenótipo, ou seja no mesmo ponto do ciclo celular [Hartwell *et al.*, 1970], ou no caso de *S. pombe* apresentavam variações no comprimento, indicação de precocidade ou retardamento na entrada em mitose [Nurse, 1975]. Estes mutantes foram designados por mutantes *cdc* (cell division cycle mutants) e estão na base do estudo molecular dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular.

As abordagens bioquímica e genética da regulação do ciclo celular conjugaram-se quando foi observado que o MPF purificado continha o produto de um homólogo em *Xenopus* do gene de controlo do ciclo celular *cdc2⁺* de *S. pombe* [Gautier, *et al.*, 1988].

1.1.2 - Mecanismos de regulação do ciclo celular

A regulação do ciclo celular assenta fundamentalmente em mecanismos de modificação postraducional, nomeadamente a fosforilação e a degradação de proteínas, embora intervenham igualmente outros tipos de mecanismos nomeadamente ao nível do controlo da transcrição [revisão geral em Murry & Hunt, 1993].

A chave do processo de regulação do ciclo celular é um complexo formado por uma cinase CDK (Cyclin Dependent Kinase) em associação com uma ciclina. A actividade do

complexo CDK-ciclina é controlada positiva e negativamente por fosforilação da CDK, síntese e degradação da ciclina e ligação de outras proteínas reguladoras [Nigg, 1995; Elledge, 1996].

Em leveduras foi identificada unicamente uma CDK que funciona em todos os passos do ciclo (Cdc28 em *S. cerevisiae* [Reed, 1980; Reed & Wittenberg, 1990] e Cdc2 em *S. pombe* [Nurse & Bisset, 1981]), dependendo a sua especificidade das diversas ciclinas (G_1 , S e B) com que se associa [Reed, 1991; Nurse, 1994]. Contrariamente, em metazoários existem diversas CDKs, dependendo o decorrer do ciclo celular da sucessiva activação e inactivação de diversos complexos CDK/ciclina [revisão em Nigg, 1995]. Em G_1 actuam os complexos formados pela ciclina D associada à CDK4 e CDK6, e cuja regulação é influenciada por factores externos. Na transição G_1 -S intervêm o complexo CDK2/ciclina E, enquanto que durante a fase S a CDK2 está associada com a ciclina A. Em G_2 , na transição para mitose, actua a ciclina A ligada à CDK1 (homologa das Cdc28 e cdc2) e posteriormente o complexo CDK1/ciclina B conduz a célula para a mitose promovendo a fosforilação de diversos componentes celulares envolvidos na mitose. A inactivação irreversível do complexo CDK1/ciclina B, e a consequente saída de mitose, dá-se por degradação da ciclina mediante um processo dependente de ubiquinação [Glotzer, 1993]. Durante o ciclo, outros processos de proteólise mediados por ubiquinação são necessários para a progressão do ciclo, nomeadamente para a separação das cromátidas irmãs [Holloway *et al.*, 1993] e durante a activação da síntese do DNA [King *et al.*, 1996]. Estes processos de degradação estão sob a regulação dos complexos CDK/ciclina, conduzindo a uma interdependência entre a actividade CDK e a proteólise ubiquitina-dependente que assegura a progressão ordenada do ciclo celular [King *et al.*, 1996].

No decorrer da descrição dos mecanismos de regulação envolvidos nos diversos passos do ciclo celular, os complexos CDK/ciclina serão designados com base na fase do ciclo em que actuam não especificando qual a CDK e ciclina envolvida, a não ser em casos que a isso justifiquem. Assim, os complexos activos durante G_1 são nomeados por CDK/ciclina G_1 , os da fase S por CDK/ciclina S e os activos durante G_2 e a mitose por CDK/ciclina M.

1.1.2.1 - Transição G_1 -S

A entrada da célula no processo de divisão depende da passagem de um intervalo do ciclo onde são monitorizadas as condições da célula para que essa entrada possa ocorrer. Após

este intervalo as células reduzem o nível de resposta a agentes externos, como a disponibilidade de nutrientes, e a factores de crescimento, acasalamento e proliferação celular [revisão em Murray & Hunt, 1993]. Em leveduras este intervalo é denominado START [Hartwell *et al.*, 1974; Nurse & Bissett, 1981], ao passo que, em organismos multicelulares foi classificado como ponto de restrição (R) [Pardee, 1989; Sherr, 1994]. O controlo deste intervalo é efectuado por regulação da actividade dos complexos CDK/ciclinas G_1 , sendo a actividade essencialmente dependente da abundância das ciclinas G_1 e da ligação de inibidores ao complexo [Reed *et al.*, 1994; Sherr, 1994; Sherr, 1996]. A regulação da entrada da célula no processo de divisão é determinante para o controlo da proliferação celular [Sherr, 1996].

Após a saída de G_1 , as células entram na fase S, período durante o qual vai ocorrer a duplicação do DNA. A síntese do DNA exige uma preparação prévia dos cromossomas para os tornar competentes para a replicação, ao mesmo tempo que a passagem pela mitose é, em geral, necessária para que ocorra um novo ciclo de replicação [Stillman, 1996].

A replicação do DNA inicia-se nas origens de replicação, as quais são determinadas por sequências específicas de DNA às quais se liga uma proteína iniciadora, que em eucariotas é a ORC (Origem Recognition Complex) [Bell & Stillman, 1992]. A associação às origens de replicação de outras proteínas como a Cdc6 de *S. cerevisiae* ou Cdc18 em *S. pombe* [Coker *et al.*, 1996; Muzi-Falconi *et al.*, 1996] e as MCM [Chong *et al.*, 1995], durante G_1 , é necessária para o estabelecimento do complexo de pré-replicação (Pre-RC) [Stillman, 1996]. A Cdc6/Cdc18 é essencial para a iniciação da replicação [Muzi-Falconi *et al.*, 1996, Stillman, 1996; Chevalier & Blow, 1996], estando o seu período de actuação limitado entre a destruição das ciclinas mitóticas e a activação dos CDK/ciclinas-S [Piatti *et al.*, 1996]. No início da replicação a Cdc6, bem como as MCM desaparecem das origens de replicação [Stillman, 1996]. A iniciação da replicação é dependente da actividade dos complexos CDK/ciclinas-S, sendo estes regulados pela ligação de inibidores [Stillman, 1996; Chevalier & Blow, 1996]. A degradação do inibidor Sic1 parece ser indispensável para a activação dos CDK/ciclinas-S e o início da replicação [Schwob *et al.*, 1994]. Esta degradação ocorre por um mecanismo dependente de ubiquitinação e cujo controlo está sob a acção dos CDK/ciclinas- G_1 [Verma *et al.*, 1997]. Um outro complexo cinase, o complexo Cdc7-Dbf4 é igualmente necessário para a iniciação da replicação, podendo representrar eventualmente um mecanismo de regulação independente dos complexos CDK/ciclinas [Stillman, 1996]. Na prevenção da re-replicação do

DNA estão envolvidas os complexos CDK/ciclinas-M, muito provavelmente controlando a acumulação ou activação de factores necessários à formação do Pre-RC [Stillman, 1996].

1.1.2.2 - Transição G₂-M

A progressão para mitose da maioria dos tipos de célula está dependente da conclusão da síntese do DNA, existindo mecanismos de monitorização da fase S que analisam o processo de replicação e geram um sinal regulador da entrada em mitose [Nurse, 1994]. O principal alvo da regulação é o complexo CDK1/ciclina B [King *et al.*, 1994], que constitui o MPF e é responsável pela fosforilação de diversas proteínas que originam alterações estruturais no citoesqueleto, envelope nuclear e cromatina [Bissen, 1997]. O complexo CDK1/ciclina B é essencialmente regulado por fosforilação em três amino ácidos [Gould & Nurse, 1989, Solomon *et al.*, 1992].

A actividade cinase do complexo CDK1/ciclina B requer a fosforilação de um resíduo treonina conservado (T161 na CDK1 humana), sendo a actividade inibida por fosforilação de dois resíduos conservados presentes dentro do domínio catalítico da CDK1 (Y15 e T14 na CDK1 humana) [Solomon *et al.*, 1992].

A fosforilação de T161 parece ser catalisada pela CAK (Cdc2-Activating Kinase) [Solomon *et al.*, 1992], um complexo CDK7/ciclina H [Nigg, 1996]. Em *S.cerevisise* esta actividade é exercida pela Cak1/Civ1 [Thuret *et al.*, 1996; Kaldis *et al.*, 1996]. A desfosforilação de T161 parece ser catalisada pela fosfatase PP2A ou outras fosfatases associadas as CDK [Nigg, 1996; Poon *et al.*, 1995], no entanto este mecanismo não está ainda bem definido. Mais estabelecidos estão os mecanismos que controlam a inibição por fosforilação da tirosina 15. Este resíduo é fosforilado por pelas cinases Wee1 [Russell & Nurse, 1987] e Mik1 [Lundgren *et al.*, 1991], enquanto que as fosfatases Cdc25 [Russell & Nurse, 1986; Lee *et al.*, 1992] e Pyp3 [Millar, *et al.*, 1992] removem o fosfato de Y15. Wee1 e Cdc25 são as principais responsáveis pela regulação da fosforilação de Y15, enquanto que a Mik1 e Pyp3 terão funções cooperativas ou redundantes. O resíduo T14 pode ser fosforilado pela cinase Myt1, que está associada a membranas [Mueller *et al.*, 1995].

O balanço entre os mecanismos de fosforilação e desfosforilação regulam a actividade do complexo CDK1/ciclina B, bem como a própria actividade de Wee1 e Cdc25 [Lew & Kornbluth, 1996]. A fosforilação da Y15 por Wee1 inibe a actividade do MPF [McGowan &

Russell, 1993]. Por seu turno, a proteína Wee1 é também regulada negativamente por fosforilação [Tang *et al.*, 1993; McGowan & Russell, 1995], sendo esta promovida eventualmente pelo próprio MPF em conjunto com outras cinases, como a Nim1/Cdr1 identificada em *S.pombe* e que responde a factores externos [Feilotter *et al.*, 1991]. Uma fosfatase do tipo PP2A surge como a mais provável reguladora positiva do Wee1 [Minshull *et al.*, 1996]. A activação do MPF é dependente da desfosforilação dos resíduos Y15 e T14 que é executada pela Cdc25, uma fosfatase de dupla especificidade (treonina/tirosina) [Kumagai & Dunphy, 1991; Millar *et al.*, 1991]. A expressão e actividade da Cdc25 é cíclica, sendo máxima na entrada em mitose [Kumagai & Dunphy, 1992; Izumi *et al.*, 1992]. A hiperfosforilação aumenta a actividade da Cdc25 o que leva a um aumento na actividade do MPF, que por sua vez fosforila a Cdc25, gerando um potencial ciclo de retroalimentação positiva [Hoffmann & Karsenti, 1994]. Porém, outros mecanismos deverão igualmente intrevir na fosforilação da Cdc25 e entre os candidatos estão as cinases do tipo Polo [Sunkel & Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991; Glover *et al.*, 1997]. Um membro da família Polo em *Xenopus* liga e hiperfosforila a Cdc25 gerando fosfoepítotos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal MPM2 [Kumai & Dunphy, 1996]. Este tipo de fosfoepítotos é concumitante com a mitose [Vandré *et al.*, 1986; Vandré, D.D. & Borisy, G.G. 1989] e estão igualmente presentes na Wee1 sugerindo que esta também possa ser fosforilada por uma cinase do tipo Polo [Kumai & Dunphy, 1996]. O controlo da hiperfosforilação da Cdc25 está dependente da actividade a montante de complexos CDK/ciclina que deverão regular as cinases e/ou as fosfatases (do tipo PP1 e PP2A) que actuam sobre a Cdc25 [King *et al.*, 1994] Outros mecanismos independentes da fosforilação de Y15 parecem concorrer para a inibição do MPF, podendo estar envolvidos inibidores das CDK como BimE, Rum1 ou Sic1 [King, 1994].

1.1.2.3 - Transição M-G₁

Durante a mitose ocorrem dois processos irreversíveis e fundamentais na progressão do ciclo celular: a separação das cromátidas irmãs e a degradação da ciclina B. Os processos são independentes, mas ambos são conduzidos por um mecanismo de proteólise dependente de ubiquitina [revisão em King *et al.*, 1996].

A saída de mitose e subsequente entrada em interfase ocorre por inactivação do MPF originada pela degradação da ciclina B. Este processo é dependente da ubiquitinação de uma

sequência conservada de 9 amino ácidos (D-box) presente na extremidade-amino da ciclina B. O componente do sistema de ubiquinação da ciclina mitótica é activado na transição metafase-anáfase e foi denominado APC (Anaphase Promoting Complex). [Glotzer *et al.*, 1991; Holloway *et al.*, 1993; Sudakin *et al.*, 1995; Irniger *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995; Tugendreich *et al.*, 1995] Estudos com a ciclina B desprovida da "D-box", e de inibição de componentes deste sistema de ubiquitinação, indicaram que a separação das cromátidas irmãs é igualmente dependente da actividade do APC [Holloway *et al.*, 1993; Surana *et al.*, 1993; Rimmington *et al.*, 1994; Irniger *et al.*, 1995]. Um alvo para a actuação do APC nas separação das cromátidas irmãs são as proteínas Cut2 e Psd1, que apresentam sequências do tipo "D-box" e cuja degradação é necessária para que ocorra a anáfase [Funabiki *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996]. Tem sido proposto que este tipo de proteínas funcionem como uma cola que mantém as cromátidas irmãs juntas, sendo necessária a sua destruição para que as cromátidas se possam separar [Holloway *et al.*, 1993]. Outras proteínas como a pipples [Stratmann & Lehner, 1996] poderão igualmente estar envolvidas nesta função.

O APC é possivelmente activado por fosforilação. As cinases candidatas a este processo incluem o MPF e a proteína cinase A [Gorbsky, 1997]. Também os produtos dos genes *CDC20* de *S.cerevisiae* [O'Toole *et al.*, 1997] e o homólogo em *Drosophila* (*fizzy*) [Dawson *et al.*, 1995; Sigrist *et al.*, 1995] poderão estar envolvidos na regulação positiva do APC, pois mutações em ambos os genes impedem a degradação da ciclinas mitóticas e a anáfase. O APC mantém-se activo durante G_1 até que as CDK/ciclinas G_1 sejam activadas, indicando que as CDK/ciclinas G_1 deverão desempenhar um papel fundamental no controlo da proteólise ao longo do ciclo celular, promovendo a inactivação do APC e a activação da degradação de Sic1, o inibidor das CDK/ciclinas S [King *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 1997]. Ao regularem a degradação do APC, as CDK/ciclinas G_1 controlam simultaneamente a acumulação da ciclinas mitóticas e preparam a célula para reentrar no ciclo mitótico [King *et al.*, 1994].

1.1.3 - "Checkpoints" ou controlo de qualidade do ciclo celular

Uma transferência da informação genética de uma célula para as células filhas exige a existência de mecanismos que controlem o decorrer dos diversos processos envolvidos, e

permitam que a transmissão seja isenta de ruídos que poderiam comprometer a perpetuação dessa informação [Hartwell & Weinert, 1989; Murray, 1994; Elledge, 1996].

Os mecanismos ("checkpoints") que gerem esse controlo constituem vias bioquímicas que asseguram a dependência de um processo em relação a outro, que de outro modo seriam bioquimicamente independentes [Elledge, 1996].

No ciclo celular, a transição de um processo para o seguinte é promovida pelo finalizar do primeiro processo. Como já foi referido anteriormente, a chave deste mecanismo reside nos complexos CDK/ciclina. Estes complexos funcionam igualmente como os efectores dos mecanismos de vigilância. Estes mecanismos ao detectarem a presença de anomalias enviam sinais para a paragem do ciclo, estando as vias de activação e inibição dos complexos CDK/ciclina potencialmente ao serviço da ligação entre a detecção da qualidade dos processos e a resposta activa [Murray, 1994; Elledge, 1996].

Sendo o objectivo principal do ciclo celular a perpetuação da informação, essa tem de estar à partida correcta e ser transmitida sem falhas. Assim, os mecanismos de vigilância actuam em especial sobre a replicação e manutenção da integridade do DNA e sobre a segregação dos cromossomas.

Em resposta a danos no DNA e à paragem da replicação do DNA, a célula lança uma série de respostas que permitem a reparação do DNA e o restabelecimento da replicação. Entre estas respostas está a paragem da célula em G_1 , S ou G_2 , o abrandamento da replicação do DNA e um aumento da transcrição dos genes que participam na replicação e reparação do DNA [Elledge, 1996]. As vias de tradução da resposta a estas modificações têm vindo a ser muito estudadas [revisão em Elledge, 1996], sobretudo porque alterações nessas vias têm sido implicadas directamente no desenvolvimento do cancro, sendo disso exemplo a proteína p53 [revisão em Sherr, 1996].

A segregação dos cromossomas envolve uma multiplicidade de processos como a formação de um fuso bipolar, a ligação dos cromossomas ao fuso, o estabelecimento da placa metafásica, a separação das cromátidas e o seu movimento para os pólos opostos do fuso. Todos estes processos estão sujeitos a erros e são alvo de controlo. Os alvos que se têm revelado com maior potencial para a actuação dos mecanismos de vigilância são os cromossomas, sobretudo mediante a detecção da sua ligação bipolar ao fuso [Gorbsky, 1995].

Os sensores deste mecanismo parecem residir nos cinetocoros, que emitirão sinais inibidores da entrada em anafase enquanto os dois cinotocoros do cromossomas não

estabelecerem ligação com microtúbulos do pólo oposto [Gorbsky, 1995; Rieder *et al.*, 1995]. A detecção desta ligação está relacionada com tensão exercida sobre os cinetocoros ligados aos microtúbulos [Li & Nicklas, 1995; Skibbens *et al.*, 1995]. A tradução bioquímica deste sinal está associada ao epítipo fosforilado 3F3. A inibição da desfosforilação deste epítipo causa um atraso na entrada das células em anáfase [Campbell & Gorbsky, 1995] e o seu padrão de marcação reflete uma relação entre a presença do epítipo e a aplicação de tensão sobre os cinetocoros aos microtúbulos [Gorbsky & Ricketts, 1993; Nicklas *et al.*, 1995]. Este epítipo está presente com uma marcação forte nos cinetocoros dos cromossomas dissociados do fuso ou ligados a microtúbulos de um só pólo. Com a ligação bipolar e o estabelecimento de tensão ocorre uma redução da intensidade de marcação do epítipo. Nos cromossomas mono-orientados, a intensidade da marcação é mais intensa no cinetocoro virado para a placa metafásica do que no cinetocoro mais perto do pólo. Já nos cromossomas metafásicos, a marcação está ausente ou reduzida ao mínimo em ambos os cinotocoros. Este epítipo também está presente em células de *Drosophila*, e verifica-se que em mutantes desta espécie que exibem alterações no aparelho mitótico, o epítipo está presente mesmo nos cromossomas alinhados na placa metafásica [Bousbaa, *et al.*, 1997]. Neste momento estão a ser efectuados esforços no nosso laboratório para caracterizar a(s) proteína(s) de *Drosophila* associadas a este epítipo fosforilado.

Outra proteína envolvida neste mecanismo de vigilância é a MAD2 (Mitotic Arrest Deficient - 2) que se liga especificamente só a cinetocoros não ligados a microtúbulos, sinalizando a conexão de cinetocoro a estes, independentemente da tensão. Esta proteína inicialmente identificada em *S. cerevisiae*, surge também em *Drosophila*, o que indicia uma conservação evolutiva [Glozer, 1996; Bousbaa & Sunkel, comunicação pessoal].

A natureza dos sinais que fazem a conexão entre a detecção e a efectivação da resposta não estão bem estabelecidos, mas deverão actuar sobre o APC que será mantido inactivo até receber um sinal de que pode actuar na degradação das ciclinas mitóticas e das proteínas que estabelecem a coesão das cromátidas [Elledge, 1996; Gorbsky, 1997].

1.1.4 - O ciclo celular meiótico

A conservação dos organismos unicelulares em condições adversas conduziu ao estabelecimento do ciclo celular meiótico, no qual após a replicação do DNA ocorrem duas

rondas sucessivas de segregação dos cromossomas, produzindo quatro células com metade dos cromossomas presentes na célula progenitora. As células haplóides formam esporos que sobrevivem melhor que as células diplóides a condições extremas. Este ciclo meiótico tornou possível a reprodução sexual em organismos multicelulares.

Os mecanismos do ciclo celular meiótico são em parte idênticos aos do ciclo celular mitótico, partilham a mesma maquinaria e processos de regulação. A principal diferença reside principalmente nos cromossomas. Estes sofrem um processo de recombinação recíproca e os pares de homólogos são segregados durante a primeira divisão meiótica (meiose I). Em seguida ocorre a segunda divisão meiótica (meiose II), durante a qual as cromátidas irmãs são segregadas, tal como na mitose. O resultado final do processo é a formação de quatro células haplóides geneticamente não idênticas, em contraste com as duas células idênticas resultantes da mitose [revisões em Darnell *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1988; Murray & Hunt, 1993].

1.2 - Segregação cromossómica

Os principais eventos conducentes à segregação dos cromossomas são: a **profase** - condensação dos cromossomas duplicados, reorganização do citosqueleto, separação dos pólos astrais para posições opostas; a **prometáfase** - quebra do invólucro nuclear, estabelecimento do fuso, interacção dos cromossomas com os microtúbulos do fuso, originando a movimentação dos cromossomas que culmina na **metáfase** com o seu alinhamento no meio do fuso formando a placa metafásica; a **anafase** - separação das cromátidas irmãs (cromossomas homólogos, na meiose I) e sua movimentação para os pólos opostos da célula; a **telófase** - reformação do núcleo e descondensação dos cromossomas. A estes eventos segue-se a **citocinese** - formação de um anel contráctil de actinmiosina (ou do fragmoplasto em plantas superiores) e separação das células. [revisões em Darnell *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1988; McIntosh, J.R. e Koonce, M.P., 1989].

A segregação das cromátidas irmãs ou dos cromossomas homólogos é um mecanismo activo no qual intrevêm os próprios cromossomas, o fuso (estrutura bipolar formada por microtúbulos, em geral, emanados dos centros de organização de microtúbulos) e um conjunto

de proteínas motoras associadas aos microtúbulos e aos cromossomas. A segregação é basicamente determinada pela conjugação da dinâmica dos microtúbulos com a acção de proteínas motoras.

1.2.1 - Cromossomas

Os cromossomas mitóticos são constituídos por duas cromátidas irmãs associadas na constrição primária. Cada cromátida é formada por uma molécula linear de DNA associada a diversas proteínas e altamente condensada, mediante sucessivos níveis de compactação. A dupla hélice de DNA é enrolada em torno de conjuntos de histonas formando os nucleossomas. A fibra nucleossomal é seguidamente compactada num filamento solenóide de 30 nm de diâmetro. Este é disposto em dobras de ~50,000 pb sobre o "scaffold" (definido como as proteínas cromossomais que restam nos cromossomas após a remoção de todas as histonas e grande parte do DNA depois de um tratamento específico) e finalmente compactado em fibras com um diâmetro final de ~225-250 nm [Murray, 1993; Rattner & Lin, 1985].

Uma estrutura fundamental do cromossoma é o centrómero. Este localiza-se na constrição primária dos cromossomas de eucariotas superiores e numa região específica em leveduras [Sunkel & Coelho, 1995] e desempenha diversas funções essenciais em mitose, meiose e eventualmente também durante a interfase. O centrómero é a base para a formação do cinetocoro, estrutura proteica que medeia e controla a ligação e movimentação dos cromossomas no fuso. A coesão final das cromátidas irmãs passa pelo cinetocoro e/ou por regiões adjacentes o que implica que esta região tenha de receber os sinais conducentes à separação das cromátidas e presumivelmente ter maquinaria que intervenha nessa separação [para revisão Sunkel & Coelho, 1995; Pluta *et al.*, 1995]. O sistema de controlo de qualidade do aparelho mitótico detecta anomalias no alinhamento dos cromossomas no fuso, possivelmente mediante sinais emitidos pelos cinetocoros dos cromossomas que ainda não adquiriram uma ligação estável e biorientada com o fuso [Gorbsky, 1995].

Os cinetocoros apresentam-se como duas estruturas discóides nas superfícies laterais do cromossoma na região centromérica. Estruturam-se em três domínios: a placa interna em contacto com o DNA; a região intermédia que poderá funcionar com receptor de tensão e estar envolvida na sinalização do controlo do ciclo celular; a placa externa e coroa fibrosa associada envolvidas na ligação aos microtúbulos [Pluta *et al.*, 1995]. Têm sido identificadas diversas

proteínas presentes nos cinetocoros em *S. cerevisiae* e em mamíferos [revisão em Sunkel & Coelho, 1995]. De entre estas há que destacar a presença de putativas proteínas motoras como a dineína, a CENP-E (Centromeric Protein - E), as MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesins) [Yen & Schaar, 1996]. A dineína citoplasmática foi encontrada na coroa fibrosa [Wordeman *et al.*, 1991], tendo sido sugerido que seja responsável pelo rápido movimento dos cinetocoros para os pólos, quando estabelecem os primeiros contactos laterais com um microtúbulo no início da prometáfase [Rieder *et al.*, 1990]. A CENP-E tem homologia com as cinesinas, associa-se à placa externa do cinetocoro durante a congressão dos cromossomas para a placa metafásica [WC Earnshaw e T Yen, dados não publicados; Yen *et al.*, 1992] e é especificamente degradada no fim da anáfase [Brown, K.D., Coulson, R.M.R., Yen T.J., Cleveland, D.W., 1994]. Estudos com anticorpos contra domínios específicos da CENP-E indicaram que esta proteína está implicada na movimentação dos cromossomas pelo mecanismo dependente da despolimerização de microtúbulos [Lombillo *et al.*, 1995; Desai & Mitchison, 1995]. A MCAK pertence igualmente à família das cinesinas e localiza-se na vizinhança do centrómero [Wordeman & Mitchison, 1995]. A sua homóloga em *Xenopus* XKCM1 comporta-se como um factor de catástrofe que induz a despolimerização dos microtúbulos. Estes resultados sugerem que estas proteínas estão envolvidas na regulação da dinâmica de polimerização dos microtúbulos [Walczak *et al.*, 1996]. Também em *S. cerevisiae*, existe uma cinesina, a Kar3, que é um componente motor associado ao complexo centromérico CBF3 [Middleton & Carbon, 1994].

A presença de proteínas motoras que promovem a interacção dos microtúbulos com os cromossomas não está limitada ao cinetocoro, encontrando-se igualmente distribuídas ao longo dos braços dos cromossomas. Uma destas proteínas é o produto do gene *nod*, presente ao longo dos cromossomas aquiasmáticos de fêmeas de *Drosophila*, e que é necessário para a congressão dos cromossomas [Theurkauf & Hawley, 1992; Afshar *et al.*, 1995]. Outra proteína motora associada ao longo dos braços dos cromossomas é a Cromocinesina que pertence à família das cinesinas e apresenta domínios de ligação ao DNA [Wang & Adler, 1995]. Em *Xenopus* foi identificada a Xklp1, outra cinesina com localização cromossomal, que é necessária para a estabilização da bipolaridade do fuso e para a congressão dos cromossomas para a placa metafásica [Vernos *et al.*, 1995]. Estas proteínas poderão também contribuir para as forças de ejeção, que actuando sobre os cromossomas têm sido implicadas na congressão dos mesmos para placa metafásica [Rieder & Solomon, 1994; Fuller, 1995].

1.2.2 - Microtúbulos

Os microtúbulos, componentes chave do citoesqueleto de células eucariotas, são fibras dinâmicas que desempenham um papel fundamental em diversos eventos celulares incluindo a segregação dos cromossomas durante a mitose e meiose [Gelfand & Bershadsky, 1991]. A sua unidade estrutural é um heterodímero (genericamente designado por tubulina) formado por monómeros de α -tubulina e β -tubulina associados de modo alternado em protofilamentos que estabelecem contactos laterais uns com os outros para formar um tubo oco. O tipo de associação alternada dos dímeros confere ao microtúbulos uma polaridade estrutural que se reflete nas diferentes velocidades de polimerização e despolimerização observadas em cada extremidade. Uma característica dos microtúbulos é a sua instabilidade dinâmica ou a capacidade de alternarem entre um estado de crescimento e um rápido encolhimento [Mitchison, T.J. & Kirschner, M., 1984]. Existem diversas proteínas que interagem com os microtúbulos, como as MAPs (Microtubule Associated Proteins) que modelam a dinâmica dos microtúbulos, assim como diversas proteínas motoras que utilizam a energia da hidrólise do ATP para gerarem movimento ao longo dos microtúbulos [Mandelkow & Mandelkow, 1995]

1.2.2.1 - A superfamília das tubulinas

As α - e β -tubulinas pertencem à superfamília das tubulinas [Sullivan, 1988], que engloba igualmente as γ -tubulinas [Oakley & Oakley, 1989] e a FtsZ, uma homóloga procaríota das tubulinas [Erickson, 1995].

Na maioria dos eucariotas existem pequenas famílias multigénicas que codificam para diversas isoformas de α - e β -tubulinas [MacRae & Langdon, 1989] e originam as classes de α e β polipéptidos. Estas classes são conservadas ao longo da escala filogenética e diferem essencialmente nas regiões C-terminal [Sullivan, 1988]. Nos vertebrados existem aproximadamente seis genes funcionais para a α -tubulina e outros tantos para a β -tubulina [Cleveland, 1987], enquanto que em *Drosophila* foram identificados quatro tipos de cada classe [MacRae & Langdon, 1989]. Em eucariotas mais simples o número de isoformas é mais variável [MacRae & Langdon, 1989].

A diversidade de isoformas e a sua conservação entre espécies, conjuntamente com a multiplicidade de funções em que estão envolvidos os microtúbulos, levou ao estabelecimento

da hipótese da multi-tubulina [Fulton & Simpson, 1976]. Segundo esta, as diferentes tubulinas deveriam determinar a especificidade dos microtúbulos. Outra formulação alternativa sugere que os múltiplos polipéptidos são funcionalmente equivalentes, mas representam produtos de genes duplicados que evoluíram de modo a possuírem diferentes sequências reguladoras da activação da transcrição durante os programas alternativos de diferenciação [Raff, 1984; Cleveland, 1987]. Os estudos efectuados em diversos organismos indicam que ambas as formulações são válidas, mas a sua aplicação varia consoante o organismo estudado. Em fungos, as isoformas são funcionalmente equivalentes [Schatz *et al.*, 1986; May, 1989; Kirk & Morris, 1993], o que sustenta a segunda formulação. Nos organismos multicelulares, surgem as duas situações: a especialização funcional das isoformas e a expressão diferencial dos genes [MacRae & Langdon, 1989; Hutchens *et al.*, 1997].

Estudos em *Drosophila* têm fornecido dados importantes sobre a expressão e a especialização funcional das diversas isoformas de α - e β -tubulina. A expressão das isoformas $\beta 1$ e $\beta 3$ é espacialmente regulada durante o desenvolvimento [Buttgereit *et al.*, 1991; Gasch *et al.*, 1988] e a tubulina $\beta 2$ é específica dos testículos [Kemphues *et al.*, 1980; Kemphues *et al.*, 1982]. Nestes, as três isoformas têm uma distribuição celular restrita [Kaltschmidt *et al.*, 1991] e as isoformas $\beta 1$ e $\beta 3$ não podem substituir todas as funções da isoforma $\beta 2$ [Kaltschmidt *et al.*, 1991; Hoyle & Raff, 1990]. Estas β -tubulinas são funcionalmente distintas e verifica-se o mesmo entre as tubulinas α -84B e α -85B [Hutchens *et al.*, 1997]. Recentemente, a expressão em testículos de *Drosophila* da proteína homóloga de $\beta 2$ de *Heliothis virescens*, indicou que a arquitectura dos microtúbulos poderá ser determinada especificamente pela isoforma de β -tubulina, mediante a interacção com outras proteínas [Raff *et al.*, 1997]. Este estudo mostrou que a incorporação da β -tubulina heteróloga nos axonemas origina a formação de microtúbulos com 16 protofilamentos, número igual ao que é encontrado nos microtúbulos correspondentes de *Heliothis virescens*, diferindo dos microtúbulos de 13 protofilamentos que normalmente constituem os axonemas em *Drosophila*. Este estudo, também sugeriu uma evolução da hipótese da multi-tubulina, que envolve a participação de proteínas extrínsecas na determinação da estrutura das tubulinas e na génese da diversidade microtubular [Wilson & Borisy, 1997]

As tubulinas apresentam regiões muito conservadas, que presumivelmente correspondem a domínios de ligação com o GTP [Linse & Mandelkow, 1988]. As regiões com

maior variabilidade localizam-se principalmente na região do terminal carboxílico e surgem envolvidas na interacção com proteínas associadas aos microtúbulos [Littauer *et al.*, 1986].

A síntese das α e β -tubulinas é um processo autoregulado, no qual está envolvido o péptido amino-terminal (Met-Arg-Glu-Ile) [Yen *et al.*, 1988a]. O modelo proposto sugere que à saída da cadeia nascente do polipéptido de tubulina dos ribossomas, ocorra a ligação de tubulina solúvel ao tetrapeptídeo conservado e origine uma paragem do ribossoma e/ou uma alteração conformacional que permita a degradação do mRNA ligado aos ribossomas [Yen *et al.*, 1988b; Cleveland, 1988].

O estabelecimento da conformação das tubulinas é assistido pela TCP-1 (Tubulin Chaperoning Protein) [Yaffe *et al.*, 1992; Sternlicht, *et al.*, 1993; Melki *et al.*, 1993]. Após a tradução das tubulinas estão sujeitas a diversos tipos de modificações [Sullivan, 1988; MacRae & Langdon, 1989], das quais se salienta a acetilação [Piperno *et al.*, 1987] e tirosilação/destirosilação da α -tubulina [Thompson, 1982], a fosforilação da isoforma β_{III} [Alexander *et al.*, 1991], a glutamilação das formas alfa e beta [Alexander *et al.*, 1991; Edde, 1990] e a poliglicilação da tubulina axonemal [Bré *et al.*, 1996]. O significado funcional de todas estas modificações não está bem estabelecido. No entanto, na maioria dos casos as modificações pós-traducionais das tubulinas acumulam-se em microtúbulos estáveis, embora também sejam encontradas em microtúbulos mais labéis, e no caso da poliglicilação pode estar envolvida na mobilidade flagelar [Bré *et al.*, 1996].

1.2.2.2 - Estrutura dos microtúbulos

Os microtúbulos são cilindros ocos de cerca de 25 nm de diâmetro cuja parede é formada por heterodímeros de tubulina. As subunidades α e β associam-se alternadamente em protofilamentos longitudinais que se ligam para formar o tubo. As ligações laterais entre subunidades formam uma hélice com um passo de 3 subunidades (3-start helix) [Wade & Hyman, 1997]. As ligações laterais podem ser entre subunidades iguais, formando uma "B-lattice", ou diferentes, originando uma "A-lattice". Estudos *in vitro* com microtúbulos decorados com proteínas motoras mostraram que os microtúbulos eram organizados segundo uma "B-lattice" com costura, ou seja no fim de cada volta da hélice cada subunidade α encontra uma β [Kikkawa *et al.*, 1994; Wade *et al.*, 1995; Sosa & Milligan, 1996; Wade & Hyman, 1997]. A análise de microtúbulos formados *in vitro*, por microscopia electrónica de

espécimes corados negativamente [Erickson, 1974; Wade & Chrétien, 1993] ou incluídos em gelo vitrificado [Mandelkow *et al.*, 1991; Wade & Chrétien, 1993; Chrétien *et al.*, 1995], indica que as extremidades de crescimento dos microtúbulos assumem uma estrutura em tipo folha encurvada. Os dímeros de tubulina deverão ser adicionados à extremidade livre da folha curva, a qual na outra extremidade vai progressivamente sendo fechada para formar o cilindro [Wade & Chrétien, 1993; Chrétien *et al.*, 1995]. A hidrólise do GTP não parece ser directamente responsável pelo fecho da folha em tubo [Hyman *et al.*, 1995]. O GTP deverá estar envolvido na conformação do heterodímero de tubulina, dado que a estabilidade dos microtúbulos parece ser favorecida por uma conformação tipo-GTP do heterodímero [Hyman *et al.*, 1995; Arnal & Wade, 1995]. A alteração da conformação da tubulina poderá contribuir para o enrolamento dos protofilamentos em anéis, que é observado nas extremidades de encolhimento [Mandelkow *et al.*, 1991, Tran *et al.*, 1997], e também poderá estar envolvida na interacção com as MAPs e proteínas motoras [Wade & Hyman, 1997]. A polaridade dos microtúbulos foi determinada por diversos estudos [Mitchison, 1993; Fan *et al.*, 1996; Arnal *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1996] que levaram ao estabelecimento de um consenso sobre a presença da β -tubulina na extremidade (+), de crescimento mais rápido, e de α -tubulina na extremidade (-) [Amos & Hirose, 1997; Wade & Hyman, 1997].

Não foi ainda determinada a estrutura exacta dos microtúbulos *in vivo*. Contudo, se os microtúbulos de 13 protofilamentos tiverem uma organização em "B-lattice" deverão ter igualmente costura e crescerem tipo folha encurvada [Wade & Hyman, 1997]. *In vivo* os microtúbulos têm origem nos centros de organização de microtúbulos (MTOCs) [Gould & Borisy, 1977]. Estes últimos que deverão ter meios para modelar a iniciação dos microtúbulos, sendo disso reflexo os 13 protofilamentos constituintes da generalidade dos microtúbulos das células, contrariamente aos 10 a 16 protofilamentos observados nos microtúbulos formados *in vitro* [Evans *et al.*, 1985; Amos & Hirose, 1997]. Esta modelação conjuntamente com as MAPs pode determinar o tipo de "lattice" e o modo de crescimento, que poderá ser helicoidal e não em folha [Amos, 1995]. Associada ao mecanismo de nucleação dos microtúbulos surge outro membro da família das tubulinas: a γ -tubulina. As suas características moleculares, assim como os vários modelos que têm sido propostos para a sua função serão desenvolvidos na secção exclusivamente dedicada à γ -tubulina.

1.2.2.3 - Dinâmica dos microtúbulos

Os microtúbulos são por natureza dinamicamente instáveis. Microtúbulos formados em solução a partir de tubulina pura estão num constante polimerizar e despolimerizar [Mitchison & Kirschner, 1984]. Esta instabilidade que se verifica em solução é suposta estar relacionada com ciclos de hidrólise e troca do GTP presente no local GTP cambiável (E-site) da β -tubulina [Mitchison & Kirschner, 1986, Tran *et al.*, 1997]. O crescimento dos microtúbulos é acompanhado da hidrólise do GTP no E-site. No entanto, as subunidades de tubulina ligadas na extremidade mantêm o GTP, formando o denominado "GTP-cap" [Carlier & Pantaloni, 1981]. Para a despolimerização é necessária a hidrólise do GTP [revisões em Bayley, 1990; Caplow, 1992; Tran *et al.*, 1997], que induz alterações estruturais na extremidade dos microtúbulos [Hyman *et al.*, 1995]. *In vivo* a instabilidade intrínseca dos microtúbulos é influenciada pela presença de proteínas a eles associadas (MAPs). As MAPs mais estudadas (MAP2 e Tau) estão presentes em células nervosas [revisão em Schoenfeld, T.A. & Obar, R.A. 1994]. Estas proteínas estabilizam os microtúbulos, promovendo a sua nucleação e alongamento, protegendo-os da destruição e induzindo associação de microtúbulos em feixes, sendo estes efeitos contrariados pela fosforilação [revisões em Hirokawa, 1994; Mandelkow & Mandelkow, 1995]. Contudo, a Tau e a MAP2 estão presentes em microtúbulos neuronais (um tipo específico de microtúbulos muito estáveis) e não são encontradas em células em divisão. Na generalidade das células os microtúbulos apresentam uma velocidade de reciclagem superior à observada em soluções de tubulina pura, o que sugere que a presença das MAPs aumenta a frequência das transições crescimento-encolhimento [McNally, 1996]. Ao longo do ciclo celular ocorrem alterações na velocidade de reciclagem, sendo essa velocidade incrementada durante a mitose [Saxton *et al.*, 1984]. O aumento ocorre precisamente durante a quebra do envelope nuclear (NEB) [McNally, 1996]. Esta variação é acompanhada de uma redução da quantidade de polímeros, mas durante a progressão da mitose os níveis de microtúbulos voltam a aumentar mantendo-se uma elevada velocidade de reciclagem [McNally, 1996]. A fosforilação de proteínas parece ser essencial para esta alteração da dinâmica dos microtúbulos, estando a actividade do MPF envolvida no processo [Verde *et al.*, 1990]. A MAP4 surge como uma proteína que poderá estar envolvida neste processo, dado que é ubíqua e associa-se ao microtúbulos durante todo o ciclo celular [Bulinski & Borisy, 1980; Goldstein *et al.*, 1986; Ookata *et al.*, 1995]. *In vitro*, a forma desfosforilada estabiliza os microtúbulos. A

fosforilação leva à perda de influência da MAP4 sobre a dinâmica dos microtúbulos sem contudo alterar a sua ligação aos mesmos [Ookata *et al.*, 1995]. A CDK1/ciclina B fosforila e forma complexos com a MAP4 que são estabelecidos através da ligação directa da ciclina B à MAP4 [Ookata *et al.*, 1995]. Outra proteína que poderá estar envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos é a XMAP presente em ovos de *Xenopus* [Gard & Kirschner, 1987; Vasquez *et al.*, 1994]. A XMAP aumenta a velocidade de reciclagem ao mesmo tempo que promove um incremento da massa real de microtúbulos [Vasquez *et al.*, 1994]. Eventualmente, também a acção de proteínas que promovem o corte dos microtúbulos, poderão contribuir para a regulação da dinâmica destes [Nally, 1996]. A dinâmica dos microtúbulos ligados aos cinetocoros é principalmente regulada por estes. Os cinetocoros estabilizam os microtúbulos durante a formação do fuso e eventualmente promovem o seu encurtamento durante a anafase [revisão em Hyman & Karsenti, 1996] mediante a acção de proteínas motoras [Desai & Mitchison, 1995]. Estudos com tubulina fluorescente fotoactivada [Mitchison, 1989] mostraram que microtúbulos do fuso ligados aos cinetocoros também exibem durante a prometáfase-metafase um fluxo de subunidades direccionado aos pólos motivado pela efectiva adição de subunidades na extremidade (+) ligada aos cinetócoros e à sua perda na extremidade (-) inserida nos MTOCs.

1.2.3 - Proteínas motoras associadas aos microtúbulos

Existem diversas proteínas motoras que se associam aos microtúbulos. Estas proteínas utilizam a energia da hidrólise de ATP e o substracto dos microtúbulos na condução de múltiplas tarefas de transporte intracelular, como por exemplo o transporte de cromossomas e organelos membranares. Foram identificadas dois tipos de famílias de proteínas motores associadas ao microtúbulos: as cinesinas e as dineínas. Estas diferem a nível estrutural, bioquímico e especialmente funcional. Em geral a cinesinas movem-se sobre os microtúbulos no sentido da extremidade (+) e as dineínas no sentido da extremidade (-). Estas proteínas estão organizadas em domínios motores, que possuem actividade ATPase, e caudas, que carregam a estrutura a ser movida [Vale, 1990; Skoufias & Scholey, 1993; Hoyt, 1994; Schroer, 1994]. As cinesinas envolvidadas na formação do fuso dividem-se nas classes do tipo BimC - BimC, Cut7, Cin8p, Kip1p, Eg5, Klp61F; e do tipo KAR3 - KAR3, KlpA, Ncd. As proteínas destas classes localizam-se nos microtúbulos que correm de um pólo ao outro e

aparentam ter uma função antagonista, com as do tipo Bim-C actuando na separação dos pólos e as KAR3-like contrariando essa acção [Hoyt, 1994]. A MKLP-1 é outra proteína também presumivelmente implicada na separação dos pólos, sendo capaz de promover *in vitro* o deslizar de microtúbulos antiparalelos [Nislow *et al.*, 1992]. A manutenção ou estabelecimento da focalização polar do fusos depende da actividade da dineína citoplasmática e proteínas associadas como a dinactina e a NuMA (Nuclear protein that associates with the Mitotic Apparatus)[Vaisberg *et al.*, 1993; Allan, 1996; Heald *et al.*, 1997; Galio, *et al.*, 1997]. Para além proteínas referidas, existem outras que estão presentes quer nos cromossomas quer nos centros de organização de microtúbulos e estão envolvidas no funcionamento do fuso, como já foi ou irá ser referido.

1.2.4 - Centros de organização de microtúbulos

Na generalidade das células eucariótas os microtúbulos têm origem em centros de organização genericamente designados por MTOCs (Microtubule Organizing Centers). Estes são locais de nucleação e controle da estrutura, polaridade, dinâmica e distribuição dos microtúbulos. Os MTOCs funcionam na organização polar dos fusos e intrevêm no controlo da organização da célula [revisões gerais em McIntosh, 1983; Brinkley, 1985; Kellogg *et al.*, 1994].

1.2.4.1 - Estruturas com capacidade de organização de microtúbulos

Existem diversos tipos de MTOCs que no entanto e apesar das diferentes estruturas desempenham papéis idênticos, o que constitui um exemplo de uma conservação de função ao longo da evolução filogenética.

Os MTOCs nas células animais são os centrossomas [revisão em Glover *et al.*, 1993]. Em geral, estes são constituídos por um par ortogonal de centríolos (estruturas formadas por tripletos de microtúbulos com um arranjo circular de 9+0) envolto numa massa amorfa de material electrodense pericentriolar (PCM) de onde os microtúbulos são emanados [Gould & Borisy, 1977]. No entanto, nem em todas as células animais os MTOCs apresentam centríolos, disso são exemplo as divisões meioticas em oócitos de diversas espécies, as primeiras divisões do ovo de ratinho [Szöllösi *et al.*, 1972] e uma linha celular de *Drosophila* [Debec *et al.*,

1982]. Também os MTOCs das plantas superiores são acentriolares com uma organização não bem definida, mas que contêm material electrodense similar ao PCM [Lambert, 1993]. A função dos centríolos nos MTOCs não está ainda bem determinada, a não ser no caso dos flagelos em que o centríolo se transforma em corpo basal [Kellogg *et al.*, 1994].

Em leveduras, os MTOCs têm uma estrutura peculiar denominada SPB (Spinde Pole Body). O SPB de *S. cerevisiae* é uma estrutura discóide imbutida no envelope nuclear [revisão em Snyder, 1994]. É formada por três camadas laminares electrodensas paralelas: a placa central que fica no plano da membrana nuclear, a placa interior localizada na face interna do núcleo e de onde são emanados os microtúbulos nucleares, e do lado citoplasmático, a placa exterior que constitui a origem dos microtúbulos citoplasmáticos [revisão em Snyder, 1994]. Os SPBs de outros fungos, como de *S. pombe*, são também estruturas laminares mas que só se associam ao envelope nuclear durante a mitose e não organizam os microtúbulos citoplasmáticos [Snyder, 1994].

1.2.4.2 - Componentes bioquímicos dos MTOC

Os componentes bioquímicos dos MTOCs têm vindo a ser identificados por diversas abordagens bioquímicas, imunológicas e genéticas. Estas incluem a purificação de centrossomas e de SPBs, a utilização de autoanticorpos contra epítopos centrossomais, cromatografia de afinidade para microtúbulos e rastreio de mutações genéticas [revisão em Kalt & Schliwa, 1993]. Nem todas as proteínas identificadas estão sempre presentes nos MTOCs ao longo de todo o ciclo celular e mesmo as que estão podem apresentar variações de intensidade durante o ciclo. Outras não são exclusivas dos MTOCs e algumas dependem da presença de microtúbulos para a sua localização nos MTOCs. Quanto à função desempenhada por cada um dos componentes moleculares dos MTOCs pouco se sabe, no entanto sabe-se que certas proteínas estão envolvidas na nucleação dos microtúbulos, na estrutura, na separação e na regulação do funcionamento dos MTOCs.

Uma das proteínas associadas aos MTOCs é γ -tubulina, a qual surge como a principal implicada no mecanismo de nucleação de microtúbulos ao longo da escala filogenética. Esta proteína é um componente integral dos MTOCs (localiza-se de modo independente da presença de microtúbulos) e está presente nos mesmos durante todo o ciclo celular, mas com intensidade superior nos períodos de maior actividade de nucleação dos microtúbulos. A γ -

tubulina apresenta-se no material pericentriolar em complexo com outras proteínas sob a forma de anéis que se pensa serem os nucleadores directos dos microtúbulos [ver secção dedicada à γ -tubulina]. Em *Drosophila* existem duas proteínas que estão envolvidas num complexo que também contém γ -tubulina: a CP60 e a CP190. Ambas são recrutadas no início da mitose para os centrossomas, sendo a sua localização independente da presença de microtúbulos, mas, contrariamente à γ -tubulina, dependentes da presença de centríolo [Kellogg *et al.*, 1989; Kellogg & Alberts, 1992; Whitfield *et al.*, 1995; Oegeme *et al.*, 1995; Raff *et al.*, 1993]. A pericentrina é outro componente conservado e integral dos centrossomas e também dos corpos basais. Surge como parte da matriz filamentosa do centrossoma, provavelmente desempenhando um papel chave na organização de outros componentes, não sendo contudo requerida para a localização da γ -tubulina. Estudos com anticorpos indicaram que a pericentrina também está envolvida no processo de nucleação dos microtúbulos [Doxsey *et al.*, 1994].

Em *Drosophila* a expressão de um componente dos centrossomas é regulada por genes homeóticos. Este componente, a centrossomina está envolvido em processos de desenvolvimento dependentes de microtúbulos, sendo igualmente necessário para a função dos centrossomas mitóticos e meióticos [Heuer *et al.*, 1995; Li & Kaufman, 1996]. As centrinas são membros da família das proteínas "EF-hand" e estão envolvidas na dinâmica dos MTOCs. As centrinas promovem a contração de fibras dependente de cálcio e estão associadas aos MTOCs desde as levedura até aos mamíferos [Salisbury, 1995]. Em levedura a sua presença é requerida para a duplicação dos SPBs conjuntamente com a KAR1 [Vallen *et al.*, 1992]. Nas células animais, as centrinas estão presentes no lúmen distal dos centríolos [Paoletti *et al.*, 1996] presumindo-se que a sua função esteja relacionada com alterações estruturais dos centríolos [Sciebel & Bornens, 1995]. Embora as funções das centrinas não estejam bem definidas, os estudos efectuados sugerem que possam estar envolvidas no posicionamento e no ciclo de reprodução dos MTOCs, assim como no mecanismo pelo qual os centrossomas coordenam a divisão citoplasmática e celular [Sciebel & Bornens, 1995; Paoletti *et al.*, 1996].

Uma célula em G_1 tem dois centríolos: um maturo, que foi formado há pelo menos dois ciclos, e outro imaturo, gerado no ciclo anterior. Ambos os centríolos são replicados durante S ou G_2 . A cenexina está presente no centríolo maturo ao longo do ciclo, mas só é adquirida pelo centríolo imaturo na transição G_2/M . Esta aquisição está correlacionada com a maturação do centríolo imaturo, funcionando a cenexina como marcador da maturação dos centríolos

[Lange & Gull, 1995]. Uma proteína que requer a presença de microtúbulos para a sua associação aos centrossomas é a NuMA. Esta proteína é nuclear durante a interfase, mas após o NEB envolve os centrossomas e mantém-se associada ao pólos durante a mitose [Cleveland, 1995; Tousson *et al.*, 1991; Gaglio *et al.*, 1995; Sparks *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1993; Kallajoki *et al.*, 1993; Yang & Snyder, 1992]. A NuMA surge envolvida na organização e estabilização dos pólos do fuso, conjuntamente com a dineína citoplasmática e a dinactina [Heald *et al.*, 1997; Galio *et al.*, 1997; Merdes & Cleveland, 1997]. Esta proteína também poderá contribuir para a reformação do núcleo e na própria estrutura interna do núcleo. Outra proteína que não é um componente integral dos centrossomas é a catanina que promove activamente o corte e despolimerização dos microtúbulos. Esta proteína está altamente concentrada em torno dos centrossomas ao longo do ciclo celular e supõe-se estar envolvida no fluxo polar dos microtúbulos do fuso mediante o desfazer dos microtúbulos na extremidade (-) [McNally *et al.*, 1996].

Também foram identificadas proteínas motoras associadas a microtúbulos nos centrossomas, tais como a Xklp2 [Boleti *et al.*, 1996], a KHP1 [Vashishtha *et al.*, 1996] e a Ncd [Masuda & Shibata, 1996]. A Xklp2 é uma proteína de *Xenopus* do tipo cinesina, que se desloca em direcção as extremidades (+) dos microtúbulos e é um componente integral dos centrossomas durante todo o ciclo celular. Esta proteína está envolvida na separação dos centrossomas e na manutenção da bipolaridade do fuso [Boleti *et al.*, 1996]. A KHP1 é também da família da cinesinas, está associada com os corpos basais e centríolos de *Chlamydomonas* e envolvida na formação dos flagelos e presumivelmente do fuso mitótico [Vashishtha *et al.*, 1996]. A Ncd tem uma função essencial no estabelecimento e manutenção da bipolaridade do fusos meióticos acentrossomais em fêmeas de *Drosophila* [Matthies *et al.*, 1996], mas também é necessária durante as primeiras 14 divisões mitóticas em embriões [Endow *et al.*, 1994]. A Ncd associa-se aos centrossomas e microtúbulos do fuso durante a mitose, de um modo dependente da presença de microtúbulos. A Ncd pertence à família das cinesinas, apresentando um movimento direccionado à extremidade (-) dos microtúbulos. Os estudos efectuados com mutações no gene *ncd* indicam que esta proteína motora deverá estar implicada na manutenção dos centrossomas nos pólos do fuso [Endow *et al.*, 1994].

A regulação da actividade dos MTOCs surge associada a mecanismos de fosforilação. Existem fosfoproteínas que são detectadas nos pólos do fuso no início da mitose [Centonze & Borisy, 1990] e a activação dos MTOCs está dependente de uma cascata de cinases iniciada

pela CDK1/ciclinas mitóticas [Ohta *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1992]. De facto, a CDK1 e a ciclina B estão em parte associadas aos centrossomas desde G₂ até ao fim da mitose [Bailly *et al.*, 1989; Alfa *et al.*, 1990; Maldonado-Codina & Glover, 1992]. A associação da CDK1 e ciclina B com os centrossomas coincide com as alterações estruturais do material pericentriolar e com o aumento da actividade de nucleação de microtúbulos [Bailly *et al.*, 1989]. Envolvidas na cascata de cinase parecem também estar cinases do tipo-Polo que estão presentes nos centrossomas de um modo dependente do ciclo celular e são requeridas para a maturação funcional dos centrossomas [Sunkel & Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991; Lane & Nigg, 1996; Golsteyn *et al.*, 1995; resultados não publicados de Logarinho, E. e Sunkel, C.]. As proteínas fosfatase também estão presentes nos MTOCs e como exemplo temos a PPX, uma fosfatase serina/treonina componente integral dos centrossomas. A PPX é similar, mas não pertence à família da PP2A, e poderá estar envolvida na regulação da função dos centrossomas [Brewis *et al.*, 1993]

1.2.4.3 - Duplicação dos MTOCs

Na divisão celular, cada célula recebe um MTOC que terá de duplicar para completar um novo ciclo de divisão. Os conhecimentos sobre o processo de duplicação dos MTOCs e a sua coordenação com os restantes eventos do ciclo celular são ainda insipientes. Os centrossomas e SPBs são duplicados em geral mediante uma replicação conservativa respectivamente dos centríolos e SPBs, e com a subsequente segregação semiconservativa dos centríolos [Rose *et al.*, , 1993; Kellogg *et al.*, 1994]. Contudo, os centríolos não são essenciais na formação de todos os MTOCs animais e existem células em que os centríolos são formados *de novo* [revisão em Maniotis & Schliwa, 1991]. Os MTOCs duplicam uma só vez por ciclo, o que implica que o controlo do processo de formação dos MTOCs esteja sob a influência de mecanismos que controlam igualmente outros eventos do ciclo celular, embora seja um processo independente [Sluder *et al.*, 1990; Gard *et al.*, 1990; Balczon *et al.*, 1995].

O SPB de *S. cerevisiae* inicia a replicação em G₁, antes de Start, com a formação de um satélite de material electro-denso na face citoplasmática da meia-ponte (região unilateralmente adjacente à placa central). Na transição G₁/S são observados dois SPBs separados por uma ponte. Presume-se que a acção reguladora das CDK1/ciclinas S intervem nos processos pós-formação do satélite [Snyder, 1994]. A duplicação dos SPBs requer de

início a interacção de dois componentes da meia ponte externa do SPB, a Cdc31 (uma proteína do tipo centrina) e a KAR1 [Vallen *et al.*, 1992]. Posteriormente, a MPS1, a MPS2 e a NDC1 são também necessárias para formação dos SPBs [Winey, 1993; Snyder, 1994]. Durante a fase S os SPBs que replicaram separam-se para formar um pequeno fuso [Byers & Goetsch, 1973]. Neste processo estão envolvidas duas cinesinas funcionalmente redundantes, as Cin8 e a Kip1p, que por acção da sua actividade motora direccionada à extremidade (+) causam o deslizar dos microtúbulos antiparalelos, afastando os SPBs [Saunders & Hoyt, 1992].

Nas células animais o processo de replicação dos centríolos inicia-se com a perda da ortogonalidade entre os centríolos do par durante G_1 . Segue-se a formação e crescimento do procentríolo em G_1 tardio ou durante S e G_2 . Finalmente após a maturação do centríolo imaturo (ver cenexina) os pares de centríolos separam-se [Lange & Gull, 1995]. Os componentes envolvidos neste processo e na sua regulação não são ainda bem conhecidos, porém a γ -tubulina surge como uma potencial proteína envolvida na modelação da formação do procentríolo [Fuller *et al.*, 1995]. O factor de crescimento EGF (Elongation Grow Factor) surge como uma chave provável na activação da maquinaria de duplicação dos centrossomas, pois enquanto células CHO bloqueadas com hidroxilureia na fase S não duplicam os centrossomas, a adição do EGF reinicia essa duplicação e origina a dissociação dos eventos de replicação dos centrossomas dos ciclos de síntese de DNA e da divisão mitótica [Balczon *et al.*, 1995].

1.2.4.4 - Regulação

A activação funcional dos MTOCs depende de processos de fosforilação e acumulação de material. No início da mitose, verifica-se o aparecimento de um epítipo fosforilado, reconhecido pelo anticorpo monoclonal MPM-2 [Vandre *et al.*, 1986]. Concomitantemente, ocorre um aumento do material pericentriolar e os MTOCs exibem um aumento da capacidade nucleadora [Rieder & Borisy, 1982; Snyder & McIntosh, 1975; Kuriama & Borisy, 1981; Ohta *et al.*, 1993]. A fosforilação dos epítipos MPM-2 é de facto necessária para a função nucleadora dos centrossomas e dos SPBs [Centonze & Borisy, 1990; Masuda *et al.*, 1992]. O processo de fosforilação deverá ser regulado pela CDK1/ciclina mitótica, porém não directamente, pois o complexo purificado é incapaz de activar a nucleação de microtúbulos de centrossomas em sistemas *in vitro* [Ohta *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1992]. As cinases que

apresentam um grande potencial para estarem envolvidas na maturação funcional dos centrossomas são as da família Polo [Glover *et al.*, 1996]. Em *Drosophila*, alelos mutantes do *polo* causam severas alterações no aparelho mitótico, com a formação pólos aberrantes e fusos monopolares [Sunkel & Glover, 1988, Llamazares *et al.*, 1991]. A microinjecção de anticorpos contra a Plk1 em células humanas afecta não só processo de separação dos centrossomas bem como impede o seu aumento de volume no início da mitose. Do mesmo modo, também, a acumulação de γ -tubulina e a presença de fosfoepítomos MPM-2 é prejudicada [Lane & Nigg, 1996]. A Plk1 será provavelmente uma cinase MPM-2, pois este tipo de epítomos é gerado por uma sua presumível homóloga em *Xenopus* (Xplo1) [Kumai & Dunphy, 1996].

1.2.4.5 - Mecanismos de acção

A função básica que tem sido atribuída aos MTOCs é constituírem um ambiente favorável para o início da nucleação dos microtúbulos. Possivelmente os MTOCs proporcionam a formação de "sementes" de nucleação a partir das quais os microtúbulos são polimerizados, transpondo deste modo as limitações termodinâmicas impostas para a iniciação dos microtúbulos [Kellogg *et al.*, 1994]. Um estudo recente mostrou que os centrossomas têm uma capacidade específica para acumular dímeros de tubulina livre [Meda *et al.*, 1997], sugerindo que a criação de áreas com elevada concentração de tubulina seja uma função intrínseca dos MTOCs. Esta propriedade cria um elevado potencial para a nucleação dos microtúbulos. No entanto, a nucleação de microtúbulos a partir dos MTOCs é um processo que obedece a uma organização e não uma nucleação espontânea induzida pelas condições favoráveis. Isto implica a que existam de mecanismos de organização. Uma hipótese corrente é a existência de sítios de nucleação discretos que actuem como moldes para a iniciação da polimerização dos microtúbulos, estando a acção destes locais sujeita a regulação. Uma proteína potencialmente envolvida no estabelecimento dos sítios de nucleação é a γ -tubulina [Oakley, 1995], que surge no material pericentriolar sob a forma de anéis helicoidais associados às extremidades (-) dos microtúbulos [ver secção dedicada à γ -tubulina].

Os MTOCs não são só meros locais de nucleação de microtúbulos, uma vez que desempenham também uma função activa no controlo da dinâmica destes, por exemplo, regulando a despolimerização da extremidade (-) dos microtúbulos ancorados, ou libertandos [Kellogg *et al.*, 1994].

1.2.5 - Mecanismos de formação do fuso

O modelo mais recente para a formação do fuso faz uma integração dos mecanismos que conduzem à formação dos fusos em células que têm estruturas com capacidade de organização de microtúbulos distintas (ex: centrossomas, SPBs) e as que não as têm [Merdes & Cleveland, 1997].

1.3 – γ -tubulina

1.3.1 - Identificação da γ -tubulina

A γ -tubulina foi descrita pela primeira vez como produto do gene *mipA* em *Aspergillus nidulans* no laboratório de Berl Oakley [Oakley & Oakley, 1989], durante estudos genéticos conducentes à identificação de novas de proteínas envolvidas na função dos microtúbulos [Weil *et al.*, 1986]. O método consistiu no isolamento de mutações que suprimissem o efeito de mutações termossensíveis na β -tubulina. A ideia do método baseou-se na capacidade do bacteriófago P22 reverter certas mutações sensíveis ao calor (hs^-), por mutações em outros genes, cujos produtos interagiam fisicamente com a proteína mutante original [Jarvik & Botstein, D., 1975]. O rastreio foi dirigido para o isolamento de revertentes da *benA33*. Esta mutação no gene da principal β -tubulina em *A. nidullans* é sensível ao calor e confere resistência ao agente desestabilizador de microtúbulos benomil (benzimidazol) [Oakley & Morris, 1981]. Nestes mutantes, a mitose e a translocação de organelos são inibidas a uma temperatura restritiva, o que não acontece com a formação dos microtúbulos. Os dados sugerem que a *benA33* é uma mutação que hiperestabiliza os microtúbulos ao afectar a sua despolimerização, à temperatura restritiva [Oakley & Morris, 1981]. Entre os revertentes obtidos no rastreio, foi identificado o gene *mipA* cujos mutantes não só suprimiam as alterações provocadas pela mutação *benA33* à temperatura restritiva, bem como, em conjunto com outros alelos mutantes *benA* originavam fenótipos diferentes dos conferidos pelos alelos *benA* isolados. Todavia, os alelos mutantes de *mipA* eram silenciosos quando isolados num genótipo *benA* do tipo selvagem [Weil *et al.*, 1986]. O conjunto das observações indicou que

in vivo, o produto de *mipA* interagia especificamente, talvez fisicamente, com a β -tubulina codificada pelo gene *benA* e estava envolvido no funcionamento dos microtúbulos [Weil *et al.*, 1986].

O gene *mipA* foi clonado por "chromosome walking" [Oakley & Oakley, 1989]. A análise da sequência genômica, assim como, a dos clones de cDNA revelou que o gene *mipA* codificava para uma proteína desconhecida, mas relacionada com as α - e β -tubulinas [Oakley & Oakley, 1989]. A comparação de homologia da MAGP (produto de *mipA*) com todas as sequências conhecidas à data de α - e β -tubulinas, deu 32.3-35.2% de identidade da MAGP com as diversas β -tubulinas e 28.9-31.7% com as α -tubulinas [Oakley & Oakley, 1989], enquanto que as α - e β - tubulinas partilham uma similaridade entre ambas de 36-42%. Atendendo à substancial similaridade do produto do gene *mipA* com a superfamília das tubulinas, este foi denominado como γ -tubulina [Oakley & Oakley, 1989]. Simultaneamente, foi sugerido que a γ -tubulina deveria ter divergido da tubulina ancestral, ao mesmo tempo da divergência das α - e β -tubulinas, e deveria estar presente em todos os organismos eucariotas [Oakley & Oakley, 1989].

Os anos que se seguiram à identificação da γ -tubulina em *A. nidullans* vieram confirmar a γ -tubulina como uma proteína altamente conservada ao longo da escala filogenética eucarióta. Foram identificadas sequências de γ -tubulina, por exemplo, nas leveduras *S. cerevisiae* [Sobel & Snyder, 1995] e *S. pombe* [Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991], em outros fungos como *Ustilago violacea* [Luo & Perlin, 1993], *Trypanosoma brucei* [Scott *et al.*, 1997], e o mixomicete *Physarum polycephalum* [Dawson *et al.*, 1993], no parasita *Plasmodium falciparum* [Maessen *et al.*, 1993], em animais como *Drosophila melanogaster* [Zheng *et al.*, 1991], *Xenopus laevis* [Stearns *et al.*, 1991], Ratinho [Joshi *et al.*, 1992] e *Homo sapiens* [Zheng *et al.*, 1991], bem como em diversas plantas [Marchesi & Ngo, 1995; Liu *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 1997]. Esta distribuição tão variada da γ -tubulina permite assumir que ela esteja presente em todos os organismos eucariotas.

Já foi detectada a presença de mais que um gene codificante para uma γ -tubulina em quatro espécies. Em *Drosophila melanogaster* existe um gene com expressão essencialmente zigótica [Zheng *et al.*, 1991] e outro com expressão materna cujo produto é utilizado nas primeiras divisões do ovo [Wilson, P. G. *et al.*, 1992; Tavanois G., *et al.*, 1997]. Igualmente, *Arabidopsis thaliana* [Liu *et al.*, 1994], *Euplotes* (Genebank X85234 e X85235) e humanos

[Wise & Oakley, 1995] foram identificados dois genes. No futuro é possível que mais isoformas da γ -tubulina venham a ser conhecidas em cada espécie à semelhança com o que se verifica com as α - e β -tubulinas.

1.3.2 - Conservação das sequências proteicas

A comparação entre as sequências de aminoácidos das γ -tubulinas publicadas mostra que estas são altamente conservadas, sendo a região C-terminal a mais variável. As sequências menos homólogas são as de *Caenorhabditis elegans* (GenBank Z22179), *E. histolytica* (GenBank U20322) e *S. cerevisiae* (GenBank U14913), que divergem altamente das restantes sequências e também entre si. No entanto, diversos resíduos característicos das γ -tubulina estão também presentes nestas sequências e estudos funcionais em *S. cerevisiae* apontam para que, pelo menos neste caso, a tubulina divergente seja um membro da família das γ -tubulinas [Sobel & Snyder, 1995].

O alinhamento das sequências de aminoácidos das γ -tubulinas com as das α - e β -tubulinas permitiu confirmar que a γ -tubulina é claramente mais um membro da superfamília da tubulinas, previsivelmente mantendo estruturas terciárias semelhantes e propriedades bioquímicas relacionadas [Burns, 1995]. Os péptidos mais conservados na γ -tubulina em relação as α/β tubulinas localizam-se na região N-terminal e correspondem aos domínios presumivelmente implicados na ligação do GTP à β -tubulina, sendo provável que, tal como a β -tubulina, a γ -tubulina ligue GTP [Burns, 1995]. Contudo é improvável que ocorra a hidrólise do GTP pois o domínio implicado nessa função na β -tubulina é marcadamente diferente na γ -tubulina [Burns, 1995]. Na região C-terminal os resíduos mais conservados entre as tubulinas correspondem aos implicados na libertação das cadeias nascentes de tubulina do "chaperonine" TCP1 [Melki *et al.*, 1993] que está envolvido no correcto enrolamento de componentes do citoesqueleto [Yaffe *et al.*, 1992; Sternlicht, *et al.*, 1993]. Surgem dois péptidos divergentes nas γ -tubulinas precisamente na zona de transição entre a região de maior e de menor homologia com as outras tubulinas, dividindo a γ -tubulina em dois putativos domínios funcionais: o domínio N-terminal de ligação ao heterodímero α/β e o domínio C-terminal de intreação com os MTOCs [Burns, 1995].

1.3.3 - Localização celular

A γ -tubulina constitui menos de 1% do total das tubulinas presentes na célula [Stearns *et al.*, 1991], mas surge essencialmente concentrada nos MTOCs. De início, a γ -tubulina foi imunolocalizada nos SPBs e MTOCs citoplasmáticos em *Aspergillus* [Oakley *et al.*, 1990] e em *S. pombe* [Horio *et al.*, 1991], e nos centrossomas de linhas celulares humanas, de *Drosophila* e de ratinho [Zheng *et al.*, 1991]. Simultaneamente, no laboratório de Marc Kirschner foi demonstrado que a γ -tubulina era um componente integral altamente conservado dos centrossomas, associado ao material pericentriolar [Stearns *et al.*, 1991]. Eles observaram que a γ -tubulina se mantinha associada aos centrossomas mesmo após a despolimerização dos microtúbulos e que anticorpos específicos contra a γ -tubulina de *Xenopus* reconheciam os centrossomas numa grande variedade de linhas celulares [Stearns *et al.*, 1991]. A nível ultraestrutural esses anticorpos localizavam-se na superfície externa do material pericentriolar, na área de onde os microtúbulos são nucleados [Stearns *et al.*, 1991]. Diversos estudos posteriores vieram confirmar a γ -tubulina como um componente permanente de estruturas intracelulares que já tiveram ou ainda possuem capacidade de nucleação de microtúbulos [Palacios *et al.*, 1993]. Assim, também foi detectada a presença de γ -tubulina em estruturas acentriolares. Exemplo disso é a presença de γ -tubulina nos centros de ásteres citoplasmáticos e nos pólos dos fusos meióticos e mitóticos de oócitos e embriões iniciais de ratinho [Palacios *et al.*, 1993; Gueth-hallonet *et al.*, 1993], bem como nos pólos dos fusos mitóticos de uma linha celular acentriolar de *Drosophila* [Debec *et al.*, 1995]. Neste último caso, a focalização da γ -tubulina nos pólos do fuso é dependente da presença de microtúbulos [Debec *et al.*, 1995]. Em *Trypanosoma brucei*, a γ -tubulina localiza-se em diversas estruturas com capacidade de organização de microtúbulos [Scott *et al.*, 1997]. A divergente γ -tubulina de *S. cerevisiae* também se posiciona no SBP [Sobel & Snyder, 1995; Spang *et al.*, 1996], nas placas interna e externa de onde os microtúbulos têm origem [Spang *et al.*, 1996]. As células diferenciadas não escapam à regra da presença de γ -tubulina nos MTOCs [revisão em Joshi, 1993]. Esta foi detectada no PCM de neurónios [Baas & Joshi, 1992], na região do corpo basal de células epiteliais ciliadas e fotoreceptoras retiniais [Rizzolo & Joshi, 1993; Muresan *et al.*, 1993], e associada ao corpo basal de espermatozóides de ratinho [Palacios *et al.*, 1993]. As células animais no fim da telofase formam uma estrutura equidistante dos pólos do fuso que vai manter

a ligação entre as duas células filhas até à separação total. Esta estrutura denomina-se "midbody" e é constituída por dois feixes de microtúbulos interdigitados pela extremidades (+). A γ -tubulina acumula-se transitoriamente nas extremidades (-) dos microtúbulos do "midbody", e a sua síntese *de novo* é essencial para a formação do mesmo e consequente citocinese [Julian *et al.*, 1993; Shu *et al.*, 1995].

Nos centrossomas, a γ -tubulina não está exclusivamente presente na superfície externa material pericentriolar, estando também localizada nos centríolos [Dibbayawan *et al.*, 1995; Fuller *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 1996], mais concretamente na área em torno destes, nos satélites e noutras extensões projectadas da extremidade proximal dos centríolos, bem como, a ponte que liga os dois centríolos [Fuller *et al.*, 1995]. A γ -tubulina está igualmente presente no interior dos centríolos, numa estrutura organizada que se posiciona na extremidade proximal dos mesmos, mas ausente dos microtúbulos da parede centriolar [Fuller *et al.*, 1995].

Nas plantas, um anticorpo específico para um péptido conservado das γ -tubulina [Joshi *et al.*, 1992] reconhece a presença de uma proteína relacionada com a γ -tubulina [Marchesi & Ngo, 1995]. Esta proteína está associada a séries de microtúbulos e a estruturas que desempenham o papel de MTOCs nas plantas [Marchesi & Ngo, 1995]. A marcação é também detectada ao longo dos microtúbulos ligados aos cinetocoros [Marchesi & Ngo, 1995]. Esta distribuição da γ -tubulina não é exclusiva das plantas, pois também em células animais foi observada a presença da γ -tubulina na superfície dos microtúbulos do fuso [Lajoie-Mazenc *et al.*, 1994; Oakley *et al.*, 1990; Sunkel *et al.*, 1995; Tivosanis G. *et al.*, 1997], especialmente ao longo dos microtúbulos cinetocorianos [Lajoie-Mazenc *et al.*, 1994]. A associação com os microtúbulos ligados aos cinetocoros surge durante a prometáfase e diminui na telófase, fase em surge localizada na interzona [Lajoie-Mazenc *et al.*, 1994].

A associação da γ -tubulina com os MTOCs, em geral, é observada durante todo o ciclo celular [Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 1992], porém ocorrem variações de intensidade da marcação durante o ciclo celular [Horio *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991; Debec *et al.*, 1995; Lajoie-Mazenc *et al.*, 1994]. Estas variações estão correlacionadas com o número de microtúbulos emanados dos MTOCs, sendo maior a quantidade de γ -tubulina antigénica nos períodos de máxima actividade de nucleação dos microtúbulos por parte dos MTOCs [Zheng *et al.*, 1991].

1.3.4 - Caracterização bioquímica

As γ -tubulinas apresentam um peso molecular em torno dos 50 kDa e constituem entre de 0.001% [Zheng *et al.*, 1995] e 0.01% [Stearns & Kirschner, 1994] das proteínas totais. A γ -tubulina é substancialmente menos acídica que as α/β tubulinas e está presente nas células pelo menos nas formas centrossomal e citosólica [Moudjou *et al.*, 1996].

Em *Physarum polycephalum* foram identificadas duas formas da γ -tubulina, codificadas por um só gene, mas com comportamentos bioquímicos diversos. As duas formas têm diferente mobilidade electroforética e coeficiente de sedimentação. A forma com menor mobilidade está mais fortemente associada aos MTOCs que a forma rápida [Dawson *et al.*, 1993].

Estudos de fracionamento celular de ovos de *Xenopus* e de células de mamíferos revelaram que uma elevada percentagem da γ -tubulina não está associada aos centrossomas, sendo citosólica e solúvel [Stearns & Kirschner, 1994; Moudjou *et al.*, 1996]. Testes com agentes extractivos indicaram que só parte da γ -tubulina está fortemente associada ao centrossoma [Moudjou *et al.*, 1996], a outra parte da γ -tubulina solúvel está envolvida em complexos pesados [Moudjou *et al.*, 1996] e uma pequena parte está associada à Tcp1 [Moudjou *et al.*, 1996; Vassilev *et al.*, 1995]. No citoplasma de ovos *Xenopus*, bem como em células somáticas de vertebrados, a forma solúvel está presente num complexo que apresenta uma velocidade de sedimentação 25S (γ -soma 25S) [Stearns & Kirschner, 1994]. Os componentes deste complexo são ainda desconhecidos, no entanto em *Xenopus* o complexo parece conter pelo menos 7 polipéptidos, entre os quais existem os três tipos de tubulinas [Zheng *et al.*, 1995]. Foi estimado que o complexo deverá ser composto por 10-13 monómeros de γ -tubulina, 1-2 dímeros de α/β tubulina e várias outras proteínas não tubulinas [Zheng *et al.*, 1995]. A nível ultraestrutural, o complexo purificado surge com um estrutura em anel aberto com as duas extremidade sobrepostas com um diâmetro de 25-28 nm, formando uma hélice virada à esquerda com menos de duas voltas [Zheng *et al.*, 1995]. Atendendo à estrutura do complexo, este foi denominado por complexo anel de γ -tubulina (γ TuRC) [Zheng *et al.*, 1995]. Estruturas semelhantes foram identificadas no PCM de centrossomas isolados de embriões de *Drosophila* [Moritz *et al.*, 1995]. Desconhece-se, se esta estrutura contém o complexo isolado de extractos de embriões de *Drosophila*, do qual a γ -tubulina é componente

conjuntamente com, pelo menos, as proteínas centrossomais CP60 e CP190, e que pode interagir com microtúbulos [Raff *et al.*, 1993]. Complexos proteicos contendo γ -tubulina estão também presentes em preparações de microtúbulos de cérebros de mamífero [Detraves *et al.*, 1997]. Estes complexos apresentam uma composição similar aos complexos com γ -tubulina isolados de ovos de *Xenopus*, mas não exibem uma ultraestrutura homogênia [Detraves *et al.*, 1997].

A γ -tubulina também foi encontrada em complexos formados *in vitro* a 37° na presença de ATP ou GTP a partir de supernadantes de células CHO paradas com nocodazole [Marchesi & Ngo, 1995]. Estes complexos são heterogênicos em tamanho e contêm α -, β - e γ -tubulina conjuntamente com uma proteína do tipo do factor de alongação EF1 α e HSP70 ou actina dependendo da presença ou ausência de nucleotídeos [Marchesi & Ngo, 1995].

Quando altamente super-expressa em células de mamífero, a γ -tubulina forma estruturas tubulares com ~50 nm de diâmetro (γ -túbulos), resistentes à despolimerização induzida pelo frio ou por drogas [Shu & Joshi, 1995]. Assim, a γ -tubulina é capaz se associar em polímeros tal qual as suas congêneres α/β tubulinas. Foi, igualmente observado em células Sf9 e HeLa que a γ -tubulina existe na forma de dímeros, desconhecendo-se se são homo ou heterodímeros [Vassilev *et al.*, 1995].

1.3.5 - Funções da γ -tubulina

Após a identificação da γ -tubulina logo começaram as especulações quanto à sua função na célula. De imediato a primeira hipótese que surgiu foi a de a γ -tubulina estar envolvida na nucleação dos microtúbulos [Oakley *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Oakley, 1992]. Os estudos entretanto efectuados têm vindo confirmar esta hipótese, apoiando fortemente um papel da γ -tubulina na nucleação dos microtúbulos, e também, na organização e estabilização destes, bem como na estrutura dos MTOCs.

Um dos melhores meios para aquilatar as funções de uma proteína *in vivo* é a análise dos efeitos produzidos por mutações no gene codificante para a mesma. As mutações iniciais no gene *mipA* que conduziram à descoberta da γ -tubulina eram silênciosas quando isoladas [Weil *et al.*, 1986]. Assim, para avaliar a função da γ -tubulina em *Aspergillus* foi induzido um alelo mutante de *mipA* por disrupção do gene. Esta mutação é recessiva e letal. A disrupção do

gene da γ -tubulina inibe a divisão nuclear, mas não a progressão do ciclo celular, originando a formação de núcleos possivelmente poliplóides. Na ausência de γ -tubulina o fuso mitótico não é formado e os microtúbulos citoplasmáticos sofrem uma redução em número e tamanho [Oakley *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1997]. Estes resultados indicaram que em *A. nidullans* a γ -tubulina é necessária para a formação dos microtúbulos do fuso mitótico, mas não para os citoplasmáticos, embora neste caso desempenhe um papel na formação de microtúbulos normais [Martin *et al.*, 1997]. Em *S. pombe*, a γ -tubulina também é essencial [Stearns *et al.*, 1991; Horio *et al.*, 1991] e está envolvida no controlo da formação dos microtúbulos. A disrupção do gene *gtb1* origina uma organização anormal dos microtúbulos, revelada pelo aparecimento de células em que a imunomarcagem com anti- α -tubulina é muito fraca, reduzida a um pequeno ponto no centro dos cromossomas, ou uma marcação muito forte de um fuso alongado que corre através dos cromossomas [Horio *et al.*, 1991]. Em ambos os casos, os cromossomas apresentam-se condensados e não ocorre a sua segregação. Variações na quantidade de γ -tubulina ainda presente nas células poderão justificar as diferenças observadas, com a ausência total de γ -tubulina a impedir a formação do fuso e a redução nos seus níveis a permitir ainda o estabelecimento de um fuso, embora não funcional [Horio *et al.*, 1991]. A γ -tubulina de *S. cerevisiae* é igualmente essencial para a divisão nuclear, visto que os alelos mutantes da TUB4 causam a paragem das células com grandes "buds" e o DNA replicado [Sobel & Snyder, 1995]. Em geral, nos alelos mutantes os microtúbulos nucleares e citoplasmáticos são aberrantes [Sobel & Snyder, 1995]. Contudo, o efeito primário é dependente do alelo, com deficiente organização do fuso mitótico em alguns [Spang *et al.*, 1996], enquanto que noutros surgem alterações na capacidade de nucleação de um dos SPB do par, originando a formação de fusos monopolares [Marschall *et al.*, 1996]. Em *Drosophila* também têm sido obtidos alelos mutantes para os dois genes de γ -tubulina. A análise de mutantes para o gene da γ -tubulina 37C, que tem uma expressão materna, revelou que esta isoforma é necessária para a organização do fuso meiótico, em fêmeas, e do fuso mitótico, nas primeiras divisões do embrião [Tavosanis, *et al.*, 1995]. O estudo de uma mutação no gene de expressão zigótica (*ytub23C*) constitui o objectivo central desta tese.

As abordagens anteriores da função *in vivo* da γ -tubulina incidiram sobre a depleção da mesma, contudo também a superexpressão de γ -tubulina em células de mamífero causa uma desorganização da estrutura microtubular e impede a organização de fusos funcionais e a

citocinese [Shu & Joshi, 1995]. Após a despolimerização induzida dos microtúbulos, nas células transformadas ocorre uma nucleação de microtúbulos dispersa pelo citoplasma, frequentemente associada à presença de γ -tubulina, e um aumento do número de microtúbulos nucleados. Contrariamente, nas células controlo não transformadas os microtúbulos são organizados radialmente pelo centrossoma [Shu & Joshi, 1995]. Como já referido anteriormente, em parte das células transformadas surgem γ -túbulos [Shu & Joshi, 1995].

A microinjecção de anticorpos específicos contra um péptido conservado nas γ -tubulinas permitiu outra análise *in vivo* da função da γ -tubulina em células de mamífero [Joshi *et al.*, 1992]. A presença do anticorpo em células em interfase impede a reformação dos ásteres citoplasmáticos após despolimerização dos microtúbulos induzida por frio ou nocodazol. Em células injectadas antes de mitose, o anticorpo provoca a formação de um fuso aberrante com um reduzido número de microtúbulos, enquanto que a microinjecção durante a metafase, anula a funcionalidade do fuso [Joshi *et al.*, 1992]. Este anticorpo também impede a nucleação de microtúbulos *in vitro* por centrossomas interfásicos e mitóticos [Joshi *et al.*, 1992]. A γ -tubulina emergiu deste estudo como um componente dos MTOCs requerido para a nucleação dos microtúbulos ao longo do ciclo celular. A corroborar esta ideia está o efeito inibitório de anticorpos anti- γ -tubulina na activação e nucleação de microtúbulos por SPBs de *S. pombe* [Masuda & Shibata, 1996]. Quando incubados *in vitro* na presença de taxol com tubulina, isolada de cérebro de porco, os SPBs mitóticos nucleiam microtúbulos, enquanto que os SPBs interfásicos só adquirem essa capacidade após a incubação em extractos "mitóticos" de ovos de *Xenopus* [Masuda *et al.*, 1992]. A pré-incubação dos SPBs interfásicos ou mitóticos com anticorpos anti- γ -tubulina inibe a sua capacidade de nucleação [Masuda & Shibata, 1996]. Este efeito inibitório deverá ter a sua acção não só sobre o processo de nucleação, mas também sobre a activação dos SPBs, pois anticorpos específicos para região N-terminal da γ -tubulina são mais eficientes na inibição da actividade dos SPBs interfásicos que dos mitóticos [Masuda & Shibata, 1996]. A região N-terminal surge implicada na activação dos SPBs, dado que os factores presentes nos extractos de *Xenopus* que interagem com um fragmento desta região são requeridos para a conversão dos SPBs interfásicos em mitóticos com capacidade de nucleação [Masuda & Shibata, 1996]. Entre estes factores está uma cinase que não a p34^{cdc2} ou a cinase MAP, pois a presença de estaurosporina (inibidor de proteínas cinase) inibe a capacidade activadora das fracções que se ligam ao fragmento amino-terminal em

cromatografia de afinidade, enquanto que a depleção da p34^{cdc2} ou da cinase MAP não tem esse efeito [Masuda & Shibata, 1996]. Estes resultados mostram que em *S. pombe* a γ -tubulina é um componente do complexo promotor da nucleação de microtúbulos com o qual interagem proteínas requeridas para a activação do complexo [Masuda & Shibata, 1996]. A activação dos SPBs não requer o recrutamento de γ -tubulina, porém no caso da formação de centrossomas *in vitro* a partir de centríolos de esperma de *Xenopus* esse recrutamento é essencial [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Os ovos não fertilizados de *Xenopus* não contêm centrossomas, mas têm os componentes necessários para a formação de centrossomas [Gard *et al.*, 1990] após a adição de centríolos de esperma, caso da fertilização, ou outros corpos basais [Heidemann & Kirschner, 1975]. Os centríolos de esperma de *Xenopus* não contêm γ -tubulina detectável antes da incubação nos extractos de ovos. Contudo, após essa incubação passa a ser assinalável a presença de γ -tubulina concomitantemente com a aquisição da capacidade de nucleação, ou seja com a formação de um centrossoma [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Com a γ -tubulina surgem igualmente associados aos centríolos epítomos fosforilados [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994], enquanto que outros componentes centrossomais como a pericentrina, a centrina e α -tubulina estão presentes já antes da incubação nos extractos [Stearns & Kirschner, 1994]. A formação do centrossoma neste sistema *in vitro* é um processo dependente do recrutamento de γ -tubulina presente nos extractos sob a forma do γ -soma 25S e que requer ATP. O bloqueamento com anticorpos específicos ou a depleção de γ -tubulina (mais proteínas associadas) dos extractos suprime a aquisição da capacidade de nucleação de microtúbulos por parte dos centríolos de esperma, enquanto que a ausência de ATP têm o mesmo efeito supressor, sendo a sua presença crucial para o recrutamento da γ -tubulina [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Estes resultados indicaram que a γ -tubulina está envolvida no processo de formação dos centrossomas em ovos de *Xenopus* após a fertilização.

Independentemente dos centrossomas, os complexos citosólicos de γ -tubulina, como o γ -soma 25S, têm alta afinidade para com microtúbulos induzidos por taxol ou DMSO, copurificando com estes [Raff *et al.*, 1993; Stearns & Kirschner, 1994; Zheng *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 1996]. Igualmente, os monómeros de γ -tubulina de *Chlamydomonas* expressa num sistema de baculovirus em células Sf9, também se associam aos microtúbulos de um modo dependente da concentração salina [Vassilev *et al.*, 1995]. A corroborar estes dados

cromatografia de afinidade, enquanto que a depleção da p34^{cdc2} ou da cinase MAP não tem esse efeito [Masuda & Shibata, 1996]. Estes resultados mostram que em *S. pombe* a γ -tubulina é um componente do complexo promotor da nucleação de microtúbulos com o qual interagem proteínas requeridas para a activação do complexo [Masuda & Shibata, 1996]. A activação dos SPBs não requer o recrutamento de γ -tubulina, porém no caso da formação de centrossomas *in vitro* a partir de centríolos de esperma de *Xenopus* esse recrutamento é essencial [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Os ovos não fertilizados de *Xenopus* não contêm centrossomas, mas têm os componentes necessários para a formação de centrossomas [Gard *et al.*, 1990] após a adição de centríolos de esperma, caso da fertilização, ou outros corpos basais [Heidemann & Kirschner, 1975]. Os centríolos de esperma de *Xenopus* não contêm γ -tubulina detectável antes da incubação nos extractos de ovos. Contudo, após essa incubação passa a ser assinalável a presença de γ -tubulina concomitantemente com a aquisição da capacidade de nucleação, ou seja com a formação de um centrossoma [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Com a γ -tubulina surgem igualmente associados aos centríolos epítomos fosforilados [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994], enquanto que outros componentes centrossomais como a pericentrina, a centrina e α -tubulina estão presentes já antes da incubação nos extractos [Stearns & Kirschner, 1994]. A formação do centrossoma neste sistema *in vitro* é um processo dependente do recrutamento de γ -tubulina presente nos extractos sob a forma do γ -soma 25S e que requer ATP. O bloqueamento com anticorpos específicos ou a depleção de γ -tubulina (mais proteínas associadas) dos extractos suprime a aquisição da capacidade de nucleação de microtúbulos por parte dos centríolos de esperma, enquanto que a ausência de ATP têm o mesmo efeito supressor, sendo a sua presença crucial para o recrutamento da γ -tubulina [Felix *et al.*, 1994; Stearns & Kirschner, 1994]. Estes resultados indicaram que a γ -tubulina está envolvida no processo de formação dos centrossomas em ovos de *Xenopus* após a fertilização.

Independentemente dos centrossomas, os complexos citosólicos de γ -tubulina, como o γ -soma 25S, têm alta afinidade para com microtúbulos induzidos por taxol ou DMSO, copurificando com estes [Raff *et al.*, 1993; Stearns & Kirschner, 1994; Zheng *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 1996]. Igualmente, os monómeros de γ -tubulina de *Chlamydomonas* expressa num sistema de baculovirus em células Sf9, também se associam aos microtúbulos de um modo dependente da concentração salina [Vassilev *et al.*, 1995]. A corroborar estes dados

bioquímicos está a presença de γ -tubulina no centro de ásteres induzidos por DMSO ou taxol [Gueth-hallonet *et al.*, 1993; Stearns & Kirschner, 1994]. Outros componentes centrossomais como a pericentrina e os epítomos MPM2 estão igualmente presentes no centro destes ásteres [Stearns & Kirschner, 1994].

A localização da γ -tubulina no centro de organizadores de microtúbulos sugere a sua possível associação as extremidades (-) dos microtúbulos. Esta hipótese foi reforçada por um estudo com γ -tubulina humana sintetizada *in vitro* [Li & Joshi, 1995]. Este estudo mostrou que não só a γ -tubulina interage específica e fortemente com microtúbulos de modo saturável, bem como esta interacção é com as extremidades (-) dos microtúbulos numa estequiometria calculada em 12.6 ± 4.9 moléculas por microtúbulo [Li & Joshi, 1995]. É de notar que este número está próximo do número de protofilamentos, ou seja 13, que constituem os microtúbulos nucleados pelos centrossomas e poderá ser o reflexo de uma eventual actividade de molde da γ -tubulina na iniciação dos microtúbulos [Oakley *et al.*, 1990; Oakley, 1992]. Segundo este modelo, um anel de γ -tubulina estaria na base dos microtúbulos, fornecendo o suporte para a iniciação da polimerização dos dímeros de α/β tubulina e impondo o número de protofilamentos constituintes do microtúbulo [Oakley, 1992]. Em concordância com este modelo está a estrutura do complexo γ -soma 25S em *Xenopus*: um anel (γ TuRC) constituído, entre outras proteínas, por 10-13 moléculas de γ -tubulina [Zheng *et al.*, 1995]. O γ TuRC promove a nucleação de microtúbulos *in vitro*, aparentemente na proporção de um γ TuRC para cada microtúbulo [Zheng *et al.*, 1995]. Os microtúbulos nucleados na presença de γ TuRC têm uma estrutura anelar em só uma das extremidades, que deverá ser a extremidade (-), uma vez que o γ TuRC afecta negativamente o crescimento desta extremidade [Zheng *et al.*, 1995]. A reconstrução tridimensional ultraestrutural de centrossomas isolados de embriões de *Drosophila* conjugada com anticorpos anti- γ -tubulina marcados com ouro permitiu constatar que as estruturas similares aos γ TuRC presentes no material pericentriolar contêm agregados de γ -tubulina [Moritz *et al.*, 1995]. Estes agregados estão dispostos em arranjos circulares correspondentes à forma dos anéis e situam-se na base da extremidade dos microtúbulos embebida no PCM. Estes dados apontam para que a semente de nucleação dos microtúbulos seja uma estrutura em forma de anel que contém um número de moléculas de γ -tubulina determinante do número de protofilamentos constituintes dos microtúbulos [Zheng *et al.*, 1995; Moritz *et al.*, 1995]. Os complexos nucleadores de microtúbulos deverão ser formados

em parte no citoplasma, associar-se a componentes previamente presentes no centrossoma, e a sua capacidade nucleadora ser activada de um modo dependente do ciclo celular.

O modelo de nucleação Oakley e Mitchison propõe uma associação do anel iniciador ao topo do microtúbulo [Zheng *et al.*, 1995; Oakley, 1995]. Um modelo alternativo propõe que os anéis de γ -tubulina correspondam a γ -protofilamentos curvos muito estáveis, que podem parcialmente assumir uma conformação esticada, que funcione como um pilar a partir do qual se forma o microtúbulo. Os protofilamentos de α/β tubulina seriam formados mediante interacções laterais dos dímeros de α/β tubulina com o γ -protofilamento [Erickson & Stoffler, 1996]. Este segundo modelo, baseia-se no enrolamento em forma de anel, assumido pelos α/β -protofilamentos nas extremidades (-) dos microtúbulos [Mandelkow *et al.*, 1991], e pelos FtsZ-protofilamentos bacterianos [Erickson *et al.*, 1996], o que indica que este seja um mecanismo conservado ao longo do processo evolutivo. Um outro modelo sugere que os anéis de γ -tubulina poderão não estar directamente envolvidos na nucleação, mas sim, actuando na cobertura e estabilização de extremidade (-) dos microtúbulos [Murphy & Stearns, 1996]. Qual o modelo que reflecte o que ocorre *in vivo* é ainda uma questão em aberto [Pereira & Schiebel, 1997].

A γ -tubulina não deverá estar só empenhada num papel de nucleação, porquanto esta tubulina está presente ao longo de microtúbulos particularmente estáveis [Lajoie-Mazenc *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1997; Wolf & Joshi, 1996; Liu *et al.*, 1994], aventando a hipótese de também estar envolvida na regulação da estabilidade dos microtúbulos. A sua localização centriolar sugere igualmente uma participação na nucleação e estabilização dos microtúbulos centriolares [Moudjou, 1996] e na replicação dos centríolos [Fuller *et al.*, 1995].

A conjugação de todos estes estudos indica claramente que a γ -tubulina desempenha um papel na nucleação/organização/dinâmica dos microtúbulos, por mecanismos que agora começam a ser desvendados. O trabalho desenvolvido na presente tese pertence ser mais um contributo para o alargamento dos conhecimentos sobre a γ -tubulina *in vivo*.

1.4 - A *Drosophila melanogaster*

1.4.1 - Características como modelo de estudo da divisão celular

A *Drosophila melanogaster*, vulgarmente designada como mosca da fruta, é um ótimo modelo para o estudo de diversos processos biológicos, pois é um organismo multicelular geneticamente bem caracterizado, com um ciclo de vida curto, de fácil manutenção em laboratório e que permite facilmente a execução de estudos genéticos e moleculares.

As características do seu ciclo de vida, aliadas à facilidade de mutagenese, a identificação dos locus mutados e a manipulação genética, tornaram a *Drosophila* num organismo de eleição para o estudo dos genes envolvidos na divisão celular.

1.4.2 - O genoma da *Drosophila*

A *Drosophila melanogaster* apresenta um complemento haplóide de quatro cromossomas, que comportam os cerca de $1,7 \times 10^8$ pb que constituem o seu genoma. Nas células diplóides, existem em duas cópias individualizadas dos autossomas 2, 3 e 4, e dois cromossomas sexuais. As fêmeas têm dois X (cromossoma 1) e os machos existe um X e um Y.

Certas células de *Drosophila* exibem cromossomas politénicos gigantes, que mais não são que cromossomas formados por DNA altamente replicado, estando todos cromossomas ligados entre si através do cromocentro, que reúne os centrómeros de cada cromossoma. Estes cromossomas são facilmente observados por microscopia óptica e apresentam um bandejamento característico específico. Com base neste padrão de bandas, os cromossomas politénicos foram divididos em sectores, o que permite efectuar o mapeamento do genoma de *Drosophila*.

1.4.3 - Ciclo de vida da mosca

A *Drosophila* passa por diversos estádios de desenvolvimento durante o seu ciclo de vida de cerca de 14 dias. Do ovo fecundado forma-se um embrião que dá origem a uma larva

do 1º estágio, a qual cresce, passando a larva do 2º e, seguidamente, do 3º estágio. Findo a fase larvar, forma-se uma pupa, no interior da qual a larva sofre um processo de metamorfose que irá originar o indivíduo adulto [Ashburner, 1989].

1.4.4 - A divisão celular em *Drosophila*

Os primeiros 13 ciclos de divisão do zigoto diplóide de *Drosophila* consistem numa rápida sucessão intercalada de fases S e M, sem intervalos e citocinese, originando a formação de um sincício de núcleos cujas as divisões são simultâneas. Estes ciclos de divisão ocorrem quase exclusivamente à custa de produtos (mRNAs, proteínas, etc.) de origem materna, que são acumulados no ócito durante a oogénese. Ao 14º ciclo ocorre a celularização e o embrião entra no processo de gastrulação. Durante o 14º ciclo inicia-se a transcrição extensiva do genoma do zigoto e surge uma fase G2 de extensão variável conforme o domínio mitótico. Após este ciclo só ocorrem mais 3-4 ciclos de divisão celular para formar todas as células que constituirão a larva. O crescimento da larva vai ocorrer por aumento do volume celular, que pode ser acompanhado de ciclos de endoreduplicação (formados por fase S e G1), que originam a politenização dos cromossomas [Ashburner, 1989].

Os únicos tecidos que permanecem mitoticamente activos na larva são os que irão constituir o indivíduo adulto: os neuroblastos, os discos imaginais, os histoblastos abdominais e as células das linhas germinais. Estes tecidos já apresentam um ciclo celular contituidos por quatro fases. Durante a pupação só permanece actividade mitótica nos histoblatos abdominais e nas células das linhas germinas. Finalmente no indivíduo adulto, as divisões mitóticas restringem-se às oogónias e espermatogonias [Ashburner, 1989].

1.4.5 - Identificação de mutações que afectam a divisão celular em *Drosophila*

As características particulares do desenvolvimento da *Drosophila* fazem com que alterações em genes envolvidos no ciclo celular possam fazer surtir os seu efeitos em dois estádios do desenvolvimento: nas primeiras fases embrionárias e nas larvas no 3º estágio tardio.

O início do desenvolvimento embrionário é um período de elevada actividade mitótica, que depende de produtos de origem materna depositados no ovo. Mutações em genes do ciclo

celular cujos produtos são necessários para o desenvolvimento embrionário, conduzem à letalidade do embrião e podem ser caracterizadas por exame citológico dos embriões.

No caso de mutações em genes específicos das divisões sinciciais do início da embriogénese, as fêmeas homozigóticas em que têm origem estes embriões, conseguem atingir a adultícia à custa dos produtos do tipo selvagem depositados no ovo pela sua progenitora heterozigótica. No caso de genes necessários durante o desenvolvimento, incluindo os necessários para as divisões dos tecidos imaginais, a actividade do gene mutado pode ser suficiente para a formação das fêmeas adultas, mas não para provir o ovo (mutação hipomórfica) [Gatti & Goldberg, 1991; Ripoll *et al.*, 1987]. Este efeito hipomórfico pode ser potenciado pela eventual perdurância de produtos maternos do tipo selvagem [Carmena *et al.*, 1991].

As larvas atingem o terceiro estado praticamente sem a necessidade da expressão zigótica de genes envolvidos na mitose, pois as células que as constituem todas foram formadas durante a embriogénese à custa dos produtos de origem materna. A excepção são os neuroblastos, os discos imaginais e histoblastos que vão dar origem às estruturas do indivíduo adulto e são praticamente dispensáveis para a sobrevivência das larvas, tal como as células goniais. Esta especificidade torna desnecessários à larva muitos dos genes envolvidos na divisão celular, permitindo assim a sobrevivência de muitos alelos mutantes mitóticos até uma fase tardia do desenvolvimento. A análise citológica de neuroblastos do 3º estágio larvar permite a identificação destes alelos e a sua caracterização [Gatti & Goldberg, 1991; Ripoll *et al.*, 1987].

Deste modo a *Drosophila melanogaster* tornou-se num importante meio para a identificação, a caracterização e o estudo de genes envolvidos no ciclo celular e particularmente na mitose. São já diversos os genes do ciclo celular caracterizados neste sistema [Gatti & Goldberg, 1991; Ripoll *et al.*, 1987; Gonzalez *et al.*, 1994; Glover, 1989; Glover, 1989].

1.4.6 - Elementos P

Uma das abordagens mais simples para clonar genes mitóticos é a utilização de mutantes induzidos por elemento P e clonagem do DNA a ele adjacente [Cooley *et al.*, 1988; Steller & Pirrota, 1985; Gatti & Baker, 1991].

Os elementos P são fragmentos de DNA que têm a capacidade de se inserirem no genoma da *Drosophila* e que possuem um alto potencial para a execução de experiências de manipulação controlada [367 Engels, 1983; Cooley *et al.*, 1988; 369 Sentry & Kaiser, 1992].

Os elementos P dividem-se em elementos completos com 2,9 kb e incompletos, que resultam de deleções internas dos elementos completos. Os elementos completos possuem repetições terminais invertidas de uma sequência de 31 pb e uma sequência interna que codifica para duas proteínas: uma transposase, e uma proteína repressora [O'Hare & Rubin, 1983].

A transposição dos elementos P depende exclusivamente da presença das repetições terminais invertidas e da transposase, uma enzima cuja produção está limitada às células das linhas germinais. A transposição é um processo regulado, que só ocorre quando se cruzam machos que contêm elementos P (estirpes P) com fêmeas que não os contêm (estirpes M), e não ocorre nos cruzamentos recíprocos. O mecanismo de regulação da transposição parece depender de factores de repressão presentes no citoplasma [Misra & Rio, 1990].

Os elementos P defectivos que não têm capacidade de mobilização autónoma podem ser mobilizados por fornecimento de uma fonte de transposase. Esta pode ser provida por elementos P sem capacidade de mobilização, permitindo assim um controlo sobre o número de elementos inseridos e a sua estabilização nos locais de inserção. Esta característica permite a execução de programas de mutagenese controlada [Cooley, *et al.*, 1988; Gatti & Baker, 1991] que têm resultado no isolamento de diversos alelos mutantes e a caracterização dos correspondentes genes, sendo disso exemplo o alelo mutante objecto de estudo nesta tese.

1.4.6 - Espermatogénese

A espermatogénese oferece um excelente meio para o estudo da divisão celular, atendendo a que muitas funções envolvidas na divisão mitótica são partilhadas pela divisão meiótica. Assim, não é de estranhar que o efeito de diversos mutantes mitóticos tenha reflexos também na meiose.

A espermatogénese em *Drosophila* é um complexo processo que se inicia com a divisão mitótica das células das linhas germinais, que dão origem às células goniais primárias. Estas células por sua vez sofrem quatro ciclos sucessivos de divisão mitótica, originando um cisto com dezasseis espermatócitos primários que mantêm pontes de ligação citoplasmáticas entre si, resultantes de citocinese incompleta. Estas conexões intercelulares vão permitir um

desenvolvimento síncrono de todas as células do cisto e mantêm-se quase até ao final do processo. Este cisto é envolvido por duas células somáticas [revisão em Fuller, 1993].

Os espermatócitos primários vão passar por um período de crescimento até atingirem as divisões meióticas. A replicação do DNA ocorre num estágio inicial do desenvolvimento do cisto. O crescimento dos espermatócitos ocorre assim maioritariamente durante a fase G₂. Durante este período as células vão aumentar 25 vezes em volume e vão multiplicar várias vezes o número de mitocôndrias que cada uma contém. Os espermatócitos primários são divididos em duas fases consoante o posicionamento do núcleo. Na primeira fase o núcleo encontra-se dentro da célula numa posição assimétrica, daí a designação de espermatócitos polares. É no decorrer desta fase que os centríolos são duplicados, estando os pares de centríolos localizados nas proximidades do núcleo. Com a progressão do crescimento das células, os centríolos deslocam-se para a superfície da célula e o núcleo toma uma posição central, originando os espermatócitos apolares. Estas células vão sofrer uma série de alterações, nomeadamente ao nível da organização interna das membranas e do núcleo, originando os espermatócitos primários maduros [revisão em Fuller, 1993].

Durante a fase apolar, também os centríolos passam por modificações. Os dois pares de centríolos encontram-se à superfície da células com os membros de cada par dispostos num arranjo em ângulo recto. Cada centríolo aumenta em comprimento passando a ser constituído por duas partes morfológicamente distintas. A parte proximal está embebida no citoplasma e apresenta o arranjo circular típico de nove tripletos de microtúbulos. A parte distal projecta-se sob uma evaginação da membrana e é composto por um anel de nove singletos de microtúbulos com ganchos. A zona de transição têm nove dupletos com ganchos. Nesta zona de transição existe um microtúbulo central, mas nas zonas proximal e distal não existem microtúbulos centrais [Tates, 1971].

Na transição para a primeira divisão meiótica os cromossomas homólogos e os sexuais surgem em pares que condensam, podendo ser observado por microscopia óptica a formação de três grupos que se vão tornando compactos à medida que a meiose progride. É de referir que nos machos de *Drosophila* não ocorre recombinação nem a formação dos complexos sinaptonemais [Cooper, 1965], não sendo ainda muito conhecido o mecanismo de emparelhamento destes cromossomas.

Na entrada em meiose I, o núcleo mantém um sistema de membrana dupla e é rodeado por diversas camadas de outras membranas (parafusiais). As regiões polares também são

cobertas por camadas de membranas (astrais), que apresentam um buraco central, que cria espaço para o posicionamento dos centríolos [Tates, 1971].

O exame da meiose nos espermatócitos de *Drosophila* pode ser feito em preparações de células vivas por microscopia de contraste de fase, graças à associação de membranas, e também mitocôndrias, aos fusos, o que possibilita a visualização dos mesmos desde a sua formação até à telofase, .

Os fusos meióticos são formados a partir de microtúbulos emanados pelos centrossomas que formam os centros astrais. Estes fusos são formados por microtúbulos nucleares ligados aos cinetócoros e outros correndo de pólo-a-pólo, e microtúbulos extranucleares dirigidos ao equador do fuso. Estes últimos estão interligados com as membranas extranucleares e deverão desempenhar um papel na organização das mesmas e das mitocôndrias em torno do núcleo [Church & Lin, 1982; Fuller *et al.*, 1987].

As díadas de cromossomas ligam-se aos microtúbulos mediante cinetocoros partilhados por ambas as cromátidas de cada cromossoma homólogo [Church & Lin, 1982], e entram em movimentos erráticos até atingirem uma posição aproximadamente equatorial [Church & Lin, 1985], após o que entram em anáfase I e telofase I. Durante a anáfase I, os cromossomas perdem o seu aspecto compacto e os braços das cromátidas separam-se. Em profase II, os cromossomas têm um aspecto em cruz [Cooper, 1965].

Após a meiose I, o cisto inicial passa a ser constituído por 32 espermatócitos secundários, que irão passar por uma divisão equatorial (meiose II) semelhante à meiose I.

Nos espermatócitos primários não há replicação dos centríolos, cada pólo do fuso secundário contém um único centríolo que irá mais tarde irá funcionar como corpo basal na formação do axonema [Tates, 1971].

Finda a divisão meiótica, o cisto é composto por 64 espermatídios haplóides que entram num processo de diferenciação que culmina com a formação dos espermatozóides maduros [Stanley *et al.*, 1972; revisão em Fuller, 1993].

Durante no início da espermiogénese, as mitocôndrias fundem-se e formam um corpo esférico, o denominado "nebenkern" pela sua proximidade ao núcleo. No corte ultrastructural do "nebenkern" observa-se o enrolamento em camadas das membranas mitocôndriais fundidas, o que motivou a classificação desta fase da espermiogénese como "onion stage". Nesta fase, os "nebenkern" estão juntos ao núcleo e ambos apresentam um diâmetro regular, representativo da quantidade de material que ambos contêm [Gonzalez *et al.*, 1989]. O centríolo converte-se

em corpo basal e localiza-se junto à membrana nuclear, perto à ligação núcleo com o "nebenkern".

Nas fases seguintes da espermiogénese, o axonema é alongado, sendo o crescimento acompanhado de dois derivados mitocondriais, originários do "nebenkern" [Stanley, 1972; Tokuyasu, 1974a]. No fim do alongamento do axonema, o núcleo é transformado por condensação do DNA e enlongamento, até atingir uma forma em agulha, por um processo mediado por microtúbulos [Tokuyasu, 1974b]. Após a alongação do núcleo, a cabeça é alinhada com o complexo axonemal [Tokuyasu, 1975] e inicia-se um processo de individualização de cada espermátidio. Grande parte do citoplasma é eliminado, os derivados mitocondriais compactados e cada espermátidio envolvido na sua membrana plasmática [Stanley, 1972].

Os espermátidios são mantidos em feixe dentro do cisto, ao longo da espermiogénese. Após a individualização o feixe é torcido e os espermatozóides libertados no lúmen dos testículos, de onde passam para as vesículas seminais [Lindsley & Tokuyasu, 1980].

Muitos eventos da diferenciação ocorrem por processos independentes ou semi-independentes. A espermatogénese prossegue mesmo quando um processo está alterado o que conduz à formação de células aberrantes. Esta característica cria a aparecimento de muitos mutantes que exibem um fenótipo mutante secundário comum que poderá não resultar de efeitos directos da mutação [Fuller, 1993].

1.5 - Antecedentes históricos e objectivos do projecto

O presente trabalho foi desenvolvido na continuidade dos estudos efectuados pelo Professor Doutor Claudio Sunkel na identificação de genes envolvidos no mecanismo de divisão celular. O rastreio de uma colecção de linhas mutantes de *Drosophila melanogaster* geradas por inserção de elemento P permitiu, através da análise do fenótipo mitótico observado em neuroblastos de larvas no 3º estado larvar, isolar a linha P141 que apresentava a inserção de um elemento P na região 23C. Os indivíduos homozigóticos da linha P141 morriam num estado larvar avançado ou já durante a pupação. As larvas apresentavam cérebros e discos imaginais de reduzido tamanho e um fenótipo mitótico em neuroblastos caracterizado por um elevado grau de poliplóidia, um baixo índice de figuras mitóticas, uma quase ausência de anáfases e alterações na organização das figuras mitóticas observadas (Fig. 1). Estudos de imunofluorescência revelaram a presença de fusos mitóticos aberrantes e uma distribuição irregular do componente centrossomal CP190 (Fig. 2 e 3) [Gomes, R, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. Estes resultados indicaram estarmos em presença de uma mutação que afectava a organização dos microtúbulos, bem como a estrutura e função dos MTOCs. Atendendo ao facto de o elemento P inserido ser derivado do plasmídeo pChsneo [Pirrotta & Steller, 1985] foi possível a clonagem directa do DNA de parte da região genómica adjacente ao mesmo. A sequenciação das extremidades 5' e 3' do fragmento revelou que o elemento P estava inserido no gene da γ -tubulina 23C [Gomes, R, 1994; Sunkel *et al.*, 1995], 134 pb a montante do início da região codificante [Gomes, R, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. Este resultado indicava estarmos perante um alelo mutante da γ -tubulina 23C, contudo havia que o confirmar por testes genéticos e moleculares, e igualmente proceder a uma caracterização detalhada do mutante. A concretização deste projecto exigiu assim, a análise molecular da região do gene da γ -tubulina 23C, a expressão da proteína em sistemas heterólogos para a obtenção de antigénio com vista à produção de anticorpos anti- γ -tubulina, a caracterização genética da linha mutante, testes de complementação do fenótipo mutante por inserção de cópias do gene da γ -tubulina 23C e a análise das alterações no aparelho mitótico induzidas pela mutação. Na sequência destes estudos veio a constatar-se que a linha P141 também apresentava um fenótipo mutante ao nível da espermatogénese, o que levou à extensão do projecto para a análise do papel da γ -tubulina na espermatogénese.

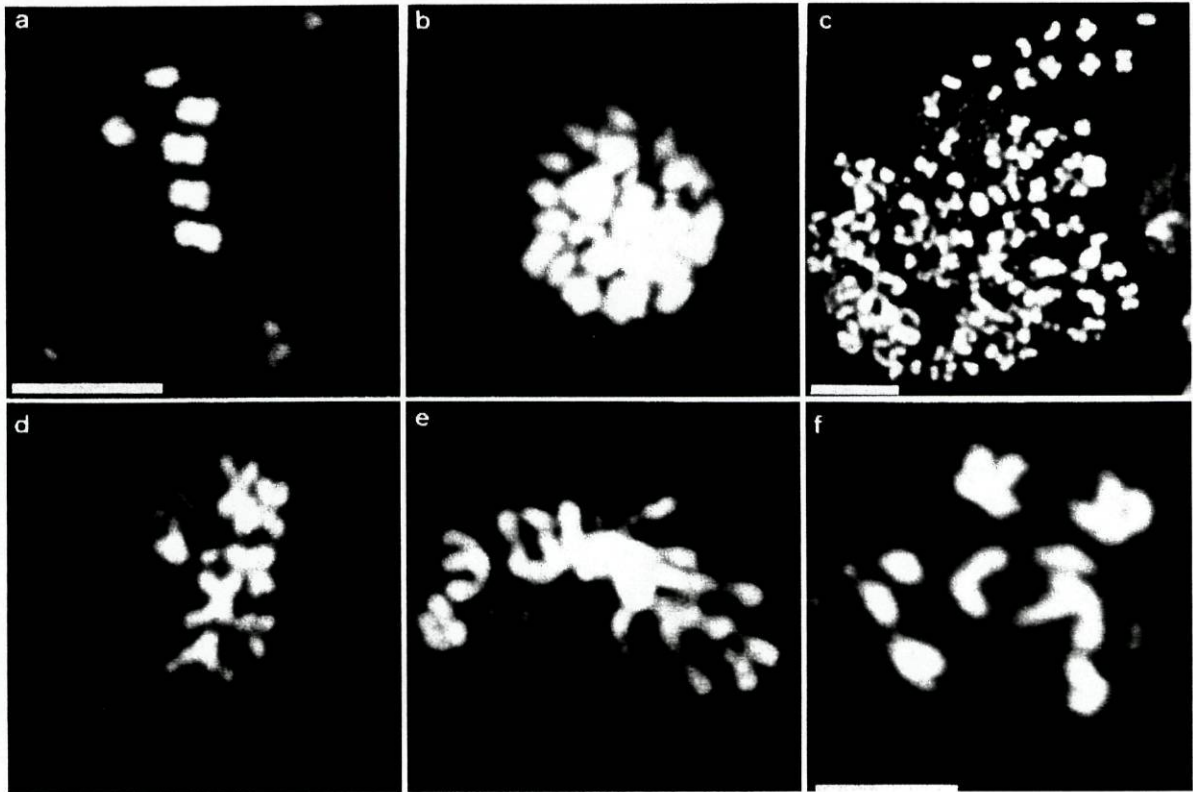


Figura 1 - Figuras mitóticas observadas em neuroblastos de larvas do terceiro estado homocigóticas da linha P141 original. **a)** Célula mutante exibindo cromossomas muito condensados sem organização de placa metafásica. **b)** Figura poliplóide com os cromossomas muito condensados e aglomerados. **c)** Figura altamente poliplóide com cromossomas muito condensados e espalhados. **d)** Célula aneuplóide. **e)** Célula exibindo um número anormal de cromossomas e condensação cromossômica irregular. **f)** Figura de uma anafase aberrante. Preparações coradas com iodeto de propídio. A ampliação é a mesma em (a,b,d,e,f). Barra de escala (a,f) - 5 μ m e (c) - 2,5 μ m. Adaptado de Sunkel *et al.*, 1995 com autorização dos autores.

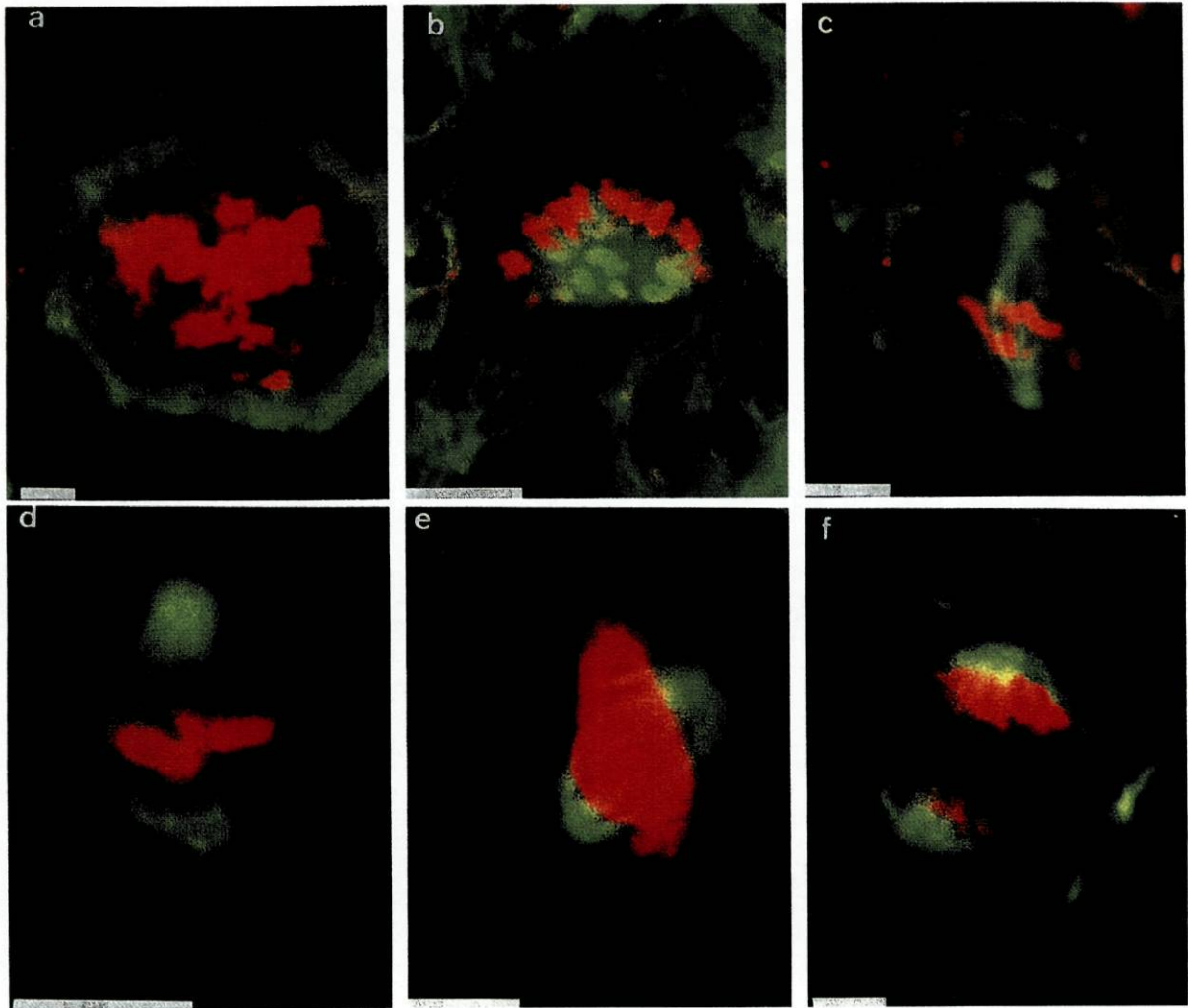


Figura 2 - Organização microtubular mitótica em neuroblastos de larvas do terceiro estado homozigóticas da linha P141 original. As preparações de cérebros *in toto* foram imunomarcadas com anti- β -tubulina (verde) e o DNA corado com iodeto de propídio (vermelho). **a)** Célula mutante exibindo uma banda circular de β -tubulina sem sinais de organização de microtúbulos e com cromossomas condensados no centro. **b)** Célula mutante exibindo um fuso monopolar com os microtúbulos a correrem entre os cromossomas. **c)** Célula mutante com um fuso bipolar quase normal, mas uma organização irregular da placa metafásica. **d)** Célula mutante com um fuso bipolar e placas metafásicas quase normais, mas com pólos irregulares. **e)** Célula muito poliplóide com fuso bipolar curto e com pólos muitos largos. **f)** Anafase anormal com uma distribuição assimétrica dos cromossomas. Barra de escala - 5 μ m. Adaptado de Sunkel *et al.*, 1995 com autorização dos autores.

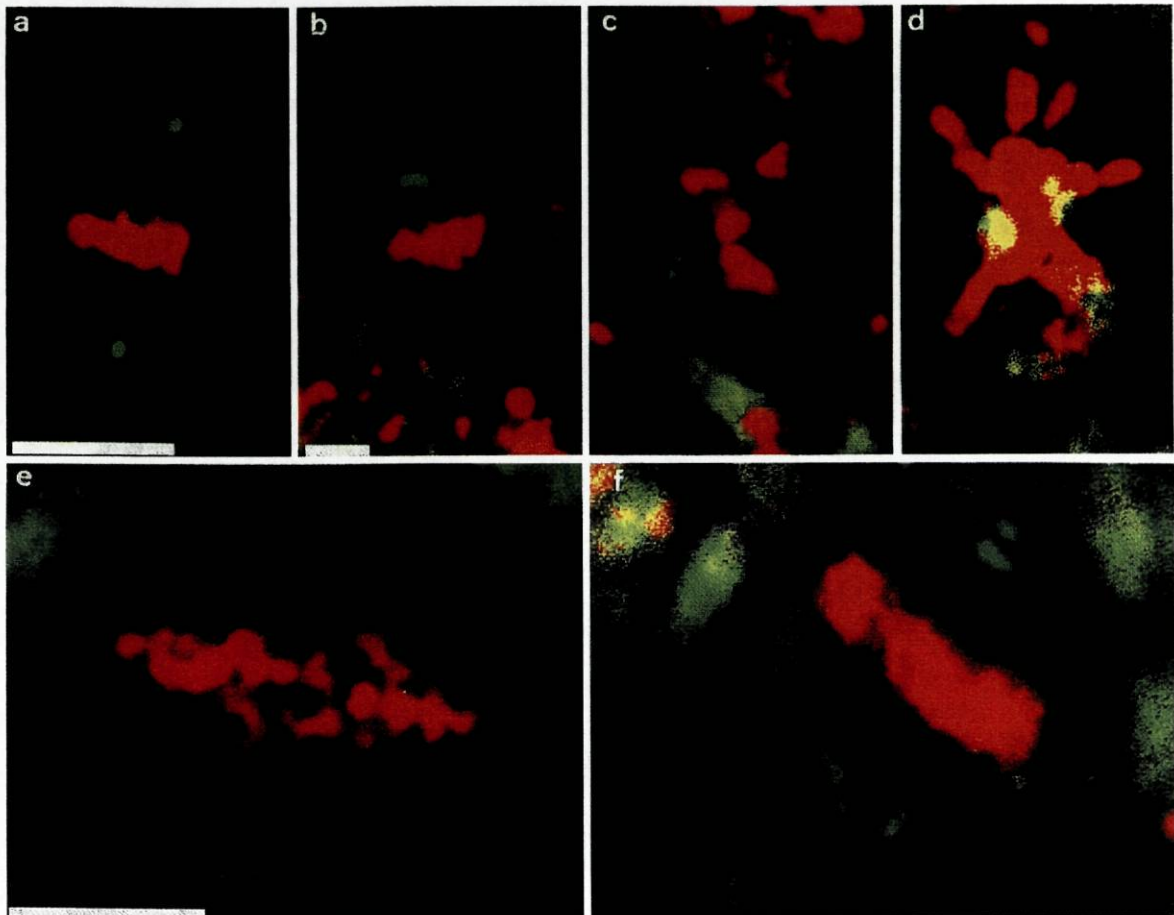


Figura 3 - Imunolocalização dos MTOCs em neuroblastos de larvas do terceiro estado do tipo selvagem e homozigóticas da linha P141 original. As preparações de cérebros *in toto* foram imunomarcadas com anticorpo anti-CP190 (verde) e o DNA corado com iodeto de propídio (vermelho). **a)** Neuroblasto do tipo selvagem durante a metafase exibindo MTOCs de tamanho e forma regular, e posicionados de ambos os lados da placa metafásica. **b-f)** Células P141. **b)** Célula mutante poliplóide exibindo MTOCs aberrantes em ambos os pólos. **c)** MTOC de aspecto de desorganizado associado de um só lado a cromossomas condensados. **d)** Célula poliplóide com MTOCs anormais associados aos cromossomas. **e)** Célula mutante que apresenta um MTOC desorganizado de um lado dos cromossomas e no outro, um MTOC circular, mas difuso. **f)** Célula poliplóide que exhibe dois MTOCs aberrantes de cada lado dos cromossomas. A ampliação é a mesma em (a,c), e em (d,e,f). Barra de escala - 5 μ m. Adaptado de Sunkel *et al.* (1995) com autorização dos autores.

Capítulo 2

Caracterização molecular dos genes das γ -tubulinas de *Drosophila melanogaster*

O elemento P inserido na região 23C da linha 141 deriva do plasmídeo pChsneo [Steller & Pirrotta, 1985]. Este plasmídeo contém o gene que confere resistência à ampicilina e uma origem de replicação bacteriana compreendidos entre as extremidades invertidas específicas dos elementos P. Tirando partido destas características, foi possível clonar directamente por recuperação de plasmídeo [Cooley *et al.*, 1988] um fragmento de DNA correspondente à região genómica adjacente ao elemento de transposição, dando origem ao plasmídeo p141I. Após a sequenciação deste fragmento constatou-se que o elemento P se encontrava inserido no gene da γ -tubulina 23C [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. Este fragmento foi utilizado como sonda no rastreio de bibliotecas fágicas de DNA genómico e de cDNA preparado a partir de mRNA isolado de testículos de *Drosophila melanogaster* [Gomes, 1994]. Os fagos positivos isolados de ambas as bibliotecas foram caracterizados molecularmente, já no âmbito do presente trabalho.

Neste capítulo, também é analisada a expressão dos genes de γ -tubulina ao longo dos vários estádios de desenvolvimento. No seguimento deste estudo pretendeu-se confirmar a existência de um segundo gene para a γ -tubulina, previamente identificado em *Drosophila melanogaster* na região 37C e com uma putativa expressão materna [Wilson *et al.*, 1992].

2.1 - Análise molecular da região genômica que abrange o gene da γ -tubulina 23C

No rastreio de uma biblioteca fágica de DNA genômico de *Drosophila melanogaster* com o plasmídeo p141I, foram isolados três clones independentes (fagos G1, G7 e G14) [Gomes, 1994]. A análise dos fragmentos genômicos contidos nestes fagos, com diversas endonucleases, permitiu estabelecer a relação entre os vários fragmentos e definir o mapa de restrição de uma região abrangendo 15 kb onde se inclui o gene γ tub23C. Na figura 2.1 representa-se o mapa de restrição da região genômica em que se localiza o gene da γ -tubulina, assim como a localização da inserção do elemento P na linha 141, a zona correspondente ao cDNA e os fragmentos de γ tub23C utilizados nos testes de complementação (ver capítulo 6).

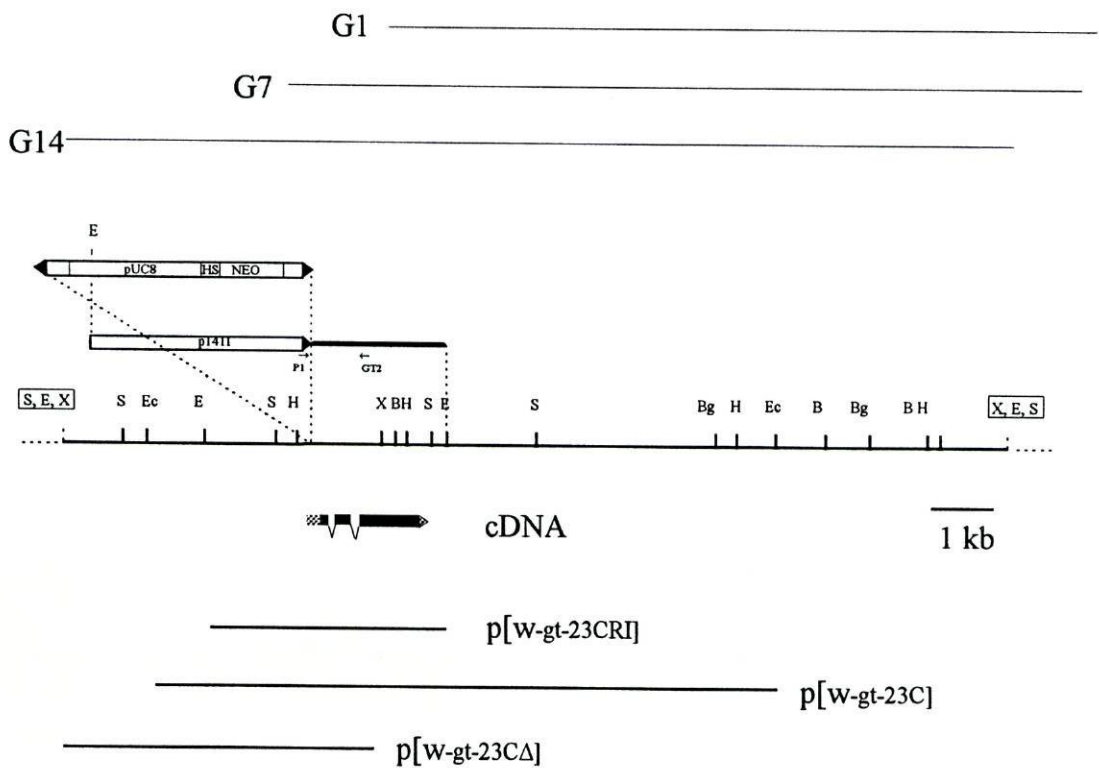


Figura 2.1 Mapa de restrição da região genômica de γ tub23C resultante da análise dos clones fágicos λ Dash G14, G7 e G1 (no topo) com as enzimas de restrição: *Bam*HI (B), *Bg*II (Bg), *Eco*RI (E), *Ecl*XI (Ec), *Hind*III (H), *Nco*I (N), *Sal*I (S) e *Xba*I (X). Acima do mapa está representada a estrutura molecular do elemento P inserido em γ tub23C e o plasmídeo p141I. O transposão contém as sequências das extremidades repetidas dos elementos P (setas invertidas pretas), sequências do plasmídeo pUC8, o promotor de choque termico (HS) e o gene de resistência à neomicina (neo). O plasmídeo p141I (pRG1.1) foi obtido por digestão de DNA genômico da linha 141(γ tub23C^{PI}) com *Eco*RI, ligação intramolecular e transformação de *E. coli*. A região a cheio corresponde ao fragmento genômico adjacente clonado em p141I. P1 e GT2 representam os iniciadores utilizados na detecção por PCR da presença da inserção no genoma das linha 141. O transcrito de γ tub23C está

desenhado abaixo do mapa, com a direcção assinalada pela seta e a região codificante indicada a cheio. A comparação das sequências genómica e de cDNA revelou a presença de pelo menos dois intrões [Gomes, 1994; Moutinho dos Santos, 1995]. Estão igualmente representados os fragmentos contendo a região γ tub23C completa (p[w-gt-23C] e p[w-gt-23CRI]) e truncada (p[w-gt-23C Δ]) utilizados na transformação de linha germinais.

2.2 - Análise molecular do cDNA da γ tubulina 23C

A partir de uma biblioteca fágica de cDNA de *Drosophila melanogaster*, preparada com mRNA extraído de testículos, foram isolados dois clones com inserções de 1,7 kb (clone C2) e 700 pb (clone C15) [Gomes, R, 1994]. A caracterização do clone C2 com endonucleases confirmou que a inserção nele presente correspondia ao cDNA de γ -TUB23C, pois o mapa de restrição (Fig. 2.2) coincidia com o obtido a partir da sequência presente no Genebank (M61765). Esta inserção foi subclonada no local EcoRI do vector pKS, dando origem ao plasmídeo pKGT23C Δ 19. A sequenciação das extremidades do fragmento confirmou tratar-se de um cDNA de γ -TUB23C incompleto, pois estava ausente toda a região 5' "leader" e os codões para os primeiros 19 amino ácidos (Fig. 2.2).

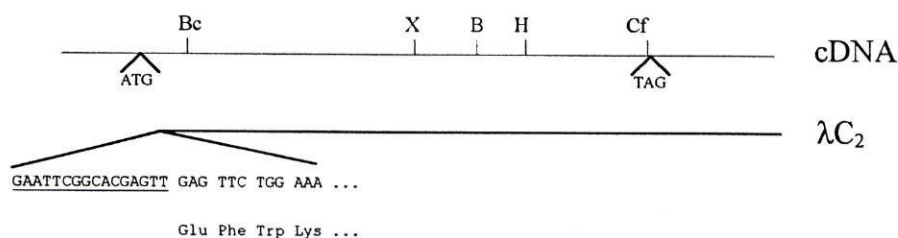


Figura 2.2 Mapa de físico do cDNA de γ -tubulina 23C obtido por análise dos locais de restrição das enzimas *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Xba*I (X), *Hind*III (H) presentes na sequência publicada (M61765) e/ou no clone fágico λ Zap C₂. Note-se que o local *Hind*III não está presente na sequência publicada, mas está na do clone C2 e nos clones genómicos (ver figura 2.1). Abaixo do mapa está representada a região abrangida pelo clone C2, com indicação da sequência da sua extremidade 5'. A sequência sublinhada corresponde ao presumível adaptador utilizado na construção da biblioteca de cDNA.

2.3 - Caracterização da expressão dos genes de γ -tubulina ao longo do desenvolvimento da *Drosophila melanogaster*

A expressão dos genes de γ -tubulina ao longo dos vários estádios de desenvolvimento foi caracterizada pela avaliação comparativa dos níveis de mRNAs de γ -tubulina presentes em embriões, larvas, pupas e adultos. A análise foi efectuada pela técnica de "Northern blot" com mRNA poli(A)+ isolado dos vários estádios e hibridado com uma sonda de cDNA da γ -tubulina23C (é de notar que este cDNA tem elevada homologia com o correspondente de γ -tubulina37C, sendo passível de ser utilizado na identificação de ambas as isoformas, sob condições que favoreçam a hibridação entre DNAs com homologia não elevada). O resultado da análise mostra a presença de uma banda de ~2 kb ao longo de todas as fases do desenvolvimento (Fig. 2.3A). Esta banda é mais intensa nas fases embrionárias de 0-4 h e 4-8h (Fig. 2.3A linhas 1 e 2), após o que, a intensidade das bandas diminui (Fig. 2.3A linhas 3-6). Nas fases de pupa ocorre um aumento nos níveis de mRNA de γ -tubulina (Fig. 2.3 linha 7 e 8). Nos machos adultos surge uma banda muito tenue, contudo a qualidade do mRNA é fraca o que não possibilita a correcta avaliação do nível de mRNA de γ -tubulina presente nestes (Fig. 2.3A linha 9). Nas fêmeas adultas observa-se uma banda de intensidade média e que aparenta ter um tamanho inferior ao das outras bandas (Fig. 2.3 linha 10). Esta banda deveria corresponder possivelmente à segunda γ -tubulina de *Drosophila*, para a qual estava descrito um transcrito de menor tamanho que o da forma 23C e uma putativa expressão materna [Genebank M76765; Wilson *et al.*, (1992)]. Para confirmar a diferença observada, foi executado novo "northern blot" com mRNA poli(A)+ isolado de embriões de 0-2 h, 2-4h, 0-4h e de fêmeas adultas (Fig. 2.3B), tendo em conta que as primeiras divisões do embrião dependem principalmente de produtos de origem materna. O resultado do "Northern" mostra uma pequena diferença entre o tamanho da banda observada no mRNA de 2-4h (Fig. 2.3B linha 3) e as observadas de 0-2h, 0-4h ou fêmeas (Fig. 2.3B linhas 1-2 e 4). Esta diferença talvez corresponda à expressão zigótica da γ -tubulina 23C nos embriões de 2-4 h ou poderá dever-se exclusivamente a variações na corrida do RNA.

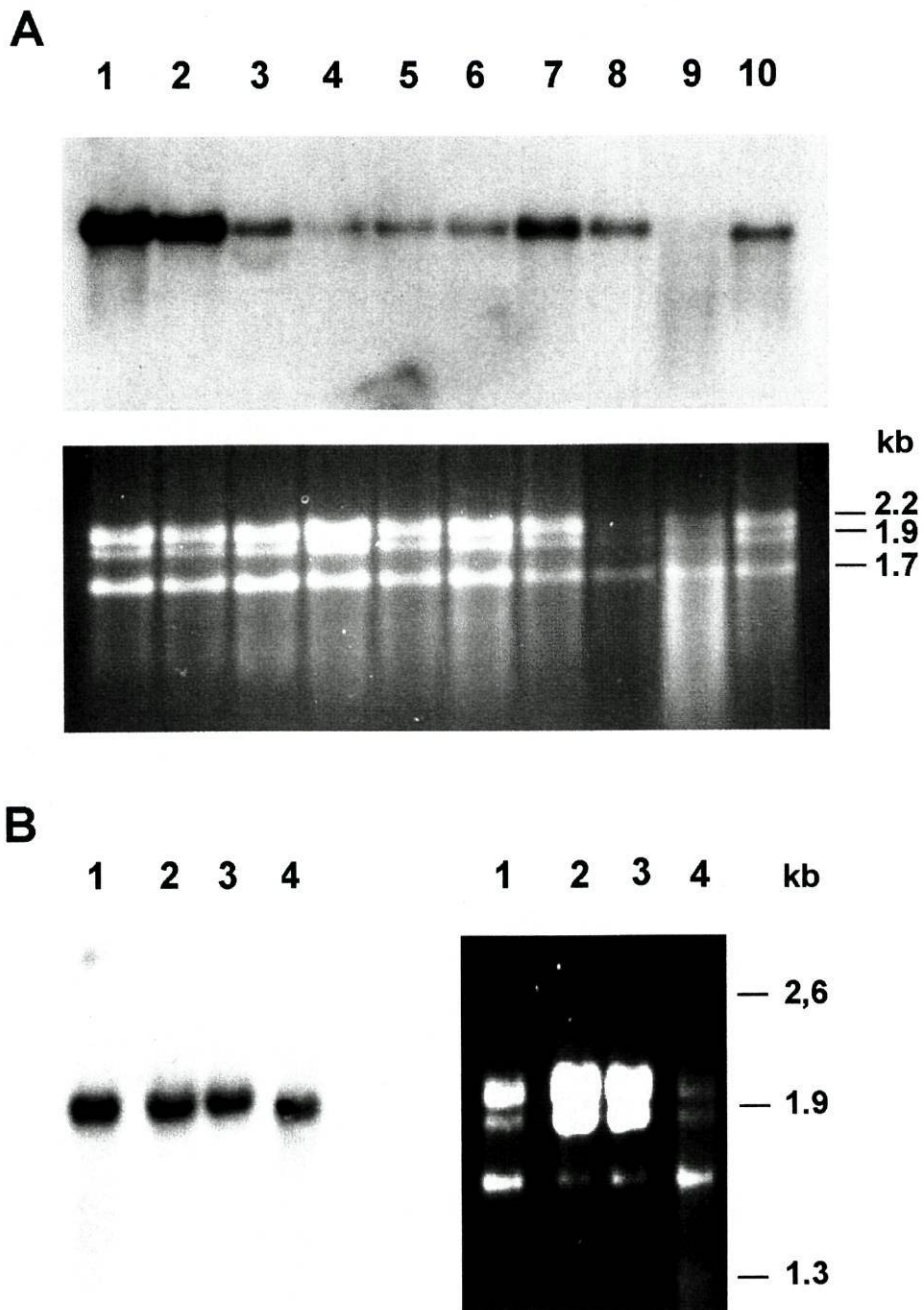
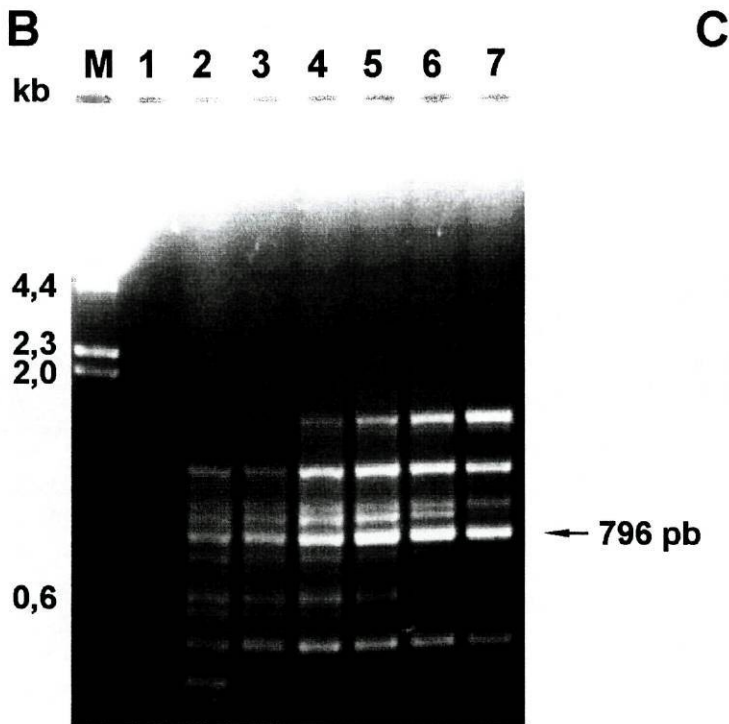


Figura 2.3 Análise da expressão da γ -tubulina durante os varios estádios de desenvolvimento da *Drosophila melanogaster* por "northern blot" com mRNA poli(A)⁺ extraído de (A) embriões de 0-4 h (linha 1), 4-8 h (linha 2) e 8-24 h (linha 3), larvas do 1º (linha 4), 2º (linha 5) e 3º estágio (linha 6), pupas iniciais (linha 7) e tardias (linha 8), e fêmeas (linha 9) e machos adultos (linha 10); e (B) embriões de 0-4 h (linha 1), 0-2 h (linha 2), 2-4 h (linha 3) e fêmeas adultas (linha 4). O mRNA foi hibridado com o plasmídeo pKGT23CA19 contendo o cDNA da γ -tubulina 23C marcado radioativamente com [α -³²P] dCTP. Abaixo (A) e ao lado (B) de cada autoradiografia é apresentada a fotografia do respectivo gel de agarose após a electroforese. O mRNA corado com brometo de etídio evidencia os rRNAs e permite avaliar a qualidade e quantidade das amostras corridas.


```

TUB37C- -AGAGCCGCCAGTGGCTTCGGTCTCCATACTGAACATCATCCAGGGCGAGGTGGATCCATCCCAGGTGCACAAGTCGGTGCAGCGCATCCGGGAGCGAAACG -1126
TUB23C- CAAATCATC-ACTGCTACATCTCCATTCTAAACATTATCCAGGGCGAGGTGGATCCCAGTCAAGTGCACAAGTCACTGCAGCGCATCCGGGAGCGCAAGA -1244
TUB37C- TGGCCAACTTCATACCATGGGGTCCGGCCAGCATCCAAGTGGGTCTGCGCGGAGCTCGCCCTACGTGCAGTCCGGCCAC-AAGGTATCCGGATTAATGA -1225
TUB23C- TGGCCAGTTCATTCCCTGGGGCCCCACCTCTATCCAGGTAGCCCTTCCCGCTCATCGCCCTACGTGCAGAGCAACCATCGAG-TGTCGGGACTGATGC -1343
TUB37C- TGGCCAACTCACACGGGTATCAGTTCGCTCTTCAAGAGG-CTTTCGCGCAATGCTAAAGCTGAGGAAGCGCAACGCCTTCTTGACAACCTTTCGGCCGGA -1325
TUB23C- TGGCCAACCACACCAGCATTGCTCGCTTTTCGAGCGAGCTCTCAACCAGTATGACAACGTTTCGCAAGCGCGCGCCTTCTTGACCAGTTTCGACCGGA -1443
TUB37C- ATCCATGTTCCAGGACGACCTGACCGAAGTGGACATCGCACGGGACACGGTTGACTGCTTGGTGCAGGAATATGAGGCAGCCACCCA-GA---T-C-G-- -1417
TUB23C- GGACATCTTCAAGGACGACCTCAATGAGCTGGACGAATCTCGCGAAACTGTTGACTGCCTGGTGAAGAGTATGAGGCAGCCACGCGTGGAGACTACATG -1543
TUB37C- A-T-TATCC-----C-----CAGTGGAGTCCCT---G---CTG-TCGAA-----GCT----TCG-----AA -1454
TUB23C- CAGTTTTCAGTGAAGCGGGAAATGGGCCAGTTGACTCCAAGTCGGAGGATAGTCGATCTGTGACCAGCGCGGTTCC- -TTCGCTTGTGCAGAAGAA -1643
TUB37C- AG-----CCGG-T---TCG---A-TA-----ATT---ATTT-A---TA-A-----TTCA-AC--CC----- -1489
TUB23C- ATGCGTGCCATGCATCTTAACCAATGTATTTAAAATGTAATATTCTCCAATGACGATGGGATTTCGAAATCCTTAAGTAGTAGTATAAGACGATTGTTG -1743
TUB37C- -----TCA--A--TT-T-----TTT---TTT---TTC--T-TT--TA---TC-----AA--CAA-TAATATATG---T-A-TT--T -1532
TUB23C- GTATGACTCGCATGTATGTAACGCTGTTTCGCTCTTTACGATATTTAAGTTCGATTTCCATTGTTGCCATTACACATGAGATTTCCCGATCATGTTT -1843
TUB37C- AAAATA----CTTTATAA-AAAAACC -1553
TUB23C- AATATGTACACATTAATAAAAAACAGTTTTT -1875
    
```

B



C

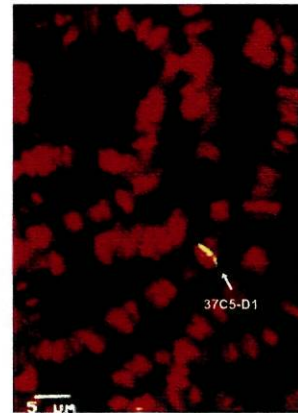


Figura 2.4 Amplificação e clonagem de um fragmento de γ tub37C. (A) Os iniciadores GTM+ e GTM- utilizados na reacção de amplificação foram desenhados de modo a serem específicos para a sequência de cDNA de γ tub37C publicada. O posicionamento dos iniciadores (vermelho) e a região de 796 pb por eles delimitada (amarelo) é apresentado sobre o alinhamento das sequências de cDNA das γ -tubulinas 23C e 37C. A verde estão indicados os códones de iniciação e terminação. (B) Electroforese em gel de agarose do produtos de amplificações resultante dos PCR efectuados com os iniciadores GTM+ e GTM- sobre DNA genómico de *Drosophila*. As reacções foram realizadas com quantidades decrescentes de ambos os iniciadores: 250 pmol (1), 250 pmol (2), 100 pmol (3), 50 pmol (4), 20 pmol (5), 10 pmol (6) e 5 pmol (7). Na reacção da linha 1 não foi colocado DNA genómico molde, enquanto nas restantes foi aplicado 100 ng de DNA por reacção. A linha M corresponde ao

genómico molde, enquanto nas restantes foi aplicado 100 ng de DNA por reacção. A linha M corresponde ao marcador λ HindIII. A banda de 796 pb indicada pela seta foi isolada, clonada e sequenciada. Esta corresponde a um fragmento de *γtub37C*. (C) Hibridação *in situ* em cromossomas politénicos de glândulas salivares com o fragmento clonado de *γtub37C* e marcado com biotina. A sonda foi localizada na região 37C5-D1 (banda amarela), sendo a única banda observada no conjunto dos cromossomas visualizados por coloração com iodeto de propídio (vermelho).

2.6 - Discussão

A análise molecular dos fagos contendo DNA genómico de *Drosophila melanogaster* da região onde está localizado o gene codificante para a γ -tubulina 23C conduziu à determinação dos locais de actuação de diversas endonucleases numa extensão de 15 kb em que se inclui integralmente *γtub23C*. O estabelecimento do mapa de restrição de *γtub23C* possibilitou a posterior subclonagem de fragmentos do gene com vista à realização de testes de complementação, mediante a transformação de linhas germinais de *Drosophila* com esses fragmentos.

Procedeu-se igualmente à subclonagem de um fragmento de cDNA incompleto para a γ TUB23C. No decorrer do trabalho, este clone foi utilizado para a construção de genes de fusão que permitiram a sobreexpressão da γ -tubulina em *E. coli*, para ser utilizada na produção e purificação de anticorpos específicos contra a γ -tubulina.

Os resultados obtidos da avaliação dos níveis de transcritos de γ -tubulina no decorrer do desenvolvimento da *Drosophila* indicam que a γ -tubulina está sempre presente ao longo do processo. No entanto, ocorrem flutuações nos níveis de transcritos, os quais são mais elevados nas fases em que está a ocorrer maior actividade de divisão celular ou seja nas fases embrionárias. Igualmente, nas fêmeas surge um quantidade significativa de transcritos de γ -tubulina, o que está de acordo com um aprovisionamento materno dos ovos com os produtos que irão ser utilizados nas primeiras divisões do embrião. Os transcritos na fêmeas e nos embriões de 0-2 horas aparentam ter um menor tamanho que o observado nas outras fases, supondo-se que correspondam aos transcritos do segundo gene de γ -tubulina presente em *Drosophila*. O segundo gene de γ -tubulina foi identificado em bibliotecas de cDNA preparadas de ovários (GeneBank, M76765). Os seus mRNAs apresentam um tamanho menor

que os de $\gamma tub 23C$ e logo de início foi implicado como codificando para uma forma materna da γ -tubulina [Wilson *et al.*, 1992]. O trabalho desenvolvido na amplificação de um fragmento deste gene confirmou a sua presença no genoma da *Drosophila*, posicionado na região 37C5-D1 dos cromossomas politénicos e daí a sua designação com γ -tubulina 37C. Estudos posteriores mostraram que esta isoforma da γ -tubulina não só está envolvida nas primeiras divisões embrionárias [Wilson *et al.*, 1997, Tavosanis *et al.*, 1997], bem como desempenha uma função essencial na formação dos fusos meióticos acentriolares das fêmeas [Tavosanis *et al.*, 1997].

Capítulo 3

Expressão de γ -tubulina 23C em *E. coli* e caracterização de anticorpos anti γ -tubulina

A avaliação dos níveis de γ -tubulina presentes em extractos de proteínas de diversos tecidos de *Drosophila* do tipo selvagem ou mutantes, bem como a caracterização da distribuição da γ -tubulina por imunofluorescência, implicava a existência de anticorpos dirigidos contra esta proteína. Inicialmente foi utilizado o anticorpo policlonal JH46 produzido contra um oligopéptido correspondente a uma região conservada entre as γ -tubulinas e gentilmente cedido por Joshi [Joshi *et al.*, 1992]. No entanto, a quantidade fornecida era escassa, o que impôs produção de novos anticorpos anti- γ -tubulina.

A preparação de novos soros contra a γ -tubulina requereu a preparação de antigénios específicos contra a proteína. A escolha dos antigénios recaiu sobre proteínas de fusão com γ -tubulina 23C expressas em *Escherichia coli*, atendendo à facilidade e economia da sua produção e, por originarem anticorpos policlonais dirigidos contra múltiplos epítomos. Estas proteínas foram utilizadas na produção de anticorpos policlonais em coelhos e na posterior imunopurificação dos mesmos.

3.1 - Expressão de γ -tubulina 23C em *E. coli*

A produção de γ -tubulina 23C como proteína de fusão foi efectuada utilizando dois sistemas de expressão em *E. coli*: pMal (New England BioLabs) e pET (Novagen, inc.) No primeiro caso, o gene alvo é colocado a seguir ao gene *malE*, codificante para a proteína de

ligação à maltose (MBP), e dentro do mesmo quadro de leitura, resultando na expressão de uma proteína de fusão com a MBP. Este sistema utiliza o forte promotor "tac", indutível por adição de IPTG. No sistema pET, o gene alvo é colocado sob o controlo dos fortes sinais de transcrição e tradução do bacteriófago T7, sendo a expressão induzida por uma fonte de T7 RNA polimerase fornecida pela célula hospedeira. A expressão da T7 RNA polimerase também é dependente da adição de IPTG. Este sistema utiliza diversos vectores, no caso presente o gene alvo foi clonado entre uma pequena sequência inicial codificante para os 11 amino ácidos N-terminais da proteína 10 do gene T7 (T7.tag) e a sequência codificante para 6 histidinas (His6.tag).

3.1.1 - Proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19

O clone de cDNA GT23C Δ 19, abrangendo a totalidade da região codificante para a γ -tubulina 23C excepto para os 19 amino ácidos N-terminais, foi isolado do plasmídeo pKGT23 Δ 19 por digestão com a enzima *EcoRI* e subclonado no local *StuI* do vector pMal-c, ficando a jusante do gene *MalE* e dentro do mesmo quadro de leitura. O plasmídeo resultante foi designado como pMGT23C Δ 19 (Fig. 3.1).

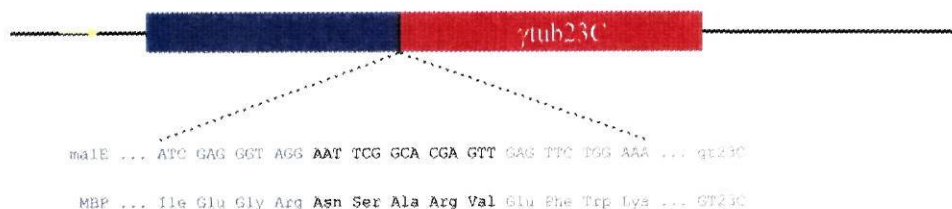


Figura 3.1 Representação esquemática do plasmídeo pMGT23C Δ 19. Este plasmídeo é derivado do vector pMal-c por inserção no seu local de clonagem *StuI* de um fragmento de cDNA de γ -tubulina 23C obtido por restrição do plasmídeo pKGT23C Δ 19 com *EcoRI*. O gene assim construído codifica para uma proteína de fusão entre a proteína de ligação à maltose (MBP) na região N-terminal e a γ TUB23C, sem os 19 amino ácidos iniciais, na região C-terminal, separadas por 5 amino ácidos não pertencentes a ambas as proteínas.

A expressão das proteínas de fusão MBP- β -gal- α e MBP: γ TUB23C Δ 19 foi induzida com IPTG em culturas de estirpe de *E. coli* TB1 transformadas, respectivamente, com os plasmídios pMal-c e pMGT23C Δ 19. A análise por SDS-PAGE de extractos de proteínas totais de culturas não induzidas e induzidas revelou o aparecimento de novas bandas nos extractos de células induzidas em relação às presentes nos extractos não-induzidos (Fig. 3.2A). Nas células controlo é sobreexpressa uma proteína com o peso de ~52 kDa que corresponde à expressão da

MBP- β -gal- α (Fig. 3.2A linha 2). Nos extractos das células transformadas com pMGT23C Δ 19 surgem diversas bandas: uma mais intensa com \sim 95 kDa e outras de menor peso molecular e intensidade (Fig. 3.2A linha 4). A banda de \sim 95 kDa tem o peso esperado para a proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19. Por "western blot" com o anticorpo anti- γ -tubulina JH46, comprovou-se que a banda de \sim 95 kD corresponde à proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19 e constatou-se que as bandas de menor intensidade devem corresponder a formas truncadas ou a produtos de degradação da MBP: γ TUB23C Δ 19 (Fig. 3.2B). O anticorpo JH46 só reconhece de *E. coli* MGT1 capaz de produzir a proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19

bandas nos extractos de células onde a expressão de MBP: γ TUB23C Δ 19 foi induzida (Fig. 3.2B linha 2) e não nos extractos não-induzidos (Fig. 3.2B linha 1) ou naqueles em que foi induzida a expressão de MBP- β -gal- α (Fig. 3.2B linha 3). Por "dot blot" com um anticorpo anti-MBP verificou-se que a proteína expressa após indução é, como esperado, uma proteína de fusão da γ -tubulina23C com a proteína de ligação à maltose (Fig. 3.2C). Deste modo foi construída a estirpe

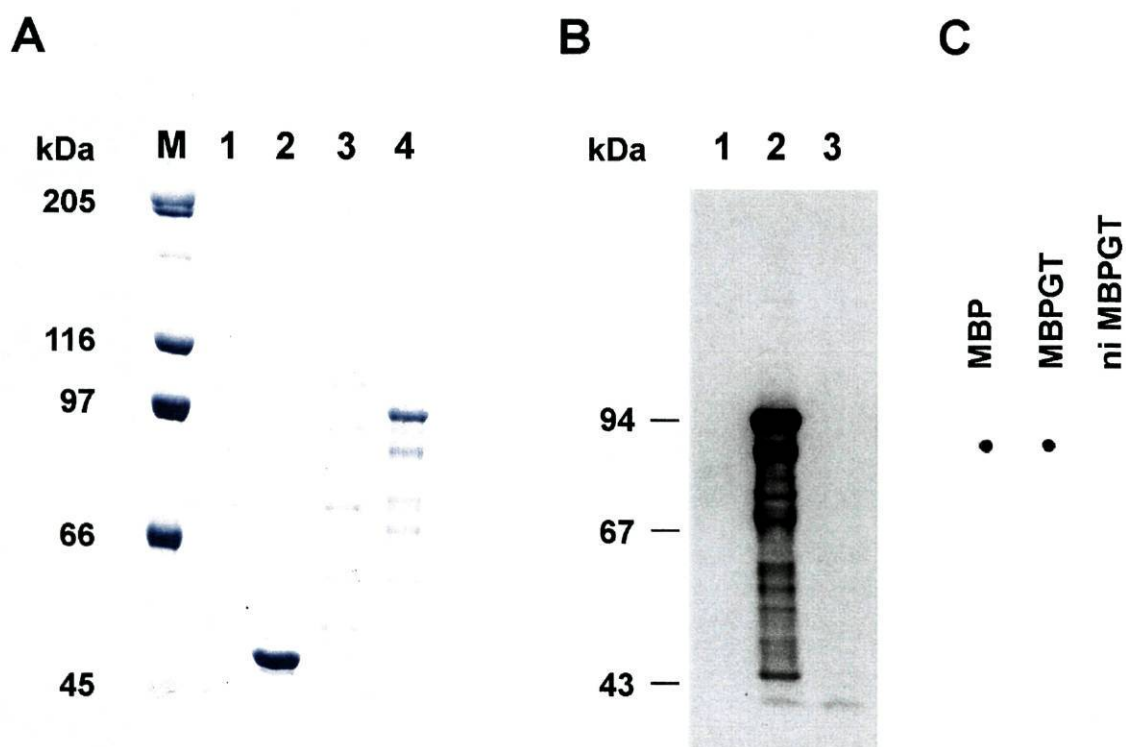


Figura 3.2 Expressão da proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19. **(A)** Gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie com extractos totais de proteínas de *E. coli* transformadas com os plasmídios pMAL-c (linhas 1 e 2) e pMGT23C Δ 19 (linhas 3 e 4), antes (linhas 1 e 3) e após indução com IPTG (linhas 2 e 4). Padrões de peso molecular (linha M). **(B)** "western blot" e **(C)** "dot blot" com extractos proteicos de *E. coli* MGT1 não induzidas (linha 1, ni MBPGT) e induzidas (linha 2, MBPGT), e *E. coli* transformadas com pMal-c e induzidas (linha 3, MBP) incubados com o anticorpo **(B)** anti γ -tubulina JH46 ou **(C)** anti MBP.

3.1.1 - Proteína de fusão T7: γ -GT23C Δ 19:His6

O fragmento *Eco*RI - *Cfr*10I do cDNA da γ -tubulina 23C, abrangendo a totalidade da região codificante para a γ -tubulina 23C excepto para os 19 amino ácidos N-terminais e os 3 C-terminais, foi isolado do plasmídeo pKGT23 Δ 19 por digestão com as enzimas *Eco*RI e *Cfr*10I e subclonado no plasmídeo pET23b* entre o T7.tag a 5' e o His6.tag a 3', originando o plasmídeo pETGT23C Δ 19 (Fig. 3.3).

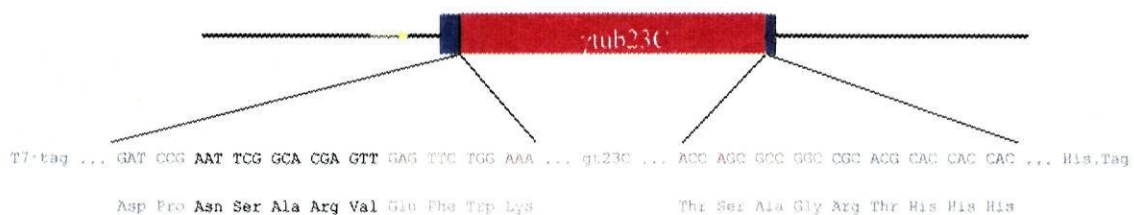


Figura 3.3 Representação esquemática do plasmídeo pETGT23C Δ 19. Este plasmídeo é derivado do vector pET23b* por inserção entre os seus locais de clonagem *Eco*RI e *Not*I de um fragmento de cDNA de γ -tubulina 23C obtido por restrição do plasmídeo pKGT23C Δ 19 com *Eco*RI e *Cfr*10I. O gene assim construído codifica para uma proteína de fusão contida pelo T7.tag na extremidade N-terminal seguido da γ TUB23C, sem os 19 amino ácidos iniciais e 3 C-terminais, e 6 histidinas na região C-terminal. Abaixo do esquema, estão indicadas as sequências de junção.

A adição de IPTG a culturas da estirpe de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pETGT23C Δ 19 resultou na indução da sobreprodução de uma proteína insolúvel de 53 kDa (Fig. 3.4A). Esta proteína apresenta o peso molecular calculado para a proteína de fusão T7: γ -GT23C Δ 19:His6. Por "western blot" com o anticorpo anti- γ -tubulina JH46 (Fig. 3.4B) e "dot blot" com anticorpo anti-T7.tag (Fig. 3.4C) foi comprovado que a proteína de 53 kDa corresponde à T7: γ -GT23C Δ 19:His6. Deste modo, obteve-se a estirpe de *E. coli* TGTH1 capaz de expressar esta proteína de fusão.

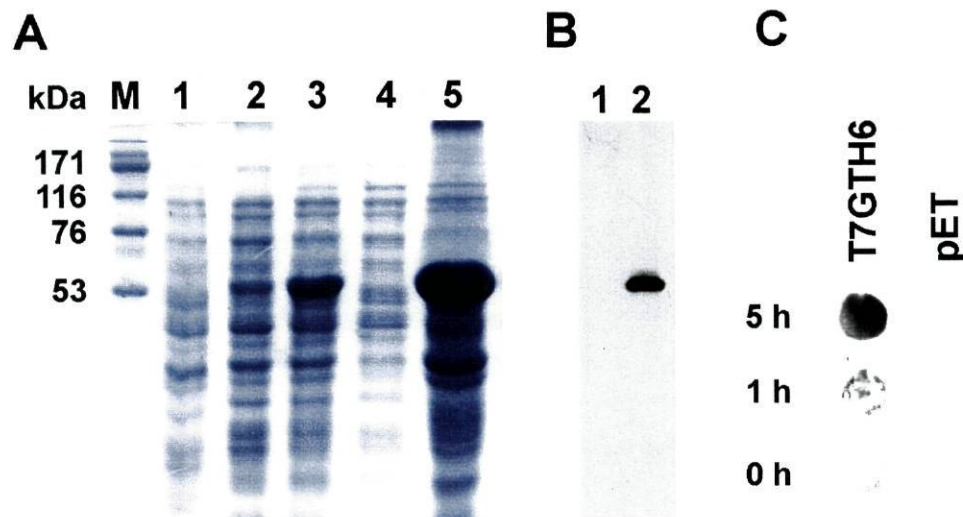


Figura 3.2 Expressão da proteína de fusão T7: γ TUB23C Δ 19:His6. (A) Gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie com extractos totais de proteínas de *E. coli* transformadas com os plasmídios pET23B* (linha 1) e pETGT23C Δ 19 (linhas 2-5), antes (linha 2) e após 5 h de indução com IPTG (linhas 1, 3-5). Fracções solúvel (linha 4) e insolúvel (linha 5). Padrões de peso molecular (linha M). (B) "Western blot" com extractos proteicos de *E. coli* transformadas com pET23B* (linha 1) e *E. coli* TGTH1 (linha 2) preparados após 5 h de indução com IPTG, e incubados com o anticorpo anti γ -tubulina JH46. (C) "Dot blot" com extractos proteicos das mesmas culturas utilizadas em (B) mas induzidas durante 0 h, 1 h e 5 h e incubados com anticorpo anti T7.tag.

3.2 - Análise e purificação de anticorpos anti- γ -tubulina

Anticorpos policlonais contra a γ -tubulina 23C, gerados em coelhos, foram produzidos em laboratórios comerciais ou laboratórios com os quais havia colaboração. Com excepção do anticorpo JH46, todos os anticorpos aqui presentes foram obtidos contra proteínas de fusão com a γ TUB23C Δ 19. As proteínas de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19 e T7: γ TUB23C Δ 19:His6 foram utilizadas como antígenos na produção dos soros RbPS1 e RbVerol e na imunopurificação de anticorpos específicos contra a γ -tubulina.

3.2.1 - JH46

O anticorpo policlonal JH46 foi produzido contra o oligopéptido de 17 aminoácidos, EEFATEGTDRKDVFFY-C, correspondente a uma região específica e conservada entre as γ -tubulinas de diversos organismos [Joshi *et al.*, 1992]. Em extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3º estágio do tipo selvagem este anticorpo reconhece duas bandas: uma de 53 kDa correspondente à γ -tubulina e outra de 75 kDa (Fig. 3.5 linha 1). Para obter um anticorpo que reconhecesse exclusivamente a γ -tubulina, o anticorpo 46 foi imunopurificado contra a MBP: γ TUB23C Δ 19 imobilizada em tiras de nitrocelulose. O imunopurificado resultante reconhece em "western blot" uma única banda de 53 kDa (Fig. 3.5 linha 2), porém o título era muito baixo e a escassez de anticorpo não permitiu a imunopurificação de quantidade suficiente para um uso sistemático do anticorpo purificado. A imunofluorescência indirecta em cérebros larvares e em embriões em fase de sincício ou já celularizados com este anticorpo imunopurificado origina um sinal focalizado na região centrossomal em concordância com a localização já descrita para γ -tubulina [Sunkel *et al.*, 1995].

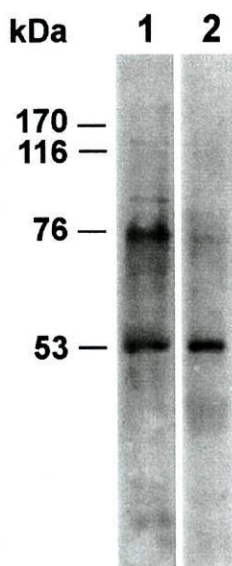


Figura 3.5 Caracterização do anticorpo anti γ -tubulina JH46. "Western blot" com extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3º estágio Oregon-R incubados com o soro JH 46 (linha 1) e JH 46 imunopurificado contra a MBP: γ TUB23C Δ 19 (linha 2).

3.2.2 - RbCS1

O cDNA GT23C Δ 19 foi clonado no vector pGEX (Pharmacia ?) para a produção da proteína de fusão Gts: γ -GT23C Δ 19, que foi utilizada para obter o anticorpo policlonal RbCS1 (resultados não publicados de W. G. Whitfield). Este soro reconhece essencialmente duas bandas em extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3^o estágio. Uma das bandas apresenta um peso molecular de ~67 kDa e a outra 53 kDa, devendo esta última corresponder à γ -tubulina, (Fig. 3.6A linha 1). Observaram-se igualmente outras bandas que apresentam um sinal menos intenso que as duas anteriores e o seu padrão varia de ensaio para ensaio. Foram feitas diversas tentativas de imunopurificação do anticorpo RbCS1 contra as proteínas MBP: γ -tubulina ou T7: γ -tubulina:His6, que no entanto resultaram infrutíferas, pois, para além de o título dos imunopurificados ser muito baixo, foi impossível remover uma forte reacção com a banda de 67 kDa enquanto que a banda de 53 kDa surgia sempre ténue (Fig. 3.6A linha 2).

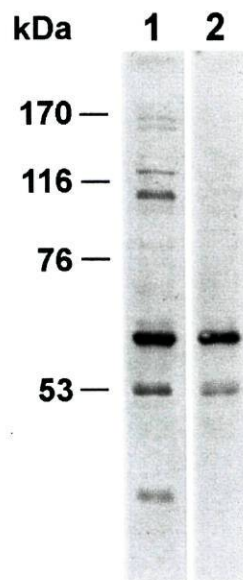


Figura 3.6 Caracterização do anticorpo anti γ -tubulina RbCS1. (A) "Western blot" com extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3^o estágio Oregon-R incubados com o soro RbCS1 (linha 1) e RbCS1 imunopurificado contra a MBP: γ TUB23C Δ 19 (linha 2).

3.2.3 - RbPS1

O anticorpo policlonal RbPS1 foi produzido por imunização de um coelho com T7: γ TUB23C Δ 19:His6 (Eurogenetics). O soro obtido reconhece múltiplas bandas em "western blot" com extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3^o estágio. Anticorpos específicos foram isolados por imunopurificação do soro total contra estas proteínas de fusão. O anticorpo imunopurificado obtido reconhece uma banda forte de 53 kDa em extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3^o estágio (**Fig. 3.7A linha 1**). A incubação de cérebros com o anticorpo imunopurificado resulta numa marcação limpa e focalizada nos centrossomas (**Fig. 3.7B**).

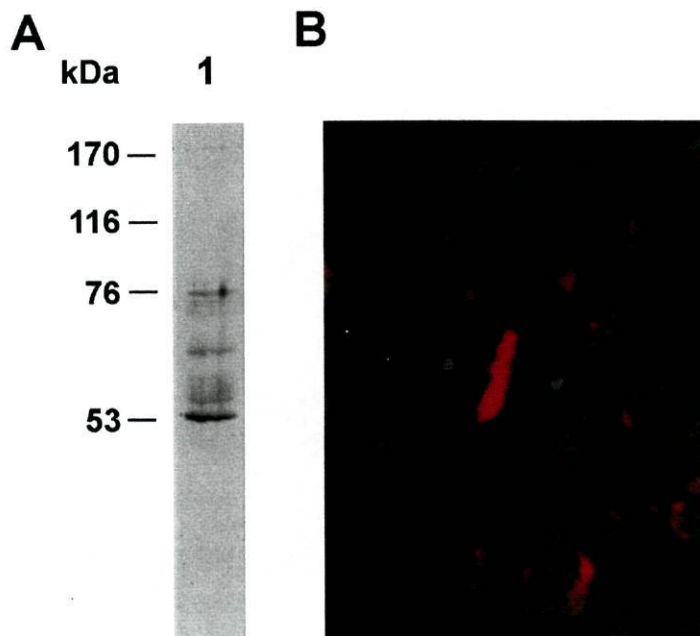


Figura 3.7 Caracterização do anticorpo anti γ -tubulina RbPS1. **(A)** "Western blot" com extractos de proteínas totais de cérebros de larvas do 3^o estágio Oregon-R incubados com o soro RbPS1 imunopurificado contra a MBP: γ TUB23C Δ 19 (linha 1). **(B)** Imunofluorescência indirecta em cérebros de larvas do 3^o estágio com o soro RbPS1 (verde). DNA corado com iodeto de propídio (vermelho).

3.2.4 - RbVero1

A proteína de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19 foi utilizada num programa de imunização de coelhos com vista à obtenção de anticorpos policlonais anti- γ -tubulina [resultados não publicados de Veronica Cambiazo]. Como resultado obteve-se o soro RbVero1. Em "western blot" este anticorpo reconhece uma banda de 53 kDa em extractos totais de proteínas de embriões de 0-6 h, de cérebros de larvas do 3º estágio e de testículos. Diversas outras bandas também surgem, mas de intensidade menor e variável de ensaio para ensaio (Fig. 3.6A). A imunomarcação de cérebros de larvas com este anticorpo originou um sinal bem focalizado na região centrossomal (Fig. 3.6B). Contudo, após congelação a -20°C o anticorpo deixou de funcionar em imunofluorescência em neuroblastos, mantendo no entanto uma forte reacção com a γ -tubulina em "immunoblotting".

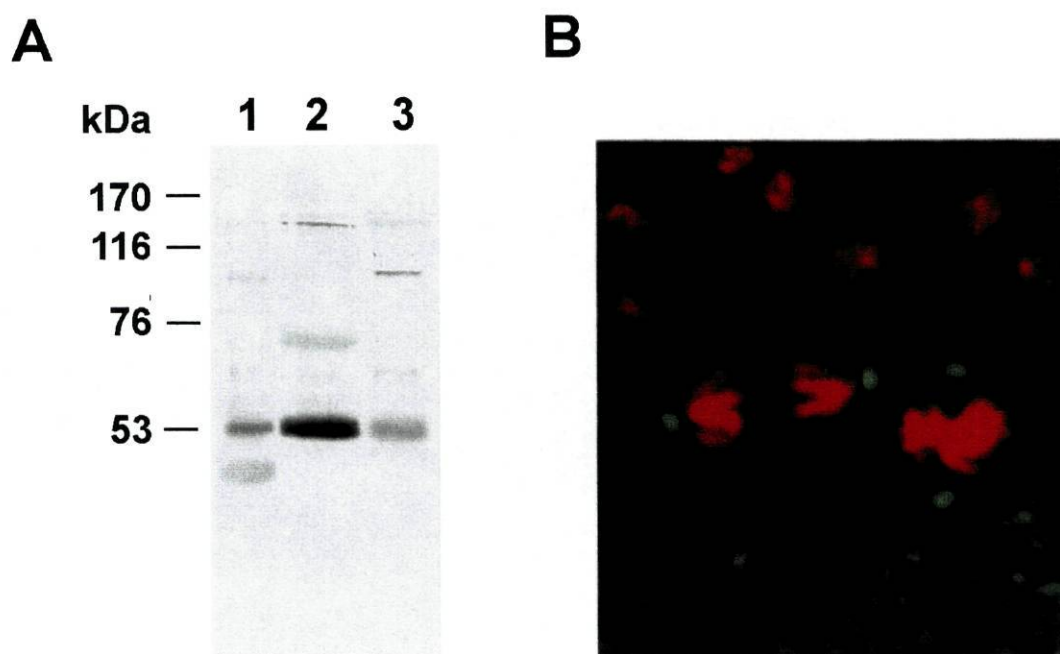


Figura 3.6 Caracterização do anticorpo anti γ -tubulina RbVero1. **(A)** "Western blot" com extractos de proteínas totais de embriões de 0-6 h (linha 1), de cérebros de larvas do 3º estágio (linha 2) e de testículos (linha 3) incubados com o soro RbVero1. **(B)** Imunofluorescência indirecta em cérebros de larvas do 3º estágio com o soro RbCS1 (verde). DNA corado com iodeto de propídio (vermelho).

3.3 - Discussão

Neste capítulo foi descrito o trabalho que conduziu à construção de estirpes de *E. coli* produtoras da γ -tubulina 23C como proteínas de fusão e à caracterização de anticorpos específicos para a γ -tubulina.

O clone de cDNA GT23C Δ 19 foi utilizado na construção de dois genes de fusão que possibilitaram a produção em *E. coli* das proteínas de fusão MBP: γ TUB23C Δ 19 e T7: γ TUB23C Δ 19:His6. Ambas as proteínas são facilmente sobreexpressas após indução e a presença da proteína de ligação à maltose (em MBP: γ TUB23C Δ 19) ou da cauda de 6 Histidinas (em T7: γ TUB23C Δ 19:His6) o que facilita a sua purificação por cromatografia de afinidade, respectivamente, para a maltose ou para catiões divalentes (Ni^{2+}). No entanto, estas proteínas são expressas sob a forma de corpos de inclusão insolúveis, o que possibilita o seu fácil isolamento com elevado grau de pureza.

As proteínas MBP: γ TUB23C Δ 19 e T7: γ TUB23C Δ 19:His6 foram utilizadas como antígeno na produção de anticorpos contra a γ -tubulina e na imunopurificação destes.

Os estudos iniciais utilizaram o anticorpo anti- γ -tubulina JH46 gerado contra um péptido conservado dentro da família das γ -tubulinas [Joshi *et al.*, 1992]. Este anticorpo reconhece essencialmente, em extractos totais de proteínas de *Drosophila*, a γ -tubulina e outra proteína de 67 kDa. Porém, após a imunopurificação contra as proteínas de fusão, passa a reagir unicamente com a γ -tubulina. Todavia, o título do imunopurificado era sempre muito baixo e a quantidade de anticorpo disponível era limitada, condicionantes que conduzam à necessidade da produção de novos anticorpos.

Foram produzidos diversos anticorpos anti- γ -tubulina em laboratórios com os quais havia colaboração ou em firmas comerciais. Estes anticorpos foram gerados contra proteínas de fusão derivadas do clone GT23C Δ 19 e todos eles reconhecem a γ -tubulina, por "immunoblotting", em extractos totais de proteínas de *Drosophila* e em células, por imunofluorescência indirecta. Porém, todos estes anticorpos reagem também, com maior ou menor intensidade, contra outras proteínas, sendo a imunopurificação necessária para aumentar a sua especificidade contra a γ -tubulina. De entre os soros analisados, o anticorpo RbVero1 revelou-se como o melhor em "immunoblotting", pois o seu título é elevado e reconhece essencialmente a γ -tubulina, mesmo sem imunopurificação. No entanto, o anticorpo é muito

lábil, pois a congelação retirou a sua reactividade em imunofluorescência indirecta em neuroblatos. Para a imunomarcção, o soro RbPS1 depois de imunopurificado revelou-se ser o mais apropriado. Porém, com o processo de imunopurificação utilizado não permitiu obter uma grande quantidade de anticorpo, com a agravante de o título ser reduzido. Uma imunopurificação em larga escala por cromatografia de afinidade em coluna será o processo mais indicado para uma futura utilização sistemática deste anticorpo.

Capítulo 4

Caracterização genética da linha 141

A linha 141 foi identificada como uma linha mutante recessiva letal tardia que apresentava alterações mitóticas [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. Os indivíduos homozigóticos 141 morrem durante a formação da pupa e as larvas do 3º estado apresentam cérebros mais pequenos e com os aspecto menos denso que os do tipo selvagem. Igualmente os discos imaginais reflectem alterações na proliferação celular, sendo bastante atrofiados. A análise citológica dos cérebros destes indivíduos revela um reduzido número de células e um severo fenótipo mitótico mutante, indicadores da existência de problemas na progressão do ciclo celular [Gomes, 1994]. Cerca de 70 % dos neuroblastos em divisão são células poliplóides, em que parte destas apresentam um grau de plóidia superior a 8n. A condensação cromossómica é anómala. São observadas metafases que apresentam cromossomas com um elevado grau de condensação, bem como outras com uma condensação irregular dos mesmos. A organização das placas metafásicas varia entre uma certa organização e uma total dispersão dos cromossomas na zona celular. Algumas figuras mitóticas apresentam uma disposição dos cromossomas em forma de círculo, figuras características da formação de fusos monopulares. Somente 1% das figuras mitóticas são anafases, as quais se apresentam altamente desorganizadas [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. O conjunto do fenótipo mitótico exibido pela linha 141 indiciava alterações na organização do aparelho mitótico o que estaria de acordo com o putativo papel da γ -tubulina na formação do mesmo. Para confirmar que o fenótipo mitótico mutante observado em indivíduos homozigóticos da linha 141 se devia à inserção do elemento P em $\gamma tub23C$, havia que excluir outras possíveis mutações presentes no cromossoma, o que constituirá o tema deste capítulo.

4.1 - Caracterização da linha 141 com uma deficiência da região 23C1-2

O uso de cromossomas com a deleções de pequenas regiões específicas é uma técnica muito importante para o estudo de mutações em *Drosophila melanogaster*. A análise de indivíduos com um cromossoma mutado em heterozigotia com um cromossoma deficiente para uma determinada região permite avaliar a existência de mutações nessa área, pois caso existam o cromossoma deficiente não as poderá complementar. Igualmente, permite verificar se essas mutações são ou não as responsáveis pelo fenótipo mutante observado nos indivíduos homozigóticos para o cromossoma mutado, visto que outras possíveis alterações presentes ao longo do cromossoma são complementadas pelo cromossoma deficiente. Finalmente, o uso de deficiências é um meio para reconhecer a intensidade de mutações, uma vez que a deficiência elimina totalmente uma cópia do gene em estudo, reduzindo assim a eventual expressão do mesmo à expressão por parte da cópia que apresenta a mutação (é de notar que nos indivíduos homozigóticos para mutações nos autossomas ocorre a eventual expressão a partir de duas cópias com mutação).

Tendo em conta o acima enunciado, havia que efectuar a análise da linha 141 com deficiências para a região 23C1-2 de modo a confirmar se o fenótipo mutante observado nos indivíduos 141 tinha origem na inserção do elemento P nessa região. Inicialmente foi difícil obter linhas deficientes para essa área, mas no decorrer do projecto, W. M. Gelbart disponibilizou a linha *Df(2L)JS17* [Sekelsky *et al.*, 1995] que permitiu um estudo dos efeitos da presença do elemento P em *γtub23C*.

4.1.1 - Caracterização da deficiência *Df(2L)JS17*

O cromossoma deficiente *Df(2L)JS17* vinha com a indicação de ter uma deleção da região 23C (Sekelsky *et al.*, 1995). A determinação exacta dos pontos de quebra, assim como a confirmação de a falha abranger a região do gene *γtub23C*, foi efectuada por observação de cromossomas politénicos de glândulas salivares e por hibridação *in situ* nos mesmos. Para o efeito procedeu-se ao cruzamento de indivíduos do tipo selvagem OR-R com outros da estirpe *Df(2L)JS17/ChTb*. Foram preparados cromossomas politénicos de glândulas salivares das larvas heterozigóticas *+/Df(2L)JS17* resultantes do cruzamento e facilmente identificáveis pela ausência do marcador *Tabby* presente no cromossoma balanciator *ChTb*. Estes cromossomas

foram hibridados com uma sonda biotilada de DNA do clone G14 (ver Fig. 2.1) e a marcação detectada com avidina conjugada com fluoresceína (Fig. 4.1). A ausência de uma porção de cromossoma em um dos cromossomas homólogos origina um desemparelhamento nessa região. A análise deste efeito nos cromossomas $+/Df(2L)JS17$ conduziu ao estabelecimento do intervalo da deleção entre 23C1-2 ; 23E1-2. O gene $\gamma tub23C$ está incluído nesta região, pois a sonda é detectada no cromossoma do tipo selvagem e não em $Df(2L)JS17$ (Fig. 4.1).

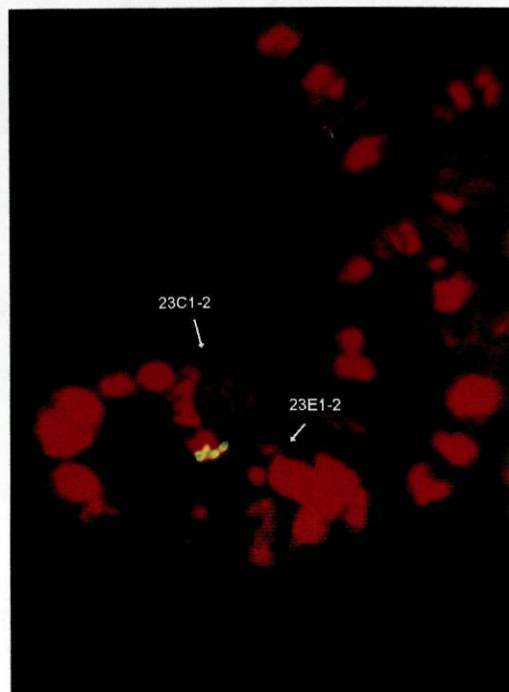


Figura 4.1 Determinação dos pontos de quebra da deficiência $Df(2L)JS17$ por análise de cromossomas politénicos $+/ Df(2L)JS17$ e por hibridação *in situ* nos mesmos com o fago G14 marcado com biotina. O cromossoma $Df(2L)JS17$ (Df) tem ausência da região compreendida entre 23C1-2 e 23E1-2, região onde se localiza $\gamma tub23C$, identificado *in situ* pela banda amarela no cromossoma do tipo selvagem (wt). DNA corado com iodeto de propídio (vermelho).

Para confirmar a ausência de $\gamma tub23C$ na deficiência $Df(2L)JS17$ foi executado um "Southern blot" com DNA genómico de moscas $141/ChTb$, $Df(2L)JS17/ChTb$ e $141/Df(2L)JS17$ digerido com endonuclease *EcoRI*, e hibridado com o fragmento HindIII -

HindIII do plasmídeo p141I (região adjacente ao elemento P inserido na linha 141) (ver Fig. 2.1). O exame da autorradiografia revela que na linha com DNA de *141/Df(2L)JS17* não surge a banda de 4 kb (Fig. 4.2 linha 2) correspondente a $\gamma tub23C$ do tipo selvagem (Fig. 4.2 linhas 1 e 3), estando só presente a banda de 6.3 kb correspondente ao $\gamma tub23C$ com a inserção do elemento P no cromossoma 141 (Fig. 4.2 linhas 2 e 3).

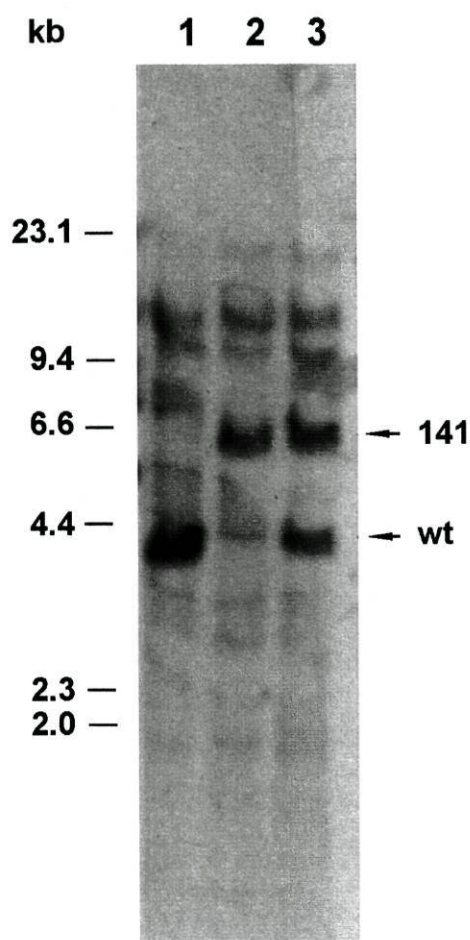


Figura 4.2 Análise molecular da presença de $\gamma tub23C$ no cromossoma deficiente *Df(2L)JS17* por "Southern blot" com DNA genómico de moscas *Df(2L)JS17/ChTb* (linha 1), *Df(2L)JS17/141* (linha 2) e *141/ChTb* (linha 3) digerido com *EcoRI* e hibridado com o fragmento HindIII-HindIII de p141I marcado radioativamente com [α - ^{32}P] dCTP. As bandas wt e 141 correspondem respectivamente ao fragmento *EcoRI* contido em $\gamma tub23C$ do tipo selvagem e a parte do mesmo, mais parte do elemento P presente no cromossoma 141.

Estes resultados comprovaram a inexistência do gene da γ -tubulina 23C na deficiência *Df(2L)JS17* e validaram a sua utilização na análise genética da linha 141.

4.1.2 - Caracterização morfológica dos indivíduos hemizigóticos 141/Df(2L)JS17

O cruzamento entre indivíduos 141/ChTb e Df(2L)JS17/ChTb resulta na eclusão de cerca de 7 % de indivíduos adultos hemizigóticos 141/Df(2L)JS17. Estes adultos apresentam severas alterações cuticulares ao nível do abdómen bem como asas a apontar para cima, fenótipos que são característicos de problemas na proliferação celular [Gatti & Goldberg, 1991]. A sua viabilidade é reduzida, no entanto as fêmeas sobreviventes são férteis, enquanto os machos são completamente estéreis. Cerca de 74 % dos imagos hemizigóticos morrem na pupa ou durante a eclusão. As larvas hemizigóticas do 3º estágio sobrevivem e os seus cérebros e discos imaginais apresentam-se desenvolvidos, contrariamente ao que sucede com as larvas homozigóticas 141.

4.1.2.1 - Fenótipo mitótico de neuroblastos de larvas 141/Df(2L)JS17

A análise citológica dos cérebros de larvas hemizigóticas 141/Df(2L)JS17 revelou um fenótipo mitótico mutante severo, diferente do observado em larvas homozigóticas 141. O fenótipo examinado caracteriza-se por um elevado índice mitótico, em que 96 % das figuras mitóticas observadas são metafases, metade das anafases tem uma organização anormal e cerca de 2.5 % são células poliplóides (Fig. 4.3).

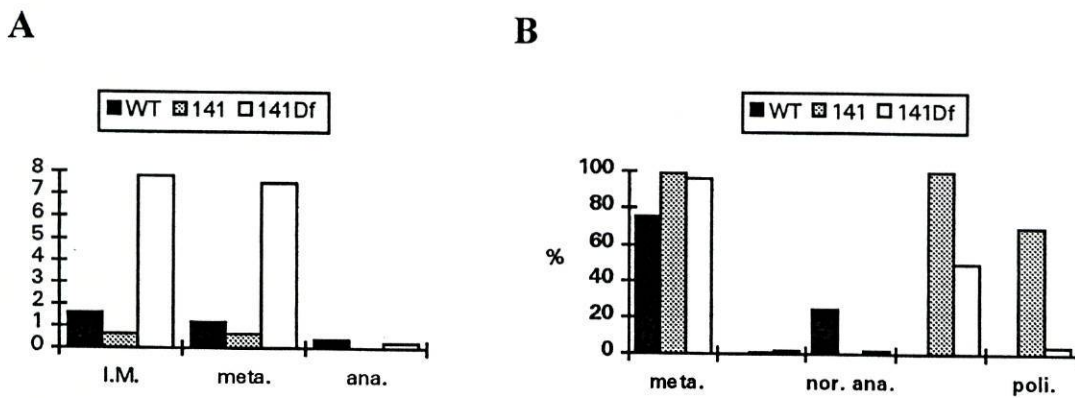


Fig. 4.3 Gráfico de frequências mitóticas em neuroblastos de larvas do 3º estado do tipo selvagem (WT), homozigóticas 141 (141) e hemizigóticas 141/Df(2L)JS17 (141Df). (A) Número total de figuras mitóticas (I.M., metafases (meta.) e anafases (ana.) presentes por campo de microscópio (objectiva de 60X). (B) Frequência relativa das diversas figuras mitóticas: metafases (meta.), anafases anormais (an. ana.) e poliplóides (poli.); (aa/ta) representa a percentagem de anafases anormais em relação ao total das anafases. Os valores correspondem ao somatório das contagens efectuadas em 15 cérebros de cada génotipo.

Os cromossomas mitóticos, com um elevado grau de condensação, estão frequentemente espalhados na região nuclear sem uma organização definida, embora se apresentem predominantemente organizados na placa metafásica. A maioria das placas são muito compactas em consequência do elevado grau de condensação dos cromossomas. Esta sobrecondensação cromossômica pode ser consequência de as células passarem muito tempo em metafase, fenómeno idêntico ao que ocorre em células paradas em metafase por agentes despolimerizadores de microtúbulos. Observam-se também, placas metafásicas nas quais os cromossomas estão organizados em forma de U. Esta disposição dos cromossomas deverá corresponder à observação lateral de placas metafásicas organizadas por fusos monopólores. As raras anafases exibem, ou uma organização normal, embora também com exagerada condensação das cromátidas, ou apresentam-se desorganizadas com as cromátidas a migrarem de modo descoordenado para ambos os pólos ou mais acentuadamente para um dos pólos. Os cérebros das larvas hemizigóticas *141/Df(2L)JS17* apresentam células poliplóides com um grau variável de plóidia, sem contudo atingirem o elevado grau de plóidia observado em neuroblatos *141*. O baixo grau de plóidia, o elevado índice mitótico e a presença de anafases normais são as principais dissemelhanças entre o fenótipo mitótico em neuroblastos de indivíduos hemizigóticos *141/Df(2L)JS17* e em homozigóticos *141* (Fig. 4.4).

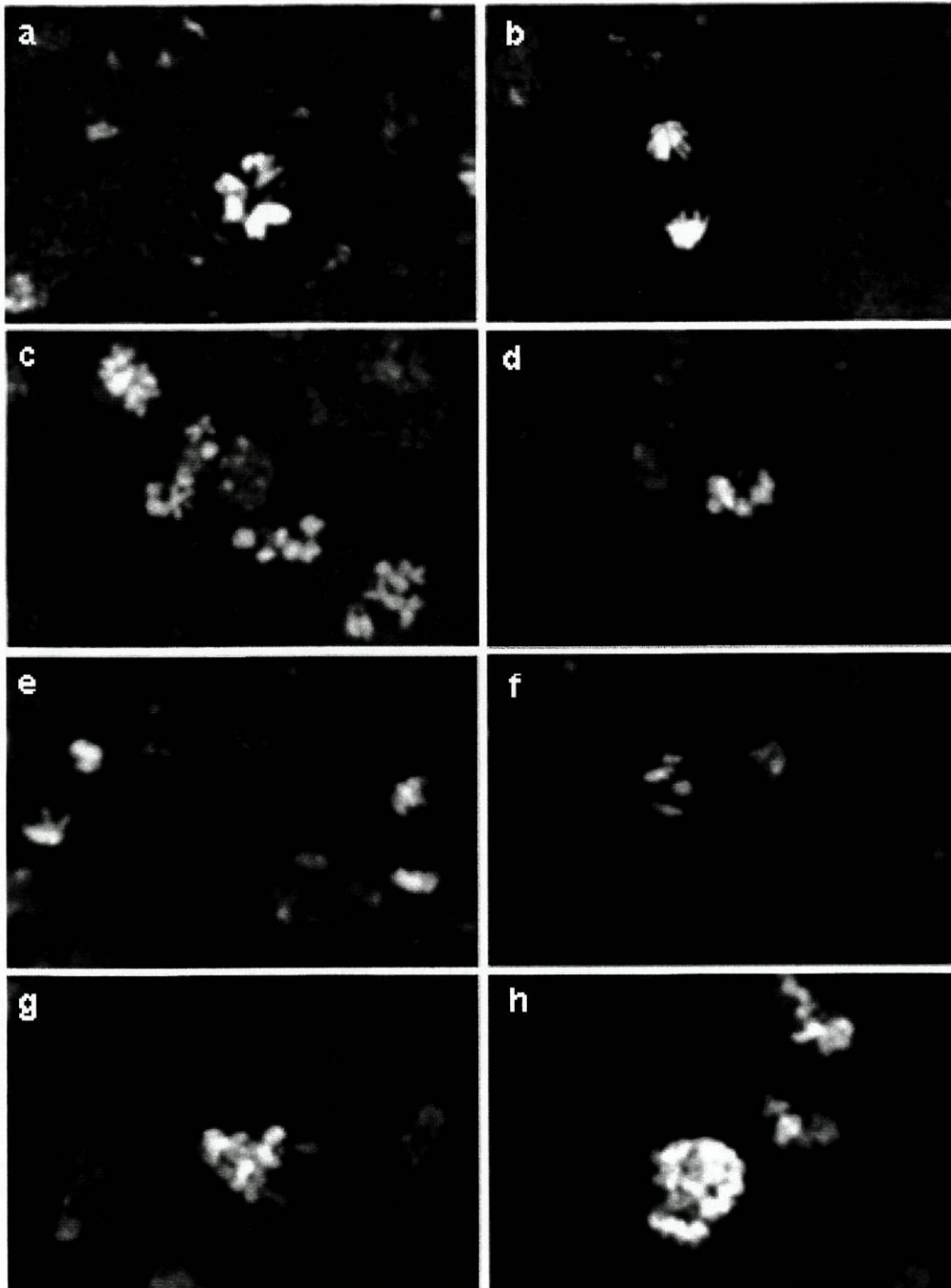


Figura 4.4 - Figuras mitóticas observadas em neuroblastos de larvas do terceiro estado do tipo selvagem (a,b) e hemizigóticas *141/Df(2L)JS17* (d-h). **a)** Célula do tipo selvagem exibindo uma placa metafásica normal. **b)** Figura de uma anafase numa célula do tipo selvagem. **c)** Células hemizigóticas exibindo cromossomas muito condensados e com uma organização irregular das placas metafásicas. **d)** Célula mutante com os cromossomas numa disposição hemicircular. **e)** Figuras de anafases exibindo excessiva condensação das cromátidas. **f)** Figura de uma anafase aberrante. **g)** Célula com um número irregular de cromossomas. **h)** Figura poliplóide com os cromossomas muito condensados e aglomerados. Preparações coradas com iodeto de propídio. A ampliação é a mesma em todas as figuras.

4.2 - Recombinação do cromossoma 141 com um cromossoma multi-marcado

As diferenças nas características fenóticas patentes pelos indivíduos *141/Df(2L)JS17* em relação às dos homozigóticos *141*, nomeadamente a viabilidade e o fenótipo mitótico, fizeram supor a existência de outras mutações no cromossoma *141*. A eliminação dessas outras possíveis mutações foi realizada por recombinação do cromossoma *141* com um cromossoma multimarcado. Estes cromossomas marcadores caracterizam-se por apresentarem múltiplas mutações recessivas em genes não vitais com localização conhecida e cada uma originar um fenótipo facilmente identificável nos indivíduos homozigóticos para essa mutação.

4.2.1 - Programa de recombinação para "limpeza" do cromossoma 141

O cromossoma *141* foi recombinado com cromossoma marcador *all*. Este cromossoma apresenta os seguintes marcadores:

Abreviatura	Nome	Citologia
<i>al</i>	<i>aristaless</i>	21C1-21C2
<i>dp</i>	<i>dumpy</i>	25A1-25A2
<i>b</i>	<i>black</i>	34D4-34D5
<i>pr</i>	<i>purple</i>	38B1-38B2
<i>c</i>	<i>curved</i>	52D1-52D7
<i>px</i>	<i>plexus</i>	58F
<i>sp</i>	<i>speck</i>	60B13-60C5

O programa de recombinação foi iniciado pelo cruzamento de organismos *141/ChTb* com *all/CyO*. A recombinação ocorre nas fêmeas *141/all* descendentes (é de notar que em machos de *Drosophila melanogaster* em geral não ocorre recombinação meiótica), fêmeas estas que foram cruzadas com machos *all/CyO*. Os cromossomas recombinantes foram

identificados pelo fenótipo resultante dos marcadores presentes em machos *141rec/all*. Cada um dos machos *141rec/all* que apresentava os marcadores pretendidos foi cruzado com uma linha balanciadora para o estabelecimento de linhas isogénicas para cada cromossoma *141* recombinante (Fig. 4.5).

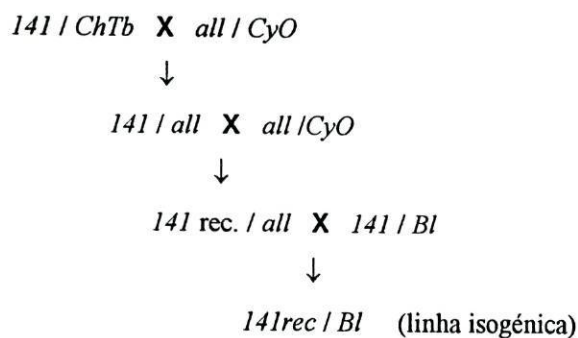


Figura 4.5 Esquema de cruzamentos de recombinação da linha *141* com o cromossoma marcador *all*. Os cromossomas recombinantes (*141rec*) foram estabilizados com os cromossomas balanciadores (*Bl*) apropriados

A inserção P141 na região 23C está compreendida entre os marcadores *al* e *dp*. Assim, foram seleccionados recombinantes com marcadores a montante ou a jusante desta região e outros que fossem simultaneamente *al* e *dp* para controlo. A presença do elemento P141 nos cromossomas recombinantes foi efectuada por PCR, utilizando os iniciadores P₁ (específico para as extremidades do elemento P) e GT2 (específico para *γtub23C*) (ver Fig. 2.1). A figura 4.6 representa resumidamente o resultado do programa de recombinação para a "limpeza" do cromossoma *141*. Verificou-se que existe pelo menos outra mutação que confere letalidade aos homozigóticos *141*. Esta segunda mutação localiza-se entre *c* e *px*, pois os organismos homozigóticos recombinantes com esta região oriunda de *all* são completamente viáveis, caso não tenham a inserção do elemento P141, ou apresentam um grau de viabilidade semelhante ou superior ao observado para os heterozigóticos *141/Df(2L)JS17* caso o elemento P esteja presente.

recombinantes	P141 ▼				viabil.	23C ^{PI}	2 letal
	<i>al dp</i>	<i>b pr</i>	<i>c</i>	<i>px sp</i>			
<i>al</i>	-----				-	-	+
<i>al dp</i>	-----				-	-	+
<i>al dp b</i>	-----	-----			-	-	+
<i>al dp b pr</i>	-----	-----			-	-	+
<i>al c px sp</i>	-----		-----	-----	+	+	-
<i>al dp px sp</i>	-----		-----	-----	++	-	-
<i>dp b px sp</i>	-----		-----	-----	-	+	+
<i>dp b pr px sp</i>	-----	-----	-----	-----	++	-	-
<i>b pr c px sp</i>	-----	-----	-----	-----	+	+	-
<i>b pr c</i>	-----	-----	-----		+	+	-
<i>b pr</i>	-----	-----			-	+	+
<i>b pr px sp</i>	-----	-----	-----	-----	+/-	+	-/+
<i>c px sp</i>	-----		-----	-----	+	+	-
<i>c px</i>	-----		-----		+	+	-
<i>c</i>	-----		-----		+	+	-
<i>px sp</i>	-----		-----	-----	-	+	+
<i>sp</i>	-----		-----	-----	-	+	+

Figura 4.6 Caracterização geral das diversas linha de recombinantes 141 isoladas no programa de "limpeza" do cromossoma 141. Cada esquema linear representa o cromossoma recombinante com a indicação da parte derivada do cromossoma 141 (preto), a parte derivada do cromossoma *all* (vermelho) e a região da qual não é possível determinar a origem (verde). Nas colunas à direita do esquema linear está indicado se indivíduos adultos homocigóticos de cada linha recombinante eram viáveis (+) ou não viáveis (-), e se tinham a presença (+) ou ausência (-) do elemento P inserido em $\gamma tub23C$, bem de uma segunda mutação.

4.2.2 - Características das linhas recombinantes sem elemento P

Foi efectuada uma análise não exaustiva dos indivíduos homocigóticos recombinantes que não contêm a inserção do elemento P em $\gamma tub23C$. As linhas recombinantes para a região *c px* originam indivíduos adultos viáveis, sem anomalias e férteis. As linhas conjuntamente não *c* e não *px* são letais no terceiro estado larvar. Os neuroblastos dessas larvas exibem um

fenótipo mitótico que se caracteriza, em geral, por reduzidíssimo número de figuras mitóticas por cérebro, por uma condensação cromossômica excessiva e por vezes também irregular, pela desorganização das placas metafásicas e pela raridade das anafases. Observam-se igualmente células poliplóides, mas nunca com o elevado grau de poliplóidia presente em neuroblastos de indivíduos 141 (Fig. 4.7).

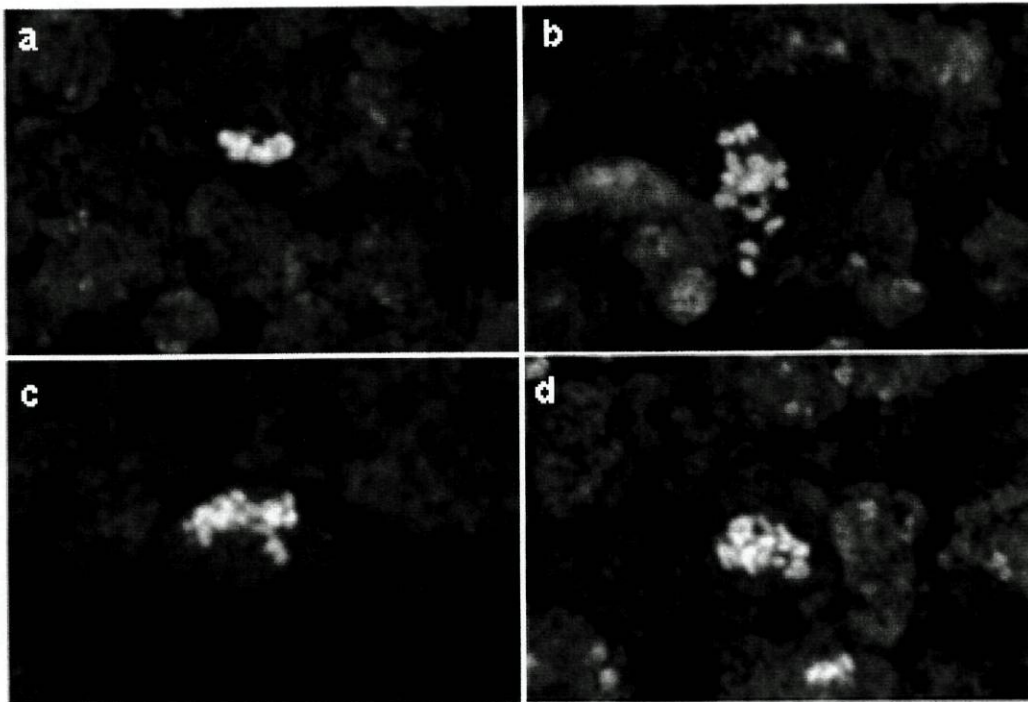


Figura 4.7 Figuras mitóticas observadas em neuroblastos de indivíduos recombinantes sem a inseção P 141
a) Placa metafásica em célula *al dp b* **b)** Célula *al dp b* poliplóide exibindo cromossomas muito condensados sem organização da placa metafásica. **c)** Célula *al dp b* poliplóide com os cromossomas aglomerados e excessivamente condensados **d)** Célula *al dp b pr* que aparenta estar em anafase. Preparações coradas com iodeto de propídio. A ampliação é a mesma em todas as figuras.

4.2.3 - Características das linhas recombinantes com elemento P

As linhas recombinantes com elemento P em *γub23C* em que não ocorreu a recombinação da região *c px* são em tudo idênticas à linha 141 original, quer no que respeita à letalidade quer ao fenótipo mitótico. No que concerne às linhas em que ocorreu a recombinação da região *c px* observa-se, no total das moscas adultas, a eclosão 10-15 % de indivíduos adultos homozigóticos. Estes indivíduos exibem severas alterações cuticulares no

abdômen, esterilidade masculina e fertilidade reduzida nas fêmeas. A análise do fenótipo mitótico em neuroblastos de larvas homozigóticas revelou, em geral, um aparente índice mitótico superior ao observado no tipo selvagem, uma alta frequência de metafases, raras células poliploides, excessiva condensação cromossômica e anafases desorganizadas entre uma significativa percentagem de anafases normais. O fenótipo mitótico mutante observado nestes recombinantes assemelha-se ao patente nos neuroblastos hemizigóticos *141/Df(2L)JS17*, embora com um menor grau de severidade. No capítulo seguinte irá ser caracterizada, com mais promenor, a linha recombinante *141 b pr c px sp* (linha *141bs*).

4.3 - Discussão

A análise genética do cromossoma *141* com um cromossoma portador de deleção da região 23C1-2 ; 23E1-2 confirmou a existência de mutações dentro dessa região, possivelmente por inserção do elemento P em *γtub23C*. Contudo, esta análise mostrou que essas mutações não eram as únicas responsáveis pelo fenótipo mutante da linha *141*. O cromossoma *141* original devia ter outras mutações localizadas fora da região coberta pela deleção, pois os indivíduos hemizigóticos exibiam um fenótipo diferente dos homozigóticos *141*. Contrariamente a estes últimos, os indivíduos *141/Df(2L)JS17* exibem um fenótipo mitótico mutante com uma elevada frequência de figuras e sem extensas poliplóidias. Todavia, as características da figuras mitóticas mutantes exibidas pelos hemizigóticos e homozigóticos são qualitativamente semelhantes. No caso da letalidade também se registam diferenças entre os dois genótipos, sendo os indivíduos *141/Df(2L)JS17* parcialmente viáveis, ocorrendo a eclusão de um número significativo de adultos. Estes adultos refletem a existência de alterações na proliferação celular, pois exibem severas alterações cuticulares e apresentam perturbações da fertilidade, a qual é reduzida nas fêmeas enquanto os machos são estéries.

O aparecimento de outras mutações é frequente em programas de mutagénese por elemento P, tendo origem provável em mutações pré-existentes ou na excisão imprecisa do elemento P [Gatti & Goldberg, 1991]. A eliminação destas outras mutações no cromossoma *141* foi efectuada por recombinação com um cromossoma multimarcado. Como resultado do programa de recombinação localizou-se a segunda mutação no intervalo entre a região 52D1-D7 e 58F, e foram isolados diversos cromossomas *141* recombinantes isentos dessa mutação.

Esta segunda mutação é letal e os indivíduos homozigóticos para a mesma apresentam um fenótipo mitótico mutante caracterizado, em geral, pela presença rara de figuras mitóticas. A sua interacção com as mutações na região 23 deve ser a origem do severo fenótipo mutante da linha 141 original, nomeadamente a total letalidade, o baixo índice mitótico e as grandes poliplóidias, atendendo as diferenças já referidas entre os indivíduos hemizigóticos e homozigóticos 141.

Os indivíduos homozigóticos 141 recombinantes "limpos" têm características semelhantes ao hemizigóticos 141, todavia o efeito da mutação é menos severo o que faz pressupor estarmos perante uma mutação hipomórfica.

O fenótipo mitótico mutante originado pelas mutações na região 23 reforçou a ideia inicialmente proposta [Gomes, 1994] de estas causarem alterações no aparelho mitótico. O índice mitótico acima do normal associado à elevada frequência de metafases, bem como a supercondensação dos cromossomas e a segregação irregular das cromátidas são consequências típicas de mutações que afectam o aparelho mitótico em *Drosophila* [Gonzalez *et al.*, 1988; Sunkel & Glover, 1988; Gonzalez *et al.*, 1990; Heck *et al.*, 1993; Glover *et al.*, 1995]. A presença do elemento P em $\gamma tub23C$ aponta para a hipótese de as eventuais alterações no aparelho mitótico serem consequência de modificações na expressão da γ -tubulina 23C. A sustentar a hipótese está a presumível função da γ -tubulina na formação do fuso mitótico, mediante uma acção sobre a nucleação dos microtúbulos (ver capítulo 1) e cuja a confirmação virá com os testes de complementação da mutação com cópias de $\gamma tub23C$ do tipo selvagem, que será assunto do próximo capítulo.

Um dado novo que surgiu da análise genética da linha 141 foi a esterilidade dos machos hemizigóticos ou homozigóticos recombinantes. A esterilidade poderá ser consequência directa das mutações presentes na região 23, uma vez que as fêmeas não são tão afectadas. Estas são férteis, pese embora a fertilidade esteja reduzida presumivelmente em consequência de um efeito indirecto motivado pela perturbação na proliferação celular. Esta diferença na fertilidade entre os sexos reflecte eventualmente as diferenças na organização dos fusos meióticos, que no caso das fêmeas é acentríolar [Theurkauf & Hawley, 1992], e uma distinta participação do produto do gene mutado na formação dos mesmos. De facto, um estudo recente com alelos mutantes de $\gamma tub37C$ mostrou que a formação dos fusos meióticos nas fêmeas e as primeiras divisões mitóticas do embrião é dependente da $\gamma TUB37C$ e não do produto de $\gamma tub23C$ [Travosanis *et al.*, 1997].

Capítulo 5

Transformação de linhas germinais com o gene γ tub23C

A comprovação da linha 141 como um alelo mutante da γ -tubulina 23C foi efectuada pela análise de complementação da mutação por uma cópia do gene γ tub23C do tipo selvagem. A inserção da cópia de γ tub23C no genoma de indivíduos homocigóticos das linhas 141 foi obtida após transformação, mediante elemento P, de linhas germinais de embriões de *Drosophila melanogaster* com um fragmento de DNA genómico contendo o gene. Este método baseia-se na capacidade que os elementos P têm para se inserirem no genoma das células germinais [Spradling & Rubin, 1982; Rubin & Spradling, 1982]. Para este efeito foram contruídos elementos P contendo diversas partes da região genómica de γ tub23C. Estes elementos, sob a forma de plasmídeo, foram introduzidos por microinjecção nas células germinais de embriões muito jovens. As linhas transformantes foram cruzadas com indivíduos das linhas 141 para a obtenção de linhas 141 com a presença de cópias de γ tub23C e subsequente avaliação do efeito destas cópias sobre o fenótipo mutante conferido pela inserção de um elemento P em γ tub23C.

5.1 - Construção de vectores de transposição contendo o gene da γ -tubulina 23C

Foram construídos três plasmídios por inserção de diferentes fragmentos de DNA genómico da região do gene γ tub23C nos locais de clonagem do vector pW8 [Klemenz *et al.*, 1987]. Este vector é um elemento P defectivo, pois só tem as extremidades invertidas

essenciais para a sua inserção no genoma, não se podendo auto-mobilizar por ausência do gene da transposase. Entre as extremidades invertidas existe uma região com vários locais de clonagem únicos e parte do gene *white* em fusão com o promotor do gene *hsp70*. As moscas de estirpes "*white*", cujos olhos são brancos, após inserção deste elemento no seu genoma passam a ter olhos de cor vermelha cuja intensidade varia com o número de cópias inseridas, permitindo assim a identificação das linhas transformadas.

5.1.1 - p[w⁺-gt-23C]

Um fragmento de DNA genómico de 12 kb contendo o gene da γ -tubulina 23C foi isolado do fago G14 (ver Fig. 2.1) por restrição com a endonuclease *EcoXI* e clonado no local *NotI* do vector pW8, originando o plasmídeo pW[gt23C] que contém o transposão p[w⁺-gt-23C] (Fig. 5.1).

5.1.2 - p[w⁺-gt-23CRI]

Para reduzir a região genómica contendo o gene γ tub23C a um mínimo funcional e eliminar outros possíveis genes presentes na região de 12 kb contida no transposão p[w⁺-gt-23C], um fragmento de DNA genómico de 4 kb foi isolado do fago G14 (ver Fig. 2.1) por restrição com a endonuclease *EcoRI* e clonado no local *EcoRI* do vector pW8, originando o plasmídeo pW[gt23CRI] que inclui o transposão p[w⁺-gt-23CRI] (Fig. 5.2).

5.1.3 - p[w⁺-gt-23CA]

Como controlo negativo foi construído o vector pW[gt23CA] por inserção no vector pW8 de um fragmento *XbaI* de 5 Kb isolado do clone G14 (ver Fig. 3.1), que só contém metade da região codificante de γ tub23C (Fig. 5.3).



Figura 5.1 Representação esquemática do transposição $p[w^+-gt-23C]$. Entre as extremidades invertidas características do elemento P (cabeças de seta) está clonado um fragmento de DNA genómico da região de $\gamma tub23C$ (23C), abrangendo 3 kb a montante da região codificante (gtCDS) e 6,5 kb a jusante. O mini gene *white* está sob a acção do promotor de *hsp70* (barra preta).

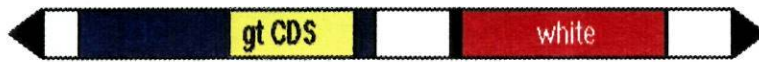


Figura 5.2 Representação esquemática do transposição $p[w^+-gt-23CRI]$. Entre as extremidades invertidas características do elemento P (cabeças de seta) está clonado um fragmento de DNA genómico da região de $\gamma tub23C$ (23C), abrangendo 2 kb a montante da região codificante (gtCDS) e 400 pb a jusante. O mini-gene *white* está sob a acção do promotor de *hsp70* (barra preta).

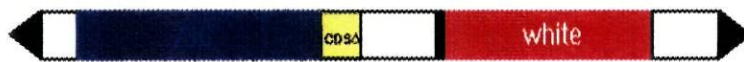


Figura 5.3 Representação esquemática do transposição $p[w^+-gt-23CA]$. Entre as extremidades invertidas características do elemento P (cabeças de seta) está clonado um fragmento de DNA genómico da região de $\gamma tub23C$ (23C), abrangendo 4 kb a montante da região codificante, estando esta truncada sensivelmente a meio (gtCDS Δ). O mini-gene *white* está sob a acção do promotor de *hsp70* (barra preta).

5.2 - Transformação de linhas germinais

A transformação de linha germinais foi efectuada mediante a microinjecção de DNA de cada plasmídeo, conjuntamente com o do plasmídeo $\text{phs}\pi\Delta(2,3)\text{wc}$ [Steller & Pirrotta, 1985], no pólo posterior de embriões de 0-1,5 horas da estirpe $w^{1118}; Sb, e, \Delta(2,3)/TM6$. Esta estirpe e o plasmídeo $\text{phs}\pi\Delta(2,3)\text{wc}$ contêm, numa forma não transponível, o gene que codifica para a transposase, proteína é essencial para que ocorra a transposição dos elemento P. A selecção dos transformantes foi conduzida através do cruzamento dos indivíduos adultos com moscas da estirpe $W1118$ ($w^{1118}; +, +$), sendo reconhecidas as linhas transformantes pela eclosão de indivíduos com olhos de cor vermelha entre a progénie (Fig. 5.4).

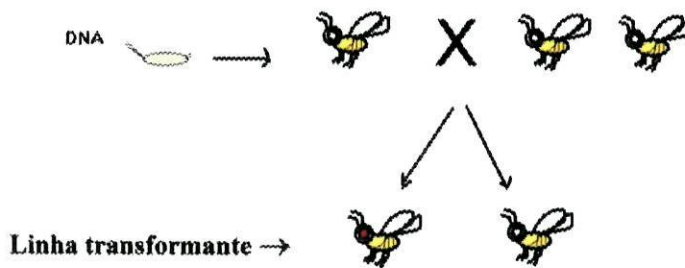


Figura 5.4 Esquema da transformação de linhas germinais. As moscas originárias de embriões injectados com DNA dos plasmídios transformantes são cruzadas com indivíduos de uma estirpe *white*. Os indivíduos transformantes surgem na progénie destes cruzamentos, com olhos vermelhos.

5.2.1 - Linhas transformadas com $p[w^+-gt-23C]$

De dezoito moscas férteis originárias de embriões microinjectados com o plasmídeo $pW[gt23C]$ obteve-se uma linha transformante independente, resultante do cruzamento individual de um macho G_0 com fêmeas $W1118$. Na geração G_1 desse cruzamento surgiram moscas com olhos de cor vermelha, sendo todas *Stable*. A ausência de moscas não-*Stable* com olhos vermelhos indicou que a inserção do transposão $p[w^+-gt-23C]$ tinha ocorrido no cromossoma 3 que continha o elemento não transponível $\Delta(2-3)$. Os machos G_1 de olhos vermelhos foram cruzados com uma estirpe balancidora apropriada para o estabelecimento da estirpe *GT1* (Fig. 5.5). A presença do gene da transposase no cromossoma transformado ponha o perigo da mobilização do transposão $p[w^+-gt-23C]$, e também da mobilização da inserção $p141$ no decurso dos cruzamentos efectuados para testar a complementação da mutação. Para

eliminar o elemento $\Delta(2-3)$ deixou-se ocorrer a recombinação do cromossoma e para isso procedeu-se ao cruzamento das fêmeas G_1 de olhos vermelhos com machos da estirpe $w;TM3,Sb,e/TM6,Ubx,e$, analisando-se posteriormente a progénie recombinante no que respeita à presença dos marcadores *Stable* e *ebony*. As moscas G_2 de olhos vermelhos eram *Stable* e *ebony*, ou *Stable*, ou não-*Stable* e não-*ebony*, não tendo surgido nenhuma que fosse somente *ebony*. Este resultado levou-nos a concluir que a inserção $p[w^+-gt-23C]$ estava a montante de *Stable* e ao estabelecimento da estirpe $GT2$ como as moscas não-*Stable*, não-*ebony* e com elevada probabilidade de serem não- $\Delta(2-3)$ pois o gene da transposase estava inserido a jusante de *ebony*, na posição 99B (Fig. 5.5).

5.2.2 - Linhas transformadas com $p[w^+-gt-23CRI]$

Dos embriões microinjectados com o plasmídeo $pW[gt23CRI]$ obtiveram-se cinco moscas férteis. Destas, uma fêmea originou um linha transformante independente. Na geração G_1 do cruzamento dessa fêmea com machos *W1118* ecludiram machos e fêmeas de olhos vermelhos. Estas moscas eram indiscriminadamente *Stable* ou *Ubx*. Machos G_1 de olhos vermelhos e *Ubx* foram cruzados com fêmeas, apresentando um cromossoma X balanciador. A geração G_2 era contituida inteiramente por fêmeas de olhos vermelhos e machos de olhos brancos, o que revela a inserção do transposição $p[w^+-gt-23CRI]$ no cromossoma X. As moscas G_2 com o balanciador *FM6* foram cruzadas entre si para o estabelecimento da estirpe $GT3$ (Fig. 5.6).

5.2.1 - Linhas transformadas com $p[w^+-gt-23CA]$

Dos embriões microinjectados com o plasmídeo controlo $pW[gt23CA]$ ecludiram catorze moscas férteis. Destas, um macho originou uma linha transformante independente. Na geração G_1 desta linha todas as fêmeas tinham olhos de cor vermelha, enquanto que os machos eram brancos. Esta distribuição sexual da cor dos olhos indica a inserção do transposição $p[w^+-gt-23CA]$ no cromossoma X. Fêmeas G_1 *Ubx* foram cruzadas com machos portadores de um cromossoma X balanciador. As moscas G_2 de olhos vermelhos foram cruzadas entre si para o estabelecimento da estirpe $GT4$ (Fig. 5.7).

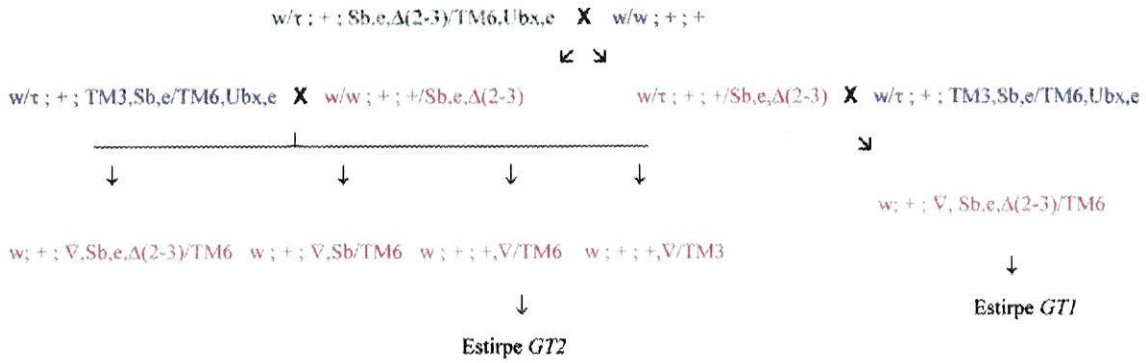


Figura 5.5 Esquema de cruzamentos para o estabelecimento de linhas transformadas com $p[w^+-gt-23C]$. Os indivíduos resultantes dos embriões injectados (verde) foram cruzados com moscas w^- (azul) originando indivíduos w^+ (vermelho) resultantes da inserção de $p[w^+-gt-23C]$ (∇).

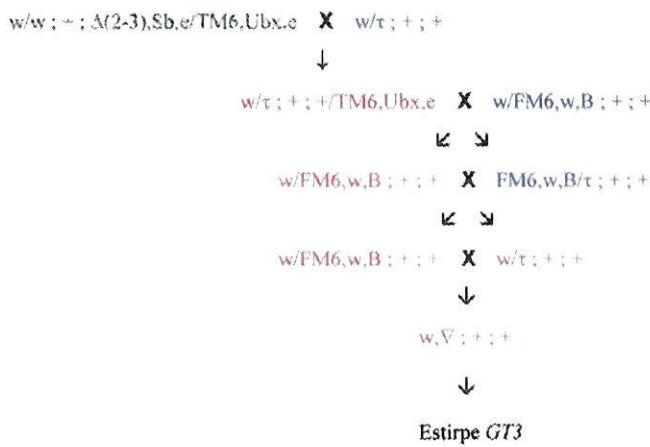


Figura 5.6 Esquema de cruzamentos para o estabelecimento da linha transformada com $p[w^+-gt-23CRI]$. Os indivíduos resultantes dos embriões injectados (verde) foram cruzados com moscas w^- (azul) originando indivíduos w^+ (vermelho) resultantes da inserção de $p[w^+-gt-23CRI]$ (∇).

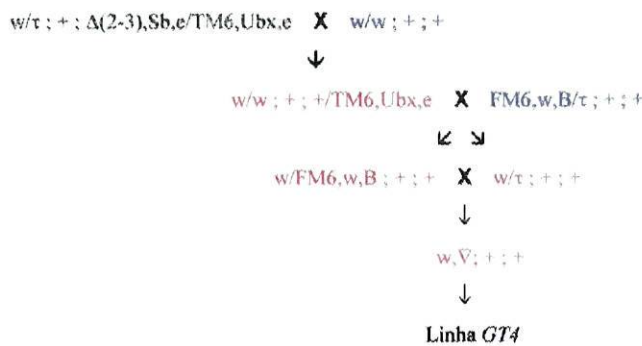


Figura 5.7 Esquema de cruzamentos para o estabelecimento da linha transformada com $p[w^+-gt-23CA]$. Os indivíduos resultantes dos embriões injectados (verde) foram cruzados com moscas w^- (azul) originando indivíduos w^+ (vermelho) resultantes da inserção de $p[w^+-gt-23CA]$ (∇).

5.3 - Testes de complementação

Os transposões ∇ GTx foram incluídos no genoma das linhas *141* através de uma série de cruzamentos entre as linhas transformantes e as linhas *141* (ver material e métodos).

O efeito da presença das inserções ∇ GTx sobre o fenótipo mutante apresentado pelas linhas *141* varia entre a linha *141* original e as recombinantes. No caso da linha original *141*, a presença de qualquer das inserções não complementa a letalidade larvar dos indivíduos homozigóticos *141*. Porém, na presença das inserções ∇ GT2 e ∇ GT3 o fenótipo mitótico dos neuroblastos é diferente do observado na ausência dessas inserções, sendo similar ao observado nas linhas recombinantes não *c px* e sem elemento P. Contrariamente, a inserção ∇ GT4 com o gene truncado não altera o fenótipo mitótico mutante da linha *141* original. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos dos estudos com a deficiência e de recombinação, que indicam a presença de um segundo letal no cromossoma *141* original. A confirmar que a mutação do gene da γ -tubulina 23C é a origem do fenótipo mutante característico dos indivíduos *141* livres da acção de outras mutações, que não a inserção do elemento P em *ytub23C*, está o que se verifica com as linhas *141* recombinantes testadas (*141 al c px sp*, *141 c px sp* e *141 b pr c px sp*) e *141* sobre *Df(2L)JH17*. Nestes casos, a presença dos transposões ∇ GT2 e ∇ GT3 complementa totalmente o fenótipo mutante dos indivíduos homozigóticos e hemizigóticos, não só quanto letalidade bem como quanto às alterações morfológicas, mitóticas e de fertilidade. Esta complementação não se verifica na presença da forma truncada de *ytub23C* (∇ GT4).

5.4 - Discussão

Os estudos de complementação das linhas *141* com cópias de *ytub23C* envolveram a transformação de linhas germinais com diversas construções contendo fragmentos de DNA genómicos da região de *ytub23C*.

A presença no genoma das linhas *141* de cópias de *ytub23C* completo é suficiente para estabelecer um fenótipo do tipo selvagem nos indivíduos hemizigóticos das linhas *141* e homozigóticos *141* recombinantes "limpos". Este resultado prova que a inserção do elemento P no gene da γ -tubulina 23C é a responsável por todos os aspectos mutantes exibidos pelas linhas

141 isentas de mutações fora da região 23C-E e que dentro desta região, a mutação em γ tub23C é única. Assim, estamos perante o que já anteriormente se supunha ser um alelo mutante da γ -tubulina 23C. Atendendo ao facto de ser uma mutação induzida pela presença de um elemento P, o alelo mutante foi designado como γ tub23C^{PI}.

À semelhança do que já havia sido demonstrado no capítulo anterior com caracterização genética da linha 141, também estes estudos confirmaram a presença de outras mutações fora da região 23C-E, pois a presença de cópias de γ tub23C no genoma de indivíduos homozigóticos da linha 141 original não complementa o fenótipo mutante destes.

Os testes de complementação permitiram igualmente delimitar a uma região genómica de 5 kb, todos os elementos necessários à expressão da γ -tubulina 23C, possibilitando uma futura utilização do fragmento de DNA contendo esta região em estudos de análise funcional da proteína *in vivo*. Exemplo destes possíveis futuros estudos é transformação de linha germinais ou a transfecção de linha celulares com as construções apropriadas que permitam analisar os domínios funcionais da proteína, bem como os que determinam a sua localização nos MTOCs, ou quais os que podem ser substituídos por domínios de outras tubulinas, atendendo à homologia entre as diversas tubulinas.

Capítulo 6

Análise detalhada da mitose no mutante $\gamma tub23C^{PI}$

O trabalho realizado sobre o cromossoma *141* original resultou na detecção de outras mutações presentes no mesmo, com influência sobre o fenótipo mutante apresentado pelos indivíduos homozigóticos da linha *141* original. Igualmente, foi levantada a suspeita de estarmos perante uma mutação hipomórfica, em virtude do número de indivíduos adultos viáveis homozigóticos de linhas *141* recombinantes ou hemizigóticos com a deficiência DF(2L)JS17. Os estudos de complementação por transformação com fragmentos genómicos da região de $\gamma tub23C$ mostraram indubitavelmente que a linha *141* é um alelo mutante do gene da γ -tubulina 23C.

Neste capítulo descreve-se mais detalhadamente as alterações produzidas sobre mitose pela inserção do elemento P em $\gamma tub23C$. Para o efeito, utilizou-se a linha *141bs* derivada da linha *141* original após recombinação do cromossoma *141*.

6.1 Características da linha *141bs*

A linha *141bs* resultou do programa de recombinação para "limpeza" do cromossoma *141* como foi descrito (capítulo 4). Este cromossoma tem a parte do cromossoma *141* original onde se insere o elemento P e toda a região entre *black* e *speck* do cromossoma multimarcado utilizado na recombinação, sendo o cromossoma recombinante com elemento P que contém a menor porção do cromossoma *141* original. Estirpes isogénicas do cromossoma *141bs* foram estabelecidas sobre o balanciator *ChTb* para manutenção do cromossoma e identificação de larvas homozigóticas.

A linha *141bs* apresenta uma viabilidade reduzida dos indivíduos homozigóticos. Estes constituem cerca de 14 % do total de adultos, enquanto que aproximadamente 45 % das pupas homozigóticas morrem numa fase de pré-eclusão. Os indivíduos adultos homozigóticos exibem graves alterações cuticulares ao nível do abdómen (nomeadamente na região posterior), uma redução da fertilidade das fêmeas e a total esterilidade dos machos. Estas características são similares às patentes pelos hemizigóticos da linha *141* original e *141bs/Df(2L)JS17*, embora com um menor grau de severidade.

6.2 Fenótipo mitótico

Os neuroblastos de larvas do 3º estado de indivíduos homozigóticos *141bs* apresentam um fenótipo mitótico caracterizado por um índice mitótico superior ao verificado no tipo selvagem, com cerca do dobro da frequência de metafases e uma redução na frequência de anafases. Nos hemizigóticos estas diferenças são ainda mais acentuadas (Fig. 6.1A). De entre as figuras mitóticas observadas nos neuroblastos homozigóticos, mais de 80% são metafases, uma pequena percentagem das anafases tem uma organização anormal e ocasionalmente são observadas células poliplóides. Nos hemizigóticos regista-se uma fracção superior de anafases anormais e de células poliplóides, bem como de metafases (Fig. 6.1B).

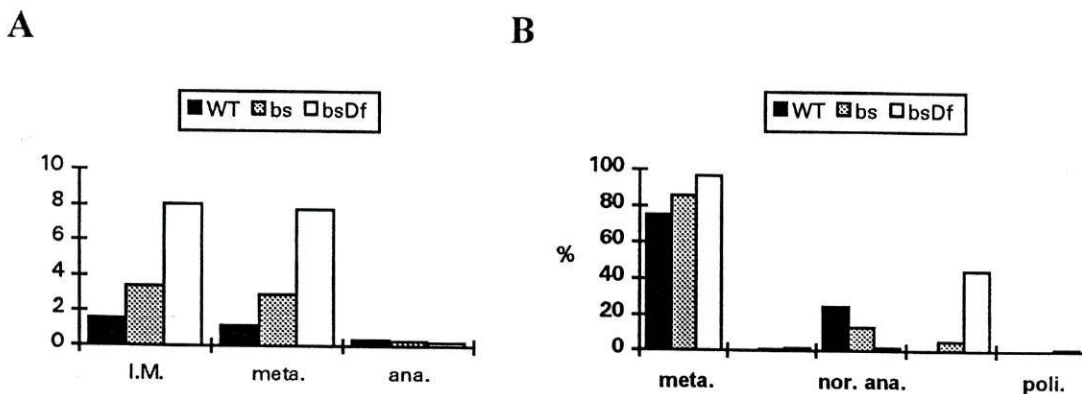


Figura 6.1 Gráfico de frequências mitóticas em neuroblastos de larvas do 3º estado do tipo selvagem (WT), homozigóticos *141bs* (*141bs*) e hemizigóticos *141bs/Df(2L)JS17* (*141bsDf*). (A) Número total de figuras mitóticas (I.M), metafases (meta.) e anafases (ana.) presentes por campo de microscópio (objectiva de 60X). (B) Frequência relativas das diversas figuras mitóticas: metafases (meta.), anafases anormais (an. ana.) e poliplóides (poli.); (aa/ta) representa a percentagem de anafases anormais em relação ao total das anafases. Os valores correspondem ao somatório das contagens efectuadas em 15 cérebros de cada genótipo.

O arranjo dos cromossomas nas figuras mitóticas varia entre uma disposição do tipo selvagem, com placas metafásicas e anafases bem organizadas, e uma desorganização com diversos graus de intensidade. O tipo mais comum de arranjo são metafases do tipo selvagem, embora com tendência para se apresentarem compactas em virtude de uma sobrecondensação dos cromossomas. O excesso de condensação é mais evidente nas metafases totalmente desorganizadas, em que os cromossomas podem ser observados isolados, e nos neuroblastos hemizigóticos. Outro tipo de arranjo metafásico, não muito frequente, corresponde a figuras circulares ou semicirculares, indiciadoras de fusos monopolares. No que respeita às anafases, para além das do tipo selvagem, podem ser observadas anafases em que as cromátidas ascendem a um ou ambos os pólos de uma forma descoordenada. São também observadas metafases e anafases poliplóides, com um grau de plóidia igual ou inferior a $8n$, nos homozigóticos e com maior frequência nos hemizigóticos (Fig. 6.2).

Apesar das diferenças já anteriormente referidas, o fenótipo mitótico mutante exibido pelos neuroblastos das larvas *141bs* homozigóticas ou hemizigóticas está qualitativamente de acordo com o inicialmente descrito para a linha *141* original e confirma que o alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ deverá causar alterações significativas na funcionalidade do aparelho mitótico.

6.3 - Expressão de γ -tubulina em neuroblastos e discos imaginais

O incremento na severidade do fenótipo mitótico mutante observado nos indivíduos hemizigóticos está de acordo com os indícios que apontavam para o mutante $\gamma tub23C^{PI}$ ser um hipomorfo. Assim, para o confirmar a nível molecular foi efectuada a imunodeteção de γ -tubulina por "western blot" em extractos totais de proteínas de cérebros e discos imaginais de larvas do 3º estado do tipo selvagem, homozigóticas *141bs* e hemizigóticas *141bs/Df(2L)JS17*. Observa-se que em relação ao registado no tipo selvagem (Fig. 6.3 linha 1), em *141bs* há uma redução dos níveis de γ -tubulina (Fig. 6.3 linha 2), sendo a redução muito mais acentuada nos hemizigóticos *141bs/Df(2L)JS17* (Fig. 6.3 linha 3). Este resultado confirma que o alelo

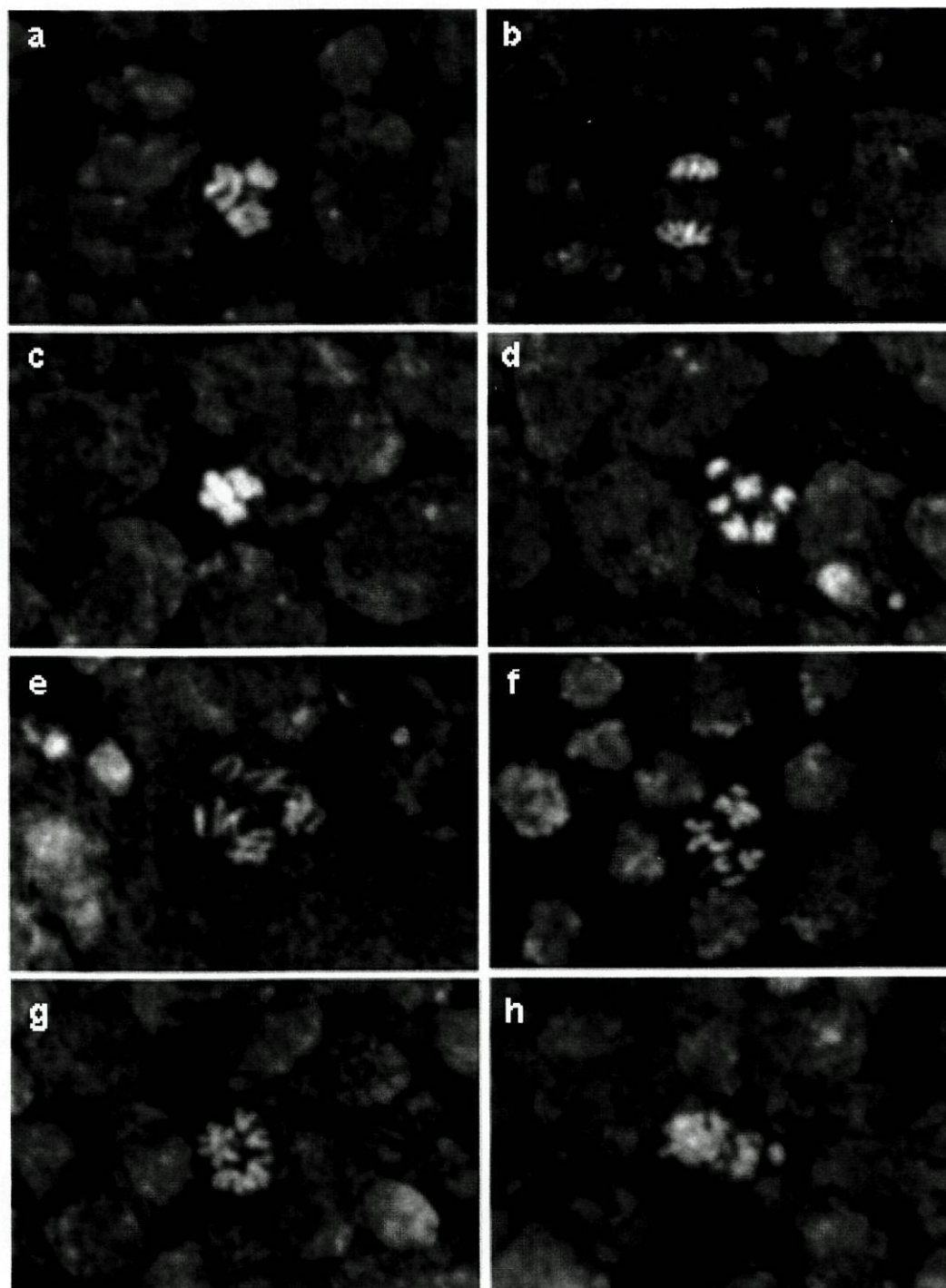


Figura 6.2 Figuras mitóticas observadas em neuroblatos indivíduos *141bs*. **a)** Placa metafásica do tipo selvagem **b)** Anafase do tipo selvagem **c)** Placa metafásica muito condensada **d)** Cromossomas hipercondensados não organizados em placa metafásica **e)** Anafase que as cromátidas acendem de modo desordenado a um dos polos **f)** Anafase aberrante **g)** Figura do tipo circular, mas em que dois cromossomas estão dispostos de modo irregular **h)** Célula poliplóide com os cromossomas aglomerados e excessivamente condensados. Preparações coradas com iodeto de propídio. A ampliação é a mesma em todas as figuras.

$\gamma tub23C^{PI}$ é hipomórfico, pois neste mutante ainda há expressão de γ -tubulina, correspondendo esta, pelo menos em parte, à isoforma 23C, pois a eliminação de uma cópia de $\gamma tub23C$ na combinação hemizigótica tem como consequência a diminuição na quantidade de γ -tubulina.

A γ -tubulina presente nos mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ foi localizada por imunofluorescência indirecta nos centrossomas dos neuroblastos (Fig. 6.3B b), essencialmente associada a figuras normais, embora a intensidade do sinal obtido e a sua frequência fosse inferior ao que se observa em neuroblastos do tipo selvagem (Fig. 6.3B a).

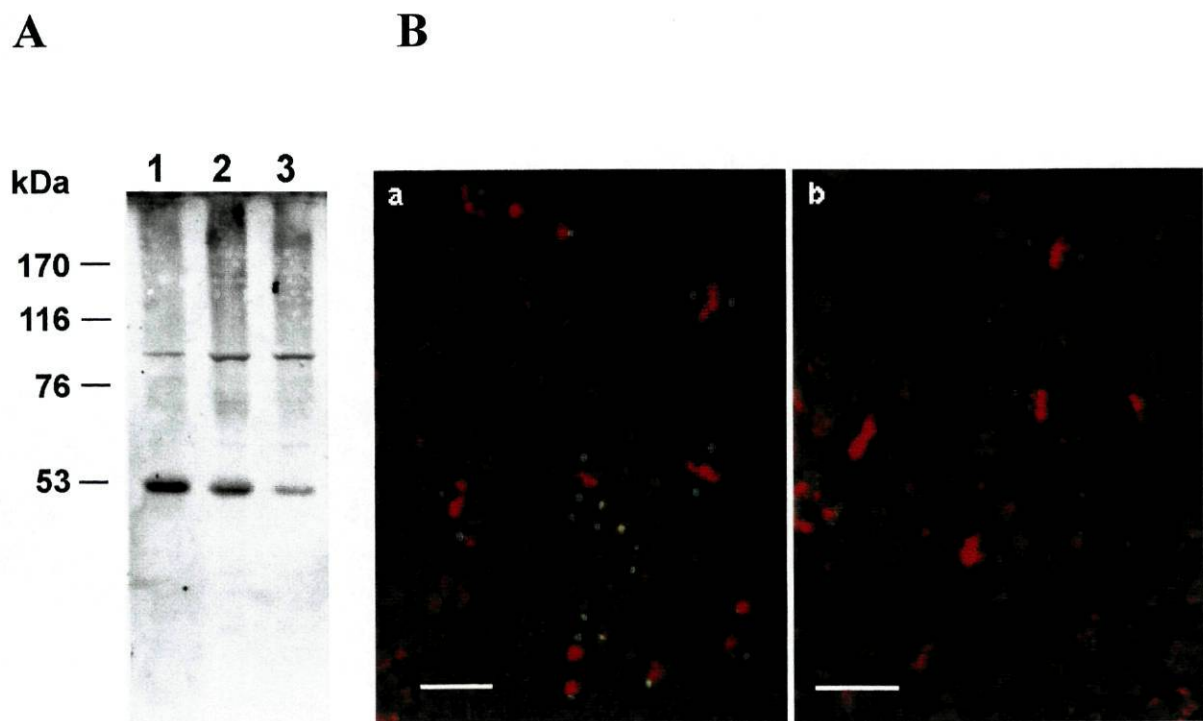


Figura 6.3 Expressão de γ -tubulina em $\gamma tub23C^{PI}$, um alelo mutante hipomórfico. (A) Quantidades aproximadamente idênticas de extractos totais de proteínas de cérebros e discos imaginiais de larvas do 3º estágio do tipo selvagem (linha 1), homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ (linha 2) e hemizigóticos $\gamma tub23C^{PI}/Df(2L)JS17$ (linha 3) foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti- γ -tubulina RbVerol. (B) Imunofluorescência indirecta em cérebros e discos imaginiais de indivíduos do a) tipo selvagem b) homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ marcados com o anticorpo anti- γ -tubulina RbPS1 IP. As preparações foram realizadas simultaneamente e captadas sob as mesmas condições.

6.4 - Estrutura do aparelho mitótico

A organização do aparelho mitótico no mutante $\gamma tub23C^{PI}$ foi caracterizada por imunofluorescência indirecta em cérebros e discos imaginais de larvas homocigóticas. Foi efectuada a marcação simultânea dos microtúbulos e de componentes centrossomais, como a própria γ -tubulina, a CP190 e a centrossomina. A conjugação dos resultados obtidos permitiu avaliar o tipo de organização estrutural do fuso e dos centrossomas neste mutante.

A imunomarcação de cérebros e discos imaginais com anticorpos anti α/β -tubulina permitiram observar a estrutura dos fusos acromáticos ao longo da mitose. No tipo selvagem, o fuso começa-se a formar no início da profase, com a emissão de microtúbulos astrais a partir dos MTOCs (Fig. 6.4a e 6.6a). A estruturação do fuso prossegue com a separação dos centrossomas até se localizarem em pontos diametralmente opostos e definirem os pólos do fuso bipolar entretanto formado, no meio do qual os cromossomas são alinhados na placa metafásica (Fig. 6.4b, 6.5a e 6.6b). Com o advento da anafase, o fuso alonga e as cromátidas irmãs são segregadas para os pólos (Fig. 6.4c e 6.6c). Na telofase, o fuso começa a desaparecer, formando-se na zona intermédia dois feixes de microtúbulos (Fig. 6.4d).

Durante a mitose do tipo selvagem, a γ -tubulina, centrossomina e CP190 estão presentes nos centrossomas. A imunofluorescência indirecta com anticorpo contra estas proteínas componentes centrossomais origina um foco de marcação localizado nos MTOCs (Fig. 6.4, 6.5 e 6.6). A área de marcação é maior durante a profase, nomeadamente no caso da γ -tubulina e Centrossomina (Fig. 6.4a e 6.6a), sendo depois mais condensada. A separação dos centríolos é frequentemente observada no fim da anafase como dois pontos de marcação próximos (Fig. 6.6c). A marcação individualizada dos centríolos surge por vezes ainda durante a metafase (Fig. 6.6b).

Nos neuroblastos e discos imaginais de indivíduos $\gamma tub23C^{PI}$ são observados fusos e centrossomas com marcação idêntica ao tipo selvagem, contudo também se regista a presença de fusos e centrossomas aberrantes.

Os fusos aberrantes mais frequentes nas células mutantes têm uma estrutura monopolar, em que os microtúbulos são emanados de uma ou de duas regiões muito próximas (Fig. 6.4f-i e 6.6e-g). Estes microtúbulos estendem-se para além dos cromossomas, que estão organizados num tipo de placa metafásica, localizada dentro da estrutura como num fuso normal. Certos fusos aparentam ser bipolares mas monoastrais, não existindo centrossoma, ou sinais de

componentes centrossomais, no pólo anastral (Fig. 6.5c e 6.6d). A organização dos microtúbulos também está alterada, pois são observados fusos em que os microtúbulos se apresentam bastante irregulares (Fig. 6.4e e 6.5d), culminando em figuras nas quais não há qualquer organização definida (Fig. 6.5e).

Os centrossomas associados aos fusos aberrantes em $\gamma tub23C^{PI}$ exibem também alterações no seu comportamento e organização. A γ -tubulina surge em quantidades muito limitadas, no limiar dos níveis detectáveis. Os sinais de marcação desta localizam-se nas regiões polares, mas são difusos e ténues, sendo frequentemente imperceptíveis (Fig. 6.4e-i). A CP190 surge em geral localizada nos pólos, mas contrariamente ao que se observa no tipo selvagem (Fig. 6.5a), a marcação é mais tenue e de menor área (Fig. 6.5b-e). Frequentemente são observados sinais com uma forma alongada ou constituídos por dois pontos muito próximos (Fig. 6.5b-c). Também se verificam marcações assimétricas em fusos bipolares e nestes casos a marcação num pólo é mais intensa que no outro (Fig. 6.5b). Finalmente, nas figuras em que há uma completa desorganização dos microtúbulos não se observa um sinal focalizado de CP190 (Fig. 6.5e).

Atendendo ao facto de a γ -tubulina surgir em complexos com a CP190 [Raff *et al.*, 1993], a caracterização dos centrossomas no mutante mediante a análise da distribuição da CP190, levantava a questão de saber até que ponto as variações na marcação da CP190 nas células mutantes correspondiam a modificações nos centrossomas ou, simplesmente, a alterações no recrutamento da CP190 motivada pela variação dos níveis de γ -tubulina presentes nos centrossomas. Assim, para obviar este problema, procedeu-se à imunomarcação dos centrossomas com um anticorpo contra a Centrossomina [Heuer *et al.*, 1995]. Esta proteína é um componente integral dos centrossomas, essencial para a função destes, e não é conhecida qualquer interacção sua com a γ -tubulina [Heuer *et al.*, 1995; Li & Kaufman, 1996].

A imunomarcação da Centrossomina nas células mutantes resulta em sinais de dois tipos básicos: sinais grandes de área circular idênticos aos observados no tipo selvagem (Fig. 6.6d-f e j) e sinais constituídos por vários pontos pequenos agrupados (Fig. 6.6g-i). No pólo dos fusos monopolares pode-se observar um sinal grande (Fig. 6.6d) ou dois sinais com um grau variável de separação e colocalizados com centros de nucleação de microtúbulos (Fig. 6.6e-f). Este último caso mostra que a separação dos centrossomas foi afectada e que estes fusos monopolares são na realidade bipolares. Os sinais pontuais agrupados estão igualmente localizados nas regiões polares, aparentando em geral, serem constituídos por dois ou quatro

pontos pequenos (Fig. 6.6g-i), embora seja difícil avaliar com certeza este número. O ciclo de duplicação dos centrossomas não parece estar dissociado do ciclo cromossómico, pois são observadas figuras poliplóides que apresentam dois sinais grandes em cada pólo. Cada um destes sinais aparenta corresponder a um centrossoma (Fig. 6.6j). Porém, existem outras figuras poliplóides em que se observa uma marcação centrossomal aglutinada numa área, não sendo possível distinguir o número de centrossomas presentes (Fig. 6.6l). No caso das anafases, foram observadas figuras irregulares em que se regista uma separação dos centríolos assimétrica, com um pólo a manter os centríolos juntos e o outro a exhibir já uma considerável separação. Este último é precisamente o pólo onde a organização das cromátidas está mais afectada (Fig. 6.6m).

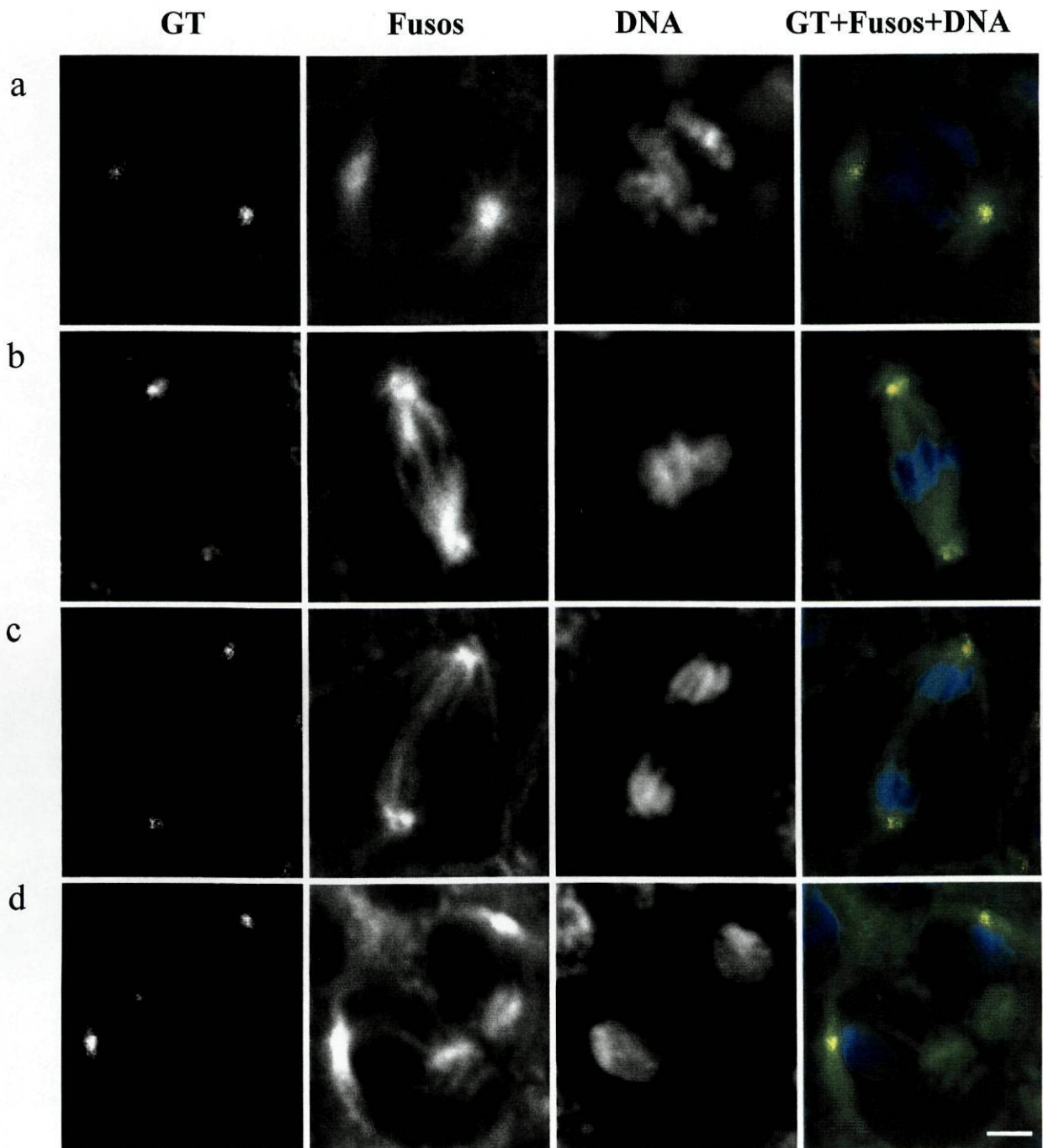


Figura 6.4 - Continua na pagina seguinte

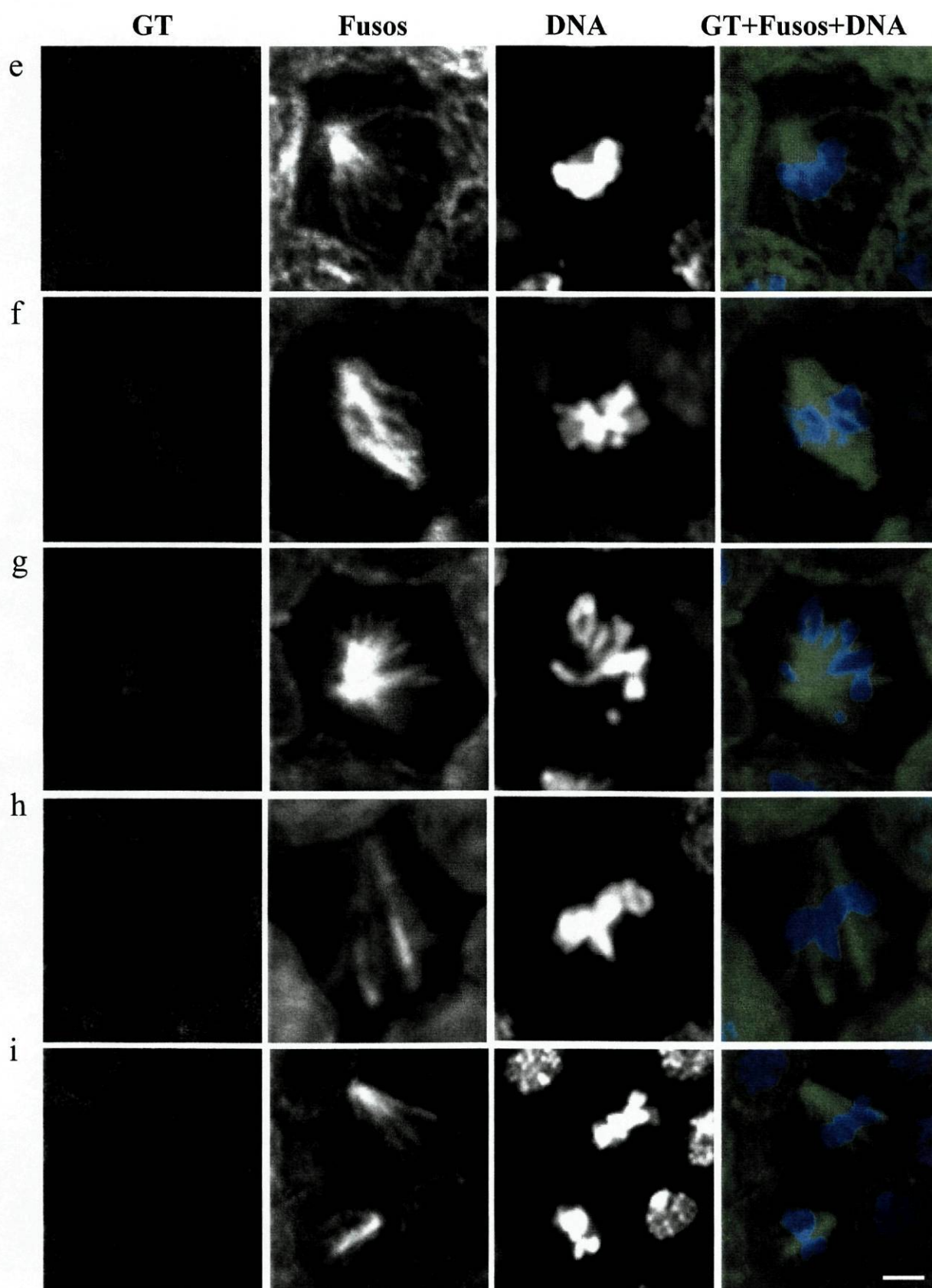


Figura 6.4 Organização dos fusos mitóticos e distribuição da γ -tubulina. Marcação tripla de cérebros e discos imaginários de larvas do 3º estágio do tipo selvagem (a-d) e homocigóticas $\gamma tub23C^{PI}$ (e-i), simultaneamente com os anticorpos RbPS1 IP (γ TUB) e anti- α -tubulina (Fusos), e coloração do DNA com iodeto de propídio (DNA). A sobreposição tricolor das marcações de γ TUB (vermelho), dos fusos (verde) e do DNA (azul) é apresentada na última coluna.

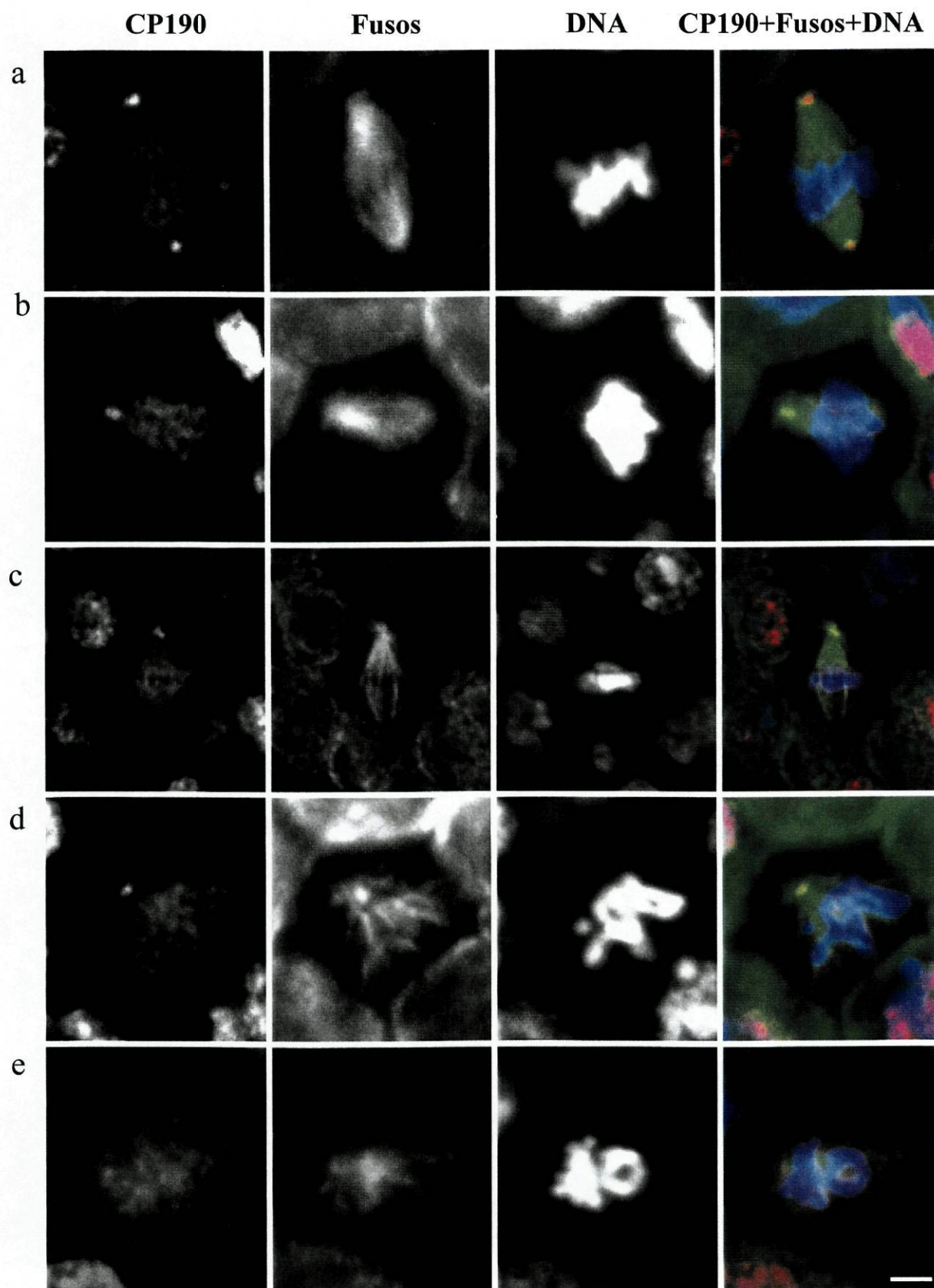


Figura 6.5 Organização dos fusos mitóticos e distribuição da CP190. Marcação tripla de cérebros e discos imaginais de larvas do 3º estágio do tipo selvagem (a) e homocigóticas $\gamma tub23C^{PI}$ (b-e), simultaneamente com os anticorpos Rb188 (CP190) e anti- α -tubulina (Fusos), e coloração do DNA com iodeto de propídio (DNA). A sobreposição tricolor das marcações de CP190 (vermelho), dos fusos (verde) e do DNA (azul) é apresentada na última coluna

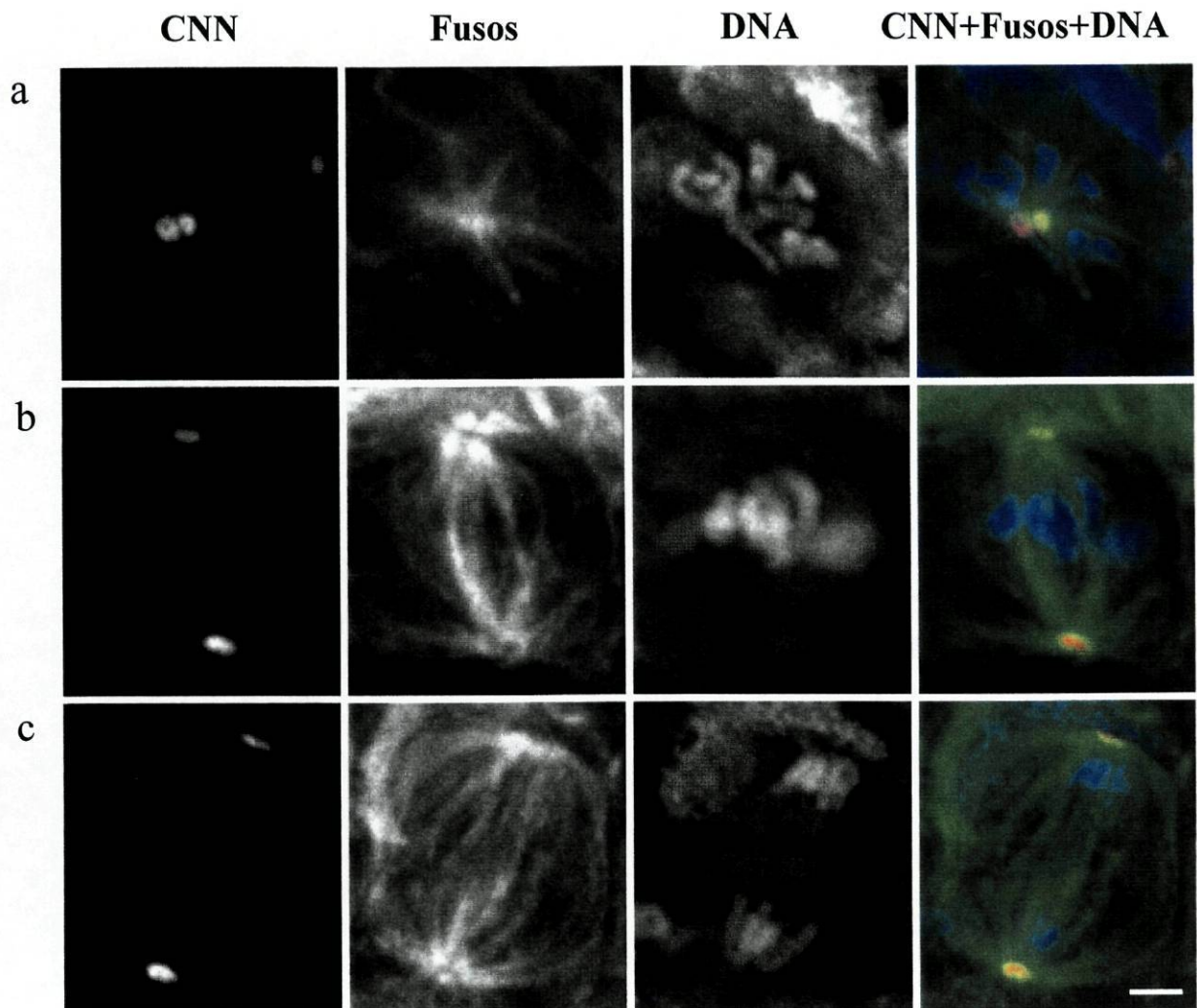


Figura 6.6 Continua nas paginas seguintes

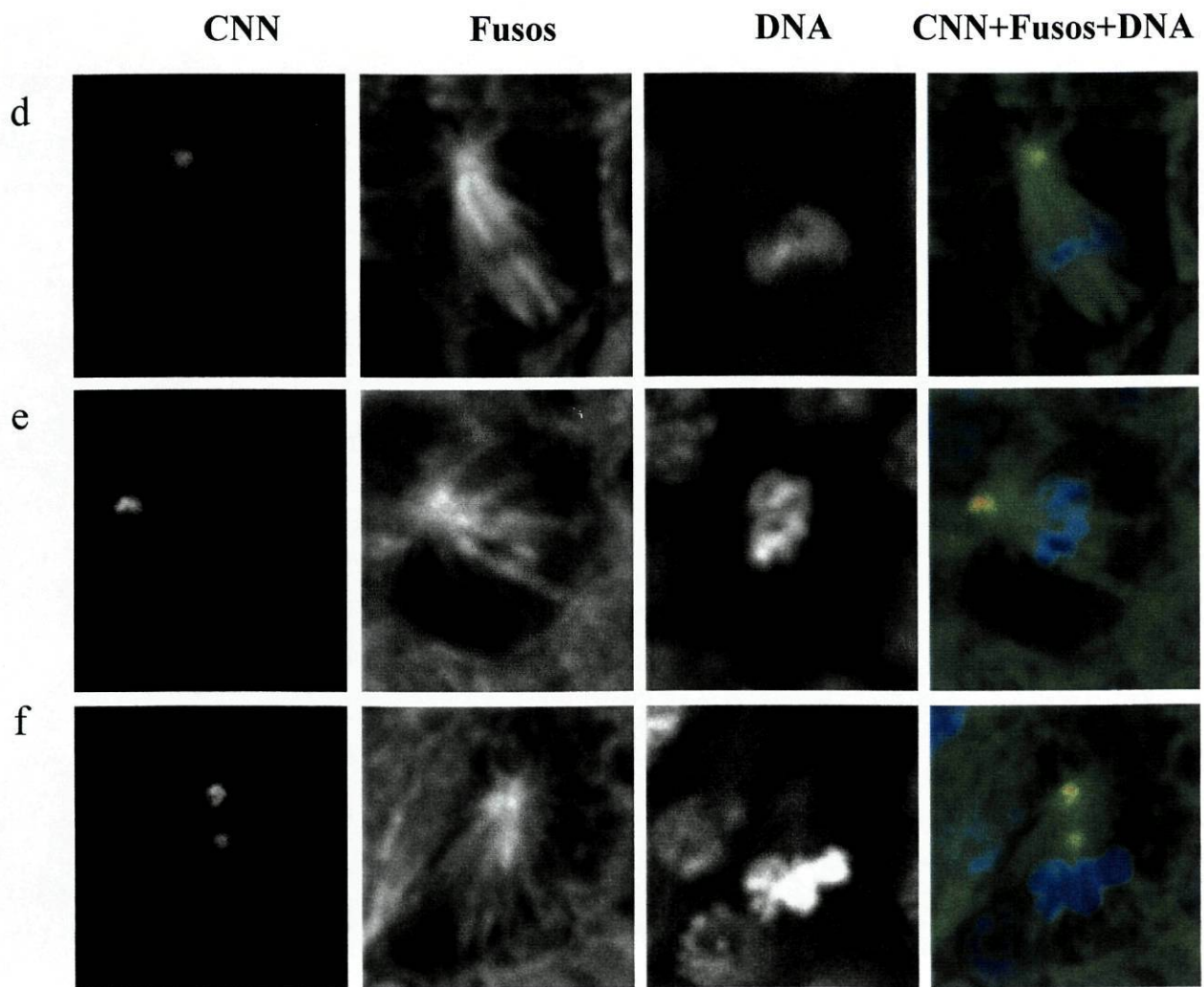


Figura 6.6 Continua na pagina seguinte

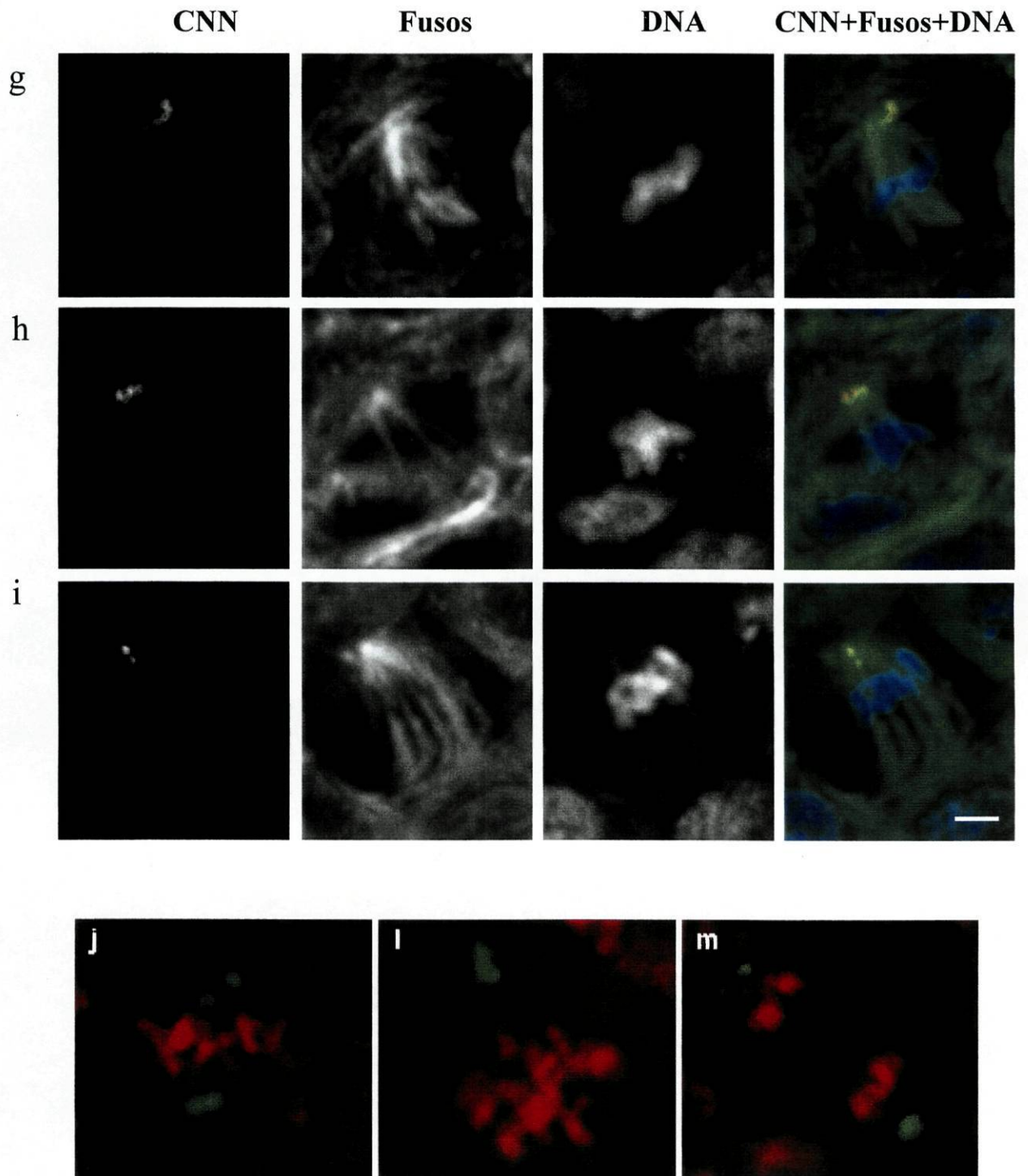


Figura 6.6 Organização dos fusos mitóticos e distribuição da centrossomina. Marcação tripla de cérebros e discos imaginiais de larvas do 3º estágio do tipo selvagem (a-c) e homozigóticas $\gamma tub23C^{PI}$ (d-m), simultaneamente com os anticorpos anti-centrossomina (CNN) e anti- α -tubulina (Fusos), e coloração do DNA com iodeto de propídio (DNA). A sobreposição tricolor das marcações de CNN (vermelho), dos fusos (verde) e do DNA (azul) é apresentada na última coluna. Nas figuras j, l, m só é apresentada a sobreposição da marcação da centrossomina (verde) sobre o DNA (vermelho). Barra de escala - 2 μ m

6.5 - Discussão

As hipóteses anteriormente levantadas quanto ao alelo $\gamma tub23C^{PI}$ ser hipomórfico e o fenótipo mutante ser consequência de alterações no aparelho mitótico vieram a ser confirmadas pela análise da linha *141bs*.

Os resultados obtidos mostraram a existência de γ -tubulina nos cérebros e discos imaginais dos indivíduos homozigóticos *141bs*, mas em quantidades menores que no tipo selvagem. Podem colocar-se várias hipóteses quanto à origem da γ -tubulina presente nestes tecidos do mutante. Por um lado, os níveis de γ -tubulina podem resultar de uma expressão reduzida de $\gamma tub23C$, apesar da inserção do elemento P e por outro, também há a possibilidade de corresponderem à isoforma 37C ou a outras isoformas ainda desconhecidas. A primeira hipótese surge como a mais provável, pois nos tecidos hemizigóticos, em que só existe uma cópia de $\gamma tub23C^{PI}$, regista-se um agravamento na redução dos níveis de γ -tubulina presentes. A corroborar esta hipótese está igualmente o posicionamento do elemento P na região "leader" e não dentro da região codificante. Contudo, a sua presença não origina uma alteração na proteína, mas tão somente afecta os níveis da sua expressão. Também, a maior severidade do fenótipo dos indivíduos hemizigóticos em relação ao exibido pelos homozigóticos é revelador de hipomorfismo. Assim, o alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ pode ser classificado com um alelo hipomórfico. Todavia, os dados obtidos não permitem excluir totalmente que parte dos níveis de γ -tubulina correspondam a outras isoformas, embora no caso da γ -tubulina 37C se saiba que não está presente em quantidades detectáveis em cérebros de larvas do tipo selvagem [Tavosanis *et al.*, 1997].

O hipomorfismo do alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ sustenta a viabilidade parcial dos indivíduos mutantes. A quantidade de γ -tubulina presente é suficiente para que ocorra uma divisão celular normal, possibilitando a formação de indivíduos adultos. No entanto, a mutação faz-se sentir na elevada mortalidade das pupas tardias, bem como nas alterações da cutícula do abdómen dos adultos e nas alterações na fertilidade de machos e fêmeas. As alterações na cutícula fazem-se sentir sobretudo na região posterior do abdómen, facto que poderá ser a face visível de diferenças nos níveis de γ -tubulina 23C nos discos imaginais. Aliás, verificou-se a existência de discos imaginais (ou zonas destes ou de cérebros) que apresentavam uma percentagem maior de figuras mitóticas anormais reactivamente a outros. A eventual diferença

nos níveis de γ -tubulina poderá resultar de uma menor eficiência da transcrição de $\gamma tub23C^{PI}$ nessas células ou de um esgotamento das reservas existentes. O esclarecimento futuro deste ponto exigirá a identificação dos discos imaginais em que mais frequentemente ocorrem as alterações assim como a avaliação dos níveis de expressão da γ -tubulina nesses tecidos.

A análise citológica dos neuroblastos $\gamma tub23C^{PI}$ mostrou que as alterações na expressão de $\gamma TUB23C$ produziam um fenótipo mitótico indiciador de perturbações no aparelho mitótico, como já discutido no capítulo 4. Também aqui o efeito hipomórfico é visível, com a frequência de figuras mitóticas anormais a ser mais elevada nos hemizigóticos, o que reforça uma acção da γ -tubulina 23C no funcionamento do aparelho mitótico.

A estrutura do aparelho mitótico nos neuroblastos e discos imaginais $\gamma tub23C^{PI}$ foi examinada por imunofluorescência. Os resultados revelaram a existência de aberrações na organização do fuso mitótico, bem como nos centrossomas.

Devido ao hipomorfismo do alelo $\gamma tub23C^{PI}$ foi detectado um grande número das figuras mitóticas que exibiam uma organização normal do aparelho mitótico e que correspondia uma marcação centrossomal da γ -tubulina próxima do tipo selvagem, embora com uma intensidade da marcação frequentemente menor. No entanto, foram observadas células que apresentavam severas alterações na estrutura dos fusos mitóticos e em que a marcação da γ -tubulina era difusa e muito fraca, quase ou mesmo inexistente. Estes fusos são na sua maioria monopolares e exibem uma organização dos microtúbulos aberrante. Os fusos aberrantes aparentam não ser totalmente funcionais, pois surgem anafases anormais e não é observado com frequência o arranjo em círculo dos cromossomas nos fuso monopolares. As anafases anormais deverão corresponder a uma funcionalidade parcial dos fusos. Esta disfuncionalidade é mais evidente em algumas figuras assimétricas, em que um hemifuso deverá ser funcional e o outro não totalmente, estando a este último associado a um centrossoma irregular. A disposição em círculo dos cromossomas tem sido correlacionada com a funcionalidade dos fusos monopolares [Gonzalez *et al.*, 1988; Cassimeris *et al.*, 1994]. Pensa-se que corresponde ao puxar dos cromossomas em direcção ao pólo pelos microtúbulos ligados ao cinetocoro e ao simultâneo efeito das forças de ejeção polares sobre dos braços dos cromossomas, que os afasta dos pólos. São observadas figuras do tipo circular com elevada frequência em *Drosophila*, nos alelos mutantes *mgr* [Gonzalez *et al.*, 1988], *polo* [Sunkel & Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991] e *aur* [Glover *et al.*, 1995]. Todos estes mutantes formam fusos

monopolares considerados funcionais, contrariamente ao alelo mutante *asp* [Ripoll *et al.*, 1985; Gonzalez *et al.*, 1990]. Este mutante não apresenta figuras circulares, mas forma fusos monopolares similares aos observados em $\gamma tub23C^{PI}$.

As alterações observadas nos fusos de $\gamma tub23C^{PI}$ estão em concordância com as já descritas para a linha original *141* [Gomes, 1994], embora não sejam tão severas. Isto mostra que as hipóteses iniciais quanto ao efeito da mutação em $\gamma tub23C$ sobre a formação do fuso estavam certos. A já discutida presença de outra mutação no cromossoma da linha original *141* não tem influência sobre o tipo de alteração da organização do fuso mitótico, mas sim sobre a severidade dessa alteração. Este efeito poderá ser devido ao somatório das duas mutações, dado que a outra mutação também afecta a mitose ou à severa redução dos níveis de γ -tubulina presentes na linha original *141* [Sunkel *et al.*, 1995].

A estrutura anormal dos fusos mitóticos no alelo $\gamma tub23C^{PI}$ aponta para uma função da γ -tubulina na organização dos microtúbulos do fuso, que no entanto não parece ser totalmente indispensável para a nucleação dos mesmos. A existência de γ -tubulina no alelo, embora em quantidades reduzidas nos fusos aberrantes, não permite tirar uma conclusão definitiva quanto a uma absoluta necessidade da mesma na nucleação dos microtúbulos. Todavia, em alelos mutantes para genes da γ -tubulina em *A. nidulans*, *S. pombe* e *S. cerevisiae* com disrupção total do gene, há nucleação de microtúbulos [Oakley *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1997; Horio *et al.*, 1991; Sobel & Snyder, 1995]. Estes organismos mutantes exibem microtúbulos citoplasmáticos, cuja organização é anormal. O efeito das mutações é mais severo a nível do fuso mitótico, em que se observa a sua ausência em *A. nidulans* [Oakley *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1997], ou à presença de fusos altamente aberrantes em *S. pombe* e *S. cerevisiae* [Horio *et al.*, 1991; Sobel & Snyder, 1995]. Também o alelo mutante de $\gamma tub37C$ de *Drosophila*, que é nulo ou hipomorfo severo, exhibe fusos meióticos com uma organização aberrante [Tavosanis, 1997]. Estes dados em conjunto com os obtidos no presente estudo indicam que a γ -tubulina deverá ser requerida para a organização de microtúbulos funcionais, nomeadamente os envolvidos no aparelho mitótico.

Uma característica marcante da linha original *141* é a aberrante organização dos centrossomas nos neuroblastos e discos imaginais de larvas homozigóticas *141* [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995]. A imunomarcção dos centrossomas com anticorpo anti-CP190 revelou uma distribuição anormal deste antígeno nas células em mitose. Esta distribuição anómala

observa-se essencialmente como uma marcação grande e de forma irregular ou como um conjunto de pequenas marcações em série. Para avaliar indirectamente a estrutura dos centrossomas em $\gamma tub23C^{PI}$ procedeu-se à imunomarkação com o mesmo anticorpo anti-CP190 e com um anticorpo anti-centrossomina. A centrossomina é um componente integral dos centrossomas e sem aparente ligação com a γ -tubulina [Heuer *et al.*, 1995; Li & Kaufman, 1996], contrariamente ao que se verifica com a CP190, que participa conjuntamente com a γ -tubulina em complexos [Raff *et al.*, 1993]. Os resultados obtidos não derivaram muito dos da linha 141 original, contudo observaram-se algumas diferenças, sobretudo na distribuição da CP190.

A marcação com o anticorpo anti-CP190 dos centrossomas $\gamma tub23C^{PI}$ associados a fusos aberrantes é, em geral, menos intensa que o normal e com uma área mais restrita. Estas marcações estão localizadas nos centros de organização de microtúbulos. Nas figuras em que os microtúbulos não têm qualquer tipo de organização, a marcação não se apresenta focalizada. Com este anticorpo não foi possível detectar sinais exactamente do tipo de séries de pontos observado na linha 141 original, todavia esses sinais estão em geral associados a células poliplóides e poderão corresponder a centrossomas constituídos por vários centriolos. É de notar que em $\gamma tub23C^{PI}$ foram observadas marcações contínuas por dois pequenos pontos próximos que poderão estar a definir os centriolos. No entanto, não se pode excluir a influência de questões técnicas para justificar esta disparidade, pois a imunomarkação da centrossomina revelou a presença de sinais em série. De facto, a centrossomina exhibe uma curiosa distribuição nos pólos dos fusos aberrantes $\gamma tub23C^{PI}$.

A marcação com o anticorpo anti-CNN permitiu constatar que alguns dos pólos desses fusos eram formados por dois centrossomas juntos ou próximos, em que cada um dos centrossomas define um centro de organização de microtúbulos. Estes dados indicam que a separação dos centrossomas é afectada neste alelo mutante, o que poderá estar correlacionado com as alterações na organização dos microtúbulos. Eventualmente os microtúbulos nucleados na ausência de quantidade suficiente de γ -tubulina não constituem um substracto eficaz para o desenvolvimento da actividade das proteínas motoras na separação dos centrossomas [revisões do mecanismo de separação dos pólos do fuso em: Ault & Rieder, 1994; Waters & Salmon, 1997]. Em *Drosophila* uma dessas proteínas motoras parece ser a cinesina KLP61F [Heck *et al.*, 1993], cuja mutação impede a separação dos centrossomas e a formação de fusos

monopolares, embora esta proteína também tenha sido implicada na manutenção da estrutura dos centrossomas [Wilson, *et al.*, 1997].

Em alguns pólos dos fusos $\gamma tub23C^{PI}$, a centrossomina apresenta-se distribuída sob a forma de pequenos pontos alinhados. Estes sinais dão a ideia de corresponderem à marcação dos centríolos, não só pelo reduzido tamanho do sinal, bem como pelo número de sinais. Este número, nuns casos é de dois e noutros aparenta ser de quatro, poderá corresponder aos centríolos presentes em um ou dois centrossomas, respectivamente. Esta distribuição da centrossomina está próxima da observada para a CP190 na linha 141 original, e tal como foi proposto anteriormente poderá reflectir uma desorganização na estrutura dos centrossomas na ausência de γ -tubulina. Uma hipótese para esta desorganização é uma separação precoce dos centríolos em virtude da ausência de γ -tubulina na ponte que liga os pares de centríolos. Esta hipótese baseia-se nos estudos de que detectaram a presença de γ -tubulina nos centríolos e na ponte que os liga após a replicação, processo na qual a γ -tubulina também estará eventualmente implicada [Fuller *et al.*, 1995].

Em resumo, a análise da mitose no alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ deu a indicação de que a γ -tubulina é necessária para a funcionalidade do aparelho mitótico, eventualmente mediante a organização dos microtúbulos e na manutenção da estrutura dos centrossomas. Estudos futuros a nível ultraestrutural serão efectuados para melhor avaliação do efeito da mutação.

Capítulo 7

O papel da γ -tubulina na espermatogénese em *Drosophila*

A espermatogénese é um processo complexo que se inicia com a divisão mitótica das células goniais. Cada uma destas células origina um cisto com 16 espermatócitos primários que irão passar por uma divisão reducional e um processo de diferenciação cujo resultado final é a formação de 64 espermatozóides haplóides [revisão em Fuller, 1993]. Perturbações no processo de espermatogénese frequentemente conduzem à esterilidade dos machos ou pelo menos à formação de espermatozóides mutantes. Os machos de indivíduos homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ são estéreis, o que indicou que a γ -tubulina 23C também deveria ter uma função durante a espermatogénese. Assim, inicialmente procedeu-se à análise da distribuição da γ -tubulina ao longo do processo espermatogénico no tipo selvagem, e posteriormente caracterizou-se a espermatogénese em indivíduos homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$.

7.1 - Distribuição da γ -tubulina durante a espermatogénese

A caracterização distribuição da γ -tubulina durante a espermatogénese foi efectuada por imunofluorescência indirecta com anticorpos anti- γ -tubulina em preparações de testículos do tipo selvagem, sendo os vários estádios da espermatogénese identificados segundo a organização dos cromossomas.

Durante as divisões mitóticas das células goniais, a γ -tubulina está localizada nos centrossomas de cada célula (Fig. 7.1a). Esta associação da γ -tubulina com os centrossomas persiste nos espermatócitos primários sendo possível observar dois focos de marcação (Fig. 7.1b). Estes focos vão-se separando e adquirem uma forma alongada, que é mais evidente nos

espermatócitos primários maduros, em que a marcação assume a forma de V (Fig. 7.1c). Esta marcação em V está co-localizada com os MTOCs (Fig. 7.2) e traduz o arranjo característico dos centríolos nestas células [Tates, 1971; Fuller, 1993]. Durante ambas as divisões meióticas, a γ -tubulina continua localizada em focos coincidentes com posicionamento dos centrossomas (Fig. 7.1e). Durante a metafase I (Fig. 7.1d), os dois centrossomas localizam-se diametralmente opostos de cada lado do cariosoma. Durante a telofase I, o centrossoma associado com cada núcleo divide-se e dois focos de γ -tubulina podem ser observados perto de cada núcleo (Fig. 7.1f). Durante a meiose II, a marcação é idêntica à observada na meiose I, embora com uma área menor (Fig. 7.1g). Após a meiose II estar completa, inicia-se o processo de diferenciação dos espermátídios. Durante as várias fase deste processo é observada uma marcação de γ -tubulina na região do corpo basal, localizado na base posterior das cabeças em alongação (Fig. 7.1h). Nos espermatozóides maduros ainda se detecta a presença de γ -tubulina na base da cabeça (Fig. 7.1i), embora esta marcação seja fraca e levante dúvidas quanto à sua autenticidade, pois não é uma marcação sistemática e os anticorpos pré-incubados com T7: γ TUB23C Δ 19:His6 (o que anula a reacção com a γ -tubulina em "western") ainda reagem com esta região.

7.2 - A espermatogénese no alelo γ tub23C^{PI}

A caracterização da espermatogénese em indivíduos γ tub23C^{PI} homozigóticos e hemizigóticos envolveu a análise dos níveis de γ -tubulina presentes em testículos desses indivíduos, da qualidade das divisões mitótica gonial e meiótica (com especial ênfase para a estrutura do aparelho meiótico) e do processo de diferenciação dos espermátídios. A formação dos axonemas foi também caracterizada a nível ultraestrutural. Nos indivíduos hemizigóticos não se observaram diferenças substanciais em relação ao fenótipo exibido pelos indivíduos homozigóticos, pelo que as figuras seguintes se referem exclusivamente a estes últimos.

7.2.1 - Expressão da γ -tubulina nos testículos do alelo mutante

O nível de expressão de γ -tubulina nas gónadas masculinas dos indivíduos $\gamma tub23C^{PI}$ foi analisado por "western blot" com anticorpo anti- γ -tubulina. O anticorpo reconhece uma banda de aproximadamente 53 kDa nos extractos de proteínas de testículos de diferentes estados de desenvolvimento do tipo selvagem (Fig. 7.3 linha 1 e 3). Esta banda corresponde ao peso molecular esperado para a γ -tubulina 23C. Nos extractos do mutante não se observa uma banda de 53 kDa claramente definida (Fig. 7.3 linhas 2 e 4).

Para confirmar estes resultados ao nível citológico procedeu-se à imunofluorescência indirecta com anticorpo anti- γ -tubulina. Em contraste com a marcação dos MTOCs registada nos testículos do tipo selvagem, em testículos de indivíduos homocigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ só ocasionalmente é detectada uma fraca marcação dos centrossomas das células goniais (ver Fig. 7.4), enquanto que, os espermátocitos e espermátídios não apresentam qualquer marcação definida.

O conjunto dos resultados mostra que a γ -tubulina está presente nos testículos mutantes em quantidades muito limitadas, sendo a razão entre os níveis detectados no mutante e no tipo selvagem substancialmente inferior ao verificado nos cérebros. Isto indica que apesar de o alelo $\gamma tub23C^{PI}$ ser hipomórfico, a expressão de γ -tubulina 23C nos testículos é mais severamente afectada pela inserção do elemento P em $\gamma tub23C$.

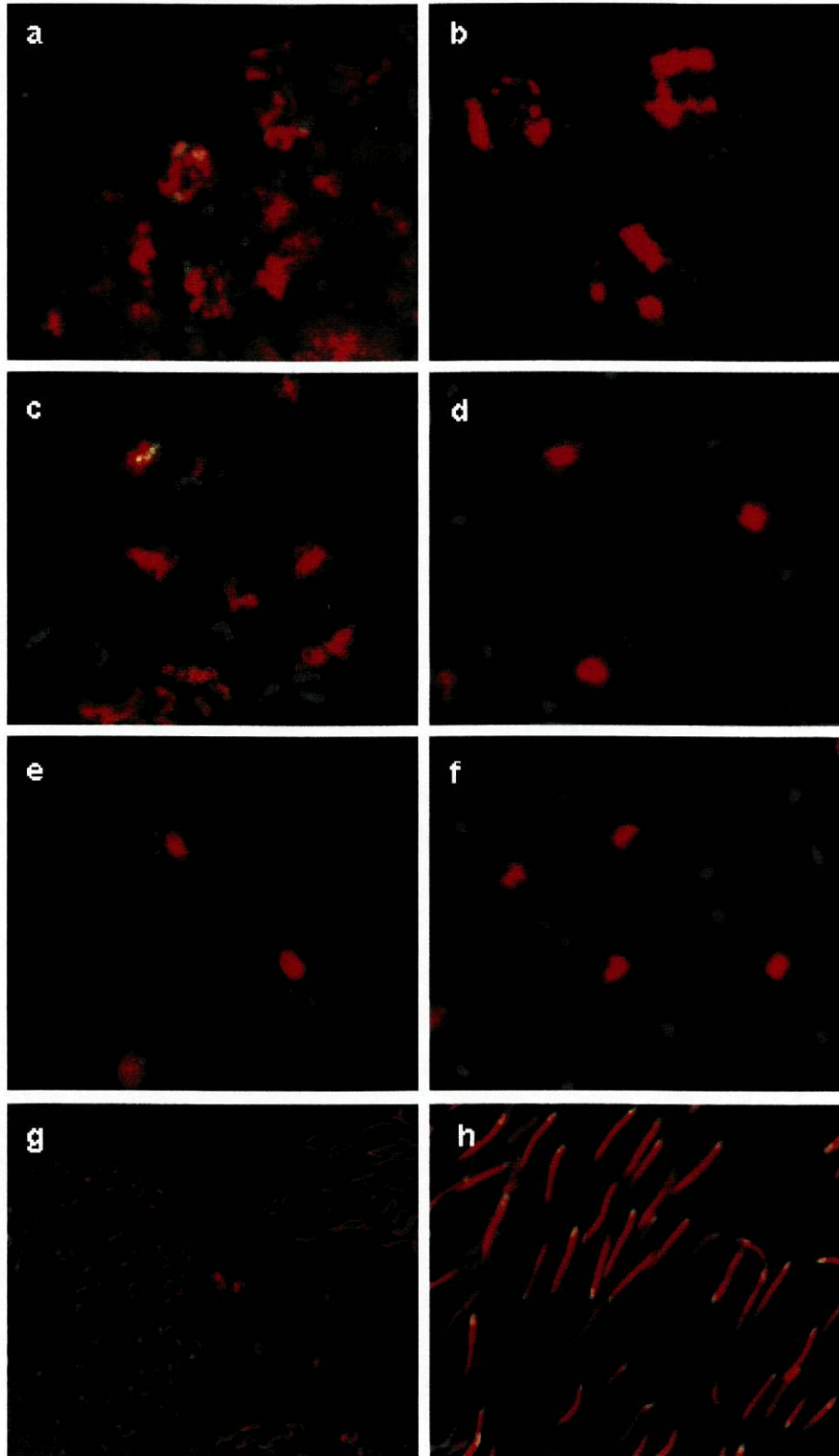


Figura 7.1 Distribuição da γ -tubulina ao longo da espermatogênese. Imunomarcção em testículos do tipo selvagem com anticorpo anti γ -tubulina (verde) e coloração do DNA com iodeto de propídio (vermelho). As células em diferentes estádios da espermatogênese foram classificadas de acordo com a organização da cromatina. Espermatogônias (a), espermatócitos primários juvenis (b) e maduros (c), metafase I (d), telofase I (e), meiose II (f), espermatídios em alongação (g), espermatozoides maduros preparados de vesículas seminais (h)

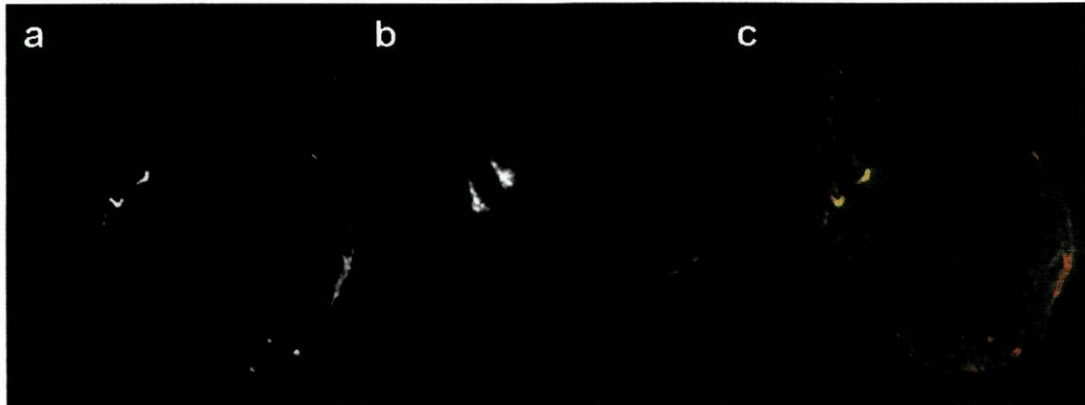


Figura 7.2 Co-localização da marcação em forma de V da γ -tubulina com os MTOCs. Os espermatócitos primários maduros foram simultaneamente marcados com os anticorpos anti- γ -tubulina (a) e anti- α -tubulina (b). A sobreposição das imagens das duas marcações mostra claramente a co-localização da marcação em forma de V com os centros astrais (c).

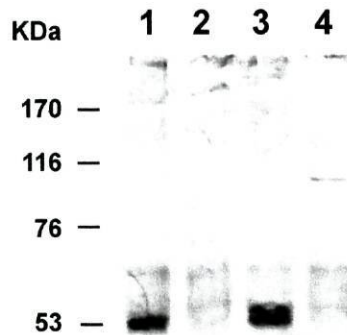


Figura 7.3 Expressão de γ -tubulina nos testículos de indivíduos do tipo selvagem (linhas 1 e 3) e homocigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ (linhas 2 e 4). Quantidades aproximadamente idênticas de extractos totais de proteínas de testículos de larvas do terceiro estágio (linhas 1 e 2) e adultos jovens (linhas 3 e 4) foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti- γ -tubulina RbVero1.

7.2.2 - Caracterização da mitose gonial

Não se observaram alterações da actividade mitótica nas espermatogónias de testículos de indivíduos homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$. A primeira evidência que as células espermatogoniais se dividem e originam espermatócitos primários normais foi obtida pela análise de testículos, por contraste de fase. Os cistos pré-meióticos no mutante eram similares aos do tipo selvagem, sendo constituídos por 16 células com núcleos de tamanho regular. Esta observação foi confirmada por análise da divisão celular nas células goniais (Fig. 7.4). Apesar da ausência de marcação de γ -tubulina na maioria das células goniais, os mutantes homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$ apresentam figuras mitóticas bem organizadas e similares à observadas no tipo selvagem.

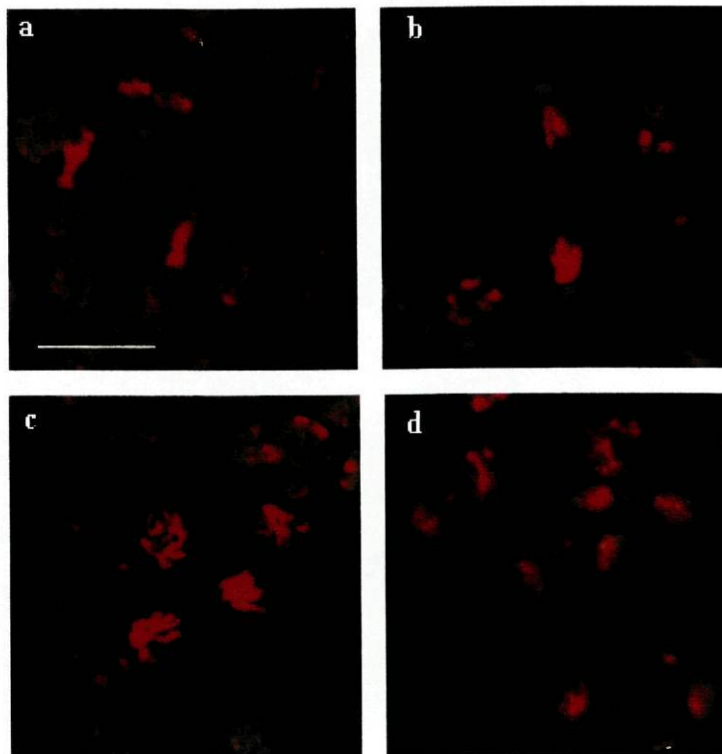


Figura 7.4 Análise da mitose nas células espermatogoniais $\gamma tub23C^{PI}$. Imunofluorescência indirecta em testículos do tipo selvagem e $\gamma tub23C^{PI}$ marcados com anticorpo anti- γ -tubulina (verde). O DNA foi corado com iodeto de propídio (vermelho). a) Figuras mitóticas goniais do tipo selvagem exibindo sinal de γ -tubulina nos pólos do fusos. b) Células goniais $\gamma tub23C^{PI}$ em prometafase e c) anafase sem ou com ligeiros sinais (setas) da presença de γ -tubulina nos centrosomas

7.2.3 - Caracterização do aparelho meiótico

A primeira manifestação de perturbações na espermatogénese, induzidas pela redução da expressão da γ TUB23C, surge na organização dos microtúbulos no início da meiose. As células em profase I do tipo selvagem apresentam ásteres bem organizados que irradiam dos pólos astrais (Fig. 7.5a). Em contraste, equivalentes espermatócitos primários de $\gamma tub23C^{PI}$ exibem microtúbulos irregulares, emanados de pólos astrais mal definidos (Fig. 7.5b). Os centrossomas, visualizados por marcação com o anticorpo anti-centrossomina (CNN) (Li and Kaufman, 1996), colocalizam-se com o par de centros astrais dos espermatócitos do tipo selvagem (Fig. 7.5a', a"). O padrão de marcação de CNN surge como um foco brilhante com margens irregulares de aspecto pontilhado. As células $\gamma tub23C^{PI}$ também apresentam dois centrossomas bem separados e colocalizados com os presumíveis centros astrais (Fig. 7.5b', b"). A distribuição da CNN é similar ao verificado no tipo selvagem, porém a área marcada é menor. Também nos mutantes, a detecção de CNN surge numa fase mais avançada do desenvolvimento dos espermatócitos pré-meióticos que no tipo selvagem.

Durante a metafase I do tipo selvagem, os cromossomas localizam-se em grupo no meio de um fuso bipolar (Fig. 7.6a). Nas células mutantes em que os cromossomas assumem uma conformação do tipo metafásico ou pré-metafásico, não se observou a organização regular de um fuso bipolar. Nestas células, um emaranhado de microtúbulos com uma organização aberrante e sem centros de organização bem definidos, envolve os cromossomas (Fig. 7.6b). Na meiose I, o padrão de marcação centrossomal da CNN nos mutantes e no tipo selvagem é similar, todavia, ocorrem diferenças no posicionamento dos centrossomas. Durante a meiose I do tipo selvagem, os centrossomas separam-se, para na metafase se localizarem em pólos opostos (Fig. 7.6a', a"). Nos espermatócitos $\gamma tub23C^{PI}$ os centrossomas separam-se, mas raramente são observados em posição oposta (Fig. 7.6b'), contudo, os centrossomas surgem nas áreas de onde os microtúbulos são nucleados (Fig. 7.6b").

Com o decorrer da meiose I, cada célula do tipo selvagem passa pela anafase e telofase para originar dois espermatócitos secundários, cada com metade dos cromossomas iniciais. Durante este processo, os cromossomas deslocam-se para ambos os pólos e na zona central da

célula forma-se um denso feixe de microtúbulos que é progressivamente apertado a meio (Fig. 7.7a'). Nas células mutantes, os cromossomas não são segregados e o conjunto dos microtúbulos adquire um arranjo cónico, em que os microtúbulos convergem para um ponto oposto à localização dos cromossomas (Fig. 7.7b'). Esta organização dos microtúbulos corresponde a estruturas monoastrais, similares a de hemifusos telofásicos dos tipo selvagem. Nestas estruturas cónicas, os dois centrossomas estão posicionados muito perto um do outro

(Fig. 7.7b'), na região do pólo onde se localizam os cromossomas. Contrariamente, na telofase do tipo selvagem pode-se observar um ou dois centrossomas em cada pólo (Fig. 7.7a').

No tipo selvagem, após a meiose I sobrevivem a meiose II, e com esta a formação de fusos semelhantes aos observados na meiose I, embora de menor dimensão (Fig. 7.8). Contrariamente, no mutante não foi possível identificar células em meiose II, embora não possa ser excluída que esta ocorra, pelo menos ao nível da condensação e descondensação dos cromossomas, pois cromossomas com uma morfologia característica da meiose II pode ser observada em preparações com orceína (Fig. 7.9). É de notar que as células mutantes têm o dobro do complemento de cromossomas, esperado para os espermatócito secundários, isto implica que não se verifica a segregação dos cromossomas na meiose I.

Durante a transição da meiose I para a meiose II no tipo selvagem, o padrão de marcação da CNN muda de um largo e brilhante foco com margens pontilhadas, para dois pequenos focos de reduzida intensidade. Após a profase II, a distribuição centrossomal da CNN é semelhante à observada durante a meiose I, mas com um sinal de inferior diâmetro (Fig. 7.8a'). Nos espermatídios juvenis, a CNN está restrita a um ponto na área do corpo centriolar (Fig. 7.10a) e a uma marcação citoplasmática difusa. Durante a espermiogênese a marcação da CNN desaparece completamente. A distribuição da CNN em $\gamma tub23C^{PI}$ é diferente do tipo selvagem. No fim da meiose I, a distribuição focalizada da CNN passa para uma marcação pontiada difusa (Fig. 7.7b'), que se mantêm nos espermatídios juvenis (Fig. 7.10b), e não é observada a marcação da região centriolar. Com o evoluir da espermatogênese, também no mutante a marcação desaparece completamente.

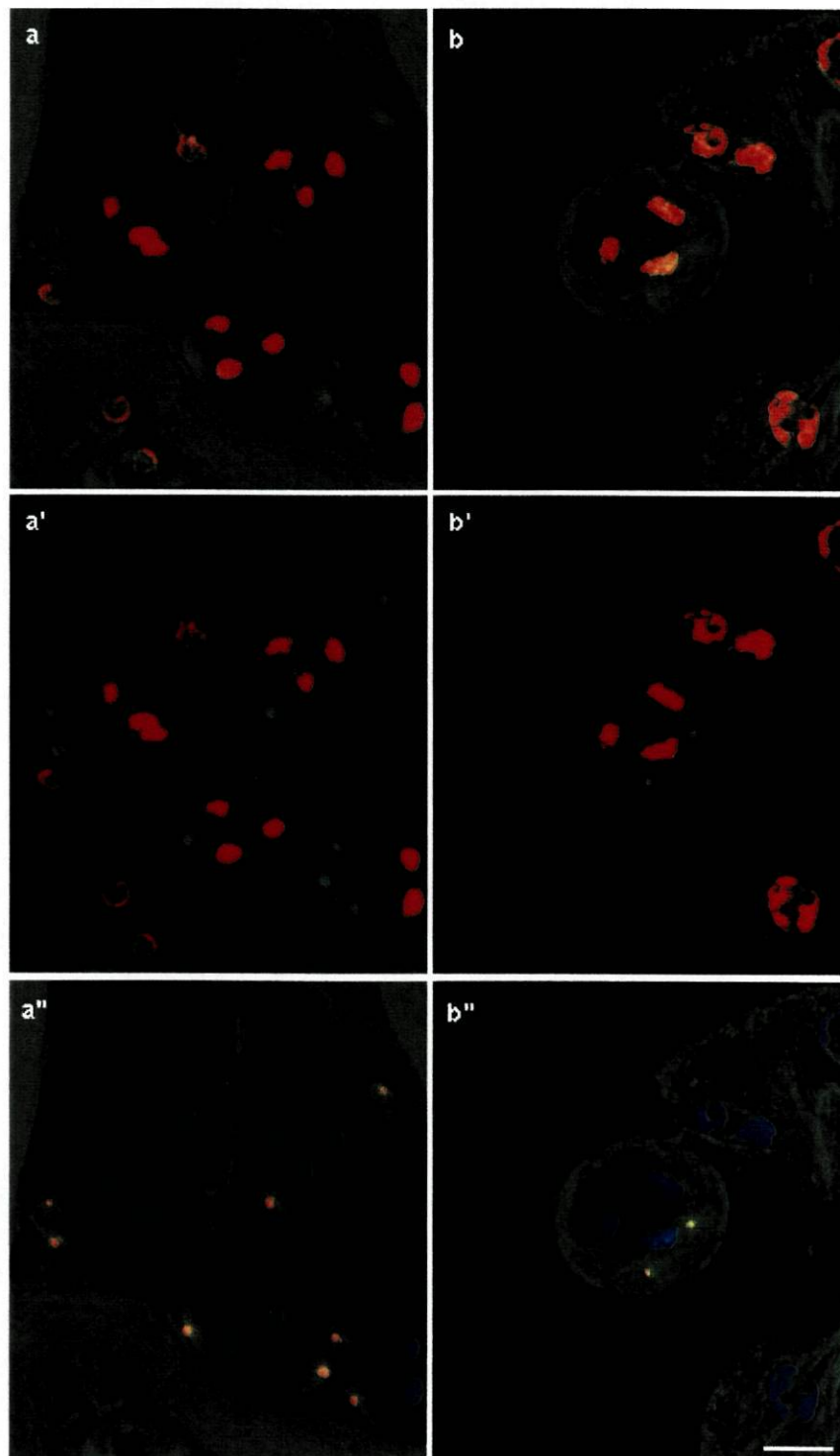


Figura 7.5 Células meióticas $\gamma tub23C^{PI}$ em profase I organizam ásteres anormais a partir de centrossomas separados. Preparações de testículos para imunofluorescência foram efectuadas de indivíduos do tipo selvagem (a-a'') e mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ (b-b''). Estas preparações foram marcadas simultaneamente com os anticorpos anti- α -tubulina (a, a'' e b, b'') e anti-CNN (a', a'' e b', b''). O DNA foi corado com iodeto de propídio. a-a'') Células do tipo selvagem com ásteres definidos a serem emanados da área do foco de marcação da centrossomina. b-b'') Profase I em $\gamma tub23C^{PI}$ exibindo ligeiros ásteres, com um foco de marcação da centrossomina no meio de cada centro astral difuso. a'', b'') Sobreposição tricolor das marcações de CNN (vermelho) e α -tubulina (verde) com o DNA (azul).

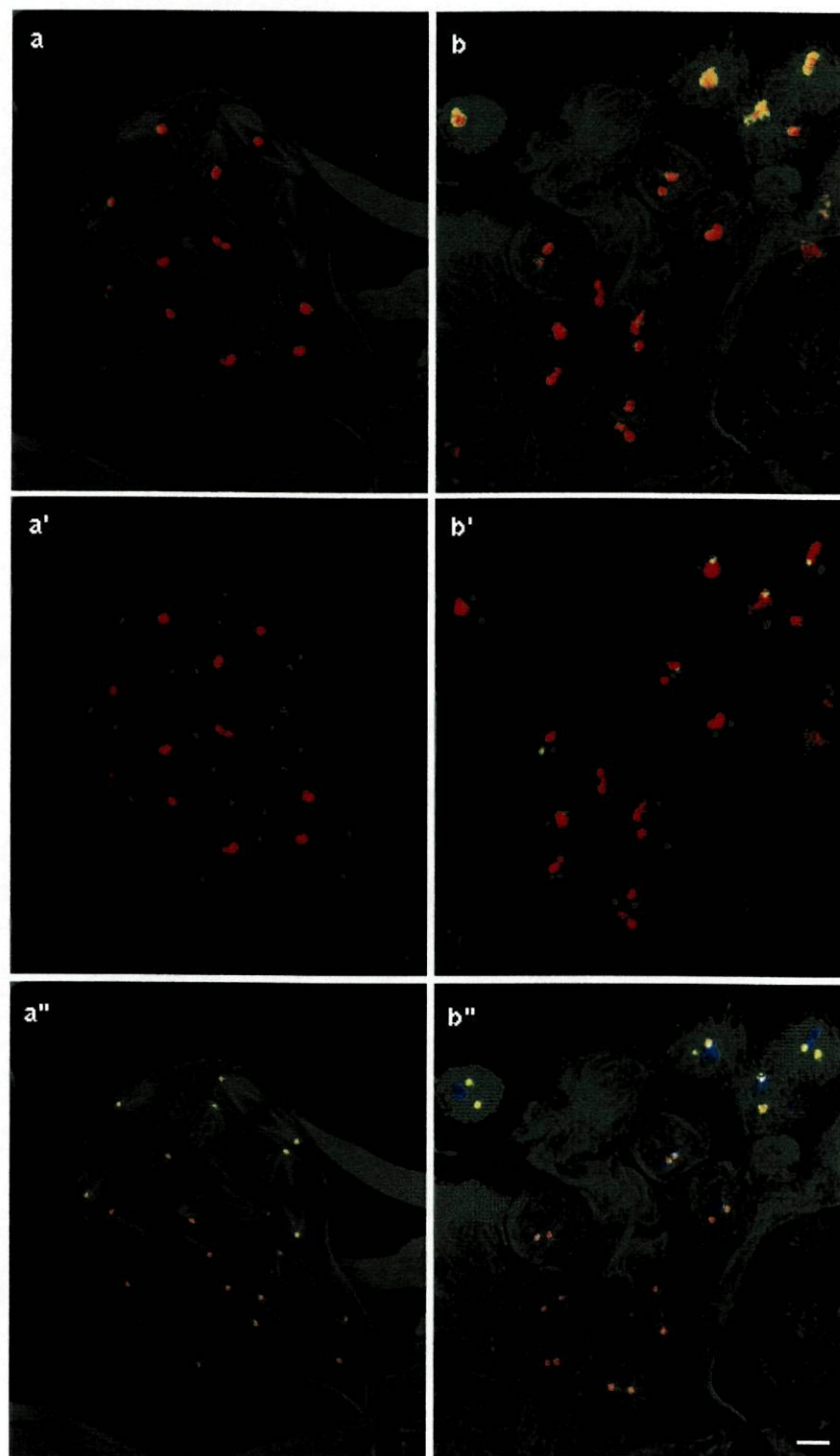


Figura 7.6 Células $\gamma tub23C^{PI}$ que aparentam estar em meiose I apresentam fusos meióticos aberrantes e comportamento anormal dos centrôssomas. Preparações de testículos para imunofluorescência foram efectuadas de indivíduos do tipo selvagem (a-a'') e mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ (b-b''). Estas preparações foram marcadas simultaneamente com os anticorpos anti- α -tubulina (a, a'' e b, b'') e anti-CNN (a', a'' e b', b''). O DNA foi corado com iodeto de propídio. a-a'') Células do tipo selvagem em metafase I formam fusos bipolares, que exibem um foco de marcação da centrôssomina em cada pólo. b-b'') Nos espermatócitos $\gamma tub23C^{PI}$, os cromossomas com uma organização tipo-metafase I são rodeados por um emaranhado de microtúbulos com organização aberrante. Nesta células, os focos de CNN estão mais próximos do que em profase I e colocalizam com putativos centros de organização de microtúbulos. a'', b'') Sobreposição tricolor das marcações de CNN (vermelho) e α -tubulina (verde) com o DNA (azul).

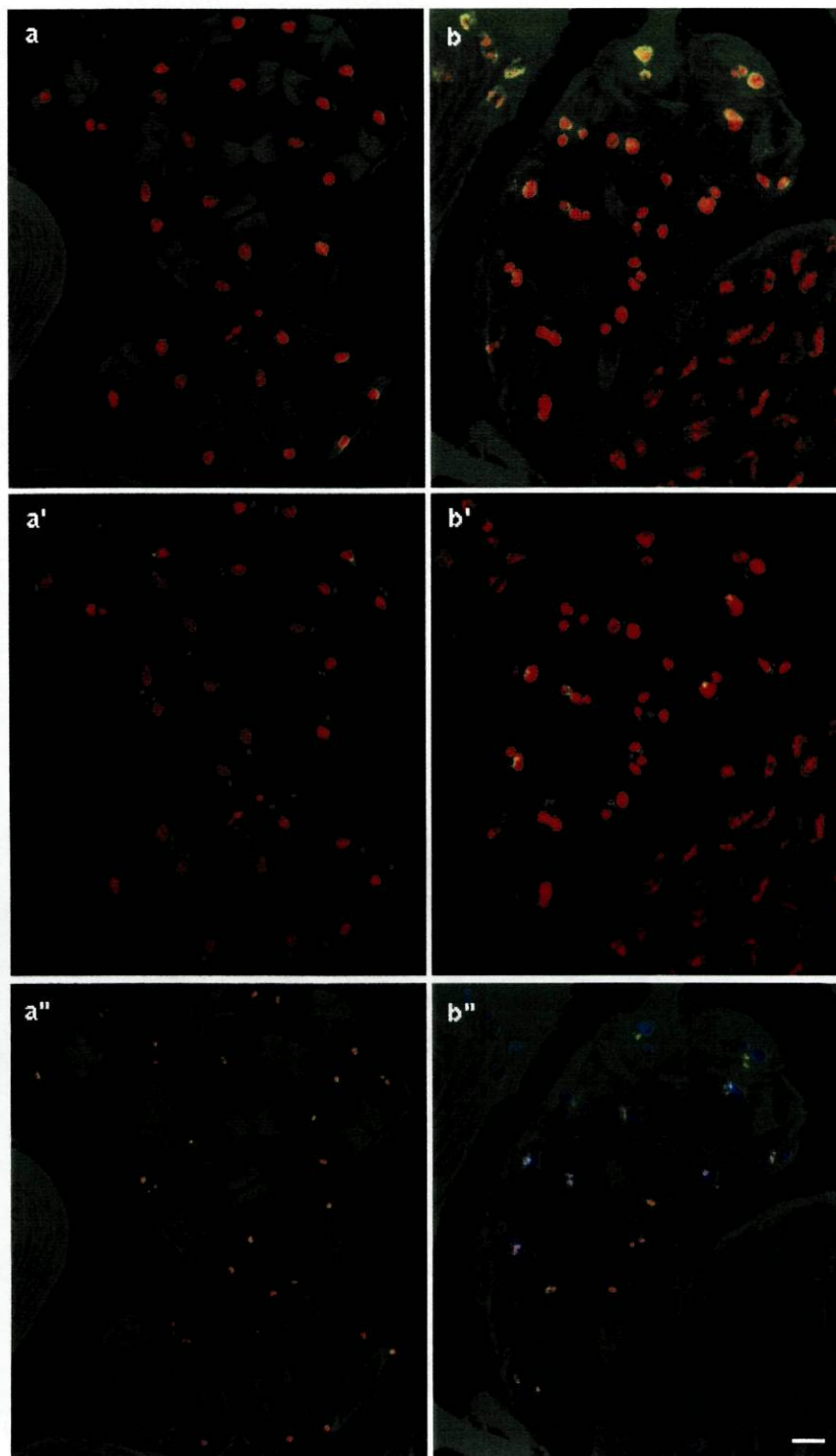


Figura 7.7 Células meióticas $\gamma tub23C^{PI}$ presumivelmente em anáfase-telófase I formam fusos cónicos e exibem desorganização do material centrossomal. Preparações de testículos para imunofluorescência foram efectuadas de indivíduos do tipo selvagem (a-a'') e mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ (b-b''). Estas preparações foram marcadas simultaneamente com os anticorpos anti- α -tubulina (a, a' e b, b'') e anti-CNN (a', a'' e b', b''). O DNA foi corado com iodeto de propídio. a-a'') Um cisto de espermatócitos do tipo selvagem em anáfase-telófase I. É de notar o estreitamento da região central do fuso e divisão dos centrossomas (seta em a') na telófase. b-b'') Os espermatócitos $\gamma tub23C^{PI}$ organizam fusos cónicos, que lembram metade de fusos telofásicos do tipo selvagem. Estas estruturas parecem ser organizadas a partir de dois MTOCs muito próximos um do outro, cada definido por um foco de marcação da CNN. Nestas células mutantes não se observa a divisão dos centrossomas, em vez disso, a marcação da centrossomina torna-se dispersa. a'', b'') Sobreposição tricolor das marcações de CNN (vermelho) e α -tubulina (verde) com o DNA (azul). Barra de escala - 10 μ m

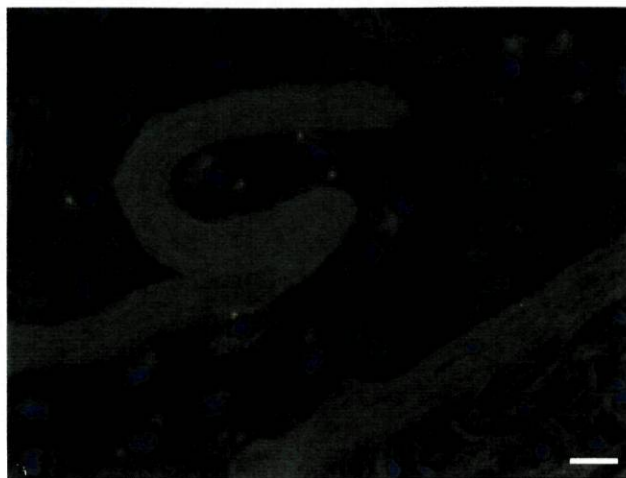


Figura 7.8 Meiose II no tipo selvagem. Parte de um cisto do tipo selvagem em meiose II imunomarcado simultaneamente com os anticorpos anti- α -tubulina (a, a") e anti-CNN (a', a"). O DNA foi corado com iodeto de propídio. a") Sobreposição tricolor das marcações de CNN (vermelho) e α -tubulina (verde) com o DNA (azul). Barra de escala - 10 μ m

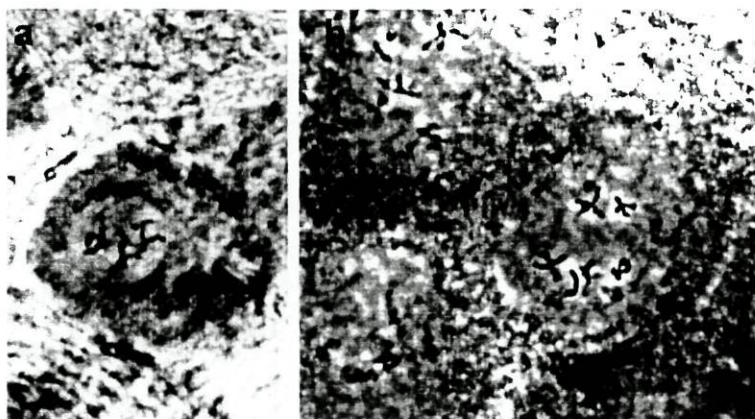


Figura 7.9 Cromossomas em meiose II nos espermatócitos mutantes. Análise citológica dos cromossomas meióticos em preparações de testículos do tipo selvagem (a) e de indivíduos homozigóticos *tub23C^{PI}* (b) coradas com acetorceína.

7.2.4 - Espermiogênese

Os cistos de espermatídios do tipo selvagem são compostos por 64 células haplóides. Cada espermatídio juvenil na fase de "onion stage" é composto por um núcleo associado a um "nebenkern" (derivado da fusão de mitocôndrias), ambos de tamanho regular (Fig. 7.11a). No mutante, a falha de ambas as divisões meióticas origina cistos de espermatídios só com 16 células, em que cada espermatídio exibe um ou vários núcleos com diâmetros variáveis (Fig. 7.11b). Estes núcleos estão nas proximidades de um grande nebenkern de aspecto irregular, por vezes mesmo fragmentado. As características dos cistos mutantes é consistente com uma segregação aberrante dos cromossomas e a ausência de citocinese durante a meiose.

A mutação em $\gamma tub23C$ também se reflecte, directa ou indirectamente, na diferenciação dos espermatídios. Na espermiogênese no tipo selvagem, os espermatídios de um cisto diferenciam-se de modo sincrónico e são mantidos agrupados em feixes. Durante o processo de diferenciação, ocorre uma transformação dos pequenos núcleos esféricos da fase de "onion stage" em núcleos com forma de agulha e simultaneamente, as caudas alongam até o conjunto cabeça-cauda atingir 1.8 mm de comprimento (Fig. 7.12a). Nos testículos de $\gamma tub23C^{PI}$, os núcleos têm inicialmente um aspecto esférico, mas numa fase mais avançada de diferenciação apresentam uma larga variedade de formas e tamanhos. Também, as caudas não alongam completamente e os espermatídios surgem dispersos com um aspecto aberrante em cistos elipsoidais, em vez de agrupados em feixe (Fig. 7.12b).

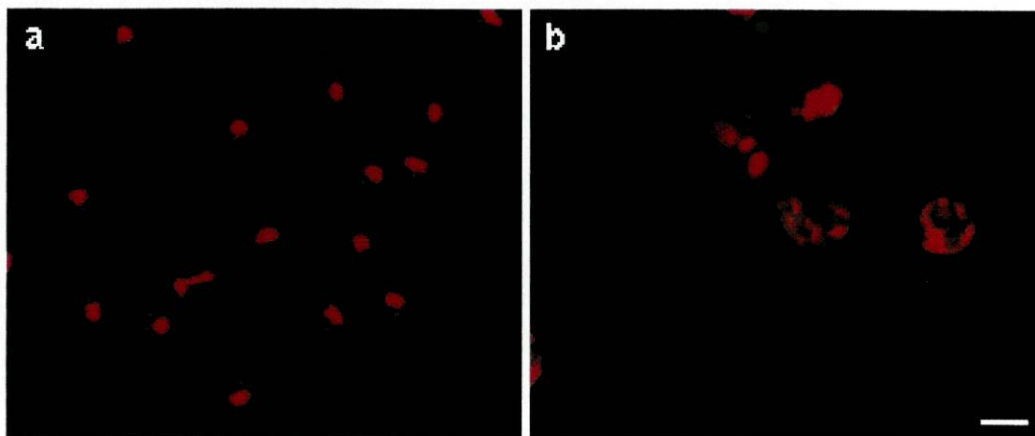


Figura 7.10 No espermatídios juvenis de $\gamma tub23C^{PI}$, a centrossomina surge dispersa em vez de concentrada nos presumíveis corpos basais. Preparações de testículos para imunofluorescência foram efectuadas de indivíduos do tipo selvagem (a) e mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ (b). Estas perparações foram marcadas com anticorpos anti-CNN (verde). O DNA foi corado com iodeto de propídio (vermelho). a) Espermatídios juvenis do tipo selvagem exibindo marcação da centrossomina no citoplasma e na região do corpo basal. b) O espermatídios mutantes são maiores que os do tipo selvagem e apresentam uma marcação espalhada da centrossomina. Barra de escala - 10 μm

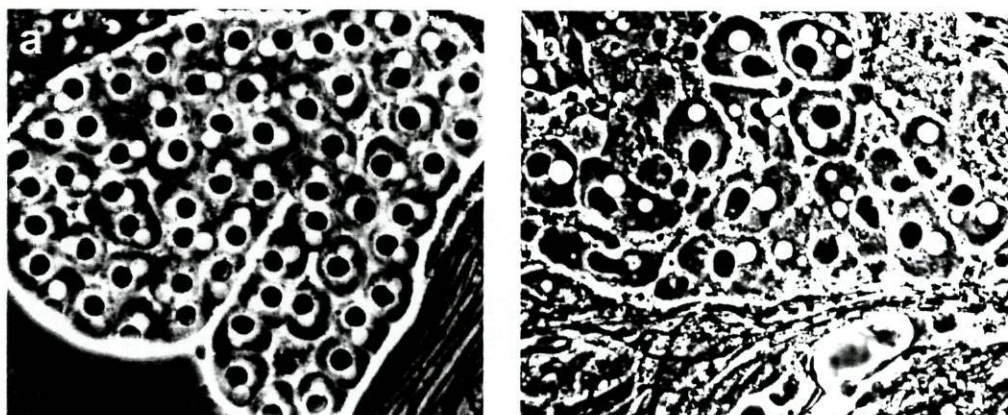


Figura 7.11 Os espermatócitos mutantes falham a citocinese e exibem uma segregação anormal dos cromossomas. Preparações de células vivas de testículos do tipo selvagem e $\gamma tub23C^{PI}$, observadas por microscopia de contraste de fase. Cisto completo do tipo selvagem exibindo os sessenta e quatro espermatídios regulares (a), em contraste com um cisto mutante igualmente completo, composto por desasseis espermatídios aberrantes.

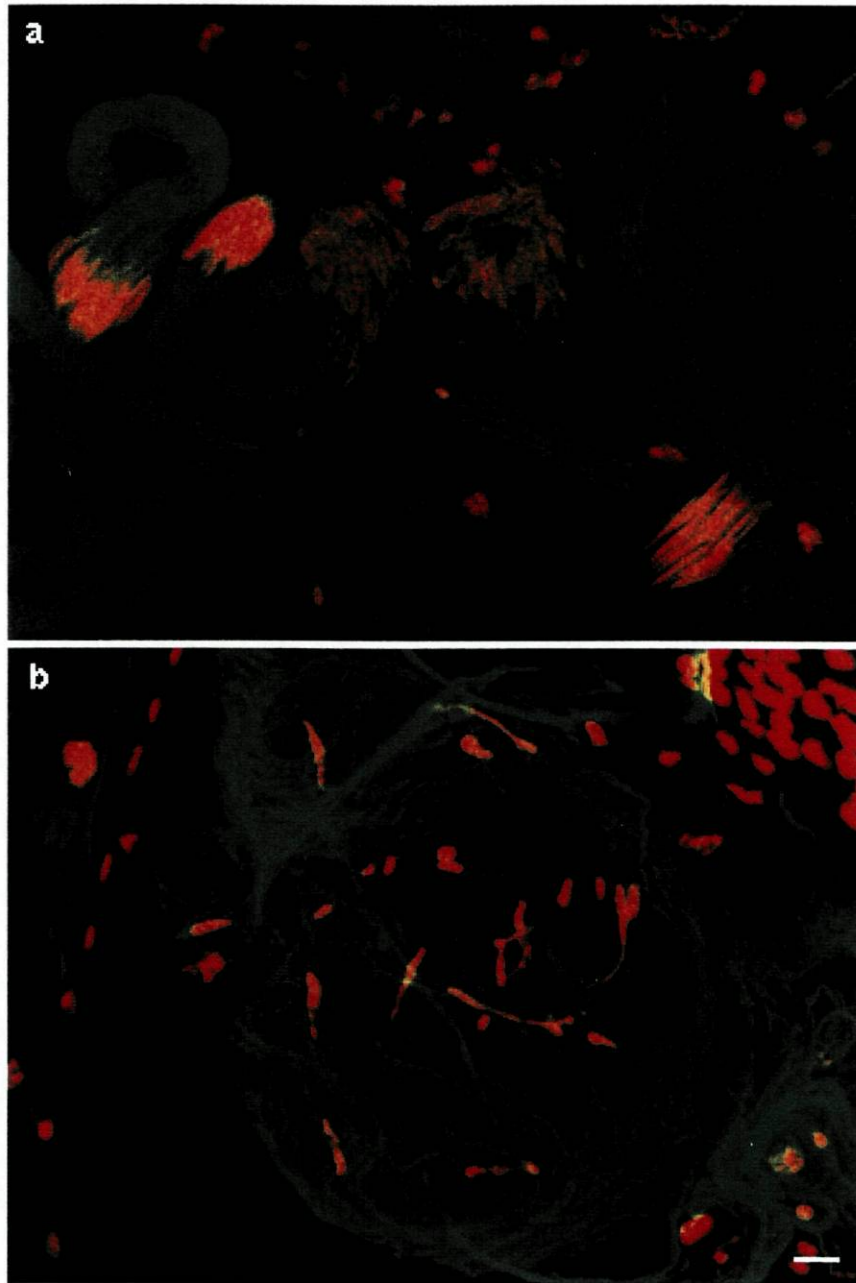


Figura 7.12 Os espermatídios mutantes sofrem uma diferenciação aberrante. Cistos de espermatídios do tipo selvagem (a) e $\gamma ub23C^{PI}$ (b) marcados com anti- α -tubulina e corados com iodeto de propídio para visualização das caudas (verde) e dos núcleos (vermelho), respectivamente. Barra de escala - 10 μ m

7.2.5 - Funcionalidade dos centríolos como corpos basais

Durante o crescimento dos espermátocitos primários, os dois centríolos presentes em cada célula replicam-se, dando origem a quatro centríolos. Estes centríolos, não voltam a ser replicados e cada um deles vai constituir um corpo basal. Num espermátido do tipo selvagem, o centríolo está presente numa estrutura denominada corpo centriolar e encontra-se ligado à membrana nuclear [Tates, 1971]. O axonema cresce com base no centríolo, sendo a alongação acompanhada pelos derivados mitocondriais (Fig. 7.13a). Em cada espermátido $\gamma tub23C^{PI}$ são observados até quatro corpos centriolares, os quais raramente estão associados ao núcleo (Fig. 7.13b). Não é de excluir que todas as células tenham quatro corpos centriolares, porém a sua observação é dificultada pelo seu reduzido tamanho. Estas células apresentam caudas alongadas a partir de cada corpo centriolar, acompanhadas de derivados mitocondriais com uma organização irregular.

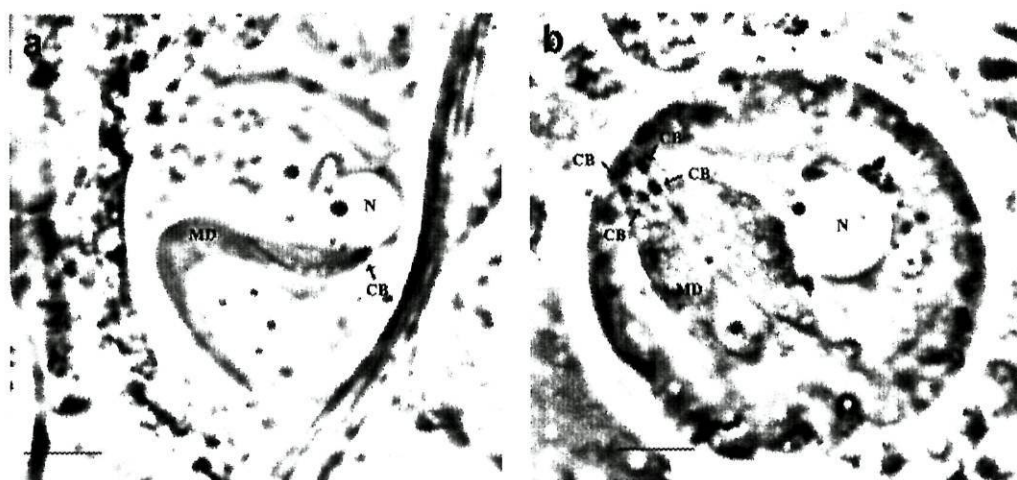


Figura 7.13 Nas células mutantes ocorre a replicação dos centríolos. Preparações de células vivas de testículos do tipo selvagem (a) e $\gamma tub23C^{PI}$ (b), observadas por microscopia de contraste de fase. a) No tipo selvagem cada espermátido contém um corpo centriolar (CB) que está sempre associado ao núcleo (N) e do qual cresce o axonema acompanhado por dois derivados mitocondriais (MD). b) Nas células mutantes os corpos centriolares não se associam ao núcleo, mas cada um está no início de um presumível axonema, acompanhado de derivados mitocondriais irregulares. A observação de diversas preparações mostrou que cada célula mutante continha até quatro corpos centriolares, encontrados na maioria na vezes todos nas proximidades uns dos outros.

Para avaliar se as caudas observadas, por contraste de fase, nos espermátídios mutantes contêm axonemas, e com que organização, procedeu-se à análise ultraestrutural deste tipo de células em preparações de testículos.

Os espermátídios do tipo selvagem apresentam um arranjo muito regular. Durante a alongação, as caudas dispõem-se num complexo formado axonema rodeado pela membrana axonemal e dois derivados mitocondriais em estrita associação com o axonema [Tates, 1971; Stanley *et al*, 1972]. A estrutura básica do axonema consiste de nove dupletos de microtúbulos exteriores organizados em torno de um par singleto central. De cada subfibra-B cresce um pequeno gancho que irá fechar, formando um microtúbulo acessório (Fig. 7.14a). Após a alongação, material paracrystalino acumula-se no derivado mitocondrial maior, o axonema é transformado numa estrutura complexa e a membrana axonemal é reorganizada. Durante o processo de individualização, os derivados mitocondriais são compactados e toda a estrutura é rodeada por membrana plasmática (Fig. 7.14c). Os espermátídios $\gamma tub23C^{PI}$ exibem alterações significativas na sua estrutura. Muitos axonemas são morfológicamente normais, mas estão dispersos e só ocasionalmente são vistos em associação com derivados mitocondriais (Fig. 7.14b). Em geral, os axonemas completam o processo de maturação e os derivados mitocondriais condensam em agregados irregulares (Fig. 7.14d). Contudo, também foram observados axonemas em processo degenerativo, tanto nas fases iniciais (Fig. 7.14e,f) como após a maturação (Fig. 7.14g). Os axonemas na figura 7.14e apresentam tripletos de microtúbulos intrecalados com dupletos externos que podem corresponder a uma secção da região de transição entre a organização do corpo basal e a do axonema.

Estes resultados mostram que na espermatogénese em $\gamma tub23C^{PI}$ os centríolos, apesar de não estarem associados a MTOCs meióticos funcionais, são replicados e convertidos em corpos basais funcionais.

Figura 7.14 Os espermátídios $\gamma tub23C^{PI}$ organizam axonemas. Análise por microscopia electrónica de secções ultrafinas de testículos do tipo selvagem (a, c, inclusões em e e g) e $\gamma tub23C^{PI}$ (b, d-g). Secções transversais de espermátídios do tipo selvagem (a) e mutantes (b) num estágio inicial de pós-elongação. Os axonemas no mutante não diferem do tipo selvagem, porém a organização das células mutantes está corrompida. c) Secção de parte de um feixe de espermátídios individualizados do tipo selvagem, com a sua regular organização dos axonemas maduros e derivados mitocondriais. d) Secção de um testículo mutante, mostrando axonemas idênticos aos do tipo selvagem mas com uma completa desorganização dos derivados mitocondriais. e) Espermátídios mutantes seccionados presumivelmente numa região de transição entre o corpo basal e o axonema, mostrando axonemas com tripletos intercalados com dupletos de microtúbulos exteriores. Um dos axonemas está parcialmente desorganizado e surgem dupletos externos espalhados. Na inserção pode-se observar a regular organização dos axonemas do tipo selvagem. f) Axonemas pós-elongação e maduros (g) normais e em processo de desorganização (setas) de espermátídios $\gamma tub23C^{PI}$. A inserção em g) mostra um axonema maduro no tipo selvagem.

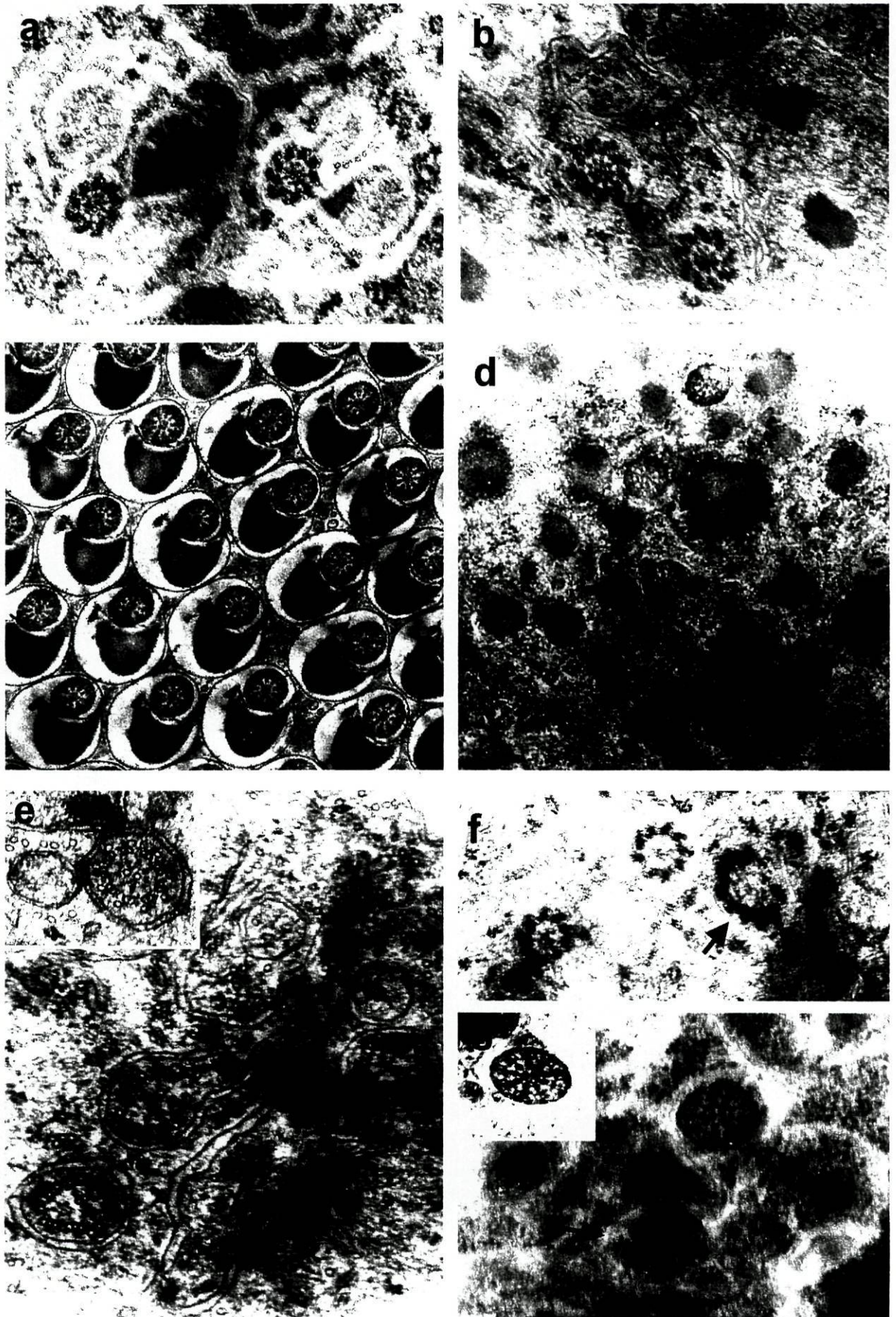


Figura 7.14 - Legenda na página anterior

7.3 - Discussão

A esterilidade dos machos $\gamma tub23C^{PI}$ conduziu ao estudo da participação da γ -tubulina 23C na espermatogênese, tendo sido constatado que a γ -tubulina está presente nos MTOCs ao longo de todo o processo e que a isoforma 23C é necessária para a organização do fuso meiótico, mas não para a replicação dos centríolos ou para a função dos corpos basais.

A γ -tubulina colocaliza com os MTOCs durante todo o processo espermatogénico. Estudos com anticorpos específicos contra as isoformas 23C e 37C mostraram que a isoforma presente nos testículos é a γ -tubulina 23C [Wilson *et al.*, 1997; Tavanois *et al.*, 1997]. A proteína está presente nos centrossomas das espermatogónias e espermatócitos, e nos corpos basais dos espermatídios.

Durante a fase de transição dos espermatócitos primários apolares para polares, a marcação da γ -tubulina é pontual e permite seguir a separação dos centrossomas. É de referir que nesta fase já ocorreu a replicação dos centríolos [Tates, 1971], os quais são alongados durante a maturação destas células. Nos espermatócitos maduros cada centríolo consiste em duas partes morfologicamente distintas, a parte proximal que está incluída no citoplasma enquanto que a parte distal se projecta na superfície da célula sob uma evaginação da membrana [Tates, 1971; Fuller, 1993]. Estas células contêm dois pares de centríolos, cada par com os centríolos dispostos em ângulo recto e localizados na superfície celular [Tates, 1971; Fuller, 1993]. O padrão de marcação da γ -tubulina traduz esta organização dos centríolos, sendo constituído por dois pares de traços organizados em forma em V e localizados na proximidade da superfície da célula. Este padrão poderá reflectir uma estrita associação da γ -tubulina aos centríolos. Nas células meióticas a marcação torna-se mais focalizada não sendo tão evidentes os centríolos. Isto poderá ser consequência da inclusão dos centríolos em cavidades nas membranas astrais [Tates, 1971] ou reflectir um aumento da quantidade de γ -tubulina presente no material pericentriolar requerido para a nucleação dos fusos meióticos. Um incremento na concentração de γ -tubulina nos centrossomas já foi anteriormente observada durante a formação dos fusos mitóticos [Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991]. No final da anafase I, os centrossomas começam-se a separar [Cenci *et al.*, 1994] e a marcação da γ -tubulina acompanha esse processo, sendo observados em cada pólo dois pequenos pontos próximos. Estes centrossomas são compostos por um só centríolo

que não é replicado para a meiose II, centríolo este que irá constituir o corpo basal dos espermatídios [Tates, 1971]. A γ -tubulina continua associada aos MTOCs durante a espermiogénese, sendo detectada na extremidade basal do núcleo em elongação de cada espermatídio. Nos espermatídios em diferenciação de *Tenebrio molitor*, a γ -tubulina surge num foco de fraca intensidade na região basal e numa forte marcação na região precursora do acrossoma [Wolf and Joshi, 1995]. Esta dupla marcação não foi observada em *Drosophila* e não era esperada, pois enquanto que, em *T. molitor* os microtubulos citoplasmáticos têm origem nas proximidades do precursor do acrossoma [Wolf and Joshi, 1995], em *Drosophila* os microtúbulos citoplasmáticos que correm ao longo do núcleo em elongação parecem ter origem na área do corpo basal [Stanley *et al.*, 1972; Tokuyasu, 1974; Tokuyasu, 1975]. Assim a presença de γ -tubulina restrita à região basal sugere que os microtúbulos citoplasmáticos presentes nos espermatídios são nucleados nesta área. Nos espermatozóides maduros, a γ -tubulina aparentemente persiste na região basal, contudo o sinal de marcação é reduzido, nem sempre visível e a pré-incubação do anticorpo com antigénio não remove totalmente o sinal. Assim, a marcação detectada nos espermatozóides pode ser um artifício. Este ponto terá de ser esclarecido mediante a utilização de mais anticorpos contra a γ -tubulina. A presença de γ -tubulina na região basal dos espermatozóides já foi observada em ratinho [Palacios *et al.*, 1993], mas em *Xenopus* só é detectada nos espermatozóides após incubação destes em extractos de ovos [Felix *et al.*, 1994; Stearns and Kirschner, 1994]. A existir realmente γ -tubulina nos espermatozóides, esta poderá representar uma fracção residual que se mantém em estreita associação ao corpo basal, o que estaria de acordo com a presença de γ -tubulina nos centríolos [Dibbayanwan *et al.*, 1995; Fuller *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 1996].

A presença de γ -tubulina 23C nos MTOCs durante a espermatogénese sugere que esta proteína participa na função dos mesmos. Para investigar esta função foi realizada a caracterização citológica da espermatogénese em machos homozigóticos $\gamma tub23C^{PI}$.

Nos testículos dos indivíduos mutantes a expressão da γ -tubulina está ausente ou é muito reduzida. Neste tecido os níveis de γ -tubulina sofrem uma redução substancialmente maior em consequência da mutação em relação ao que acontece em cérebros e discos imaginais. Esta diferença poderá resultar de a expressão da γ -tubulina 23C nos testículos ser eventualmente mais sensível à presença do elemento P em $\gamma tub23C$ e de a γ -tubulina 23C poder ser a única isoforma expressa neste tecido.

A primeira fase da espermatogénese não parece ser afectada pela mutação. As divisões mitóticas das espermatogónias surgem sem alterações, apesar a γ -tubulina não ser facilmente detectada nos centrossomas das células mutantes.

Existem diversos mutantes que também exibem fenótipos mitóticos e meióticos anormais e que no entanto não apresentam qualquer efeito sobre a mitose gonial, exemplos destes são alelos mutantes de *polo* [Sunkel & Glover, 1988] , *mgr* [Casal *et al.*, 1990] e *twinstar* [Gunsalus *et al.*, 1995] .

Apesar de aparentemente haver uma evolução normal das fases pré-meióticas, os espermatócitos mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ falham completamente na organização de um fuso meiótico normal. A primeira manifestação de anormalidade surge no atraso do recrutamento da Centrossomina [Li & Kufman, 1996] para os centrossomas dos espermatócitos primários maduros. Apesar disto, os centrossomas profásicos nucleiam pequenos ásteres e separam-se. Contudo, os centrossomas raramente atingem a posição diametralmente oposta que se observa nas células em metafase I do tipo selvagem. Com a progressão da meiose, o fenótipo mutante torna-se mais severo, as díadas de cromossomas são envolvidas por um emaranhado de microtúbulos com uma organização muito aberrante. Estes resultados sugerem que a γ -tubulina pode ser necessária não só para a nucleação dos microtúbulos, mas também para a correcta organização de microtúbulos funcionais. Esta hipótese está de acordo com propostas para a função de um complexo de γ -tubulina na organização dos microtúbulos [Murphy & Stearns, 1996; Erickson & Stoffler, 1996] .

O emaranhado de microtúbulos observado nos espermatócitos mutantes em tipo-metafase evolui para uma organização cónica nas células que estão num tipo de anafase-telofase. A estrutura microtubular irregular torna-se mais concentrada na ponta da célula oposta à área onde se encontram os cromossomas. Este fenótipo não tinha sido descrito anteriormente. Os fusos meióticos monoastrais produzidos pelo mutante *ms(1)516* [Lifschytz & Hareven, 1977; Lifschytz & Meyer, 1977] , embora parecidos, são claramente diferentes das estruturas cónicas de $\gamma tub23C^{PI}$. Estas estruturas são mais semelhantes a fusos telofásicos em que metade do fuso está ausente. Provavelmente, estas figuras resultam de um enfaixamento dos microtúbulos que fazem parte da estrutura microtubular aberrante presente nas células mutantes. Este tipo de enfaixamento também parece ocorrer no tipo selvagem, quando o fuso central é cingido durante a citocinese. Assim, talvez possa ser válido concluir, que a forma

cónica é originada pela função dos produtos que conduzem à constrição do fuso central nos espermatócitos do tipo selvagem.

Os centrossomas que se estavam a separar em profase I nas células $\gamma tub23C^{PI}$, aproximam-se durante a metafase, para nas células em tipo-telofase estarem de novo juntos. Este comportamento anormal dos centrossomas deve resultar da aberrante organização microtubular. Os mecanismos propostos para a separação dos centrossomas envolvem um processo dependente de microtúbulos [Waters *et al.*, 1993; Hogan & Cande, 1990] no qual o citoesqueleto de actina também participa [Gunsalus *et al.*, 1995]. Nos espermatócitos mutantes, os discretos ásteres presentes nas células em profase talvez sejam capazes de interagir com os filamentos de actina e iniciar o processo de separação. Porém, a posterior separação e manutenção da posição oposta poderá estar mais dependente de interacções entre microtúbulos. A organização aberrante dos microtúbulos nas células mutantes pode impedir este processo e conseqüentemente os centrossomas voltam a juntar-se.

A distribuição da Centrossomina nos centrossomas dos espermatócitos mutantes é variável. Primeiro, como já mencionado, nos espermatócitos primários maduros ocorre um atraso no recrutamento da proteína para a área pericentriolar em comparação com o que se passa nas células do tipo selvagem. Em prometáfase, a área de marcação da Centrossomina é menor nas células mutantes que nas do tipo selvagem, porém com a progressão da meiose, a proteína atinge uma distribuição normal. Voltam a surgir diferenças nas células em tipo-telofase, com a dispersão da marcação da Centrossomina. Esta dispersão pode ainda ser observada nos espermatídios juvenis mutantes.

A distribuição anormal da Centrossomina nos MTOCs mutantes, bem como a aberrante organização dos microtúbulos, poderá ser uma indicação de a γ -tubulina ser exigida para a organização de MTOCs funcionais, com previamente sugerido [Stearns & Kirschner, 1994; Felix *et al.*, 1994; Sunkel *et al.*, 1995].

Os espermatócitos primários $\gamma tub23C^{PI}$ aparentam entrar directamente em espermiogénese sem passar por meiose II. Todavia, é observada a condensação característica dos cromossomas desta fase, mas não pode ser indentificada a presença de aparelho meiótico de meiose II.

As células mutantes $\gamma tub23C^{PI}$ falham a citocinese após a meiose. Esta conclusão é suportada pelo facto de os cistos em "onion-stage" não apresentarem mais de dezasseis células. A falha da citocinese é muito provavelmente consequência da ausência de um fuso meiótico

normal. Diversas mutações que causam defeitos na organização e funcionalidade do fuso, frequentemente também apresentam problemas na citocinese [Kemphues *et al.*, 1982; Fuller *et al.*, 1988; Fuller, 1993]. No entanto, não se pode afastar uma função mais directa da γ -tubulina na citocinese, como acontece nas células de mamíferos [Shu *et al.*, 1995] e de *S. pombe* [Horio *et al.*, 1991].

A espermiogénese nos testículos $\gamma tub23C^{PI}$ é muito anormal, com alterações na organização dos derivados mitocondriais, na elongação do núcleo, na ligação das caudas aos núcleos e a completa desorganização dos feixes de espermátídios. Fenótipos similares têm sido descritos em outros mutantes [Lifschytz & Hareven, 1977; Lifschytz & Meyer, 1977; Castrillon *et al.*, 1993; Hackstein, 1991] e é considerado serem consequência indirecta das alterações durante os estadios anteriores da espermatogénese, reflectindo a semi-independência do processo de espermiogénese [Hackstein, 1991; Lifschytz & Hareven, 1977; Fuller, 1993]. Contudo, a elevada variabilidade na forma dos núcleos em elongação observada neste mutante não foi descrita antes e poderá ter origem numa aberrante organização dos microtúbulos que conduzem à elongação dos núcleos [Tokuyasu, 1974]. Assim, a γ -tubulina 23C pode ser indirectamente requerida para a diferenciação dos núcleos dos espermátídios.

Em cada espermátidio $\gamma tub23C^{PI}$ jovem podem ser observados até quatro corpos centriolares, os quais parecem ser funcionais pois encontram-se em associação com axonemas. A presença de quatro corpos centriolares nestes espermátídios, indica que nos espermátócitos primários mutantes que lhes deram origem tinham de existir dois pares de centríolos, tal como no tipo selvagem. Isto demonstra que estes espermátócitos primários são capazes de replicar os seus centríolos, apesar da virtual ausência de γ -tubulina 23C. Porém, a ausência de fusos meióticos normais indica claramente que estes centríolos não estão associados com MTOCs funcionais.

O conjunto destas observações mostra que na espermatogénese a γ -tubulina 23C está envolvida na organização dos microtúbulos e funcionamento dos MTOCs. Porém, não é necessária para a replicação dos centríolos, sendo este mutante um bom exemplo de separação entre a função dos centríolos e dos centrossomas.

Capítulo 8

Discussão geral e perspectivas futuras

O trabalho descrito nesta dissertação veio na sequência dos estudos que têm vindo a ser desenvolvidos para um melhor conhecimento da divisão celular. O laboratório onde decorreu toda a parte experimental aqui descrita, está empenhado na investigação dos mecanismos de segregação dos cromossomas e utiliza essencialmente como modelo de estudo a *Drosophila melanogaster*. Este organismo permite realizar a identificação e a caracterização de alelos mutantes de genes envolvidos na divisão celular, muito particularmente na mitose. No decorrer de um destes estudos foi identificada a linha mutante *141* como um alelo mutante de *γtub23C*. Este gene codifica para uma isoforma da γ -tubulina em *Drosophila* que é uma proteína que tem vindo a ser implicada na nucleação, na organização e na estabilidade dos microtúbulos.

O trabalho inicial de caracterização da linha mutante *141* revelou a inserção de um elemento P na região "leader" de *γtub23C*, que condiciona a expressão do gene, e verificou que os neuroblastos de larvas homocigóticas do terceiro estágio larvar apresentavam um severo fenótipo mitótico mutante em que sobressaiem grandes poliplóidias e uma organização aberrante do aparelho mitótico com destaque para a estrutura anormal dos centrosomas [Gomes, 1994; Sunkel *et al.*, 1995].

Os estudos que se seguiram à caracterização inicial foram executados no âmbito deste projecto e podem ser divididos em três partes: 1) análise molecular de *γtub23C*, expressão de proteínas de fusão com a γ TUB23C e caracterização de anticorpos anti- γ -tubulina; 2) definição da linha mutante *141* como o alelo mutante *γtub23C^{PI}*, por estudos genéticos do mutante e complementação da mutação com uma cópia de *γtub23C* do tipo selvagem; 3) caracterização do aparelho mitótico e da espermatogénese em *γtub23C^{PI}*.

Deste trabalho resultou a construção de duas estirpes de *E. coli* produtoras de proteínas de fusão contendo a γ -tubulina 23C, a caracterização de diversos anticorpos anti-tubulina, a construção de estirpes de *Drosophila* com a inserção de fragmentos de *γtub23C* no seu genoma e a classificação da linha mutante *141bs*, derivada da linha original *141*, por recombinação como o alelo mutante *γtub23C^{PI}*.

A análise de $\gamma tub23C^{PI}$ revelou que este alelo é hipomórfico, e que os níveis de γ -tubulina presentes são suficientes para que uma percentagem de indivíduos alcancem o estado adulto, se bem que com alterações na cutícula e na fertilidade. O estudo citológico de neuroblastos e discos imaginais do terceiro estágio larvar mostrou que a mutação em $\gamma tub23C$ causa severas alterações na organização do aparelho mitótico e na estrutura dos centrossomas. Estes resultados estão de acordo a caracterização inicial da linha 141, embora a presença de uma segunda mutação na linha original interfira sobre o fenótipo e cause um incremento da severidade do fenótipo mutante, nomeadamente no que respeita às grandes poliplóidias e à reduzida actividade mitótica.

Os machos adultos $\gamma tub23C^{PI}$ são estéreis enquanto que as fêmeas só apresentam uma redução da fertilidade. Esta diferença pode ter origem na utilização diferencial, nos processos gametogénicos, das duas isoformas de γ -tubulina conhecidas em *Drosophila*. A γ -tubulina 37C é essencial para a oógenese e para as primeiras divisões do embrião [Tavosanis *et al.*, 1997], enquanto que o estudo do alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ revelou que a isoforma 23C é essencial para a mitose em fases mais avançadas do desenvolvimento, bem como para espermatogénese. A observação de testículos de indivíduos do tipo selvagem evidenciou a presença de γ -tubulina associada aos centrossomas e aos corpos basais durante toda a espermatogénese. A ausência ou quase ausência de γ -tubulina nos testículos dos machos $\gamma tub23C^{PI}$ origina a formação de fusos meióticos totalmente aberrantes e uma espermiogénese degenerada. Contudo, a replicação dos centríolos não é perturbada, bem como a sua transformação em corpos basais e funcionalidade como tal na formação de axonemas.

O conjunto dos estudos sobre o alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ levantou várias hipóteses quanto à função da γ -tubulina na célula. Uma das hipóteses é a γ -tubulina não ser essencial para que ocorra a nucleação de microtúbulos, mas ser indispensável para a organização de microtúbulos funcionais, nomeadamente os envolvidos nos fusos mitóticos e meióticos. Esta acção da γ -tubulina poderá ser exercida através da influência sobre a estrutura dos microtúbulos como é proposto no modelo de Oakley e Mitchison [Zheng *et al.*, 1995; Oakley, 1995] ou pela modelação da dinâmica destes. Outra hipótese é a γ -tubulina estar envolvida na manutenção da estrutura do centrossomas, eventualmente por estabilização da ligação entre os centríolos, uma vez que esta proteína está presente na ponte que liga os centríolos.

A futura análise ultraestrutural das células do alelo mutante $\gamma tub23C^{PI}$ vai contribuir para a comprovação das hipóteses postas acima. Para o efeito estão a ser desenvolvidos esforços para a manutenção de culturas de neuroblastos de larvas de *Drosophila melanogaster*, incluindo a cultura de neuroblastos do alelo $\gamma tub23C^{PI}$, esta técnica permitirá a observação por microscopia electrónica da estrutura dos centrossomas e da organização dos

microtúbulos nessas células e assim contribuir para um melhor esclarecimento da função da γ -tubulina nas células.

Outra via futura de estudo da γ -tubulina consistirá na identificação dos seus domínios funcionais, o que poderá ser efectuado por transfecção de linhas celulares de *Drosophila* ou por transformação de linhas germinais com fragmentos de *γ tub23C* que contêm deleções da região codificante. Também é de todo o interesse determinar se existem mais isoformas de γ -tubulina na *Drosophila*, para além da forma 23D e 37C, a existirem poderão eventualmente estar envolvidas em funções específicas.

O estabelecimento de mutantes duplos entre o alelo *γ tub23C^{PI}* e outros alelos mutantes, como por exemplo alelos do *polo*, irá permitir verificar se existem interacções directas ou indirectas entre a γ -tubulina e os produtos dos outros alelos mutantes e assim contribuir para o melhor conhecimento da γ -tubulina no contexto celular.

Capítulo 9

Material e Métodos

9.1 - Material biológico

9.1.1 - Estirpes de *Drosophila melanogaster*

A estirpe do tipo selvagem Oregon-R foi utilizada como estirpe referência e foi obtida do banco europeu de estirpes "Umea *Drosophila* Stock Center" (Suécia).

A descrição dos cromossomas balancadores *CyO*, *ChTb*, *TST1*, *TM6*, *FM6*, e múltiplo marcador *all* pode ser encontrada na base de dados "Flybase" (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

Todas as estirpes foram mantidas a 25°C em tubos contendo meio de cultura de *Drosophila*.

Meio de cultura de *Drosophila*: 5g de agar; 28g de levedura de cerveja integral; 60 ml de melão de cana; 70 g de sêmola de milho; 60 ml de solução de Nipagin (10% em etanol absoluto) para 1 litro de água.

9.1.2 - Estirpes de *Escherichia coli*

No decorrer do trabalho foram utilizadas as estirpes de *E. coli* indicadas a seguir em conjunto com os respectivos genótipos e utilização:

P2	<i>Hfr</i> H <i>argE(am)</i> <i>rpoB</i> <i>galT::(λΔ[int-FII])</i> P2	Propagação dos fagos λDash G1, G7, G14
C600	<i>e14⁻</i> (<i>mcrA</i>) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>thr-1</i> <i>leuB6</i> <i>lacY1</i> <i>tonA21</i>	Propagação do fago λZap C2
DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZΔM15</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>relA1</i> F ⁻	Clonagens em pKS, pET e pW8
TB1	<i>ara</i> <i>hsdR</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> Φ 80 <i>lacZΔM15</i>	Clonagem do plasmídeo de expressão pMal-c
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>dcm</i> <i>gal</i> DE3	Expressão de plasmídios pET
MGT1	TB1 [pMGT23CΔ19]	Expressão da proteína MBP:γ-TUB23CΔ19
TGTH1	BL21(DE3) [pETGT23CΔ19]	Expressão da proteína T7:γ-TUB23CΔ19:His6

9.2 - Clonagem em vetores

Os diversos plasmídios utilizados neste trabalho foram construídos por subclonagem de fragmentos de DNA específicos nos vetores apropriados, seguindo as técnicas básicas descritas em Sambrook *et al.*, 1989.

9.2.1 - Vetores de:

9.2.1.1 - Subclonagem simples

9.2.1.1.1 - pBluescript® KS

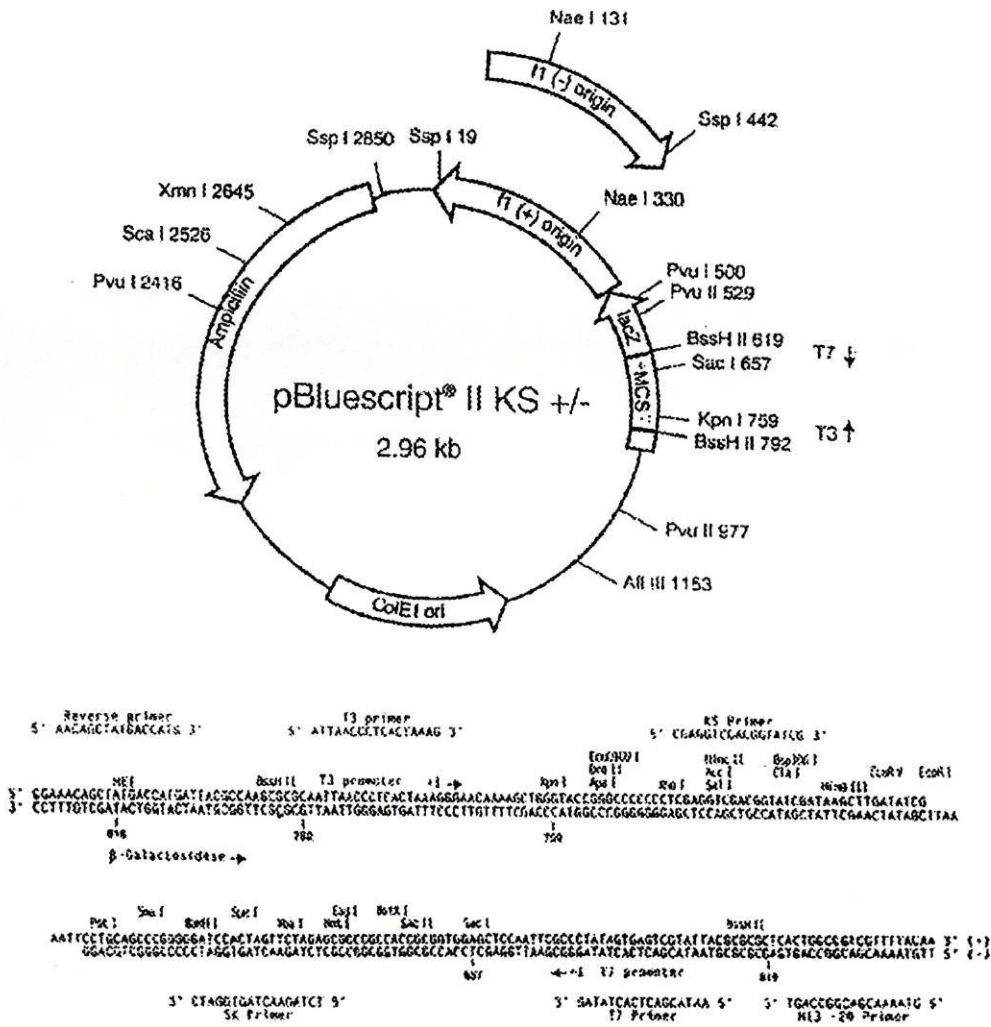
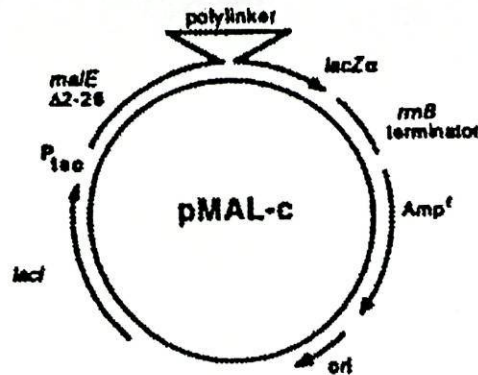


Figura 9.1 Representação esquemática do vector pBluescript® KS (Statagen, Inc.) e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo

9.2.1.2 - Expressão em *E. coli*

9.2.1.2.1 - pMALc



**pMAL-c,
Polylinker:**

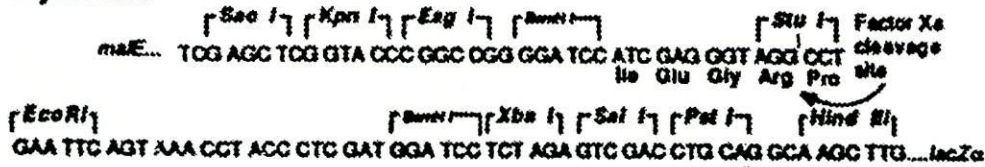


Figura 9.2 Representação esquemática do vector pMAL-c (Amersham, UK) e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo

9.2.1.2.2 - pET23b*

O vector de expressão pET23b* é derivado do vector pET23b (Novagen, Inc) por eliminação do local XhoI. A modificação foi efectuada por restrição de pET23b com XhoI (45 µl DNA pET23b a 1µg/µl + 5 µl tampão de XhoI 10X + 1 µl XhoI xU) a 37°C durante 3 horas, seguida de alisamento das extremidades por digestão com a enzima "Mung Bean Nuclease ou MBN" (50 µl da mistura de restrição + 20 µl Tampão da enzima MBN + 130 µl H₂O + 0,5 µl MBN xU) a 30° por 30 min. e inactivação da MBN durante 10 min a 68°C. Religação do vector, seguida de digestão com XhoI e transformação de células de *E. coli* DH5. Isolamento de algumas colonias, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes. Confirmação da eliminação do local XhoI por ausência restrição com XhoI e sequenciação da região utilizando o iniciador específico para uma sequência do promotor T7.

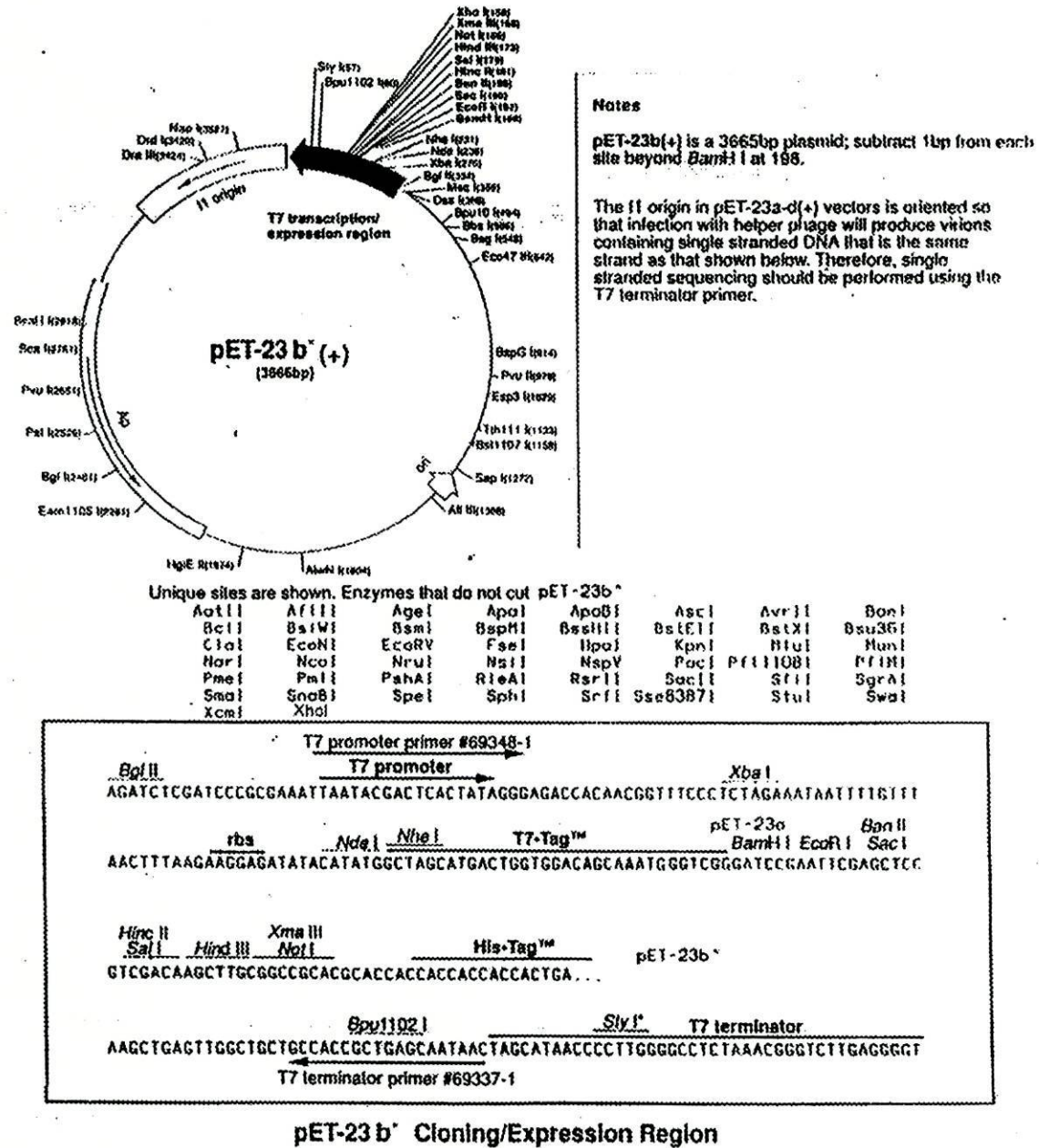


Figura 9.3 Representação esquemática do vector pET23b* (Novagen, Inc.) e da respectiva sequência local de clonagem múltiplo pET23b*

9.2.1.3 - Transposição

9.2.1.3.1 - pW8

O pW8 foi o vector utilizado na construção dos plasmídeos de transformação das linhas germinais [Klemenz *et al.*, 1987]. Este vector contém entre as extremidades invertidas (derivadas de elemento P), uma região com vários locais de clonagem únicos e parte do gene *white* em fusão com o promotor do gene *hsp70*. Abaixo está indicada a parte da sequência do pW8 em que se encontram os locais de clonagem únicos:

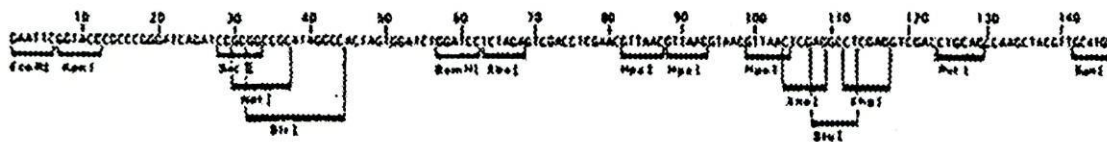


Figura 9.4 Sequência do local de clonagem múltiplo do vector pW8

9.2.2 - Construção dos plasmídios recombinantes

9.2.2.1 - pKGT23CA19

Corte do fago lambda Zap C2 com *EcoRI*, isolamento da banda de ~1,7 kb, ligação ao vector pKS previamente digerido com *EcoRI*. Transformação de células de *E. coli* DH5 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento correcto por restrição com *EcoRI* e *XbaI*. Sequenciação da extremidade 5' do cDNA clonado utilizando o iniciador "reverse" presente no "polylinker" do vector

9.2.2.2 - pKGTM

Isolamento da banda de 796 bp do produto de PCR total, efectuado com iniciadores específicos para a γ TUB37C sobre DNA genómico de *Drosophila melanogaster* (ver 9.x.x), por electroforese em gel agarose (2 %). Extracção do DNA da agarose com QIAEX (QIAGEN, Inc.) e ressuspensão em 34 μ l de ddH₂O. Enchimento da extremidades coesivas com os quatro dNTPs, para tal efectuou-se a seguinte mistura:

34 μ l DNA da banda + 2 μ l 10xUniv (Stratagen, Inc.) + 1 μ l dATP 2 mM + 1 μ l dTTP mM + 1 μ l dGTP mM + 1 μ l dCTP mM + 1 μ l Klenow 5U (Stratagen, inc)

Em seguida incubou-se a mistura durante 30 min. a 30°C, tempo findo o qual se inactivou a enzima durante 10 min. a 75°C, depois procedeu-se a uma extracção com 1 volume de clorofórmio e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto na presença de 1/10 acetato de sódio 3M. O DNA foi ressuspensão em 6 ml de ddH₂O e procedeu-se à ligação do fragmento ao vector pKS previamente digerido com Eco RV. Transformação de células de *E. coli* DH5 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e

confirmação de se ter clonado um fragmento de γ TUB37C por restrição com *EcoRI*/*SacI*, *EcoRV* e *BamHI* e sequenciação com os iniciadores "universal" e "reverse" presentes no "polilinker" do vector

9.2.2.3 - pMGT23CD19

Corte de pKGT23CA19 com *EcoRI*, enchimento das extremidades com os quatro dNTPs, do modo indicado para o plasmídeo pKGTM, e isolamento da banda de 1,7 kb por electroforese em gel de agarose. Ligação ao vector pMal-c previamente digerido com *StuI*. Transformação de células de *E. coli* TB1 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento correcto por restrição com *HindIII*.

9.2.2.4 - pETGT23CA19

Corte de pKGT23CA19 com *Cfr10I*, enchimento das extremidades com dCTP, seguido de restrição com *EcoRI* e isolamento da banda de 1,7 kb. Ao mesmo tempo executou-se o corte do vector pET23b* que se seguiu o enchimento das extremidades com dGTP e a restrição com *EcoRI*. Ligação da banda de 1,7 kb com o vector cortado e modificado, transformação de células de *E. coli* DH5 α com a mistura de ligação. Isolamento de algumas colónias, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento por restrição com *XbaI*. Confirmação da sequência de junção a 5' por sequenciação com iniciador específico para uma sequência do promotor T7.

9.2.2.5 - pW[gt23C]

Corte da fago lambda Dash G14 com *EclXI*, ligação ao vector pW8 previamente digerido com *NotI*. Transformação de células de *E. coli* DH5 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento correcto por restrição com *EcoRI* e *XbaI*.

9.2.2.6 - pW[gt23CRI]

Corte da fago lambda Dash G14 com *EcoRI*, isolamento da banda de 4 kb, ligação ao vector pW8 previamente digerido com *EcoRI*. Transformação de células de *E. coli* DH5 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento correcto por restrição com *EcoRI* e *XbaI*.

9.2.2.7 - pW[gt23CA]

Corte da fago lambda Dash G14 com *XbaI*, isolamento da banda de 4 kb, ligação ao vector pW8 previamente digerido com *XbaI*. Transformação de células de *E. coli* DH5 com a mistura de ligação. Identificação dos clones recombinantes por selecção de cor, isolamento das

colónias brancas, mini-preparação de DNA dos plasmídios transformantes e confirmação de se ter clonado o fragmento correcto por restrição com *EcoRI* e *XbaI*.

9.3 - Sequenciação de DNA

A sequenciação do DNA foi efectuada segundo o método de terminação da cadeia (Sanger *et al.*, 1977). Para o efeito, foi utilizado o conjunto "Sequenase® 2.0" (United States Biochemical Corporation, USB.) e de acordo com as instruções inclusas para a sequenciação de DNA de dupla cadeia com incorporação de [α - 35 S] dATP (Amersham, U.K.). Após as reacções de sequenciação, as amostras foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida "Long Ranger™ Gel" (AT Biochem, USA), processado segundo o protocolo incluso.

9.4 - Extração de ácidos nucleicos

9.4.1 - Preparação de DNA plasmídico

O DNA plasmídico foi preparado segundo adaptações do método lise alcalina (Sambrook, 1989).

9.4.1.1 - Micropreparação

Preparou-se um cultura de *E. coli*, por inoculação de 3 ml de L-Broth (contendo 50 μ l/ml de ampicilina) com a estirpe transformada com o plasmídio pretendido e incubação a 37°C durante a noite. As células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspendidas em 100 μ l de solução I e transferidas para um tubo "eppendorf". Adicionaram-se 200 μ l de solução II e misturou-se por inversão até lise completa das células. Em seguida foram adicionados 150 μ l de solução III, voltou-se a misturar por inversão e centrifugou-se de imediato, durante 10 min a 14000 r.p.m.. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, extraído com um volume de clorofórmio e as fases separadas por centrifugação a 14000 r.p.m. durante 5 min.. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o DNA foi precipitado com 1 ml de etanol absoluto. Após centrifugação a 14000 r.p.m. durante 15 min., o sedimento foi lavado com etanol a 70 % e os traços de etanol removidos. O DNA, uma vez seco, foi ressuspendido em 40 μ l de ddH₂O e a solução guardada a -20°C.

Soluções:

L-Broth: Triptona 1 %; extracto de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 %

Solução I: Glucose 50mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM, EDTA (pH 8.0) 10 mM

Solução II: NaOH 0,2 M, SDS 1 %

Solução III: Acetato de potássio 3 M (pH 4,8)

9.4.1.2 - Macropreparação

O DNA plasmídico foi preparado em larga escala com o conjunto "Qiagen Plasmid Midi Kit" (QIAGEN, Inc.) segundo as intruções do fabricante.

9.4.2 - Extracção de DNA fágico

Uma cultura de estirpe apropriada de *E. coli* cresceu durante a noite a 37°C com agitação em LB suplementado com 10 mM MgSO₄ e 0.2% Maltose. Juntou-se a 100 ml da cultura crescida 1 a 3 volumes de lisado de fago. Esta mistura foi incubada 20 min. a 37° C com agitação suave. A mistura foi adicionada a 100 ml de LB contendo 10 mM MgSO₄ e incubada a 37° C com agitação até observação da lise da cultura (cerca de 8 a 12 h de incubação). Após a lise, adicionou-se 1 ml de clorofórmio e manteve-se incubação por mais 30 min., para uma lise completa. O lisado foi repartido por tubos de 50 ml e centrifugado durante 5 min. a 5000 r.p.m. e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Os fagos foram precipitados a 0° C durante a noite, após a adição de NaCl e de PEG 8000 para concentrações finais de 6 % e 7 % respectivamente. Recolheram-se os fagos após 5 min de centrifugação a 5000 r.p.m. Ressuspendeu-se o sedimento de cada tubo em 0,25 ml tampão λ e juntaram-se as suspensões num tubo "eppendorf". Os RNA e DNA bacterianos foram eliminados por digestão com RNase e DNase, em concentrações finais de 60 µg/ml e 30 µg/ml respectivamente, durante 1 h a 37° C. Para extrair o DNA fágico, adicionou-se SDS e EDTA em concentrações finais de 0.1 % e 20 mM respectivamente. À mistura juntou-se 0,5 volumes de Fenol/TE, vortexou-se ligeiramente, adicionou-se 0,5 volumes de clorofórmio, a mistura foi bem homogeneizada e centrifugada 2 min 14000 r.p.m.. A fase fenólica foi removida e a fase aquosa reextraída com fenol e clorofórmio. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo tubo e extraída com 1 volume de clorofórmio. Esta extracção foi repetida até obtenção de uma interfase sem resíduos. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto. Após a formação do novelo de DNA, este foi transferido para um tubo contendo etanol a 70 % (caso não se formasse um novelo adicionava-se 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, deixava-se pelo menos 1 h a -70°C, centrifugava-se 5 min. a 5000 r.p.m. e lavava-se com etanol 70%). Após a lavagem, centrifugou-se a 10000 rpm por 1 min., removeu-se o etanol e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente. O DNA foi finalmente ressuspendido em 200 µl de TE a 4°C e conservado a -20°C.

Soluções:

TE: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, 1 mM EDTA.

9.4.3 - Extracção de DNA genómico de *Drosophila*

Colocou-se 1,5 ml de moscas adultas num tubo homogeneizador, adicionou-se 5 ml de tampão de homogeneização e procedeu-se à homogeneização em 10 estocadas com um homogeneizador (Heidolph) na velocidade 2. A mistura foi transferida para um tubo de 15 ml e adicionou-se 5 ml de tampão de homogeneização. Os núcleos foram recuperados por centrifugação a 4000 r.p.m., durante 10 min. O sobrenadante foi removido por aspiração (tomba de água), tendo o cuidado de eliminar os lípidos. Utilizando pontas cortadas, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão de homogeneização e repartido por dois tubos "eppendorf". Adicionou-se proteinase K para a concentração final de 100 µg/ml, misturou-se cuidadosamente por inversão, lisaram-se os núcleos com SDS numa concentração final de 1 % (misturou-se por inversão) e deixou-se a proteinase actuar durante 60 min. a 37°C. A mistura foi extraída com 1 volume de fenol/TE, as fases separadas por centrifugação durante 5 min. a 6000 r.p.m.. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, utilizando pontas cortadas, reextraída com 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e como anteriormente, centrifugada e a fase aquosa transferida para novo tubo. Esta extracção foi repetida até se obter

uma interfase limpa. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol a 70 %, centrifugado 5 min. a 12000 r.p.m. e deixado secar ao ar. Finalmente, foi cuidadosamente ressuspensionado em 200 µl de TE e analisado por electroforese em gel de agarose 0,7%.

Soluções:

Tampão de homogeneização: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA (pH 8) 10mM, Espermina 0,15 mM, Espermidina 0,15 mM.

9.4.4 - Micropreparação de DNA genómico de *Drosophila*

A micropreparação de DNA genómico de mosca foi efectuada segundo o protocolo descrito por Gloor, G. e Engels, W. (1990).

Colocou-se uma mosca num tubo de 0,5 ml e esmagou-se com uma ponta contendo 50 µl de tampão SB, sem expelir o líquido, só o fazendo no fim do esmagamento. Incubou-se a mistura durante 20-30 min. a 37°C e inactivou-se a proteinase K por aquecimento a 95°C durante 1-2 min. A preparação foi guardada a 4°. O DNA assim preparado foi utilizado em reacções de PCR, tendo sido utilizados 7 µl da mesmo por cada reacção de 50 µl.

9.4.5 - Preparação de mRNA poli(A)+ de *Drosophila*

O mRNA poli(A)+ foi isolado de indivíduos nas várias fases do desenvolvimento da *Drosophila*, segundo o protocolo adaptado no laboratório de Kevin O'Hare (comunicação pessoal).

Preparam-se misturas de homogeneização (10 ml tampão de homogeneização, 5 ml fenol neutralizado, 5 ml clorofórmio-álcool isoamílico) em tubos de 50 ml e lavou-se o triturador (Polytron) fazendo uma falsa homogeneização de uma das misturas. 5 ml de tecido, previamente colhido e mantido a -70°C, foram homogeneizados numa mistura de homogeneização. Centrifugou-se o homogeneizado a 5000 r.p.m. durante 5 min. e retirou-se a fase fenólica sem retirar interfase. Adicionou-se 5 ml de fenol e 5 ml de clorofórmio-álcool isoamílico, vortexou-se, centrifugou-se e retirou-se a fase fenólica. Adicionou-se 5 ml de clorofórmio-álcool isoamílico, vortexou-se, centrifugou-se e retirou-se a fase fenólica. A interfase deve ser quase nula, caso contrario repete-se a extracção com clorofórmio-álcool isoamílico até tal se obter. Transferiu-se a fase aquosa para tubos corex 30 ml e adicionou-se 20 ml de etanol. Misturou-se por inversão e guardou-se a -20°C durante a noite. O RNA foi recolhido por centrifugação a 10000 r.p.m. num rotor HB4 Sorval, durante 15 min. a 4°C. Deixou-se secar o sedimento. Adicionou-se ao sedimento 4 ml de tampão SDS e ressuspendeu-se por incubação a 37°C com vortexações de 5 em 5 min. até à dissolução completa. Juntou-se proteinase K para uma concentração final de 0,3 mg/ml e manteve-se a incubação a 37°C por mais 2 horas. Adicionou-se 2 ml de fenol mais 2 ml de clorofórmio-álcool isoamílico. Vortexou-se e centrifugou-se no rotor HB4 Sorval a 5000 r.p.m. por 10 min. à temperatura ambiente. Retirou-se a fase fenólica e reextraiu-se a fase aquosa do mesmo modo. Após a extracção fenólica procedeu-se a duas novas extrações com 4 ml de clorofórmio-álcool isoamílico. Finalmente, transferiu-se a fase aquosa para um tubo Corex de 15 ml, precipitou-se o RNA com 2 volumes de etanol e guardou-se durante a noite a -20°C. Sedimentou-se o RNA por centrifugação a 10000 r.p.m. num rotor HB4 Sorval, durante 15 min. a 4°C. Secou-se e ressuspendeu-se em 3 ml de tampão de eluição contendo 0,5 % SDS, vortexando. O RNA foi aquecido a 65°C durante 5 min., arrefecido à temperatura ambiente em gelo e adicionou-se 0,3

ml de NaCl 5 M. O RNA foi aplicado numa coluna de celulose oligo-dT. Esta foi previamente preparada por suspensão da celulose oligo-dT (Collaborative Research Type) em NaOH 0,1 M, lavagem em tampão de ligação e empacotamento num volume de 1 ml numa seringa de 5 ml. O RNA foi deixado correr através da coluna à velocidade de 1 ml / 5 min. O líquido passado pela coluna foi reaplicado na coluna por duas vezes. A coluna foi lavada com 10 ml de tampão de ligação e o mRNA poli(A)+ eluído com 5 ml de tampão de eluição contendo 0,05 % SDS. Desprezaram-se os primeiros 0,5 ml eluídos e recolheu-se o restante em tubos Corex de 15 ml. O mRNA foi precipitado com 150 µl de NaCl 5 M e 8 ml de etanol e mantido a -20°C durante a noite. O mRNA foi recolhido por centrifugação a 10000 r.p.m. num rotor HB4 Sorval, durante 15 min. a 4°C, e ressuspenso em 0,5 ml de tampão SDS. Para a quantificação foram diluídos 10 µl em 0,5 ml de tampão SDS e a absorbância lida a 260 nm ($40 \mu\text{g/ml} = 1 \text{OD}_{260}$). A solução de mRNA foi guardada a -70°C

Soluções:

Tampão de homogeneização: Acetato de Sódio 0,15 M; EDTA 5 mM; SDS 1 %; Tris-HCl (pH 9) 50mM

Tampão SDS: Tris-HCl (pH 7,5) 10mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; SDS 0,5 %

Tampão de ligação: Tris-HCl (pH 7,5) 10mM; NaCl 400 mM; EDTA 1 mM; SDS 0,5 %

Tampão de eluição: Tris-HCl (pH 7,5) 10mM; EDTA 1 mM

As soluções acima foram autoclavadas

Clorofórmio-álcool isoamílico: mistura na proporção de 100:1

Fenol neutralizado: fenol saturado em água equilibrado com igual volume de tampão de homogeneização.

9.4.6 - Micropreparação de mRNA poli(A)+ de *Drosophila*

- mRNA de embriões de 0-2 h e 2-4h foi preparado em pequena escala utilizando o "QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit" (Pharmacia P-L Biochemical Inc.) e de acordo com as instruções inclusas.

9.5 - Hibridação de sondas radioactivas de DNA com ácidos nucleicos fixados em membranas

9.5.1 - Marcação de sondas de DNA com [α -³²P] dCTP

A marcação das sondas de DNA radioactivas com [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mol) (Amersham, U.K) foi efectuada com o "Multiprime DNA Labelling System" (Amersham, UK) de acordo com as instruções inclusas. Os oligonucleótidos livres foram removidos por passagem da mistura de marcação por uma coluna de Sephadex G-50 médio (Pharmacia P-L Biochemical Inc.). A resina foi empacotada numa seringa de 1 ml por centrifugação a 1800 r.p.m. por 1 min., lavada com TNE2 e recentrifugada. Adicionou-se 50 µl de TNE2 com azul de bromofenol à mistura de marcação, aplicou-se na coluna, seguida de 100 µl de TNE2. Recolheu-se a sonda num tubo "Eppendorf" por centrifugação a 1800 r.p.m. durante 3 min. A sonda foi fervida durante 3 min. e em seguida colocada em gelo, após o que foi adicionada a mistura de hibridação.

Soluções:

TNE2: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; NaCl 20 mM; EDTA (pH8) 2 mM; SDS 0,1 %

9.5.2 - "Southern blot"

A técnica de "Southern blot" foi executada segundo adaptação do protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989).

Procedeu-se à digestão de 10 µg de DNA genómico, por linha de corrida, com as enzimas de restrição indicadas, no tampão apropriado e num volume total de 20 µl, a 37°C durante a noite. Pré-analisou-se a qualidade da digestão, correndo 1/10 do volume com 1 ml de SB num gel de agarose 0,7 % na presença de brometo de etídio. Às digestões e ao padrão (3 µg de fago λ cortado com *Hind*III) adicionou-se 5 µl de SB e aplicaram-se as amostra num gel de agarose 0,7 % com brometo de etídio previamente preparado e submerso, na tina de electroforese, em tampão TAE 1X. A electroforese correu a 30 V durante a noite. Após o registo do gel transiluminado por U.V., este foi colocado em solução de despurinação durante 15 min., 30 min. em solução de desnaturação e neutralizado durante 30 min. em solução de neutralização. O DNA foi deixado a transferir durante a noite, para uma membrana Hybond + (Amersham, UK) em SSC 20X. Após a transferência, a membrana foi colocada na estufa a 80°C durante 2 horas para fixação do DNA à mesma. Pré-hibridou-se a membrana em solução de hibridação durante 2 horas num banho a 56°C com agitação. A solução de hibridação foi substituída e adicionou-se a sonda previamente marcada com [³²P] dCTP. A hibridação decorreu no banho a 56°C com agitação, durante a noite. A membrana foi lavada com agitação, por 4 x 15 min. em de solução de lavagem, e, caso a membrana se mantivesse muito radioactiva, mais 2 x 15 min. a 65°C na mesma solução. A membrana foi exposta para autoradiografia em filme especial para raios X (Agfa) a -70°C durante 3 dias.

Soluções:

TAE 10X: Tris acetato 40 mM; EDTA 2 mM

SB: 50 % de glicerol em TE 1X e azul de bromofenol q.b.

Solução de despurinação: HCl 0,25M (10 ml HCl 37% mais 490 ml de água desionizada)

Solução de desnaturação: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M

Solução de neutralização: NaCl 1,5 M; Tris-HCl (pH 7,2) 0,5 M; EDTA 1 mM

SSC 20X: NaCl 3 M; Citrato de sódio 0,3 M

Solução de hibridação: SSC 5X; SDS 0,1 %; Denhardt's 10X; S.S.DNA 50 µg/ml

Solução de lavagem: SSC 5X; 0,1 % SDS

Denhardt's 100X: BSA 2 %; polivinilpirolidona 2 %; ficol 2 % em EDTA 20 mM

S.S.DNA: DNA de esperma de salmão preparado a 5 mg/ml em água desionizada e autoclavado por 10 min para dissolução e desnaturação.

9.5.3 - "Northern blot"

A técnica de "Northern blot" foi executada segundo o protocolo adaptado no laboratório de Kevin O'Hare (comunicação pessoal).

O suporte e o pente para o gel de agarose foram limpos por lavagem com detergente comum, passagem por água desionizada e água saturada em diethyl pirocarbonato. O gel de agarose 1,5 % foi preparado por autoclavagem de 3 g de agarose SeaKem HGT (FMC, Inc.) em 160 ml de água desionizada. Após ser arrefecida a ~65°C, adicionou-se 32 ml de formamida a 37 % e 10 ml de tampão de gel 20X, misturou-se, verteu-se sobre o molde e deixou-se

solidificar. Entretanto, as amostras de mRNA (5 µg) foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol, centrifugadas e o mRNA seco a 65°C. Ressuspendeu-se em 20 µl de SBE e continuou-se a incubação a 65°C por 5 min. Adicionou-se 20 µl de DB e as amostras foram aplicadas no gel de agarose, previamente submerso em 2 l de tampão de corrida no tanque de electroforese. A electroforese correu durante a noite a 40-50 V. Após a corrida, a integridade do RNA foi observada sob iluminação ultravioleta. O gel foi colocado em SSC 10X durante 20 min e montado com vista à transferência para uma membrana Hybond N (Amersham). A transferência decorreu durante a noite em SSC 10X. A membrana foi deixada secar ao ar durante 30 min., e o mRNA fixado à mesma por exposição aos U.V. no transiluminador durante 5 min e no forno a 80°C por 2 horas. A membrana foi pré-hibridada em 25 ml de mistura de hibridação por mais de 4 horas, num banho a 42°C sem agitação. A mistura de hibridação foi mudada e adicionou-se a sonda previamente marcada com [³²P] dCTP. A hibridação decorreu no banho anterior durante a noite. A membrana foi lavada com agitação, em 4 mudas de solução de lavagem 1, e, caso a membrana estivesse muito radioactiva, mais 2 mudas de solução de lavagem 2. A membrana foi exposta para autoradiografia em filme especial para raios X (Agfa) a -70°C durante 1 dia.

Soluções:

Tampão de gel 20X: Na₂HPO₄ 0,36 M; NaH₂PO₄ 0,04 M

Tampão de corrida: HCHO 3 %; tampão de gel 1X

SET 20X: NaCl 3 M; Tris-HCl (pH 8) 0,6 M; EDTA 40 mM

SBE: HCONH₂ 50 %; HCHO 6 %; tampão de gel 1X; brometo de etídio 200 µg/ml

DB: HCONH₂ 50%; glicerol 50 %; tampão de gel 1X; azul de bromofenol q.b.

Mistura de hibridação: HCONH₂ 50 %; SET 5X; Denhardt's 5X; SDS 0,5 %; tampão de gel 2X; S.S.DNA 200 µg/ml

Solução de lavagem 1: Denhardt's 5X; SSC 2X; SDS 0,5 %

Solução de lavagem 2: SSC 2X; 0,5 % SDS

9.5.4 - Rastreo de colónias

Humedeceram-se membranas de nylon Quiabrand (Quiagen,...) numa placa limpa com L-agar. Colocou-se cada membrana sobre as colónias de uma placa, marcou-se a sua posição e retirou-se. Lavaram-se as membranas em SSC 2 X e colocaram-se sucessivamente sobre papel de filtro grosso embebido em solução de desnaturação, 7 min. e solução de neutralização, 10 min.. As membranas foram lavadas de novo em SSC 2 X e o DNA fixado às mesmas a 80°C durante 2 horas. Em seguida, procedeu-se à hibridação com sondas de DNA marcado com [³²P]dCTP seguindo o mesmo procedimento utilizado na técnica de "Southern blot", com a excepção de a hibridação ter ocorrido a 65°C. As placas com as colónias foram posicionadas sobre a autoradiografia, (seguindo as marcas inicialmente feitas), sendo as colónias positivas repicadas para placas limpas, crescidas e posteriormente analisadas.

9.6 - Hibridação *in situ* em cromossomas politénicos com sondas biotiniladas de DNA

9.6.1 - Marcação com biotina-14-dATP

As sondas biotiniladas de DNA foram preparadas por "nick translation" utilizando o "BioNick™ Labeling System" (Gibco BRL, Life technologies, Inc.) de acordo com o protocolo incluído, com a exceção de não se ter procedido à remoção dos nucleotídeos livres.

9.6.2 - Hibridação *in situ*

Dissecaram-se glândulas salivares de larvas do 3º estágio crescidas a 18°C, em NaCl 0,7 %, tendo o cuidado de remover o tecido gordo aderente. As glândulas foram transferidas para uma gota de 8 µl de solução 3:2:1 numa lamela siliconizada e sem pó, e apanhou-se a lamela com uma lâmina limpa. Libertaram-se e espalharam-se os cromossomas politénicos por ligeiros toques em círculo sobre a lamela. As preparações foram colocadas debaixo de um peso de aproximadamente 1,5 kg durante 4 horas e depois fixadas por imersão em azoto líquido, seguida da remoção das lamelas e incubação das lâminas em etanol absoluto por 30 min. Deixaram-se secar e guardaram-se a 4°C. Para a hibridação, as preparações dos cromossomas foram incubadas em SSC 2X a 65°C por 30 min, depois em etanol a 70 % por 5 min., seguidos de 5 min. em etanol absoluto e secas ao ar. Os cromossomas foram desnaturados por 2 min. em 70 mM NaCl (preparado no momento), de novo desidratados durante 3 min. em etanol 70 % e etanol absoluto e secos. Adicionou-se 5 µl da sonda de DNA biotinilado a 2 ml de solução de hibridação 2X, aqueceu-se a mistura a 90°C por 3 min. e arrefeceu-se em gelo. Aplicou-se 10 µl da mistura de hibridação na zona dos cromossomas, cobriu-se com uma lamela e incubou-se a 58°C dentro de uma câmara húmida, durante a noite. Após a hibridação, lavaram-se as preparações sucessivamente em: SSC 2X a 53°C por 2 min., SSC 4X por 5 min., SSC 4X com 0,1 % de Triton-X100 por 5 min. e SSC 4X por 5 min. (com exceção da primeira, todas as lavagens foram à temperatura ambiente). A cada preparação, adicionou-se 50 µl de 2 % de avidina conjugada com fluoresceína (Vector Labs) em SSC 4X, na região dos cromossomas, cobriu-se com uma lamela, manteve-se à temperatura ambiente durante 30 min.. As lâminas foram lavadas sucessivamente em: SSC 4X por 5 min., SSC 4X com 0,1 % de Triton-X100 por 5 min. e SSC 4X por 5 min.. As preparações foram montadas com 5 µl de Vectrashield (Vector Labs., Inc.) com iodeto de propídio a 1 µg/ml. A observação das preparações foi realizada num microscópio laser confocal de varrimento MRC-600. As imagens foram adquiridas com o programa COMOS 7.0 (BioRad, Labs.) e processadas em Photoshop 4.0 (Adobe systems, Inc.).

Soluções:

Solução de hibridação 2X: SSC 8 X; solução Denhardt's 2 X; sulfato de dextrano 20 %; ssDNA 40 µg/ml

9.7 - Amplificação de DNA por PCR

9.7.1 - Ampliação de um fragmento de *γtub37C*

A amplificação de um fragmento de *γtub37C* a partir de DNA genómico de *Drosophila melanogaster* foi efectuada por PCR utilizando os seguintes iniciadores:

GTM+: 5' GCTGGAGGGATTCGTGC 3'

GTM-: 5' TCGTACTGGGCCAAGGC 3'

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 50 µl cuja composição era a seguinte: tampão de reacção 1X; dNTPs 1 mM; DNA genómico 100 ng/µl; GTM+ e GTM- a 250, 100, 50, 50, 20 ou 5 pmol; e enzima Taqpolimerase 0,5U. A enzima só foi adicionada durante o primeiro ciclo de incubação no passo a 52°C. As reacções decorreram num aparelho "Bio-Rad THERMOCYCLER 60" (B. Braun Biotech) com os seguintes passos:

	Desnaturação	Emparelhamento	Síntese
1º ciclo:	2 min a 97°C	30 seg. a 52°C	2 min. a 72°C
2-31º ciclos:	30 seg. a 95°C	30 seg. a 52°C	2 min. a 72°C
extensão final:			5 min. a 72°C

O resultado das reacções foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1,6%

9.7.2 - Identificação da presença do elemento P 141

A presença do elemento P 141 nas linhas recombinantes *141* foi detectada por PCR com iniciadores específicos para a extremidade do elemento P (P1) e para *γtub23C* (GT2) sobre o DNA genómico de cada linha:

P1: 5' TGAAATAACATAAGGTGGTC 3'

GT2: 5' CCTCCGTGCTTGGATAGG 3'

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 50 µl cuja composição era a seguinte: tampão de reacção 1X; dNTPs 1 mM; 7 µl de DNA genómico resultante de microextração; P1 50pmol; GT2 50pmol; e enzima Taqpolimerase 0,5U. A enzima só foi adicionada durante o primeiro ciclo de incubação no passo a 52°C. As reacções decorreram num aparelho "Bio-Rad THERMOCYCLER 60" (B. Braun Biotech) com os seguintes passos:

	Desnaturação	Emparelhamento	Síntese
1º ciclo:	2 min a 97°C	30 seg. a 50°C	2 min. a 72°C
2-31º ciclos:	30 seg. a 95°C	30 seg. a 50°C	2 min. a 72°C
extensão final:			5 min. a 72°C

O resultado das reacções foi analisado por electroforese em gel de agarose a 1,5%. O elemento P141 foi detectado pela presença de uma banda de aproximadamente 550 pb.

9.8 - Expressão de γ -tubulina em *E. coli*

9.8.1 - MBP: γ -TUB23C Δ 19

A expressão da proteína de fusão MBP: γ -TUB23C Δ 19 foi induzida por adição de IPTG a culturas de TGT1 seguindo o protocolo incluído com o conjunto pMAL (Amersham).

9.8.2 - T7: γ -TUB23C Δ 19:His6

Para a expressão da proteína de fusão T7: γ -TUB23C Δ 19:His6 o plasmídeo pETGT23C Δ 19 foi introduzido na estirpe BL21(DE3), o que originou a estirpe MGTH1. A indução da proteína foi efectuada por adição de IPTG a culturas de MGTH1 segundo as instruções incluídas no manual dos vectores pET (Novagen, Inc.), assim como a preparação das fracções solúveis e insolúveis.

9.9 - Separação de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE segundo o método de Laemmli (1970). Cada gel, tal como a electroforese, foi executado de acordo com protocolo descrito nas instruções acompanhantes das unidades de electroforese utilizadas: "Tall Mighty Small-Vertical Slab Gel Electrophoresis-SE280" (Hofer Scientific Instruments). As electroforeses decorreram a uma intensidade de corrente contante de 18 mA. Utilizaram-se padrões de peso molecular comerciais da Pharmacia Biotech.

9.10 - Técnicas imunológicas

9.10.1 - Anticorpos utilizados e respectivas diluições

Anticorpos primários	Origem	Immunoblot	Immunofluor	Referência
anti-MBP	coelho	1:5000	-----	New England, BioLabs
anti-T7.tag TM	coelho	1:1000	-----	Novagen, inc.
anti- α -tubulina	ratinho	1:200	1:200	Amersham, U.K.
anti- β -tubulina	ratinho	1:200	1:200	Amersham, U.K.
Rb188	coelho	1:200	1:500	Whitfield <i>et al.</i> , 1988
CNN	coelho	-----	1:500	Heuer <i>et al.</i> , 1995
JH46	coelho	1:500	1:200	Joshi, H.C. <i>et al.</i> , 1992
JH46 IP	coelho	1:4	1:2	JH46 imunopurificado
RbCS1	coelho	1:500	1:100	Whitfield, W. não publi.
RbCS1 IP	coelho	1:2	-----	RbCS1 imunopurificado
RbPS1	coelho	1:100	1:100	Eurogenetics
RbPs1	coelho	1:10	1:2	RbPS1 imunopurificado
RbVerol	coelho	1:1000	1:100	Cambiazio, V. não publi.
RbVerol IP	coelho	1:10	1:2	RbVerol imunopurific.

Anticorpos secundários	origem	conjugado	diluição	Referência
Anti-coelho	IgG(H+L) de cabra	peroxidase	1:1000	Vector Labs
Anti-coelho	IgG de burro	fluoresceína	1:200	Amersham
Anti-coelho	IgG(H+L) de cabra	cy5	1:100	Jackson
Anti-ratinho	IgG(H+L) de cavalo	peroxidase	1:1000	Vector Labs
Anti-ratinho	IgG(H+L) de ovelha	fluoresceína	1:200	Amersham
Anti-ratinho	IgG(H+L) de cabra	cy5	1:100	Jackson

9.10.3 - "Immunoblotting"

9.10.3.1- Preparação dos extractos proteicos

Os extractos totais de proteínas de tecidos de *Drosophila* foram preparados directamente em tampão de amostra de Laemmli 2X (Laemmli, U.K., 1970). Dissectaram-se 12 cérebros com discos imaginais, 12 pares de testículos larvares ou 8 pares de testículos de adultos jovens em NaCl 0,7 %. À medida que iam sendo isolados, eram imediatamente colocados num tubo ("ependorf" de 100 µl) contendo 5 µl de tampão de amostra de Laemmli 2X, mantido em gelo. Após a dissecação, o volume do extracto foi ajustado para 10 µl com a adição de água, o extracto foi aquecido a 95°C durante 3 min., colocado em gelo e aplicado no gel, ou congelado a -20°C.

Tampão de amostra: Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); SDS 2 %; glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol q.b..

9.10.3.2 - "Western blot"

A técnica de "western blot" foi realizada segundo adaptação do método descrito por Towbin *et al.*, 1979.

Os polipéptidos presentes nos extractos totais de proteínas foram separados por SDS-PAGE (gel de acrilamida a 7,5-10%) de acordo com o método de Laemmli (1970). Após a separação os polipéptidos foram electrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, a uma corrente constante de 400 mA durante 1 h, em tampão de transferência. A eficiência da transferência foi analisada por coloração das proteínas na membrana, com solução de Ponceau-S. A membrana foi descorada com TBST 1X e bloqueada com 5 % de leite em pó magro preparado em TBST 1X, . Depois de uma rápida lavagem em TBST 1X, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo diluído em solução de incubação, durante a noite, a 4°C, ou 1 hora à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo primário foi removido com 4 lavagens com TBST 1X, de 10 min. cada e procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário apropriado, diluído em solução de incubação, durante 1 hora, à temperatura ambiente. De novo, o excesso de anticorpo foi removido com 4 lavagens com TBST 1X, de 10 min. cada. O anticorpo secundário está conjugado com a peroxidase o que permite a sua detecção por quimioluminescência com o sistema ECL, segundo as instruções do fabricante (Amersham, U.K.).

Soluções:

Solução de transferência: glicina 191 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8.3)

TBST 10X: Tris-HCl 50 mM (pH 7.9); NaCl 150 mM; Tween-20 0.05%

Solução de incubação: 1 % de leite em pó magro dissolvido em TBST 1X

9.10.3.3 - "Dot blot"

A técnica de "dot blot" resultou de uma adaptação da técnica de "western blot", consistindo a diferença em que as proteínas não são separadas, sendo aplicadas directamente sobre a membrana. Para o efeito a membrana de nitrocelulose foi humedecida em solução de transferência e as amostras foram aplicadas em gotas de 2 µl sobre a superfície da membrana. Após a absorção das amostras, a membrana foi bloqueada e incubada com os anticorpos segundo o já descrito para "western blot".

9.10.2 - Imunopurificação

A imunopurificação dos anticorpos anti- γ -tubulina foi efectuada segundo a técnica do antigénio fixado em bandas de nitrocelulose, descrita em Sambrook *et al.*, 1989.

9.10.5 - Imunofluorescência indirecta em cérebros de larvas

Os cérebros e discos imaginais foram dissecados em NaCl 0,7 % na presença de taxol 10 µM e imediatamente fixados em formaldeído 3,7 % em NaCl 0,7% na presença de taxol 10 mM, durante 10-15 min. Os cérebros e discos fixados foram bloqueados por 1 hora com (10 % de soro fetal, 0,3 % Triton-X100 em NaCl 0,7 %) e incubados com o primeiro anticorpo diluído em solução de bloqueamento com 10 µg/ml de RNaseA (livre de DNases) durante 1-2 horas à temperatura ambiente ou por 12-16 horas a 4°C. Após duas lavagens de 15 min. com (NaCl 0,7 %, Triton-X100 0,3 %), procedeu-se à incubação durante 2 horas à temperatura ambiente com o segundo anticorpo diluído em solução de bloqueamento. Os cérebros e discos foram lavados com anteriormente, seguindo-se de uma lavagem em NaCl 0,7 % e a coloração com iodeto de propídio a 1 µg/ml em NaCl 0,7 % por 5 min. Os cérebros foram separados dos discos imaginais e o conjunto foi montado em Vectrashield (Vector Labs.) com iodeto de propídio a 1 µg/ml. A observação das preparações foi realizada num microscópio laser confocal de varrimento MRC-600. As imagens foram adquiridas com o programa COMOS 7.0 (BioRad, Labs.) e processadas em Photoshop 4.0 (Adobe, inc.).

Soluções:

RNase: 1 mg/ml de Ribonuclease A em [Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; NaCl 15 mM]. Para eliminar DNases, ferveu-se durante 15 min. e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Guardou-se em alicotas a -20°C.

9.10.6 - Imunofluorescência indirecta em testículos

As imunofluorescências em testículos de *Drosophila* foram executadas segundo uma adaptação do método descrito por Pisano *et al.*, (1993).

Os testículos foram dissecados em tampão TB1 e colocados numa lâmina limpa contendo 100 µl do mesmo tampão. Os testículos foram cortados a 2/3 do seu comprimento com duas agulhas de tungsténio (afiadas por electrólise em KOH 10 %). Sobrepostas-se uma lamela siliconizada e removeu-se cautelosamente o excesso de líquido com um papel de filtro observando a saída dos cistos. Congelou-se o conjunto em azoto líquido e removeu-se a

lamela. Imediatamente, colocou-se a lâmina em metanol a -20°C durante 5 minutos, sendo depois transferida para acetona a -20°C por 1 minuto. Depois de fixado, o espécime foi extraído com (ácido acético 0,5 %; triton X-100 1 % em tampão TB2) durante 10 minutos à temperatura ambiente, e foi lavado por 3 vezes durante 5 minutos em tampão TB2. As preparações foram acumuladas em tampão TB2 até ao imunoprocessamento.

O material foi bloqueado em 10 % FCS, 0,3 % Tween em PBS por 1 hora. De seguida foi incubado com o anticorpo primário diluído em 10 % FCS, 0,1 % Tween, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ RNase em PBS (ver diluições específicas no ponto 10.x) durante 2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C . Lavaram-se as lâminas em 0,1% Tween em PBS por 3 x 15 minutos e incubou-se o material com o segundo anticorpo em 10 % FCS, 0,1 % Tween em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem em 0,1% Tween em PBS por 3 x 15 minutos, as preparações foram montadas em Vectashield (Vector Labs.) com iodeto de propídio a 1 $\mu\text{m/ml}$ e observadas num microscópio laser confocal de varrimento MRC-600. As imagens foram adquiridas com o programa COMOS 7.0 (BioRad, Labs.) e processadas em Photoshop 4.0 (Adobe, inc.).

Soluções:

TB1: KCl 183 mM ; NaCl 147 mM; Tris (pH 6,8) 10 mM; PMSF 1 mM (preparado fresco)

B2: CaCl_2 1 mM; KCl 2,6mM; KH_2PO_4 1,5 mM; MgCl_2 0,5 mM; NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM

TB2: TB2 mais 0,5% ácido acético e 1% triton X-100

Nota: a solução B2 pode ser substituída por PBS.

PBS: Dissolver em ddH₂O (8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4) para um volume final de 1 l, ajustar o pH a 7,2

9.11 - Análises citológicas

9.11.1 - Observação da mitose em neuroblastos

A análise citológica da mitose em neuroblastos de *Drosophila* foi executada segundo adaptação dos métodos previamente descritos (Gonzalez & Glover, 1993).

9.11.1.1 - Coloração com orceína

Os cérebros de larvas do 3^o estágio foram dissecados em NaCl 0,7 %, fixados em ácido acético 45 % durante 30 segundos, corados em acetorceína 45 % por 3 min. e o excesso de corante removido em ácido acético 60 %. Colocou-se 5 μl de acetorceína 60 % numa lamela isenta de pó e os cérebros corados foram transferidos para a gota. A lamela foi apanhada com uma lâmina limpa e os cérebros esmagados sob pressão. A preparação foi selada com verniz e examinada com uma objectiva de 63X, sob contraste de fase num microscópio Zeiss Axiophoto.

Acetorceína 45 % e 60 %: Adicionou-se 1,5 g de orceína sintética a 50 ml de ácido acético a 45 % ou 60 %, ferveu-se a mistura durante 30 min. com refluxo, para dissolução. Filtrou-se e guardou-se a 4°C em embalagem bem selada. Antes de usar, centrifugavam-se as alíquotas a uso, durante 5 min., a 12000 r.p.m.

9.11.1.2 - Coloração com Iodeto de propídio

Os cérebros de larvas do 3º estágio foram dissecados em NaCl 0,7 % e fixados em ácido acético 45 % durante 30 segundos. Colocou-se 5 µl de ácido acético 60 % numa lamela isenta de pó e os cérebros foram transferidos para a gota. A lamela foi apanhada com uma lâmina limpa, aguardou-se 3 min. e esmagaram-se os cérebros sob pressão. Após congelação em azoto líquido, removeu-se a lamela. A preparação foi deixada secar, montada em Vectashield (Vector Labs.) com iodeto de propídio a 1 µm/ml e examinada num microscópio laser confocal de varrimento MRC-600, com objectiva de 60X. As imagens foram adquiridas e processadas com o programa COMOS 7.0 (BioRad, Labs.).

9.11.1.3 - Determinação do índice mitótico

As contagens dos números de figuras mitóticas foi realizado em neuroblastos corados com iodeto de propídio e visualizados com objectiva de 60X. O resultados apresentados correspondem ao somatório das contagem efectuadas em 15 cérebros de cada genótipo. O índice mitótico e as frequências de metafases e anafase correspondem ao número total de figuras sobre o total de campos contados.

9.11.2 - Observação *in vivo* da espermatogenese

Os testículos de larvas no 3º estágio, pupas ou adultos, foram dissecados em NaCl 0,7% e colocados numa gota de NaCl 0,7 % (~100 µl) aplicada sobre um lâmina siliconizada. Sobre a gota foi cuidadosamente pousada uma lamela e o excesso de líquido removido, por lenta absorção com papel de filtro e visualizando a saída dos cistos de dentro dos testículos. No caso de pupas tardias e adultos, os testículos são previamente cortados a 2/3 do seu comprimento com agulhas de tungsténio. As preparações foram observadas num microscópio Zeiss Axiophoto (objectivas de 40X e 100X). Filme T-Base Kodak (Eastman Kodak, inc.) foi utilizado no resisto microfotográfico.

9.11.3 - Observação da segregação meiótica dos cromosomas

A coloração dos testículos com orceia foi executada de acordo com os procedimentos descritos por Lifschytz e Hareven, (1977).

Os testículos foram dissecados em NaCl 0,7%, fixados durante 1 minuto em ácido acético 45 % e corados com acetorceína 60% por 4 minutos. Após uma rápida lavagem em ácido acético 60 %, os testículos foram removidos para uma gota de ácido acetico 60 %, previamente colocada numa lâmina limpa, e cortados com agulhas de tungsténio. O conteúdo dos testículos foi deixado sair durante alguns segundos. Finalmente, uma lamela com uma gota de ácido láctico:acetorceína 60 % a 1:1 foi colocada sobre a preparação e o excesso de líquido cuidadosamente removido sem exercer pressão. As preparações foram seladas com verniz e observadas num microscópio Zeiss Axiophoto microscope (objectivas de 40X e 100X). Foram utilizados filmes T-Base Kodak (Eastman Kodak, inc.) para o resisto microfotográfico.

9.11.4 - Microscopia electrónica de testículos

Os testículos de indivíduos adultos jovens foram preparados para microscopia electrónica de transmissão segundo modificação de métodos previamente descritos (Tokuyasu *et al.*, 1974a; Hauschteck-Jungen, E. comunicação pessoal).

Os testículos foram dissecados em glutaraldeído a 2,5 % em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), fixados na mesma solução durante 60 min, e depois lavados em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 com 1,5 % de sacarose. A pós-fixação foi feita em OsO₄ a 2 % em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), por 1 hora, seguida de lavagem como a anterior, a que se seguiram uma série de desidratações com etanol a 25 % (5 min.), 50 % (10 min.), 70 % (15 min.), 90 % (20 min.) e 100 % (2 X 15 min.). Após a desidratação, o tecido foi transferido para duas mudas de 15 min. de óxido de propileno, impregnado durante 60 min. numa mistura de Epon-óxido de propileno a 1:1 e incluído em Epon durante 60 min. à temperatura ambiente seguidos de 40 horas a 60°C. Os blocos foram talhados, observaram-se cortes semi-finos corados com azul de metileno 1% em borax para a localização das áreas com interesse. Em seguida foram cortadas secções ultrafinas num ultramicrotomo LKB Ultratome III com o auxílio de uma faca de diamante. As secções foram colocadas em grelhas de cobre (400 buracos), contrastadas em solução saturada de acetato de uranilo durante 12 min. seguido de solução de citrato de chumbo durante 10 min. e examinadas num microscópio electrónico Zeiss (Carl Zeiss, EM 10C, Germany).

9.12 - Transformação de linhas germinais

9.12.1 - Preparação do DNA para microinjecção

O DNA plasmídico foi preparado em larga escala por Quiagen midiprep (ver 9.x.2). No fim do processo, o DNA foi dissolvido em tampão de microinjecção.

Tampão de microinjecção: KCl 5 mM; NaPO₄ 0,1 mM (pH 7.8)

9.12.2 - Microinjecção em embriões

A microinjecção em embriões de *Drosophila* foi efectuada segundo as técnicas descritas por P. Santamaria (1986) e A.C. Spradling (1986). As microinjecções foram efectuadas no pólo posterior de embriões de 0-1,5 horas da estirpe *w¹¹¹⁸; Sb,e,Δ(2,3)/TM6* com cada DNA da construção com o vector pW8 em conjunto com o do plasmídeo *phsπΔ(2,3)wc* [Steller & Pirrotta, 1985] na razão de 1:4.

9.12.4 - Cruzamentos para inclusão dos transposões ∇GTx no genoma das linhas 141

A inclusão no genoma das linhas 141 (*141*, *141bs* ou *141cpxsp*) de cada transposição portador de um fragmento *γtub23C* foi efectuada segundo os esquemas de cruzamentos a seguir indicados, em que a vermelho estão representadas as estirpes portadoras de ∇GTx e logo de olhos de cor vermelha e a azul as não portadoras de ∇GTx e com olhos de cor branca, o ponto de interrogação corresponde à dúvida que existia quanto à exclusão de indivíduos homocigóticos adultos normais do genótipo indicado abaixo da seta.

Capítulo 10

Bibliografía

- Afshar, K., Barton, N.R., Hawley, R.S., & Goldstein, L.S. (1995). DNA binding and meiotic chromosomal localization of the *Drosophila* Nod kinesin-like protein. *Cell* **81**, 129-138.
- Alexander, J.E., Hunt, D.F., Lee, M.K., Shabanowitz, J., Berlin, S.C., MacDonald, T.L., Sundberg, R.J., Rebhun, L.I. & Frankfurter, A. (1991). Characterization of post-translational modifications in neuron-specific class III β -tubulin by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4685-4689
- Alfa, C., Ducommun, B., Beach, D. & Hymys, J. (1990). Distinct nuclear and spindle pole body populations of cyclin-Cdc2 in fission yeast. *Nature* **347**, 680-682
- Allan, V. (1996). Motor proteins: A dynamic duo. *Curr. Biol.* **6**, 630-633
- Amos, L.A. (1995). The microtubule lattice - 20 years on. *Trends Cell Biol.* **5**, 48-51.
- Amos, L.A. & Hirose, K. (1997). The structure of the microtubule-motor complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 4-11.
- Arnal, I., Metoz, F., DeBonis, S. & Wade, R.H. (1996). Three-dimensional structure of functional motor proteins on microtubules. *Curr. Biol.* **6**, 1265-1270
- Arnal, I. & Wade, R.H. (1995) How does taxol stabilize microtubules?. *5*, 900-908
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Ault, J.G. & Rieder, C.L. (1994). Centrosomes and kinetochore movement during mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 41-49.
- Baas, P.W. & Joshi, H.C. (1992). γ -tubulin distribution in the neuron: implications for the origins of neuritic microtubules. *J. Cell Biol.* **119**, 171-178.
- Bailly, E., Dorée, M., Nurse, P., & Bornens, M. (1989). p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J.* **8**, 3985-3995.
- Balczon, R., Bao, L., Zimmer, W.E., Brown, K., & Zinkowski, R.P. (1995). Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **130**, 105-115.
- Bousbaa, H., Correia, L., Gorbsky, G.J. & Sunkel, C.E. (1997). Mitotic phosphoepitopes are expressed in Kc cells, neuroblasts and isolated chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* **110**, 1979-1988

- Bayley, P.M. (1990). What makes microtubule dynamics? *J. Cell Sci.* **95**, 329-334.
- Bell, S. & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**, 128-134
- Bissen, S.T. (1997). Developmental control of cell division in leech embryos. *BioEssays* **19**, 201-207.
- Boleti, H., Karsenti, E., & Vernos, I. (1996). Xkpl2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell* **84**, 49-59.
- Bré, M., Redeker, V., Quibell, M., Darmanaden-Delorme, J., Bressac, C., Cosson, J., Huitorel, P., Schmitter, J., Rossier, J., Johnson, T., Adoutte, A., & Levilliers, N. (1996). Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J. Cell Sci.* **109**, 727-738.
- Brewis, N.D., Street, A.J., Prescott, A.R., & Cohen, P.T.W. (1993). PPX, a novel protein serin/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* **12**, 987-996.
- Brinkley, B.R. (1985). Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**, 145-172.
- Brown, K.D., Coulson, R.M.R., Yen T.J. & Cleveland, D.W. (1994) Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis. *J. Cell Biol* **125**, 1303-1312
- Bulinski, J.C. & Borisy, G.G. (1980). Widespread distribution of a 210,000 mol wt microtubule-associated protein in cells and tissue of primate. *J. Cell Biol.* **87**, 802-808
- Burns, R.G. (1995). Analysis of the g-tubulin sequences: implications for the functional properties of g-tubulin. *J. Cell Sci.* **108**, 2123-2130.
- Buttgereit, D., Leiss, D., Michiels, F. & Renkawitz-Pohl, R. (1991). During *Drosophila* embryogenesis the b1 tubulin gene is specifically expressed in the nervous system and the apodemes. *Mech Dev*
- Byers, B. & Goetsch, L. (1973). Duplication of the spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 123-131
- Campbell, M.S. & Gorbsky, G.J. (1995). Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J. Cell Biol.* **129**, 1195-1204.
- Caplow, M. (1992). Microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 58-65.
- Carrier, M.F. & Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine-5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerisation. *Biochemistry* **20**, 1918-1924
- Carmena, M., Gonzalez, C., Casal, J., & Ripoll, P. (1991). Dosage dependence of maternal contribution to somatic cell division in *Drosophila melanogaster*. *Development* **113**, 1357-1364.
- Casal, J., Gonzalez, C., & Ripoll, P. (1990a). Spindles and centrosomes during male meiosis in *Drosophila melanogaster*. *Euro. J. Cell Biol.* **51**, 38-44.
- Casal, J., Gonzalez, C., Wandosell, F., & Avila, J. (1990b). Abnormal meiotic spindles cause a cascade of defects during spermatogenesis in asp males of *Drosophila*. *Development* **108**, 251-260.

- Cassimeris, L., Rieder, C.L., & Salmon, E.D. (1994). Microtubule assembly and kinetochore directional instability in vertebrate monopolar spindles: implications for the mechanism of chromosome congression. *J. Cell Sci.* **107**, 285-297.
- Castrillon, D.H., Gonczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhart, C.G., Viswanathan, S., DiNaerdo, S., & Wasserman, S.A. (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* **135**, 489-505.
- Cenci, G., Bonaccorsi, S., Pisano, C., Verni, F., & Gatti, M. (1994). Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **107**, 3521-3534.
- Centonze, V.E. & Borisy, G.G. (1990). Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *J. Cell Sci.* **95**, 405-411.
- Chrétien, D., Fuller, S.D. & Kaesenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* **129**, 1311-1328
- Chevalier, S. & Blow, J.J. (1996). Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 815-821
- Chong J.P., Thsmmes, P. & Blow, J.J. (1996). The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trend. Biochem. Sci.* **21**, 102-106
- Church, K. & Lin, H.P. (1982). Meiosis in *Drosophila melanogaster*. II. The prometaphase-I kinetochore microtubule bundle and kinetochore orientation in males. *J. Cell Biol.* **93**, 365-373.
- Church, K. & Lin, H.P. (1985). Kinetochore microtubules and chromosome movement during prometaphase in *Drosophila melanogaster* spermatocytes studied in life and with the electron microscope. *Chromosoma* **92**, 273-282.
- Cleveland, D.W. (1987). The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned? *J. Cell Biol.* **104**, 381-383. *Trend. Biochem. Sci.* **13**, 339-343
- Cleveland, D.W. (1988). Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eukaryotic regulatory mechanism. *Trend*
- Cleveland, D.W. (1995). NuMa: a protein involved in nuclear structure, spindle assembly, and nuclear reformation. *Trends Cell Biol.* **5**, 60-63.
- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. & Diffley, J.F. (1996). An essential role for the cdc6 protein in forming the prereplicative complexes of budding yeast. *Nature* **379**: 180-182
- Cooley, L., Kelley, R., & Spradling, A. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**, 1121-1128
- Cooper, K.W. (1965). Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In *Biology of Drosophila*. M. Demerec, ed. (New York: Hafner Publishing), pp. 1-61.
- Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1986). *Molecular cell biology*. 1° ed. Scientific American Books, Inc. New York.
- Dawson, I.A., Roth, S., Akam, M., & Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Mutations of the fizzy locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* **117**, 359-376.

- Dawson, I.A., Roth, S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). The *Drosophila* cell cycle gene *fizzy* is required for normal degradation of cyclins A and B during mitosis and has homology to the CDC20 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **129**, 725-737
- Debec, A., Szöllösi, A. & Szöllösi, D. (1982). A *Drosophila melanogaster* cell line lacking centrioles. *Biol. Cell* **44**, 133-138
- Debec, A., Détraves, C., Montmory, C., Géraud, G., & Wright, M. (1995). Polar organization of gamma-tubulin in acentriolar mitotic spindles of *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Sci.* **108**, 2645-2653.
- Desai, A. & Mitchison, T.J. (1995). A New role for motor proteins as couplers to depolymerizing microtubules. *J. Cell Biol.* **128**, 1-4
- Detraves, C., Mazarguil, H., Lajoie-Mazenc, I., Julian, M., Raynaud-Messina, B. & Wright, M. (1997). Protein complexes containing gamma-tubulin are present in mammalian brain microtubule protein preparations. *Cell Motil. Cytoskeleton* **36**, 179-189
- Dibbayanwan, T.P., Harper, J.D., Elliot, J.E., Gunning, B.E. & Marc, J. (1995). A g-tubulin that associates specifically with centrioles in HeLa cells and basal body complex in *Chlamydomonas*. *Cell Biol. Int.* **19**, 559-567
- Doxsey, S.J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P., & Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* **76**, 639-650.
- Edde, B.M., Rossie, J., Lecaer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F. & Denoulet, P. (1990). Post-translational glutamylation of alpha-tubulina. *Science* **251**, 671-675
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672.
- Endow, S.A., Chandra, R., Komma, D.J., Yamamoto, A.H., & Salmon, E.D. (1994). Mutants of the *Drosophila* *ncd* microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *J. Cell Sci.* **107**, 859-867.
- Engels, W.R. (1983). The P element family of transposable elements in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **17**, 315-344.
- Engels, W.R., Johnson-Schlitz, D.M., Eggleston, W.B. & Sved, J. (1990). High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* **62**, 512-525
- Erickson, H.P. (1974). Microtubule surface lattice and subunit structure and observations on reassembly. *J. Cell Biol.* **60**, 153-167
- Erickson, H.P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?. *Cell* **80**, 367-370
- Erickson, H.P. & Stoffler, D. (1996). Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/b and gamma tubulin. *J. Cell Biol.* **135**, 5-8
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A. & Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 519-523
- Evans, L., Mitchison, T., & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**, 1185-1191.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youglblom, J., Distel, D. & Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396

- Fan, J., Griffith, A.D., Lockhart, A. & Cross, R.A. (1996). Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. *J. Mol. Biol.* **259**, 325-330
- Feilotter, H., Nurse, P. & Young, P.G. (1991). Genetic and molecular analysis of *cdr1/nim1* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **127**, 309-318
- Felix, M., Antony, C., Wright, M., & Maro, B. (1994). Centrosome assembly in vitro: role of g-tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J. Cell Biol.* **124**, 19-31.
- Flemming, W. (1878) Beitrage zur kenntnis der zelle und ihrer lebenserscheinungem. *Arch. Mikrosk. Anat.* **III** **18**, 151-259
- Forsburg, S.L. & Nurse, P. (1991). Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Biol.* **7**, 227-256
- Fuchs, U., Moepps, B., Maucher, H.P. & Schraudolf, H. (1993). Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding gamma-tubulin protein from the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw.. *Plant Mol. Biol.* **23**, 595-603
- Funabiki, H. *et al.* (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438-441
- Fuller, M.T. (1993). Spermatogenesis. In *Development of Drosophila*. A. Martinez-Arias and M. Bate, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 71-147.
- Fuller, M.T. (1995). Riding the polar winds: chromosomes motor down east. *Cell* **81**, 5-8.
- Fuller, M.T., Caulton, J.H., Hutchens, J.A., & Kaufman, T.C. (1987). Genetic analysis of microtubule structure: a b-tubulin mutation causes the formation of aberrant microtubules in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* **104**, 385-394.
- Fuller, M.T., Caulton, J.H., Hutchens, J.A., Kaufman, T.C., & Raff, .E.C. (1988). Mutations that encode partially funtional b2 tubulin subunits have different effects on structurally diferent microtubule arrays. *J. Cell Biol.* **107**, 141-152.
- Fuller, S.D., Gowen, B.E., Reinsch, S., Sawyer, A., Buendia, B., Wepf, R., & Karsenti, E. (1995). The core of the mammalian centriole contains g-tubulin. *Curr. Biol.* **5**, 1384-1393.
- Fulton, C. & Simpson, P.A. (1976). Selective synthesis and utilization of flagelar tubulin. The multitubulin hypotesis. *Em Cell Motility* (ed. R. Goldman e T. Pollard), pp. 987-1005. Cold Spring Harbor, New York
- Gasch, A., Hinz, U., Leiss, D. & Rekawitz-Pohl, R. (1988). The expression of b1 and b3 tubulin genes of *Drosophila melanogaster* is spatially regutated during embryogenesis. *Mol. Gen. Genet* **211**, 8-16.
- Gaglio, T., Dionne, M.A. & Compton, D.A. (1997). Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrossomes. *J. Cell Biol.* **138**, 1055-1066
- Gaglio, T., Saredi, A., & Compton, D.A. (1995). NuMa is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J. Cell Biol.* **131**, 693-708.
- Gard, D.L. & 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
- Gard, D.L., Hafezi, S., Zhang, T. & Doxsey, S.J. (1990). Centrosome duplication continues in Cyclohexamide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J. Cel Biol.* **110**, 2033-2042

- Gatti, M. & Goldberg, M. (1991) Mutations affecting cell division in *Drosophila*. *Methods in Cell Biology* **35**, 543-586
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. & Maller, J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**, 487-494
- Gould, K.L. & Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2⁺*. *Cell*, **54**, 433-439
- Gelfand, V.I. & Bershadsky, A.D. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 93-116.
- Gerhart, J., Wu, M. & Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* **98**, 1247-1255
- Glotzer, M. (1996). Mitosis: Don't get mad, get even. *Curr. Biol.* **6**, 1592-1594.
- Glotzer, M. (1997). Cytokinesis. *Curr. Biol.* **7**, 274-276.
- Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138
- Glover, D.M. (1989). Mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **92**, 137-146.
- Glover, D.M., Alphey, L., Axton, J.M., Cheshire, A., Dalby, B., Freeman, M., Girdham, C., Gonzalez, C., Karess, R.E., Leibowitz, M.H., Llamazares, S., Maldonado-Codina, M.G., Raff, J.W., Saunders, R.D., Sunkel, C.E., & Whitfield, W.G. (1989). Mitosis in *Drosophila* development. *J. Cell Sci. Suppl.* **12**, 277-291
- Glover, D.M., Gonzalez, C. & Raff, J.W. (1993). The centrosome. *Sci Am.* **June**, 32-38.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., & Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95-105.
- Glover, D.M., Ohkura, H., & Tavares, A. (1996). polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? *J. Cell Biol.* **135**,
- Goldstein, L.S.B., Laymon, R.A. & McIntosh, J.R. (1986). A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J. Cell Biol.* **107**, 2076-2087
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., & Nigg, E.A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of PLK1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* **129**, 1-12.
- Gomes, R., Karess, R.E., Ohkura, H., Glover, D.M., & Sunkel, C.E. (1993). Abnormal anaphase resolution (aar): a locus required for progression through mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **104**, 583-593.
- Gomes, R. (1994). Análise genética e molecular de mutações que afectam o ciclo celular em *Drosophila melanogaster*. Tese de doutoramento. Universidade de Lisboa, Lisboa
- Gonzalez, C., Alphey, L., & Glover, D.M. (1994). Cell cycle genes of *Drosophila*. *Advances in genetics* **31**, 79-138.
- Gonzalez, C., Casal, J., & Ripoll, P. (1988). Functional monopolar spindles caused by mutation in mgr, a cell division gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* **89**, 39-47.

- Gonzalez, C., Casal, J., & Ripoll, P. (1989). Relationship between chromosome content and nuclear diameter in early spermatids of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. Camb.* **54**, 205-212.
- Gonzalez, C., Saunders, R.D., Casal, J., Molina, I., Carmena, M., Ripoll, P., & Glover, D.M. (1990). Mutations at the *asp* locus of *Drosophila* lead to multiple free centrosomes in syncytial embryos, but restrict centrosome duplication in larval neuroblasts. *J. Cell Sci.* **96**, 605-616
- Gonzalez, C. & Glover, D. M. (1993). Techniques for studying mitosis in *Drosophila*. In Frantes, P. & Brooks, R. (eds), *The Cell Cycle, A practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, UK, pp. 143-175
- Gorbsky, G.J. (1995). Kinetochores, microtubules and the metaphase checkpoint. *Trends Cell Biol.* **5**, 143-148.
- Gorbsky, G.J. (1997). Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *BioEssays* **19**, 193-197.
- Gorbsky, G.J. and Ricketts, W.A. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J. Cell Biol.* **122**, 1311-1321.
- Gould, R.R. & Borisy, G.G. (1977). The pericentriolar material in chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* **73**, 601-615.
- Gould, K.L. & Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., & Maro, B. (1993). γ -tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *J. Cell Sci.* **105**, 157-166.
- Gunsalus, K.C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M., and Goldberg, M.L. (1995). Mutations in *twinstar*, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J. Cell Biol.* **131**, 1243-12
- Hackstein, J.H. (1991). spermatogenesis in *Drosophila*. A genetic approach to cellular and subcellular differentiation. *Euro. J. Cell Biol.* **56**, 151-169.
- Hartwell, L.H. (1991). Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics*, **129**, 975-980
- Hartwell, L.H., Culotti, J. & Reid, B. (1970). Genetic control of the cell division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 352-359
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J. & Reid, B. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**, 46-51
- Hartwell, L. H. & Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: control that ensure the order of the cell cycle events. *Science* **246**, 629-634
- Heald, R., Tournebize, R., Habermann, A., Karsenti, E. & Hyman, A. (1997). Spindle assembly in *Xenopus* eggs extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. **138**, 615-628.
- Heck, M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y., & Spradling, A.C. (1993). The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **123**, 665-679.
- Heidemann, S.R. & Kirschner, M.W. (1975). Aster formation in eggs of *xenopus laevis*: induction by isolated basal bodies. *J. Cell Biol.* **57**, 105-117
- Heuer, J.G., Li, K., & Kaufman, T.C. (1995). The *Drosophila* homeotic target gene centrosomin (*cnn*) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* **121**, 3861-3876.

- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 74-81.
- Hirose, K., Lockhart, A., Cross, R.A. & Amos, L.A. (1996). Three-dimensional cryoelectron microscopy of dimeric kinesin and ncd motor domains on microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9539-9544
- Hoffmann, I. & Karsenti, E. (1994). The role of *cdc25* in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. *J. Cell Sci. Supp.* **18**, 75-79
- Hogan, C.J. & Cande, W.Z. (1990). Antiparallel microtubule interactions: spindle formation and anaphase B. *Cell Motil Cytoskeleton* **16**, 99-103
- Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W. & Murray, A.W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of the maturation-promoting factor. *Cell* **73**, 1393-1402
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M.K., Oakley, B.R., Tanakka, K., & Yanagida, M. (1991). The fission yeast *g-tubulin* is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J. Cell Sci.* **99**, 693-700.
- Hoyle, H.D. & Raff, E.C. (1990). Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J. Cell Biol.* **111**, 1009-1026.
- Hoyt, M.A. (1994). Cellular roles of kinesin and related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 63-68.
- Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., Turner, F. & Raff, E.C. (1997). Structurally similar *Drosophila* α -tubulin are functionally distinct in vivo. *Mol. Biol. Cell* **8**, 481-500.
- Hyman, A.A., Chrétienm D., Arnal, I. & Wade, R.H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(a,b)-methylene-diphosphonate. *J. Cell Biol.* **128**, 117-125
- Hyman, A.A. & Karsenti, E. (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* **84**, 401-410.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C. & Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**, 269-277
- Izumi, T., Walker, D.H. & Maller, J.L. (1992) Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* *cdc25* phosphatase regulate its activity. *Mol. Biol. Cell* **3**, 927-939
- Jarvik, J. & Botstein, D. (1975). Conditional-lethal mutations that suppress genetic defects in morphogenesis by altering structural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2738-2742
- Joshi, H.C. (1993). *g-tubulin*: the hub of cellular microtubule assemblies. *BioEssays* **15**, 637-643.
- Joshi, H.C., Palacios, M.J., McNamara, L., & Cleveland, D.W. (1992). *g-tubulin* is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80-83.
- Julian, M., Tollon, Y., Lajoie-Mazenc, I., Moisan, H., Puget, A., & Wright, M. (1993). *g-tubulin* participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **105**, 145-156.
- Kaldis, P., Sutton, A. & Solomon, M.J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* **86**, 553-564

- Kallajoki, M., Harborth, J., Werber, K., & Osborn, M. (1993). Microinjection of a monoclonal antibody against SPN antigen, now identified by peptide sequences as the NuMA protein, induces micronuclei. *J. Cell Sci.* **104**, 139-150.
- Kalt, A. & Schliwa, M. (1993). Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biol.* **3**, 118-128.
- Kaltschmidt, B., Glotzer, K.H., Michiels, F., Leiss, D. & Renkawitz-Pohl, R. (1991). During *Drosophila* spermatogenesis b1, b2 and b3 tubulin isotypes are cell-type specifically expressed but have the potential to coassemble into the axoneme of transgenic flies. *Euro. J. Cell Biol.* **54**, 110-120.
- Kellogg, D.R. & Alberts, B.M. (1992). Purification of a multiprotein complex containing centrosomal protein from the *Drosophila* embryo by chromatography with low-affinity polyclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1-11.
- Kellogg, D.R., Field, C.M., & Alberts, B.M. (1989). Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J. Cell Biol.* **109**, 2977-2991.
- Kellogg, D.R., Moritz, M., & Alberts, B.M. (1994). The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 639-674.
- Kemphues, K.J., Raff, E.C., Raff, R.A., & Kaufman, T.C. (1980). Mutation in a testis-specific b-tubulin in *Drosophila*: analysis its effects on meiosis and map location of the gene. *Cell* **21**, 445-451.
- Kemphues, K.J., Kaufman, T.C.; Raff, R.A. & Raff, E.C. (1982). The testis-specific b-tubulin subunit in *Drosophila melanogaster* has multiple function in spermatogenesis. *Cell* **31**, 655-670
- Khodjakov, A., Cole, R.W., McEwen, B.F., Buttle, K.F., & Rieder, C.L. (1997). Chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J. Cell Biol.* **136**, 229-240.
- Kikkawa, M. Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T. & Hirokawa, N. (1994). Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **127**, 1965-1971
- King, R.W., Peters, J-M., Tugendreich, S., Rolfe, M. Hieter, P. & Kirshner, M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-288
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J., & Kirschner, M. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659.
- King, R.W., Jackson, P.K., & Kirschner, M. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563-571.
- Kirk, K.E. & Morris, N.R. (1993). Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **24**, 473-478
- Kirschner, M. & Mitchison, T.J. (1986). Beyond self assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-342
- Klemenz, R., Weber, U., & Gehring, W.J. (1987). The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **15**, 3947-3959.
- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine desphosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-914
- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* **70**, 139-151

- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a *cdc25* regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* **273**, 1377-1380
- Kuryama, R. & Borisy, G.G. (1981). Microtubule -nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* **91**, 822-826
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lajoie-Mazenc, I., Tollon, Y., Detraves, C., Julian, M., Moisand, H., Gueth-hallonet, C., Debec, A., Salles-Passador, I., Puget, A., Mazarguil, H., Raynaud-Messina, B., & Wright, M. (1994). Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* **107**, 2825-2837.
- Lambert, A. (1993). Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 116-122.
- Lane, H.A. & Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human Polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* **135**, 1701-1713.
- Lange, B.M. & Gull, K. (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell Biol.* **130**, 919-927.
- Lee, M.S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L.L., Donoghue, D.J., Maller, J.L. & Piwnicka-Worms, H. (1992). *cdc25⁺* encodes a protein phosphatase that desphosphorylates p34^{cdc2}. *Mol. Biol. Cell* **3**, 73-84
- Lew, D.J. & Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795-804.
- Li, K. & Kaufman, T.C. (1996). The homeotic target gene centrosomin encodes an essential centrosomal component. *Cell* **85**, 585-596.
- Li, Q. & Joshi, H.C. (1995). γ -tubulin is a minus end-specific microtubule binding protein. *J. Cell Biol.* **131**, 207-214.
- Li, X. and Nicklas, B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* **373**, 630-632.
- Lifschytz, E. & Hareven, D. (1977). Gene expression and the control of spermatid morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **58**, 276-294.
- Lifschytz, E. & Meyer, G.F. (1977). Characterization of male meiotic-sterile mutations in *Drosophila melanogaster* The genetic control of meiotic divisions and gametogenesis. *Chromosoma* **64**, 371-392.
- Lindsley, D.L. & Tokuyasu, K.T. (1980). Spermatogenesis. In *Genetics and biology of Drosophila*. M. Ashburner and T.R. Wright, eds. (New York: Academic Press), pp. 225-294.
- Linse, K. & Mandelkow, E.M. (1988). The GTP-binding peptide of β -tubulin. Localization by direct photoaffinity labeling and comparison with nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **263**, 15205-15210
- Littauer, U.Z., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. & Ponstingl, H (1986). Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7162-7166
- Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A. & Snustad, D.P. (1994). gamma-tubulin in arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* **6**, 303-314

- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., & Sunkel, C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Gene & Dev.* **5**, 2153-2165.
- Lombillo, V.A., Nislow, C., Yen, T.J., Gelfand, V.I., & McIntosh, J.R. (1995). Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro. *J. Cell Biol.* **128**, 107-115.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. & Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-1122
- Lopez, I., Khan, S., Sevik, M. Cande, W.Z & Hussey, P.J. (1995). Isolation of a full-length cDNA encoding *Zea mays* gamma-tubulin. *Plant. Physiol.* **107**, 309-310
- Luo, H. & Perlin, M. (1993). The g-tubulin-encoding gene from the basidiomycete fungus, *Ustilago violacea*, has a long 5'-untranslated region. *Gene* **137**, 187-194.
- MacRae, T.H. & Langdon, C.M. (1989). Tubulin synthesis, structure, and function: what are the relationships? *Biochem. Cell Biol.* **67**, 770-790.
- Maessen, S., Wessling, J.G., Smits, M.A., Konings, R.N.H., & Schoenmakers, J.G.G. (1993). The g-tubulin gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 27-36.
- Maldonado-Codina, G. & Glover, D. M. (1992). Cyclins A and B associate with chromatin and the polar regions of spindles, respectively, and do not undergo complete degradation at anaphase in syncytial *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* **116**, 967-976
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E-M. (1991). Microtubules dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**, 977-991.
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E-M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 72-81.
- Maniotis, A. & Schiliwa, M. (1991). Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell* **67**, 495-504.
- Marchesi, V.T. & Ngo, N. (1995). In vitro assembly of multiprotein complexes containing α , β , and γ tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3028-3032.
- Marschall, L., Jeng, R., Mulholland, J., & Stearn, T. (1996). Analysis of Tub4p, a yeast g-tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function. *J. Cell Biol.* **134**, 443-454.
- Martin M.A., Osmani S.A. & Oakley B.R. (1997). The role of gamma-tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **110**, 623-633
- Masui, Y. & Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129-145
- Masuda, H. & Shibata, T. (1996). Role of g-tubulin in mitosis-specific microtubule nucleation from the *Schizosaccharomyces pombe* spindle pole body. *J. Cell Sci.* **109**, 165-177.
- Masuda, H., Sevik, M., & Cande, W.Z. (1992). In vitro microtubule-nucleating activity of spindle pole bodies in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: cell cycle-dependent activation in *Xenopus* cell-free extracts. *J. Cell Biol.* **117**, 1055-1066.

- Matthies, H., McDonald, H., Goldstein, L.S. & Theurkauf, W.E. (1996). Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein. *J. Cell Biol.* **134**, 455-464.
- May, G.S. (1989). The highly divergent b-tubulins of *Aspergillus nidulans* are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* **109**, 2267-2274
- McGowan, C.H. & Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12**, 75-85
- McGowan, C.H. & Russell, P. (1995). Cell cycle regulation of human Wee1. *EMBO J.* **14**, 2166-2175
- McIntosh, J.R. (1983). The centrosome as an organizer of the cytoskeleton. *Mod. Cell Biol.* **2**, 115-142.
- McIntosh, J.R. & Koonce, M.P. (1989). Mitosis. *Science*, **246**: 622-628
- McIntosh, J.R. & Hering, G.E. (1991). Spindle fiber action and chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 403-426.
- McNally, F.J. (1996). Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 23-29
- McNally, F.J., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Vale, R.D. (1996). Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes. *J. Cell Sci.* **109**, 561-567.
- Meda, P. Chvrier, V., Edde, B & Job, D. (1997). Demonstration and analysis of tubulin binding sites on centrosomes. *Biochemistry* **36**, 2550-2558
- Melki, R., Vainberg, I.E., Chow, R.L. & Cowan, N.J. (1993). Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and g-tubulina. *J. Cell Biol.* **122**, 1301-1310
- Merdes, A. & Cleveland, D.W. (1997). Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J. Cell Biol.* **138**, 953-956
- Middleton, K. & Carbon, J. (1994). KAR3 kinesin is a minus-end-directed motor that functions with centromere binding proteins (CBF3) on an *in vitro* yeast kinetochore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7212-7216
- Millar, J.B., Lenaers, G. & Russell, P. (1992). Pyp3 PtPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J.* **11**, 4933-4941
- Millar, J.B., McGowan, C.H., Lenaers, G., Jones, R. & Russell, P. (1993). p80^{cdc25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{cdc2} kinase in fission yeast. *EMBO J.* **10**, 4301-4309
- Minshull, J., Straight, A., Rudner, A.D., Dernburg, A.F., Belmont, A., & Murray, A.W. (1996). Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast. *Curr. Biol.* **6**, 1609-1620.
- Misra, S. & Rio, D.C. (1990). Cytotype control of *Drosophila* P element transposition: The 66 kd protein is a repressor of transposase activity. *Cell* **62**, 269-284
- Mitchison, T.J. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* **119**, 637-652
- Mitchison, T.J. (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044-1047

- Mitchison, T.J. & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242
- Mitchison, T. & Salmon, E.D. (1992). Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J. Cell Biol.* **119**, 569-582.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Fung, J.C., Sedat, J.W., Alberts, B.M., & Agard, D.A. (1995). Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* **130**, 1149-1159.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B.M., & Agard, D.A. (1995). Microtubule nucleation by g-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* **378**, 638-640.
- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M., & Bornens, M. (1996). g-tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell Sci.* **109**, 875-887.
- Moutinho dos Santos, T. (1995) Relatório de estágio da licenciatura em bioquímica. Universidade do Porto
- Mueller, P.R., Coloman, T.R., Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90
- Muresan, V., Joshi, H.C., & Besharse, J.C. (1993). g-tubulin in differentiated cell types: localization in vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia. *J. Cell Sci.* **104**, 1229-1237.
- Murphy, S. & Stearns, T. (1996). Cytoskeleton: Microtubule nucleation takes shape. *Curr. Biol.* **6**, 642-644.
- Murray, A.W. (1994). Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 872-876.
- Murray, A.W. & Hunt, T. (1993). *The cell cycle: An introduction*. 1° ed W.H. Freeman and Company, New York
- Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-280
- Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1989). Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* **246**, 614-621
- Murray, A.W., Solomon, M.J. & Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-286
- Muzi-Falconi, M., Brown, G.W. & Kelly, T.J. (1996) Cdc18(+) regulates initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1566-1570
- Nicklas, B., Ward, S.C., and Gorbsky, G.J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J. Cell Biol.* **130**, 929-939.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471-480
- Nigg, E.A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA and cell cycle control?. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 312-317
- Nislow, C., Lombillo, V.A., Kuriyama, R. & McIntosh, J.R. (1992). A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules *in Vitro* localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature* **359**, 543-547
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**, 547-551
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547-550

- Nurse, P. & Bissett, Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**, 558-60
- Oakley, B.R. (1992). g-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* **2**, 1-5.
- Oakley, B.R. (1995). A nice ring to the centrosome. *Nature* **378**, 555-556
- Oakley, B.R. & Morris, N.R. (1981). A beta-tubulin mutation that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* **24**, 837-845
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., & Jung, M.K. (1990). g-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**, 1289-1301.
- Oakley, C.E. & Oakley, B.R. (1989). Identification of g-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664.
- Oegeme, K., Whitfield, W.G., & Alberts, B.M. (1995). The cell cycle-dependent localization of the CP190 centrosomal protein is determined by the coordinate action of two separable domains. *J. Cell Biol.* **131**, 1261-1373.
- O'Hare, K. and 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.
- Ohta, K., Shiina, N., Okumura, E., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Endo, S., Gotoh, Y., Nishida, E., & Sakai, H. (1993). Microtubule nucleating activity of centrosomes in cell-free extracts from *Xenopus* eggs: involvement of phosphorylation and accumulation of pericentriolar material. *J. Cell Sci.* **104**, 125-137.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J.C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T.J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K. & Kishimoto, T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **128**, 849-862
- O'Tool, E.T., Mastronarde, D.N., Giddings, T.H., Winey, M., Bruke, D.J. & McIntosh, J.R. (1997). Three-dimensional analysis and ultrastructural design of mitotic spindles from the *cdc20* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1-11
- Palacios, M.J., Joshi, H.C., Simerly, C., & Schatten, G. (1993). g-tubulin reorganization during mouse fertilization and early development. *J. Cell Sci.* **104**, 383-389.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J.L., & Bornens, M. (1996). Most of centrin in animals cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* **109**, 3089-3102.
- Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608
- Piatti S., Bohm T., Cocker J.H., Diffley J.F. & Nasmyth K (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev* **10**, 1516-1531
- Piperno, G., Ledizet, M. & Chang, X.J. (1987). Microtubules containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* **104**, 289-302
- Pisano, C., Bonaccorsi, S., & Gatti, M. (1995). The kl-3 loop of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* binds a tektin-like protein. *Genetics* **133**, 569-579.

- Pluta, A.F., Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Goldberg, I.G., & Earnshaw, W.C. (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* **270**, 1591-1600.
- Poon, R.Y. & Hunter, T. (1995). Desphosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-93
- Raff, E.C. (1984). Genetics of microtubule systems. *J. Cell Biol.* **99**, 1-10
- Raff, E.C., Fackenthal, J.D., Hutchens, J.A., Hoyle, H.D. & Turner, F.R. (1997). Microtubule architecture specified by a β -tubulin isoform. *Science* **275**, 70-73
- Raff, J.W., Kellogg, D.R., & Alberts, B.M. (1993). *Drosophila* γ -tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *J. Cell Biol.* **121**, 823-835.
- Rattner, J.B. & Lin, C.C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosome. *Cell* **42**, 291-296
- Reed, S.I. (1980). Selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics* **95**, 561-577
- Reed, S.I. (1991). G1-specific cyclins: in search of an S-phase-promoting factor. *Tren. Genet.* **7**, 95-99
- Reed, S.I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D. & Slingerland, J. (1994). G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci. Supp.* **18**, 69-73
- Reed, S.I. & Wittenberg, C. (1990). Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5697-5701
- Rieder, C.L. & Borisy, G.G. (1982). The centrosome cycle in PtK2 cells: asymmetric distribution and structural changes in the pericentriolar material. *Biol. Cell* **44**, 117-132
- Rieder, C.L., Alexander, S.P., & Rupp, G. (1990). Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* **110**, 81-95.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and 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. & Salomon, E.D. (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **124**, 223-333
- Rimmington, G., Dalby, B., and Glover, D.M. (1994). Expression of N-terminally truncated cyclin B in the *Drosophila* larval brain leads to mitotic delay at late anaphase. *J. Cell Sci.* **107**, 2729-2738.
- Ripoll, P., Casal, J., & Gonzalez, C. (1987). Towards the genetic dissection of mitosis in *Drosophila*. *BioEssays* **7**, 204-210.
- Ripoll, P., Pimpinelli, S., Valdivia, M.M., & Avila, J. (1985). A cell division mutant of *Drosophila* with a functionally abnormal spindle. *Cell* **41**, 907-912.
- Rizzolo, L.J. & Joshi, H.C. (1993). Apical orientation of the microtubule organizing center and associated γ -tubulin during the polarization of the retinal pigment epithelium in vivo. *Dev. Biol.* **157**, 147-156.
- Rose, M.D., Biggins, S. & Satterwhite, L.L. (1993). Unravelling the tangled web at the microtubule-organizing center. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 105-115.

- Rubin, G. M. & Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353
- Russell, P. & Nurse, P. (1986). *cdc25⁺* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153
- Russell, P. & Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1⁺*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **64**, 145-153
- Salisbury, J.L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 39-45.
- Sambrook, J., Frits, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Santamaria, P. (1986). Injecting eggs. Em: Roberts, D.B. (ed.) *Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Oxford
- Saunders, W.S. (1993). Mitotic spindle pole separation. *Trends Cell Biol.* **3**, 432-437.
- Saunders, W.S. & Hoyt, M.A. (1992). Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* **70**, 451-458
- Saxton, W.M., Stemple, D.L., Leslie, R.J., Salomon, E.D., Zavortink, M. & McIntosh R.J. (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* **99**, 2175-2186
- Schatz, P.J., Solomon, F. & Botstein, D. (1986). Genetically essential and nonessential α -tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3722-3733
- Schejter, E.D. & Wieschaus, E. (1993). Functional elements of the cytoskeleton in the early *Drosophila* embryo. *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**, 67-99.
- Schoenfeld, T.A. & Obar, R.A. (1994). Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **151**, 67-137
- Schroer, T.A. (1994). Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 69-73.
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M.D. & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{sic} controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**, 233-244
- Sciebel, E. & Bornens, M. (1995). In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol.* **5**, 197-200.
- Scott, V., Sherwin, T., & Gull, K. (1997). γ -tubulin in trypanosomes: molecular characterization and localisation to multiple and diverse microtubule organizing centres. *J. Cell Sci.* **110**, 157-168.
- Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H. & Gelbart, W.M. (1995) Genetic characterization and cloning of *Mothres against dpp*, a gene required for *decapentaplegic* function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1347-1358
- Sentry, J.W. and Kaiser, K. (1992). P element transposition and targeted manipulation of the *Drosophila* genome. *Trend. Genetics* **8**, 329-331.
- 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

- Shu, H. & Joshi, H.C. (1995). g-tubulin can both nucleate microtubule assembly and self-assemble into novel tubular structures in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **130**, 1137-1147.
- Shu, H., Li, Z., Palacios, M.J., Li, Q., & Joshi, H.C. (1995). A transient association of g-tubulin at the midbody is required for the completion of cytokinesis during the mammalian cell division. *J. Cell Sci.* **108**, 2955-2962.
- Sigrist, S., Jacobs, H., Stratmann, R., and Lehner, C.F. (1995). Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *EMBO J.* **14**, 4827-4838.
- Skibbens, R., Rieder, C.L., & Salmon, E.D. (1995). Kinetochore motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochore directional instability and position is regulated by tension. *J. Cell Sci.* **108**, 2537-25
- Skoufias, D.A. & Scholey, J.M. (1993). Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 95-104.
- Sluder, G., Miller, F.J., Cole, R. & Rieder, C.L. (1990). Protein synthesis and the cell cycle: centrosome reproduction in sea urchin eggs is not under translational control. *J. Cell Biol.* **110**, 2025-2032
- Snyder, M. (1994). The spindle pole body of yeast. *Chromosoma* **103**, 369-380.
- Snyder, M. & McIntosh, J.R. (1975). Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells. *J. Cell Biol.* **67**, 744-760
- Sobel, S.G. & Snyder, M. (1995). A highly divergent g-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **131**, 1775-1788.
- Solomon, M.J., Lee, T. & Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: Identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell* **3**, 13-27
- Sosa, H. & Milligan, R.A. (1996). Three-dimensional structure of ncd-decorated microtubules obtained by a back projection method. *J. Mol. Biol.* **260**, 743-755
- Spang, A., Geissler, S., Grein, K., & Schiebel, E. (1996). g-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *J. Cell Biol.* **134**, 429-441.
- Sparks, C.A., Fey, E.G., Vidair, C.A., & Doxsey, S.J. (1995). Phosphorylation of NUMA occurs during nuclear breakdown and not mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* **108**, 3389-3396.
- Spradling, A.C. (1986). P element-mediated transformatio. Em: Roberts, D.B. (ed.) *Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Oxford
- Spradling, A. C. & Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-47
- Stanley, H., Bowman, J., Romrell, L., Reed, S. & Wilkinson, R. (1972) Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruc. Res.* **41**, 433-466
- Stearns, T. & Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of g-tubulin. *Cell* **76**, 623-637.
- Stearns, T., Evans, L., & Kirschner, M. (1991). g-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**, 825-836.

- Steller, H. & Pirrotta, V. (1985) A transposable P vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* larvae. *EMBO J.*, **1**, 167-171
- Sternlicht, H., Farr, G.W., Sternlicht, M.L., Driscoli, J.K., Willison, K. & Yaffe, M.B. (1993). The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9422-9426
- Stillman, B. (1996). Cell cycle control of DNA replication. *Science* **274**, 1659-1664
- Stratmann, R. & Lehner, C.F. (1996). Separation of sister Chromatids in mitosis requires the *Drosophila* pimples product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* **84**, 25-35.
- Sudakin, V., *et al.*, (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Cell Biol.* **15**, 185-197
- Sullivan, K.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 687-716.
- Sunkel, C.E. & Coelho, P.A. (1995). The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 756-767.
- Sunkel, C.E. & Glover, D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* **89**, 25-38.
- Sunkel, C.E., Gomes, R., Sampaio, P., Perdigão, J., & Gonzalez, C. (1995). g-tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblasts. *EMBO J.* **14**, 28-36.
- Surana *et al.*, (1993). Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* **12**, 1969-1978
- Szöllösi, D., Calarco, P. & Donahue, R.P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **11**, 521-541
- Tang, Z., Coleman, T.R. & Dunphy, W.G. (1993). Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *EMBO J.* **12**, 3427-3436
- Tang, K.T., Tang, C.C., Chen, Y., & Wu, C. (1993). Nuclear proteins of the bovine esophageal epithelium: II. The NuMA gene gives rise to multiple mRNAs and products reactive with monoclonal antibody W1. *J. Cell Sci.* **104**, 249-260.
- Tates, A. D. (1971). Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, Dept. of Radiation Genetics, Transitorium voor Geneeskunde. Leiden, Netherlands
- Tavosanis G., Llamazares S., Goulielmos G. & Gonzalez C. (1997) Essential role for gamma-tubulin in the acentriolar female meiotic spindle of *Drosophila*. *EMBO J.* **16**, 1809-1819
- Theurkauf, W.E. & Hawley, R.S. (1992). Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J. Cell Biol.* **116**, 1167-1180.
- Thompson, W.C. (1982). The cyclic tyrosination/detyrosination of alpha tubulin. *Methods Cell Biol.* **24**, 235-255
- Thuret, J-Y., Valay, J-G., Faye, G. & Mann, C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* **86**, 565-576
- Tokuyasu, K.T. (1974a). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.* **84**, 239-350.

- Tokuyasu, K.T. (1974b). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.* **48**, 284-303.
- Tokuyasu, K.T. (1975). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* V. Head-tail alignment. *J. Ultrastruct. Res.* **50**, 117-129.
- Tousson, A., Zeng, C., Brinkley, B.R., & Valdivia, M.M. (1991). Centrophilin: a novel mitotic spindle protein involved in microtubule nucleation. *J. Cell Biol.* **112**, 427-440.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354
- Tran, P.T., Walker, R.A. & Salomon, E.D. (1997). A metastable intermediate state of microtubule dynamics instability that differs significantly between plus and minus ends. *J. Cell Biol.* **13**, 105-117
- Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W. & Hieter, P. (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* **81**, 261-268
- Vaisberg, E.A., Koonce, M.P. & McIntosh, J.R. (1993). Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *J. Cell Biol.* **123**, 849-858
- Vale, R.D. (1990). Microtubule-based motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 15-22.
- Vallen, E.A., Scherson, T.Y., Roberts, T., Zee, K., & Rose, M.D. (1992). Asymmetric mitotic segregation of the yeast spindle pole body. *Cell* **69**, 505-515.
- Vandré, D.D., Davis, F.M., Rao, P.N. & Borisy, G.G. (1986). Distribution of cytoskeletal proteins sharing a conserved phosphorylated epitope. *Eur. J. Cell Biol.* **41**, 72-81
- Vandré, D.D. & Borisy, G.G. (1989). Anaphase onset and desphosphorylation of mitotic phosphoproteins occur concomitantly. *J. Cell Sci.* **94**, 245-258.
- Vashishtha, M., Walther, Z., & Hall, J.L. (1996). The kinesin-homologous protein encoded by the *Chlamydomonas* FLA10 gene is associated with basal bodies and centrioles. *J. Cell Sci.* **109**, 541-549.
- Vasquez, R.J., Gard, D.L. & 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
- Vassilev, A., Kimble, M., Silflow, C.D., LaVoie, M., & Kuriyama, R. (1995). Identification of intrinsic dimer and overexpressed monomeric forms of γ -tubulin in Sf9 cell infected with baculovirus containing the *Chlamydomonas* γ -tubulin sequence. *J. Cell Sci.* **108**, 1083-1092.
- Verde, F., Labbé, J. Dorée, M. & Karsenti, E. (1990). Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* **343**, 233-238
- Verma, R.M., Feldman, R. & Deshaies, R.J. (1997). SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1427-1437
- Vernos, I., Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E., & Wylie, C. (1995). Xkpl1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell* **81**, 117-127.
- Wade, R.H. & Chrétien, D. (1993). Cryoelectron microscopy of microtubules. *J. Struct. Biol.* **110**, 1-27.
- Wade, R.H., Horowitz, R. & Milligan, R.A. (1995). Toward understanding the structure and interactions of microtubules and motor proteins. *Proteins* **23**, 502-509

- Wade, R.H. & Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 12-17.
- Wadsworth, P. (1993). Mitosis: spindle assembly and chromosome motion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 123-128.
- Walczak, C., Mitchison, T.J., & Desai, A. (1996). XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* **84**, 37-47.
- Wang, S. & Adler, R. (1995). Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *J. Cell Biol.* **128**, 761-768.
- Waters, J.C., Cole, R.W., & Reider, C.L. (1993) The force producing mechanism for centrosome separation in vertebrate cell is intrinsic to each aster. *J. Cell Biol.* **122**, 361-372
- Waters, J.C. & Salmon, E.D. (1997). Pathways of spindle assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 37-43.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. & Weiner, A.M. (1988). Molecular biology of the gene. 4^a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, California.
- Weil, C.F., Oakley, C.E., & Oakley, B.R. (1986). Isolation of mip (microtubule-interacting protein) mutations of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **6**, 2963-2968.
- Whitfield, W.G., Millar, S.E., Saumweber, H., Frach, M. & Glover, D.M. (1988). Cloning of a gene encoding an antigen associated with the centrosome in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **89**, 467-480
- Whitfield, W.G., Chaplin, M.A., Oegema, K., Parry, H., & Glover, D.M. (1995). The 190 kDa centrosome-associated protein of *Drosophila melanogaster* contains four zinc finger motifs and specific sites on polytene chromosomes. *J. Cell Sci.* **108**, 3377-3387.
- Wilson, P.G. & Borisy, G.G. (1997). Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *BioEssays* **19**, 451-454
- Wilson, P.G., Fuller, M.T., and Borisy, G.G. (1997). Monoastral bipolar spindles: implications for dynamic centrosome organization. *J. Cell Sci.* **110**, 451-464.
- Wilson, P. G., Zheng, Y., Oakley, E. & Oakley, B. (1992) Differential expression and behavior of two gamma tubulin isoforms in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* **4**, 2012 abstract 346a
- Wilson, P.G., Zheng, Y., Oakley, C.E., Oakley, B.R., Borisy, G.G. & Fuller, M.T. (1997) Differential expression of two g-tubulin isoforms during gametogenesis and development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **184**, 207-221
- Winey, M. & Byers, B. (1993). Assembly and functions of the spindle pole body in budding yeast. *Trend. Genetics* **9**, 300-304.
- Wise, D. & Oakley, B.R. (1995). Identification of a second gamma-tubulin gene in *Homo Sapiens*. *Mol. Biol. Cell* **6**, 225 abstract 39a
- Wolf, K.W. & Joshi, H.C. (1995). Microtubule organization and the distribution of g-tubulin in spermatogenesis of a beetle, *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae, Coleoptera, Insecta). *J. Cell Sci.* **108**, 3855-3865.
- Wolf, K.W. & Joshi, H.C. (1996). Microtubule organization and distribution of gamma-tubulin in male meiosis of lepidoptera. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 547-559
- Wordeman, L. & Mitchison, T.J. (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* **128**, 95-105
- Wordeman, L., Steuer, E.R., Sheet, M.P. & Mitchison, T. (1991). Chemical subdomains within the kinetochore domain of isolated CHO mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* **114**, 285-294

- Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwih, A.L., Sternlich, M.L. & Sternlich, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* **358**, 248-248
- Yamamoto, A., Guacci, A. & Koshland, D. (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* **133**, 99-110
- Yang, C.H. & Snyder, M. (1992). The nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1259-1267.
- Yen, T.J., Gay, D.A. Pachter, J.S. & Cleveland, D.W. (1988a). Autoregulated changes in stability of polyribosome-bound b-tubulin mRNAs are specified by the first 13 translated nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1224-1235
- Yen, T.J., Machlin, P.S. & Cleveland, D.W. (1988b). Autoregulated instability b-tubulin mRNA's by recognition of the nascent amino terminus of b-tubulin. *Nature* **334**, 580-585
- Yen, T.J., Li, G., Schaar, B.T., Szilak, I., & Cleveland, D.W. (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* **359**, 536-539.
- Yen, T.J. & Schaar, B.T. (1996). Kinetochore function: molecular motors, switches and gates. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 381-388
- Zheng, Y., Jung, M.K., & Oakley, B.R. (1991). g-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* **65**, 817-823.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B.M., & Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a g-tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583.
-