

Maria do Carmo Pinto Basto Avides Moreira

**ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS
CROMOSSOMAS DE *Drosophila melanogaster***

**UNIVERSIDADE DO PORTO
1994**

Maria do Carmo Pinto Basto Avides Moreira

**ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS
CROMOSSOMAS DE *Drosophila melanogaster***

UNIVERSIDADE DO PORTO

1994

Maria do Carmo Pinto Basto Avides Moreira

**ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS CROMOSSOMAS
DE *Drosophila melanogaster***

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

PORTO
1994



6653

DECLARAÇÃO

De acordo com o disposto no nº2 do Artº 8º do Decreto-Lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados da publicação abaixo indicada. 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 do manuscrito enviado para publicação, sob o nome de Maria do Carmo Avides.

Avides, M. C., and C. E. Sunkel. 1994. "Isolation of chromosome-associated proteins from *Drosophila melanogaster* that bind a human centromere DNA sequence." *J. Cell Biol.* 127, *In Press.*

**Este trabalho é dedicado
à minha mãe, Helena,
e ao meu pai, Miguel,
por tudo, e com muito amor.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com um enorme prazer porque eu realmente gosto do trabalho de investigação em Biologia Molecular. Este gosto nasceu comigo, mas foi alimentado por leituras diversas e pelo contacto com algumas pessoas que contribuíram para a minha formação científica, especialmente o Professor Doutor Pedro Moradas Ferreira, a Professora Doutora Maria João Mascarenhas Saraiva, a Doutora Leonor Teles Grilo, e a Professora Doutora Claudina Rodrigues Pousada. Além destes, as discussões com o Paulo Magalhães e com o Álvaro Tavares corrigiram muitos dos meus erros de raciocínio e contribuíram imenso para o desenvolvimento do meu espírito científico.

O projecto em que trabalhei é um projecto do Doutor Claudio Sunkel, meu orientador de Doutoramento, a quem agradeço a oportunidade que me deu de trabalhar no seu laboratório, os meios que pôs á minha disposição, e o apoio que me forneceu.

A Joana Perdigão trabalhou comigo nos últimos tempos que passei no laboratório. Juntas fizemos uma pesquisa de bibliotecas de expressão com o soro Rb5.3, que irá ser por ela continuada. Além de prezar imenso a sua opinião científica, gostei muitissimo de trabalhar em conjunto com a Joana.

Agradeço ainda ás seguintes pessoas:

-ao Álvaro Tavares (uma vez mais), porque me ajudou na execução deste projecto, ensinou-me muitas coisas, e fez-me rir e sorrir.

-à Alexandra Moreira por ser uma simpatia e por me ter ensinado a técnica de microinjecção em embriões de *Drosophila*.

-à Elsa Bronze da Rocha, ao Jorge Pedrosa e ao José Catita que me ajudaram (muito, muito) a produzir os anticorpos policlonais em coelho. Também agradeço à Elsa as células Hep2.

-à Paula Coelho, com quem trabalhei inicialmente neste projecto, e que muito me aturou.

-à Paula Sampaio, pela sua amizade.

-ao Orlando Morais, à Inês Chaves, à Elsa Logarinho e à Xana (Alexandra Teixeira), por serem umas pessoas espantosas, com quem é óptimo trabalhar e conversar.

-ao Professor Roberto Salema, que pôs à minha disposição equipamento necessário para realizar o trabalho fotográfico reproduzido nesta tese.

-ao Dr William C. Earnshaw, que nos cedeu os anticorpos anti-CENP-B, e ao Dr Tunedo Okazaki, pela dádiva do plasmídeo p α (4-1).

-ao Dr António Campos e às suas colaboradoras, e ao Dr António Sequeira Campos, sem o apoio dos quais não teria sido possível escrever esta tese.

-à minha avó Clotilde, aos meus irmãos Miguel e Cristina, ao meu cunhado João Paulo, à Fátima Magalhães, a todos os meus tios e tias, aos meus primos, e ao Padre António Marim; que estiveram comigo nos momentos mais difíceis.

Durante o período de tempo em que realizei este trabalho fui bolsista de Doutoramento do Programa Ciência da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), a quem agradeço todo o apoio que me concedeu. Também estou grata à JNICT e à Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (FLAD) por terem financiado a minha participação em congressos científicos realizados no estrangeiro.

ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
bp	pares de bases
Br-UTP	trifosfato de bromouridina
BSA	albumina bovina do soro
cDNA	DNA complementar
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	trifosfato de desoxicitosina
ddH ₂ O	água destilada e desionizada
dGTP	trifosfato de desoxiguanosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	trifosfato de desoxirribonucleósido
DTT	ditiotreitól
dTTP	trifosfato de timidina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Hepes	ácido N-(2-hidroxietilpiperazina)-N'-(2-etanossulfónico)
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
kDa	kilodalton

mRNA	RNA mensageiro
MW	peso molecular
NOR	organizador nucleolar
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RNA	ácido ribonucleico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
snRNP	ribonucleoproteína pequena e nuclear
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TBE	tampão tris-borato-EDTA
tRNA	RNA de transferência
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

ÍNDICE

RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
RÉSUMÉ.....	5
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	7
I.1 - O desenvolvimento embrionário em <i>Drosophila melanogaster</i>	8
I.2 - Os cromossomas de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
I.3 - A cromatina.....	11
I.4 - Proteínas da cromatina.....	20
I.4.1 - As histonas e a estrutura da cromatina.....	20
I.4.2 - As HMGs.....	25
I.4.3 - Proteínas envolvidas na variação do efeito de posição (PEV).....	27
I.5 - Proteínas da matriz nuclear.....	35
I.6 - Ordem no núcleo: domínios nucleares e posição dos cromossomas.....	41
I.7 - Os centrómeros: domínios especializados dos cromossomas metafásicos.....	44
I.8 - A estrutura dos centrómeros: um modelo.....	56
I.9 - Razões para a pesquisa de homólogos funcionais de CENP-B em <i>Drosophila melanogaster</i>	59
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
II.1 - Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> e linhas celulares.....	62
II.2 - Congelação e descongelação das linhas celulares.....	62
II.3 - Transformações de células com plasmídeos.....	63
II.4 - Preparações de plasmídeos.....	63

II.5 - Doseamento de DNA, de proteínas, e contagem de radioactividade.	64
II.6 - Cortes de moléculas de DNA com enzimas de restrição e ligações de fragmentos de DNA.....	64
II.7 - Recuperação de fragmentos de DNA de geis de agarose e de poliacrilamida.....	64
II.8 - Geis de agarose e de poliacrilamida.....	65
II.9 - Marcação radioactiva de DNA por preenchimento de extremidades com Klenow.....	66
II.10 - Marcação radioactiva de oligonucleótidos por fosforilação das extremidades.....	66
II.11 - Plasmídeos e sondas.....	67
II.12 - Construção da coluna de afinidade CENP-B box-Sepharose.....	68
II.13 - Extracção de proteínas nucleares de células Kc e Hep2.....	70
II.14 - Purificação das proteínas.....	72
II.15 - "Western blots" e tratamento com fosfatase.....	73
II.16 - Obtenção de anticorpos policlonais e imunopurificação.....	74
II.17 - Ensaio de retardação em gel.....	74
II.18 - Ensaio de protecção à digestão por DNaseI.....	76
II.19 - Ligação covalente das proteínas a fluoresceína.....	77
II.20 - Microinjecção em embriões de <i>Drosophila</i>	78
II.21 - Preparação dos embriões para marcação com anticorpos.....	79
II.22 - Marcação dos embriões com anticorpos.....	80
II.23 - Preparação de cérebros esmagados e marcação com anticorpos.....	81
CAPÍTULO III - RESULTADOS	82
III.1 - Identificação e purificação de proteínas de <i>Drosophila</i> que	

reconhecem DNA do centrômero humano.....	83
III.2 - Caracterização das proteínas purificadas	96
III.3 - Localização das proteínas AF1.....	112
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES.....	124
CAPÍTULO V - BIBLIOGRAFIA.....	132

RESUMO

A CENP-B é uma proteína dos centrómeros humanos, essencial às funções que esta estrutura desempenha durante a mitose. Esta proteína reconhece uma sequência de DNA com 17 bp, designada CENP-B box, que existe em números variáveis no DNA centromérico dos cromossomas humanos, com a excepção do cromossoma Y. Existem homólogos da CENP-B em macaco, ratinho, e galinhas, mas até agora não foi possível encontrar CENP-B em *Drosophila melanogaster*.

Com o objectivo de isolar proteínas do centrómero de *Drosophila*, pensámos que este organismo poderia possuir proteínas funcionalmente similares à CENP-B. Com base neste raciocínio, foi usada uma sequência de DNA do centrómero humano - α 341- , e a sequência CENP-B box, para pesquisar a presença, em células Kc (uma linha celular de *Drosophila*), de actividades específicas de ligação a estas sequências de DNA. Tendo-se observado a existência de tal actividade, em extractos nucleares das referidas células, procedeu-se ao seu isolamento através de cromatografia de troca iónica em DE52, e cromatografia de afinidade em colunas CENP-B box-Sepharose.

A fracção final obtida, designada AF1, consiste predominantemente de três polipéptidos com massas moleculares aparentes em SDS-PAGE de 71, 50, e 31 kDa. Estas proteínas reconhecem a sequência CENP-B box no DNA satélite alfoide humano, e todas elas são componentes do complexo proteína/DNA visível em geis de retardação.

A fracção AF1 foi covalentemente ligada a um fluorocromo (fluoresceína) e microinjectada em embriões de *Drosophila*, tendo-se observado por microscopia confocal de laser, que as proteínas fluorescentes aparecem associadas aos cromossomas dos núcleos diploides dos embriões.

As proteínas AF1 foram usadas na produção de anticorpos policlonais em coelho, tendo sido obtido um soro designado Rb5.3. Este soro reconhece em extractos de embriões, neuroblastos, e células Kc de *Drosophila*, três polipéptidos com massas moleculares aparentes em SDS-PAGE de 71, 50, e 31 kDa; o segundo dos quais apresenta uma composição heterogénea que não parece ser devida a fosforilações diferenciais. Não se detectou nenhuma

reactividade quando foram usados extractos de células Hep2 (uma linha celular humana).

Foram imunopurificados anticorpos contra cada um dos polipéptidos. Estes, em "western blot", reconhecem apenas os polipéptidos originais, não exibindo reactividade cruzada, confirmando as suspeitas de que os polipéptidos mais pequenos não resultam da proteólise de uma proteína maior.

O soro Rb5.3 foi também usado para imunolocalização dos antigéneos em embriões de *Drosophila*. Observou-se que as proteínas aparecem associadas à cromatina durante todas as fases do ciclo celular. Em interfase os anticorpos marcam diversas regiões da cromatina, produzindo um padrão de fluorescência pontilhado. O número de pontos marcados diminui durante a profase (mas o seu diâmetro aumenta), sendo nesta altura visíveis 1-3 pontos por núcleo. Durante a metafase e anafase, as proteínas encontram-se concentradas nas zonas aonde os centrómeros dos cromossomas estão localizados, retomando a localização pontual na telofase. Imunolocalização em cromossomas metafásicos, mostrou que os antigéneos não se encontram confinados à região do centrómero, e que também se localizam nos braços dos cromossoma, embora sejam mais abundantes nas zonas ricas em heterocromatina constitutiva.

A purificação dos polipéptidos AF1 e a produção de anticorpos contra estas proteínas permitiu iniciar uma pesquisa de bibliotecas de *Drosophila melanogaster* com vista a clonar as sequências de DNA que as codificam. O isolamento dos seus genes permitirá no futuro iniciar estudos genéticos que esclareçam a função desempenhada por estas proteínas da cromatina.

SUMMARY

CENP-B is one of the proteins of the human centromere. This protein recognizes a 17bp DNA sequence (CENP-B box) present at the centromeres of the majority of human chromosomes, except in the Y chromosome. CENP-B homologues have been identified in monkey, mouse, and chicken, but not in *Drosophila melanogaster*.

Aiming to isolate proteins of the *D. melanogaster* centromere, we have developed a functional approach in order to look for possible equivalents of CENP-B in this organism. Using a human centromere DNA sequence - α 341-, and the CENP-B box sequence, we have observed that Kc (a *Drosophila melanogaster* cell line) nuclear extracts display a specific binding activity towards these sequences. This activity has been further purified by ion-exchange on DE52, and oligonucleotide-affinity chromatography.

The purified fraction, AF1, is predominantly composed of three polypeptides with apparent MW on SDS-PAGE of 71, 50, and 31 kDa. All of them are components of the protein/DNA complex visible on retardation gels. These proteins recognize the sequence CENP-B box on α 341 DNA, as shown by DNase I protection experiments.

The AF1 proteins were covalently coupled to a fluorochrome (fluorescein) and microinjected into *Drosophila* embryos. Confocal laser microscopy observation revealed that the fluorescent proteins associate with the chromossomes of the diploid embryonic nuclei.

A polyclonal sera against all three polypeptides was raised in rabbit (Rb5.3). This sera recognizes three polypeptides with MW in SDS-PAGE of 71, 50, and 31 kDa; the second of which shows heterogeneity in its composition that does not seem to result from differential phosphorylation of the same polypeptide. No reactivity was found against nuclear extracts from Hep2 cells (a human cell line).

Antibodies against p-71, p-50 and p-31 were immunopurified. In western blots these antibodies recognize only the original band and do not show cross-reactivity, indicating that the smaller polypeptides are not the result of degradation of a larger protein.

Rb5.3 was also used for immunolocalization of the antigens in *Drosophila* embryos. These proteins are chromosome-associated throughout

the cell cycle. During interphase antibodies stain the chromatin in a speckled pattern. These specks converge into 1-3 dots per nucleus by prophase. During anaphase and metaphase the proteins localize to regions which encompass the centromeres of mitotic chromosomes, resuming the dot configuration at the time of telophase.

Immunolocalization in metaphase chromosomes revealed that the antigens are not confined to the centromere region and some staining of chromosome arms is also apparent. Nevertheless there is a clear accumulation of the proteins at constitutive heterochromatic regions.

The purification of the AF1 polypeptides and the production of the polyclonal Rb5.3 sera has allowed us to initiate a screen in some *Drosophila melanogaster* libraries. Cloning of its genes will open way to genetic analysis that will help in the future to understand the function displayed by these chromosomal proteins.

RÉSUMÉ

CENP-B est une protéine de 80 kDa détectée dans la région centromérique des chromosomes humains. Cette protéine se lie à une séquence nucléotidique de 17bp, appelée "CENP-B box", du DNA centromérique. Il semble que CENP-B joue un rôle important au moment de la mitose. La protéine a été décrite chez le singe, le rat et le poulet; mais pas encore chez *Drosophila melanogaster*.

Afin d'isoler protéines du centromère des chromosomes de *Drosophila melanogaster*, nous avons utilisé la capacité de liaison à la séquence CENP-B box, pour pesquiser la présence de homologues de CENP-B dans cet organisme. On a utilisé une séquence du DNA α -satellite humain (α 341), et un oligonucléotide de la séquence CENP-B box. L'activité spécifique de liaison à ces séquences a été étudiée à partir d'extraits nucléaires de cellules Kc de *Drosophila*. Cette activité a été purifiée par chromatographie par échange d'ions (DE52), et d'affinité sur colonnes de CENP-B box-Sepharose

La fraction obtenue, nommée AF1, consiste essentiellement en trois polypeptides de poids moléculaire apparent sur SDS-PAGE de 71, 50 et 31 kDa. Ces protéines reconnaissent la séquence CENP-B box dans le DNA α 341, et tous les trois existent dans le complexe protéine/DNA analysé par le test de retardement sur gel.

La fraction AF1 a été liée de façon covalente à un fluorochrome (fluorescéine) et microinjectée à des embryons de *Drosophila*. L'observation en microscopie confocal a révélé que les protéines fluorescentes s'associent aux chromosomes des noyaux diploïdes des embryons.

Les protéines AF1 ont été utilisées pour produire des anticorps polyclonaux chez le lapin. Par "western blot", le sérum obtenu (nommé Rb5.3) reconnaît les trois protéines dans des extraits d'embryons, de cellules du cerveau, et de cellules Kc. La bande de 50 kDa est parfois hétérogène; cette hétérogénéité ne serait pas le résultat de phosphorylations. On n'a pas détecté aucune réactivité avec des protéines de cellules humaines Hep2.

On a immunopurifié les anticorps contre p-71, p-50, et p-31. Ces anticorps ne montrent pas de réactions croisées, suggérant que les polypeptides ne dérivent pas d'une protéolyse d'un précurseur plus grand.

Le sérum Rb5.3 a aussi été utilisé pour l'immunolocalisation des antigènes sur les embryons de *Drosophila*. On a observé que les protéines s'associent à la chromatine pendant toutes les phases du cycle cellulaire. En interphase les anticorps marquent la chromatine de façon punctiforme. Pendant la prophase ce marquage semble converger en 1-3 points plus grands per noyau. L'immunolocalisation sur les chromosomes métaphasiques a révélé que les protéines ne sont pas localisées exclusivement dans les centromères, mais on les trouve aussi dans les bras des chromosomes, même si elles sont particulièrement concentrées dans les régions d'hétérochromatine constitutive.

La purification des polypeptides AF1 et la production d'anticorps correspondants vont nous permettre d'identifier les séquences de DNA qui codifient pour les trois protéines et de procéder à une analyse fonctionnelle et génétique.

I. INTRODUÇÃO

I.1. O desenvolvimento embrionário em *Drosophila melanogaster*

As características que fazem com que *Drosophila melanogaster* seja um sistema biológico ideal para o estudo do ciclo celular devem-se a particularidades do seu desenvolvimento. Na oógenese, as divisões celulares no germário do ovário produzem um cisto composto por 16 células (Mahowald e Kambyzellis, 1980). Uma destas células diferencia-se em oócito, iniciando a meiose, enquanto que as restantes 15 células se diferenciam em células companheiras poliplóides. Quando o oócito atinge o estado de maturação plena, o seu núcleo fica bloqueado na metafase da primeira divisão meiótica, formando o corpo polar, e o prosseguimento da meiose é desencadeado à medida que o oócito percorre o oviducto.

Durante a oógenese o oócito acumula grandes quantidades de proteínas e mRNAs, produzidos pelas células companheiras circundantes. Estes produtos irão ser usados após a fertilização, durante as primeiras horas da embriogénese, não sendo requerida a transcrição da maioria dos genes zigóticos até ao 14º ciclo de divisão mitótica (Foe e Alberts, 1983).

Durante as duas primeiras horas de desenvolvimento, o embrião de *Drosophila* é um sincício, devido à acumulação de alguns milhares de núcleos num citoplasma comum. Estes núcleos, resultam de 13 divisões mitóticas que ocorrem sincronizadamente, com a duração aproximada de 8-10 min cada (fig I.1). Estas divisões, consistem unicamente de uma sucessão de fases S (síntese) e M (mitose), não se observando a ocorrência das fases G1 e G2 nos sincícios (Foe e Alberts, 1983). No início das divisões mitóticas do embrião, os núcleos situam-se no interior do sincício, mas por volta do ciclo 8, a maioria começa a migrar para a superfície do ovo (córtex), deixando para trás um pequeno número de núcleos que permanecem no interior do embrião

e que irão ser poliploides (Foe e Alberts, 1985). Os primeiros núcleos a atingirem o córtex durante o ciclo 9, localizam-se no polo posterior do embrião e vão formar as células polares, precursoras da linha germinal. Os restantes núcleos à superfície do sincício sofrem mais 4 divisões mitóticas (ciclos 10-13), até serem individualizados em células (blastoderme) durante o início da interfase do ciclo 14. Este ciclo de divisão difere dos anteriores por possuir uma fase G2 nítida, e as células formadas durante o ciclo 14 englobam todos os progenitores dos tecidos somáticos do organismo. A partir daí, as mitoses já não ocorrem de forma sincronizada ao longo de todo o embrião, mas sim em 27 domínios regulados de forma temporalmente distinta (Foe, 1989). No decurso do restante desenvolvimento ocorrem mais 3-4 divisões celulares (Campos-Ortega e Hartenstein, 1985). É introduzida uma fase G1 no ciclo 17 e em todas as divisões seguintes das células das larvas e das pupas. Enquanto que as células que vão dar origem ao organismo adulto permanecem diploides, as células larvares realizam ciclos de politenização (endorreduplicação do DNA sem divisão nuclear).

O facto de a *Drosophila* sofrer metamorfose faz com que durante o seu desenvolvimento existam duas populações celulares distintas: as células larvares que constituem as estruturas diferenciadas da larva, e as células imaginais que originam o adulto. Com excepção de alguns tecidos, como é o caso da maioria do sistema nervoso central, a separação destas duas linhagens ocorre cedo na embriogénese. Após a eclosão do ovo, a maioria do desenvolvimento larvar é efectuada por politenização e aumento do tamanho celular, sem requerer qualquer actividade mitótica. Todavia, as células dos discos imaginais e os neuroblastos do sistema nervoso central permanecem diploides, e mitoticamente activos, durante e após o período larvar. Os indivíduos da espécie *D. melanogaster* passam por três fases larvares até

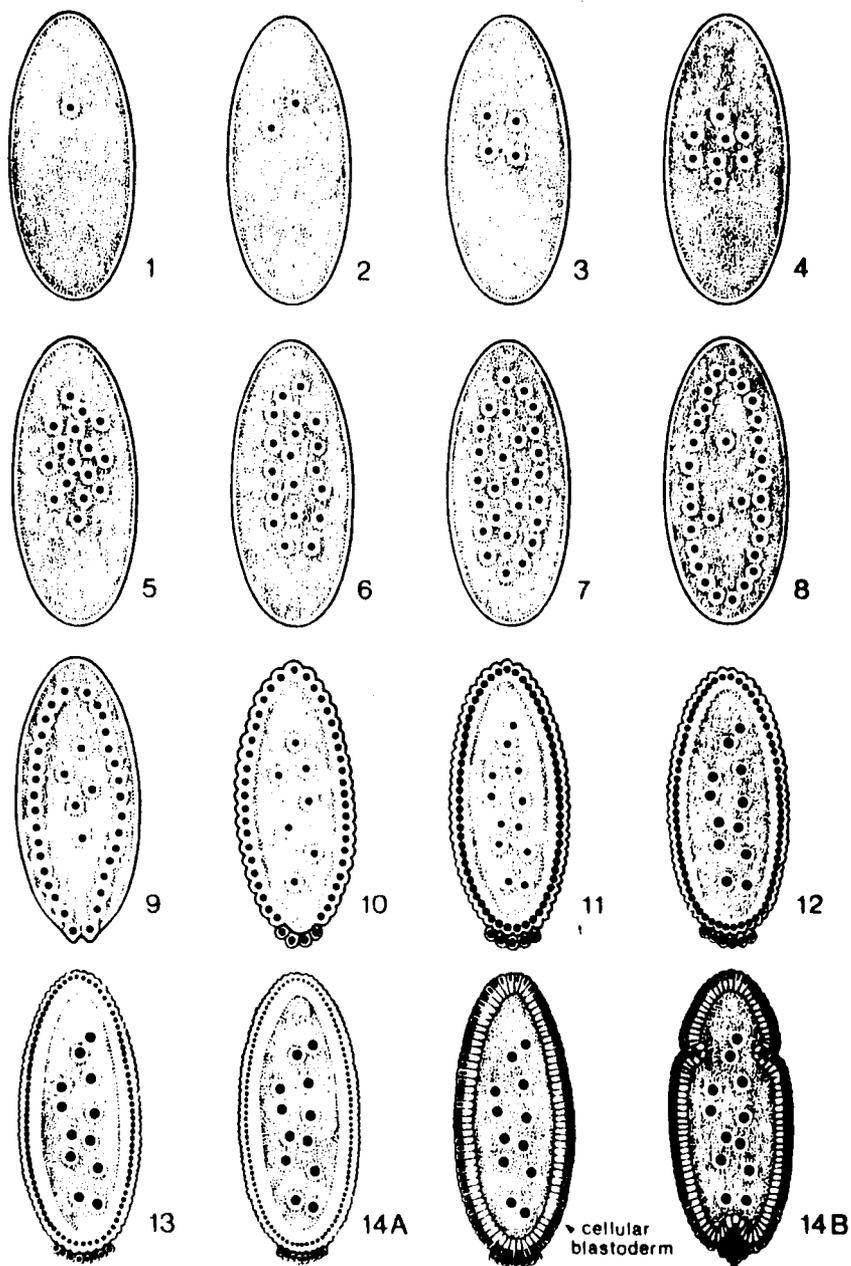


Fig I.1: Diagrama esquemático das fases embrionárias em *Drosophila melanogaster* até à gastrulação. O número ao lado de cada embrião, que se refere à sua fase de desenvolvimento, corresponde ao número total de divisões. Reproduzido de Foe e Alberts, 1983.

formarem uma pupa no interior da qual sofrem metamorfose (Ashburner, 1989).

I.2. Os cromossomas de *Drosophila melanogaster*

Os indivíduos da espécie *Drosophila melanogaster* possuem dois tipos de cromossomas: os cromossomas dos núcleos diploides, e os cromossomas politénicos que existem na maioria dos tecidos das larvas e em alguns tecidos dos indivíduos adultos, como nas glândulas salivares. Os cromossomas politénicos resultam da endoreduplicação do material genético sem que ocorra divisão celular. Nestes cromossomas, a heterocromatina constitutiva não é tão replicada quanto a eucromatina, e acumula-se no cromocentro (Ashburner, 1989).

A maioria dos núcleos dos embriões, e núcleos de algumas células do organismo adulto (como os neuroblastos), são diploides, possuindo 4 cromossomas: um cromossoma X em forma de bastão, um cromossoma Y submetacêntrico e heterocromático, dois cromossomas metacêntricos (cromossomas 2 e 3, com braços direitos e esquerdos), e um cromossoma 4 em forma de ponto (fig I.2) (Ashburner, 1989).

I.3. A cromatina

No núcleo de células eucariotas as moléculas de DNA encontram-se associadas a numerosas proteínas, as mais abundantes das quais são as

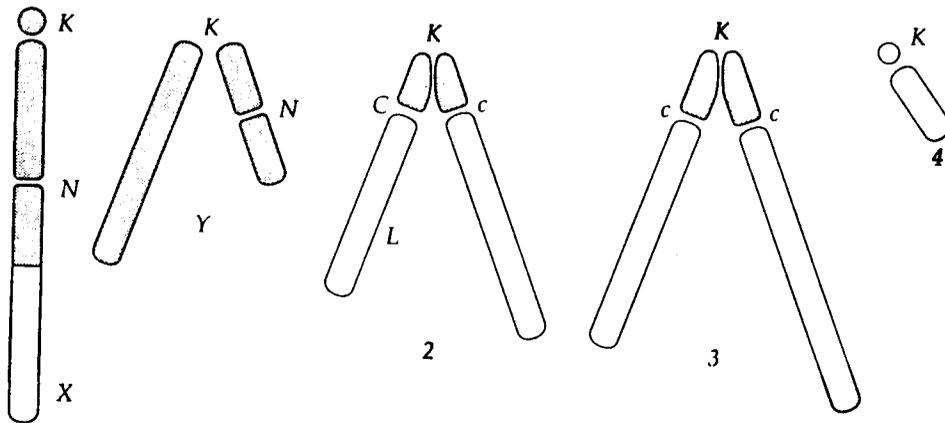


Fig I.2: Esquema dos cromossomas metafásicos de *Drosophila melanogaster*. A heterocromatina constitutiva está representada a cinzento, a eucromatina a branco. K-centrômeros, N-organizadores nucleolares, C-constricções secundárias. Reproduzido de Ashburner, 1989.

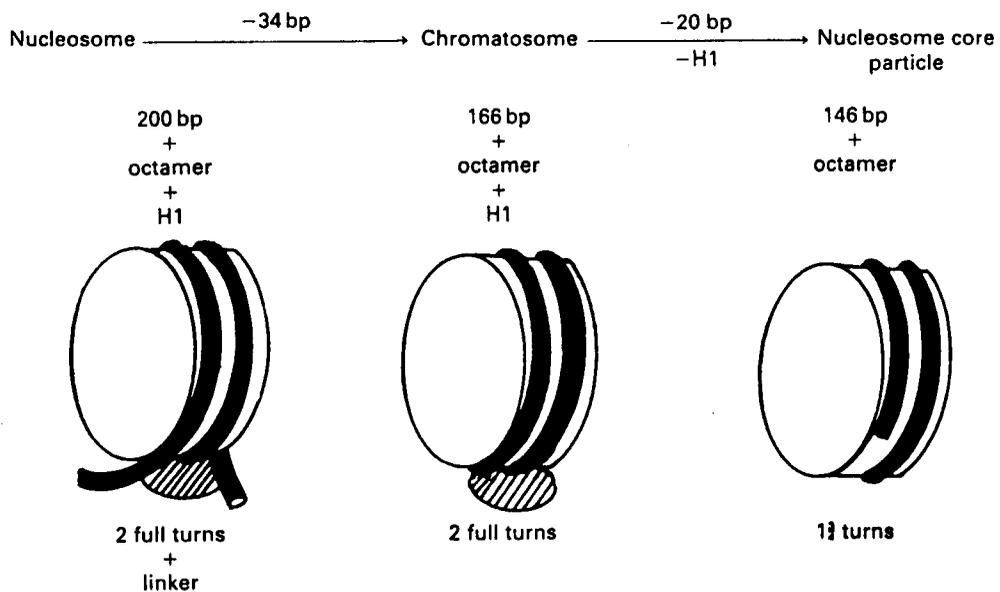


Fig I.3: Representação esquemática de um nucleossoma completo e das partículas originadas por digestão deste com nuclease micrococcal. Adaptado de Thomas, 1984.

histonas, formando a cromatina. A cromatina interfásica existe geralmente sob duas formas morfológica e funcionalmente distintas: a eucromatina transcricionalmente activa e composta por sequências únicas e medianamente repetitivas; e a heterocromatina visível em microscopia óptica, após coloração com corantes específicos, como zonas aparentemente mais compactas. A heterocromatina pode ser constitutiva se for permanente, ou facultativa se houver transição aparente entre o estado condensado (heterocromático) e o estado eucromático. A heterocromatina constitutiva é principalmente constituída por sequências altamente repetitivas, variáveis de espécie para espécie, também chamadas de DNA satélites devido à sua migração distinta através de gradientes de cloreto de cézio, e raramente contém genes, não sendo em geral transcrita. Pensa-se que as diferenças funcionais entre a eucromatina e a heterocromatina advêm de alterações estruturais devidas à modificação química de proteínas que normalmente se associam ao DNA, bem como à ligação de certas proteínas que alteraram localmente a estrutura da fibra cromática (John, 1988).

Considera-se que as fibras de DNA existentes nos núcleos se organizam estruturalmente, em várias etapas, através da ligação a proteínas. O primeiro nível de organização do DNA consiste no enrolamento da dupla hélice em torno dos octâmeros de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) formando os nucleossomas (ver fig I.3), e originando uma fibra com 10 nm de espessura e com a aparência em microscopia eletrónica de contas num colar (do inglês "beads on a string") (McGhee e Felsenfeld, 1989). *In vitro* esta associação é favorecida por proteínas como a nucleoplasmina e pensa-se que o mesmo se passa nas células vivas (Cox e Laskey, 1991; Philpott e Leno, 1992). Nesta fibra, cerca de 145 bp de DNA contornam os octâmeros de histonas deixando 30-50 bp de DNA entre cada octâmero - o DNA de ligação, do inglês "linker

DNA". Na presença de histona H1, a qual se liga ao "linker DNA", nos pontos de entrada e saída do DNA em torno dos octâmeros, a fibra condensa-se, provavelmente assumindo uma forma solenoide no interior da qual se encontra a histona H1, passando a ter uma espessura de 30 nm (fig I.4) (Woodcock *et al*, 1984; Widom e Klug, 1985; Graziano *et al*, 1994).

A maioria dos modelos estruturais da cromatina aceitam que o nível seguinte de organização é a formação de laços com 50-100 kb, cuja base se associa, através de sequências particulares (designadas MARs ou SARs, de "matrix attachment regions, scaffold associated regions"), a uma rede proteica chamada matriz ou esqueleto nuclear ("nuclear matrix, nuclear scaffold") (fig I.5) (Benyajati e Worcel, 1976; Gasser *et al*, 1986; Belmont *et al*, 1989). A existência e composição da matriz nuclear são ainda objecto de debate mas as evidências acumuladas até agora corroboram a sua existência. *In vivo*, a organização final da cromatina interfásica poderá ser um arranjo solenoide dos laços orientados radialmente, originando uma fibra com 225-250 nm (fig I.6) (Rattner e Lin, 1985).

Durante a mitose a cromatina assume uma forma altamente compacta através de condensação dos laços de DNA. Este processo requer a acção da topoisomerase II e origina os cromossomas mitóticos visíveis em microscopia óptica após coloração com corantes específicos (fig I.7) (Adachi *et al*, 1991). Estes, possuem constricções primárias (centrómero) e secundárias (organizador nucleolar) que parecem ser locais aonde a fibra não sofreu o processo final de condensação (Sumner, 1991) (fig I.8). Na fig I.9 apresenta-se um esquema dos vários níveis de organização do DNA.

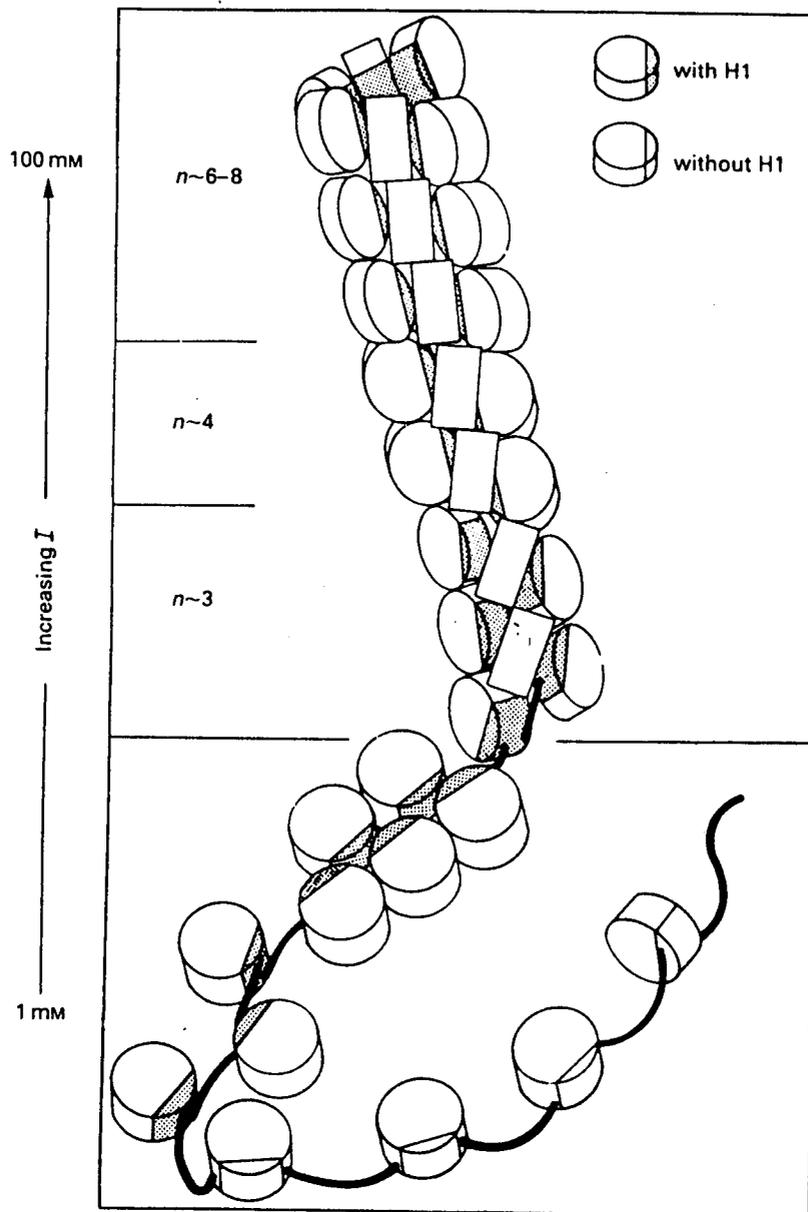


Fig I.4: Modelo da condensação da cromatina representando a solenoide contendo histona H1. A cadeia de nucleossomas (canto inferior esquerdo) condensa-se formando uma hélice em que o nº de nucleossomas/volta da hélice (n) vai aumentando. Na ausência de H1 (canto inferior direito) a cadeia assume a forma de contas num colar. Adaptado de Thomas, 1984.

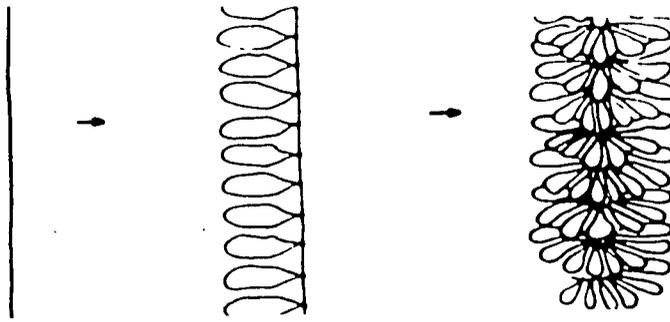


Fig I.5: Esquemas da formação de laços no DNA. Adaptado de Paulson, 1988.

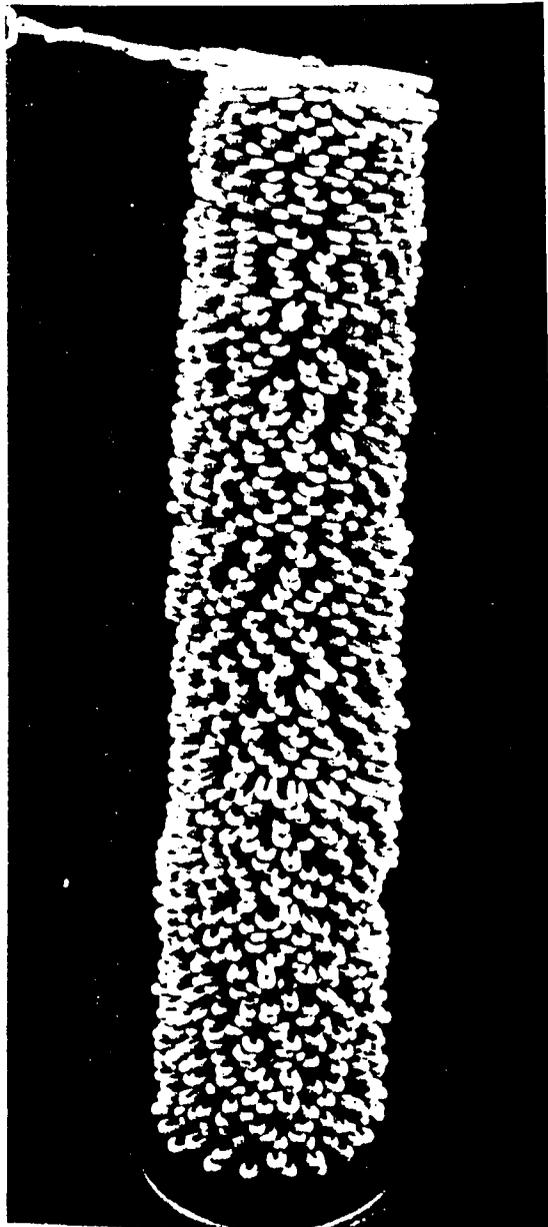


Fig I.6: Modelo da organização da cromatina num dos cromátideos metafásicos humanos 4, exceptuando o centrómero. Este cromossoma contém 106 minibandas, que, no modelo de organização radial dos laços de DNA, surgem empilhadas verticalmente ao longo de um eixo central. A fibra branca no modelo é equivalente ao filamento de 30 nm. A fibra forma laços individuais, cada um com 60 kb e o modelo contém um total de 1908 laços. O modelo tem 26,5 cm de comprimento e é equivalente a um cromátideo com 3,19 μm . Adaptado de Pienta e Coffey, 1984.

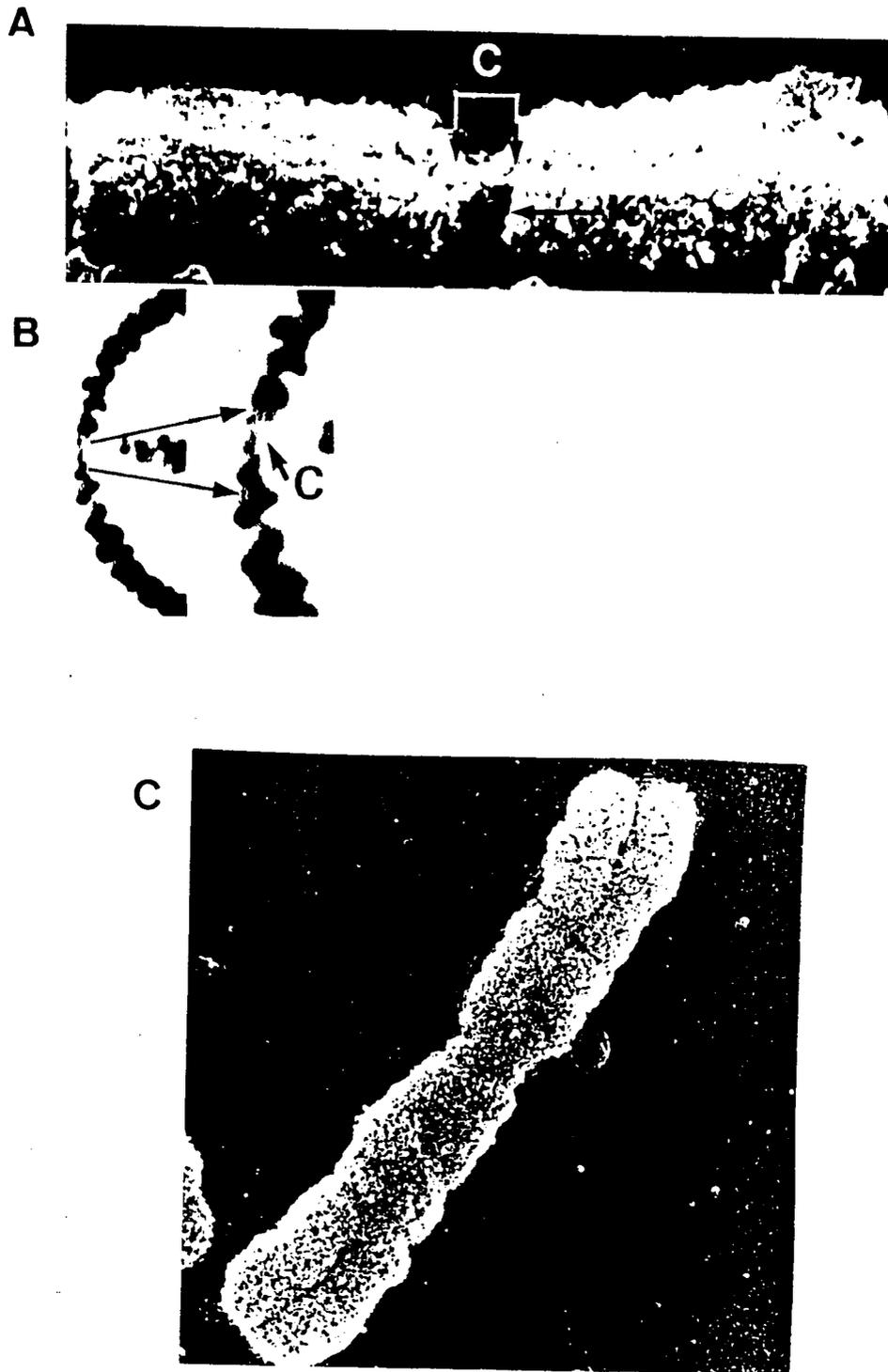


Fig I.7: Cromossomas metafásicos visualizados por microscopia electrónica de varrimento. **A-** A região do centrómero (C) é visível como a constrição primária deste cromossoma. **B-** O mesmo cromossoma observado após tratamento de uma célula em prometáfase, com ácido acético/metanol. O cromossoma é composto por uma série de espirais de uma fibra com 250 nm. Reproduzido de Rattner, 1991. **C-** Cromossoma metafásico humano. Nesta imagem observa-se nitidamente a separação entre os cromátídeos irmãos, excepto na região do centrómero. Adaptado de Sumner, 1991.

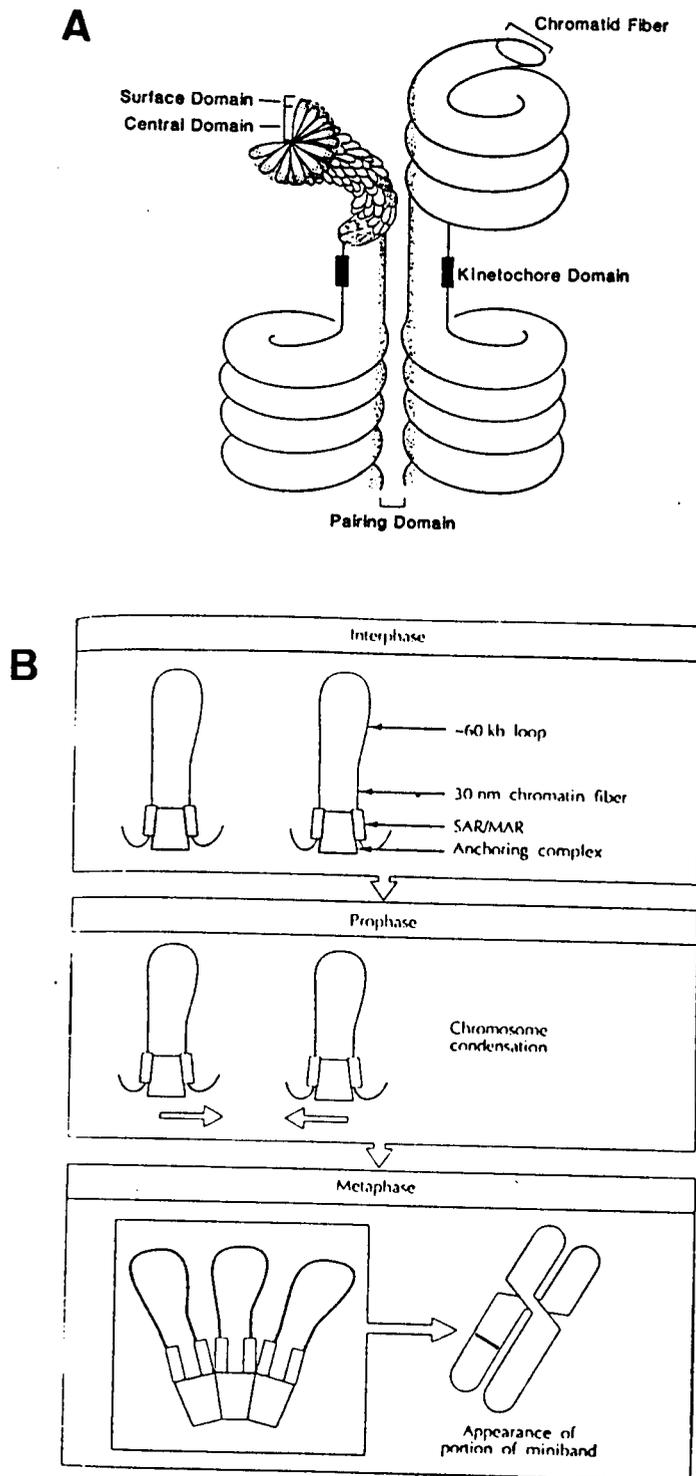


Fig I.8: A- Esquema da arquitectura dos cromossomas mitóticos e dos seus domínios funcionais. B- Esquema da organização dos cromossomas em laços e de um mecanismo possível de condensação durante a mitose. Reproduzidos de Earnshaw, 1991 e de Rattner, 1992.

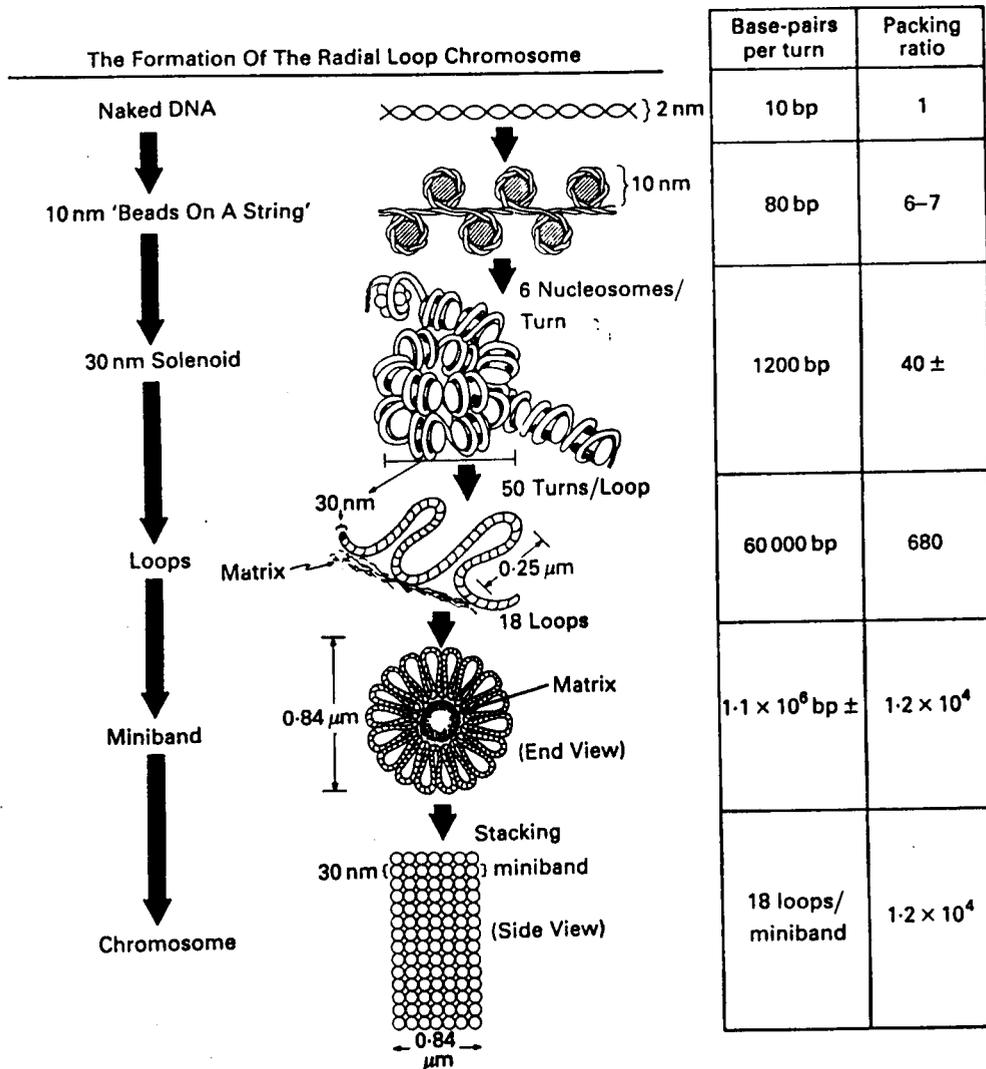


Fig 1.9: Diagrama esquemático dos vários níveis de organização da cromatina. Reproduzido de Pienta e Coffey, 1984.

I.4. Proteínas da cromatina

I.4.1. As histonas e a estrutura da cromatina

A associação do DNA às histonas, formando os nucleossomas, interfere com a capacidade de transcrição dos genes segundo dois mecanismos: por um lado influencia a acessibilidade de factores de transcrição, tendo sido demonstrado em vários casos que a ligação de proteínas activadoras da transcrição ao DNA envolve um deslocamento de nucleossomas na zona de interacção (Conconi *et al*, 1989; Adams e Workman, 1993; Sandaltzopoulos *et al*, 1994) (fig I.10); por outro lado, as histonas são passíveis de várias alterações pós-traducionais, como acetilações, fosforilações e ubiquitinilação (também podem ocorrer metilações irreversíveis e ribosilação por ADP, mas estas modificações são extremamente raras) que podem afectar o enrolamento local da hélice ou os contactos com factores de transcrição (Turner, 1991) (fig I.11).

Vários trabalhos com anticorpos monoclonais que reconhecem uma única isoforma acetilada de H4 permitiram concluir que a distribuição das isoformas não é aleatória (Turner *et al*, 1990). Por exemplo, em núcleos politénicos de *Drosophila*, as isoformas de H4 acetiladas nas lisinas 5, 8, 12 ou 16 apresentam padrões de distribuição distintos (Turner *et al*, 1992). As moléculas de H4 acetiladas nos resíduos 5 ou 8 distribuem-se em domínios diferentes nos braços dos cromossomas politénicos ao passo que a β -heterocromatina do cromocentro é rica em H4 acetilada na posição 12 (fig I.12). A isoforma acetilada na lisina 16 é apenas abundante no cromossoma X

hiperactivo dos machos, tendo sido proposto que os produtos dos genes *male-specific lethal (msl)*, necessários à hiperactivação do cromossoma X, interagem com a H4 acetilada na lisina 16, definindo os locais aonde a transcrição vai ser hiperactivada (Bone *et al*, 1994). Em cromossomas metafásicos humanos, a distribuição de H4 acetilada também não é aleatória, sendo a heterocromatina centromérica (Jeppesen *et al*, 1992), e também o cromossoma X inactivo das fêmeas, pobres nesta isoforma, que parece assim estar associada a regiões que serão transcricionalmente activas em interfase (Jeppesen e Turner, 1993).

A melhor prova de que as histonas afectam a estrutura da cromatina advém de estudos funcionais. Em *S. cerevisiae*, mutações que alteram a acetilação das histonas impedem o silenciamento dos "mating type locus" HML α e HMRA, e, em *Drosophila* os genes que codificam para as histonas são supressores da PEV ("position effect variegation"; ver secção I.6.3) (Turner, 1993). Todos estes dados sugerem que pelo menos a acetilação das histonas deve estar envolvida nas modificações da conformação da cromatina e/ou no seu potencial de transcrição. É no entanto difícil averiguar se o efeito se exerce directamente sobre a hélice ou se depende de proteínas adicionais.

A fosforilação da histona H1 pela cinase p34^{cdc2} tem sido implicada na condensação dos cromossomas durante a mitose (Kharrat *et al*, 1991). Contudo, também foi observado que na ausência de fosforilação da histona H1, extractos nucleares de *Xenopus Laevis* são capazes de condensar a cromatina de uma forma aparentemente normal (Ohsumi *et al*, 1993), não sendo claro o papel que a fosforilação desta histona desempenha na condensação dos cromossomas durante a mitose. No entanto, esta proteína parece afectar a estrutura da cromatina de algum modo e, por exemplo, eritrócitos de galinha cuja cromatina apresenta uma morfologia muito

condensada possuem uma isoforma de histona H1, denominada H5 (Postnikov *et al*, 1991).

Além das modificações pós-traducionais, as histonas são codificadas por uma família multigênica, existindo várias isoformas cuja expressão pode ser regulada ao longo do desenvolvimento. Por exemplo, os tecidos somáticos de vertebrados expressam três classes principais de histona H1. Primeiro, uma isoforma embrionária, até agora encontrada apenas em anfíbios, é especificamente expressa durante o início do desenvolvimento. Segundo, as histonas H1 comuns surgem apenas quando se inicia a transcrição dos genes zigóticos e permanecem na maioria dos tecidos do animal ao longo da sua vida. Finalmente, há um tipo de histonas H1 que existe só nos organismos adultos, e em células que se aproximam do estado terminal de diferenciação. Dois membros desta última família foram caracterizados: a H1⁰, que é expressa na maioria dos tecidos somáticos diferenciados de vertebrados; e a H5 que é expressa durante a maturação dos eritrócitos das aves (Turner, 1991).

A ligação do DNA às histonas também influencia a sua capacidade de replicação, e nas primeiras células embrionárias, e em células germinais de diversos organismos as histonas são substituídas por diversas proteínas, como as protaminas presentes nos espermatozoides de mamíferos ou a histona B4 de *Xenopus Laevis*. Em *Drosophila melanogaster*, a histona H1 só surge por volta do nono ciclo de divisão embrionária, sendo anteriormente substituída pela proteína HMG-D, presumivelmente porque na presença desta proteína a fibra é menos compacta e a replicação é conseqüentemente mais rápida (Ner e Travers, 1994).

Initial factor binding to a nucleosome core creates a ternary complex



Additional factors may bind the ternary complex



Nucleosome displacement onto histone-binding components allows the binding of additional factors

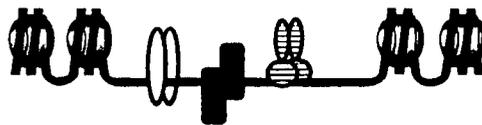


Fig I.10: Formação de complexos com factores de transcrição e deslocação dos nucleossomas na zona transcriçionalmente activa. Reproduzido de Adams e Workman, 1993.

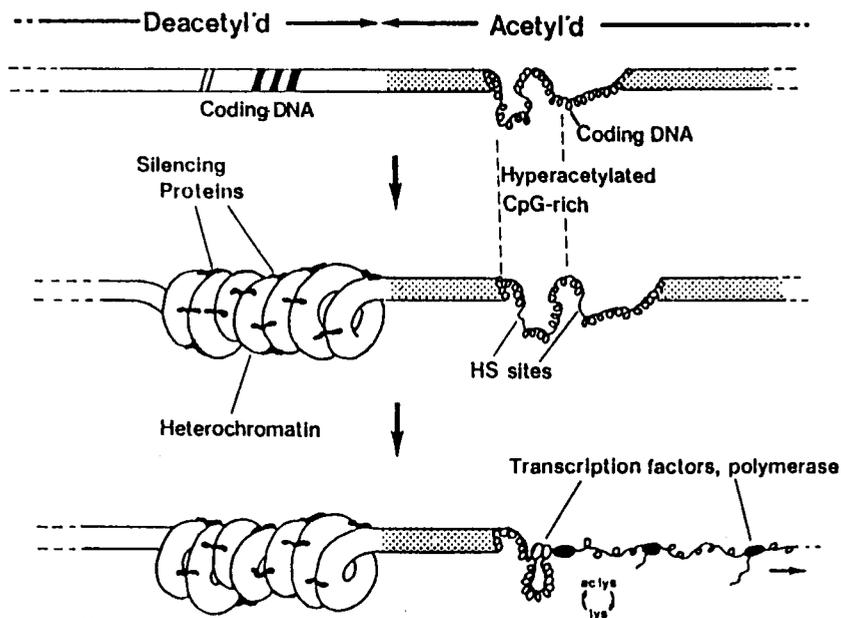


Fig I.11: Diagrama que representa algumas das alterações na estrutura da cromatina que acompanham a activação e inactivação da transcrição. A acetilação das histonas pode estar envolvida nestas modificações. A cromatina na zona transcriçionalmente activa é representada como uma fibra de 10 nm, nos restantes locais considera-se que a fibra é uma solenoide com 30 nm. Na figura, acetyl'd e deacetyl'd, referem-se quer aos níveis globais de acetilação, quer à acetilação de alguns locais específicos. A formação de heterocromatina é apresentada na parte do meio e inferior da figura, como enrolamento da fibra de 30 nm. O modelo propõe que o alastramento da heterocromatina acaba na fronteira entre a cromatina acetilada e hipoacetilada. A activação do gene na parte direita da figura envolve a formação de locais hipersensíveis à digestão por DNaseI (HS), por deslocamento de nucleossomas nessa região. Reproduzido de Turner, 1991.

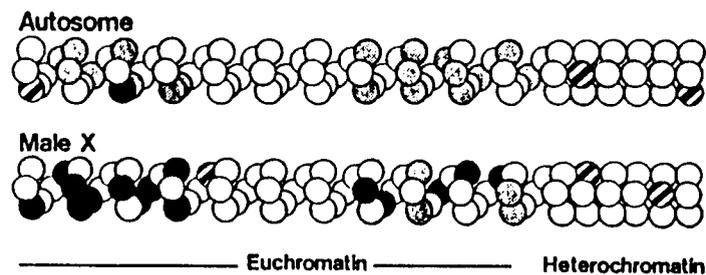


Fig I.12: Modelo da distribuição de H4 acetilada nos cromossomas de *Drosophila*. Cada círculo representa um nucleossoma. Os nucleossomas com H4 acetilada na lisina 5 e/ou 8 (cinzento) encontram-se agrupados ao longo dos braços dos cromossomas, intercalando com regiões hipoacetiladas (branco). Nucleossomas com H4 acetilada na lisina 12 (riscas) surgem quer na heterocromatina, quer nos braços dos cromossomas. H4 acetilada na lisina 16 (preto) surge apenas no cromossoma X hiperactivo dos machos, raramente surgindo nos autossomas e nos cromossomas X das fêmeas. Reproduzido de Turner et al, 1992.

I.4.2. As HMGs

As proteínas do grupo HMG ("high mobility group") são proteínas nucleares moderadamente abundantes cuja característica comum é serem solúveis em ácido perclórico a 5%. Designaram-se HMGs por serem geralmente proteínas de baixo peso molecular. Estas proteínas podem ser classificadas em três grupos de acordo com homologias nas sequências de DNA dos seus genes: HMG1/Y, HMG1/2, HMG 14/17 (Bustin *et al*, 1990).

A família HMG 1/2 consiste de proteínas com o peso molecular aproximado de 25 kDa que se ligam preferencialmente a DNA em cadeia simples e são capazes de diferenciar várias conformações da hélice exibindo preferência pela conformação em forma de cruz. Estas proteínas modificam as propriedades estruturais da cadeia de DNA conferindo-lhe uma maior flexibilidade. Várias proteínas de procariotas, como a proteína HU de *E.coli* possuem a mesma função (fig I.13) (Giese *et al*, 1992; Paull *et al*, 1993).

A família HMG 14/17 é composta por proteínas cujo peso molecular varia entre 10-12 kDa. Estas proteínas não se ligam ao DNA mas sim às histonas. Várias linhas de evidência são consistentes com a ideia das HMGs14/17 serem parte de um mecanismo que confere propriedades distintas a regiões da cromatina que contêm genes transcricionalmente activos. A deposição da HMG-17 durante a replicação perturba a organização dos nucleossomas e aumenta o potencial de transcrição da cromatina nascente pela RNA polimerase III, e a HMG 14 estimula a elongação da transcrição pela RNA polimerase II (Crippa *et al*, 1993; Ding *et al*, 1994).

A família HMG-I é composta pela HMG-I e HMG-(Y). Estas proteínas têm um peso molecular semelhante ao das HMG-14/17 mas são

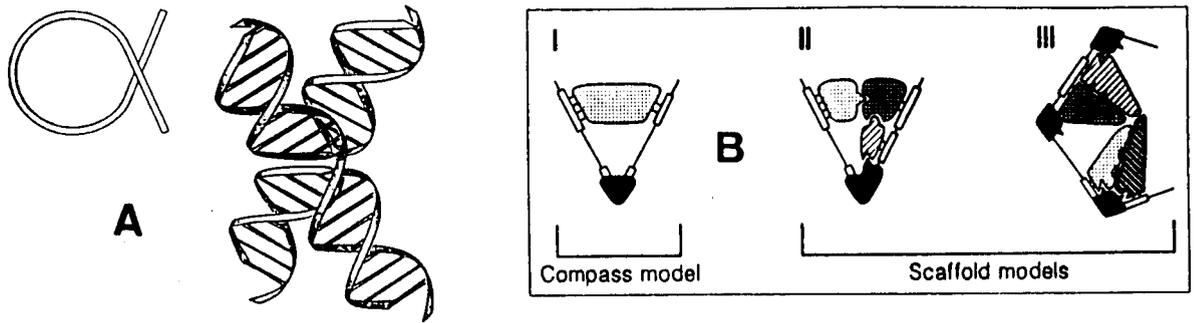


Fig I.13: A- A formação de "loops" de DNA pode gerar nodos (esquerda) semelhantes a uma junção de quatro cadeias de DNA (direita). As HMGs podem ter selectividade por esta estrutura cruzada. Adaptado de Lilley, 1992. B-Modelos sobre a indução de dobras no DNA por proteínas. A hélice de DNA é representada por uma linha e os locais de ligação de factores por rectângulos ocios. I é o chamado modelo de compasso, em que uma proteína de ligação ao DNA com especificidade de sequência (triângulo a cheio), induz uma dobra que alinha espacialmente locais de ligação não adjacentes. Neste modelo não há interacção entre a proteína que dobra a hélice e os outros factores. Os modelos II e III descrevem casos em que a proteína interage com um ou mais factores. Reproduzido de Grosschedl et al, 1994.

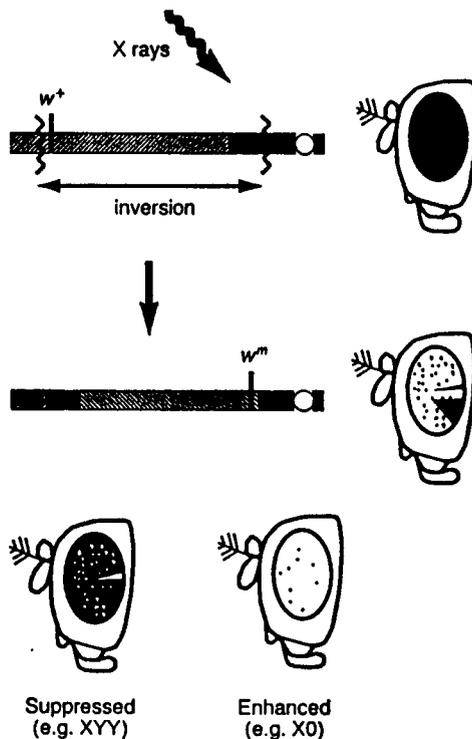


Fig I.14: Exemplo de PEV no gene *white* (w), um gene ligado ao cromossoma X, que participa na pigmentação do olho. Radiação ionizante provoca quebras nos cromossomas (linha ondulada), levando a inversões, translocações e transposições. Quando o gene *white* é juxtaposto à heterocromatina (caixas pretas) pode ocorrer PEV, originando o alelo *white-mottled* (w^m), cujo fenótipo consiste na alteração da cor dos olhos das moscas (passam a ser brancos com pontos vermelhos, que correspondem a células em que o gene *white* não foi inativado). A presença de um cromossoma Y adicional (XYY) causa uma supressão forte do fenótipo, ao passo que a ausência de cromossoma Y em machos (X0), provoca aumento do fenótipo. Reproduzido de Henikoff, 1990.

funcionalmente distintas pois não apresentam afinidade pelas histonas mas sim pelo DNA, ligando-se à "minor groove" da hélice e exibindo afinidade por sequências ricas em AT (van der Wetering e Clevers, 1992; Thanos e Maniatis, 1992).

Em embriões de *Drosophila* foram identificadas três HMGs, uma do tipo Y e duas do tipo 1/2. A proteína D1 é uma HMG do tipo I/Y e apresenta um peso molecular aparente de 50kDa (Levinger, 1985). Esta proteína liga-se ao DNA exibindo preferência por sequências ricas em -AT, sendo particularmente abundante em regiões heterocromáticas (Ashley *et al*, 1989). As outras duas HMGs que foram recentemente identificadas são a HMG-D e a HMG-Z (Ner *et al*, 1993). Os genes que codificam para estas proteínas são homólogos e localizam-se em regiões adjacentes do genoma sugerindo que um deles deriva de duplicação do outro. A HMG-D substitui a histona H1 até ao nono ciclo de divisão em embriões de *Drosophila* possivelmente por conferir à cromatina uma maior velocidade de replicação (Ner e Travers, 1994).

I.4.3 Proteínas envolvidas na variação do efeito de posição (PEV)

Quando um gene eucromático transcricionalmente activo é transposto, através de rearranjos ou translocações, para a vizinhança da heterocromatina, verifica-se que este é inactivado e o fenómeno é chamado variação do efeito de posição ,ou abreviadamente PEV ("position effect variegation"). A extensão em que o gene é inactivado varia de célula para célula, sendo o

padrão de expressão herdado pelas células filhas, de modo que o fenótipo observado consiste num mosaico de expressão genética (fig I.14). A PEV foi originalmente descrita em *Drosophila melanogaster* em 1930 (Muller, 1930) quando se estudaram translocações do gene *white* que confere aos olhos das moscas a cor vermelha, e mais tarde foi também descrita em levedura (Gottschling *et al*, 1990; Aparicio *et al*, 1991). Citologicamente, observa-se que a heterocromatina próxima do gene translocado se estende, cobrindo total ou parcialmente esse mesmo gene e silenciando a sua expressão. Este propagar da heterocromatina pode extender-se a 80 bandas nos cromossomas politénicos de *Drosophila* (cerca de 1 500 kb) (revisto por Henikoff, 1990).

O estudo da PEV foi enormemente facilitado pela descoberta de mutantes de *Drosophila* em que há supressão (*su(var)*) ou aumento (*en(var)*) deste efeito, embora os mutantes *su(var)* se encontrem muito melhor caracterizados. Os modificadores da PEV podem ser proteínas da cromatina, como a HP1, os produtos do grupo de genes *Polycomb* (Pc-G), e os produtos do grupo de genes *Trithorax* (Trx-G) de *Drosophila*, bem como os produtos dos genes SWI/SNF em *S. cerevisiae*; ou então são enzimas que se pensa actuarem sobre as proteínas da cromatina, como é o caso da PP1 (protein phosphatase 1) de *Drosophila* (Baksa *et al*, 1993). Estas proteínas da cromatina parecem actuar através da formação de complexos multiméricos que se ligam ao DNA e que, de uma forma ainda desconhecida, alteram a estrutura da fibra originando heterocromatina compacta e inerte (fig I.15) (Locke *et al*, 1988). O facto da introdução de um cromossoma Y adicional em embriões machos de *Drosophila* suprimir a PEV comprova que este efeito se deve realmente à formação de heterocromatina, uma vez que o cromossoma Y de *Drosophila* é totalmente heterocromático (revisto por Shaffer *et al*, 1993).

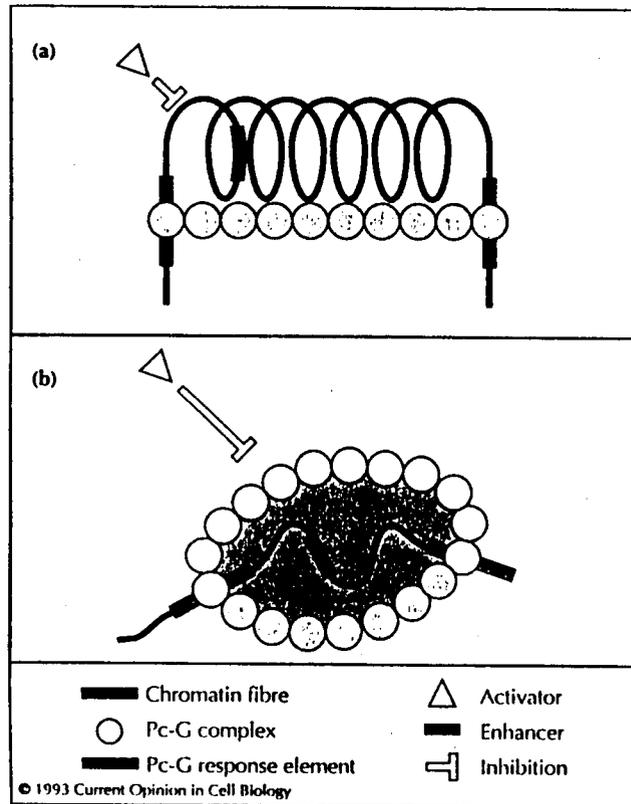


Fig I.15: Dois modelos que representam formas de um estado inactivo da transcrição ser estabelecido no núcleo. (a) O modelo de empacotamento propõe que a fibra de cromatina se organiza numa estrutura regular. O elemento de resposta ao Pc-G actua como sinal de nucleação para a montagem cooperativa de complexos Pc-G, responsável pelo empacotamento da cromatina. O elevado grau de condensação tornaria os "enhancers" inacessíveis aos factores de transcrição. (b) Os complexos Pc-G formam compartimentos subnucleares que actuam como barreiras em relação aos factores de transcrição. Reproduzido de Paro, 1993.

O mutante de *Drosophila su(var)2-5* permitiu isolar a proteína HP1 (Eissenberg *et al*, 1990). A HP1 é uma proteína nuclear essencial, ácida, com 206 aa, que não possui nenhum domínio de ligação ao DNA nem exibe tal actividade *in vitro*, embora nas células vivas se localize nas zonas heterocromáticas dos cromossomas (Eissenberg *et al*, 1992; Powers e Eissenberg, 1993). Provavelmente, a HP1 participa na formação de um complexo multimérico em que um ou mais membros são proteínas capazes de se ligarem ao DNA, como os produtos dos genes *su(var)3-7* e *su(var)3-9* que possuem domínios com estrutura de dedos de zinco (Reuter *et al*, 1990; Tschiersch *et al*, 1994). Um dos domínios da HP1, chamado "chromo domain" é potencialmente um local de ligação a outras proteínas e é essencial para a função da HP1 (fig I.16). Utilizando anticorpos monoclonais contra o domínio "chromo", foi possível clonar um homólogo humano da HP1 que se localiza nos centrómeros dos cromossomas humanos (Saunders *et al*, 1993). Também foram encontrados homólogos da HP1 em *Drosophila virilis*, escaravelho e ratinho (Singh *et al*, 1991; Epstein *et al*, 1992).

Um supressor dominante da PEV identificado recentemente em *Drosophila*, é o gene *modulo (mod)*, que codifica para uma proteína que se liga ao DNA (Garzino *et al*, 1992). Na ausência de *mod*, o corpo gordo e a musculatura visceral das larvas no terceiro estado apresentam uma morfologia muito alterada. Estes tecidos de origem mesodérmica são invadidos e posteriormente encapsulados por hemócitos, resultando no aparecimento de tumores melanóticos. O *mod* é expresso em todos os núcleos somáticos antes da celularização, parecendo ser requerido para a formação da heterocromatina pericentromérica durante os ciclos de divisão embrionária 11-12, mas após a primeira divisão celular é só expresso em linhagens celulares específicas. Além do domínio de ligação ao DNA, a proteína *mod* tem também um

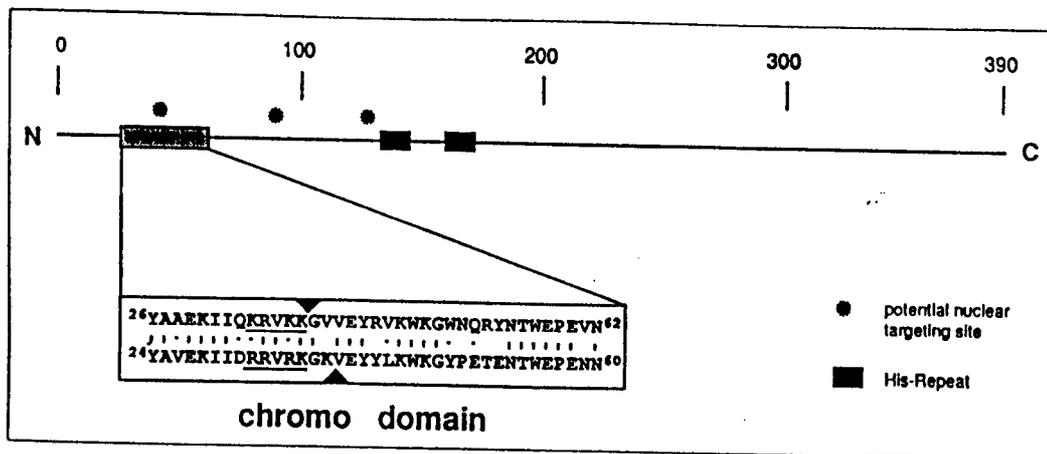
domínio ácido que pode estar envolvido em interações proteína/proteína e, uma vez que a mod, em cromossomas politénicos, se localiza em locais aonde existe HP1, foi proposto que ambas as proteínas são componentes de um mesmo complexo proteico (Garzino *et al*, 1992).

Outros modificadores da PEV em *Drosophila* incluem os grupos de genes *Polycomb* (Pc-G) e *Trithorax* (Trx-G), que codificam proteínas reguladoras da transcrição dos genes dos grupos *Antennapedia* (ANT-C) e *Bithorax* (BX-C) (revisto por Paro, 1990). Estes últimos genes são genes homeóticos, necessários durante o desenvolvimento do embrião de *Drosophila* e codificam para factores de transcrição com domínios "homeodomain". O complexo ANT-C determina a identidade dos segmentos torácicos e da cabeça, e o complexo BX-C determina a identidade dos segmentos torácicos abdominais e posteriores (Pelegri e Lehmann, 1994). A expressão destes genes zigóticos é estabelecida numa fase precoce do desenvolvimento, devido à acção dos produtos de outro tipo de genes: os genes da segmentação (revisto por Pirrotta e Rastelli, 1994). Embora o padrão de expressão dos genes dos grupos ANT-C e BX-C seja iniciado por acção dos produtos dos genes da segmentação, ele é mantido por acção dos produtos dos genes Pc-G, que reprimem a transcrição de certos genes, e Trx-G que permitem a transcrição de outros. Assim, os produtos dos genes Pc-G e Trx-G participam num processo antagónico de "memória celular". O mecanismo é semelhante ao da formação de heterocromatina na PEV, envolvendo a acção de complexos multiméricos e a alteração da estrutura da cromatina (fig I.17).

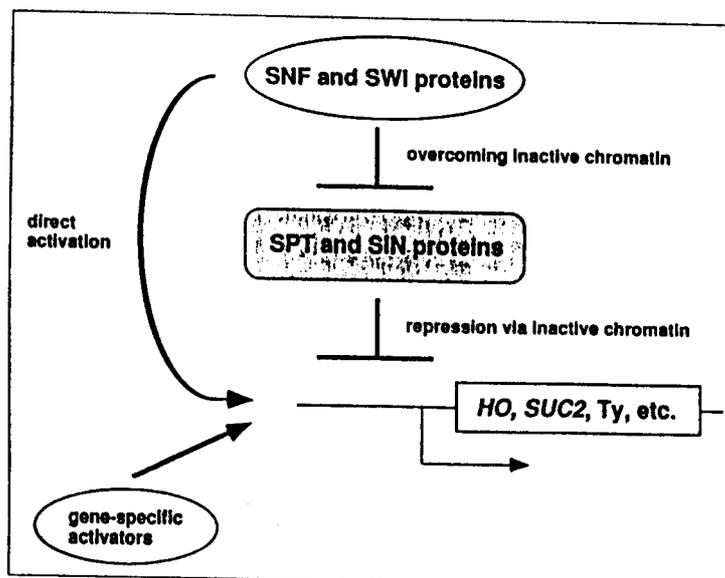
Até agora, foram descritos onze genes do grupo Pc-G. São eles: *Polycomb* (Pc), *extra sex combs* (esc), *Polyhomeotic* (Ph), *Additional sex combs* (Asx), *Sex combs on midleg* (Scm), *Polycomb-like* (Pcl), *super sex combs* (sxc), *pleihomeotic* (pho), *sex comb extra* (sce) e *Enhancer of zeste*

[*E(z)*] (revisado por Paro, 1993). De todos os produtos destes genes, a proteína Polycomb é a que se encontra melhor caracterizada. Esta, é uma proteína nuclear com 390 aa que possui um domínio "chromo" idêntico ao da HP1 (Paro e Hogness, 1991) e, tal como esta proteína, não se liga directamente ao DNA, embora se localize em cerca de oitenta a cem bandas dos cromossomas politénicos, incluindo nos locus ANT-C e BX-C (Zink e Paro, 1989; Chan *et al*, 1994). A proteína Polycomb faz parte de um complexo multimérico que inclui vários outros membros do Pc-G (Franke *et al*, 1992; Rastelli *et al*, 1993), alguns dos quais, como a proteína polihomeotic (DeCamillis *et al*, 1992) e posterior sex combs, possuem domínios de ligação ao DNA.

Quanto ao grupo de genes *Trithorax* só dois dos seus membros se encontram parcialmente caracterizados. São eles os genes *trithorax*, que codifica para uma proteína nuclear com domínio dedos de zinco, e o gene *brahma*, homólogo dos genes SNF2/SWI2 de *S. cerevisiae* que codificam para ATPases dependentes do DNA (Tamkun *et al*, 1992). Os produtos dos genes SWI2/SNF2, SWI1, SWI3, SNF5 e SNF6 são necessários para a activação da transcrição de vários genes (mas não para a transcrição basal), como o gene SUC2, cuja transcrição é activada em resposta a diminuição nos níveis de glucose, e o gene HO, requerido para o "mating type switching" de levedura (Winston e Carlson, 1994). Os produtos dos genes SNF2/SWI2 e SNF 5 parecem actuar através da deslocação local de histonas: dímeros H2A/H2B são removidos e a estrutura da cromatina sofre um relaxamento local (Hirschhorn *et al*, 1992; Kwon *et al*, 1994). Estas proteínas podem ser componentes de um complexo multimérico, que, análogamente ao complexo formado pelos produtos dos genes Pc-G de *Drosophila*, altera localmente a estrutura da cromatina, modificando o potencial local de transcrição.



I.18: Domínios da proteína Polycomb. A proteína tem 390 amino-ácidos, o que corresponde a 44 kDa. O terminal amino da proteína apresenta duas repetições homopoliméricas de histidina, e três sinais potenciais de localização nuclear. Também é nesta região que se encontra o domínio "chromo". Reproduzido de Paro, 1990.



I.19: Modelo sobre a função das proteínas SNF/SWI e SPT/SIN. O modelo sugere que as proteínas SNF/SWI activam a transcrição através de dois mecanismos: um consiste de activação directa e o outro consiste em ultrapassar os efeitos inibidores provocados pela estrutura da cromatina. Em ambos os casos as proteínas actuam em conjunto com activadores específicos da transcrição. As proteínas SPT/SIN provocam repressão na transcrição por participarem na formação de uma estrutura inactiva da cromatina. Reproduzido de Winston e Carlson, 1992.

Outros genes de levedura cujos produtos parecem também alterar localmente a estrutura da cromatina, são os genes SIR, requeridos para o silenciamento dos "mating type locus" HML e HMR (Winston e Carlson, 1994). Os produtos dos genes SIR não se ligam ao DNA e parecem interagir com as proteínas ORC, RAPI e ABF1 que são proteínas de ligação ao DNA, e actuam sobre os silenciadores dos locus HML e HMR (Chien *et al*, 1993) (fig I.19).

Têm sido encontrados homólogos dos genes Pc-G, Trx-G e SWI/SNF em ratinho e no homem, sendo possível que este tipo de mecanismo de memória celular seja evolutivamente conservado. Notavelmente, a expressão aberrante de alguns destes genes (como o gene humano ALL-1/Hrx) pode causar leucemias, sugerindo que eles são requeridos para manter o estado de expressão genética nos tecidos que proliferam até à maturidade. No caso de falhas na regulação, a perda de memória celular resultante poderá provocar a formação de tumores (Tschiersch *et al*, 1994).

I.5. Proteínas da matriz nuclear

O termo "matriz nuclear" foi originalmente usado para descrever o remanescente nuclear em forma de rede, que é obtido após extração dos núcleos com nucleases, sal, e detergentes (Berezney e Coffey, 1977) (fig I.20). Embora seja possível que esta estrutura derive de artefactos experimentais provenientes dos tratamentos enzimáticos e químicos necessários á sua observação, tal não parece hoje em dia credível pois que a matriz ou esqueleto nuclear tem sido observada em numerosos tipos de

células e sob variadíssimas condições experimentais, incluindo em células encapsuladas em agarose, que se pensa serem morfológica e funcionalmente idênticas às células vivas (fig I.21) (Jackson *et al*, 1990; Belgrader *et al*, 1991; Micheli *et al*, 1993). Estes filamentos parecem ser do tipo dos filamentos intermediários e em alguns casos demonstrou-se que anticorpos anti-proteínas dos filamentos intermediários reconhecem esta estrutura, mas as provas existentes sobre a composição da matriz nuclear não são ainda conclusivas (Jackson e Cook, 1988; Beven *et al*, 1991).

Cromossomas metafásicos digeridos com nucleases e extraídos com sal e detergentes originam uma estrutura residual que é o análogo mitótico da matriz nuclear e é chamada esqueleto dos cromossomas (fig I.22) (Paulson e Laemmli, 1977; Paulson, 1988). Pensa-se que esta estrutura contém proteínas cuja função é a de servirem como âncoras das bases dos laços de cromatina à matriz nuclear (ver secção 3). Esqueletos de cromossomas purificados foram usados para a produção de anticorpos. Estes, reconhecem principalmente duas proteínas em "imunoblots", designadas sc1 e sc2 ("scaffold protein") (Lewis and Laemmli, 1982). A sc1 foi identificada como topoisomerase II e propõe-se que para além dos vários papéis funcionais desempenhados pela topoII durante a replicação, transcrição, segregação, e condensação da cromatina (Rose *et al*, 1990; Adachi *et al*, 1991), esta proteína também participe na ligação de sequências específicas de DNA (chamadas MARs ou SARs, "matrix-attachment regions" ou "scaffold-attachment regions") à matriz nuclear, desempenhando um papel estrutural na organização da cromatina no núcleo (Earnshaw *et al*, 1985). Com efeito, muitas das sequências MAR isoladas são locais de ligação da topoisomerase II (Adachi *et al*, 1989), e, trabalhos com anticorpos mostram que esta enzima se localiza na base dos laços de DNA (Earnshaw e Heck, 1985).

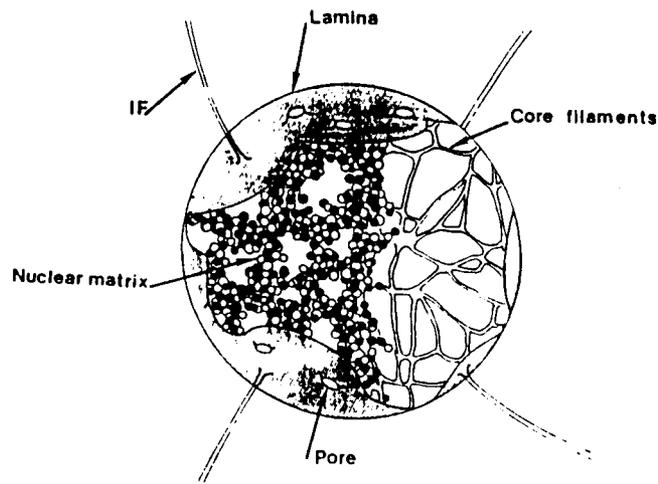


Fig I.20: Modelo da estrutura da matriz nuclear. As lamina e os poros nucleares definem a fronteira da matriz. Filamentos intermediários irradiam das lamina para o espaço citoplasmático. O interior da matriz é composto por fibras polimórficas. Reproduzido de He et al, 1990.

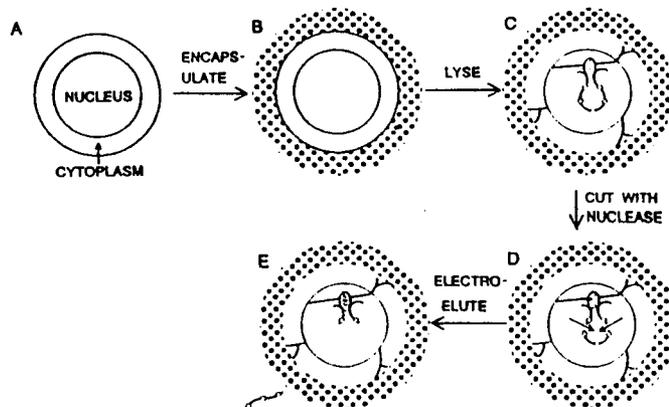


Fig I.21: Preparações da matriz nuclear em células encapsuladas em agarose. As células (A) são encapsuladas em agarose (B), lisadas (C) e lavadas com um tampão fisiológico. A cromatina é fragmentada (D) por adição de nucleases e os fragmentos são removidos por eletroforese (E). Finalmente, as amostras são fixadas e visualizadas no microscópio eletrônico. Reproduzido de Jackson e Cook, 1988.

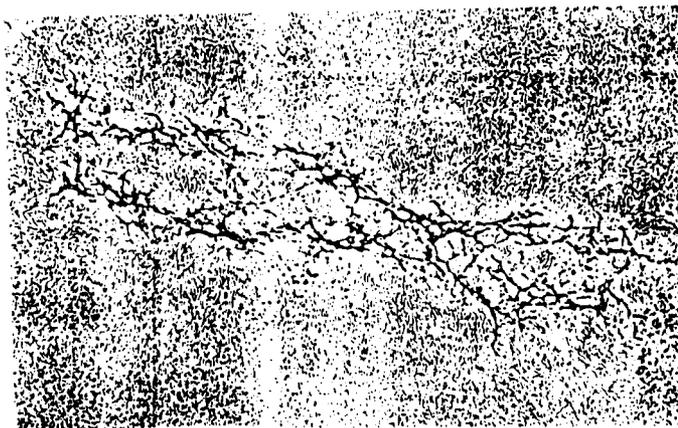


Fig I.22: Aparência em microscopia eletrônica de um esqueleto de cromossoma. Reproduzido de Paulson, 1988.

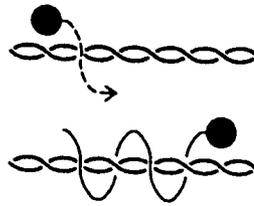
A sc2 também parece ser um verdadeiro componente da matriz, embora ainda não existam muitos dados disponíveis sobre esta proteína (W. C. Earnshaw, resultados não publicados).

Em busca de outras proteínas com a função de âncoras da base dos laços de DNA à matriz nuclear, usaram-se sequências MAR para o isolamento de proteínas que exibissem actividade específica de ligação a estas sequências. Assim, foi isolada uma proteína de células HeLa, com peso molecular aparente de 95 kDa, designada ARBP ("Attachment region binding protein") (von Kries *et al.*, 1991) mas não foram ainda publicados mais trabalhos sobre esta proteína, pelo que não é certo que a ARBP funcione *in vivo* como âncora à matriz.

Utilizando sequências MAR sintéticas para pesquisa de uma biblioteca de expressão de células humanas, foi clonado um cDNA que codifica para uma proteína designada SATB1 ("scaffold-attachment-binding 1"). Verificou-se que esta proteína se liga a sequências ricas em AT, incluindo MARs não sintéticas, e que se encontra confinada a certos tipos celulares (Dickinson *et al.*, 1992). Embora potencialmente seja candidata ao papel de âncora dos cromossomas, serão necessárias mais evidências experimentais para o comprovar.

Um candidato provável a proteína de ligação à matriz nuclear é a RNA polimerase II. Contrariamente aos modelos sobre transcrição que visualizam uma cadeia de DNA estacionária e moléculas de RNA pol II que se deslocam ao longo dela de modo a transcreverem o genoma, existem bastantes evidências experimentais que indicam estarem as moléculas de RNA pol II em posições fixas do núcleo, e ser a molécula de DNA que se desloca para ser transcrita (fig I.23) (Cook, 1990).

A POLYMERASE TRANSLOCATES AND ROTATES.



B DNA TRANSLOCATES AND ROTATES.

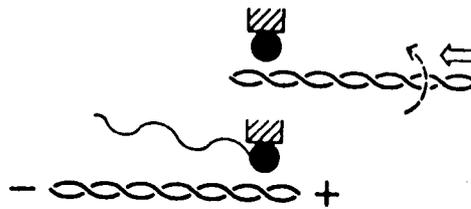


Fig I.23: Modelos da transcrição. (A) A polimerase (círculo a cheio) move-se ao longo de uma das cadeias da hélice originando um transcrito que fica enrolado na hélice de DNA. (B) O DNA roda, à medida que se move ao longo de uma molécula de RNA polimerase estacionária. Este movimento induz a formação de enrolamentos suprahelicoidais na hélice que são removidos pela acção de topoisomerases. Reproduzido de Cook, 1994.

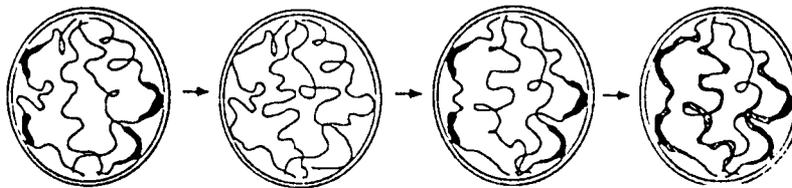


Fig I.24: Diagrama sobre a condensação e descondensação dos cromossomas. Após a formação do envelope nuclear na telofase a descondensação prossegue sequencialmente, terminando em locais específicos dos cromossomas associados à membrana nuclear. A condensação começa nestes mesmos locais. Reproduzido de Hiraoka *et al*, 1989.

Com efeito, moléculas de RNA polimerase II imobilizadas em vidro ou em plástico transcrevem o DNA com eficiência maior do que em solução, atingindo uma velocidade próxima da observada *in vivo* (Cook, 1994). Também, quando células encapsuladas em agarose e permeabilizadas são incubadas com Br-UTP, é visível o aparecimento de 300-500 foci de incorporação de Br-UTP que permanecem visíveis após a remoção da maioria da cromatina, indicando que os locais de síntese de RNA estão associados a um esqueleto subjacente (Jackson *et al*, 1993). O mesmo pode suceder com os locais de replicação (Hassan *et al*, 1994) e reparação de DNA (Jackson *et al*, 1994), que têm sido observados em células cuja morfologia é preservada (O'Keefe *et al*, 1992).

Embora subsistam ainda dúvidas sobre as proteínas que ligam os laços de DNA à matriz do núcleo é bastante evidente que as sequências MAR conferem propriedades funcionais particulares às regiões que delimitam, isolando-as do efeito de sequências reguladoras localizadas noutros laços adjacentes. Verifica-se, por exemplo, que os elementos A (MAR) do gene da lisozima de galinha, quando associados a um gene repórter, conferem a esse gene a propriedade de ser transcrito de uma forma independente da sua posição no genoma (Stief *et al*, 1989), e MARs de um gene de choque térmico de *Drosophila* também isolam um gene repórter da influência de domínios da cromatina exteriores a estas sequências (Kellum and Schedl, 1991).

I.6. Ordem no núcleo: domínios nucleares e posição dos cromossomas

Trabalhos publicados nos últimos anos têm demonstrado que o núcleo, embora não contendo organelos delimitados por membranas, é uma estrutura ordenada, com domínios estruturais e funcionais definidos, sendo o domínio mais óbvio o nucléolo, aonde ocorre a síntese e a montagem das subunidades ribossomais. Por sua vez o nucléolo também não é homogêneo e apresenta componentes fibrogranulares ricos em fibrilarina, e centros fibrilares ricos em RNA polimerase I (Reimer *et al*, 1988).

A organização dos cromossomas no núcleo tem sido objecto de vários estudos. Verifica-se que esta não é aleatória e que os cromossomas ocupam sempre domínios separados dentro dos núcleos embora a sua disposição varie com o tipo celular, sugerindo que a forma como os cromossomas se dispõem dentro do núcleo pode ter implicações funcionais na transcrição e na replicação do genoma, pois pode criar domínios distintos a que nem todos os factores terão acesso (Hochstrasser e Sedat, 1987; Hiraoka *et al*, 1989). A região NOR dos cromossomas, aonde se situam os genes que codificam para os rRNAs, encontra-se normalmente associada ao nucléolo, ao passo que os telómeros e os centrómeros aparecem frequentemente junto à membrana nuclear (fig I.24) (Hernandez-Verdun *et al*, 1991).

Os cromossomas politénicos das glândulas salivares de *Drosophila* dispõem-se de uma forma polarizada (Rabl) encontrando-se os telómeros associados ao envelope nuclear no topo das células e os centrómeros na extremidade oposta (Hochstrasser *et al*, 1986; Hill e Whytock, 1993). Além dos centrómeros e dos telómeros, outras regiões dos cromossomas podem estar associadas à membrana nuclear, possivelmente devido à ligação a

proteínas integrais da membrana interna do núcleo, como a LAP2 (lamin-associated protein2) (Foisner e Gerace, 1993).

Vários domínios subnucleares têm sido observados em células de mamíferos. Até agora foram descritos quatro tipos de domínios subnucleares morfológica e funcionalmente diferentes: os "nuclear dots" ou pontos nucleares, "nuclear bodies" ou corpos nucleares, "coiled bodies" ou corpos enrolados, e os PIKAs ("polimorphic interphase karyosomal association").

Os "nuclear dots" foram observados em células de vertebrados através do uso de autoanticorpos (fig 1.25). Estes domínios têm 0.2-0.3 μm de diâmetro e existem em células em interfase, desaparecendo durante a mitose. Três dos seus componentes foram descritos: um é uma proteína de 55 kDa que apresenta três isoformas com diferentes pontos isoelétricos, o segundo é uma proteína com 100 kDa e o último é uma proteína com 53 kDa que migra anormalmente em SDS-PAGE, aparentando um peso molecular de 72 kDa. Esta proteína é um ativador da transcrição, sugerindo que os nuclear dots podem estar envolvidos na activação da transcrição em regiões específicas do genoma (Ascoli e Maul, 1991; Xie *et al*, 1993).

Os "nuclear bodies" são um grupo heterogêneo de inclusões nucleares com diâmetros compreendidos entre 0.2-1.2 μm e aparência de grânulos fibrosos encapsulados por uma capa de proteínas. São locais aonde ocorre replicação de DNA sendo ricos em DNA polimerase α e PCNA ("proliferative cell nuclear antigen"). Estes domínios desaparecem durante a mitose (Hozák *et al*, 1994).

Os "coiled bodies" são inclusões ovais e esféricas com tamanho variável entre 0.3-0.9 μm e têm a aparência de feixes de fibras com nós. Estão envolvidos no processamento do pré-mRNA sendo ricos em snRNPs (contendo os RNAs U1, U2, U4/U6 e U5) (Carmo-Fonseca *et al*, 1992)

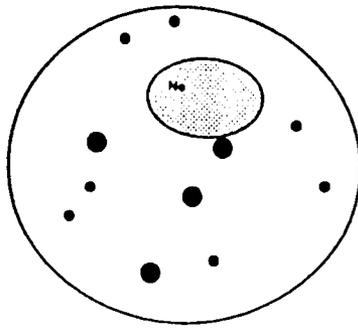


Fig I.25: Diagrama do núcleo que mostra o número aproximado e a distribuição dos "nuclear dots". Reproduzido de Ascoli e Maul, 1991.

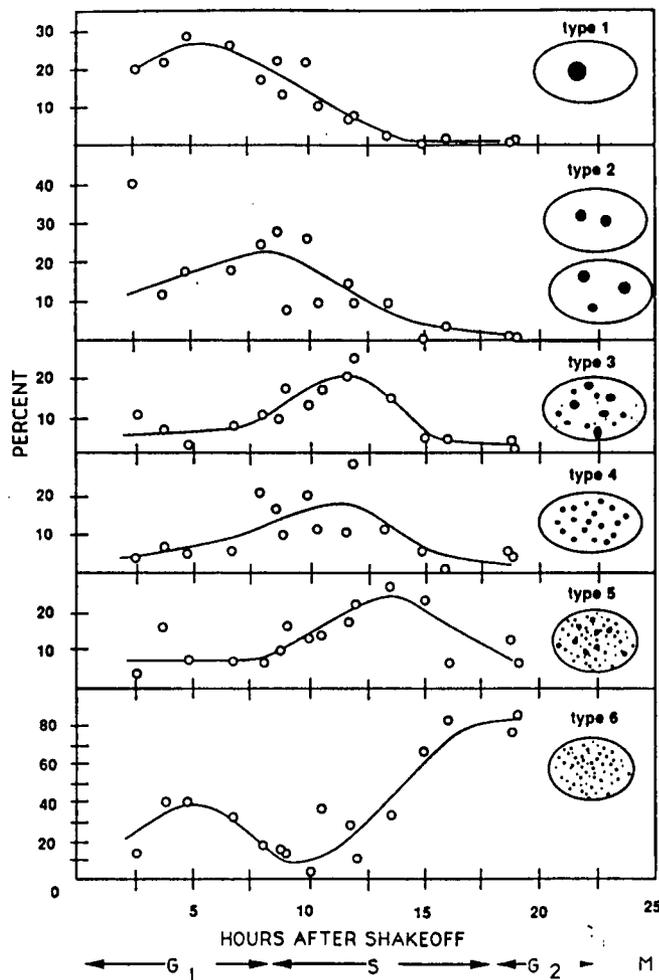


Fig I.26: Aparência morfológica dos PIKAs ao longo do ciclo celular. Reproduzido de Saunders *et al*, 1992.

Os PIKAs são o domínio descrito mais recentemente. Estes foram descobertos em células HeLa através do uso de soros autoimunes que reconhecem proteínas relacionadas, com pesos moleculares entre 23-25 kDa. A morfologia dos PIKAs varia ao longo do ciclo celular (fig I.26) e a integridade desta estrutura requer DNA, mas ainda se desconhecem as funções que os PIKAs podem desempenhar (Saunders *et al*, 1991).

I.7. Os centrómeros: Domínios especializados dos cromossomas metafásicos

O centrómero é visível citologicamente como a constrição primária dos cromossomas metafásicos (fig I.27). Esta estrutura desempenha funções essenciais durante a mitose, sendo o local aonde ocorre o emparelhamento e disjunção dos cromátídeos irmãos e também a ligação dos cromossomas aos microtúbulos do fuso acromático (revisto por Schulman e Bloom, 1991). O centrómero pode ser subdividido em três domínios funcionalmente distintos: a região interna, aonde ocorre o contacto entre os cromátídeos irmãos; a região central, que contém o grosso da cromatina centromérica e cuja estrutura é determinante na formação de um centrómero funcional; e a região exterior, ou cinetocoro, aonde ocorre a ligação aos microtúbulos (revisto por Rattner, 1991) (fig I.28). O cinetocoro é visível em microscopia electrónica como uma estrutura trilaminar (fig I.29) e contém proteínas com actividade motriz, como dineínas e cinesinas que, podem ser necessárias para o movimento dos cromossomas durante a prometáfase e a anáfase (Pfarr *et al*, 1990; Steuer *et al*, 1990).



Fig I.27: Cromossoma condensado mostrando a região do centrómero (seta).
reproduzido de Rattner, 1991.

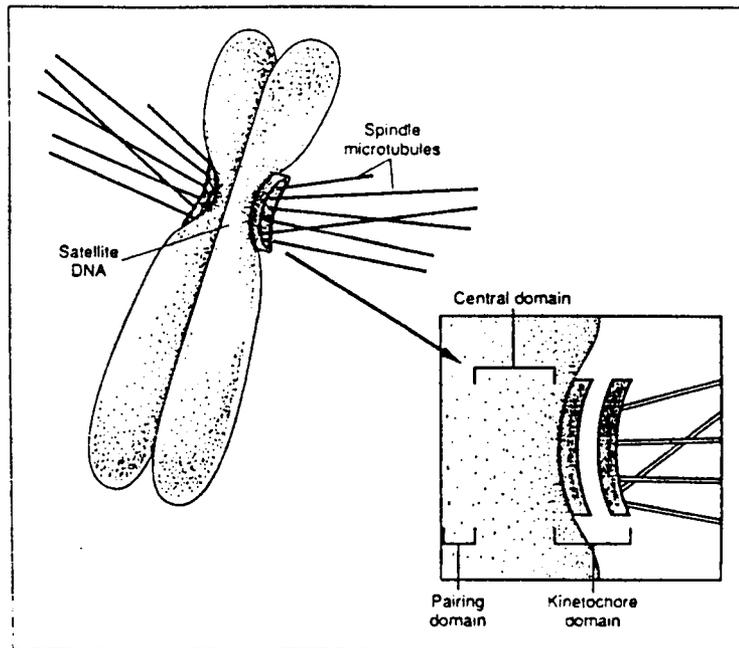


Fig I.28: Diagrama do centrómero de mamíferos, mostrando a constrição primária, o cinetocoro trilaminar, e os microtúbulos do fuso. Reproduzido de Willard, 1990.

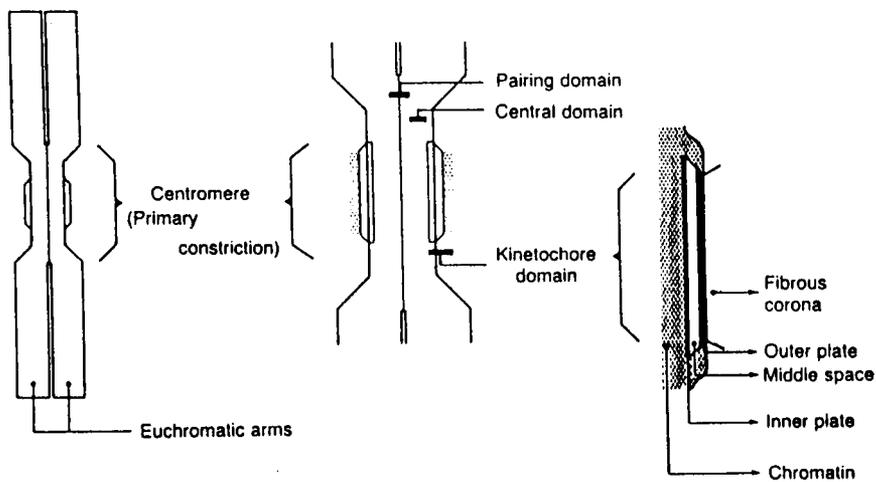


Fig I.29: Domínios do centrómero e do cinetocoro. Reproduzido de Rattner, 1991.

O centrômero é determinado por sequências de DNA que actuam em cis, isto é, a presença destas sequências num determinado local dos cromossomas determina a formação de um centrômero funcional nesse local (Pluta *et al*, 1990). Estas sequências foram identificadas nas leveduras *S. cerevisiae*, *S. pombe* e em células humanas, mas ainda não foram descritas em *Drosophila melanogaster*, embora se conheçam sequências pericentroméricas neste organismo (fig I.30) (Carmena *et al*, 1993).

A sequência de DNA do centrômero de *S. cerevisiae* é curta, tendo cerca de 125 bp de DNA, e três regiões distintas: CDEI (8 bp), CDEII (78-86 bp) e CDEIII (25 bp) (do inglês "centromere determinant") (Carbon, 1984), a última das quais é a única absolutamente requerida para a função do centrômero (fig I.31) (Clarke e Carbon, 1983). Os centrômeros de *S. pombe* e de células humanas são maiores: 40-100 kb em *S. pombe* (Clarke e Carbon, 1985) e 300-5000 kb em células humanas (Willard, 1990) e apenas têm em comum a propriedade de serem compostos por sequências repetitivas, que são diferentes nestes dois organismos. O DNA centromérico de *S. pombe* é composto por vários tipos de sequências repetidas, designadas B, K, J, L das quais só as K parecem ser essenciais, e por uma sequência única central que é específica do cromossoma e que parece ter uma estrutura especial, pois não contém nucleossomas (fig I.32) (Baum *et al*, 1994). Neste organismo, o centrômero também inclui sequências que codificam para tRNAs, mas não se sabe se são ou não transcritas *in vivo* (Takahashi *et al*, 1991). O DNA centromérico humano é composto por repetições divergentes em série de DNA satélite alfoide, um tipo de DNA que constitui cerca de 5% do genoma humano, sendo a unidade monomérica destas repetições, uma sequência de 171bp (fig I.33) (Waye e Willard, 1987). O padrão das repetições é específico de cada cromossoma.

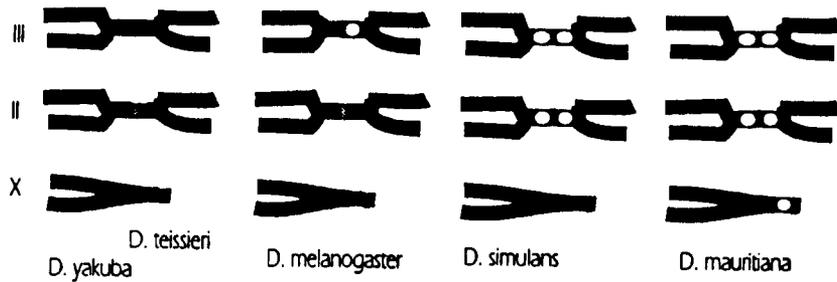


Fig I.30: Diagrama da distribuição do DNA satélite dodeca (círculo branco) nos cromossomas de cinco espécies de *Drosophila*. Esta sequência não foi encontrada em *D. teissieri* e em *D. yakuba*. Reproduzido de Carmena *et al*, 1993.

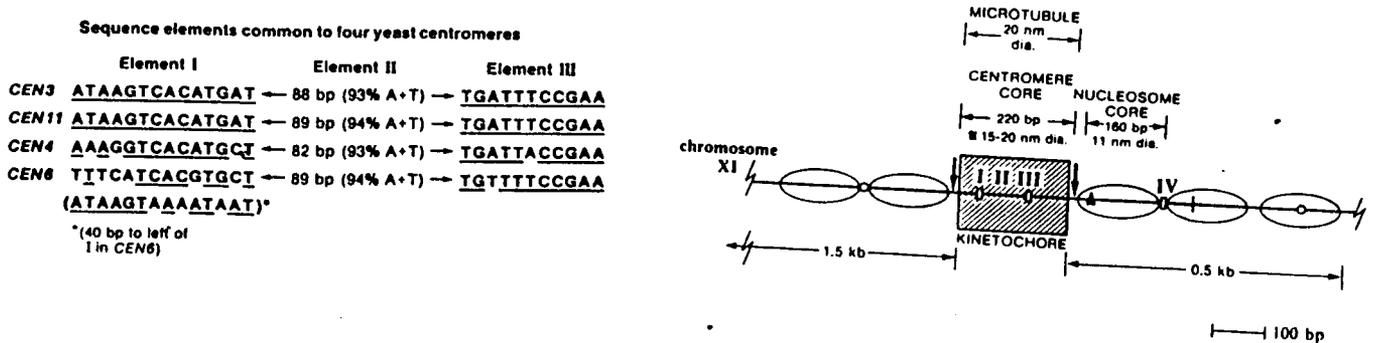


Fig I.31: A- Sequências comuns (CDEs) aos quatro centrómeros de *S. cerevisiae*. B- Esquema do centrómero do cromossoma 11 de *S. cerevisiae* mostrando a localização das sequências CDEs. Neste organismo, cada cinetocoro contacta apenas um microtúbulo do fuso. Supõe-se que a região das sequências CDEs não possui nucleossomas. Reproduzido de Carbon, 1984.

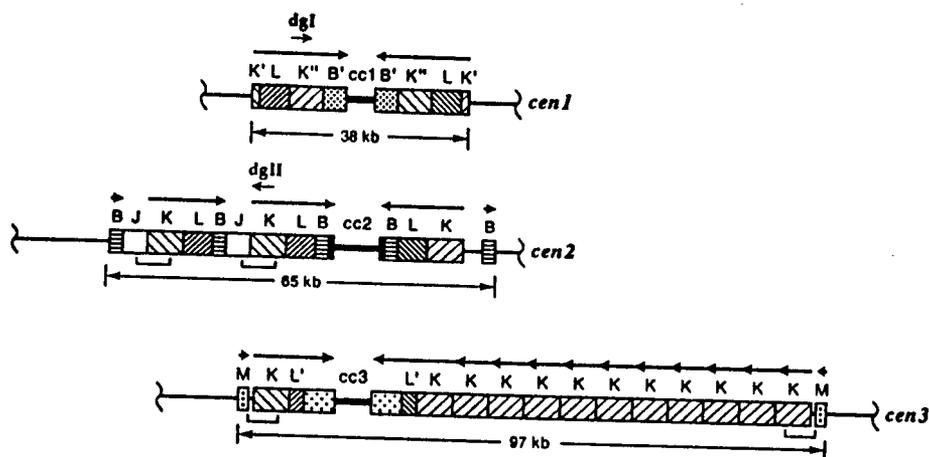


Fig I.32: Regiões centroméricas de *S. pombe*. Esquema da organização do DNA nos três centrómeros deste organismo. Cada centrómero possui uma repetição invertida (setas mais escuras) que ladeia uma sequência central (cc). Os elementos B, J, K, L e M organizam-se em repetições específicas do centrómero. Reproduzido de Baum *et al*, 1994.

O DNA satélite alfoide também é encontrado nos centrómeros de outros primatas (Haaf *et al*, 1992) e faz parte do "minor satellite" DNA de ratinho, um tipo de sequências que se localizam nos centrómeros (Sullivan e Glass, 1991).

Conhecem-se proteínas do centrómero de *S.cerevisiae* e de células humanas, mas não de *S. pombe*. Em *S. cerevisiae* foi identificada uma proteína que se liga à sequência CDEI, designada CBF1 (centromere binding factor I) (Bram e Kornberg, 1987) e um complexo proteico que reconhece a CDEIII, designado CBF3 (Lechner e Carbon, 1991). A CBF1 é uma proteína de 39 kDa, com um domínio de ligação ao DNA que apresenta estrutura do tipo "helix-loop-helix", e parece ser um activador da transcrição de vários genes, sendo necessária para a prototrofia em relação à metionina (Cai e Davis, 1990). A CBF1 pode estar envolvida na arquitectura da cromatina centromérica pois a ligação de dímeros de CBF1 á sequência CDEI, induz a formação de curvaturas na hélice (Niedenthal *et al*, 1993). No entanto, deleções do gene que codifica para esta proteína provocam um fenótipo pleiotrópico, devido ao facto de a CBF1 ser um activador geral da transcrição, mas só uma diminuição parcial (nove vezes) na fidelidade da segregação dos cromossomas (Mellor *et al*, 1990; Baker e Masison, 1990). A CBF3 é um complexo de três polipéptidos designados CBF3A (110 kDa), B (64 kDa) e C (58 kDa) cuja ligação ao DNA é dependente de fosforilação, e de factores acessórios de montagem. Pensa-se que este complexo é essencial à função do centrómero uma vez que não reconhece sequências CDEIII com mutações pontuais que eliminam função do centrómero (Lechner e Carbon, 1991). Foi descrito que o complexo CBF3 possuía uma actividade motriz do tipo da das cinesinas (Hyman *et al*, 1992), mas parece que a actividade observada era devida a contaminação da preparação

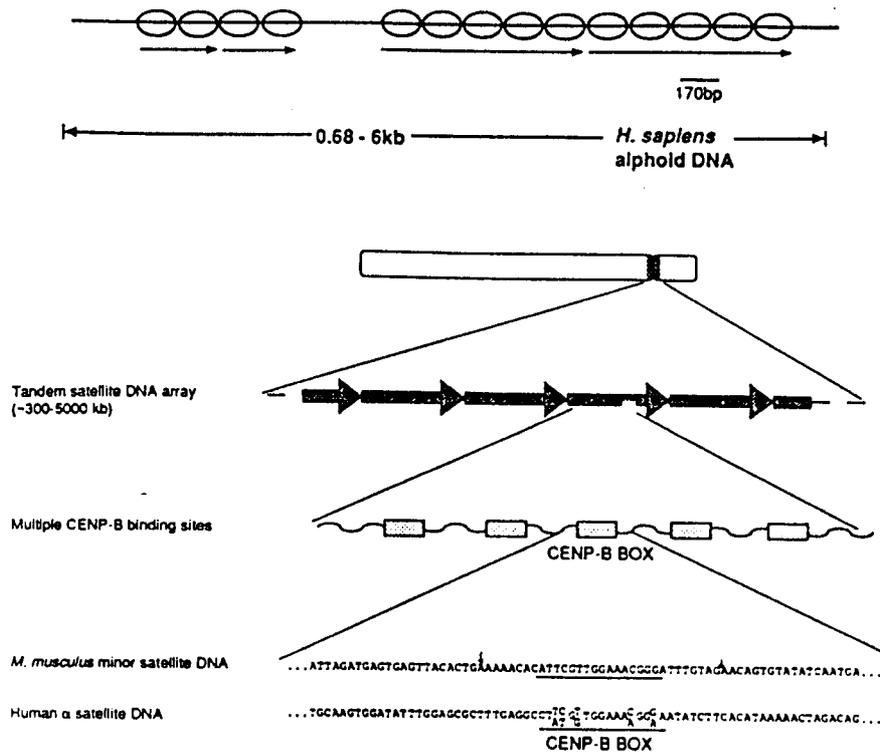


Fig I.33: A-Representação do DNA centromérico humano. As repetições alfoides estão agrupadas em dímeros ou pentâmeros, que por sua vez se organizam em repetições de 0,68-6,0 kb. As unidades maiores repetem-se 100-1000 vezes ao longo do centrómero. Reproduzido de Schulman e Bloom, 1991. **B-** Organização do DNA satélite no centrómero de mamíferos. Este consiste de repetições divergentes em série de uma sequência de 171 bp (homem) ou 120 bp (ratinho). A sequência CENP-B box, que se encontra em várias destas repetições, está indicada em baixo. Reproduzido de Willard, 1990.

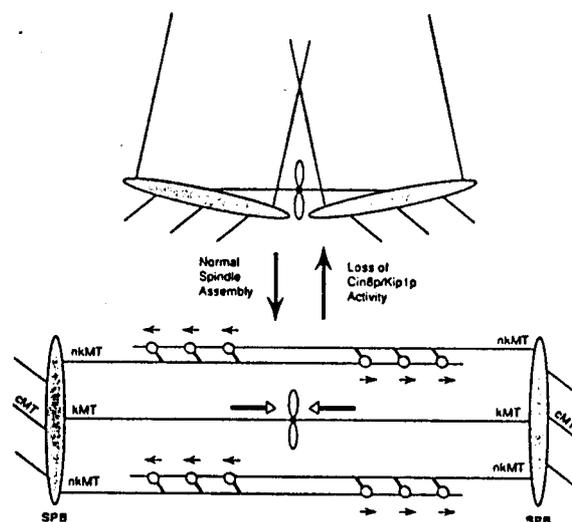


Fig I.34: Modelo da função de Cin8p/Kip1p durante a pré-anáfase. Propõe-se que a Cin8p e a Kip1p ligam entre si microtúbulos antiparalelos, fazendo com que estes deslizem, um ao longo do outro. Reproduzido de Saunders e Hoyt, 1992.

com o produto do gene KAR3 (W. C. Earnshaw, resultados não publicados), que é uma cinesina de *S. cerevisiae*, envolvida, juntamente com os produtos dos genes Kip1p e Cin8p, no movimento dos cromossomas durante a anafase (fig I.34) (Saunders e Hoyt, 1992). A proteína CBF5p que é uma proteína essencial de ligação aos microtúbulos e se localiza nos centrómeros, pode estar associada *in vivo* ao complexo CBF3, mas não é claro o papel que esta associação poderá desempenhar (Jiang *et al*, 1993).

Em células humanas, a identificação de proteínas do centrómero foi enormemente facilitada através do uso de soros autoimunes, especialmente soros de CREST, que reconhecem componentes do centrómero (Moroi *et al*, 1980; Earnshaw e Rothfield, 1985). Assim, foram identificados vários componentes, como as CLips (chromatid linking proteins), que se localizam na zona de emparelhamento dos cromátídeos (Willard, 1990); as INCENPs (inner centromere proteins) que se localizam na região interma do centrómero e são depositadas na zona central do fuso durante a anafase, aonde participam na formação do "cleavage furrow" requerido para a citocinese (fig I.35) (Earnshaw e Cooke, 1991; Cooke *et al*, 1987), e a maior parte das CENP (centromere proteins). As CENP que reagem com soros autoimunes são a CENP-A (17 kDa), CENP-B (80 kDa), CENP-C (140 kDa) e CENP-D (47 kDa). Duas outras proteínas centroméricas foram descobertas por indução de anticorpos contra o esqueleto de cromossomas. São elas a CENP-E (320 kDa) (Compton *et al*, 1991) e a CENP-F (400 kDa) (Rattner *et al*, 1993). A CENP-E é uma proteína do tipo cinesina que apresenta uma actividade motriz ao longo dos microtúbulos e pode ser necessária para o movimento dos cromossomas, uma vez que a microinjecção de anticorpos contra esta proteína bloqueia as células na transição metafase-anafase (Yen *et al*, 1991; Yen *et al* 1992).

A CENP-D é homóloga da proteína RCC1 (regulator of chromosome condensation), a qual é necessária para a entrada em mitose, mas a sua presença nos centrómeros não é ainda compreendida (Bischoff *et al*, 1990). O gene que codifica para a CENP-C foi clonado e verifica-se que esta é uma proteína que não apresenta homologias significativas com outras, embora tenha regiões com estrutura do tipo helix-loop-helix, podendo ser uma proteína que se liga ao DNA. A CENP-C localiza-se na lâmina interna do cinetocoro, sendo até agora a única proteína centromérica que se sabe estar localizada nesta estrutura (fig I.36) (Saitoh *et al*, 1992). Foi recentemente demonstrado que a presença da CENP-C nos cinetocoros é essencial à formação de cinetocoros funcionais: a microinjecção de anticorpos anti-CENP-C bloqueia a montagem dos cinetocoros e impede a entrada das células em anafase (Tomkiel *et al*, 1994). A CENP-A é uma variante centromérica da histona H3, altamente divergente, e pode estar implicada na formação de uma estrutura especial da cromatina nesta zona (Palmer *et al*, 1991). Ao contrário das outras histonas, a CENP-A não é substituída por protaminas durante a espermatogénese em mamíferos (Palmer *et al*, 1990).

A CENP-B é, até ao momento, a proteína do centrómero humano melhor caracterizada. Esta é uma proteína que se liga ao DNA (Masumoto *et al*, 1989a) com domínios helix-loop-helix (Sullivan e Glass, 1991). A CENP-B tem 65 kDa mas migra anormalmente em SDS-PAGE como uma banda de 80 kDa (Earnshaw *et al*, 1987). Esta proteína reconhece uma sequência de 17 bp existente em algumas repetições centroméricas alfoide humanas, designada CENP-B box (fig I.37) (Masumoto *et al*, 1989b). A CENP-B liga-se ao DNA sob a forma de um dímero, encontrando-se a região de ligação ao DNA no domínio N-terminal da proteína, e a região de dimerização no domínio C-terminal (fig I.38) (Yoda *et al*, 1992).

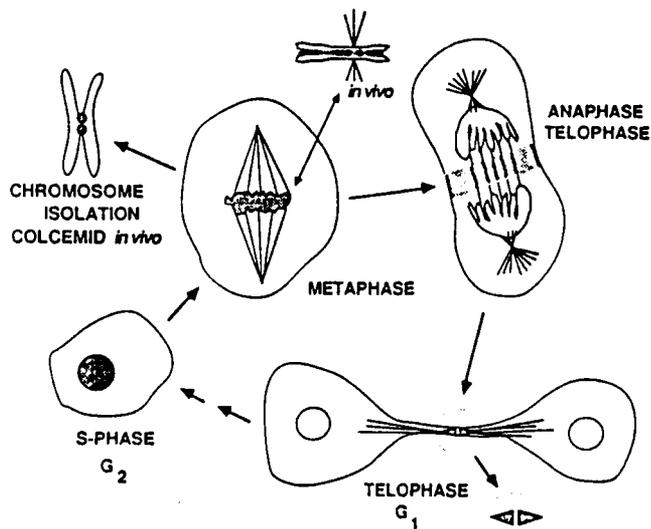


Fig I.35: Localização das INCENPs ao longo do ciclo celular. Reproduzido de Cooke *et al*, 1987.

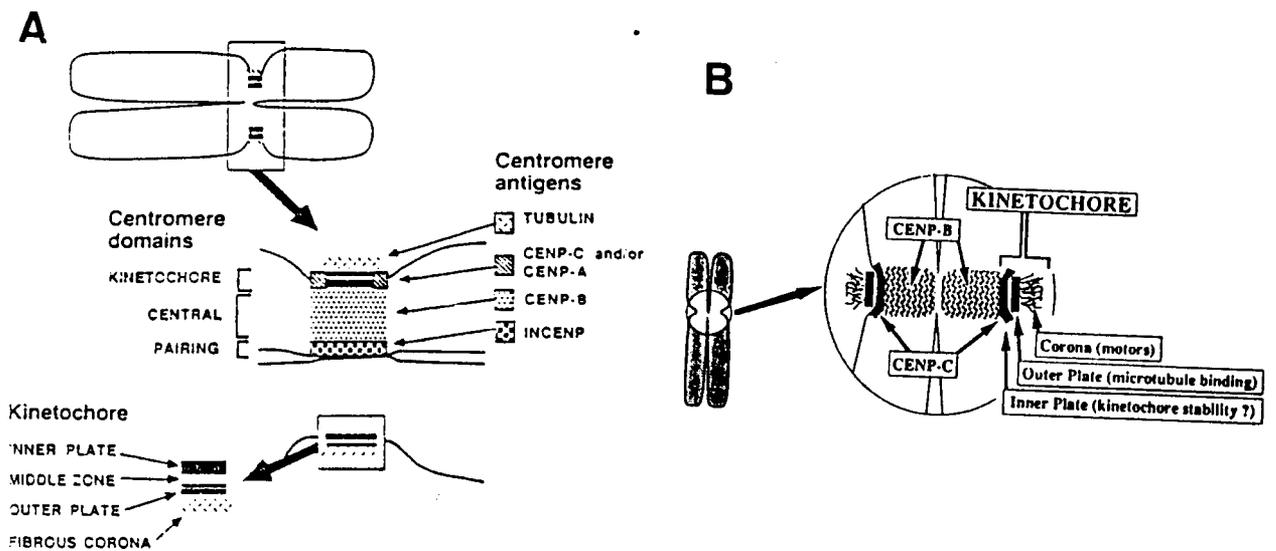


Fig I.36: A- Esquema do centrômero de um cromossoma metafásico humano, indicando os domínios estruturais do cinetocoro e as respectivas funções. As localizações das CENPs B e C também estão representadas no desenho. Reproduzido de Saitoh *et al*, 1992. B- Desenho do centrômero dos cromossomas de mamíferos mostrando os vários domínios e a localização dos antígenos. reproduzido de Pluta *et al*, 1990.

CTTCGTTGGAAACGGGA
GAAGCAACCTTTGCCCT

Fig I.37: Sequência da CENP-B box. Reproduzido de Masumoto *et al*, 1989.

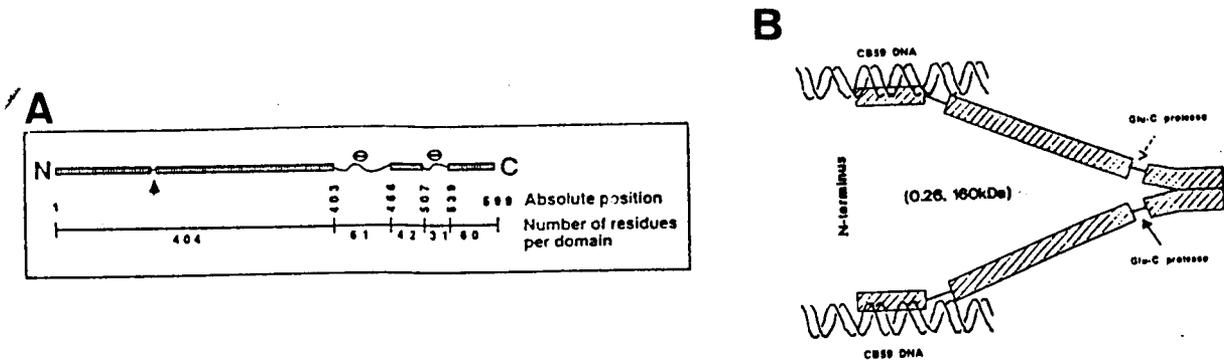


Fig I.38: A- Organização em domínios da CENP-B. Reproduzido de Pluta *et al*, 1990. B - Estrutura hipotética dos dímeros de CENP-B ligados a duas hélices de DNA. reproduzido de Yoda *et al*, 1992.

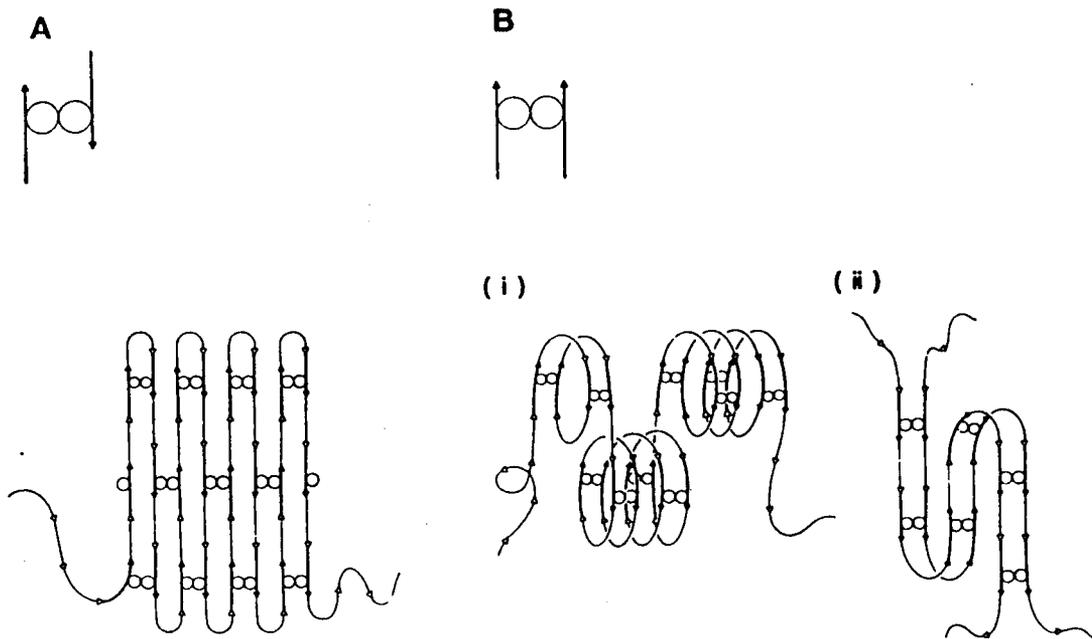


Fig I.39: Modelos das estruturas formadas pelo DNA alfoide e pela CENP-B. Em A e B, um dímero de CENP-B forma uma "ponte" entre duas hélices de DNA, que podem ser paralelas (B) ou antiparalelas (A). Em (i) e (ii) representam-se estruturas formadas pela repetição em série de DNA alfoide e conseqüente ligação de vários dímeros de CENP-B. Reproduzido de Muro *et al*, 1992.

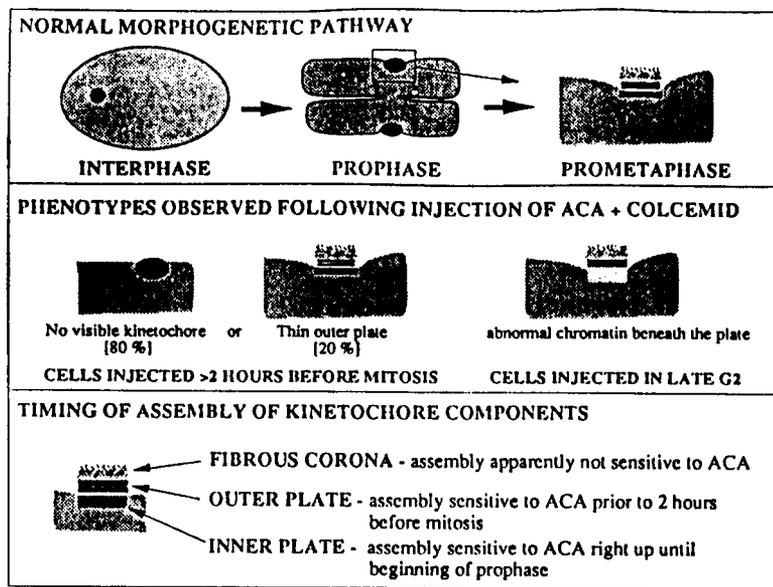


Fig I.40: Resumo das alterações na morfologia do cinetocoro observadas normalmente durante o ciclo celular, e alterações estruturais provocadas por microinjecção de soros de CREST no início e no final da mitose. Reproduzido de Bernat *et al*, 1991.

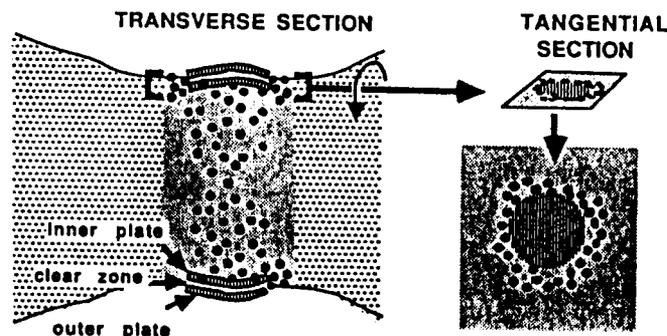


Fig I.41: Imunolocalização da CENP-B em cromossomas mitóticos por imuno-electromicroscopia. Os pontos pretos representam a distribuição das partículas de ouro em secções transversais e tangenciais do centrómero. Reproduzido de Cooke *et al*, 1990.

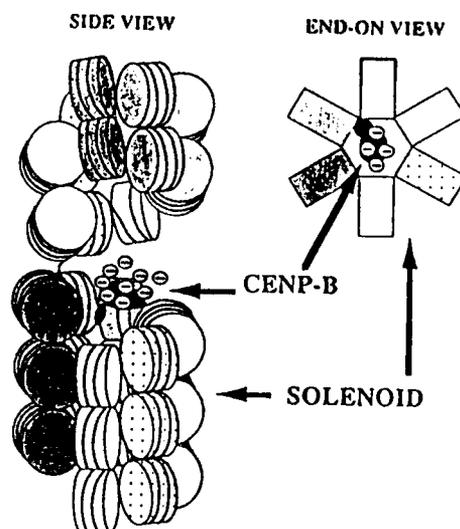


Fig 1.42 A ligação da CENP-B ao DNA satélite alfa deve afectar a estrutura da fibra de 30 nm. O espaçamento das sequências CENP-B box ao longo do DNA alfoide permite prevêr que estas se localizam no interior da solenoide. A ligação de uma proteína carregada negativamente, como é o caso da CENP-B, deve perturbar a continuidade da solenoide. Reproduzido de Pluta *et al*, 1992.

Este último domínio é extremamente ácido e é responsável pela migração anormal da proteína em geis (Pluta *et al*, 1992). A CENP-B na sua forma de dímero pode-se ligar a duas moléculas de DNA através dos domínios N-terminais livres, formando uma ligação cruzada entre as duas hélices (fig I.39) (Muro *et al*, 1992). Esta proteína parece ser requerida para a função do centrómero, uma vez que a microinjecção de soros de CREST que reconhecem apenas a CENP-B em "western", impedem a formação de um centrómero funcional (fig I.40) (Bernat *et al*, 1990), e localiza-se no domínio central do centrómero (fig I.41), na heterocromatina subjacente ao cinetocoro, aonde se pensa que desempenhará um papel estrutural, implicado na conformação especial que a cromatina assume nesta zona (fig I.43) (Cooke *et al*, 1990).

Em *Drosophila melanogaster* só uma proteína que se associa transitóriamente com os centrómeros durante a anafase foi identificada - ZW(10) (Williams *et al*, 1992). A ZW(10) é essencial para a segregação correcta dos cromossomas e a sua localização centromérica é alterada nos mutantes mitóticos *rod* e *aar*, mostrando que os produtos destes genes devem interagir com a ZW(10) de modo a possibilitar a sua localização nos centrómeros (Williams e Goldberg, 1994).

I.8. A estrutura dos centrómeros: um modelo

Embora a função dos centrómeros dos cromossomas eucarióticos seja conservada ao longo da evolução, a sua aparência e composição variam consideravelmente de espécie para espécie. Os cromossomas de mamíferos bem como os de vários outros eucariotas, possuem centrómeros localizados na constrição primária e que apresentam cinetocoros com a composição trilaminar discutida na secção anterior. Esta organização é encontrada em organismos filogeneticamente tão distantes como as diatomáceas e o homem. Outros organismos, incluindo plantas superiores e alguns insectos, apresentam centrómeros também localizados na constrição primária mas cujos cinetocoros não têm aparência trilaminar, mas sim uma forma arredondada (Rieder, 1982; Brinkley *et al*, 1989). Em vermes, insectos ortopteranos, e plantas monocotiledóneas, os cromossomas não possuem constrição primária, e apresentam cinetocoros difusos, ou holocêntricos, que se estendem ao longo de todo o cromossoma (Rieder 1982; Brinkley *et al*, 1989). Nalguns organismos, como *S. cerevisiae*, não são visíveis cinetocoros nos cromossomas mitóticos e meióticos, e os microtubúlos do fuso parecem ligar-se directamente à cromatina (Peterson e Ris, 1976).

Dada a diversidade de padrões estruturais na natureza é difícil conceber um mecanismo comum que explique a evolução de vários tipos de centrómeros nos cromossomas eucarióticos. Também não é fácil compreender como é que cinetocoros com morfologias tão diversas se integram num mecanismo geral de organização da cromatina centromérica. Independentemente da morfologia e da composição do centrómero, os cinetocoros de todas as espécies podem ser identificados como fragmentos curtos, com capacidade de ligação aos microtubúlos do fuso mitótico,

arranjados como repetições descontínuas ao longo de uma fibra de DNA. Assim, a organização do cinetocoro em diversas espécies parece ser um produto do arranjo espacial de unidades da fibra cromática, ou módulos, que tem como consequência a montagem das proteínas do cinetocoro numa massa funcional contínua (fig I.43) (Zinkowski *et al*, 1991).

O centrómero de eucariotas superiores parece ser montado a partir da condensação de subunidades funcionalmente similares e repetidas, ao longo da fibra de DNA. Esta estrutura modular pode explicar a diversidade de centrómeros que ocorre na natureza. O modelo ilustrado na fig. representa o centrómero de cromossomas de mamíferos. Aqui, o centrómero é mostrado como um par de fibras de DNA com 30 nm, que consistem de elementos múltiplos montados em série, intercalados com outras sequências de DNA de tamanhos variáveis. Quando ocorre a condensação dos cromossomas durante a mitose, interações entre proteínas estruturais do centrómero (como a CENP-B) e as sequências heterocromáticas repetitivas, determinam o arranjo espacial ordenado de um certo número específico de sequências de DNA à superfície do centrómero, formando os locais de montagem dos cinetocoros funcionais (Zinkowski *et al*, 1991).

Este modelo da organização modular do centrómero explica também vários dados experimentais. Por exemplo, o tratamento de núcleos com hidroxureia e cafeína provoca a fragmentação dos cinetocoros em pedaços que retêm a capacidade de se ligarem aos microtúbulos do fuso mitótico e de se movimentarem ao longo deles (Zinkowski *et al*, 1989), o que seria uma consequência directa do facto de o cinetocoro ser composto por subunidades.

O modelo proposto responde a várias questões sobre a evolução dos cromossomas. A região do centrómero é um local aonde ocorreu com frequência rearranjos e recombinações, ao longo da evolução. Uma

organização do centrómero em subunidades pode permitir quebras e trocas extensas, deleções, duplicações e inversões sem que se perca a funcionalidade da estrutura, e os centrómeros dos organismos actuais podem resultar de duplicação e rearranjos de subunidades primordiais (Zinkowski *et al*, 1991).

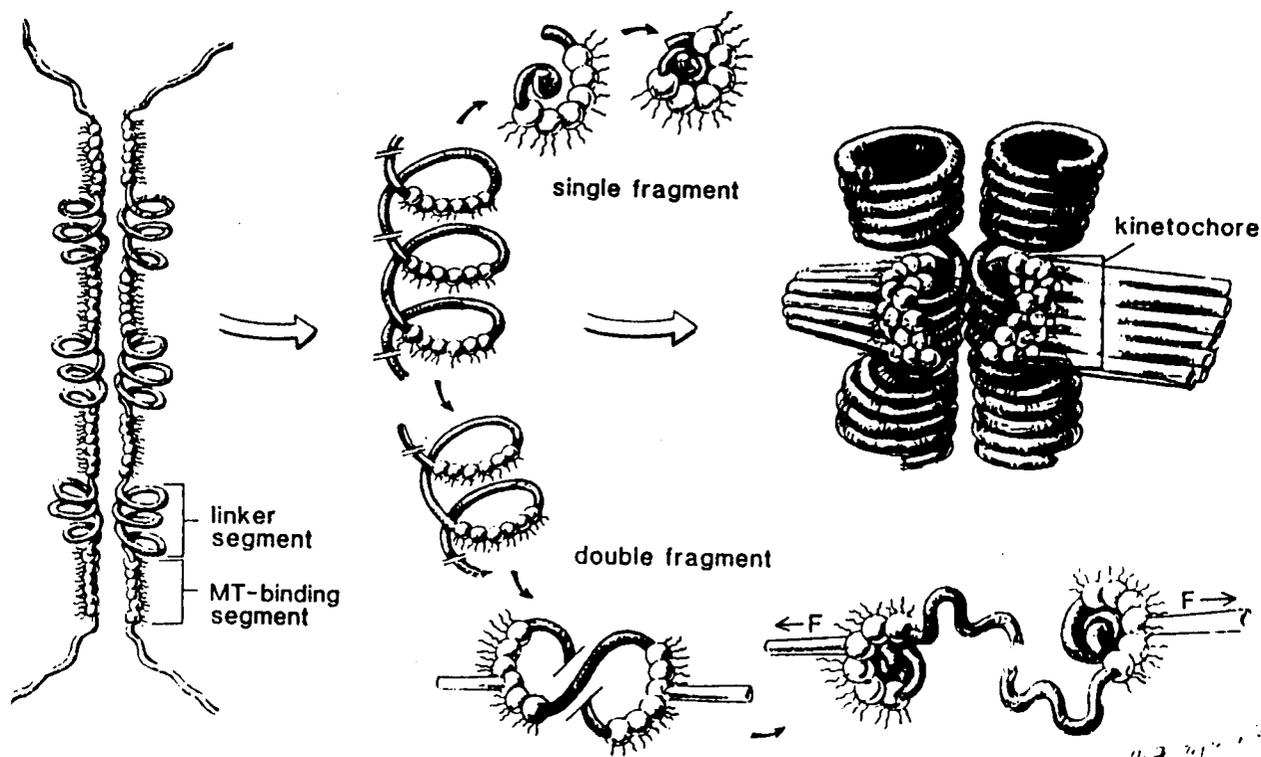


Fig 1.43: Modelo da estrutura do centrómero. À esquerda representa-se o centrómero de um cromossoma replicado. O centrómero de cada cromatídeo consiste de uma fibra de 30 nm que se prolonga pelos braços dos cromossomas. *In vivo* os centrómeros dos dois cromatídeos não estão separados, mas são assim representados na figura por razões de simplicidade. O cinetocoro forma-se por condensação de domínios repetitivos dispostos em série e intercalados por sequências de DNA de comprimento desconhecido. Reproduzido de Zinkowski *et al*, 1991.

I.9. Razões para a pesquisa de homólogos funcionais de CENP-B em *Drosophila melanogaster*

Os centrómeros são estruturas essenciais à fidelidade da segregação cromossômica (Carbon, 1984). Embora a composição dos centrómeros de *S. cerevisiae* se encontre relativamente bem elucidada e seja já possível construir cromossomas artificiais de levedura (YACs, "yeast artificial chromosomes") com centrómeros funcionais, tal não sucede no caso de eucariotas superiores. Nestes organismos, a composição do DNA centromérico diverge consideravelmente das repetições simples que compoem o centrómero de *S. cerevisiae*, e ainda não foi possível construir cromossomas artificiais de mamíferos ou de *Drosophila*. A construção destes cromossomas teria um grande impacto no estudo da expressão dos genes e na evolução de técnicas para terapia de doenças genéticas.

A *Drosophila melanogaster* é um organismo que tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas, quer a nível genético, quer a nível de biologia molecular. Estes trabalhos permitiram elucidar diversos processos como o desenvolvimento do organismo, a divisão celular, a formação de heterocromatina, e a memória celular. Mais tarde verificou-se que estes processos são conservados ao longo da escala filogenética, e foi possível identificar vários genes humanos envolvidos nestas vias biológicas. Assim, o estudo de *Drosophila* tem permitido um avanço notável na compreensão da biologia molecular dos mamíferos, e é de crer que a análise dos centrómeros dos seus cromossomas venha a elucidar questões que ainda se colocam relativamente à composição destas estruturas em células humanas, uma vez que a *Drosophila* é um organismo bastante acessível à análise genética.

Na perspectiva do modelo centromérico de repetição de subunidades, considera-se que os centrómeros, embora sejam diferentes quer a nível de composição proteica quer de DNA, são funcionalmente semelhantes (Zinkowski *et al*, 1991). Esta semelhança deverá reflectir uma conservação de componentes (a nível da sua função) que parece resultar essencialmente na formação de uma estrutura da cromatina com uma topologia particular. A CENP-B parece ter um papel determinante na formação do centrómero humano, dada a sua localização e as consequências da inibição da sua função por microinjecção de anticorpos (Bernat *et al*, 1990; Cooke *et al*, 1990). Assim sendo, é pertinente considerar a existência de homólogos funcionais da CENP-B em organismos filogeneticamente distantes do homem, como a *Drosophila melanogaster*.

Neste trabalho utilizou-se uma abordagem funcional para a identificação e purificação de análogos de CENP-B em *D. melanogaster*. Com base na actividade de ligação específica a sequências do DNA centromérico humano foi possível isolar três proteínas de *Drosophila* que apresentam uma localização cromossomal ao longo do ciclo celular. O isolamento destas proteínas permitiu já iniciar a pesquisa dos seus genes, cuja caracterização abrirá caminho a uma análise genética das funções que desempenham.

II MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Estirpes de *Drosophila melanogaster* e linhas celulares

Neste trabalho usaram-se as estirpes selvagens de *Drosophila melanogaster*, Oregon R e Canton S que foram mantidas à temperatura ambiente, e a 18°C, em meio próprio (Ashburner, 1989). As linhas celulares utilizadas foram a linha Kc (*Drosophila melanogaster*) e a linha Hep2 (humana). Os stocks de células Kc e Hep2 eram mantidos em azoto líquido e descongelados quando necessário. As células Kc cresceram a 26°C em meio D22 (Sigma) com 5% de FCS (soro fetal bovino) (GIBCO). As células Hep2 cresceram a 37°C, com 7% de CO₂, em meio DMEM (GIBCO) com 10% FCS. A ambos os meios foi adicionada uma solução de penicilina, estreptomicina e fungizona (GIBCO #15240), sendo a diluição final de 100X. As células eram observadas num microscópio invertido Nikon e contadas numa câmara de NewBauer.

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

II.2. Congelação e descongelação das linhas celulares

Células em crescimento exponencial eram recolhidas por centrifugação a baixa velocidade (1000 rpm, 5-15 min, centrífuga de bancada) e ressuspensas em 90% de FCS, 10% de DMSO. Os criotubos eram congelados 1 h a -20°C, 12 h a -70°C e depois transferidos para azoto líquido.

Para descongelar as células, os criotubos eram aquecidos rapidamente nas mãos, as células eram lavadas, por centrifugação, com 10 ml do meio apropriado, e ressuspendidas no volume final de meio de cultura.

II.3. Transformações de células com plasmídeos

Células *E. coli* XL-1 Blue foram transformadas segundo o método de permeabilização com cloreto de cálcio, e selecionadas em placas de L-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina, IPTG e X-GAL (Sambrook *et al*, 1990)

II.4. Preparações de plasmídeos

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

Meio LB - 10 g/L de Triptona; 5 g/L de extracto de levedura; 5 g/L NaCl.

II.5. Doseamento de DNA, de proteínas, e contagem de radioactividade

O DNA em cadeia dupla foi doseado num fluorímetro Hoeffler. O DNA em cadeia simples foi doseado por leitura da A260 num espectrofotómetro. As proteínas foram doseadas segundo o método de Bradford usando um conjunto de reagentes da Stratagene (Bradford, 1976). A radioactividade foi contada num contador de cintilações Beckman após precipitação ácida do DNA (Sambrook *et al*, 1989).

II.6. Cortes de moléculas de DNA com enzimas de restrição e ligações de fragmentos de DNA

Os cortes de DNA com enzimas de restrição e as ligações de fragmentos de DNA foram efectuados com enzimas da Boehringer Mannheim, da BioLabs, ou da USB, usando as soluções e os protocolos fornecidos pelas casas comerciais.

II.7. Recuperação de fragmentos de DNA de geis de agarose e de poliacrilamida

Fragmentos de DNA com mais de 100 bp eram recuperados de geis de agarose por excisão da banda corada com brometo de etídeo (Sambrook *et al*,

1990). O fragmento de agarose contendo o DNA era colocado num eppendorff furado na base, e contendo lâ de vidro silanizada. Este era congelado a -20°C e o DNA recuperado por centrifugação (15 min, centrífuga eppendorff de bancada). A solução final obtida, era concentrada por extração da água com n-butanol, lavagem com etanol a 70%, e solubilização final em ddH₂O (Sambrook *et al*, 1990).

Fragmentos mais pequenos eram recuperados de geis de poliacrilamida por difusão passiva para ddH₂O, a 37°C , durante pelo menos 12 h. A solução era concentrada segundo o mesmo processo de extração com n-butanol.

II.8. Geis de agarose e de poliacrilamida

Os geis de agarose foram feitos em TAE (Sambrook *et al*, 1990) e os geis de poliacrilamida com SDS, foram feitos segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970), usando o protocolo descrito nos catálogos da Hoeffer.

Nos geis de agarose usou-se como padrão de peso molecular o DNA do fago λ digerido com *HindIII*. Nos geis de poliacrilamida utilizaram-se padrões da Pharmacia.

Tampão Tris-acetato 10X (TAE 10X) - 48,4 g/L de Tris base; 11,4 ml/L de ácido acético; 9,3 g/L de EDTA.

II.9. Marcação radioactiva de DNA por preenchimento de extremidades com Klenow

O DNA era cortado com as enzimas de restrição em tampões apropriados. À mistura de reacção (Vt - 20 µl) adicionava-se 1 µl de solução de nucleótidos, 1 µl de [α - 32 P]dCTP (Amersham) e 1 U do fragmento Klenow da DNA polimerase I. A reacção prosseguia durante 15 min à temperatura ambiente, e separavam-se os nucleótidos livres por electroforese em geis de agarose.

Mistura de nucleótidos - 2 mM dATP; 2 mM dGTP; 2mM dTTP

II.10. Marcação radioactiva de oligonucleótidos por fosforilação das extremidades

Oligonucleótidos em cadeia dupla eram fosforilados com [γ - 32 P]ATP (Amersham) e T4 Polinucleótido Cinase, utilizando as soluções e os protocolos fornecidos pelas casas comerciais (Boehringer Mannheim ou USB). Os nucleótidos livres eram separados por electroforese em geis de poliacrilamida.

II.11. Plasmídeos e sondas

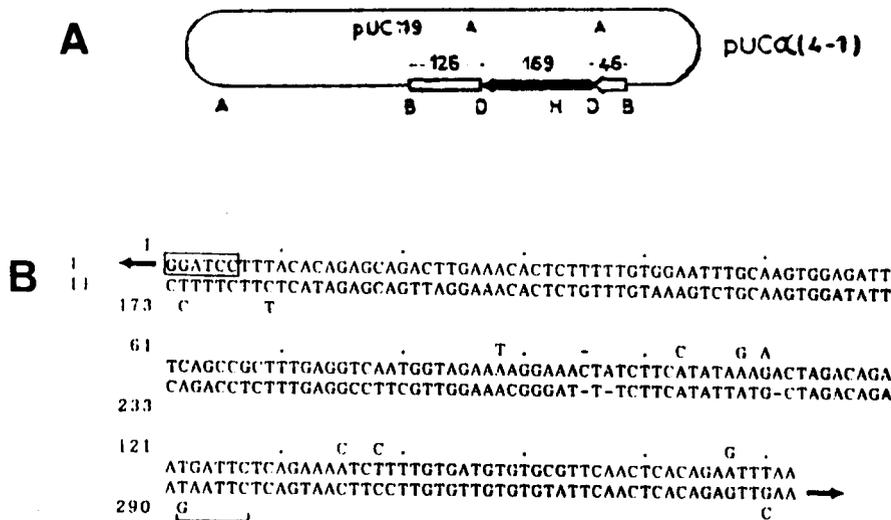


Fig II.1: A - Mapa do plasmídeo $\alpha(4-1)$. As inserções de DNA alfoide são representadas por setas ou caixas. B - locais de corte por *Bam*HI. D - locais de corte por *Dde*I. Reproduzido de Masumoto *et al*, 1989 b. B - Sequência do fragmento com 341 bp de DNA alfa, obtido por restrição do plasmídeo $\alpha(4-1)$ com *Bam*HI. Reproduzido de Masumoto *et al*, 1989 a.

O plasmídeo $\alpha(4-1)$ (Masumoto *et al*, 1989) contém um fragmento com 341 bp de DNA satélite alfoide humano, inserido no local *Bam*HI do plasmídeo pUC119 (fig II.1). O fragmento possui uma única CENP-B box e foi usado para geis de retardação após preenchimento dos terminais com o fragmento Klenow da DNA polimerase I e $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham).

O mesmo fragmento foi usado para ensaios de protecção à digestão por DNase I. O plasmídeo foi digerido com *Hinc*II/*Sma*I e, para a marcação da cadeia L o fragmento foi marcado por preenchimento da extremidade livre

com Klenow e [α - 32 P]dCTP. Para marcação da cadeia R, o fragmento foi marcado com [γ - 32 P]dATP e T4 Polinucleótido Cinase.

O seguinte oligonucleótido foi sintetizado quimicamente (MedProbe), baseado na sequência da CENP-B box publicada por Masumoto *et al* (1989), e usado como sonda ou para a construção da colunade afinidade:

5'CTAGCTTCGTTGGAAACGGGA3'/3'GAAGCAACCTTTGCCCTGATC5

O oligonucleótido CENP-B box foi usado para geis de retardação através do preenchimento das extremidades com Klenow, ou fosforilação com T4 Polinucleótido Cinase. Um concatâmero do oligonucleótido com 210 bp foi inserido no local *XbaI* do vector pKs+. Este fragmento foi também usado em geis de retardação após preenchimento das extremidades com Klenow.

II.12. Construção da coluna de afinidade CENP-B box-Sepharose

A coluna de afinidade foi contruida com base no protocolo descrito por Kadonaga e Tjian (1986).

Os oligonucleótidos em cadeia simples (cerca de 500 μ g cada) foram solubilizados em 280 μ l de ddH₂O. Adicionou-se 40 μ l do tampão PNK (10X) e as cadeias foram emparelhadas por incubação a 88°C 5min, 65°C 10min, 37°C 10min e 5min à temperatura ambiente. Os terminais 5' dos oligonucleótidos eram fosforilados por adição de 60 μ l de solução de ATP, 5

μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, 20 μl de T4 Polinucleótido Cinase (Vt - 400 μl) e incubação a 37°C durante 2h. A mistura foi incubada a 65°C 20min, extraída uma vez com TFC e duas vezes com CIA. O DNA foi precipitado por centrifugação após adição de 40 μl de LiCl 4M e 1 ml de etanol, e lavado com etanol a 70%. Após secagem, o DNA foi dissolvido em 195 μl de ddH₂O e ligado, de modo a formar concatâmeros, por adição de 30 μl de tampão de ligação, 60 μl de mistura de ATP, 15 μl (2000 U) de T4 DNA Ligase e incubação a 17,5°C durante a noite. A formação de concatâmeros foi analisada por electroforese em geis de agarose. O ATP livre foi removido por precipitação do DNA com 400 μl de Isopropanol, após a adição de 100 μl de acetato de amónia 10 M e extração com 500 μl de TFC (1X) e CIA (2X),

2,5 g de Sepharose activada com CNBr (Pharmacia) foram hidratados em HCl 1 mM e lavados com 500 ml desta solução num funil Millipore. A resina foi ainda lavada com 300 ml de ddH₂O e 100 ml de Fosfato de Potássio 10 mM (pH 8,0), transferida para um tubo de plástico com 15 ml, e ressuspendida em 4 ml deste último tampão. À mistura adicionaram-se os concatâmeros do oligonucleótido, e a reacção de ligação à matriz prosseguiu durante 16h à temperatura ambiente, com agitação suave. A resina foi lavada com 200 ml de ddH₂O e 100 ml de etanolamina-HCl (pH 8,0). Os primeiros 10 ml da água de lavagem eram recolhidos para determinação da radioactividade, de modo a calcular a percentagem de incorporação (típicamente superior a 90%). Os grupos CNBr livres da resina foram bloqueados por incubação com 4 ml de Etanolamina-HCl (pH 8,0) durante 4h, à temperatura ambiente, com agitação suave. A Sepharose foi lavada sucessivamente com 100 ml de: fosfato de potássio 10 mM pH 8,0; fosfato de potássio 1 M pH 8,0; KCl 1 M; ddH₂O; e tampão de armazenamento da

coluna. A Sepharose-CENP-B box (Vf - 10 ml) foi empacotada numa coluna de vidro da Pharmacia e mantida a 4°C em tampão de armazenamento.

PNK (10X) - Tris.HCl 500 mM (pH 7,5); MgCl₂ 100 mM; espermidina 10 mM; EDTA 10 mM

Mistura de ATP - ATP 20 mM; DTT 20 mM

TFC - Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1

CIA - Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1

Tampão de ligação (10X) - Tris.HCl 700 mM pH 7,5; MgCl₂ 100 mM

Tampão de armazenamento da coluna - NaCl 0,3 M; Tris.HCl 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM; NaN₃ 0,02%

II.13. Extracção de proteínas nucleares de células Kc e Hep2

As células Kc de 1L de cultura a cerca de 5×10^6 células/ml eram recolhidas por centrifugação a 2000 rpm, durante 5 min, numa centrífuga de bancada refrigerada. Lavavam-se duas vezes com 40 ml de PBS e ressuspensavam-se em 3-4 ml de tampão A. As células eram lisadas num homogenizador Heidolph a velocidade baixa (10X), e a lise era esporadicamente controlada por observação da preparação corada com Hoechst 33258, num microscópio de fluorescência Zeiss. Os núcleos eram recolhidos por centrifugação através de uma almofada de sacarose 0,3 M em tampão A (30 min, 4°C, 8000 rpm, tubos Corex, rotor HB-4, Sorvall RC-5B). A sacarose era removida por lavagem dos núcleos (cerca de 1 ml) com 10 ml de tampão B, e estes eram lisados por adição de 10 ml de tampão de lise e

incubação em gelo durante 30 min com agitação ocasional no vortex. O lisado era mantido a -80°C e descongelado a 4°C.

Os lisados nucleares das células Hep2 eram preparados de forma semelhantes, excepto que estas células não eram lavadas por centrifugação, uma vez que são aderentes, e eram lisadas sem que fosse necessário juntar TritonX-100 ao tampão A.

Os resquícios nucleares e o DNA eram removidos por centrifugação a 150000g durante 1h, a 4°C, numa ultracentrífuga IEC. O sobrenadante era dializado durante a noite contra BB sem glicerol, e o precipitado formado durante a diálise era removido por centrifugação a 15000 rpm (30 min, 4°C, tubos Corex, rotor SS-34, Sorvall RC-5B).

Todos os procedimentos foram efectuados a 4°C, excepto quando especificado.

PBS - 9g/L de NaCl; 1,4 g/L de hidrogenofosfato de sódio monohidratado; 0,117 ml de ácido fosfórico. pH final - 7.4

Tampão A - Tris.HCl 15 mM (pH 7,4), 0,01% de TritonX-100; sacarose 0,23 M; KCl 60 mM; NaCl 15 mM; MgCl₂ 25 mM; EGTA 0,5 mM; espermidina 0,15 mM; espermina 0,15 mM; 2-mercaptoetanol 14 mM; NaF 2 mM; 2-glicerofosfato 2 mM; PMSF 0,1 mM

Tampão B - Tris.HCl 10 mM (pH 7,5); NaCl 100 mM

Tampão de lise - Tris.HCl 10 mM (pH 7,5); NaCl 1M; EDTA 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; NaF 2 mM; 2-glicerofosfato 2 mM; PMSF 0,1 mM

BB - Hepes 10 mM (pH 7,9); KCl 60 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 1 mM; 10% de glicerol; 2 mM NaF; 2 mM 2-glicerofosfato; 0,1 mM PMSF

II.14. Purificação das proteínas

Extractos nucleares dialisados (cerca de 20ml/L cultura) foram aplicados a uma coluna de DE52 (Whatman) com 30 ml de resina, equilibrada com BB+KCl 60 mM. A coluna foi lavada com 200 ml de BB, e eluída com 100 ml de BB+KCl 250 mM e 100 ml de BB+NaCl 2M, a uma velocidade aproximada de 40 ml/h. A presença de proteínas nas fracções recolhidas (8 ml cada) foi determinada por leitura da A_{280} . As proteínas foram dialisadas contra BB+KCl 60 mM e a actividade de ligação ao DNA era seguida por ensaios de retardação em gel.

A fracção que apresentava actividade específica de ligação à sequência CENP-B box (eluída da coluna de troca iónica com KCl 0,25 M) era aplicada à coluna CENP-B box-Sepharose equilibrada em BB+KCl 60 mM+0,01% Tween 20. A coluna era lavada com este tampão e eluída com BB+KCl 250 mM+0,01% Tween 20, e BB+KCl 1M+0,01% Tween 20, à velocidade aproximada de 20 ml/h. As fracções (2-3 ml cada) contendo proteínas foram dialisadas contra BB+KCl 60 mM e concentradas em sistemas Centricon 100 (Amicon), após o que se adicionava glicerol até 10% ,e se congelavam a -80°C em aliquotas. Todas as fracções obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração com prata (Morrissey, 1979).

Ambas as colunas eram regeneradas com solução de regeneração, não se detectando a eluição de qualquer proteína durante este processo, e foram guardadas a 4°C em tampão de armazenamento.

As cromatografias e diálises decorreram a 4°C, numa câmara fria.

BB - Hepes 10 mM (pH 7,9); MgCl₂ 1 mM; DTT 1 mM; 2 mM NaF; 2 mM 2-glicerofosfato; 0,1 mM PMSF

Tampão de regeneração - Tris.HCl 10 mM (pH 7,5); NaCl 2,5 M; EDTA 1 mM

Tampão de armazenamento da coluna - NaCl 0,3 M; Tris.HCl 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM; NaN_3 0,02%

II.15. "Western Blots" e tratamento com fosfatase

Proteínas separadas em geis de poliacrilamida com SDS foram transferidas eléctricamente para membranas de nitrocelulose (Towbin, 1979) em aparelhos Hoeffer. As membranas foram bloqueadas, incubadas com o primeiro anticorpo, lavadas, incubadas com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase (Vector Labs), e reveladas por quimioluminescência usando o sistema ECL da Amersham e seguindo o protocolo que acompanha estes produtos.

Para o tratamento com fosfatase, 10 μg de proteínas nucleares foram incubadas durante intervalos de tempo variáveis (10 min- 1h), a 37°C, com 10U de fosfatase alcalina bovina do intestino (CIAP), por adição de 1 μl de solução de CIAP a 10 μl de proteína.

Para facilitar a localização das proteínas após transferência para nitrocelulose foram usados nos geis padrões pré-corados da Boehringer Mannheim.

II.16. Obtenção de anticorpos policlonais e imunopurificação

Anticorpos policlonais anti-AF1 foram produzidos em coelho por injeção de uma mistura de polipéptidos nativos e desnaturados. O soro pré-imune deste coelho não apresentava reação contra proteínas de *Drosophila* quer em western, quer em imunofluorescência. Fizeram-se três injeções (100 µg de proteína/injeção) da mistura de proteínas e adjuvante de Freund (Harlow, 1988) com intervalos de 1 mês. O soro imune obtido após remoção do coágulo foi submetido a cromatografia numa coluna de proteínas de *E.coli*-Sepharose (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos que não foram retidos pela coluna designaram-se Rb5.3 e foram usados a uma diluição de 1/500 em "western" e 1/50 em imunofluorescência.

Anticorpos policlonais anti-CENP-B dirigidos contra a proteína de fusão completa produzida em *E.coli*, foram uma dádiva de William C. Earnshaw. Estes foram usados em "western blot" a uma diluição de 1/500.

Os anticorpos anti-p71, anti-p50 e anti-p31 foram imunopurificados de nitrocelulose por desnaturação com glicina 100 mM pH 2,5 e neutralização com Tris.HCl 1 M pH 8,0, de acordo com protocolos publicados (Harlow, 1988), estes foram usados em "western blots" à concentração de 35 ng/µl.

II.17. Ensaio de retardação em gel

Os ensaios de retardação em gel foram realizados tal como descrito por Avides *et al* (1990). As reações de ligação (12.5 µl) continham 10 µg de extractos nucleares, ou 2 µg das fracções da coluna de troca iónica, ou 5-10

ng das fracções purificadas por afinidade; 0,5-1 ng de DNA marcado radioactivamente; 5-10 µg de pKS⁺ (linearizado e supraenrolado); em BB. Após a incubação durante 15 min à temperatura ambiente, adicionava-se 1 µl de azul de bromofenol 0,0002% em BB e as amostras eram aplicadas a um minigel alto (Hoeffler) de 4% poliacrilamida em TAE . A electroforese decorria a 100 V em TAE.

Os geis eram fixados numa solução de fixação, secos, e expostos a um filme de raios-X, a -80°C, com ecrãs de ampliação. Para os ensaios de competição, a quantidade de competidor não específico (pKS) não foi alterada. Nos ensaios de super-shift adicionou-se Rb5.3 às reacções de ligação sendo a diluição final do soro 1/100.

Nas retardações preparativas usaram-se 5-10 µg de proteínas purificadas e 10 ng de DNA α-341 marcado, por reacção de ligação. Após a electroforese, o gel era embrulhado em plástico aderente e ficava a impressionar um filme de raios - X durante a noite, a 4°C. Os pedaços de gel contendo os complexos proteína/DNA eram cortados, fervidos em tampão de amostra de SDS-PAGE, e aplicados num minigel 10% de poliacrilamida com SDS. Este gel era corado com prata (Morrissey ?), seco, e exposto a um filme de raios-X, de modo a revelar a localização de DNA marcado, ou era transferido para nitrocelulose e usado em western.

BB - HEPES 10 mM (pH 7,9); KCl 60 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 1 mM; 10% de glicerol; 2 mM NaF; 2 mM 2-glicerofosfato; 0,1 mM PMSF

Solução de fixação - 5% de ácido acético; 5% de metanol

Tampão Tris-acetato 10X (TAE 10X) - 48,4 g/L de Tris base; 11,4 ml/L de ácido acético; 9,3 g/L de EDTA.

Tampão de amostra - Tris.HCl 0.0625 mM pH 6,8; 2% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol

II.18. Ensaio de protecção à digestão por DNase I

Os ensaios de protecção à digestão por DNase I foram feitos de acordo com Avides *et al*, 1990. As reacções de ligação (25 μ l) continham 1 ng de DNA marcado (descrito na secção 11), 0,5-5 ng de fracções purificadas, e a restante composição era exactamente igual à das reacções de ligação para ensaios de retardação em gel. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, adicionavam-se 2 μ l de uma solução aquosa de DNase I a 2 μ g/ml, e a digestão prosseguia durante 1 min, após o que era terminada por adição de 50 μ l de solução STOP. A mistura era extraída 1X com TFC e 2X com CIA, precipitada por adição de 2 vol de etanol, e seca ao ar. O DNA era dissolvido em 2 μ l de solução de formamida, fervido durante 1 min, e aplicado a um gel de poliacrilamida:ureia a 8% em TBE. Após a electroforese, que decorria a 60 W, a ureia era removida por incubação do gel em 2L de 5% metanol; 5% ácido acético durante 15 min, o gel era transferido para papel 3MM, seco, e exposto a um filme de raios-X, a -80°C, com ecrãs de ampliação.

As reacções de clivagem química nas adeninas e guaninas foram feitas segundo o protocolo de Maxam e Gilbert (ref). A 5 ng de DNA marcado era adicionada ddH₂O até 20 μ l. A solução era arrefecida em gelo, adicionava-se 50 μ l de ácido fórmico e a reacção prosseguia à temperatura ambiente por 5 min, após o que se terminava por adição de 180 μ l de HZSTOP. O DNA era precipitado com 750 μ l de etanol, recuperado por centrifugação, ressuspenso em 250 μ l de acetato de sódio 0,3 M e 750 μ l de etanol, e recentrifugado, após o que se lavava com etanol a 70% e se deixava secar. A reacção com piperidina era efectuada por adição de 100 μ l de piperidina 1 M, e incubação a 90°C durante 30 min. O DNA era precipitado por extracção da

água com 1-butanol, ressuspendido em 150 µl de SDS a 1%, e recuperado por mais uma extração com butanol. O sedimento era lavado com 1 ml de etanol, seco, dissolvido em 2 µl de solução de formamida, fervido, e aplicado ao gel.

Solução STOP - EDTA 20 mM; 1% de SDS; NaCl 0,2 M; 0,25 mg/ml tRNA

TFC - Fenol: Clorofórmio:álcool isoamílico 50:48:2

CIA - Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1

Solução de formamida - 94% de formamida desionizada; EDTA 10 mM; 0,05% de azul de bromofenol

TBE (5X) - 54g/L de Tris base; 27,5g/L de ácido bórico; 20 ml/L de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

HZSTOP - acetato de sódio 0,3 M; EDTA 0,1 mM; 25 µg/ml tRNA

II.19. Ligação covalente das proteínas a fluoresceína

As proteínas foram covalentemente ligadas a 5(6)-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida (FLUOS) utilizando-se o sistema FLUOS da Boehringer Mannheim e seguindo-se o protocolo que acompanha os produtos. O FLUOS livre foi removido por filtração em gel em colunas de Sephadex G-25 (Pharmacia) e as proteínas foram concentradas num sistema Centricon 100 (Amicon) até cerca de 1 mg/ml. A marcação das proteínas foi controlada por SDS-PAGE e observação sob luz ultravioleta.

II.20. Microinjecção em embriões de *Drosophila*

Recolheram-se embriões de *Drosophila* durante 30 min. Estes foram depositados, com a ajuda de um pincel húmido, sobre fita cola dupla Scotch colada a uma lâmina de microscopia. Os embriões foram descorionados manualmente com pinças de dissecação e observação numa lupa iluminada com luz fria (Nikon), e transferidos para uma lamela coberta com cola obtida por dissolução da fita cola dupla Scotch em n-heptano, que havia sido previamente montada numa lâmina. Os embriões foram ligeiramente desidratados por incubação da lâmina numa caixa contendo sílica azul. Depois cobriram-se com óleo Volalec 20S (permeável ao ar) e injectaram-se com agulhas de vidro e micromanipulador Narishige, a meio do comprimento, num microscópio invertido Nikon, seguindo o protocolo descrito por Santamaria, (1986). As agulhas eram feitas de capilares de vidro num aparelho Narishige. Após a injeção os embriões eram incubados durante 20-30 min numa câmara húmida, e eram fixados com 3,7 % de formaldeído, segundo o procedimento de Karr e Alberts (1986), descrito na próxima secção. Após fixação, os ovos foram lavados várias vezes com tampão A+0,1% de TritonX-100, lavados 1X com tampão A durante 15 min, e corados com 0,1 µg/ml de Hoechst 33258 ou 1 µg/ml de iodeto de propídeo em tampão A. Para coloração com iodeto de propídeo os ovos foram tratados com RNase A (2,5 µg/µl) durante 1h, à temperatura ambiente, antes da adição do corante. A preparação foi montada em 85% de glicerol contendo 2,5% de propilgalato, e observada num microscópio confocal BioRad MRC-600.

Tampão A (10X) - Tris-HCl 150 mM (pH 7,5); KCl 0,6 M; NaCl 0.15 M; espermina 15 mM; espermidina 5 mM

II.21. Preparação dos embriões para marcação com anticorpos

Os embriões foram recolhidos durante 1-2h numa caixa de populações e lavados várias vezes com NaCl 0.7%/TritonX-100 0,003%. O corion foi removido por imersão dos embriões numa solução contendo volumes iguais da solução NaCl/TritonX-100 e solução aquosa a 5% de hipoclorito de sódio (lexívia comercial) durante 5 min, seguida de lavagem abundante com NaCl/Triton. Os embriões foram transferidos para 1 ml da solução de fixação na qual permaneceram 6-10 min com agitação constante. Juntou-se então 1 ml de metanol e agitou-se no vortex 30seg-1min, de modo a remover a membrana vitelina. Após sedimentação dos embriões desvitelinizados estes foram lavados 3 vezes em 1 ml de metanol e incubados 30 min em metanol. Os embriões foram rehidratados por suspensão em tampão A contendo 0,1% de TritonX-100 e gardados a 4°C.

Solução de fixação - 10 ul de formaldeído a 37%; 10 ul de tampão B (10X); 89 ul de ddH₂O; 900 ul de n-heptano

Tampão A (10X) - Tris-HCl 150 mM (pH 7,5); KCl 0,6 M; NaCl 0.15 M; espermina 15 mM; espermidina 5 mM

Tampão B (10X) - fosfato de potássio 100 mM pH(7.5); KCl 50 mM; NaCl 150 mM; MgCl₂ 20 mM

II.22. Marcação de embriões com anticorpos

Os embriões foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente em solução de bloqueio, em godés de vidro. Após este período adicionou-se o primeiro anticorpo - Rb5.3 - 1/50 em 100-200 ul de solução de bloqueio contendo 2.5 ug/ul de RNaseA. Os embriões foram incubados com o primeiro anticorpo durante a noite, a 4°C. O primeiro anticorpo foi removido por duas lavagens de 15 min com tampão A contendo 0,1% de TritonX-100, à temperatura ambiente, com agitação. A incubação com o segundo anticorpo diluído 1/500 em solução de bloqueio, (anti-coelho conjugado à fluoresceína, Vector) decorreu durante 1h à temperatura ambiente. Os embriões foram lavados 2X em tampão A/TritonX-100 durante 15 min e lavados 1X em tampão A durante 30 min, à temperatura ambiente. O DNA foi corado com iodeto de propídeo (5 min, 1 µg/ml em tampão A). A preparação foi montada numa gota de glicerol a 85% com 2.5% de propilgalato e observada num microscópio confocal de laser MRC-600 BioRad.

Solução de bloqueio - 10% de FCS em tampão A com 0,1% de TritonX-100

Tampão A (10X) - Tris-HCl 150 mM (pH 7,5); KCl 0,6 M; NaCl 0.15 M; espermina 15 mM; espermidina 5 mM

II.23. Preparação de cérebros esmagados e marcação com anticorpos

A dissecação de cérebros de indivíduos na 3ª fase larvar foi efectuada numa gota de NaCl 0.7%. Os cérebros foram fixados durante 10s numa gota de 3,7% de formaldeído, 1% de TritonX-100 em tampão A. Em seguida, os cérebros foram transferidos para uma gota de 3,7% de formaldeído e 50% de ácido acético sobre uma lamela silanizada. Foi colocada uma lâmina de vidro coberta com Denhardts sobre a preparação e exerceu-se pressão. A preparação foi imersa em azoto liquido durante 5 min. Uma vez terminada a congelação a lamela foi removida com uma lâmina de bisturi e a preparação foi rehidratada por incubação em PBS, durante 15 min, à temperatura ambiente. A incubação com anticorpos decorreu segundo o procedimento adoptado para os embriões (secção 22), excepto que a incubação com o primeiro anticorpo foi feita durante 1h, à temperatura ambiente.

PBS - NaCl 0,16 M; fosfato de sódio 50 mM (pH6.9)

Cobertura das lâminas com Denhardts - lavaram-se as lâminas em etanol/éter (1:1) durante 30 min. Secaram-se ao ar. Incubaram-se a 65°C em SSC-Denhardts, durante 2h30 min. Passaram-se por ddH₂O. As lâminas foram então fixadas em etanol/ácido acético (3:1) durante 20 min, secas ao ar, e conservadas a 4°C.

SSC-Denhardts - 360 ml de 20XSSC, 48 ml de 1% polivinilpirrolidona, 48 ml de 1% ficoll, 48 ml de 1% BSA, ddH₂O até 2,4L

20XSSC - NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M (pH7.0)

III. RESULTADOS

**1. IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
DROSOPHILA QUE RECONHECEM DNA DO
CENTRÓMERO HUMANO**

Identificação, em extractos nucleares de células Kc, de uma actividade específica de ligação à sequência CENP-B box, uma sequência de DNA do centrómero humano.

A primeira etapa deste trabalho consistiu em averiguar se extractos de células de *Drosophila melanogaster* apresentavam ou não alguma actividade de ligação específica a um fragmento de DNA centromérico humano.

A presença, em extractos nucleares de células Kc, de uma actividade específica de ligação à sequência de DNA centromérico humano, α -341 (ver materiais e métodos), uma sequência que faz parte do DNA satélite alfoide, foi testada através de ensaios de retardação em gel. O DNA α -341 possui uma sequência CENP-B box à qual se liga a CENP-B humana.

A fig III.1A mostra o resultado de um desses ensaios. Extractos nucleares de células Kc foram incubados com o DNA α -341 marcado com ^{32}P , e com DNA pasmídico não marcado, que actua como competidor de ligações não específicas, e o complexo resultante pode ser observado na coluna 2. Este complexo desaparece após a adição, às reacções de ligação, de um excesso molar (10X) de α -341 não marcado (coluna 4), indicando que a mistura de proteínas contém uma actividade específica de ligação à sequência α -341.

Esta actividade parece resultar de ligação à sequência CENP-B box no DNA α -341, uma vez que a adição de um excesso molar (10X) da sequência CENP-B box, também impede a formação do complexo radioactivo (coluna 6). É de referir que nestas reacções de competição se incluiu sempre um excesso molar (100X) do vector pKS, para assegurar que a competição se devia a especificidade de ligação relativamente à sequência de DNA.

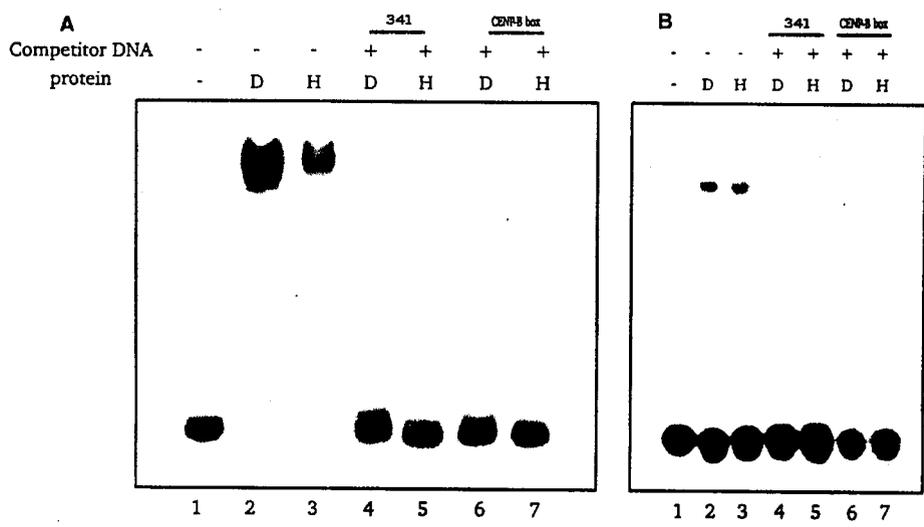


Fig III.1: Pesquisa, por ensaios de retardação em gel, de actividades de ligação ao DNA alfoide e à sequência CENP-B box, em extractos nucleares de células humanas e de *Drosophila*. **(A)** Actividade de ligação ao DNA alfoide. As reacções incluem um controle sem adição de proteínas (coluna 1), extractos nucleares de *Drosophila* (colunas 2, 4 e 6), e extractos nucleares de células humanas (colunas 3, 5 e 7). Nas colunas 2 e 3, observa-se a formação de complexos proteína/DNA alfa-341, que são competidos eficientemente por um excesso molar, de dez vezes, de DNA alfa-341 não marcado (colunas 4 e 5) ou de oligonucleótido CENP-B box (colunas 6 e 7). **(B)** Actividade de ligação à sequência CENP-B box. Este ensaio de retardação em gel é similar ao da fig III.1A, excepto que o oligonucleótido CENP-B box foi aqui usado como DNA marcado.

Como controle positivo, repetiram-se as reacções de ligação à sequência α -341 usando extractos nucleares de células Hep2, uma linha celular humana, pois que nestes extractos deverá existir CENP-B. O complexo formado nestas reacções é visível na coluna 3. Este complexo também parece resultar de interações específicas entre as proteínas da mistura a sequência CENP-B box, uma vez que a adição de excessos molares (10X) de α -341(coluna 5) ou CENP-B box não marcados (coluna 7) compete com eficácia a formação do complexo radioactivo.

Para assegurar que a actividade de ligação à CENP-B box observada é específica, a sequência CENP-B box foi também usada como DNA marcado em ensaios de retardação em gel. Os resultados estão expostos na fig III.1B. Os complexos formados entre as proteínas nucleares de *Drosophila* e humanas são visíveis nas colunas 2 e 3, respectivamente. Ambos desaparecem após a adição de oligonucleótidos não marcados (colunas 6 e 7) ou α -341 (colunas 4 e 5), indicando serem o resultado de interacções específicas.

Purificação da actividade de ligação à sequência CENP-B box

A observação de que extractos nucleares de células de *Drosophila melanogaster* exibiam uma actividade de ligação específica à sequência CENP-B box, levou-nos a tentar isolar tal actividade.

Para purificar a actividade de ligação à CENP-B box, procedeu-se ao fraccionamento de extractos nucleares de células Kc por cromatografia de troca iónica numa coluna de DE52. Esta coluna foi lavada com KCl 60 mM e eluída com KCl 250 mM e NaCl 2M (fig III.2A). A actividade de ligação à

sequência CENP-B box, das fracções obtidas, foi seguida através de ensaios de retardação em gel, usando-se um concatâmero desta sequência como sonda (fig III.3A). O concatâmero da sequência CENP-B box possui 10 repetições desta sequência.

A actividade é eluída com 250 mM KCl (coluna 4) e foi posteriormente purificada por cromatografia de afinidade numa coluna CENP-B box-Sepharose.

A coluna de afinidade foi lavada com KCl 60 mM, e eluída com KCl 250 mM e 1 M (fig III.2B). Verificou-se que a actividade de ligação à CENP-B box era retida pela coluna, eluindo com KCl 1 M (coluna 9).

Alguns desta actividade também é observada no "flow-through" da coluna, mas tal é devido ao facto de se ter ultrapassado a capacidade da coluna, pois que não era observada quando se diminuía a quantidade de proteína aplicada.

A composição proteica das fracções foi analisada por SDS-PAGE (fig III.3B). Após coloração com prata, observou-se que a fracção purificada (AF1), que exhibe capacidade de ligação específica à sequência CENP-B box, é composta essencialmente por três polipéptidos com pesos moleculares aparentes de 71, 50, e 31 kDa.

Como controle do método de purificação, fraccionaram-se extractos de células Hep2 humanas segundo o mesmo protocolo experimental. Observou-se que a fracção final obtida consiste de três polipéptidos principais, um dos quais migra em SDS-PAGE com um peso molecular aparente de 80 kDa e foi identificado como sendo a proteína CENP-B através de "western blot" (fig III.4).

A tabela I apresenta um resumo da purificação das proteínas AF1.

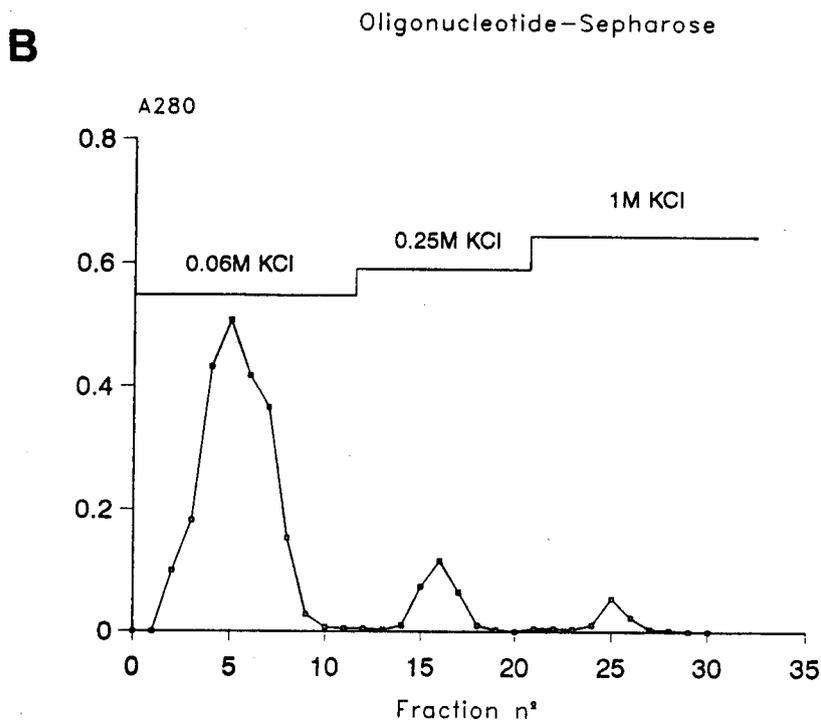
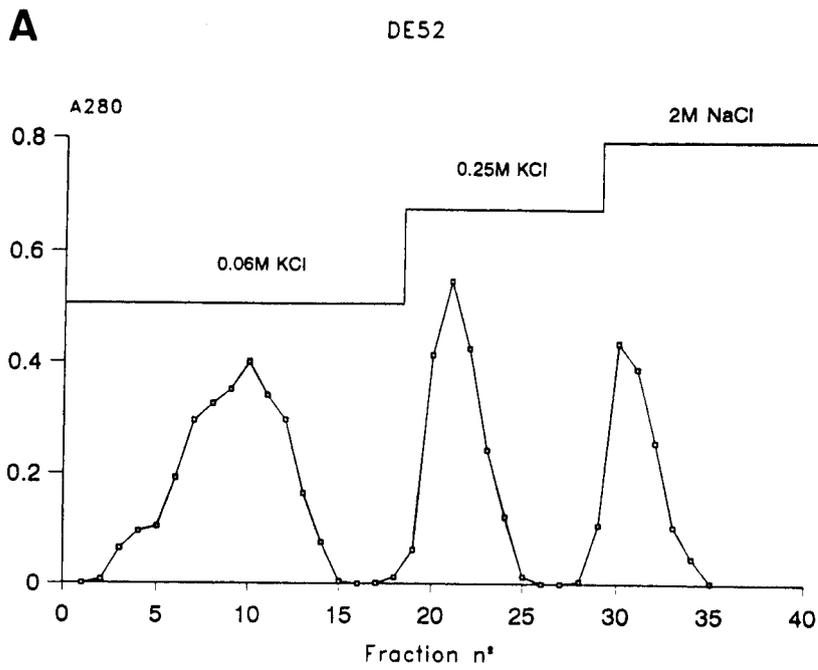


Fig III.2: Purificação da actividade de ligação à sequência CENP-B box, de células Kc de *Drosophila*. **A** - Perfil de eluição da coluna de troca iónica. **B** - Perfil de eluição da coluna de afinidade CENP-B box-Sepharose.

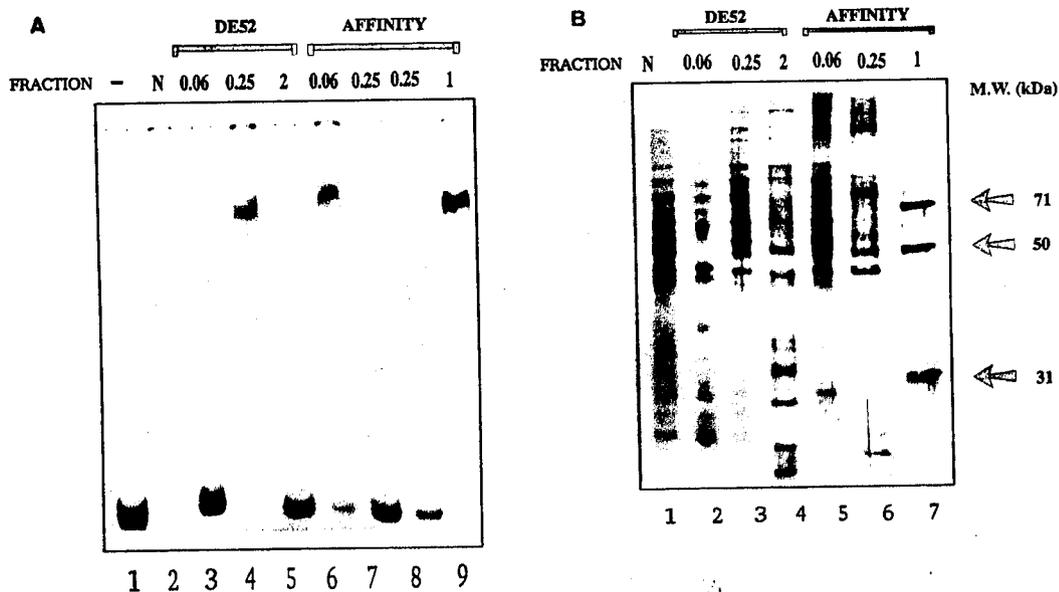


Fig III.3: Purificação da actividade de ligação à sequência CENP-B box, de células Kc de *Drosophila*, por cromatografia em De52 e em CENP-B box-Sepharose. **A** - A actividade de ligação das fracções, a um concatêmero da sequência CENP-B box, foi seguida por ensaios de retardação em gel. Coluna 1 - controle sem proteína; coluna 2 - proteínas nucleares de células Kc (N). Não foi detectada qualquer actividade de ligação no "flow-through" da coluna de De52 (coluna 3). A maioria da actividade de ligação elui com KCl 0,25 M (coluna 4) e não se recupera nenhuma actividade após eluição da coluna com NaCl 2 M (coluna 5). O "flow-through" da coluna de afinidade apresenta alguma actividade de ligação que é devida a "overloading" (coluna 6). Não se observou actividade de ligação após eluição com KCl 0,25 M (colunas 7 e 8; a coluna 8 tem o dobro da quantidade de proteína presente na coluna 7). A actividade de ligação à sequência CENP-B box é retida pela coluna de afinidade, eluindo com KCl 1 M (coluna 9). **B** - A composição proteica das várias fracções das colunas foi analisada por SDS-PAGE, tendo-se corado o gel com prata. Colunas 1-6: aplicaram-se 5 µg das seguintes amostras: coluna 1 - proteínas nucleares de células Kc, coluna 2 - "flow-through" da coluna de De52, coluna 3 - eluato KCl 0,25 M da De52, coluna 4 - eluato NaCl 2 M da De52, coluna 5 - "flow-through" da coluna de afinidade, coluna 6 - eluato KCl 0,25 M da coluna de afinidade. Aplicaram-se 2 µg da fracção eluída da coluna de afinidade com KCl 1 M (coluna 7).

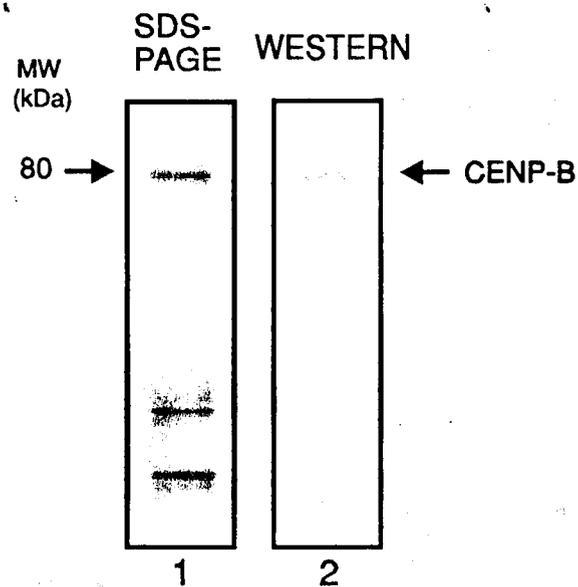


Fig III.4: Purificação da CENP-B humana de células Hep2. Análise da composição proteica da fracção final, por SDS-PAGE (coluna 1). Aplicou-se 2 μ g de proteína e o gel foi corado com prata. "Western blot" da fracção purificada com anti-corpos anti-CENP-B diluídos 1:500 (coluna 2).

Tabela I : Purificação da actividade de ligação de sequência CENP-B box.

Fraction	Volume (ml)	Total Protein (µg)	DNA Binding Activity *		Yield (%)		Purification (-fold)	
			Total (U)	Specific (U/µg)	Per Step	Overall	Per Step	Overall
Nuclear extract	65	91 000	34 000	0,37	-	-	1	1
DE52	25	19 600	23 800	1,2	70	70	3,2	3,2
Oligonucleotide - Sephacrose	2	1	4 760	4 760	20	14	4 000	13 000

* - One unit corresponds to the quantity of protein necessary to bind 1 fmol of alphoid DNA

DISCUSSÃO

A preparação dos núcleos de células Kc e Hep2, descrita na secção "Materiais e Métodos" foi seguida por observações periódicas num microscópio de fluorescência após coloração das preparações com o corante fluorescente Hoechst 33258, um corante específico para o DNA. Verificou-se que a preparação final de núcleos não apresentava contaminações significativas com células inteiras e com remanescentes celulares.

Os núcleos foram rebentados e extraídos com uma solução contendo NaCl 1M, uma vez que para esta concentração salina se verifica a extração da maioria das proteínas que se ligam ao DNA (Lechner e Carbon, 1991). A lise era eficiente, não sendo possível observar a existência de núcleos inteiros na preparação.

Os extractos nucleares obtidos não evidenciam a ocorrência de degradação proteolítica durante a sua preparação pois que são compostos por proteínas que apresentam uma gama variadíssima de pesos moleculares em SDS-PAGE, havendo muitas proteínas com peso molecular superior a 100 kDa. Na preparação destes extractos utilizava-se normalmente o PMSF como inibidor de proteases, mas foi experimentada a adição de pepstatina A e leupeptina, sem que se observassem diferenças no padrão de composição dos extractos. A adição de 2-glicerofosfato e de fluoreto de sódio (inibidores de fosfatases) era importante para a recuperação da actividade de ligação ao DNA. Na ausência destes compostos observava-se que os extractos perdiam rapidamente a capacidade de ligação à coluna de afinidade, sendo possível que alguma das proteínas responsáveis à ligação à sequência CENP-B box se encontre normalmente fosforilada. No entanto, o tratamento das proteínas purificadas com fosfatase, não alterava a formação dos complexos em geis de

retardação pelo que se pensa ser o efeito da fosforilação indirecto. Pode, por exemplo, existir nos extractos uma protease específica activada por desfosforilação.

Antes de se adoptar a técnica final de purificação por cromatografia de troca iónica e de afinidade, foram tentados outros procedimentos. Assim, procedeu-se ao fraccionamento dos extractos por cromatografia de afinidade em heparina-agarose (Sigma) e por cromatografia de filtração em gel em colunas de Sephadex S-300 (Pharmacia). No entanto estas tentativas foram desprovidas de sucesso na medida em que não resultaram num enriquecimento na actividade de ligação ao DNA centromérico humano.

O método final adoptado - fraccionamento dos extractos por cromatografia de troca iónica em DE52 e posterior purificação por cromatografia de afinidade em colunas CENP-B box-Sepharose permitiu um enriquecimento significativo (13 000X) na actividade de ligação específica à sequência CENP-B box. Este procedimento permitia isolar entre 10-100 µg de proteína purificada a partir de 90 mg de proteínas nucleares totais, provenientes de 1L de cultura de células Kc (a cerca de 5×10^6 células/ml).

O fraccionamento das proteínas nucleares por cromatografia de troca iónica em colunas DE52, possibilitava a remoção de cerca de 65% das proteínas totais em fracções ("flow-through" e 2M NaCl) que não exibiam qualquer actividade de ligação ao DNA satélite alfoide. A fracção que exibia tal actividade era eluída com 0,25 M KCl e continha cerca de 30% das proteínas nucleares. Os restantes 5% das proteínas totais, eram normalmente perdidos durante as etapas de cromatografia e diálise das fracções. Durante a cromatografia de troca iónica, que era efectuada a 4°C, também não se registou degradação apreciável das proteínas, tal como estimado em SDS-PAGE.

A purificação das proteínas em colunas de afinidade CENP-B box-Sepharose, permitiu remover, através da lavagem com 0,25 M de KCl, proteínas que se ligam a esta sequência de DNA com afinidade baixa e que constituíam cerca de 5% da amostra aplicada à coluna. Além disso, a inclusão do detergente Tween 20 nos tampões de eluição da coluna, diminuiu apreciavelmente a ocorrência de interações hidrofóbicas entre as proteínas da mistura, permitindo recuperar uma fracção (AF1) que consiste predominantemente de três polipéptidos: p-71, p-50, e p-31. Esta fracção contém cerca de 0,7% da quantidade de proteína aplicada à coluna, constituindo 0,02% das proteínas nucleares totais. Na ausência do detergente observou-se que a composição final da fracção purificada era mais complexa.

Os dados resumidos na tabela I, referentes à purificação das proteínas AF1, permitem comparar a purificação destas proteínas, com a purificação de outras proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA, como por exemplo a CENP-B. Assim, verifica-se que a purificação conseguida (13 000X) é boa, em relação aos valores descritos para outras proteínas (12 000X no caso da CENP-B). A actividade específica de ligação ao DNA apresentada pela fracção AF1, medida em U/ μ g (sendo 1U a quantidade de proteína necessária para ligar 1 fmol de DNA satélite alfa), é semelhante aos valores exibidos por diversas proteínas que apresentam especificidade de ligação ao DNA. O rendimento da purificação também é da mesma ordem de grandeza que o obtido durante a purificação da CENP-B (Muro *et al*, 1992). Com base nos dados apresentados na tabela I, e supondo que os três polipéptidos existem na célula como um trímero equimolar, prevê-se que existam nos núcleos cerca de 30 000 moléculas de complexos AF1. Como as células Kc são poliploides, é praticamente impossível de esclarecer se este número está de alguma forma relacionado com o número de centrómeros por núcleo.

Também é possível que os três polipéptidos não existam exclusivamente sob a forma de um trímero equimolar; nesse caso os dados disponíveis não nos permitem deduzir o número de moléculas de cada polipéptido que existem nas células.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

As proteínas AF1 reconhecem a sequência CENP-B box no DNA α -341

Os ensaios de retardação em gel efectuados sugeriam que as proteínas purificadas se ligavam especificamente à sequência CENP-B box. Contudo, para assegurar a especificidade da ligação, procederam-se a ensaios de protecção à digestão por DNase I, usando-se a sequência α -341 (fig III 5A e 5B). Os resultados obtidos mostram que as proteínas AF1 protegem a sequência CENP-B box da digestão por DNase I, em ambas as cadeias das moléculas de DNA, indicando que efectivamente, *in vitro*, estas proteínas se ligam à CENP-B box.

Um padrão semelhante de protecção é observado com a fracção enriquecida em CENP-B humana, preparada por nós. No entanto, verificam-se pequenas diferenças no padrão de protecção obtido com as proteínas de *Drosophila* e com as proteínas humanas: as proteínas de *Drosophila* parecem proteger mais alguns pares de bases. Não sabemos se as diferenças resultam de contactos diferenciais das proteínas com a hélice de DNA, ou se advêm de impedimentos estereoquímicos à acção da nuclease.

As proteínas AF1 ligam-se a um só local no DNA satélite alfoide

Para investigar as características de ligação das proteínas AF1 à sequência α -341 e aos concatâmeros da CENP-B box, foram feitos ensaios de retardação em gel, nos quais a quantidade de proteína adicionada às reacções de ligação era progressivamente aumentada. A sequência α -341 possui uma

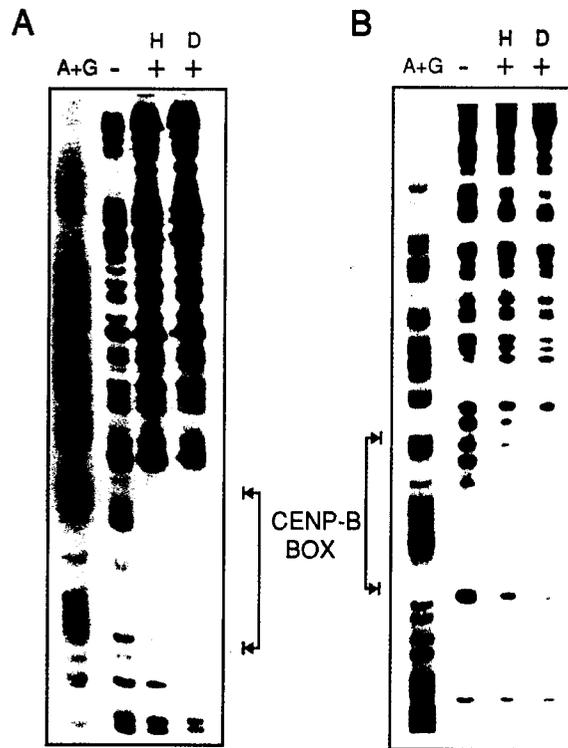


Fig III.5: Ensaio de protecção conferida pelas proteínas AF1 e CENP-B à digestão do DNA α -341 por DNase I. Mostram-se as reacções de sequenciação A+G e os cortes provocados por DNase I nas cadeias L (A) e R (B). Incubou-se 1ng de DNA, marcado num dos terminais de cada cadeia complementar, sem (-), ou com 5 ng da fracção AF1 (D), ou 5 ng da CENP-B purificada por cromatografia de afinidade (H), antes da digestão com DNase I.

CENP-B box, ao passo que os concatâmeros usados nestes estudos consistem de uma repetição em série de dez CENP-B boxes.

Quando se usaram os concatâmeros da sequência CENP-B box, verificou-se o aparecimento de complexos com mobilidade intermédia (fig III 6A) que não se formavam com o DNA α -341 (fig III 6B). Estes resultados sugerem que os complexos intermédios são devidos à ligação sequencial de um complexo formado pelos três polipéptidos, às várias sequências CENP-B box existentes nos concatâmeros.

Anticorpos policlonais anti-AF1 reconhecem um conjunto similar de proteínas em vários extractos proteicos de *Drosophila*.

Visando uma melhor caracterização das proteínas AF1 procedeu-se à imunização de coelhos com estas proteínas, de modo a obter anticorpos policlonais anti-AF1. Os resultados obtidos com o soro imune (Rb5.3) são apresentados na fig III 7A. Este soro reconhece um conjunto similar de polipéptidos em extractos totais e nucleares de células Kc (colunas 1 e 2), extractos de embriões (coluna 4), e extractos de neuroblastos de larvas de *Drosophila* na terceira fase (coluna 5). Todos os extractos apresentam uma banda de 71 kDa que reage com o soro Rb5.3. Contudo, a banda de 50 kDa surge como uma banda dupla ou tripla, dependendo da origem dos extractos proteicos: extractos purificados apresentam uma única banda de 50 kDa (fig III 7B), enquanto que extractos de células Kc, embriões, e cérebros de larvas, contêm duas ou três bandas imunoreactivas. Se estes extractos forem tratados

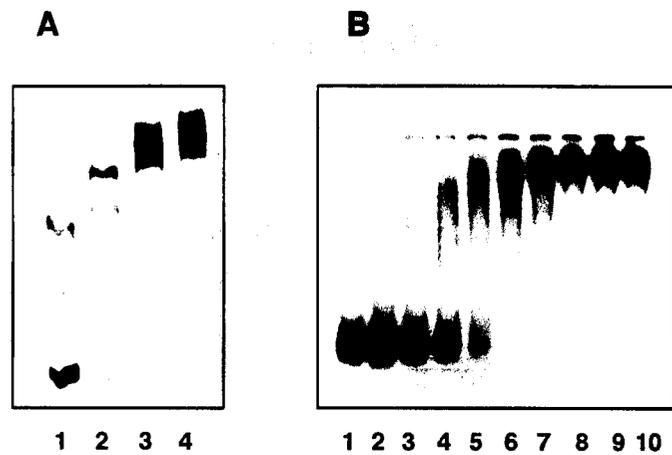


Fig III.6: Análise do número de locais ocupados pelas proteínas AF1 nas sequências de DNA α -341 (**B**) e concatêmero da CENP-B box (**A**). A quantidade de proteína incluída nas reacções de ligação ao DNA variou desde 0,5 a 5 ng, com incrementos de 0,5. **A** - 1,5 ng (coluna 1) a 3 ng de proteína. **B** - 0 ng (coluna 1) a 5 ng de proteína (coluna 10).

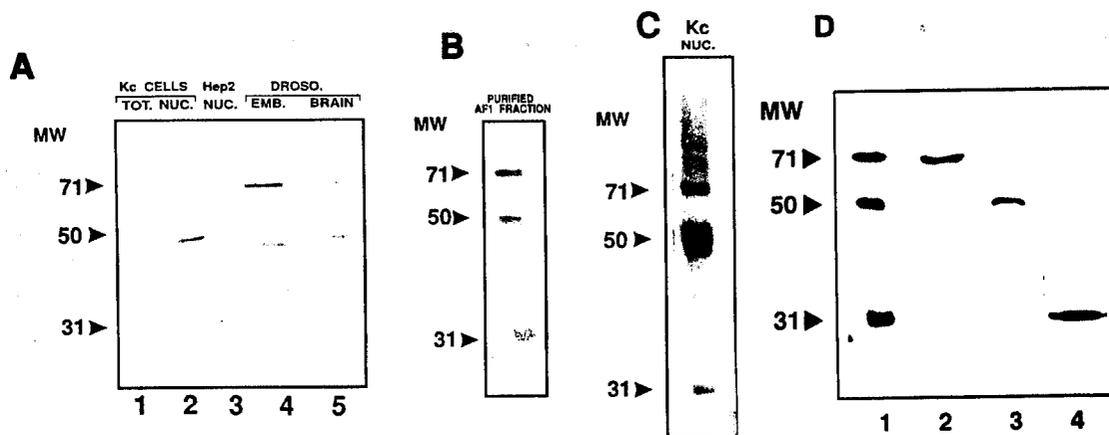


Fig III.7: Análise dos antígenos AF1 por "Western blot". (A) "Imunoblots" dos antígenos AF1 em vários tipos de células de *Drosophila* e em extractos de células humanas. 20 μ g de extractos totais de células Kc (coluna 1), 10 μ g de extractos nucleares de células Kc (coluna 2), 10 μ g de extractos nucleares de células humanas Hep2 (coluna 3), 10 μ g de extractos de embriões com menos de duas horas (coluna 4), e 10 μ g de extractos de cérebros de larvas na 3ª fase (coluna 5). O soro Rb5.3 foi usado a uma diluição de 1:500 (B) Análise da reactividade, por "Western blot", do soro Rb5.3 contra a fracção AF1 purificada. Aplicou-se 2 μ g de proteína no gel e a diluição do soro era de 1:500. (C) Visualização da reactividade do soro Rb5.3 (1:500) contra o polipéptido de 31 kDa, em 50 μ g de extractos nucleares de células Kc. (D) Análise, por "Western blot" dos anticorpos imunopurificados. Aplicou-se 2 μ g de proteínas AF1 em cada coluna, e os anticorpos foram usados a uma concentração final de 35 ng/ μ l. Anti-p71 (coluna 2), anti-p50 (coluna 3), e anti-p31 (coluna 4).

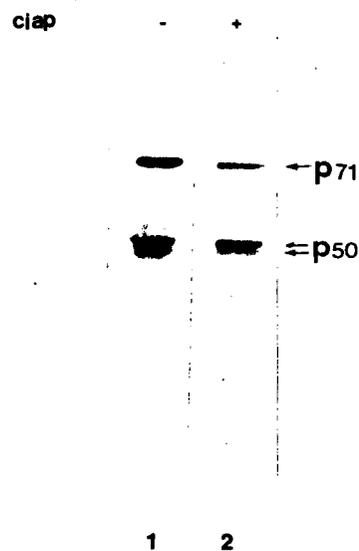


Fig III.8: Análise do efeito do tratamento com fosfatase no padrão de bandas que reagem contra o soro Rb5.3 em 10 μ g de extractos nucleares de células Kc. As proteínas foram (coluna 2) ou não (coluna 1) tratadas com fosfatase antes do "Western blot". O tratamento com fosfatase foi efectuado por incubação com 10 U de CIAP, 30 min, a 37°C.

com fosfatase antes da electroforese, o padrão das bandas não é alterado, sugerindo que não resulta de fosforilações diferenciais de um mesmo polipéptido (fig III 8)

O soro Rb5.3 também reconhece um polipéptido de 31 kDa na fracção AF1 (fig III 7B) mas a reacção em extractos não purificados é fraca, só se observando uma banda muito ténue que não foi possível fotografar. Provavelmente este polipéptido é muito pouco abundante nos extractos não fraccionados, pois se um excesso de proteínas nucleares de células Kc fôr aplicado no gel, o polipéptido de 31kDa é detectado pelos anticorpos Rb5.3, tal como se pode observar na fig III 7C.

Em extractos nucleares de células Hep2 humanas não foi possível detectar nenhum polipéptido que reagisse com os anticorpos anti-AF1 (fig III 7A, coluna 3).

Os polipéptidos presentes na fracção AF1 não parecem resultar de proteólise, pois que são sempre detectados em vários extractos e, anticorpos contra cada um dos polipéptidos, obtidos por imunopurificação, apenas reconhecem a banda original na fracção AF1 (fig III 7D).

Os anticorpos Rb5.3 reconhecem as proteínas AF1 em solução

Para averiguar se os anticorpos Rb5.3 reconhecem as proteínas AF1 em solução, quer livres, quer ligadas ao DNA, efectuaram-se ensaios de "super-shift", que são apresentados na fig III 9. Quando os anticorpos são incubados com DNA marcado radioactivamente (concatâmero da CENP-B box)

na

ANTIBODY	+	+	+	-
PROTEIN	-	+	+	+

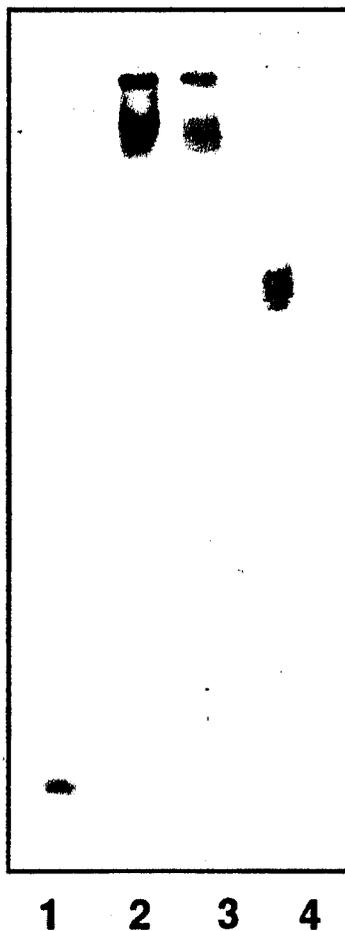


Fig III.9: Análise dos complexos AF1/CENP-B box por "super-shift". Coluna 1 - O soro Rb5.3 foi incubado com o DNA marcado por forma a determinar se os anticorpos se ligam directamente ao DNA. As proteínas foram incubadas com o DNA marcado antes da adição de anticorpos (coluna 2) ou foram incubadas com os anticorpos antes da adição de DNA (coluna 3). Complexo formado na ausência de anticorpos (coluna 4). Todas as reacções continham 0,1 ng de DNA marcado. Usou-se 10 ng/reacção das proteínas AF1. O soro Rb5.3 foi diluído 1:100.

ausência de proteínas, nenhum complexo é detectado (coluna 1), indicando que estes anticorpos não se ligam ao DNA. Se os anticorpos são incubados com as proteínas AF1 antes da adição de DNA (coluna 2), ou se são incubados com o DNA antes da adição de proteínas (coluna 3), então a formação de um complexo é detectada. A mobilidade deste complexo é inferior à mobilidade do complexo AF1/CENP-B box (coluna 4), indicando que ele é composto por anticorpos/proteínas AF1/DNA.

Estes ensaios permitem-nos concluir que o soro Rb5.3 reconhece as proteínas nativas em solução e que os anticorpos não interferem com a capacidade de ligação das proteínas ao DNA. É portanto verosímil que os epítopes reconhecidos pelos anticorpos Rb5.3 não se localizem nas regiões de ligação ao DNA.

Os três polipéptidos da fracção AF1 são componentes do complexo AF1/DNA α -341

A composição proteica do complexo observado em geis de retardação foi investigada com anticorpos imunopurificados. Para tal, foram feitos geis de retardação em que as proteínas AF1 eram incubadas com o DNA α -341 e, estes geis, foram posteriormente transferidos para nitrocelulose por "electroblotting" (fig III 10A). A nitrocelulose foi cortada em quatro tiras, cada uma delas contendo um complexo idêntico, e incubada com o soro total (coluna 1), ou com anticorpos imunopurificados contra as proteínas de 71 kDa (coluna 2), 50 kDa (coluna 3), e 31 kDa (coluna 4). Os resultados obtidos mostram que o complexo AF1/ α -341 contém os três polipéptidos.

A composição do complexo foi confirmada por ensaios de retardação preparativos (fig III 10B). Para estes ensaios efectuaram-se retardações em gel com o DNA α -341, e com as proteínas AF1 (colunas 1, 3 e 5), ou com a fracção enriquecida em CENP-B (colunas 2, 4 e 6). Os complexos foram detectados por exposição dos geis a filmes de raios-X, cortados do gel, e aplicados a um segundo gel de poliacrilamida com SDS. Após a electroforese, parte do gel foi corada com prata para visualizar as proteínas (colunas 1 e 2).

Uma vez que o DNA também é detectado por este método, o gel foi seco e exposto a um filme de raios-X, de modo a detectar a banda radioactiva correspondente ao DNA (colunas 3 e 4).

Na coluna 1, além da banda superior que consiste de DNA, são visíveis as três proteínas da fracção AF1, e, na coluna 2, pode-se ver que o complexo humano apresenta apenas uma proteína com 80 kDa. A identidade das várias proteínas foi confirmada por "western blotting". Os resultados obtidos indicam que o soro Rb5.3 reage com os três polipéptidos, confirmando a sua presença no complexo observado em geis de retardação (coluna 5). Anticorpos anti-CENP-B foram usados para identificar a proteína de 80 kDa presente na coluna 2, como sendo a CENP-B humana (coluna 6).

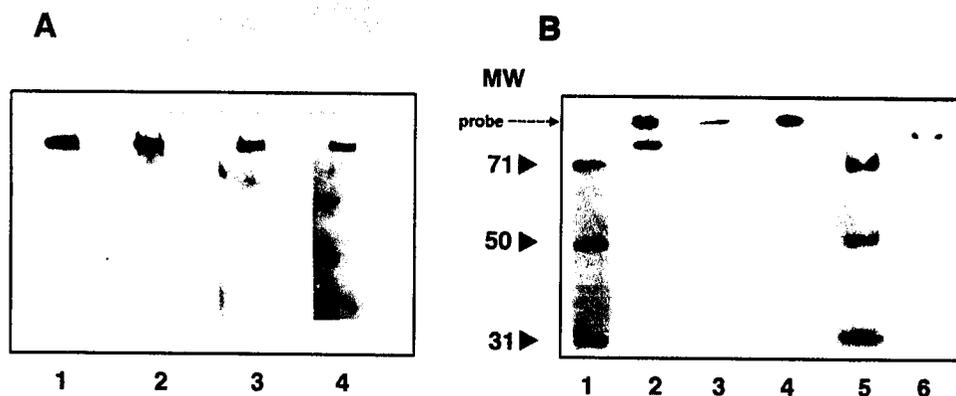


Fig III.10: Análise da composição proteica do complexo AF1/DNA α -341. **(A)** Geis de retardação foram transferidos para nitrocelulose e incubados com o soro Rb5.3 1:500 (coluna 1), com anti-p71 (coluna 2), anti-p50 (coluna 3), e anti-p31 (coluna 4). A concentração final dos anticorpos imunopurificados era 35 ng/ μ l. **(B)** Ensaio de retardação preparativos. A composição proteica dos complexos AF1/DNA α -341 e CENP-B/DNA α -341 foi analisada por SDS-PAGE e coloração com prata (colunas 1 e 2). O mesmo gel foi exposto a um filme de raios-X de forma a revelar a localização do DNA marcado (colunas 3 e 4). Um gel idêntico foi transferido para nitrocelulose e incubado com o soro Rb 5.3 (coluna 5) ou com anti-CENP-B (coluna 6). Estes anticorpos foram diluídos 1:500.

DISCUSSÃO

Confirmou-se que as proteínas de *Drosophila*, designadas AF1, purificadas com base na sua capacidade de ligação específica à sequência do centrómero humano CENP-B box, demonstram de facto especificidade na sua ligação. Com efeito, os estudos de competição efectuados com as proteínas nucleares totais de células Kc e Hep2 foram repetidos utilizando as respectivas fracções purificadas, e os resultados eram idênticos aos apresentados para os extractos não fraccionados, confirmando que a ligação é específica. Por outro lado, foi também possível observar que a fracção AF1 protege a sequência CENP-B box, no DNA satélite alfa, da digestão por DNase I, indicando que pelo menos *in vitro*, as proteínas de *Drosophila* reconhecem esta sequência. O padrão de protecção é semelhante ao produzido pela CENP-B humana, embora seja ligeiramente maior. Como foi referido nos resultados, é possível que o complexo formado pelas proteínas de *Drosophila* seja maior do que os dímeros de CENP-B, impedindo o acesso da nuclease a mais algumas bases. Contudo, o nível de resolução conseguido nestes geis não é suficiente para identificar com precisão a natureza das diferenças no padrão de degradação pela DNase I.

Embora os ensaios de protecção à digestão por DNase I indiquem claramente que as proteínas AF1 se ligam à sequência CENP-B box no DNA satélite alfa, não se pode excluir a hipótese da existência de outros locais de ligação que, devido a limitações da própria técnica de "footprint", não sejam visualizados nos geis de acrilamida:ureia. No caso da existência de mais locais de ligação, seria possível observá-los em retardações em gel nas quais a concentração de proteína fosse gradualmente aumentada, pois que se deveria verificar a formação de complexos com mobilidades diferentes,

correspondentes à ocupação dos vários locais. Assim efectuaram-se os tais ensaios de retardação em gel, utilizando como DNA marcado, quer o DNA satélite alfa, quer um concatâmero da CENP-B box, com dez repetições em série desta sequência. No caso do DNA satélite alfa não se observou a formação de complexos de mobilidade intermédia, mas apenas um complexo cuja mobilidade não dependia da concentração de proteínas, indicando a existência de um só local de ligação das proteínas AF1, que se presume ser a CENP-B box. Utilizando o concatâmero da CENP-B box, observa-se a formação de complexos com mobilidade intermédia que devem corresponder à ocupação sequencial dos vários locais de ligação. Tendo dez locais de ligação poder-se-ia esperar a formação de dez complexos diferentes. Tal não é observado, quer porque a resolução do gel pode não ser suficiente para separar todos os complexos, quer porque pode existir cooperatividade na ligação (isto é, a ocupação de certos locais pode favorecer a ocupação simultânea de vários outros). É ainda possível que as proteínas AF1 se possam ligar simultaneamente a mais do que uma sequência CENP-B box. Estes ensaios permitem ainda concluir que as proteínas AF1 devem existir em solução como um complexo e é este complexo que se liga ao DNA. Se as proteínas fossem individualmente capazes de se ligarem à CENP-B box, então dever-se-ia observar a formação de vários complexos com o DNA satélite alfa, que corresponderiam à ligação das várias proteínas.

A produção de anticorpos policlonais anti-AF1, designados Rb5.3, constituiu uma etapa muito importante neste trabalho pois que permitiu caracterizar melhor estas proteínas, visualizar a sua localização intranuclear, e iniciar a pesquisa dos seus genes em bibliotecas de expressão de *Drosophila* (J. Perdigão, M. C. Avides, e C. E. Sunkel; resultados não publicados). No caso de as proteínas AF1 estarem, por analogia com a CENP-B humana,

implicadas na formação de estruturas particulares da cromatina, como é o caso do centrómero, então seria de esperar que as proteínas existissem em vários tecidos diploides de *Drosophila*. Com efeito verifica-se que elas estão presentes em núcleos e extractos totais de células Kc, em embriões, e em neuroblastos, embora a p-31 exista em quantidades inferiores à das outras proteínas, não sendo fácil observar a sua presença em extractos, através de "western" blot. A p-50 aparenta heterogenidade na sua composição, surgindo como uma banda dupla ou tripla em "western blot" de diferentes extractos. Estas bandas não parecem resultar de fosforilações diferenciais, uma vez que o seu padrão não é alterado por tratamento com fosfatase, e podem ser o resultado da existência na célula de uma família de polipéptidos relacionados, embora não seja de excluir a existência de outras modificações pós-traducionais. O facto de o soro Rb5.3 não reconhecer proteínas em "western" blots de extractos nucleares de células humanas não é inesperado, uma vez que anticorpos anti-CENP-B também não apresentam reactividade contra proteínas de *Drosophila* (W. C. Earnshaw, resultados não publicados).

A produção do soro Rb5.3 também foi extremamente útil para esclarecer a possibilidade de os polipéptidos com pesos moleculares mais baixos resultarem da degradação proteolítica de uma proteína maior. Assim, anticorpos anti-p-71, anti-p-50, e anti-p-31 foram imunopurificados e utilizados em "western" blot da fracção AF1, verificando-se que os anticorpos imunopurificados não exibem reacções cruzadas, indicando que a p-50 e p-31 não são resultados da degradação da p-71. Pode ainda acontecer que os três polipéptidos sejam fragmentos de uma proteína ainda maior, mas os dados de que actualmente dispomos, sobre a localização dos genes que codificam para estas proteínas no genoma de *Drosophila* (J. Perdigão, M. C. Avides, e C. E. Sunkel; resultados não publicados), parecem excluir esta hipótese.

Uma outra questão que se punha relativamente às proteínas AF 1 e ao soro Rb5.3 era saber se estes anticorpos são capazes de reconhecer as proteínas AF1 ligadas ao DNA e confirmar que as três proteínas estão presentes no complexo observado em geis de retardação.

A ligação dos anticorpos às proteínas complexadas com o DNA satélite alfa foi testada através de ensaios de "super-shift", observando-se que o soro reconhece as proteínas em solução, quer livres, quer ligadas ao DNA, e que a ligação dos anticorpos não interfere com a capacidade de ligação ao DNA, possivelmente por estas regiões se situarem em diferentes domínios das proteínas. A presença das três proteínas no complexo com o DNA foi confirmada por "western blot" de geis de retardação e por retardações preparativas. Qualquer um dos métodos permitiu detectar a presença das três proteínas no complexo. Além disso, nas as retardações preparativas, os três polipéptidos aparecem corados com intensidade semelhante, sugerindo uma vez mais, que eles formam um complexo equimolar.

Ainda se desconhece qual dos três polipéptidos se liga directamente ao DNA, embora se tenha tentado responder a esta questão no decorrer deste trabalho, através de "UV-crosslinking". No entanto, os resultados obtidos não permitiram concluir com segurança a identidade do polipéptido que contacta directamente o DNA.

3. LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF1

Localização das proteínas AF1 em embriões de *Drosophila* através de microinjecção dos polipéptidos marcados com fluoresceína

Para determinar a localização dos polipéptidos AF1, esta fracção foi covalentemente ligada a fluoresceína e microinjectada em embriões de *Drosophila*. Estes embriões foram injectados durante a primeira hora da embriogénese e observados ao fim de períodos variáveis de tempo, utilizando microscopia confocal de laser. A fig III.11 mostra exemplos dos resultados obtidos com a microinjecção. Como controle positivo, histona H1 do timo de gado foi também ligada a fluoresceína e microinjectada nos embriões (fig III.11A-B), verificando-se que esta proteína colocaliza preferencialmente com a cromatina. Albumina bovina marcada com fluoresceína foi usada como controle negativo, não se tendo observado nenhuma acumulação preferencial desta proteína nos embriões. Os embriões foram então injectados com AF1-fluoresceína. Os resultados apresentados nas fig III.11C e 11E-F indicam que as proteínas AF1 se localizam na cromatina condensada. Os cromossomas apresentam um padrão de fluorescência difuso, mas são visíveis várias regiões aonde as proteínas AF1 se encontram particularmente concentradas (fig III.12 A e B). Estas regiões são zonas que apresentam uma coloração intensa com os corantes de DNA Hoechst 33258, e iodeto de propídeo, os quais coloram com maior intensidade a heterocromatina constitutiva (John, 1988). O padrão de fluorescência observado sugere então que as proteínas AF1 se acumulam particularmente em regiões de heterocromatina constitutiva.

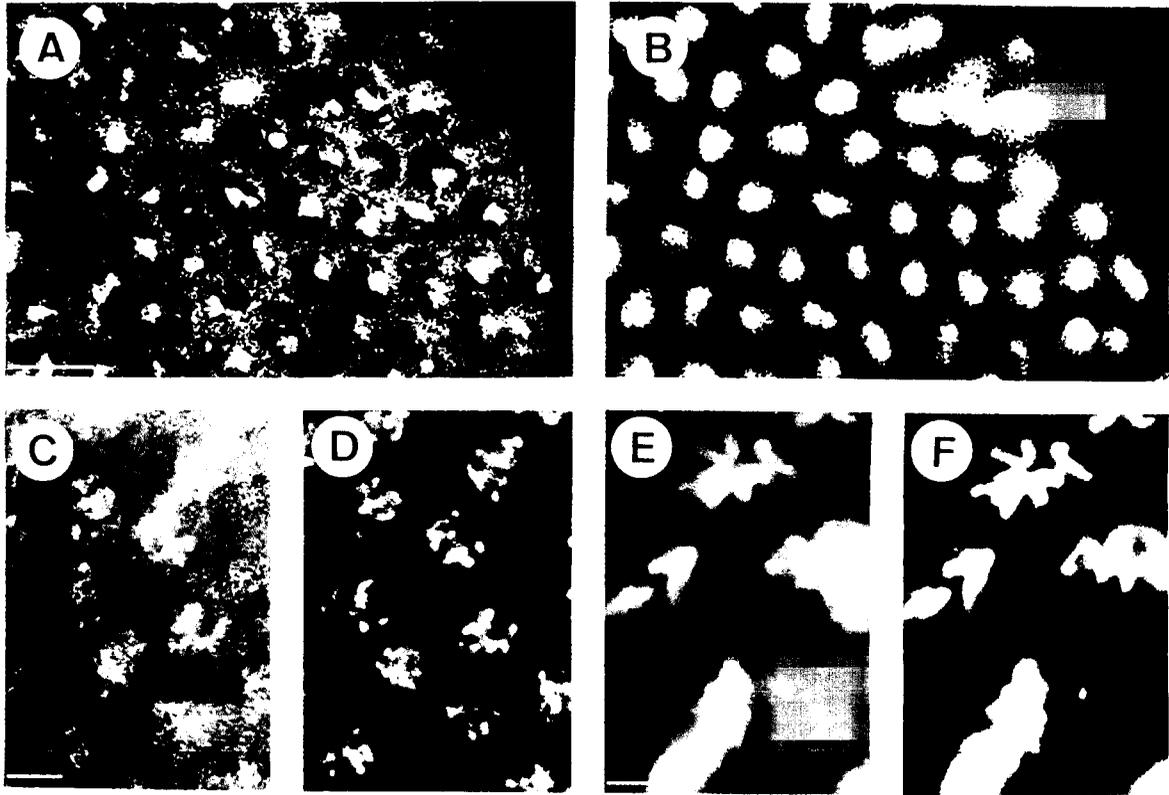


Fig III.11: Microinjecção de histona H1 e de proteínas AF1 marcadas com fluoresceína em embriões precoces de *Drosophila*. As preparações foram observadas por microscopia confocal e as imagens eram reconstruídas a partir de uma média de 15 secções ópticas da preparação. As proteínas AF1 foram marcadas com fluoresceína (A, C, e E) e o DNA foi corado com iodeto de propideo (B, D, e F). Embrião injectado com H1-fluoresceína observado a uma ampliação baixa (A e B). Observação, a alta ampliação, de diferentes preparações, mostrando quer núcleos em prometafase (C e D), quer em metafase (E e F). Barras: (A e B) 20 μm ; (C e D) 5 μm .

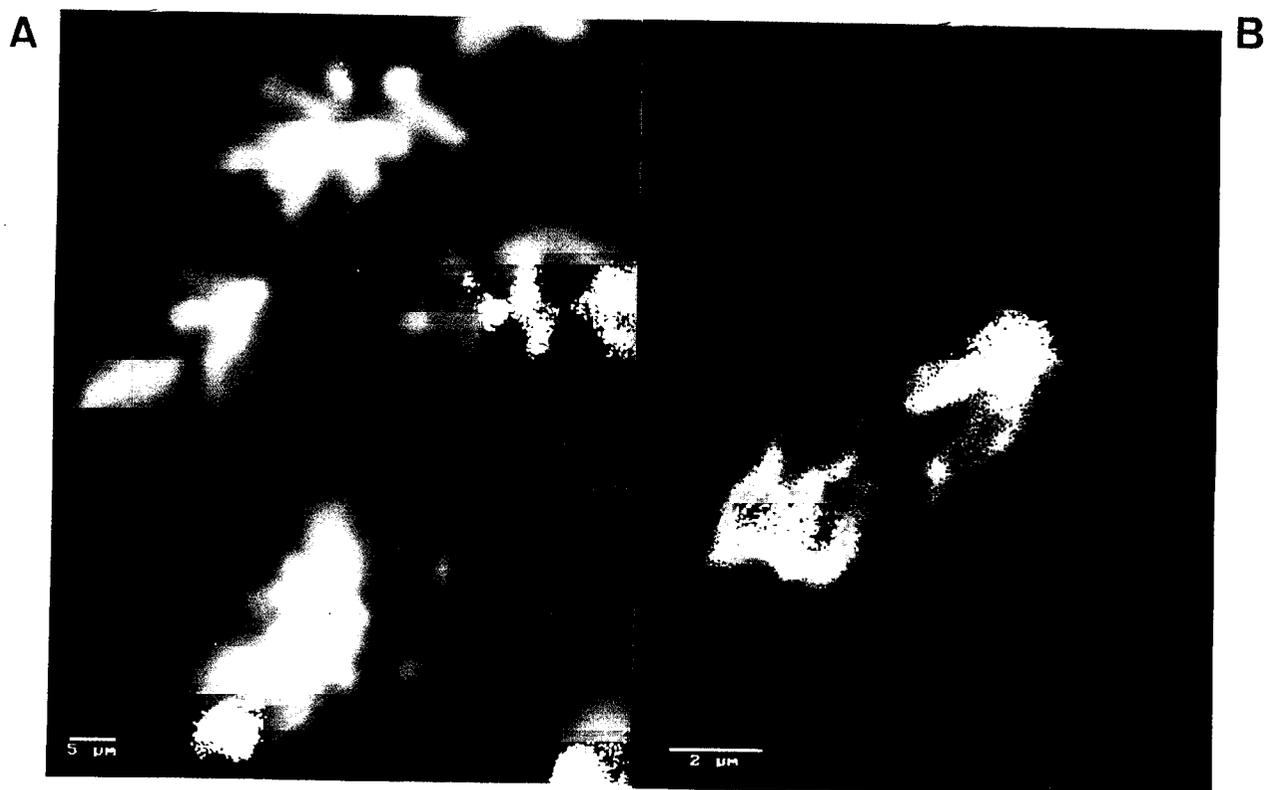


Fig III.12: Ampliação das imagens obtidas por microscopia confocal de embriões microinjectados com as proteínas AF1. A imagem de fluorescência do DNA é vista com cor vermelha, e a fluorescência das proteínas a verde, de modo a que nos locais aonde elas são sobreponíveis surge uma cor amarela. (A) Detalhe de metafases. (B) Detalhe de uma anafase.

Localização das proteínas AF1 por imunofluorescência indirecta

O soro policlonal Rb5.3 foi usado para determinar a localização das proteínas AF1 em embriões de *Drosophila*, ao longo do ciclo celular (fig III.13). Durante a interfase observa-se um padrão de coloração pontilhado ao longo da cromatina (fig III.13A). Estas zonas parecem convergir para alguns pontos por núcleo durante a prometáfase (fig III.13B). Em metafase, as proteínas aparecem particularmente concentradas no meio das placas metafásicas, em zonas que abrangem os centrómeros dos cromossomas (fig III.13C e fig III.14). No início da anáfase também se verifica uma acumulação centromérica dos antigéneos que se torna mais difusa no final desta fase (fig III.13D-E). Em telófase o padrão de coloração concentra-se num único ponto por núcleo (fig III.13F).

Na figura III.15, as imagens de fluorescência do DNA e das proteínas não foram sobrepostas, de maneira que se observa com maior nitidez o padrão de fluorescência dos antigéneos ao longo do ciclo celular (A, B, C, D).

Embora a imunolocalização em embriões forneça vários dados sobre a distribuição das proteínas ao longo do ciclo celular, não permite analisar detalhadamente a localização dos antigéneos nos cromossomas mitóticos. Para abordar esta questão incubaram-se cérebros esmagados de larvas na terceira fase com o soro Rb5.3. A fig III.16 mostra que as proteínas AF1 estão concentradas nas regiões pericentroméricas, embora também se observe uma marcação mais fraca nos braços dos cromossomas.

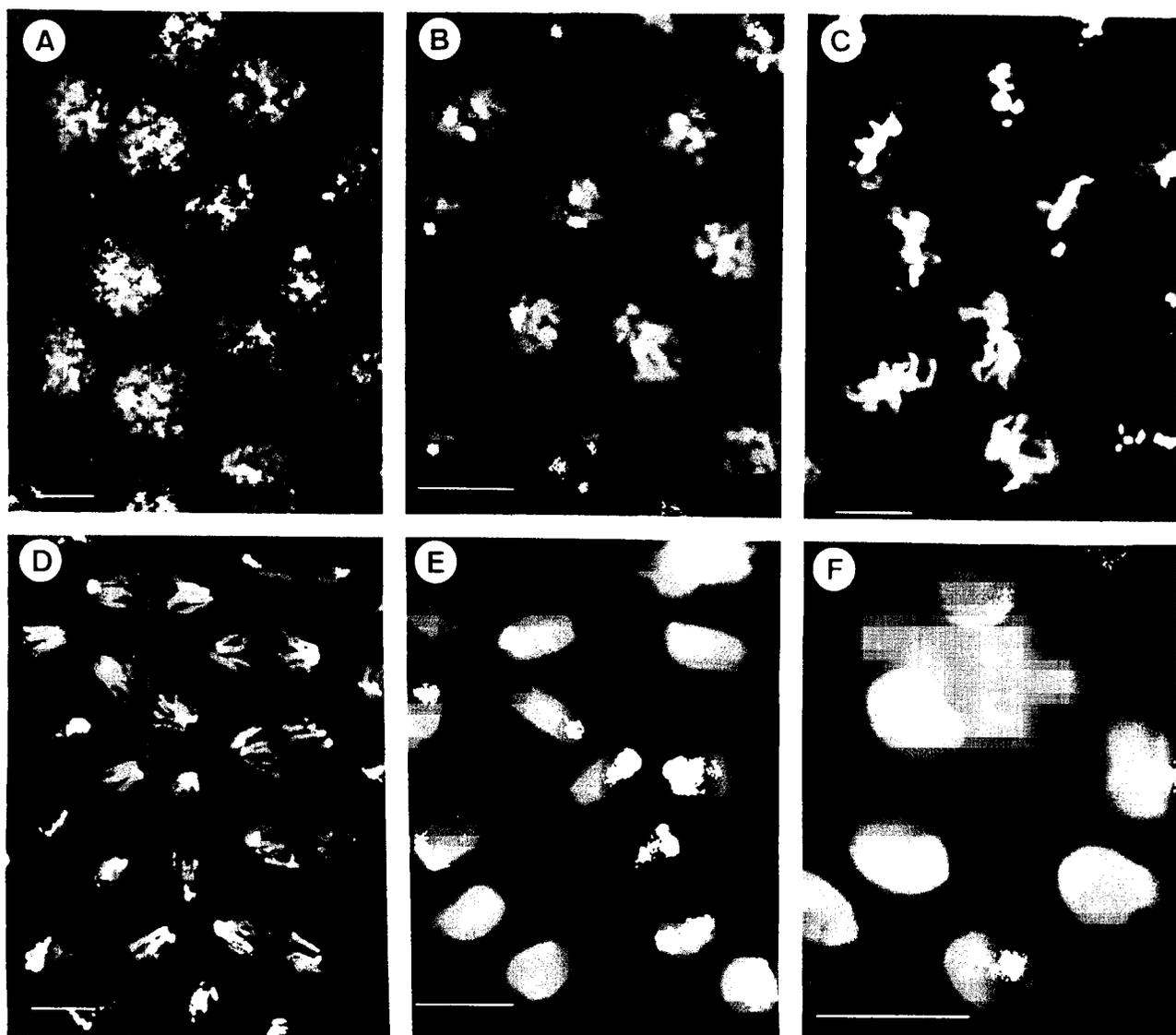


Fig III.13: Imunolocalização das proteínas AF1 durante a mitose em embriões precoces de *Drosophila*. As preparações foram observadas num microscópio confocal, utilizando as condições experimentais descritas anteriormente. As diferentes imagens foram obtidas de diferentes embriões em diferentes fases da mitose. (A) Interfase; (B) Prometáfase; (C) Metafase; (D) Anáfase; (E) Transição anáfase-telófase; e (F) telófase. O soro Rb5.3 foi usado a uma diluição final de 1:50. Barra: 5 μm .



Fig III.14: Detalhe da imunolocalização das proteínas AF1 numa placa metafásica. As condições experimentais são análogas às referidas nas figuras anteriores.

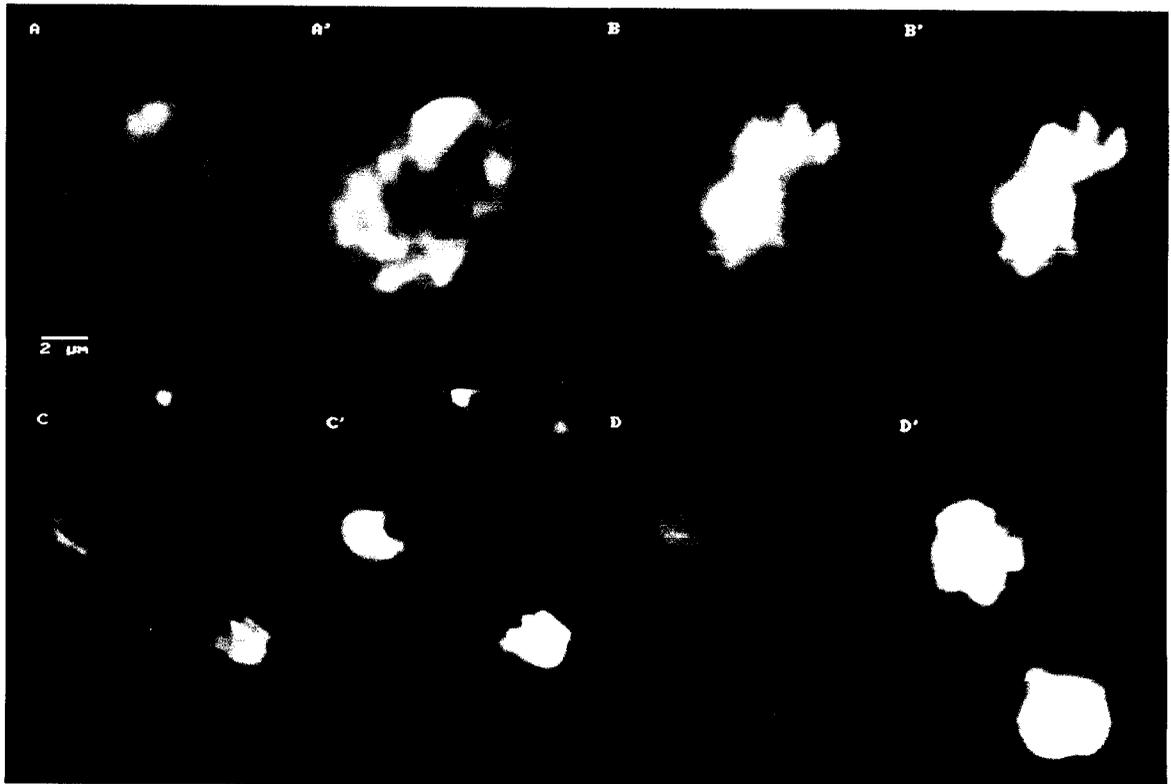


Fig III.15: Imunolocalização das proteínas AF1 durante a mitose em embriões precoces de *Drosophila*. As preparações foram observadas como referido na fig III.13, excepto que as imagens de fluorescência do DNA (A', B', C', e D') e das proteínas (A, B, C, e D) não foram sobrepostas. (A e A') Prometáfase; (B e B') metafase; (C e C') anáfase; e (D e D') transição anáfase-telófase.

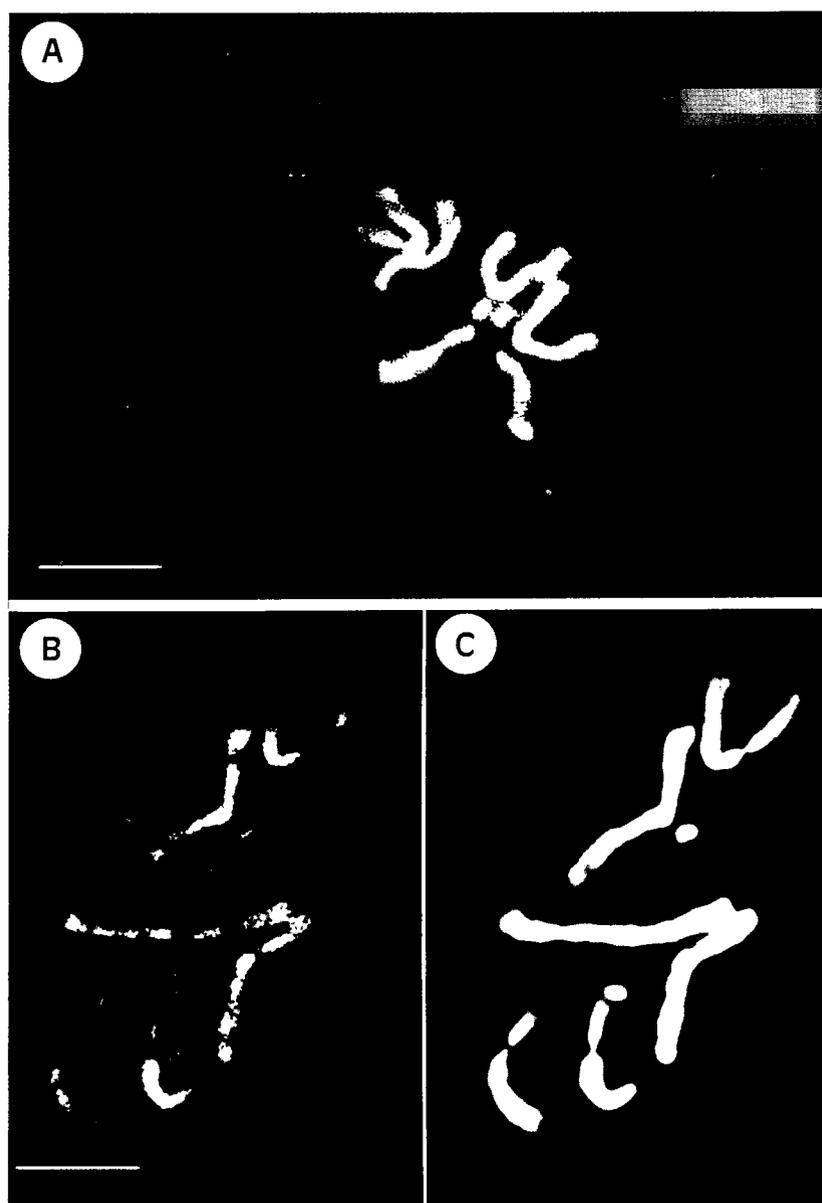


Fig III.16: Imunolocalização das proteínas AF1 em neuroblastos esmagados. Análise por microscopia confocal. (A) Sobreposição do padrão de coloração do DNA (vermelho) e dos anticorpos (verde). (B e C) Imagens, não sobrepostas, de uma preparação diferente de neuroblastos. (B) Marcação do soro Rb5.3; (C) coloração do DNA. Os cromátídeos individuais ainda não são visíveis nesta preparação. O padrão de marcação do soro Rb5.3 mostra uma acumulação significativa nas regiões heterocromáticas dos autossomas. Nos cromossomas 4 e X, o padrão de marcação é mais difuso. O soro Rb5.3 foi usado a uma diluição final de 1:50. Barra: 5 μ m.

DISCUSSÃO

A localização das proteínas AF1 em embriões de *Drosophila* foi determinada através de dois métodos: microinjecção das proteínas covalentemente ligadas a um fluorocromo, e imunolocalização com o soro Rb5.3. A primeira técnica tem a vantagem de assegurar que a distribuição observada corresponde à situação *in vivo*, uma vez que a possibilidade da ocorrência de ligações não específicas das proteínas, é baixa. Além disso, permite verificar se a presença de quantidades anormais de determinadas proteínas causa algum dano ao organismo, o que seria de esperar se ocorrer titulação de qualquer factor essencial que exista em pequenas quantidades. Por outro lado, a microinjecção é uma técnica de difícil execução experimental, tornando morosa a análise dos resultados.

A microinjecção das proteínas AF1, marcadas com fluoresceína, em embriões de *Drosophila*, durante a primeira hora da embriogênese, permitiu observar que estas proteínas se associam à cromatina dos núcleos diploides dos embriões, produzindo um padrão de fluorescência semelhante aos dos corantes fluorescentes de DNA, Hoechst 33258 e iodeto de propídeo, que se sabe corarem mais intensamente as regiões constitutivamente heterocromáticas. A fluorescência das proteínas só se observa a partir do 9º ciclo de divisão embrionária, após a migração dos núcleos para o córtex, o que pode ser consequência do tempo que as proteínas injectadas demoram a ser incorporadas. Nalguns casos, observa-se uma acumulação nítida das proteínas AF1 na região central das placas metafásicas e nos polos das figuras da anafase, aonde se situam os centrómeros dos cromossomas. A microinjecção não era prejudicial ao desenvolvimento dos embriões, uma vez que a taxa de sobrevivência dos embriões injectados com AF1 era semelhante

à de embriões injectados com soro fisiológico (50-60%). Uma vez que as proteínas AF1 injectadas parecem reter as suas características funcionais, pois são capazes de se associarem ao DNA *in vivo*, presume-se que estas não devem interagir com nenhum componente nuclear que exista em quantidades limites, o que será de esperar caso estas proteínas desempenhem uma função análoga à da CENP-B, isto é, participem na formação local de estruturas particulares da cromatina.

A localização das proteínas nos cromossomas dos embriões de *Drosophila* foi confirmada por imunolocalização. Verificou-se que estas proteínas se associam aos cromossomas dos embriões durante todas as fases da mitose, o que seria uma vez mais de esperar, para proteínas estruturais da cromatina que participem na formação de estruturas requeridas para a segregação cromossómica. Também se observou o mesmo padrão de fluorescência nalguns núcleos de embriões celularizados, antes e após a gastrulação.

Durante a interfase/início da profase, o soro Rb5.3 marca a cromatina de uma forma pontilhada. O número de pontos excede largamente o número de centrómeros, mas, se os centrómeros forem compostos por vários módulos iguais, então é possível que a distribuição das proteínas traduza a montagem das várias subunidades em centrómeros funcionais, no início da profase. No decorrer da profase/prometáfase, os pontos parecem convergir, acumulando-se em "manchas" maiores, cujo número por núcleo varia entre 1-3. Estes pontos podem resultar da organização espacial dos centrómeros, e da heterocromatina constitutiva, em regiões definidas, embora tal acumulação não tenha sido demonstrada no caso de núcleos embrionários de *Drosophila*. Durante a metafase e a anafase, os antigéneos acumulam-se preferencialmente nas zonas dos centrómeros dos cromossomas, embora

também se observe uma fluorescência mais fraca nalguns braços dos cromossomas. A acumulação das proteínas no topo das figuras anafásicas é mantida até à telofase, altura em que a distribuição se alarga, formando outra vez uma "mancha" em cada novo bloco de cromatina.

Os antigéneos também surgem associados aos cromossomas metafásicos de neuroblastos esmagados de larvas na 3ª fase, mas não se encontram apenas nos centrómeros, sendo visível fluorescência nos braços dos cromossomas. No entanto, as técnicas utilizadas para fixar estas preparações podem alterar a antigenicidade do tecido, o que complica a interpretação dos resultados obtidos.

Em cromossomas politénicos não foi possível observar nenhum padrão específico de fluorescência, nem acumulação no cromocentro, o que não será de estranhar se as proteínas AF1 estiverem envolvidas na formação de centrómeros funcionais que não existam nos cromossomas politénicos.

IV. CONCLUSÕES

Nesta tese é apresentada a purificação de três polipéptidos através da sua capacidade de ligação à sequência de DNA centromérico humano, CENP-B box. Com base nos resultados obtidos por ensaios de retardação em gel e por protecção à digestão com DNaseI, pode-se concluir que os polipéptidos purificados exibem uma actividade específica de ligação à sequência CENP-B box. Os valores obtidos para a actividade específica de ligação ao longo das várias etapas de purificação são semelhantes aos valores apresentados para a purificação da CENP-B humana (Muro *et al*, 1992). Estes autores descrevem a purificação de CENP-B de células HeLa através de cromatografia de troca iónica e de afinidade. A fracção por eles purificada consiste de um polipéptido principal com peso molecular aparente em SDS-PAGE 80 kDa, identificado como sendo a CENP-B, bem como de dois outros polipéptidos menos abundantes, com 65 kDa, um dos quais parece resultar de degradação proteolítica da CENP-B. A outra banda não era reconhecida por anticorpos policlonais anti-CENP-B, sendo possível que este polipéptido seja distinto da CENP-B. Neste trabalho usou-se um protocolo semelhante para a purificação de polipéptidos de *Drosophila* com actividade específica de ligação à sequência CENP-B box. A fracção purificada obtida consiste de três polipéptidos com pesos moleculares aparentes 71, 50, e 31 kDa em SDS-PAGE. A eficácia deste protocolo foi testada na purificação de CENP-B de células Hep2. A fracção obtida após purificação de extractos nucleares humanos, consiste de um polipéptido com 80 kDa, identificado como CENP-B através de "western blot"; bem como de dois outros polipéptidos, um com 65 kDa e outro com 28 kDa, que não reagem com anticorpos anti-CENP-B. Esta fracção liga-se ao DNA satélite alfoide α -341 em geis de retardação, reconhecendo a sequência CENP-B box em ensaios de protecção à digestão por DNase I. Muro *et al* (1992) descreveram que a CENP-B não exhibe

actividade de ligação a um oligonucleótido sintético que continha apenas a sequência CENP-B box, sugerindo que as sequências adjacentes também são importantes para a formação de um complexo. Neste trabalho usaram-se concatâmeros de um oligonucleótido com 21 bp tanto para a construção da coluna de afinidade, como para os ensaios de retardação em gel, o que pode explicar a actividade de ligação observada.

As proteínas AF1, tal como a CENP-B, são capazes de se ligarem especificamente a sequências CENP-B box, em ensaios de retardação em gel. Experiências de protecção à digestão por DNase I também mostram que as proteínas AF1 originam um padrão de protecção semelhante ao produzido pela CENP-B (Muro *et al*, 1992). A única diferença observada é que a região protegida pelas proteínas AF1 é ligeiramente maior do que a região protegida pela CENP-B. Estas diferenças podem resultar de contactos diferenciais com as bases nas moléculas de DNA, ou de diferentes tamanhos e conformações dos complexos proteicos. A CENP-B liga-se ao DNA sob a forma de um dímero (Yoda *et al*, 1992) e o complexo AF1 contém três proteínas diferentes que podem originar um complexo maior, impedindo o acesso da DNase I a mais algumas bases.

Visando uma melhor caracterização dos antigéneos AF1, foram induzidos anticorpos policlonais contra as três proteínas. "Western blots" de vários extractos celulares e nucleares de *Drosophila* indicam que os polipéptidos não derivam da proteólise de um precursor maior. Esta conclusão baseia-se no facto de que se observam sempre as três proteínas em diferentes extractos preparados em alturas diferentes, e a adição de vários inibidores de proteases não altera o padrão observado. Além disso, anticorpos imunopurificados contra cada um dos polipéptidos apenas reconhecem o

polipéptido original em extractos nucleares de células Kc e em fracções AF1 purificadas.

O protocolo usado na purificação das proteínas AF1 de *Drosophila* também funciona para o isolamento de CENP-B humana. Contudo, os anticorpos Rb5.3 não reagem contra proteínas nucleares de células humanas Hep2 nem com a fracção enriquecida em CENP-B. Estes resultados sugerem que as proteínas AF1 e a CENP-B partilham a capacidade de se ligarem à CENP-B box mas não exibem extensa homologia de sequência. Tal facto não é inesperado, uma vez que anticorpos anti-CENP-B e soros autoimunes humanos também não reconhecem proteínas do centrómero de *Drosophila* (W. C. Earnshaw, resultados não publicados).

O antigéneo de 50 kDa apresenta heterogenidade na sua composição, em extractos de diferentes tipos de células, como se observa em "Western blots". Tal facto pode ser devido quer à existência de uma família de polipéptidos relacionados nas células, quer a modificações pós-traducionais de um único polipéptido. Contudo, só uma dessas formas é obtida após a purificação, o que pode resultar da perda de modificações pós-traducionais durante o processo de extração e purificação das proteínas, ou pode indicar que só um dos polipéptidos exhibe actividade de ligação ao DNA. Uma vez que todas as purificações efectuadas originaram apenas um polipéptido, é possível que só este participe na formação do complexo proteína/DNA. Caso existam modificações pós-traducionais, estas não parecem ser devidas a fosforilação, uma vez que o tratamento dos extractos com fosfatase não altera o padrão de bandas observado.

O soro Rb5.3 também foi usado para investigar quais os polipéptidos que fazem parte do complexo proteína/DNA e para averiguar se a ligação aos anticorpos alterava ou não a actividade de ligação ao DNA. Ensaios de

"super-shift" mostram que pelo menos um dos polipéptidos é um componente do complexo e que a ligação aos anticorpos não afecta a capacidade de ligação ao DNA. A composição do complexo foi posteriormente caracterizada através de transferência para nitrocelulose e incubação com anticorpos imunopurificados anti-p71, anti-p50 e anti-p31. Os resultados obtidos mostram que as três proteínas são constituintes do complexo com o DNA α -341. A composição proteica do complexo foi ainda confirmada por ensaios de retardação preparativos e os resultados mostram claramente que os três polipéptidos estão presentes no complexo proteína/DNA..

A microinjecção das proteínas AF1 marcadas com fluoresceína foi usada para verificar se os polipéptidos permaneciam funcionais *in vivo* e também para ter uma ideia da sua localização nos embriões em desenvolvimento. Os resultados mostram que um (ou mais do que um) dos polipéptidos da fracção AF1 podem ser incorporados na cromatina de embriões vivos sem que o padrão de multiplicação nuclear seja alterado. A maioria dos embriões não aparentam anomalias mitóticas e apresentam uma quantidade de núcleos normal. A incorporação de AF-1 fluoresceína revelou ser relativamente baixa e só a foi possível observar após o nono ciclo de divisão, após a migração dos núcleos para o córtex. A análise detalhada do padrão de fluorescência das proteínas ao longo da mitose revela que este é muito semelhante ao padrão de coloração de DNA pelos corantes fluorescentes Hoechst 33258 e iodeto de propídeo. Uma vez que estes corantes se ligam preferencialmente à heterocromatina (John, 1988), conclui-se que as proteínas AF1 se encontram concentradas em regiões heterocromáticas.

A imunolocalização das proteínas AF1 durante as várias fases da mitose em núcleos de embriões de *Drosophila* não celularizados foi

determinada com o soro policlonal Rb5.3. Os resultados mostram que os antígenos se associam à cromatina durante todas as fases do ciclo mitótico nuclear. Durante a profase, o padrão de marcação apresenta-se estritamente confinado a algumas zonas da cromatina e em metafase concentra-se no centro das placas metafásicas. Durante a anafase a marcação é mais intensa nas regiões dos cromátídeos próximas dos polos, aonde os centrómeros se encontram. Na anafase tardia o padrão é semelhante mas a área marcada torna-se mais difusa. Durante a telofase a marcação pelos anticorpos está confinada a uma única área que tem a aparência de uma mancha na cromatina.

O padrão de marcação dos anticorpos em metafase e anafase sugere que as proteínas AF1 se localizam nos centrómeros, ou muito próximo deles e os mesmos resultados foram obtidos através da microinjeção das proteínas AF1. Embora não existam cromocentros nos embriões de *Drosophila* (John, 1988), é tentador especular que as proteínas AF1 se localizem nas regiões ricas em heterocromatina constitutiva durante a interfase, e, durante a mitose, é nítido que as proteínas se localizam em regiões heterocromáticas. No entanto, também se observa uma coloração fraca dos braços dos cromossomas. Este padrão pode reflectir quer a localização diferencial de um dos antígenos quer a localização do complexo formado pelos três polipéptidos. O padrão de localização é diferente do apresentado pela CENP-B em células humanas, que está sempre associada à cromatina como pontos bem definidos e claramente confinados aos centrómeros da maioria dos cromossomas humanos (Pluta *et al*, 1992).

Com vista a caracterizar em maior detalhe a localização das proteínas AF1 em cromossomas, os anticorpos foram usados para imunofluorescência em neuroblastos esmagados de larvas na terceira fase, provenientes de

cérebros que não haviam sido tratados com colquicina. Os resultados indicam que as proteínas AF1 se localizam preferencialmente nas regiões ricas em heterocromatina constitutiva. Contudo, a interpretação destes resultados é complicada pelo facto de que os métodos utilizados para fixar e alongar os cromossomas metafásicos podem solubilizar algumas proteínas. Nalguns casos, a acumulação centromérica dos antigéneos é óbvia, embora os braços dos cromossomas também apareçam corados. Consequentemente, permanece a questão de porque é que antigéneos que apresentam uma actividade altamente específica de ligação à sequência CENP-B box, demonstram ter uma localização tão lata. Além disso, nós não sabemos se o DNA centromérico de *Drosophila* possui sequências homólogas à CENP-B box, embora resultados obtidos no nosso laboratório sugiram que o DNA centromérico de *Drosophila* possui sequências relacionadas com a CENP-B box, mas não foi ainda encontrada nenhuma homologia perfeita (P. A. Coelho e C. E. Sunkel; resultados não publicados). Talvez a especificidade de ligação das proteínas AF1 à sequência CENP-B box se observe só no contexto do DNA α -341.

A ocorrência da CENP-B box nos cromossomas humanos é variável, e o cromossoma Y não contém esta sequência (Choo *et al*, 1991). A solução mais razoável para o paradoxo é a de que a CENP-B seja funcionalmente redudante, existindo na célula outras proteínas que desempenham a mesma função. A função deste componente poderá não ser só requerida para a formação de um centrómero funcional com um cinetocoro na sua superfície exterior, mas poderá ser também necessária para a organização da heterocromatina centromérica e pericentromérica. Dada a distribuição dos antigéneos AF1 é concebível que pelo menos uma das três proteínas isoladas corresponda a um homólogo funcional de CENP-B.

Neste momento está a decorrer a clonagem dos genes que codificam para estas proteínas e os resultados obtidos até agora indicam que de facto estes são genes ainda não identificados (J. Perdigão, M. C. Avides, e C. E. Sunkel; resultados não publicados). A sua clonagem permitirá caracterizar mais detalhadamente as proteínas AF1 e determinar a localização individual de cada polipéptido nos cromossomas mitóticos. Além disso, a localização das sequências que codificam para os polipéptidos AF1 no genoma de *Drosophila* iniciará uma análise genética, abrindo caminho ao estudo da função que estas proteínas desempenham.

Embora as sequências de DNA que compoem o centrómero variem bastante de organismo para organismo, a aparência morfológica e as funções que esta estrutura desempenha são relativamente conservadas, sugerindo que existe uma conservação filogenética do centrómero a nível da topologia e função. Neste cenário, pode-se imaginar que embora as sequências de DNA e as proteínas do centrómero descritas até agora (em *S. cerevisiae*, *S. pombe*, e mamíferos) não sejam idênticas, deve existir uma unicidade funcional, isto é, proteínas diferentes devem ser capazes de desempenhar a mesma função. O trabalho apresentado nesta tese, de facto, sugere que existem proteínas funcionalmente relacionadas em células humanas e de *Drosophila melanogaster* cuja sequência não apresenta grandes homologias (com base na reactividade cruzada de anticorpos), como é o caso da CENP-B e das proteínas AF1. Tais proteínas podem ser componentes estruturais e funcionais de pequenos módulos dispersos entre regiões de cromatina com tamanhos e sequências variáveis, e que, devido à condensação da cromatina que ocorre durante a mitose, são justapostos nos cromossomas condensados, formando um centrómero funcional.

V. BIBLIOGRAFIA

Adachi, Y., E. Käs, & U. K. Laemmli. 1989. "Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions". *EMBO J.* 13:3997-4006.

Adachi, Y., M. Luke, & U. K. Laemmli. 1991. "Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation". *Cell* 64:137-148.

Adams, C. C., & J. L. Workman. 1993. "Nucleosome displacement in transcription". *Cell* 72:305-308.

Alberts, B. M., & R. Sternglanz. 1990. "Chromatin contract to silence". *Nature* 344:193-194.

Aparicio, O. M., B. L. Billington, & D. E. Gottschling. 1991. "Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*". *Cell* 66:1279-1287.

Ascoli, C. A., & G. G. Maul. 1991. "Identification of a novel nuclear domain". *J. Cell Biol.* 112: 785-795.

Ashburner, M. 1989. "*Drosophila*: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.

Ashley, C. T., C. G. Pendleton, W. W. Jennings, A. Saxena, & C. V. C. Glover. 1989. "Isolation and sequencing of cDNA clones encoding *Drosophila* chromosomal protein D1". *J. Biol. Chem.* 264:8394-8401.

Avides, M. C., C. E. Sunkel, P. Moradas-Ferreira, & C. Rodrigues-Pousada. 1990. "Properties and partial characterization of the heat shock factor from *Tetrahymena pyriformis*." *Eur. J. Biochem.* 194: 331-336.

Baker, R. E., & D. C. Masison. 1990. "Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere-binding protein CP1". *Mol. Cell. Biol.* 10:2458-2467.

Baksa, K., H. Morawietz, V. Dombrádi, M. Axton, H. Taubert, G. Szabó, A. Udvardy, H. Gyurkovics, B. Szöör, D. Glover, G. Reuter, & J. Gausz. 1993.

"Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*". *Genetics* 135:117-125.

Baum, M., V. K. Ngan, & L. Clark. 1994. "The centromeric k-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere". *Mol. Biol. Cell* 5: 747-761.

Baumgartner, M., B. Dutrillaux, N. Lemieux, A. Liliembaum, D. Paulin, & E. Viegas-Péquignot. 1991. "Genes occupy a fixed and symmetrical position on sister chromatids". *Cell* 64:761-766.

Belgrader, P., A. J. Siegel, & R. Berezney. 1991. "A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix." *J. Cell Sci.* 98:281-291.

Belmont, A. S., M. B. Braunfeld, J. W. Sedat, & D. A. Agard. 1989. "Large-scale structural chromatin domains within mitotic and interphase chromosomes *in vivo* and *in vitro*". *Chromosoma* 98:129-143.

Benyajati, C., & A. Worcel. 1976. "Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*." *Cell* 9:393-407.

Berezney, R., & D. S. Coffey. 1977. "Nuclear matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei." *J. Cell Biol.* 73:616-637.

Bernat, R. L., G. G. Borisy, N. F. Rothfield, & W. C. Earnshaw. 1990. "Injection of anticentromere antibodies in interphase disrupts events required for chromosome movement at mitosis." *J. Cell Biol.* 111: 1519-1533.

Bernat, R. L., M. R. Delannoy, N. F. Rothfield, & W. C. Earnshaw. 1991. "Disruption of centromere assembly during interphase inhibits kinetochore morphogenesis and function in mitosis". *Cell* 66:1229-1238.

Beven, A., Y. Guan, J. Peart, C. Cooper, & P. Shaw. 1991. "Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament-related components within the nucleus." *J. Cell Sci.* 98:293-302.

Bischoff, F. R., G. Maier, G. Tilz, & H. Ponstingl. 1990. "A 47-kDa human nuclear protein recognized by antikinetochore autoimmune sera is homologous with the protein encoded by RCC1, a gene implicated in the onset of chromosome condensation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8617-8621.

Bloom, K. S., & J. Carbon. 1982. "Yeast centromere DNA is in a unique & highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes". *Cell* 29:305-317.

Bone, J. R., J. Lavender, R. Richman, M. J. Palmer, B. M. Turner, & M. I. Kuroda. 1994. "Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*". *Genes & Dev.* 8:96-104.

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

Bram, R. J. & R. D. Kornberg. 1987. "Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* centromere DNA-binding protein, its human homolog, and its possible role as a transcription factor."

Brinkley, B. R., M. M. Valdivia, A. Tousson, & R. D. Balczon. 1989. "The kinetochore: structure and molecular characterization". In "Mitosis: Molecules and mechanisms". J. Hyams & B. R. Brinkley, editors. Academic Press. New York. pp. 77-111.

Bustin, M., D. A. Lehn, & D. Landsman. 1990. "Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes". *Biochim. Biophys. Acta* 1049:231-243.

Campos-Ortega, J. A., & V. Hartenstein. 1985. "The embryonic development of *Drosophila melanogaster*". Springer Verlag. Berlin.

- Carbon, J. 1984. "Yeast centromeres: structure and function". *Cell* 37: 351-353.
- Carmena, M., J. P. Abad, A. Villasante, & C. Gonzalez. 1993. "The *Drosophila melanogaster* dodecasatellite sequence is closely linked to the centromere and can form connections between sister chromatids during mitosis." *J. Cell Sci.* 105: 41-50.
- Carmo-Fonseca, M., R. Pepperkork, M. T. Carvalho, & A. I. Lamond. 1992. "Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies". *J. Cell Biol.* 117: 1-14.
- Chan, C., L. Rastelli, & V. Pirrotta. 1994. "A polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression." *EMBO J.* 13:2553-2564.
- Chien, C., S. Buck, R. Sternglanz, & D. Shore. 1993. "Targeting of SIR1 protein establishes transcriptional silencing at HM loci and telomeres in yeast". *Cell* 75:531-541.
- Choo, K. H., B. Vissel, A. Nagy, E. Earle, & P. Kalitsis. 1991. "A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all human chromosomes and derivation of a new consensus sequence". *Nucleic Acids Res.* 19:1179-1182.
- Clarke, L., & J. Carbon. 1983. "Genomic substitutions of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature* 305: 23-28.
- Clarke, L., & J. Carbon. 1985. "The structure and function of yeast centromeres". *Annu. Rev. Genet.* 19: 29-56.
- Conconi, A., R. M. Widmer, T. Koller, & J. M. Sogo. 1989. "Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the Cell cycle". *Cell* 57:753-761.
- Cook, P. R. 1990. "How mobile are active RNA polymerases?." *J. Cell Sci.* 96:189-192.

- Cook, P. R.. 1994. "RNA polymerase: structural determinant of the chromatin loop and the chromosome." *BioEssays* 16:425-430.
- Cooke, C. A., R. L. Bernat, & W. C. Earnshaw. 1990. "CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore". *J. Cell Biol.* 110: 1475-1488.
- Cooke, C. A., M. M. S. Heck, & W. C. Earnshaw. 1987. "The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis." *J. Cell Biol.* 105: 2053-2067.
- Cox, L. S., & R. A. Laskey. 1991. "Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin." *Cell* 65:569-578.
- Crippa, M. P., L. Trieschmann, P. J. Alfonso, A. P. Wolffe, & M. Bustin. 1993. "Deposition of chromosomal protein HMG-17 during replication affects the nucleosomal ladder and the transcriptional potential of nascent chromatin." *EMBO J.* 12:3855-3864.
- DeCamillis, M., N. Cheng, D. Pierre, & H. W. Brock. 1992. "The *polyhomeotic* gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb." *Genes & Dev.* 6:223-232.
- Dickinson, L. A., T. Joh, Y. Kohwi, & T. Kohwi-Shigematsu. 1992. "A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition." *Cell* 70:631-645.
- Ding, H., S. Rimsky, S. C. Batson, M. Bustin, & U. Hansen. 1994. "Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-14." *Science* 265:796-799.
- Dorn, R., J. Szidonya, G. Korge, M. Sehnert, H. Taubert, E. Archoukieh, B. Tschiersch, H. Morawietz, G. Wustmann, G. Hoffman, & G. Reuter. 1993. "P transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 133:279-290.

Earnshaw, W. C. 1991. "Large scale chromosome structure and organization." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:237-244.

Earnshaw, W. C., & N. F. Rothfield. 1985. "Identification of a family of three related centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma." *Chromosoma* 91: 313-321.

Earnshaw, W. C., & M. M. S. Heck. 1985. "Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes." *J. Cell Biol.* 100:1716-1725.

Earnshaw, W. C., & M. M. S. Heck. 1988. "Cell Biology of topoisomerase II" *Cancer Cells* 6:279-288.

Earnshaw, W. C., B. Halligan, C. A. Cooke, M. M. S. Heck, & L. F. Liu. 1985. "Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds." *J. Cell Biol.* 100:1706-1715.

Earnshaw, W. C., & C. A. Cooke. 1991. "Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in cleavage furrow formation." *J. Cell Sci.* 98: 443-461.

Earnshaw, W.C., K. F. Sullivan, P. S. Machlin, C. A. Cooke, D. A. Kaiser, T. D. Pollard, N. F. Rothfield, & D.W. Cleveland. 1987. "Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere antigen." *J. Cell Biol.* 104: 817-829.

Eissenberg, J. C., T. C. James, D. M. Foster-Hartnett, T. Hartnett, V. Ngan, & S. C. R. Elgin. 1990. "Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9923-9927.

Eissenberg, J. C., G. D. Morris, G. Reuter, & T. Hartnett. 1992. "The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation." *Genetics* 131:345-352.

- Epstein, H., T. C. James, & P. B. Singh. 1992. "Cloning and expression of *Drosophila* HP1 homologs from a mealybug, *Planococcus citri*." *J. Cell Sci.* 101:463-474.
- Foe, V., & B. M. Alberts. 1983. "Studies of nuclear and cytoplasmatic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis." *J. Cell Sci.* 61:31-70.
- Foe, V., & B. M. Alberts. 1985. "Reversible chromosome condensation induced in *Drosophila* embryos by anoxia: visualization of interphase nuclear organization." *J. Cell Biol.* 100:1623-1636.
- Foe, V. E. 1989. "Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos." *Development* 107:1-22.
- Franke, A., M. DeCamillis, D. Zink, N. Cheng, H. W. Brock, & R. Paro. 1992. "Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*." *EMBO J.* 11:2941-2950.
- Gasser, S. M., T. Laroche, J. Falquet, E. Boy de la Tour, & U. K. Laemmli. 1986. "Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II." *J. Mol. Biol.* 188:613-629.
- Garzino, V., A. Pereira, P. Laurenti, Y. Graba, R. W. Levis, Y. Le Parco, & J. Pradel. 1992. "Cell lineage-specific expression of *modulo*, a dose-dependent modifier of variegation in *Drosophila*". *EMBO J.* 11:4471-4479.
- Giese, K., J. Cox, & R. Grosschedl. 1992. "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." *Cell* 69:185-195.
- Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington, & V. A. Zakian. 1990. "Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of polII transcription." *Cell* 63:751-762.

Graziano, V., S. E. Gerchman, D. K. Schneider, & V. Ramakrishnan. 1994. "Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament." *Nature* 368:351-354.

Grosschedl, R., K. Giese, & J. Pagel. 1994. "HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures". *Trends Genet.* 10:94-100.

Haaf, T., P. E. Warburton, & H. F. Willard. 1992. "Integration of human α -satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation". *Cell* 70: 681-696.

Harlow, E., & D. Lane. 1988. "Antibodies: a laboratory manual". edn 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.

Hassan, A. B., R. J. Errington, N. S. White, D. A. Jackson, & P. R. Cook. 1994. "Replication and transcription sites are colocalized in human cells". *J. Cell Sci.* 107:425-434.

He, D., J. A. Nickerson, & S. Penman. 1990. "Core filaments of the nuclear matrix". *J. Cell Biol.* 110:569-580.

Hegemann, J., & U. N. Fleig. 1993. "The centromere of budding yeast". *BioEssays* 15:451-460.

Henikoff, S..1990. "Position-effect variegation after 60 years". *Trends Genet.* 6:422-426.

Hernandez-Verdun, D., M. Robert-Nicoud, G. Geraud, & C. Masson. 1991. "Behaviour of nucleolar proteins in nuclei lacking ribosomal genes: a study by confocal laser scanning microscopy". *J. Cell Sci.* 98:99-105.

Hill, R. J., & S. Whytock. 1993. "Cytological structure of the native polytene salivary gland nucleus of *Drosophila melanogaster*: a microsurgical analysis". *Chromosoma* 102:446-456.

Hiraoka, Y., J. S. Minden, J. R. Swedlow, J. W. Sedat, & D. A. Agard. 1989. "Focal points for chromosome condensation and decondensation revealed by three-dimensional in vivo time-lapse microscopy". *Nature* 342:293-296.

Hirschhorn, J. N., S. A. Brown, C. D. Clark, & F. Winston. 1992. "Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure". *Genes & Dev.* 6:2288-2298.

Hochstrasser, M., D. Mathog, Y. Gruenbaum, H. Saumweber, & J. W. Sedat. 1986. "Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*". *J. Cell Biol* 102: 112-123.

Hochstrasser, M., & J. W. Sedat. 1987. "Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. I. Tissue-specific aspects of polytene nuclear architecture". *J. Cell Biol.* 104:1455-1470.

Hozák, P., D. A. Jackson, & P. R. Cook. 1994. "Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the Cell cycle". *J. Cell Sci.* 107: 2191-2202.

Hyman, A. A., K. Middleton, M. Centola, T. J. Mitchison, & J. Carbon. 1992. "Microtubule-motor activity of a yeast centromere-binding protein complex". *Nature* 359:533-535.

Jackson, D. A. 1991. "Structure-function relationships in eukaryotic nuclei". *BioEssays* 13:1-10.

Jackson, D. A., & P. R. Cook. 1988. "Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat". *EMBO J.* 7:3667-3677.

Jackson, D. A., P. Dickinson, & P. R. Cook. 1990. "The size of chromatin loops in HeLa cells". *EMBO J.* 9:567-571.

Jackson, D. A., A. B. Hassan, R. J. Errington, & P. R. Cook. 1993. "Visualization of focal sites of transcription within human nuclei". *EMBO J.* 12:1059-1065.

Jackson, D. A., A. S. Balajee, L. Mullenders, & P. R. Cook. 1994. "Sites in human nuclei where DNA damaged by ultraviolet light is repaired: visualization and localization relative to the nucleoskeleton". *J. Cell Sci.* 107:1745-1752.

Jeppesen, P., & B. M. Turner. 1993. "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression". *Cell* 74:281-289.

Jeppesen, P., A. Mitchell, B. Turner, & P. Perry. 1992. "Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes". *Chromosoma* 101:322-332.

Jiang, W., K. Middleton, H. Yoon, C. Fouquet, & J. Carbon. 1993. "An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres & microtubules". *Moll. Cell. Biol.* 13: 4884-4893.

John, B. 1988. "The biology of heterochromatin. In Heterochromatin: Molecular and structural aspects". R. S. Verma, editor. Cambridge University Press, Cambridge. 1-147.

Kadonaga, J. T., & R. Tjian. 1986. "Affinity purification of sequence-specific DNA-binding proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5889-5893.

Karr, T. L., & B. M. Alberts. 1986. "Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos". *J. Cell Biol.* 102:1494-1509.

Kellum, R., & P. Schedl. 1991. "A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains". *Cell* 64:941-950.

Kharrat, A., J. Derancourt, M. Dorée, F. Almaric, & M. Erard. 1991. "Synergistic effect of histone H1 and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer". *Biochemistry* 30:10329-10336.

- Kwon, H., A. N. Imbalanzo, P. A. Khavari, R. E. Kingston, & M. R. Green. 1994. "Nucleosome disruption & enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex". *Nature* 370:477-481.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227:680-
- Lechner, J., & J. Carbon. 1991. "A 240 kDa multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere". *Cell* 64: 717-725.
- Levinger, L. F. 1985. "D1 protein of *Drosophila melanogaster*". *J. Biol. Chem.* 260:14311-14318.
- Lewis, C. D., & U. K. Laemmli. "Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions". *Cell* 17:849-858.
- Lilley, D. M. J. 1992. "HMG has DNA wrapped up". *Nature* 357:282-283.
- Locke, J., M. A. Kotarski, & K. D. Tartoff. 1988. "Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect." *Genetics* 120:181-189.
- Mahowald, A., & M. P. Kambysellis .1980. "The genetics & biology of *Drosophila*". 2nd ed. M. Ashburner & T. R. F. Wright. Academic Press, London & NY.
- Masumoto, H., H. Masukata, Y. Muro, N. Nozaki, & T. Okazaki. 1989a. "A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromere satellite." *J. Cell Biol.* 109: 1963-1973.
- Masumoto, H., K. Sugimoto, & T. Okazaki. 1989b. "Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the Cell cycle." *Exp. Cell Res.* 181: 181-196.
- Maxam, A. M., & W. Gilbert. 1980. "Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages." *Meth. Enzimol.* 65:499-559

- McGhee, J. D., & G. Felsenfeld. 1989. "Nucleosome structure." *Annu. Rev. Biochem.* 59:1115-1156.
- Mellor, J., W. Jiang, M. Funk, J. Rathjen, C. A. Barnes, T. Hinz, J. H. Hegemann, & P. Philippsen. 1990. "CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters." *EMBO J.* 9:4017-4026.
- Micheli, G., A. R. C. Luzzatto, M. T. Carri, A. de Capoa, & F. Pelliccia. 1993. "Chromosome length and DNA loop size during early embryonic development of *Xenopus laevis*." *Chromosoma* 102:478-483.
- Moroi, Y., C. Peebles, M. J. Fritzler, J. Steigerwald, & E. M. Tan. 1980. "Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1627-1631.
- Morrissey, J. H.. 1979. "Silver stain for proteins in PAG, a modified procedure with enhanced sensitivity." *Anal. Biochem.* 177:507-510.
- Muller, H. J. 1930. "Types of viable variations induced by X-rays in *Drosophila*." *J. Genet.* 22:299-334.
- Murakami, S., T. Matsumoto, O. Niwa, & M. Yanagida. 1991. "Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region" *Chromosoma* 101:214-221.
- Muro, Y., H. Masumoto, K. Yoda, N. Nozaki, M. Ohashi, & T. Okazaki. 1992. "Centromere protein B assembles human centromeric α -satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box." *J. Cell Biol.* 116: 585-596.
- Ner, S. S., & A. A. Travers. 1994. "HMG-D, the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG1 protein, is associated with early embryonic chromatin in the absence of histone H1." *EMBO J.* 13:1817-1822.
- Ner, S. S., M. E. A. Churchill, M. A. Searles, & A. A. Travers. 1993. "dHMG-Z, a second HMG-1-related protein in *Drosophila melanogaster*." *Nucleic Acids Res.* 21:4369-4371.

Niedenthal, R. K., M. Sen-Gupta, A. Wilmen, & J. H. Hegemann. 1993. "Cpfl protein induced bending of yeast centromere DNA element I." *Nucleic Acids Res.* 21:4726-4733.

Ohsumi, K., C. Katagiri, & T. Kishimoto. 1993. "Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1." *Science* 262:2033-2035.

O'Keefe, R. T., S. C. Henderson, & D. L. Spector. 1992. "Dynamic organization of DNA replication in mammalian *Cell* nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific α -satellite DNA sequences." *J. Cell Biol.* 116:1095-1110.

Palmer, D. K., K. O'Day, & R. L. Margolis. 1990. "The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei." *Chromosoma* 100: 32-36.

Palmer, D. K., K. O'Day, H. L. Trong, H. Charbonneau, & R. L. Margolis. 1991. "Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3734-3738.

Paro, R. 1990. "Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*." *Trends Genet.* 6:416-421.

Paro, R. 1993. "Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*." *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:999-1005.

Paro, R., & D. S. Hogness. 1991. "The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:263-267.

Paull, T. T., M. J. Haykinson, & R. C. Johnson. 1993. "The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures." *Genes & Dev.* 7:1521-1534.

Paulson, J. R. 1988. "Scaffolding and radial loops: the structural organization of metaphase chromosomes." In "Chromosomes and Chromatin", vol III. K. W. Adolph, editor. CRC Press. Boca Raton, Florida.

Paulson, J. R., & U. K. Laemmli. 1977. "The structure of histone-depleted chromosomes". *Cell* 12:817-828.

Pelegri, F., & R. Lehmann. 1994. "A role for Polycomb Group genes in the regulation of gap gene expression in *Drosophila*". *Genetics* 136:1341-1353.

Peterson, J. B., & H. Ris. 1976. "Electron-microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Sci.* 22:219-242.

Pfarr, C. M., M. Coue, P. M. Grissom, T. S. Hays, M. E. Porter, & J. R. McIntosh. 1990. "Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis." *Nature* 345: 263-265.

Philpott, A., & G. H. Leno. 1992. "Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts." *Cell* 69:759-767.

Pirrotta, V., & L. Rastelli. 1994. "white gene expression, repressive chromatin domains & homeotic gene regulation in *Drosophila*." *BioEssays* 16:549-556.

Pluta, A. F., C. A. Cooke & W. C. Earnshaw. 1990. "Structure of the human centromere at metaphase." *Trends in Biol. Sci.* 15: 181-185.

Pluta, A. F., N. Saitoh, I. Goldberg, & W. C. Earnshaw. 1992. "Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere." *J. Cell Biol.* 116: 1081-1093.

Postnikov, Y. V., V. V. Schick, A. V. Belyavsky, K. R. Khrapko, K. L. Brodolin, T. A. Nikolskaya, & A. D. Mirzabekov. 1991. "Distribution of high mobility group proteins 1/2,E and 14/17 and linker histones H1 and H5 on transcribed and non-transcribed regions of chicken erythrocyte chromatin. *Nucleic Acids Res.* 19:717-725.

Powers, J. A., & J. C. Eissenberg. 1993. "Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding." *J. Cell Biol.* 120:291-299.

Rastelli, L., C. S. Chan, & V. Pirrotta. 1993. "Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function." *EMBO J.* 12:1513-1522.

Rattner, J. B.. 1991. "The structure of the mammalian centromere." *BioEssays* 13: 51-56.

Rattner, J. B. 1992. "Integrating chromosome structure with function." *Chromosoma* 101:259-264.

Rattner, J. B., & C. C. Lin. 1985. "Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes." *Cell* 42:291-296.

Rattner, J. B., A. Rao, M. J. Fritzler, D. W. Valencia, & T. J. Yen. 1993. "CENP-F is a 400 kDa kinetochore protein that exhibits a Cell-cycle dependent localization." *Cell Mot. Cytosk.* 26: 214-226.

Reimer, G., I. Raska, U. Scheer, & E. M. Tan. 1988. "Immunolocalization of 7-2-ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus." *Exp. Cell Res.* 176: 117-128.

Reuter, G., M. Giarre, J. Farah, J. Gausz, A. Spierer, & P. Spierer. 1990. "Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein." *Nature* 344:219-223.

Rieder, C. L. 1982. "The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber." *Int. Rev. Cytol.* 29:1-58.

Rose, D., W. Thomas, & C. Holm. 1990. "Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II." *Cell* 60:1009-1017.

Saitoh, H., J. Tomkiel, C. A. Cooke, H. Ratrie III, M. Maurer, N. F. Rothfield, & W. C. Earnshaw. 1992. "CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate." *Cell* 70: 115-125.

Sambrooke, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual." (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.

Santamaria, P. 1986. "Injecting eggs." In "*Drosophila*: a practical approach." D. Roberts, editor. IRL Press, Washington DC. p 159-174.

Sandaltzopoulos, R., T. Blank, & P. E. Becker. 1994. "Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin." *EMBO J.* 13:373-379.

Saunders, W. S., & M. A. Hoyt. 1992. "Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle." *Cell* 70:451-458.

Saunders, W. S., C. A. Cooke, & W. C. Earnshaw. 1991. "Compartmentalization within the nucleus: discovery of a novel subnuclear region." *J. Cell Biol.* 115: 919-931.

Saunders, W. S., C. Chue, M. Goebel, C. Craig, R. F. Clark, J. A. powers, J. C. Eissenberg, S. C. R. Elgin, N. F. Rothfield, & W. C. Earnshaw. 1993. "Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity." *J. Cell Sci.* 104:573-582.

Schulman, I., & K. S. Bloom. 1991. "Centromeres: an integrated protein/DNA complex required for chromosome movement." *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 311-336.

Shaffer, C. D., L. L. Wallrath, & S. C. R. Elgin. 1993. "Regulating genes by packaging domains: bits of heterochromatin in euchromatin?" *Trends Genet.* 9:35-37.

Singh, P. B., J. R. Miller, J. Pearce, R. Kothary, R. D. Burton, R. Paro, T. C. James, & S. J. Gaunt. 1991. "A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants." *Nucleic Acids Res.* 19:789-794.

Steuer, E. R., L. Wordeman, T. A. Schroer & M. P. Sheetz. 1990. "Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores". *Nature* 345: 266-268.

Stief, A., D. M. Winter, W. H. Strätling, & A. E. Sippel. 1989. "A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity". *Nature* 341:343-345.

Sullivan, K. F., & C. A. Glass. 1991. "CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins". *Chromosoma* 100:360-370.

Sumner, A. T. 1991. "Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase". *Chromosoma* 100:410-418.

Takahashi, K., S. Murakami, Y. Chikashige, O. Niwa, & M. Yanagida. 1991. "A large number of tRNA genes are symmetrically located in fission yeast centromeres". *J. Mol. Biol.* 218: 13-17.

Tamkun, J. W., R. Deuring, M. P. Scott, M. Kissinger, A. M. Pattatucci, T. C. Kaufman, & J. A. Kennison. 1992. "*brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2". *Cell* 68:561-572.

Thanos, D., & T. Maniatis. 1992. "The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF- κ B-dependent virus induction of the human IFN- β gene". *Cell* 71:777-789.

Tomkiel, J., C. A. Cooke, H. Saitoh, R. L. Bernat, & W. C. Earnshaw. 1994. "CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase". *J. Cell Biol.* 125:531-545.

Towbin, H., T. Staehelin, & J. Gordon. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-

Tschiersch, B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge, & G. Reuter. 1994. "The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes". *EMBO J.* 13:3822-3831.

Turner, B. M.. 1991. "Histone acetylation and control of gene expression". *J. Cell Sci.* 99:13-20.

Turner, B. M. 1993. "Decoding the nucleosome". *Cell* 75:5-8

Turner, B. M., L. Franchi, & H. Wallace. 1990. "Islands of acetylated histone H4 in polytene chromosomes and their relationship to chromatin packaging and transcriptional activity". *J. Cell Sci.* 96:335-346.

Turner, B. M., A. J. Birley, & J. Lavender. 1992. "Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei". *Cell* 69:375-384.

van de Wetering, M., & H. Clevers. 1992. "Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix". *EMBO J.* 3039-3044.

von Kries, J. P., H. Buhrmester, & W. H. Strätling. 1991. "A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding". *Cell* 64: 123-135.

Waye, J. S., & H. F. Willard. 1987. "Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes". *Nucleic Acid Res.* 15: 7549-7569.

- Weir, H. M., P. J. Kraulis, C. S. Hill, A. R. C. Raine, E. D. Laue, & J. O. Thomas. 1993. "Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1" *EMBO J.* 12:1311-1319.
- Widom, J., & A. Klug. 1985. "Structure of the 30 Å chromatin filament: x-ray diffraction from oriented samples". *Cell* 43:207-213.
- Willard, H. F. 1990. "Centromeres of mammalian chromosomes". *Trends Genet.* 6: 1091-1110.
- Williams, B. C., T. L. Karr, J. M. Montgomery, & M. L. Goldberg. 1992. "The *Drosophila* 1(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset". *J. Cell Biol.* 118: 759-773.
- Williams, B. C., & M. L. Goldberg. 1994. "Determinants of *Drosophila* zw10 protein localization and function". *J. Cell Sci.* 107: 785-798.
- Winston, F., & M. Carlson. 1994. "Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection". *Trends Genet.* 8:387-391.
- Woodcock, C. L. F., L. Y. Frado, & J. B. Rattner. 1984. "The higher order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement". *J. Cell Biol.* 99:42-52
- Xiao, Z., J. T. McGrew, A. J. Schroeder, & M. Fitzgerald-Hayes. 1993. "CSE1 and CSE2, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* 13:4691-4702.
- Xie, K., E. J. Lambie, & M. Snyder. 1993. "Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus." *Mol. Cell. Biol.* 13: 6170-679.
- Yen, T. J., D. A. Compton, D. Wise, R. P. Zinkowski, B. R. Brinkley, W. C. Earnshaw, & D. W. Cleveland. 1991. "CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase". *EMBO J.* 10: 1245-1254.

Yen, T. J., G. Li, B. T. Scaar, I. Szilak, & D. W. Cleveland. 1992. "CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis". *Nature* 359: 536-539.

Yoda, K., K. Kitagawa, H. Masumoto, Y. Muro, & T. Okazaki. 1992. "A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential α helices at the NH₂ terminus, which is separable from dimerizing activity". *J. Cell Biol* 119: 1413-1427.

Zink, D., & R. Paro. 1989. "In vivo binding pattern of a trans-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*". *Nature* 337:468-471.

Zink, D., & R. Paro. 1993. "Immunostaining of polytene chromosomes". *Drosophila Information Service* 72:196

Zinkowski, R. P., S. McCune, R. D. Balczon, P. N. Rao, & B. R. Brinkley. 1989. "The centromere and aneuploidy. I. Caffeine-induced detachment and fragmentation of kinetochores of mammalian chromosomes". In "Mechanisms of Chromosome Distribution and Aneuploidy". M. Resnick & B. K. Vig, editors. Alan R. Liss, Inc., New York. pp 43-60

Zinkowski, R. P., J. Meyne, & B. R. Brinkley. 1991. "The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model". *J. Cell Biol.* 113:1091-1110.

oferta
3.500.000
96.05.97

BIBLIOTECA
do
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
"ABEL SALAZAR"