Adam Arai Martens

CARACTERIZAÇÃO DO GENE CDK7 E ANÁLISE DE SUA POSSÍVEL ATUAÇÃO NOS ENDOCICLOS DE RHYNCHOSCIARA AMERICANA

SÃO PAULO | 2011

Adam Arai Martens

CARACTERIZAÇÃO DO GENE CDK7 E ANÁLISE DE SUA POSSÍVEL ATUAÇÃO NOS ENDOCICLOS DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

São Paulo 2011 **Adam Arai Martens**

CARACTERIZAÇÃO DO GENE CDK7 E ANÁLISE DE SUA POSSÍVEL ATUAÇÃO NOS ENDOCICLOS DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Fábio Siviero

Versão original

São Paulo 2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Martens, Adam Arai.

Caracterização do gene cdk7 e análise de sua possível atuação nos endociclos de *Rhynchosciara americana* / Adam Arai Martens. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Fábio Siviero.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia do desenvolvimento de insetos.

Versão do título para o inglês: Cdk7 gene characterisation and analysis of its possible role in the endocycles of *Rhynchosciara americana*.

Descritores: 1. Ciclo celular 2. Desenvolvimento animal 3. Biologia molecular 4. Diptera 5. Sequenciamento genético I. Siviero, Fábio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0226/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Adam Arai Martens.
Título da Dissertação:	Caracterização do gene cdk7 e análise de sua possível atuação nos endociclos de <i>Rhynchosciara americana</i> .
Orientador(a):	Fábio Siviero.

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome completo: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome completo: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome completo: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 368/10 referente ao projeto intitulado: "Caracterização do putativo gene CDK7 e seu possível papel nos endociclos e desenvolvimento larval de Rhynchosciara americana" sob a responsabilidade de Adam Arai Martens, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 30 de março de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP ablandto-

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus (e também a todos os chegados), por ser mais paciente comigo do que eu às vezes sou com Ele. Por nunca me deixar na escuridão completa, mas por também nunca me expor a uma luz forte o suficiente para me cegar.

Ao meu Pai (Elcio) e minha Mãe (Tioko) por terem, por um bom tempo, me apoiado em tudo que podiam. Por terem me jogado no mundo quando não tinha mais jeito de me segurar, sempre confiando em tudo que me ensinaram até então. E ao meu irmão Allan, por conseguir ser meu irmão apesar de tudo. Aos parentes que sempre admiraram a trajetória da minha família: Vó Val,Vô Takashi, Eliane, Márcia, Harumi, Tadashi, Osvaldo, e também todos os outros que não souberam expressar direito essa admiração.

Ao meu chefe, Dr. Fábio Siviero, por ter me acolhido em um momento difícil e desafiador. Por confiar no cavalo azarão e, assim espero, um dia se orgulhar. Por todas as nossas conversas e viagens ao Extra; e por não me expulsar do laboratório nos meus acessos de poder, despotismo e tirania. Muito obrigado pela dedicação e zelo. Eu reconheço tudo isso, por mais que eu não mencione.

À minha chefa, Dr. Gláucia Maria Machado-Santelli, pelas intensas e longas conversas sobre os mais diversos assuntos; e por discordar de mim. Por ser sempre acessível, mesmo que estivesse atulhada em ocupações. Também agradeço pela dedicação, minúcia e perícia; suas orientações são sempre sábias. E, claro, por sempre me oferecer mais uma xícara de café.

À doutora Paula Rezende-Teixeira, por ter sido a minha inesgotável fonte de ajuda desde quando eu entrei no lab. Sua luta, perseverança e paixão por sua pesquisa são, com certeza, uma inspiração imensa.

A todos os professores do departamento, em especial àqueles com quem tive aulas, por serem sempre parâmetro para a minha conduta enquanto mestre. E, com um carinho imenso, à Prof. Irene Yan, por ser sempre alegre, engraçada e atenciosa; por me fazer me sentir um pouquinho da família; e também por me dar dicas sempre tão boas.

Ao Roberto Cabado, por todas as ajudas científicas, tecnológicas e pelas nossas conversas cult. Seu perfeccionismo é memorável. Obrigado por tentar entender minhas explicações truncadas e sempre conseguir transpor as minhas idéias aos nossos projetos. Sem sua ajuda estilística, essa dissertação teria muito menos graça.

Aos técnicos que já não mais fazem parte do time (D. Nancy e Raphael) pelos bons tempos e cuidados que sempre tiveram; e aos novos (Edilberto e Marlene) pelo apoio contínuo nessa dureza que é cuidar de um laboratório. À Marlene, em especial, pelas nossas longuíssimas conversas e brincadeiras no laboratório; e por ter encontrado algum concorrente à altura quando se trata de arrumação e limpeza.

Ao amigo mestre do LBDI Mingau (André D'Avila), bem como os ICs Ivana Spears, Cláudia, Cris, Bruno, Renan e Liv. Vocês me ajudaram a sedimentar muitos conceitos.

À Cris, de quem eu me orgulho de ter feito parte do ensino de BioMol. Eu sei que tivemos nossas rusgas e desencontros, mas por quem eu guardo muito carinho e lembro sempre o interesse e a curiosidade em sempre aprender mais.

Aos amigos do BioCeM: Amanda Brandão, Jonatas Amaral, Marina Rosa, Marisa lonta, Marcel Urabayashi, Peru (Natalia Bazan), Peruinha (Anali), Camila Lauand, Evandro Niero, Vivian Zague, Michele Menezes, Vanessa Freitas, Isis Rocha, Beatriz Cortez (Bia), Luciana Chieregato, Raquel Almeida (muKeka), Lurdes (Ludimila Mariano), Paula Rezende, Luana Ricardi, Humberto, pelas eternas alegrias e consternações que é uma família. Talvez eu tenha percebido um pouco tarde, mas vocês são um pedaço de mim. Eu queria conseguir discorrer aqui sobre cada um, mas eu guardo no meu coração as minhas situações com cada um, sem exceção, de uma maneira super especial.

Aos amigos de seleção (Tati Kanno, Peixe, Felipe, Magá, Camila e Maíra) por compartilharem aqueles momentos que só a gente sabe como é; e aos colegas de departamento (Emerson Santos, Adriane Siqueira, Vivian Bradaschia-Corrêa, Renata lunes, Karoll Nascimento, Heloiza Ghizoni, Priscila Figueiredo, Natália Martins e muitos mais), por tornarem o nosso departamento um lar caloroso e aconchegante para aqueles que não têm uma família para a qual voltar todo dia.

Aos amigos do lab da Prof. Edna Teruko Kimura: Alex Shimura, César Fuziwara, Ana Zen (Ana Maria), Eloiza de Rezende, Marley Januário, Sabrina Gonçalves, Murilo Geraldo e Fernanda Vieira, por tornarem os suplícios do dia suportáveis e por terem me acolhido de uma maneira que eu NUNCA me esquecerei.

À Marina e à Michelle, por terem formado comigo a Tríade na disciplina de BioCel, e por termos carregado todo aquele fardo extra, que não nos cabia, mas que ainda assim fizemos com certa elegância. Também, por terem me ensinado tanta coisa com imensa competência.

À Natália, minha eterna companheira de bandejão. Por todas as ajudas, que não foram poucas, e pelas inesquecíveis refeições peruanas e pelos *pisco sours*.

À Paola Branco, pois somos tão parecidos em nossas preocupações, cuidados e consternações.

À Valéria Loro, por ser sempre tão amável, querida e paciente com todos nós que passamos pelos momentos difíceis e desesperados de pré-depósito.

À minha orientadora da graduação, Prof. Dr. Adriana Fiorini, por ser sempre tão animada e cômica, por nossas conversas honestas e todo nosso tempo em laboratório; e por ser uma referência na construção do meu "eu cientista".

Aos amigos que fiz fora do ICB: Emanuel Arruda, Thomas Ficarelli, Josy Carrijo, galera do SevenUSP (Brito, Leo, Bruno, Marcelo, etc), Marianna Rubini, por tornarem a minha vida mais colorida e memorável.

Aos meus *roomates* atuais (Omar Mertins e Orlando Chiarelli) por aturarem meus chiliques sobre ordem e limpeza e por entenderem minhas limitações; e aos *roomates* antigos: Ticiane, Alexandre, Camila, Kiefer, Vinícius, Thomas, Paula, Marcos Paulo, Eduardo, Bruno, Baiano, Polly, Gisele, e toda a galera da toca do tatu, que tornaram a minha transição para São Paulo muito mais alegre!

E, por fim, a meus amigos que estão longe, e que me orgulho de sempre ter conservado UM, não mais não menos: Um da vida, Hélio Fertonani, que já aprontou altas peripécias junto comigo nessa nossa adolescência; Um do ensino fundamental, Jonathan Sun Ho Bai, que ensinou como é irmão de pai e mãe diferentes; Uma do tempo do FISK, Roseni Silva, por ser até hoje a irmã mais velha que me socorre e que me inspira com sua coragem e audácia; Uma do ensino médio, Anelise Andrade Beltrame, que já dividiu muita água de coco comigo, e que sempre foi aquela alma gêmea que aparece sem a gente procurar; Uma da graduação, Talitha Fernandes Stefanello, que foi uma sintonia meio tardia (só nos dois últimos anos de graduação), mas com quem sempre tive uma amizade franca. E da pós-graduação, Maraysa de Oliveira Mello, a Magá, que ainda está perto e é aquela pessoa que soube como sempre estar alegre quando eu estava, e me alegrar quando podia.

Enfim, eu sei que é difícil ter que agradecer em tão curto espaço a presença e a dádiva de tantas pessoas na nossa vida. Eu espero ter feito justiça aos que agradeci e espero ser perdoado pelos que eu esqueci. Tudo que eu vivi durante esse período de pós-graduação foi peculiar e inesquecível. Agradeço a todos por tudo.

Devo agradecer também a FAPESP, Capes e CNPq, pelo apoio financeiro ao meu projeto e aos projetos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Insetos e Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

"A fact is a simple statement that everyone believes. It is innocent, unless found guilty. A hypothesis is a novel suggestion that no one wants to believe. It is guilty, until found effective" *Edward Teller*

RESUMO

Martens AA. Caracterização do gene cdk7 e análise de sua possível atuação nos endociclos de *Rhynchosciara americana*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2011.

CDKs são proteínas responsáveis pela ativação e progressão do ciclo celular e também apresentam função na ativação e alongamento na transcrição. Dentre elas, CDK7 atua em ambas as funções, fosforilando as CDKs do ciclo celular e fazendo parte do fator geral de transcrição TFIIH como subunidade catalítica. A partir de uma biblioteca de ESTs de glândula salivar, construído com mRNAs presentes durante o período em que ocorre o início do último ciclo replicativo da politenização e início da amplificação gênica, foram encontradas poucas mensagens relacionadas diretamente com o ciclo celular, correspondendo a 3.11% do ESTs. Dentre elas, foram encontradas as mensagens de cdc2-like e cdk7; portanto, foi realizada a caracterização do gene cdk7 e a análise de sua atuação durante o desenvolvimento larval de Rhynchosciara americana. O gene cdk7 apresenta 4 éxons, mais que em vertebrados. A seguência completa do mRNA foi obtida a partir de RACE, apresentando 1230 bases e uma ORF de 1020 bases. Perfis de expressão foram determinados por RT-PCR e Western blots. Modificações pós-traducionais foram analisadas por *immunoblots* em 2D. Seu perfil de expressão de mRNA e proteína apresentam variações durante o ciclo celular e entre os tecidos analisados; os immunoblots mostram a presença de uma fosforilação e possíveis modificações na cadeia lateral de alguns aminoácidos. O estudo de proteínas relacionadas ao ciclo celular nesse modelo é importante para um melhor entendimento dos ciclos celulares incomuns presentes em diferentes tecidos de insetos.

Palavras-chave: Ciclo celular. Desenvolvimento larval. Biologia molecular. Diptera. Sequenciamento genético.

ABSTRACT

Martens AA. cdk7 gene characterisation and analysis of its possible role in the endocycles of *Rhynchosciara americana*. Masters thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2011.

CDKs are proteins responsible for activation and progression of cell cycle and also work on the activation and elongation of transcription. Among them, CDK7 acts in both functions, phosphorylating cell cycle CDKs and as a part of general transcription factor TFIIH as its catalytic subunit. From an EST library of salivary gland, constructed with mRNAs present during the period when the beginning of the last polyteny replicative cycle occurs, it was found only few messages directly related to cell cycle, corresponding to 3.11% of the ESTs. Among them, it was found cdc2-like and cdk7; therefore, it was performed the characterisation of cdk7 gene and the analysis of its role during the larval development of Rhynchosciara americana. cdk7 gene presents 4 exons, more than in vertebrates. Complete mRNA sequence was obtained via RACE, presenting 1230 bases and an 1020 bases ORF. Expression profiles were determined by RT-PCR and Western blots. Posttranslational modifications were analysed by 2D immunoblots. Its mRNA and protein expression profiles presented variations during cell cycle and between the studied tissues; immunoblots showed the presence of one phosphorylation and possible modifications on the side chain of some amino acids. The study of proteins related to cell cycle in this model is important for a better understanding of uncommon cell cycles in different insect tissues.

Key Word: Cell cycle. Larval development. Molecular biology. Diptera. Gene sequencing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Modelo: Rhynchosciara americana	14
1.2 Complexos ciclina/CDK	19
1.3 CDK7	20
1.4 Transcrição	21
1.5 Endociclos	24
1.6 Cromossomos politênicos	28
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Espécimes	34
3.2 Preparações citológicas	
3.3 Extração de DNA genômico	35
3.4 Extração de RNA	35
3.5 Sequenciamento	
3.6 Clonagem do mRNA de cdk7	
3.7 Análise de RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	40
3.8 Sequenciamento da região genômica	41
3.9 Análise de sequências	42
3.10 Extração de proteínas	43
3.11 Western Blotting	44
3.11.1 Preparo do Gel	44
3.11.2 Corrida e Transferência	44
3.11.3 Bloqueio e Marcação com Anticorpos	45
3.11.4 Revelação	46
3.11.5 Stripping	47
3.12 Western Blot em 2D	47
3.12.1 Precipitação e Ressuspensão da Proteína	47
3.12.2 Reidratação da Fita e Isoeletrofocalização (IEF)	47
3.12.3 Equilíbrio da Fita e Corrida da Segunda Dimensão	48
3.12.4 Transferência e Marcação com Anticorpos	48
3.13 Tratamento com Fosfatase	48
3.14 Imunfluorescência	49

4 RESULTADOS	50
11 Sequenciamento de odk7	51
4.1 Sequenciamento de cuk/	
4.2 Nivel de expressão dos transcritos	
4.2.1 Nivel de expressão em giandula salivar	
4.2.2 Nivel de expressao em corpo gorduroso	57
4.2.3 Nível de expressão em ovário	
4.3 Níveis de expressão de proteína	62
4.3.1 Expressão proteica em glândula salivar	62
4.3.2 Expressão proteica em corpo gorduroso	63
4.4 Modificações pós-traducionais	64
4.5 Ensaios de fosfatase	66
4.6 Imunolocalização	68
5 DISCUSSÃO	71
5.1 Sequências de cdk7	72
5.2 Expressão de cdk7 durante o desenvolvimento larval	74
5.3 Modificações pós-traducionais	79
5.4 Ensaios de imunolocalização	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Modelo: Rhynchosciara americana

O díptero Rhynchosciara americana, que pertence à família dos sciarídeos, foi descrito pela primeira vez em 1821 pelo entomologista Christian R.W. Wiedemann (Wiedemann, 1821^{*} apud Breuer, 1969). Inicialmente, as espécies descritas por Wiedemann, dentre as quais Rhynchosciara americana, foram colocadas sob o gênero Sciara, somente acrescentadas ao gênero Rhynchosciara em 1919, por F.W. Edwards (Edwards, 1919[†] apud Breuer, 1969). Em 1951, Nonato e Pavan descreveram o mesmo organismo como Rhynchosciara angelae (Nonato e Pavan, 1951); sua alegação guanto à descoberta de uma nova espécie era fundada no fato de que não havia sido descrita anteriormente nenhuma espécie encontrada ao nível do mar, somente em regiões muito mais altas, como Caracas (Venezuela), Bogotá (Colômbia), Oaxaca (México) e São Paulo (Brasil). Já a espécie descrita por eles havia sido encontrada na Fazenda Santa Cruz, Vila Atlântica, próximo de Praia Grande, litoral do estado de São Paulo. Um dos grandes empecilhos quanto à caracterização desse gênero em específico foi a dificuldade em acompanhar toda a vida do animal, pois muitos autores haviam descrito as espécies com base em características de insetos adultos, ou mesmo somente de machos ou fêmeas, desconsiderando ainda o estágio larval e as características de pupação, entre outras; o que levou à formação de grandes lacunas que dificultavam uma caracterização mais apurada. Somente em 1969, a classificação do gênero foi revisitada por Martha E. Breuer e verificou-se a sinonímia entre R. americana e R. angelae, prevalecendo a nomenclatura mais antiga (Breuer, 1969). Hoje, conhecem-se 12 espécies no gênero Rhynchosciara, que passou a ser dividido em três grupos, com base na estrutura do hypoginium da fêmea: americana (R. americana, R. baschanti, R. villosa, R. argentiniensis, R. guimaraesi, R. hollanderi e R. papaveroi), milleri (R. milleri e R. grilleti) e mathildae (R. brevicornis, R. busaccai e R. mathildae) (Stocker et al., 1993).

^{*} Wiedemann CRW. Diptera exótica [Kiliae]. 1821;p.244.

[†] Edwards, FW. Diptères, Nematocères, in Mission de L'Armée por la mésure d'un arc meridian en Amerique du Sud. Zoologie, 1919;p.143.

Nesse gênero, a fêmea faz a ovoposição somente uma vez, depositando centenas a milhares de ovos que eclodem quase simultaneamente, com pouca distância de tempo entre a primeira e a última larva a eclodirem. Seu desenvolvimento larval é sincrônico e ocupa grande parte de toda a vida do inseto, sendo dividido em quatro estágios (Figura 1). Dos guatro estágios do ciclo de vida de Rhynchosciara americana, o quarto é o mais longo, sendo subdividido em seis períodos: o primeiro período inicia-se com a terceira ecdise larval e as larvas se apresentam numa coloração clara; no segundo período, as larvas adquirem uma coloração vermelha, devido à pigmentação da hemolinfa; no terceiro período, as larvas começam a secretar as proteínas do casulo, formando uma tênue rede que encobre todos os indivíduos (por essa razão, chamamos esse período de Início de Rede); no quarto período, há o início da formação do pufe B2 nos cromossomos da glândula salivar, além da formação do casulo comunal, que apresenta uma cobertura mais firme, porém ainda maleável; no quinto período, há a expansão máxima do pufe B2 (a esse período, denominamos B) e início da abertura do pufe C3; e no sexto período, há o desenvolvimento máximo do pufe C3 (por isso, chamamos esse período de C) e as larvas já estão individualizadas no casulo comunal (Terra et al., 1973). É interessante notar que esse modelo é o único entre os insetos em que o desenvolvimento é acompanhado por características morfológicas e citológicas, usando os pufes de DNA B2 e C3 como marcadores de desenvolvimento (Machado-Santelli e Basile, 1978); em outros modelos, usa-se como marcadores a presença de machas ocelares (Amabis e Janczur, 1978), o estabelecimento dos ocelos (Perondini e Dessen, 1985), entre outros.



Figura 1 – Ciclo de vida larval de Rhynchosciara americana.

Notar o detalhamento do estágio mais longo (4º estágio), subdividido em seis períodos. Fonte: Machado-Santelli, 2004.

Na natureza, as larvas dessa espécie são encontradas em locais úmidos e protegidos da luz, como embaixo de folhas e inflorescências de bananeira caídas, que promovem um nível adequado de umidade. Além disso, acredita-se que a inflorescência da bananeira, durante o apodrecimento, seja substrato para fungos dos quais as larvas se alimentam. Em laboratório, sob condições de temperatura controladas (22 °C), o ciclo de vida larval desse inseto dura em torno de 60 dias. Inicialmente, sua alimentação era baseada em folhas de batata doce (Lara et al., 1965), porém esta foi modificada para erva mate (*llex paraguariensis*), conhecida como erva de chimarrão/tereré; a erva é umidificada e deixada próxima a uma estufa de secagem, o que proporciona condições de temperaturas favoráveis ao crescimento de fungos (Sauaia et al., 1971). Após alguns dias, essa erva é congelada para matar qualquer organismo que possa contaminar a cultura das larvas (nematoides e pulgões, por exemplo) e sua temperatura é restabelecida. Além da erva, também são colocados na lata de cultura pedaços de inflorescências de bananeiras, a fim de mimetizar as condições encontradas na natureza (Figura 2).

Figura 2 – Latas de cultura das larvas de *R. americana*.



As latas são suplementadas com mate e folhas e ramagens para mimetizar o ambiente natural do inseto. Em destaque, larvas de 2° período em cultura. Fonte: Martens, 2011

Grande parte dos dípteros apresenta, em diferentes tecidos, alterações cromossômicas que lhes renderam notoriedade. A principal característica que tornou esse inseto um interessante modelo de estudo foi o fato de estes apresentarem em seus tecidos cromossomos politênicos muito maiores do que os encontrados em *Drosophila*, por exemplo (Dreyfus et al., 1951). O tamanho aumentado desses cromossomos, principalmente em glândula salivar, permite uma análise morfológica muito aprofundada, gerando preparações citológicas de alta qualidade. A glândula salivar de *Rhynchosciara americana*, usada como parâmetro para a confirmação dos eventos citológicos, é dividida em três regiões: proximal (mais anterior), medial e distal; S1, S2 e S3, respectivamente (Figura 3). Essas regiões podem ser facilmente distintas umas das outras pela distribuição das células: em S1, as células são visualizadas em secções cubóides e estão orientadas paralelamente, formando uma luz ampla; em S2, as células apresentam formato mais esférico e não apresentam uma distribuição alinhada, com uma luz mais irregular; e S3 apresenta as células distribuídas alternadamente (como um zigue-zague) (Brandão, 2011).





Notar as divisões da glândula em três secções, delimitadas pela estrutura das células e evidenciadas por curvaturas nas transições. Fonte: Machado-Santelli. 2011

Desde sua redescoberta, esse organismo vem sendo objeto de estudo devido a características muito peculiares, como amplificação gênica observada em diferentes tecidos, presença de cromossomos politênicos e desenvolvimento sincrônico de indivíduos irmãos (Breuer e Pavan, 1955). O desenvolvimento sincrônico dos indivíduos-irmãos se dá durante quase todo o estágio larval, o que permite avaliações muito precisas e confiáveis das alterações que ocorrem a nível molecular durante o estágio larval do inseto (Pavan e Da Cunha, 1969). Além disso, durante todo o desenvolvimento larval, todas as larvas estão no mesmo estágio de desenvolvimento, e são todas do mesmo sexo, ou seja, para análises citogenéticas e moleculares, uma única larva é representativa de todo o grupo (Pavan e da Cunha, 1969).

1.2 Complexos ciclina/CDK

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são a subunidade catalítica de uma grande família de proteínas serina/treonina quinases altamente conservadas, que dependem da associação com ciclinas para sua atividade e estão envolvidas no ciclo celular e na maquinaria de transcrição. Dentre as CDKs, dois conjuntos de proteínas podem ser distintos por suas funções: CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 fazem parte do controle do ciclo celular, enquanto CDK8, CDK9 e CDK11 estão envolvidas com a transcrição (Malumbres e Barbacid, 2005).

O ciclo celular é uma ópera finamente regida, em que somente a finalização de um ato permite a entrada do próximo. O controle da entrada em diferentes fases do ciclo celular é determinado pelo acúmulo de complexos ciclina/CDK e a finalização das verificações de integridade e fidelidade do DNA e alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, conhecidos classicamente como checkpoints (Morgan, 1997). A expressão de CDKs durante o ciclo celular é constante durante o ciclo celular, sendo que a concentração de suas ciclinas regulatórias apresenta um aspecto cíclico, em que há um acúmulo dessas proteínas a partir de um determinado momento e há a ativação do complexo ciclina/CDK da etapa específica do ciclo, levando à progressão do ciclo celular (Evans et al., 1983). Uma vez cumprido o papel naquele ciclo, as ciclinas se dissociam de suas parceiras CDKs e são encaminhadas para a degradação proteolítica (Murray, 1995). De modo geral, em eucariotos, entrada na fase de síntese (fase S) é deteminada por CDK2/ciclina E, enquanto a entrada na mitose (fase M) é determinada por CDK1 e ciclinas mitóticas (ciclinas A, B e B3) e a progressão do ciclo celular é direcionada pela destruição desses complexos por SCF (Skp1/Cullin/F-Box protein) e APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), respectivamente (Lee e Orr-Weaver, 2003). Além do acúmulo de ciclinas, os complexos ciclina/CDK somente podem ser completamente ativos depois da fosforilação do domínio T-Loop das CDKs. Essa função é realizada por uma guinase ativadora de CDKs (CAK - CDK-activating kinase), um complexo composto por CDK7/ciclina H e MAT1 (Ménage-à-trois 1) responsável por fosforilar T-Loops em outros complexos ciclina/CDK e, portanto, dirigir o ciclo celular (Kaldis, 1999).

Outra função fundamental realizada por CDKs é o seu envolvimento na transcrição, autando como subunidade catalítica de fatores de transcrição geral (GTFs – <u>G</u>eneral <u>T</u>ranscription <u>F</u>actors) e fosforilando domínios carboxi-terminais (CTDs – <u>C</u>arboxyl-<u>T</u>erminal <u>D</u>omains) da RNA polimerase II (RNA Pol II). CDK8/Ciclina C fosforilam o CTD e as Ser-5 e Ser-304 da Ciclina H, mostrando um efeito negativo na transcrição. Entretanto, estudos genéticos têm mostrado que o complexo CDK8/Ciclina C age tanto como repressor quanto como ativador da transcrição em *S. cerevisiae* (Tassan et al., 1995). CDK9 é a subunidade catalítica do P-TEFb (<u>Positive-T</u>ranscription <u>E</u>longation <u>F</u>actor <u>b</u>) e é responsável pela liberação da repressão transcricional e o início do elongamento transcricional (Garriga e Graña, 2004). CDK11 possui três isoformas (CDK11^{p46}, CDK11^{p58} e CDK11^{p110}), que estão envolvidas em diferentes processos: apoptose (Beyaert et al., 1997), mitose (Cornelis et al., 2000) e produção de mRNA (Trembley et al., 2002), respectivamente. A função detalhada das CDKs envolvidas na transcrição é revisada em Loyer et al., 2005.

1.3 CDK7

Interessantemente, uma proteína da família CDK – CDK7 – tem uma função dupla, atuando como CAK, fosforilando o *T-Loop* de outras CDKs e permitindo a progressão do ciclo celular; e também como parte do complexo do fator geral de transcrição TFIIH, fosforilando o CTD da subunidade maior da RNA Polimerase II (Fisher, 2005; Harper e Elledge, 1998). Em ambas as funções, a proteína CDK7 se associa com sua ciclina regulatória Ciclina H, além de se associar a uma proteína da família *RING finger* (MAT1), responsável pela estabilização do complexo CAK (Devault et al., 1995). Entretanto, a atividade exercida pelo complexo CAK apresenta uma especificidade de substrato: o complexo CAK livre não é capaz de fosforilar o CTD da RNA Polimerase II, e o complexo TFIIH é menos efetivo na ativação de CDK2 do que no complexo CAK livre (Lolli e Johnson, 2005) e esta especificidade é mediada pela proteína MAT1: complexos diméricos Ciclina H/CDK7 apresentam menor atividade CAK que complexo triméricos ciclina H/CDK7/MAT1; além disso, MAT1 promove a ligação do complexo CAK ao core do fator de transcrição TFIIH (Yankulov e Bentley, 1997).

1.4 Transcrição

A transcrição é um dos processos mais importantes em qualquer organismo, seja ele eucarioto ou procarioto, e sua regulação é uma etapa crucial na expressão gênica e sua regulação. Enquanto em procariotos, há uma única enzima RNA polimerase composta por três subunidades responsáveis por todas as transcrições, os eucariotos apresentam enzimas específicas que, com o auxílio de fatores adicionais, reconhecem os promotores de diferentes substratos: a RNA polimerase I sintetiza apenas o precursor dos rRNAs 18S, 5.8S e 28S, a RNA polimerase II sintetiza todos os pré-mRNAs das células e a RNA polimerase III sintetiza os tRNAs, rRNA 5S e outros pequenos RNAs (Young, 1991). Estruturalmente, as RNA polimerases apresentam um canal interno que pode acomodar um híbrido DNA/RNA de 8 a 9 pb, um canal ou poro secundário menor que parece servir como um canal de entrada para nucleotídeos trifosfatados (NTPs) e um canal de saída de RNA. O sítio ativo está localizado na junção entre o canal principal e o secundário e contém pelo menos um sítio de ligação de nucleotídeo e um íon Mg²⁺ firmemente ligado (Bai et al., 2006).

As três principais fases do ciclo transcricional são iniciação, elongamento e terminação. Durante o processo de iniciação, um complexo de RNA polimerase competente se forma na região promotora e o DNA molde é alinhado no sítio ativo da enzima, que corresponde à região em que os nucleotídeos são pareados com o DNA molde para o elongamento do transcrito de RNA. O processo de terminação envolve a liberação do transcrito e a dissociação do complexo transcricional do DNA molde (Saunders et al., 2006). Entretanto, a RNA polimerase II não reconhece os promotores de seus alvos diretamente, sofrendo regulação de fatores de transcrição. O início da transcrição de mRNAs depende da construção de um complexo contendo a enzima RNA polimerase II e fatores gerais de transcrição (GTFs), chamado de Complexo Pré-Iniciação (Nikolov e Burley, 1997); após a ligação da RNA polimerase ao DNA molde, há a formação do chamado complexo fechado e, uma vez que todos estejam ligados à região promotora, há uma alteração na conformação na fita de DNA molde por volta de 11-15 pb de distância do sítio de início de transcrição, que leva à formação do complexo aberto. Após a síntese de

aproximadamente 30 bases de RNA, a RNA polimerase II perde seu contato com o core do complexo e o restante da maquinaria de transcrição e entra na fase de elongamento (Hahn, 2004). Nessa fase, a RNA polimerase, o DNA e o RNA nascente formam um complexo terciário estável e a RNA polimerase se move pela fita de DNA molde enquanto incorpora NTPs complementares na extremidade 3' do RNA. Durante a terminação, a RNA polimerase se dissocia do DNA e libera o transcrito; este processo pode ser determinado por sequências específicas de DNA (terminação intrínseca) ou mediada por fatores proteicos (Bai et al., 2006).

Os fatores gerais de transcrição (GTFs) foram descobertos a partir de fracionamentos cromatográficos em que uma fração purificada de RNA polimerase II era suplementada com frações subcelulares e verificava-se a fidelidade da transcrição. Por essa razão, os fatores gerais de transcrição são nomeados de acordo com a fração de que foram isolados, sendo eles: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF e TFIIH, sendo que cada um deles apresenta uma função específica e uma ordem determinada na construção do complexo transcricional (Figura 4) (Thomas e Chiang, 2006). Uma vez estabelecido o complexo, a atividade da RNA polimerase só é ativada no momento em que há a fosforilação do domínio C-terminal (CTD) de sua subunidade maior; esse domínio, exclusivo da RNA polimerase II, é caracterizado pela repetição do heptapeptídeo YSPTSPS e sofre alterações reversíveis de várias enzimas (Akhtar et al., 2009). Os dois principais resíduos fosfoaceptores desse domínio são Ser-2 e Ser-5, e sofrem ação de CTD quinases, membros da família de Ciclina/CDK, que consistem nas subunidades catalíticas de fatores gerais de transcrição.



Figura 4 – Proteínas componentes do complexo transcricional.

Embaixo, a ordem de montagem do complexo transcricional sobre o DNA alvo. Fonte: Siviero, 2011; Adaptado de Thomas, 2006.

O TFIIH é um fator geral de transcrição essencial composto por 10 subunidades que apresenta atividades helicase e quinase, sendo que sua subunidade catalítica é composta pelo complexo CAK (CDK7/Ciclina H/MAT1), responsável pela progressão do ciclo celular. Entretanto, quando em associação com o *core* TFIIH, esse complexo apresenta uma especificidade de substrato direcionada pela subunidade Xpd do *core* (Li et al., 2010), fosforilando preferencialmente o CTD da RNA polimerase II (Kobor e Greenblatt, 2002), que facilita a iniciação da transcrição. Além disso, outros dois complexos Ciclina/CDK estão associados com a transcrição: Ciclina C/CDK8 fazem parte da holoenzima RNA polimerase II e Ciclina T/CDK9 fazem parte do fator positivo de alongamento transcricional b (P-TEFb), e ambos fosforilam, durante a fase de alongamento transcricional, o CTD da RNA polimerase II que já havia sido fosforilado pelo complexo Ciclina H/CDK7 durante a fase de iniciação (Doonan e Kitsios, 2009).

1.5 Endociclos

O conteúdo genômico aumentado, presente em mamíferos, plantas e insetos, é obtido através de endociclos, ou endoreplicação. Esse processo é um desvio do ciclo celular canônico em que as células alternam fases S (Síntese) e G (Gaps), não completando ou até mesmo não iniciando a mitose, o que promove o acúmulo de DNA na célula. Esse processo representa uma grande inovação evolucionária e está normalmente relacionado com o crescimento celular. O endociclo está amplamente distribuído entre protistas, plantas e muitos animais, como insetos, moluscos e vertebrados; e é frequentemente encontrado em células que são constitutivamente grandes ou altamente ativas metabolicamente (Edgar e Orr-Weaver, 2001).

No ciclo celular canônico, as células passam por fases S, em que há a síntese e consequente duplicação do conteúdo genômico, e fases M (Mitose), em que há a divisão simétrica do conteúdo de DNA entre duas células filhas. Essas duas fases são interpoladas por fases G (Gap), em que as células se recuperam e se preparam para a fase conseguinte. O progresso durante o ciclo celular é regulado por complexos Ciclina/CDK que apresentam uma associação e ativação fase-específica. Os complexos Ciclina/CDK promovem a fosforilação das proteínas da família Rb, que mantêm um complexo inibitório sobre os fatores de transcrição E2F; uma vez liberados os fatores de transcrição, há a ativação de genes responsivos a E2F, levando à progressão do ciclo celular (Figura 5) (Sherr e McCormick, 2002). As proteínas CDKs são a subunidade catalítica desse complexo, possuindo um domínio serina/treonina quinase característico; e sua concentração durante o ciclo celular não varia substancialmente, uma vez que elas só são ativadas em associação com as ciclinas correspondentes. Estas apresentam um padrão de flutuação em sua concentração durante o ciclo celular, ocorrendo o acúmulo dessas proteínas nos momentos que antecedem a entrada nas fases específicas (Figura 6). Para mamíferos, o complexo Ciclina/CDK de mitose é Ciclina B/CDK1 e o complexo de fase S é Ciclina A/CDK2. Além desses complexos, há outros que estão presentes em G1 (Ciclina D/CDK4 e Ciclina D/CDK6) e na transição G1/S (Ciclina E/CDK2) (Giacinti e Giordano, 2006; Nurse, 1994). Após as fases em que devem atuar, as ciclinas são degradadas pelo complexo ubiquitina-proteassomo e há o acúmulo das mesmas no próximo ciclo (Murray, 2004).



Figura 5 – Esquema do ciclo celular canônico.

Verificar os complexos Ciclina/CDK de cada etapa do ciclo celular, bem como as proteínas pRb e E2F, alvos da ação desses complexos. Em vermelho os sítios de atuação dos *checkpoints*. Fonte: Siviero, 2011; Modificado de Elledge, 1996 e Giacinti e Giordano 2006



Figura 6 – Flutuação na concentração de ciclinas durante o ciclo celular.

Usualmente as ciclinas são fase-específicas e regulam a ativação de CDKs, sendo encaminhadas para degradação proteolítica após a passagem da fase correspondente. Fonte: Modificado de Alberts et al., 2008.

Conforme mencionado anteriormente, o ciclo celular apresenta fases G em que as células se preparam para a fase conseguinte do ciclo: em G1, a célula se prepara para entrar na fase S; e em G2, a célula se prepara para entrar em mitose. Nessas fases G, há pontos de checagem (chamados de checkpoints), em que há uma verificação celular que permite ou não a progressão unidirecional do ciclo celular, ou seja, quando uma determinada fase é iniciada, não há retorno ou regressão. O Checkpoint de Dano de DNA detecta danos de DNA e gera um sinal que para as células em G1, diminui a fase S e para as células em G2, induzindo a transcrição de genes de reparo e está presente nas fases G1, S e G2M. Já o Checkpoint de Replicação de DNA verifica se o DNA duplicado na fase S foi completamente e fielmente replicado, inibindo a entrada em mitose e promovendo um retorno à fase S para a restauração do DNA (Elledge, 1996). Além disso, durante a mitose há um terceiro mecanismo de checkpoint, chamado de Checkpoint do Fuso Mitótico, que avalia a fidelidade do alinhamento do fuso na placa metafásica e a ligação das proteínas do fuso com os cromossomos, bloqueando a mitose na transição entre metáfase e anáfase. Se os cromossomos não se encontram alinhados na placa metafásica ou se as cromátides-irmãs não estão ligadas a microtúbulos originários de dois centrossomos opostos, a mitose é bloqueada e há a tentativa de correção do alinhamento dos cromossomos (Figura 5) (Tyson, 1999). Caso os erros encontrados nos checkpoints não sejam corrigidos, as células não progridem no ciclo celular, sendo destinadas para apoptose.

Já no endociclo, as células parecem escapar de alguns desses mecanismos de controle do ciclo celular sem serem direcionadas para apoptose. De algum modo, as células endoreplicativas simplificaram a maquinaria de regulação do ciclo celular, eliminando a expressão de componentes não mais necessários. Entretanto, para as fases G1 e S, bem como a transição G1/S, o endociclo usa praticamente a mesma maquinaria que o ciclo celular canônico (Edgar e Orr-Weaver, 2001). A transição do ciclo celular canônico para o endociclo ocorre através da inibição de CDK1 através da ativação de um complexo APC/C independente de CDK1, indução de inibidores de CDKs (CKIs) e *downregulation* de ciclinas mitóticas; e a progressão do endociclo é direcionada por oscilações de APC/C, CKIs e CycE/CDK2 (Campsteijn, 2011; Lilly e Spradling, 1996). Células em endociclo podem reter algumas características de mitose, promovendo a separação das cromátides irmãs, ou escapar completamente

da mitose, mantendo as cromátides irmãs firmemente atadas. No primeiro caso, são geradas células poliplóides, em que o conteúdo genômico é múltiplo de N e esse processo é chamado de endomitose; já no segundo caso, há a formação de células politênicas, em que o número de cópias do cromossomo aumenta sem aumentar o número de cromossomos propriamente (Figura 7) (Edgar e Orr-Weaver, 2001).

Figura 7 – Endociclo em diferentes tipos celulares.



Os desvios do ciclo celular canônico podem ocorrer em diferentes etapas, desde uma mitose incompleta até uma duplicação genômica parcial. Em vermelho, o tipo de endociclo presente nos tecidos estudados de *Rhynchosciara americana*. Fonte: Siviero, 2011; Modificado de Edgar e Orr-Weaver, 2001

Devido ao rígido controle de replicação e divisão celular, a poliploidia costuma estar relacionada a condições anormais de proliferação celular, como o câncer (Holland e Cleveland, 2009). Entretanto, alguns tipos celulares de eucariotos promovem poliploidia em seu desenvolvimento normal, como é o caso dos megacariócitos, que passam por um processo chamado mitose abortiva (ou endomitose), em que as células podem passar por anáfase e telófase, mas falham no cumprimento da citocinese, resultando em células com ploidia de até 128N (Davoli e De Lange, 2011). Outra forma de indução de poliploidia é a fusão de

precursores mononucleados para a formação de uma célula gigante multinucleada, como é o caso de células gigantes trofoblásticas (GTCs) da placenta e osteoclastos, gerados a partir da fusão de células macrofagocíticas (Vignery, 2000). Acredita-se que esse aumento no conteúdo genômico faça parte de um suporte a funções celulares específicas, sendo restrito a células altamente especializadas; e não como estratégia para o aumento celular somente (Lee et al., 2009).

Já a politenia é uma especialização cromatínica presente em diferentes organismos e amplamente distribuída entre os dípteros, ocorrendo em tecidos, órgãos e em estágios do desenvolvimento em que determinada função é necessária, esta normalmente envolvendo intensas funções secretórias em um curto período de tempo, frente a um panorama de rápido desenvolvimento (Zhimulev et al., 2004). Neste processo, não há separação das cromátides irmãs após a fase S, mantendose firmemente atadas umas às outras. Devido à orientação paralela destas cópias na cromátide e à distribuição da cromatina em heterocromatina e eucromatina, verifica-se um padrão de bandeamento nos cromossomos característico de cada espécie. As células podem atingir altos níveis de politenia, gerando cromossomos contendo até 8192C, em Sciara coprophila (Wu et al., 1993), e pelo menos 512C em (Machado-Santelli, comunicação pessoal[‡]). Rhynchosciara americana Em Rhyncosciara, o último ciclo endoreplicativo coincide com o período de secreção do casulo (Machado-Santelli e Basile, 1973), fase de alta atividade gênica, evidenciada pela ocorrência de pufes de DNA e RNA.

1.6 Cromossomos politênicos

Os cromossomos politênicos são encontrados em vários tecidos de dípteras, como glândula salivar, túbulos de Malpighi, intestino e vesícula seminal, sendo que, em *Rhynchosciara*, o padrão de bandeamento dos cromossomos permanece igual em quase todos os tecidos encontrados (Pavan e Breuer, 1952), sendo que as alterações tecido-específicas parecem estar diretamente relacionadas com atividades exclusivas do tecido (Guevara e Basile, 1973). Em *Rhynchosciara americana*, esses cromossomos são mais amplamente estudados em glândula

⁺ Machado-Santelli GM. São Paulo, 2011.

salivar (Figura 8), devido ao tamanho que atingem (maior número de amplificações) e também por se apresentarem menos compactados, quando comparados com os cromossomos encontrados em outros tecidos. Além da politenização amplamente disseminada entre os dípteros, entre os sciarídeos há um processo de amplificação gênica, em que há uma replicação de regiões específicas do cromossomo de uma maneira finamente regulada espaço-temporalmente, chamados pufes de DNA (Pufe B2, C3 e C8, por exemplo) (Ficq e Pavan, 1957; Rudkin e Corlette, 1957) evidenciados na figura 9; relacionam-se esses pufes a genes codificantes para proteínas estruturais do casulo comunal (Claycomb e Orr-Weaver, 2005; Santelli et al., 2004; Winter et al., 1977). A ocorrência da amplificação gênica e, portanto, dos pufes de DNA é concomitante com mudanças morfológicas abruptas no casulo comunal, levando-o de uma tênue rede a uma estrutura rígida, e essas alterações estruturais dos cromossomos são responsivas ao estímulo com o hormônio ecdisona e, portanto, rigidamente reguladas ao longo do desenvolvimento larval (Amabis et al., 1977; Stocker et al., 1984; Foulk et al., 2006).





Figura 9 – Pufes mais estudados de Rhynchosciara americana.

Notar no cromossomo C a presença dos dois pufes mais estudados (C3 e C8) e no cromossomo B, a presença do pufe B2 (Cabeça de seta). Fonte: Martens, 2011



Em uma biblioteca de EST gerada por nosso grupo, após o sequenciamento do banco de cDNA, poucas mensagens puderam ser direta ou indiretamente ligadas ao ciclo celular, correspondendo a 3.11% dos ESTs sequenciados (Siviero et al., 2006). Dentre elas, foram encontradas somente duas mensagens que pudessem ser relacionadas ao controle do ciclo celular, cdc2-*like* e cdk7. Como a mensagem para cdk7 foi encontrada em uma biblioteca gerada no início do último ciclo de politenização e início da amplificação gênica, espera-se alguma relação dessa proteína com endociclos. Apesar de a proteína CDK7 ser bastante conservada entre eucariotos, pouco se sabe sobre sua atividade em insetos. Portanto, o objetivo deste trabalho é realizar a caracterização molecular do gene cdk7 de *Rhynchosciara americana* durante o quarto instar do desenvolvimento larval.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécimes

As larvas de *Rhynchosciara americana* foram coletadas na região de Ubatuba, costa do estado de São Paulo. Os grupos foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade durante seu desenvolvimento larval com algumas modificações nas condições estabelecidas por Lara et al. (1965). A confirmação dos estágios de desenvolvimento larval foi realizada de acordo com análise de diferenças morfológicas e citológicas.

3.2 Preparações citológicas

Para cada estágio do desenvolvimento larval analisado, foram preparadas lâminas para visualização dos cromossomos politênicos coradas com orceína. Para cada grupo e estágio foi dissecada, em PBSA (140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 6.5 mM Na₂HPO₄), uma glândula que foi imediatamente transferida para uma solução de etanol:ácido acético (3:1 v/v) e armazenada em freezer. No momento de análise, a porção S1 das glândulas foi corada em orceína acética (Orceína a 2% em ácido acético 45%) por aproximadamente 5-10 minutos. Foi usada somente a porção S1 por ser a região que apresenta as maiores células e também pelo fato de as diferentes regiões (S1, S2 e S3) apresentarem uma pequena variação no tempo de abertura e expansão de pufes tornando necessária uma padronização da análise (Santelli et al., 2004). Então, estas foram transferidas para uma solução de ácido acético 45% por aproximadamente 5 minutos. Após a passagem em ácido acético, as glândulas foram posicionadas em lâminas e cobertas com uma lamínula. O excesso de solução corante e ácido acético foi retirado com um papel absorvente e foi feita uma leve pressão sobre a lamínula para liberar os cromossomos politênicos de dentro das células, processo denominado squashing. Então, a lâmina foi selada com esmalte e analisada sob microscópio de luz para a confirmação do estágio de desenvolvimento de acordo com a abertura e expansão de pufes nos cromossomos politênicos.
3.3 Extração de DNA genômico

Foi extraído DNA genômico dos tecidos: glândula salivar e corpo gorduroso de Rhynchosciara americana em diferentes períodos do desenvolvimento larval. Os tecidos foram dissecados em tampão PBSA, mantidos por 10 minutos em etanol 70%, e então transferidos para uma solução de etanol:glicerol 1:1 (v/v) e estocados a -20 °C até o momento da extração. Os tecidos foram tratados com tampão de digestão (25 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM NaCl; 20 mM EDTA pH 8.0), com a adição de 1% de SDS (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 µL proteinase K 10 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Essa solução foi incubada por uma a duas horas a 65 °C, seguido de extração com 1V de fenol. A solução foi agitada por inversão cuidadosamente e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi então purificado com 1V de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), agitado por inversão, centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante coletado em outro tubo limpo. O DNA foi precipitado com 0.3 M de acetato de sódio pH 5.2 e 2.5V de etanol absoluto gelado por 2 horas a -20 °C, lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA). As amostras foram tratadas com 10 µL de RNAse 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) a 37 °C por 30 minutos. A enzima foi então inativada a 65 °C por 10 minutos e o DNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

3.4 Extração de RNA

Foi realizada a extração de RNA dos seguintes tecidos: ovo, larva de 1 dia (todos os tecidos), ovário, testículos, corpo gorduroso e glândula salivar, sendo que dos dois últimos tecidos, foram extraídas amostras de diferentes fases do desenvolvimento larval. Os tecidos foram dissecados em PBSA, transferidos para uma solução de etanol 70% e estocados em uma solução de etanol:glicerol (1:1 v/v) até o momento de extração. Para a extração, foram utilizados aproximadamente cinco pares de glândula salivar e o corpo gorduroso de três larvas de cada período analisado. Para cada amostra, foi adicionado tampão de digestão (25 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM NaCl; 20 mM EDTA pH 8.0) com a adição de 1% de SDS (Sigma-

Aldrich, EUA) e 10 µL proteinase K 10 mg/mL (Sigma Aldrich, EUA). Essa solução foi incubada por uma a duas horas a 65 °C, seguido de extração com 1V de fenol. A solução foi agitada por inversão generosamente e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi então purificado em 1V de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), agitado por inversão, centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm a 4 °C e o sobrenadante coletado em outro tubo livre de RNAses. O RNA foi precipitado com 0.3 M de acetato de sódio pH 5.2 e 2.5V de etanol absoluto gelado por 2 horas a -20 °C, lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 50 µL de água RNAse-free (tratada com 0.1% DEPC - Dietilpirocarbonato - sob agitação por 24 horas e autoclavada). As amostras foram então pré-quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, EUA) e uma concentração estimada de 2 µg de RNA total foi tratado com 2 unidades da enzima DNAse I (Sigma-Aldrich, EUA) a temperatura ambiente por 15 minutos. Então, foi adicionado 1 µL de Stop Solution e a solução foi incubada a 70 °C por 10 minutos para a inativação da enzima. O RNA purificado foi novamente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, EUA). Para verificar a qualidade dos RNAs, uma pequena quantidade das amostras foi tratada com o método Glioxal-DMSO (Gerard e Miller, 1997). Foram adicionados à amostra 30 µL de Solução de Glioxal (390 µL glioxal; 450 µL DMSO e 90 µL de tampão fosfato 0.2 M) e a mistura foi incubada em banho a 50 °C por 60 minutos. Após esse tempo, o RNA foi verificado em gel de agarose 1.2% com tampão fosfato e, após a corrida, corado com azul de metileno.

3.5 Sequenciamento

Os clones foram transformados por choque térmico (42 °C por 1.5 minutos com transferência imediata para o gelo, mantendo por mais 1.5 minutos), utilizando bactérias competentes *E. coli* DH10B preparadas com cálcio 50 mg/L, e placas contendo meio de cultura LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona), contendo ampicilina 100 mg/L, 4 µL IPTG 1M e 40 µL X-Gal 20 mg/mL para a seleção dos insertos. As colônias selecionadas foram incubadas por 16 horas em meio LB líquido contendo ampicilina 100 mg/L em *shaker* a temperatura de 37 °C e sob agitação de 137 rpm. Após esse período, as bactérias foram concentradas por centrifugação (5 minutos a 5000 g) e a extração do DNA plasmidial foi realizada através do método de *Fast MiniPrep*.

Este protocolo consiste em adicionar ao tubo contendo as bactérias 100 µL da solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM EDTA - Solução de Ressuspensão) e 1 µL de RNAse A 20 mg/mL, homogeneizar em agitador tipo vortex para ressuspender as células, adicionar 200 µL da solução II (1% SDS e 0.2 M NaOH – Solução de Lise), misturar por inversão e deixar por 3-5 minutos na bancada. Misturar por inversão e incubar 10 minutos em gelo. Após esse tempo, adicionar 200 µL da solução III (3 M Acetato de potássio e 11.5% ácido acético -Solução de Neutralização), misturar por inversão e deixar no gelo por 10 minutos. Centrifugar a amostra por 15 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente. Em tubos limpos, adicionar 300 µL de isopropanol. Com cuidado, coletar 400 µL do sobrenadante, transferir para os tubos com isopropanol e misturar por inversão. Centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante com cuidado. Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado e misturar por inversão. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente, descartar o sobrenadante cuidadosamente e secar o material a vácuo (Concentrator 5301 -Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 65 °C por 10 a 15 minutos ou a temperatura ambiente por uma hora. Ressuspender em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA).

O DNA obtido foi digerido com uma enzima de restrição apropriada (incubação de 30 minutos a 37 °C) e checado em gel de agarose 0.8% para verificar o tamanho do inserto e, a partir desse inserto, foi realizada uma reação de PCR de sequenciamento utilizando o kit de sequenciamento *BigDye Terminator* v3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) sob as condições descritas no Quadro 1:

Reação	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo			
2 uL BigDve	1	96	1 minuto			
6 μL Tampão SM 6.5 μL água		96	20 segundos			
	35	50	1 minuto			
4 µL DNA 1.5 µL primer		60	4 minutos			
F	1	4	∞			

Quadro 1 – Parâmetros da PCR de sequenciamento

Fonte: Martens, 2011

O produto de PCR foi precipitado conforme o protocolo: Adicionar a cada amostra 25 µL de solução gelada de precipitação (23 µL de etanol absoluto, 1 µL de acetato de sódio 3 M pH 5.0 e 1 µL de glicogênio 1 g/L). Após uma rápida agitação em *vortex*, as amostras devem permanecer em gelo por 40 minutos e ser então centrifugadas por 40 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Descartar o sobrenadante, adicionar 50 µL de etanol 70% gelado e repetir o processo de centrifugação. Descartar o sobrenadante e secar as amostras no escuro a temperatura ambiente por uma hora. Finalmente, adicionar 10 µL de tampão de corrida (Formamida 10%). Utilizou-se um sequenciador automático de 16 capilares modelo ABI-3100 (Applied Biosystem, EUA).

As análises dos eletroferogramas gerados a partir da corrida foram realizadas em sistema operacional Linux através dos programas Phred, Phrap, CrossMatch e Consed 20 (Ewing e Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998), cujas licenças para uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Com esses programas, foi possível alinhar sequências, separando as que se sobrepõem em *contigs* e as sequências isoladas em *singlets*, além de eliminar possíveis contaminações de vetores sequenciados.

3.6 Clonagem do mRNA de cdk7

A clonagem do cDNA completo de cdk7 foi realizado com o auxílio do kit 3' and 5' RACE / 2nd generation (ROCHE, Basel, Suíça) (<u>Rapid Amplification of cDNA</u> <u>Ends</u>), de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* usados para a amplificação de cdk7 se encontram listados no Quadro 3 e foram desenhados com base em uma sequência de EST (Accession Number CK811302). Os fragmentos gerados foram então subclonados em plasmídeos *pGEM-T Easy Vector* (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e sequenciados. RT-PCR foi realizada usando 2 µg de RNA total de diferentes estágios larvais, sob as seguintes condições:

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Transcrição Reversa	1	50	60 minutos
Desnaturação	1	95	5 minutos
		95	30 segundos
Amplificação	35	47	30 segundos
		72	2 minutos
Extensão Final	1	72	5 minutos
Easter Masters 0011			

Quadro 2 – Programa de ciclagem da RT-PCR

Fonte: Martens, 2011

Primer	Sequência						
SP1 (CDK7-inv-L)	5'- CCG AAT AAT AAC TCT GGG CAA C -3'	53.6					
SP2 (CDK7- 5RACE2)	5'- CGA GTC ACG ACC TGA TGT GT -3'	56.8					
SP3 (CDK7- 5RACE1)	5'- CAA ACC AAA ATC GCC AAT TT -3'	50.3					
SP4 (CDK7- 3RACE1)	5'- TGG TGG AAC AAT GCT CAA AA -3'	52.9					
SP5 (CDK7- 3RACE2)	5'- TTT CCA ATA AAC CAG CTC CG -3'	53.0					
Oligo-dT Anchor	5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV -3'	NF*					
PCR Anchor	5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C -3'	NF*					

Quadro 3 - Primers usados no protocolo de RACE

*: Não fornecido pelo fabricante

Fonte: Martens, 2011

3.7 Análise de RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Reações de *One Step* qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram realizadas em um termociclador RotorGene 6000 Cycler (Corbett Life Science, Concord, NSW, Austrália) para um volume final de 25 µL. O cDNA foi amplificado sob as seguintes condições:

Quadro 4 – Condições de ciclagem da RT-PCR em tempo real:

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Transcrição Reversa	1	45	10 minutos
Desnaturação	1	95	10 minutos
		95	20 segundos
Amplificação	40	53	20 segundos
		72	20 segundos
Curva de Melting	1	49-59	0,5 °C/S

Fonte: Martens, 2011

Os *primers* utilizados para a amplificação em tempo real estão listados no Quadro 5. A normalização foi realizada em relação ao RNA total (Bustin, 2000; 2002). Isso foi feito devido ao fato de que a expressão de genes de referência, como GAPDH, actina ou tubulina, presentes na biblioteca de cDNA de glândula salivar de

Rhynchosciara americana variavam expressivamente durante o desenvolvimento larval, como visto em *Xenopus* (Sindelka et al., 2006).

Primer	Sequência	Tm (°C)
CDK7-R	5'- TTG ATC TAA ATC ACT GTC TCC C -3'	51.9
CDK7-L	5'- GTT GCC CAG AGT TAT TAT TCG G -3'	53.6

Quadro 5 – Primers usados no protocolo de qRT-PCR

Fonte: Martens, 2011

3.8 Sequenciamento da região genômica

Para o sequenciamento da região genômica, foram desenhados *primers* para a porção mais externa do mRNA, detalhados no quadro 7. Foi realizada uma reação de PCR com amostras de DNA genômico de corpo gorduroso e glândula salivar sob as seguintes condições:

Quadro 6 –	Parâmetros	da PCR	genômica
------------	------------	--------	----------

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo			
Desnaturação	1	95	2 minutos			
		95	30 segundos			
Amplificação	35	49	30 segundos			
		72	2 minutos			
Extensão Final	1	72	5 minutos			

Fonte: Martens, 2011

Quadro 7 - Primers usados no protocolo de PCR genômica

	Primer	Sequência	Tm (°C)
	gCDK7-3	5'- GCC AAC AAA ATT AAA TCG AAC G -3'	51.3
	gCDK7-5	5'- TCG CAA TGG ATG CTA AAT CA -3'	52.3
'	1 0044	•	

Fonte: Martens, 2011

O produto de PCR foi clonado em plasmídeo pGEM T-Easy Vector (Promega, EUA) e sequenciado.

3.9 Análise de sequências

A tradução conceitual foi obtida com o auxílio da ferramenta bioinformática ORF Finder e alinhamentos foram realizados com o auxílio da ferramenta ClustalX e ClustalW (Chenna et al., 2003; Jeanmougin et al., 1998; Larkin et al., 2007). O histórico evolutivo foi inferido usando o método de Maximum Likelihood baseado no modelo JTT matrix-based (Jones et al., 1992). A árvore consenso de bootsrap inferida a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) foi usada para representar o histórico evolucionário dos "taxa" analisados. Ramos correspondendo a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas de bootstraps foram colapsados. A árvore inicial para a busca heurística foi obtida automaticamente. Quando o número de sítios comuns era menos que 100 ou menos de um quarto do número total de sítios, o método de Maximum Parsimony foi utilizado. Entretanto, o método BIONJ com matriz de distância MCL foi usado. A árvore foi desenhada com escala, com o comprimento dos ramos medidos como o número de substituições por sítio. A análise envolveu sequências de 18 aminoácidos. Todas as posições contendo gaps ou dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 180 posições na distribuição final. A árvore filogenética foi construída no Mega5 usando o algoritmo de Maximum Likelihood (Tamura et al., 2011). Comparações no GenBank foram realizadas usando algoritmos do BLAST (Altschul et al., 1990; Gish e States, 1993; Zhang et al., 2000).

Os números de acesso das sequências de CDK7 analisadas são as seguintes: Xenopus laevis (NP_001084361), Xenopus tropicalis (NP_001017219), Tribolium castaneum (XP_966717), Rattus norvegicus (XP_215467), Solenopsis invicta (EFZ13601), Homo sapiens (NP_001790), Mus musculus (NP_034004), Danio rerio (NP 998126), Daphnia pulex (EFX77011), Drosophila melanogaster (NP 511044), Aedes (XP_001657865), Caenorhabditis aegypti elegans Bombyx mori (NP_001166283), Apis mellifera (XP_395800), (NP 490952), Anopheles gambiae (XP_312281), Danaus plexippus (EHJ67061) e Culex quinquefasciatus (XP_001868682). As sequências usadas nas análises foram obtidas do GenBank.

Buscas *in silico* de sítios protéicos e possíveis modificações pós-traducionais foram realizadas com o auxílio das ferramentas Compute pl/Mw (Bjellqvist et al.,

1993; 1994) e ScanProsite do servidor de proteômica ExPASy. Análise de sítios passíveis de fosforilação foi realizada no software NetPhos 2.0 e análise de possíveis alterações de carga foi realizada no software ProMoST (Halligan et al., 2004).

3.10 Extração de proteínas

Glândulas salivares e corpos gordurosos foram dissecados em PBSA e imediatamente transferidos para tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato, 0.1% SDS e 50 mM Tris-HCl pH 8.0) contendo Mix Inibidor de Protease 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Os tecidos foram sonicados em gelo por três segundos a uma amplitude de 20% em um sonicador Vibra Cell VCX130 (Sonics, Newtown, CT, EUA). A suspensão foi então centrifugada a 12000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento de uso.

As proteínas foram quantificadas pouco antes do preparo das corridas ou focalizações, devido a possíveis perdas que possam ocorrer no congelamento e armazenamento. Foi usado o kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, EUA), usando BSA como padrão. Inicialmente, foi calculado o número de amostras a serem quantificadas. Para cada amostra, são utilizados 200 µL de solução de BCA (50 partes de Solução A e 1 parte de Solução B). Todas as análises são acompanhadas de uma curva padrão de proteína (BSA) fornecida no próprio kit, com as seguintes concentrações: 2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL e 0 µg/mL e um branco, contendo a solução de BCA mais o tampão RIPA. As amostras são diluídas 10 vezes em tampão RIPA (2 µL de amostra + 18 µL de tampão) e tudo é incubado a 37 °C por 30 minutos. Então as amostras são lidas em um leitor de placas 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) no comprimento de onda de 550 nm. Só foram consideradas válidas as quantificações com R² acima de 0.99.

3.11 Western Blotting

3.11.1 Preparo do Gel

Inicialmente, é necessário saber qual a faixa de separação de cada gel. Como o peso predito da proteína é de 37 kDa, usou-se o *resolving gel* de 10%, que apresenta uma faixa de separação de 20-80 kDa. Cada gel costuma gastar em torno de 5 mL. Com o *rack* montado, pipetar o *resolving gel*, cobrir com isopropanol cuidadosamente e esperar o gel polimerizar. Após a polimerização do gel, preparar o *stacking* gel 5%, pipetar no *rack* até atingir o topo e colocar o pente lentamente, sem formar bolhas. Esperar polimerizar.

3.11.2 Corrida e Transferência

As amostras devem ser preparadas previamente, pipetando 15 µg de extrato protéico total e o mesmo volume correspondente de 2X SDS *Gel-Loading Buffer* (100 mM Tris-HCl pH 6.8; 4% SDS v/v; 0.2% Azul de Bromofenol v/v; 20% Glicerol v/v; 200 mM DTT adicionado no momento de uso). As proteínas devem ser desnaturadas a 100 °C por 3-5 minutos; depois, manter as amostras em gelo até o momento da corrida.

Retirar os géis do *rack* e posicionar no sistema de eletroforese. Remover o pente com muito cuidado e completar o sistema com Tampão de Corrida (25 mM Tris-Base; 192 mM Glicina; 0.1% SDS w/v) até cobrir o gel e permitir a formação de corrente elétrica. Pipetar seis microlitros do marcador de peso molecular (Precision Plus Protein[™] Kaleidoscope Standard – BioRad, EUA). Pipetar as amostras com muito cuidado para não extravasarem para os poços subsequentes. Cobrir o sistema e ligar a fonte sob as seguintes condições:

- 20 minutos a 50 V e 30 mA;

- 2 horas a 100 V e 50 mA.

Próximo ao fim da corrida, preparar as soluções para transferência: uma cuba com metanol, uma com água destilada e outra com tampão de transferência (25 mM Tris-Base; 192 mM Glicina; 0.1% SDS w/v, 30% Metanol). Assim que a corrida

estiver finalizada, retirar o gel do sistema, medir a área do gel e deixá-lo na cuba contendo tampão de transferência. Cortar seis folhas de papel-filtro do tamanho exato do gel, bem como uma folha de membrana de PVDF (Amersham, Amersham, Reino Unido). A membrana de PVDF deve ser ativada em metanol por 10 minutos e lavada em água destilada. Os papéis-filtro devem ser umedecidos em tampão de transferência antes da montagem do sistema de transferência (Sistema de transferência semi-seco TE77 PWR – Amersham, Amersham, Reino Unido), na ordem (de baixo pra cima): três folhas de papel-filtro, membrana, gel, três folhas de papel-filtro – todos bem umedecidos em tampão de transferência. Com base na medição anterior, multiplicar a área do gel por 1.2 para obter a amperagem a ser utilizada; transferir por 2.5 horas.

3.11.3 Bloqueio e Marcação com Anticorpos

Após a transferência, fazer um picote no canto superior direito da membrana, para identificar qual face contém as proteínas imobilizadas. Pode-se corar o gel com Coomassie Blue (250 mg Coomassie Brilliant Blue R250; 45% Metanol; 45% Água Destilada; 10% Ácido Acético Glacial) e a membrana com Ponceau S (Sigma-Aldrich, EUA) para verificar a eficácia da transferência. Em um tubo tipo *falcon* de 50 mL, bloquear a membrana com leite 3% (pode-se usar BSA 3%) em TTBS por uma hora sob agitação constante e uniforme. Então, fazer quatro lavagens de 10 minutos cada na membrana com os tampões TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl) e TTBS (0.1% Tween 20 em TBS), na ordem: TTBS/TBS/TTBS/TBS.

A incubação com o anticorpo primário deve ser realizada *overnight* a 4 °C sob agitação. O anticorpo é diluído em 2 mL de leite 1% em TTBS. No quadro 8 encontram-se os anticorpos utilizados e suas diluições.

Ac. Primário	Diluição	Ac. Secundário	Diluição			
CDK7-ds17 (GS)	1:700 ¹	Goat	1:10000			
β-Actina	1:2000	1:5000				
CDK7-ds17 (GS)	1:1000 ²	Goat	1:10000			
β-Tubulina	1:500	Mouse	1:1000			
CDK7-ds17 (CG)	1:800	Goat	1:10000			
Hsp70	1:5000	Mouse	1:7500			

Quadro 8 – Anticorpos e diluições

1: Diluição usada em membranas bloqueadas com BSA 3% 2: Diluição usada em membranas bloqueadas com Leite 3%

Fonte: Martens, 2011

Após a incubação com o anticorpo primário, lavar novamente a membrana quatro vezes (TTBS/TBS/TTBS/TBS) e incubar com 2 mL de anticorpo secundário por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Lavar quatro vezes com os tampões de lavagem (TTBS/TBS/TTBS/TBS).

3.11.4 Revelação

Até o momento da revelação, manter a membrana no tubo tipo falcon com TBS, para evitar seu ressecamento. Pipetar 500 µL de Reagente 1 e 500 µL de Reagente 2 do ECL Chemiluminescent Substrate (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) em tubos tipo eppendorf separados. Na sala escura, misturar em uma cuba pequena os Reagentes 1 e 2 e colocar a membrana com a face superior virada para baixo. Incubar por 1 minuto. No suporte para revelação, colocar a membrana com a face superior voltada para cima e cobrir com uma folha plástica. Após apagar a luz, cortar uma folha de filme no tamanho adequado e posicionar sobre a membrana, sem arrastá-lo. Fechar o suporte e esperar 10 minutos, em média. Durante esse tempo, preparar as cubas contendo solução reveladora, fixador e uma cuba para água corrente. Depois dos 10 minutos, abrir o suporte e passar o filme para a solução reveladora; agitar homogeneamente a solução até que apareçam as bandas no filme. Assim que as bandas estejam firmes, lavar abundantemente em água corrente. Transferir para o fixador; agitar homogeneamente até que o filme esteja limpo. Lavar novamente em água corrente e deixar secar naturalmente. Guardar a membrana em TBS.

3.11.5 Stripping

Após uma marcação, deve-se fazer o *stripping* para remoção dos anticorpos e permitir a marcação com outro conjunto de anticorpos. Para isso, deve-se incubar a membrana a 55 °C por 30 minutos sob agitação com a Stripping Solution (Thermo Fisher Scientific, EUA). Depois dessa etapa, retornar ao bloqueio e prosseguir com outra marcação com anticorpos.

3.12 Western Blot em 2D

3.12.1 Precipitação e Ressuspensão da Proteína

Para a isoeletrofocalização (IEF), deve-se retirar a maior quantidade possível de sais e prováveis interferentes, inclusive o tampão no qual as proteínas foram extraídas. Para isso, precipitamos os extratos totais com 4V de acetona gelada, incubando por uma hora a -20 °C. Centrifugar a 12000 g por 20 minutos a 4 °C. Desprezar o sobrenadante e secar a temperatura ambiente. Após a remoção dos possíveis contaminantes, deve-se ressuspender as proteínas em um tampão recomendado pelo fabricante do aparelho de IEF (GE Healthcare, Reino Unido).

3.12.2 Reidratação da Fita e Isoeletrofocalização (IEF)

As proteínas são ressuspendidas no próprio tampão de reidratação da fita (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS w/v; 0.5% IPG Buffer v/v; 0.002% Azul de Bromofenol). Esse tampão, já com as proteínas ressuspendidas, será usado para reidratar as fitas (strips) de IEF. Para a fita de sete centímetros, usada em nossos experimentos, usa-se 125 µL de tampão de reidratação; portanto, é nesse volume que as proteínas são ressuspendidas. As tiras devem ser retiradas do freezer somente no momento de reidratação. Remover o plástico que encobre a matriz contendo um gradiente de pH imobilizado (pH 3-10) e colocar a fita com essa matriz virada para baixo, em contato direto com a solução de reidratação, nas canaletas da *Reswelling Tray*. Cobrir com óleo mineral e deixar reidratando *overnight*. Após a reidratação, posicionar a fita com a matriz virada para cima, encobrir com óleo mineral e posicionar papéis filtro umedecidos em água destilada sobre suas pontas. Posicionar os eletrodos do aparelho em cima dos papéis-filtro. Ajustar os parâmetros no software Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Reino Unido), com um acúmulo total de aproximadamente 5750 Vh.

3.12.3 Equilíbrio da Fita e Corrida da Segunda Dimensão

Após a IEF, as fitas foram equilibradas por 15 minutos em Solução I (6M Uréia; 75mM Tris-HCI pH 8.8; 29.3% Glicerol; 2% SDS, 0.002% Azul de Bromofenol; 1% DTT) e 15 minutos em Solução II (6M Uréia; 75mM Tris-HCI pH 8.8; 29.3% Glicerol; 2% SDS; 0.002% Azul de Bromofenol; 5% Iodacetamida) antes de correr a segunda dimensão em um gel de acrilamida 10% (SDS-PAGE).

3.12.4 Transferência e Marcação com Anticorpos

Depois da corrida da segunda dimensão, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham, Amersham, Reino Unido) e detectadas como o *Western Blot* – 3.11.3 e 3.11.4.

3.13 Tratamento com Fosfatase

Amostras de glândula salivar e corpo gorduroso em Início de Rede foram coletadas para verificação do perfil de fosforilação em análise de *western blot* em 2D. Para tanto, foi extraída uma amostra de proteínas totais de cada tecido e o pH da solução foi ajustado para 6.0 com auxílio de HCI 0.2 M. A variação do pH foi acompanhada através da análise de fitas identificadoras de pH (pH Test Strips 4.5-10.0 – Sigma, EUA). Com o pH ajustado, a amostra foi dividida em duas alíquotas: F+ e F-, tratada e não tratada com a enzima, respectivamente. À amostra F+, foram adicionados 100 µg/µL de fosfatase ácida; as duas amostras foram então incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após o tratamento, as alíquotas foram precipitadas com 4V de acetona gelada e procedeu-se a análise de *western blot* 2D conforme os tópicos 3.12.2 a 3.12.4.

3.14 Imunfluorescência

Ovários foram dissecados em PBSA e fixados em formaldeído 3.7% por 10 minutos. Os tecidos foram então lavados três vezes com 0.5% albumina em PBSA por cinco minutos cada, permeabilizados em 0.5% Triton X-100 por 10 minutos e lavados novamente com PBSA três vezes por cinco minutos. O tecido foi incubado overnight a temperatura ambiente com 10 µL do anticorpo primário anti-CDK7 dv15. Os ovários foram então lavados em PBSA três vezes por cinco minutos e 20 µL do anticorpo secundário marcado com fluoresceína foram adicionados e incubados por uma hora a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionada RNAse 10 mg/mL, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e lavado três vezes por cinco minutos. Então, os ovários foram contracorados com lodeto de Propídeo 10 µg/mL e as lâminas foram montadas com Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). O material foi visualizado ao microscópio confocal de varredura a laser (ZEISS – LSM510, Oberkochen, Alemanha).

4 RESULTADOS

4.1 Sequenciamento de cdk7

Entre 8571 ESTs sequenciados, somente foram encontradas duas mensagens de CDKs, com nenhuma mensagem relacionada a suas ciclinas complementares, sendo que cdk7 apareceu somente uma vez no banco. Esse EST, contendo 761 pb (Figura 10), foi usado para o desenho de primers para RACE 5' e 3' e PCR a fim de clonar e sequenciar as regiões ausentes do transcrito e da sequência genômica. Após uma RT-PCR de um pool de mRNA contendo amostras de todos os estágios de desenvolvimento estudados nesse trabalho, o cDNA completo foi clonado por RACE 5' e 3'. O sequenciamento dessa mensagem completa mostrou uma sequência consenso contendo 1230 pb e uma ORF contendo 1020 pb, que foi usada como amostra para o desenho de primers para cobrir possíveis íntrons desconhecidos e, portanto, a seguência genômica. Uma grande parte desta já foi obtida, contendo 1604 pb até o presente momento (Figura 11). Comparações com bases de dados do GenBank confirmam sua identidade como cdk7, embora uma pequena porção da sequência codificante a 5' e sua região promotora ainda precisam ser determinadas.

Figura 10 – Mapa de restrição do EST de cdk7



CDK7-cDNA fragmento 761 bp

GC% in 1 bp blocks

Notar a alta concentração de A-T na sequência e os sítios de enzimas de restrição. Fonte: Martens, 2009



Figura 11- Obtenção da sequência do transcrito completo e da sequência genômica de cdk7.

Em azul, as sequências codificantes. Em vermelho, as regiões não traduzidas do mRNA; e em verde, os íntrons presentes no DNA genômico. Fonte: Martens, 2011

O alinhamento entre o mRNA e a sequência genômica mostrou que a estrutura do gene compreende 4 éxons (Figura 12) e os três íntrons apresentaram sequências consenso GT-AG nos sítios de *splicing*, contendo 53, 70 e 124 pares de base, respectivamente. O cDNA de cdk7 codifica uma proteína de 339 aminoácidos (Figura 13), contendo o conservado motivo da família de CDKs (PSTAIRE) que, em CDK7, é NRTALRE (em destaque na figura 13), confirmado por um alinhamento da sequência proteica de CDK7/CAK1 de diferentes organismos (Figura 14). Análises *in silico* da sequência da proteína também mostraram sítios de interação (quando em conformação quaternária) com as ciclinas para a formação dos complexos ciclina/CDK, bem como um sítio de ativação (*A-Loop*), chamado de *T-Loop* em CDKs, devido ao fato de ocorrer uma fosforilação em uma treonina (Thr) para sua ativação (Figura 15).





Notar a distribuição dos éxons ao longo da sequência genômica. Fonte: Martens, 2010 Figura 13 – Sequência do mRNA e sua tradução conceitual.

1 TTCGGGCACGAGGAGAGAAACCTAATATATCCCCTGCAACATCAAAGCTGTCTCTAGGATTTTGTTATAA 70 71 1 M D A K S I I R Y E K I D 13 141 TTTTTTGGGTGAAGGACAGTTCGCTACTGTCTACAAAGCCAGGGATAATTCACTGGATCGAATAGTTGCA 210 FLGEGQFATVYKARDNSLDRIVA36 14 GTAAAGAAAATTAAAATAGGAAGCAGAGGAGGGCCCAAGATGGCATTAATCGAACAGCGTTGCGTGAGA 280 211 37 V K K I K I G S R E E A Q D G I <mark>N R T A L R E</mark> 59 281 TAAAATTGTTGCATGAACTGGAACACGTCAATATAATTGGACTTTTAGATGTCTTTGGTCATAAGTCTAA 350 60 I K L L H E L E H V N I I G L L D V F G H K S N 83 TGTTTCACTAGTGTTTGACTTCATGGATACTGATTTGGAAAACATAATTAGAGATACGAAGATTATGCTC 420 351 84 V S L V F D F M D T D L E N I I R D T K I M L 106 421 ACTCCAGCCAATATCAAAGCGTACACAATTATGACACTGCAAGGGCTAGAATATTTGCATCTCAATTTCA 490 107 T P A N I K A Y T I M T L Q G L E Y L H L N F 129TTTTGCATCGTGATCTTAAACCGAACAATTTATTAATCAACTCAAATGGCATCTTGAAAATTGGCGATTT 560 491 130 I L H R D L K P N N L L I N S N G I L K I G D F 153 561 TGGTTTGGCTAAATTTTTCGGTTCGCCCAATCGCATTTACACACATCAGGTCGTGACTCGATGGTATCGT 630 154 GLAKFFGSPNRIYTHQVVTRWYR176 TGCCCAGAGTTATTATTCGGAGCCAGACAATATAATGTTGGTGTTGACATATGGGCTGTGGGATGTATAT 700 631 177 C P E L L F G A R Q Y N V G V D I W A V G C I 199 TAGCCGAATTATTGTTGCGGGTACCCTTTCTTCCGGGAGACAGTGATTTAGATCAACTAACAAAGATATT 770 701 LAELLRVPFLPGDSDLDQLTKIF223 200 CCAAGCACTCGGTACACCTACAGAAGAAAATTGGCCCGACGTTAAACTGTTACCAGATTACATGCTATTT 840 771 224 Q A L G T P T E E N W P D V K L L P D Y M L F 246 841 AAATCATTCCCTGGTACACCGCTTCAGCACATTTTCACTGCAGCACCCAACGATTTGCTACAATTACTCG 910 247 K S F P G T P L Q H I F T A A P N D L L Q L L 269911 AAAAATTGCTGGCACTTTGTCCATGCAATCGATGTACTTGCACTGAAGCGCTTAATATGCCGTACTTTTC 980 270 E K L L A L C P C N R C T C T E A L N M P Y F S 293 981 CAATAAACCAGCTCCGACTGTTGGCGAAAAATTACCGATGCCATCGACATGTATTCAATTGGAGGAGAGA 1050 N K P A P T V G E K L P M P S T C I Q L E E R 316 294 1051 CAGACAAATTTGAAACGGAAAATTACCAGTTCCGATGGTGGAACAATGCTCAAAAAAAGATTGCAATTTT 1120 Q T N L K R K I T S S D G G T M L K K R L Q F 317 339 1121 AATTAGAGAAATTATCTTTCGTTCGATTTAATTTTGTTGGCAATTTAATTTATTGATTTCTAATAAAAT 1190

 $1191 \ \textbf{TAAGCGTTTTACTCGTACAATATGCGAGTAGGTAGATAAA} \ 1230$

Na caixa verde, evidencia-se o motivo da família CDK; em vermelho, o *T-Loop* e em amarelo, o sinal de poliadenilação. Fonte: Martens, 2011

																			Ļ	↓	
X. laevis	1	MEGIAARGVD	VRSRAKQYE	K LDFLGEGQ	FA TVYKARDKN	T D-RIVAIKK	KLGHRAEAND	GINRTALRE	I KLLOELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLVFDF	METDLEVIIK	DTSLVLTPAH	IKSYMLMTLQ	GLEYLHHLWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKSFO	SPNRITHQV	VTRWYRSPEL	189
X. tropicalis	1	MEGIMARGVD	VRSRSKQY	K LEFLGEGQ	FA TVYKARDKN	T D-RIVAIKK	KLGHRAEAKD	GINRTALRE	I KLLQELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLVFDF	METDLEVIIK	DTSLVLTPAH	IKSYMLMTLQ	GLEYLHHLWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKSFO	SPNRIYTHQV	VTRWYRSPEL	189
D. rerio	1	MALD	VKSRAKRYE	K LDFLGEGQ	FA TVYKARDKT	T N-TIVAIKK	KVGHRTEAKD	GINRTALRE	I KLLQELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLVFDY	METDLEVIIK	DTSLVLTPAN	IKAYILMTLQ	GLEYMHNHWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKAFG	SPNRVYTHQV	VTRWYRAPEL	183
A. aegypti	1		MDNRLNRYE	K IDFLGEGQ	FA TVYKARDIE	T N-EIVAVKK	KIGNREEAAD	GINRTALRE	I KLLHELHHEN	IIGLLDVFGH	KSNVSLVFDF	MDTDLEIIIK	DPKILLTPAN	IKSYMIQTLK	GLEYLHHHWI	LHRDLKPNNL	LLSGSGILKI	GDFGLAKFFG	SPNRINTNQV	VTRWYRCPEL	179
C. quinquefasciatus	1															M	LRS		ALIVSTKACV	VTRWYRSPEL	29
A. gambiae	1	ME	ILNRLNRY	K IDFLGEGQ	FA TVYKARDAE	T N-EIVAVKK	KIGNREEAAD	GINRTALRE	I KLLHELQHEN	IIGLLDVFGH	KSNVSLVFDF	MDTDLEIIIK	DPKIILTPAN	IKSYMIQTLR	GLEYLHQHWI	LHRDLKPNNL	LISGTGVLKI	GDFGLAKFF G	SPNRINTNQV	VTRWYRCPEL	181
R. americana	1	M	DAKSIIRYE	K IDFLGEGQ	FA TVYKARDNS	L D-RIVAVKK	KIGSREEAQD	GINRTALRE	I KLLHELEHVN	IIGLLDVFGH	KSNVSLVFDF	MDTDLENIIR	DTKIMLTPAN	IKAYTIMTLQ	GLEYLHLNFI	LHRDLKPNNL	LINSNGILKI	GDFGLAKFFG	SPNRIYTHQV	VTRWYRC PEL	180
D. pulex	1	MHVSRE	REPRLORY	K IEFLGEGQ	FA TVYKAKDTQ	N DNKIVAVKK	KLGSREEARD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>ELKHD</mark> H	IIGLLDVFGH	RSNVSLVFDF	MDTDLEQIIK	DTSIILTPAH	IKAYILMTLQ	GLEYLHLLFI	LHRDLKPNNL	LVDRQGILKL	GDFGLAKSFA	SPTRIYTHQV	VTRWYRC PEL	186
T. castaneum	1		MSNKLTRY	K IEFLGEGQ	FA TVYKARDVE	T D-NIVAVKK	KMGSRQEAQD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>ELHHR</mark> N	VIGLLDVFGH	MSNVSLVFDF	MDTDLEVIIK	DNTIILTTGN	IKAYIIQTLQ	GLDYLHRNWV	LHRDLKPNNL	LVNSNGVLKI	GDFGLAKLYO	SPNRINTHQV	VTRWYRC PEL	179
S. invicta	1			Q	FA TVYKAKDIE	T N-NIVAVKK	KVGSRAEARD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>ELKHD</mark> N	IIGLLDVFGY	KSNVSLVFDF	MDTDLEVIIK	DSNIVLTAAN	IKAYMIQTLQ	GLDYLHFNWI	LHRDLKPNNL	LVNSEGVLKI	GDFGLAKFF G	SPNRINTHQV	VTRWYRAPEL	162
C. elegans	1		MSRRYI	T IKHLGEGQ	FA NVYLAQDLE	S G-ECVAIKK	KLGSREEAKD	GINRTAIRE	I KLLKEIHHD N	IIGLRDVIGH	RTSIQLVFDF	MDTDLEHVIK	DKEIILMPAH	IKNITMQMLL	GLEFLHVHWI	LHRDLKPNNL	LMNKMGRVKL	TDFGLARFFG	SPNRNYTHQV	VTRWYRAPEL	176
H. sapiens	1	MALD	VKSRAKRYE	K LDFLGEGQ	FA TVYKARDKN	T N-QIVAIKK	E KLGHRSEAKD	GI <mark>NRTALRE</mark>	I KLLQELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLVFDF	METDLEVIIK	DNSLVLTPSH	IKAYMLMTLQ	GLEYLHQHWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKSFO	SPNRAYTHQV	VTRWYRAPEL	183
D. plexippus	1		MEEPILRYE	K IDFLGEGQ	FA TVYKARDVK	T D-KIVAVKKI	KIGSRLEAQD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>E</mark> LQHIN	LIGLLDVFGQ	KSNVSLVFDF	MDTDLEIVIK	DSSIVLTPAN	VKSYMIMTLK	GLEYLHQNWI	LHRDLKPNNL	LINREGILKI	GDFGLAKAF	SPSRINTHQV	VTRWYRSPEL	179
M. musculus	1	MAVD	VKSRAKRYE	K LDFLGEGQ	FA TVYKARDKN	T N-QIVAIKK	KLGHRSEAKD	GINRTALRE	I KLLQELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLVFDF	METDLEVIIK	DNSLVLTPSH	IKAYMLMTLQ	GLEYLHQHWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKSFO	SPNRAYTHQV	VTRWYRAPEL	183
A. mellifera	1			M	IS NTQIFCIID	I S-EYNTKNPI	GKDSRAEARD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>ELKHD</mark> N	VIGLLDVFGH	KSNVSLVFDF	MDTDLEIIIK	DNNIVLTAAN	IKAYMIQTLQ	GLDYLHYNWI	LHRDLKPNNL	LVNAEGVLKI	GDFGLAKFF G	SPNRINTHQV	VTRWYRAPEL	162
R. norvegicus	1	MAVD	VKSRAKRYE	K LDFLGEGQ	FA TVYKARDKN	T N-QIVAIKK	I KLGHRSEAKD	GINRTALRE	I KLLQELSHPN	IIGLLDAFGH	KSNISLAFDF	METDLEVIIK	DNSLVLTPSH	IKAYMLMTLQ	GLEYLHQHWI	LHRDLKPNNL	LLDENGVLKL	ADFGLAKSFG	SPNRAYTHQV	VTRWYRAPEL	183
B. mori	1		• MEEPTLRYE	K IDFLGEGQ	FA TVYKAKDAK	T D-KIVAVKKI	I KIGSRLEAQD	GINRTALRE	I KLLQ <mark>E</mark> LQHIN	LIGLLDVFGQ	KSNVSLVFDF	MDTDLEIIIK	DNTIVLTPAN	VKAYMIMTLK	GLEYLHQNWI	LHRDLKPNTL	LINREGILKI	GDFGLAKAFG	SPTRINTHQV	VTRWYRAPEL	179
D. melanogaster	1	MLPN	ANDKTERY/	K LSFLGEGQ	FA TVYKARDTV	T N-QIVAVKK	KKGSREDARD	GINRTALRE	I KILQELQHEN	IIGLVDVFGQ	LSNVSLVFDF	MDTDLEVIIK	DNKIILTQAN	IKAYAIMTLK	GLEYLHLNWI	LHRDLKPNNL	LVNSDGILKI	GDFGLAKSFG	SPNRIYTHHV	VTRWYRSPEL	183
X. laevis	190) LFGARMYGVG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T RIFETLGTP	EEQWPGMSSL	PDYVAFKSF	P G-TPLHLIFI	AAGDDLLELL	QGLFTFNPCA	RCTASQALRK	RYFSNRPAPT	PGNLLPRPNC	SIEALKEQ	QNLNLGIK	RKRTEG-MDQ	KDIAKKLS	F- 352		
X. tropicalis	190) LFGARMYGVG	VDMWAVGC3	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T RIFETLGTP	EEQWPGMSSL	PDYVAFKSF	P <mark>G-TPLHHIF</mark> I	AAGDDLLELL	QGLFTFNPCA	RCTASQALRK	RYFSNRPAPT	PGSLLPRPNC	SVEALKEQ	QNLNLGIK	RKRTEG-MDQ	KDIAKKLN	F- 352		
D. rerio	184	LFGARMYGVG	VDMWAVGC3	L AELLLRVP	FL AGDSDLDQL	T KIFEALGTP	r DEIWPGMSSL	PDYVSFKPF	P G-TPLEHIFS	AAGDDLLELL	RGLFTYNPCS	RTTAMQALKM	KYFSNRPGPT	PGPQLPRPNS	STEALKEK-	ENLLIGIK	RKR-DS-IEQ	GTLKKKLV	F- 345		
A. aegypti	180) LFGARQYGTG	VDIWAVGC	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	T RIFQVMGTP	C DENWPDVKSL	PDFVQYKHF	P P-IPLRDIFT	AASDDLLDLA	NKLLALYPLH	RCTCTEALKM	PYFSNKPAPS	IGSKLPMPAS	YYAGT-KD	-KEDKQPTLK	RKLAET-VDG	GTLPKRLQ	F- 342		
C. quinquefasciatus	30	LFGARQYGVG	VDIWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	T RIFQVMGTP	EENWPDVKSL	PDYVQYKQF	P P-IPLRDIFT	AAGDDLLDL I	YKLLALYPLN	RCSCTDALKM	PYFSNKPAPT	VGDKLPMPAS	YHAGVNKDAA	S KEDK GPTL K	RKLPDS-VDG	GTLPKRLQ	F- 196		
A. gambiae	182	2 LFGARQYGIG	VDIWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	T RIFQVLGTP	ETNWPDVKSL	PDYVQYKFY	P P-IPLRDIFT	AASDDLIELA	NKMLALYPL	RCSCTEALKM	AYFSNKPAPT	VGPRLPMPAS	YNAANSKP	EEK-PSLK	RKLLDS-IDG	GTVPKRLQ	F- 343		
R. americana	181	L LFGARQYNVG	VDIWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T KIFQALGTP	EENWPDVKLL	PDYMLFKSF	P <mark>G-TPLQHIF</mark> T	AAPNDLLQLL	EKLLALCPCN	RCTCTEALNM	PYFSNKPAPT	VGEKLPMPST	CIQLEERQ	TNLK	RKITSS-DGG	TMLKKRLQ	F- 339		
D. pulex	187	LFGARMYGTG	VDVWAVGC3	M AELLLRLP	FL PGESDLDQL	T RIFTTLGTP	EENWPGLLSL	P D FVQF K AF	P V-IPMRHIFT	AAGDDLLQLL	SRFLALHPLD	RCTCSEALQM	PYFSNKPAPA	PGSSLPLPAS	LSQAAVDK	SGTK	RKVTDN-GEG	GSLAKRLV	′ <mark>F</mark> - 345		
T. castaneum	180) LFGAKLYSTG	VDMWAVGC3	L AELLLRVP	LF PGESDLDQL	T KIFAVFGNP	F EENWPGLKSL	SDYVEFKPF	Г P-IPLKNIFT	AAGDDLLDVL	EGLLVLNPLK	RFECSKCLAM	PFFSNKPAPT	PGSKLPLPQN	IRKTEV	<mark>ER</mark> PTLK	RKLLDA-VEG	GSLSKRLF	F- 338		
S. invicta	163	B LYGARLYGTA	IDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	T KIFQTLGTP	F EETWPGMTEL	PDFIQFKPF	P G-MPLKHIFT	AAGDDLLDLI	ASFLNVNPLE	RCTCDQALQM	PYFSNRPAPT	EGPKLPLPTT	IKRQRE	EK PSLK	RKLLES-IEG	ASLAKRLQ	F- 321		
C. elegans	177	LFGARSYGVG	IDIWSVGCI	I AELLLRNP	IF PGESDIDQL	V KIFNILGCP	F PETWPNMTEM	NSYVI IKPQ	T EYMALNYYFS	AAPQDLLDLM	AGMWTFDPIK	RLTCTQSLQM	EYFRTQPFCC	LDEELPLPKK	QQPQKR	S	RRLDDD	GTRP-VRRLN	FD 330		
H. sapiens	184	LFGARMYGVG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T RIFETLGTP	EEQWPDMCSL	PDYVTFKSF	P G-IPLHHIFS	AAGDDLLDLI	QGLFLFNPCA	RITATQALKM	KYFSNRPGPT	PGCQLPRPNC	PVETLKEQ	SNPALAIK	RKRTEA-LEQ	GGLPKKL1	F- 346		
D. plexippus	180) LFGARQYGTG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	S RIFQVFGTP	F EEIWPGMKTL	TDYVQYKQF	P A-QQLRHIFS	AAADDLIQLL	ESLLALYPPR	RCDCTQALMM	PYFSNKPAPS	FGPKLPMPSN	VTKIEVEK-	PSLK	RKLLDN-IDG	GSLAKRLG	F - 338		
M. musculus	184	LFGARMYGVG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T RIFETLGTP	EEQWPDMCSL	PDYVTFKSF	P G-VPLQHIFI	AAGDDLLELI	QGLFLFNPCT	RTTASQALKT	KYFSNRPGPT	PGCQLPRPNC	PVEALKEP	ANPTVATK	RKRAEA-LEQ	GILPKKLI	F- 346		
A. mellifera	163	B LYGARLYGTG	IDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	T RIFQTLGTP	F EETWPGMTEL	PDFIQFKPF	P G-TPLKHIFT	AAGDDLLDLI	ASLLNVNPLE	RCTCDQALQM	PYFSNKPAPT	PGLRLPLPTS	VKRQPE	EKPSLK	RKLLES-MDG	ASLAKRLQ	F- 321		
R. norvegicus	184	LFGARMYGVG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGDSDLDQL	T RIFETLGTP	EEQWPDMCSL	PDYVTFKSF	P G-IPLQHIFI	AAGDDLLELI	QGLFLFNPCT	RITASQALRT	KYFSNRPGPT	PGCQLPRPNC	PVEALKEQ	SNPAMATK	RKRAEA-LEQ	GILPKKLI	F- 346		
B. mori	180	D LFGARQYGTG	VDMWAVGC]	L AELLLRVP	FL PGESDLDQL	S RIFQVFGTP	EENWPGMKTL	TDYVQFKLF	P A-QELRHIFS	AASEDLIFLL	ESLLALYPPN	RCDCTQALQM	AYFSSKPAPS	VGPKLPMPSN	ISKLEVEK-	PSLK	RKLLDN-IDG	GSLAKRLG	F- 338		
D. melanogaster	184	LFGARQYGTG	VDMWAVGC]	L AELMLRVP	FM PGDSDLDQL	T RIFSTLGTP	r eae wPhLS k L	HDYLQFRNF	P G-TPLDNIFT	AAGNDLIHLM	QRLFAMNPLR	RVSCREALSM	PYFANKPAPT	VGPKLPMPSA	ILAAKEGANP	QTGDTKPALK	RKLVETTVRG	NGLAQKKRLQ	F− 353		

Figura 14 – Alinhamento de sequências de CDK7 de Rhynchosciara comparada com a sequência de homólogos disponíveis em banco de dados (NCBI)

Notar em amarelo o domínio da proteína CDK7. As setas identificam as treoninas em que ocorrem as fosforilações na proteína. Os traços na região carboxi-terminal evidenciam o sinal de localização nuclear (NLS). Fonte: Martens, 2011





Tracejado evidenciando o domínio serina-treonina quinase característico da família; sítios de interação tridimensional para formação do complexo ciclina/CDK (em rosa) e o sítio de ativação da proteína *A-Loop* (em azul), chamado de *T-Loop* em CDKs devido à ativação ser em uma treonina. Fonte: Martens, 2010

A partir de uma análise bioinformática no software MEGA 5 (Tamura et al., 2011), foi realizada uma análise filogenética comparando a sequência proteica de CDK7 de *R. americana* com as sequências de CDK7/CAK1 de outros organismos disponíveis em banco de dados internacional (Figura 16). Como esperado, *R. americana* ficou agrupada com os outros dípteros.



Figura 16 – Árvore filogenética

Comparação entre a sequência proteica de CDK7 com as sequências de CDK7/CAK de outros organismos disponíveis em banco de dados internacional (NCBI). Árvore construída no dia 30/11/2011. Fonte: Martens, 2011

4.2 Níveis de expressão dos transcritos

Após a obtenção do cDNA completo de cdk7, foi realizada uma análise de RT-PCR para verificar a presença do transcrito em diferentes tecidos, sendo eles: ovo, larva de 1 dia (todos os tecidos), ovário, testículo, corpo gorduroso e glândula salivar (Figura 17). Por não se tratar de uma análise quantitativa, não é pretendido relacionar a intensidade da banda com a quantidade de mRNA presente no tecido, sendo verificada somente a presença do transcrito em cada tecido. Como se pode ver na figura 17, a mensagem é encontrada em todos os tecidos analisados, mesmo em ovários e testículos, que apresentaram um sinal muito fraco, porém detectável.





MM: Marcardor Molecular 1Kb; 1DL: Larva de um dia; Ovar: Ovário; Test: Testículos; CG: Corpo gorduroso; GS: Glândula salivar. Fonte: Martens, 2009.

Foram realizados experimentos de PCR em Tempo Real para determinar os níveis de expressão do mRNA de cdk7 durante o desenvolvimento larval em diferentes tecidos (glândula salivar, corpo gorduroso e ovário) de *Rhynchosciara americana*, revelando diferenças nítidas no desenvolvimento de cada tecido.

4.2.1 Nível de expressão em glândula salivar

No perfil de expressão de mRNA em glândula salivar (Figura 18), foi analisada a expressão de cdk7 entre os pontos de segundo período e o período em que há a regressão do pufe de DNA C3, todos dentro do guarto estágio de desenvolvimento larval. A partir dessa análise, percebe-se um nível de expressão regular durante o início do 4° estágio até a fase de início de rede, atingindo um pico na fase B, que apresenta amplificação e expansão máxima do pufe B2 (Santelli et al., 2004), uma leve diminuição no fim da fase B e um novo pico ainda maior na transição dos estágio B e C, com uma amplificação cinco vezes maior que em segundo período, sendo que o leve declínio encontrado no fim da fase B ainda se encontra com nível de expressão maior que em segundo período. Na fase C, há a amplificação de vários pufes, como C3 e C8 (Frydman et al., 1993; Glover et al., 1981; Santelli et al., 1991). Isso é condizente com o fato de que a expressão de cdk7 pode estar diretamente relacionada ao nível de amplificação cromossômica nesse período. Após a transição entre B e C, há uma regressão da expressão de cdk7 a níveis próximos aos do segundo período. No inserto, é mostrada a curva de melting para a reação, evidenciando a especificidade dos primers.

4.2.2 Nível de expressão em corpo gorduroso

No perfil de expressão de corpo gorduroso (Figura 19), analisado entre o segundo período e a fase de pupa, pode-se observar a presença de dois picos, um na fase de Início de Rede e um na fase de Pré-Pupa, separados por uma diminuição consistente na expressão durante as fases B e C, período em que há a amplificação dos pufes de DNA na glândula salivar. Ambos os picos parecem estar relacionados com um aumento da atividade transcricional do tecido. O Início de Rede é a fase em que as larvas param de comer e precisam começar a secretar o casulo comunal, o que demanda uma grande quantidade de energia, tornando necessário queimar as reservas de energia do corpo gorduroso. Já o pico em Pré-Pupa pode ser uma consequência da reorganização do tecido durante a metamorfose, envolvendo uma histólise quase completa. Entretanto, nos períodos de expansão máxima dos pufes,

ao contrário do que foi encontrado em glândula salivar, há uma grave diminuição da expressão de cdk7, levando-nos a inferir que, neste tecido, a necessidade dessa proteína seja mais direcionada ao aspecto transcricional do que de regulação do ciclo celular. No inserto, mostra-se uma curva de *melting* da reação, que permite avaliar a especificidade dos *primers*.

4.2.3 Nível de expressão em ovário

Apesar de as diferenças entre o perfil de expressão de glândula salivar e corpo gorduroso serem visíveis, os níveis de expressão em ovário (Figura 20) foram surpreendentes. Dentre os períodos analisados (segundo período e pupa), verificouse um *plateau* durante boa parte do desenvolvimento ovariano na fase larval, com flutuações muito leves. Porém, na fase de pré-pupa, obteve-se um pico com um aumento de quase 25 vezes, quando comparado com o segundo período, e uma grande regressão na fase de pupa que, ainda assim, apresentou um nível de expressão quase oito vezes maior que no segundo período. No inserto, há uma curva de *melting*, que permite avaliar a especificidade dos *primers* da reação.



Figura 18 - Expressão de cdk7 em glândula salivar

RT-PCR em tempo real de cdk7 em glândula salivar. 2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; B/C: Transição entre B2 e C3; C: Período de expansão do pufe C3; C/B10: Transição entre C3 e B10; Post C: Período posterior à retração do pufe C3. No inserto, visualiza-se a curva de *melting* da reação. Fonte: Martens, 2009.



Figura 19 – RT-PCR em tempo real de cdk7 em corpo gorduroso.

2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3. No inserto, visualiza-se a curva de *melting* da reação. Fonte: Martens, 2009



Figura 20 – RT-PCR em tempo real de ovário.

2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3. No inserto, visualiza-se a curva de *melting* da reação. Fonte: Martens, 2009.

4.3 Níveis de expressão de proteína

Uma vez que a CDK7 de *Rhynchosciara americana* apresentou 82% de similaridade com o homólogo de *Drosophila melanogaster*, nós decidimos usar anticorpos comerciais para identificar essa proteína em vários experimentos. Foram usados dois anticorpos policlonais anti-CDK7 de *Drosophila melanogaster* (CDK7-dv15 e CDK7-ds17, Santa Cruz Biotechnology, EUA), que se ligam a uma sequência peptídica próxima ao domínio C-terminal da proteína. Experimentos preliminares de *western blot* foram realizados para verificar a especificidade de ambos os anticorpos adquiridos. Essa análise mostrou que os dois anticorpos reconheceram uma proteína com peso molecular compatível com o tamanho esperado de CDK7 de *R. americana* (aproximadamente 35 kDa) e que o anticorpo anti-CDK7 ds17 permitia o uso de diluições maiores, apresentando melhor performance nos experimentos de *western blot*.

4.3.1 Expressão proteica em glândula salivar

O nível de expressão proteica de CDK7 de *R. americana* em glândula salivar foi analisada em dois grupos diferentes, sendo que o primeiro grupo (Figura 21) compreende as fases entre o segundo período e a fase C (em que há expansão máxima do pufe C3); já o segundo grupo (Figura 22) teve analisadas as fases entre o segundo período e pupa. O controle de *loading* utilizado para o primeiro grupo foi a β -actina e do segundo grupo foi β -tubulina, ambas proteínas constitutivas de construção do citoesqueleto e, portanto, com expressão constante durante as fases analisadas. Os dois grupos analisados, quando corrigidos com a expressão das proteínas constitutivas, apresentam as mesmas condições: um aumento da expressão em início de rede, quando comparado com segundo período, e a manutenção dessa expressão durante todo o desenvolvimento larval, até a fase de pupa. Figura 21 – Western blot de CDK7 em glândula salivar.



O controle de carregamento de amostra foi realizado com β-actina. 2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3. Fonte: Martens, 2010.

Figura 22 – Western blot de CDK7 em glândula salivar.



O controle de carregamento de amostra foi realizado com β-tubulina. 2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3; PP: Pré-Pupa; P: Pupa. Fonte: Martens, 2010.

4.3.2 Expressão proteica em corpo gorduroso

A expressão proteica de CDK7 em corpo gorduroso (Figura 23) foi analisada entre as fases de segundo período e pupa. Como controle de *loading*, foi utilizada a marcação da proteína Hsp70, uma vez que os controles usuais (β-actina, β-tubulina, α-tubulina) não apresentaram um padrão confiável (dados não mostrados). Embora a expressão de CDK7 em corpo gorduroso pareça constante, quando corrigida pela

expressão de Hsp70, percebe-se que há um aumento da concentração da proteína em início de rede, quando comparado com segundo período, e essa concentração se mantém durante o desenvolvimento larval até a fase de pupa.

Figura 23 – Western blot de CDK7 em corpo gorduroso.



O controle de carregamento de amostra foi realizado com Hsp70. 2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3. PP: Pré-Pupa; P: Pupa. Fonte: Martens, 2011.

4.4 Modificações pós-traducionais

Análises bioinformáticas no software Compute pl/Mw mostraram, a partir da tradução conceitual do mRNA de cdk7, um peso molecular predito de 38.5 kDa e um pl predito de 8.08. Experimentos de *western blot* em 2D de extratos de glândula salivar revelaram a presença de diferentes isoformas de CDK7 de *R. americana*, cujas concentrações relativas variam durante o desenvolvimento (Figura 24). Uma série de experimentos foi realizada para cinco pontos do desenvolvimento larval (2P, IR, B, C e Pré-Pupa). Os *western blots* em 2D foram quantificados usando o ImageScanner III e o software ImageMaster (GE Life Sciences, Alemanha). Conforme visto na figura 24, à direita, os *immunoblots* em 2D mostram uma variação nas concentrações das diferentes isoformas, que apresentam pl entre 8.0 e 7.4. Nessas análises, pode-se delimitar uma estrutura mais constitutiva, formada pelos *spots* A e B – próximos do pl 8.0 – e outros quatro *spots* (C, D, E e F), com pls mais baixos, chegando a 7.4. Quando plotados em gráfico (Figura 24, à esquerda), as concentrações das isoformas apresentam uma tendência que se altera durante o

desenvolvimento, apresentando quase 100% de isoformas A e B no segundo período, com um início no deslocamento das concentrações em início de rede que atinge seu máximo na fase B, em que somente 60% do total de isoformas correspondem às isoformas A e B. Na fase C, já é restabelecida a condição prevalente das isoformas A e B, que se mantém durante a fase de pré-pupa.



Western blots à direita evidenciando *spots* em diferentes fases do desenvolvimento larval de *R. americana*. Os *spots* estão distribuídos entre os pls 8.0 e 7.4 e seus números variam entre 2 e 5 *spots*. À esquerda, gráfico representando as porcentagens de cada isoforma (Spots) nos diferentes estágios do desenvolvimento. 2P: Segundo Período; IR: Início de Rede; B: Período de expansão do pufe B2; C: Período de expansão do pufe C3; PP: Pré-Pupa. Fonte: Martens, 2011.

4.5 Ensaios de fosfatase

A fim de verificar qual a proporção das isoformas estaria relacionada a fosforilação, foi realizado o tratamento de extratos totais de proteína de glândula salivar de *R. americana* em início de rede, ponto em que foram encontrados os maiores números de isoformas (Figura 24). Como se pode visualizar na figura 25, é nítida a diminuição da área total do *spot* e uma considerável regressão no pl dos *spots* marcados, sendo que aqueles *spots* que se encontravam no limite inferior de pl, correspondendo a uma fosforilação, praticamente sumiram após o tratamento com a enzima. Esses resultados são consoantes com o fato de que o tratamento com a enzima fosfatase promove a remoção dos grupamentos fosfato e, assim, restabelece o ponto isoelétrico da proteína a um estado não-fosforilado. Entretanto, não foi possível a distinção de 5 pontos com diferentes pls, como foi possível na análise de *western blot* em 2D, o que limita as possibilidades de interpretação quanto às isoformas presentes e os tipos de modificações pós-traducionais a que foram submetidas.



Figura 25 – Análise de *western blot* em 2D em glândula salivar e corpo gorduroso

Análise de *western blot* em 2D em glândula salivar e corpo gorduroso com e sem o tratamento com fosfatase. Os *spots* foram plotados em gráficos para a verificação do percentual de cada isoforma. Fonte: Martens, 2011.

4.6 Imunolocalização

Foram realizados ensaios de imunolocalização em ovário para verificar a localização celular da proteína CDK7, com o anticorpo primário anti-CDK7 dv15 e secundário marcado com fluoresceína. Para marcação do DNA foi usado iodeto de propídeo. Na figura 26, pode-se visualizar a presença de CDK7 no citoplasma das células foliculares e uma marcação intensa no citoplasma da célula *nurse*. Para confirmar a localização celular da proteína, foi realizado um corte ortogonal de um par de ovaríolos (Figura 27), com um corte horizontal passando exatamente sobre o núcleo do ovócito e um corte vertical passando pelo núcleo da célula *nurse*. O gráfico apresenta a intensidade de fluorescência emitida em vermelho (DNA) e verde (CDK7) no perfil. Notar que no núcleo (pico vermelho) o sinal de CDK7 não passa da intensidade de 50, abaixo da qual se considera ruído. Isso confirma a localização exclusivamente citoplasmática de CDK7.



Figura 26 - Imunolocalização de CDK7 em ovário de Rhynchosciara americana.

Microscopia confocal de varredura a laser de ovaríolos de pupas jovens mostrando a localização de CDK7 (verde) e DNA (vermelho). São apresentados os dois canais separados e no terceiro quadro ambos os canais em sobreposição. Secções ópticas mostradas são das células foliculares. Fonte: Martens, 2011.



Figura 27 - Imunolocalização de CDK7 em ovário de Rhynchosciara americana.




5.1 Sequências de cdk7

Foi construída por nosso grupo uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de Rhynchosciara americana na fase inicial do último ciclo de endoreplicação (Início de Rede). Essa análise gerou 7108 reads de extremidade 5' e 1085 reads de extremidade 3', resultando em 8193 ESTs oriundos de diferentes clones. A reunião desses reads resultou em 846 contigs e 1734 singlets, totalizando 2580 sequências únicas, sendo que a média da sequência de leitura dos ESTs foi de 778 pb. Como Rhynchosciara americana apresenta tamanho do genoma e características similares a Drosophila, estima-se que esse banco cubra aproximadamente 13% dos transcritos e 17% dos genes codificantes de R. americana. Como esperado, os organismos mais similares à maior parte dos grupos de ESTs foram Drosophila melanogaster (5.6%) e Anopheles gambiae (3.4%) com identidade média de 84% em ambos os casos. Os ESTs gerados foram categorizados usando os termos do Gene Ontology (The Gene Ontology Consortium, 2000), que provém um vocabulário estruturado para descrever a seguência de acordo com função molecular, processo biológico e componente celular, promovendo uma visão acurada dos eventos em processo na glândula salivar durante o dado estágio (Siviero et al., 2006).

Dentre as sequências encontradas, poucas mensagens puderam ser direta ou indiretamente relacionadas ao ciclo celular, correspondendo a 3,11% de todos os ESTs, dentre elas cdc2-*like* (cdk10) e cdk7, com nenhuma outra CDK ou ciclina encontrada, mesmo Ciclina E ou CDK2, já descritos como reguladores de endociclo em *Drosophila* (Calvi et al., 1998; Follette et al., 1998; Lee e Orr-Weaver, 2003). CDK7, em metazoários, tem dois papéis com funções sobrepostas: pode atuar como uma Quinase Ativadora de CDKs (CAK), quando em complexo trimérico (CDK7/Ciclina H/MAT1), e também pode fazer parte do complexo geral de transcrição TFIIH, fosforilando o Domínio Carboxi-Terminal (CTD) da RNA Polimerase II (Fisher, 2005). A partir do EST encontrado (Clone Rasgsc6836), correspondente a cdk7 e contendo 761 pb, foram realizados os experimento de RACE 3' e 5', respectivamente.

Para o experimento de RACE 3', foram usados dois *primers* orientados na direção 3', o primeiro mais interno à sequência (CDK7-3RACE2) e o segundo mais externo (CDK7-3RACE1). Esta reação foi muito mais simples, pois se aproveita do

fato de a maioria dos mRNAs apresentarem uma cauda poli-A, sendo necessário realizar somente as duas PCRs para obter a sequência faltante a 3'. A partir do sequenciamento do produto de PCR da RACE 3', obteve-se uma sequência de 854 pb, atingindo a cauda poli-A desse mensageiro. Já a RACE 5' foi um pouco mais complicada, pois antes das PCRs propriamente ditas, deve haver a adição de algum sítio a montante que seja reconhecido por um *primer*, uma vez que não se sabe qualquer sequência da região 5'. Para tanto, foi realizada uma poliadenilação da sequência na região 5', reconhecida pelo mesmo *primer* já fornecido pelo fabricante do kit para a reação de RACE 3'; então foram realizadas três reações de amplificação com os *primers* CDK7-inv-L, CDK7-5RACE2 e CDK7-5RACE1, respectivamente. A partir do sequenciamento da reação de RACE 5', obteve-se uma sequência de 1230 pares de bases. Quando analisada em um software de identificação de ORFs (ORF Finder), verificou-se que a ORF desse transcrito compreende 1020 pb.

Após obter a sequência completa do mensageiro de cdk7, o próximo passo era conseguir a sequência genômica completa. Para tanto, foram desenhados *primers* nas regiões mais externas da sequência do transcrito (gCDK7-3 e gCDK7-5) orientados internamente. A partir de PCRs e posterior sequenciamento, obtivemos uma sequência de 1604 pb. Quando sobrepostos, a sequência genômica e o mRNA, mostraram que a sequência genômica de cdk7 apresenta 4 éxons contendo 59, 99, 263 e 708 pb, respectivamente. Os íntrons continham sequências consenso GT-AG nos sítios de *splicing*. Curiosamente, em *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*, seus genes CDK7/CAK1 possuem somente 2 éxons, com um pequeno íntron de aproximadamente 60 pb. O primeiro éxon do gene nesses organismos é muito similar ao éxon 1 de cdk7 de *R. americana*, até mesmo codificando a mesma porção inicial da proteína. Por outro lado, em vertebrados os genes correspondentes podem atingir 5 kb e conter até 12 éxons.

A partir da sequência do ORF do mRNA, foi realizada a tradução conceitual da mensagem, apresentando uma proteína contendo 339 aminoácidos. A sequência apresentou o motivo característico da família de CDKs (PSTAIRE) que, em CDK7, é NRTALRE. Esse motivo é altamente conservado entre as espécies, como pode ser verificado na figura 14, em que o domínio é idêntico em todas as espécies

estudadas, desde *C. elegans* até *H. sapiens*, exceto *Culex quinquefasciatus*, que apresentou uma sequência muito mais curta que os outros organismos, com 196 aminoácidos, enquanto as sequências dos outros organismos variavam entre 321 e 353 aminoácidos. Além disso, foram encontradas as treoninas necessárias para a ativação da proteína nas posições 167 e 172 (em *Rhynchosciara americana*), sendo que a Thr167 é fundamental na ativação da proteína.

Comparando a proteína CDK7 de *R. americana* e seus homólogos mais próximos, verificou-se uma alta similaridade com CAK1 (*CDK-Activating Kinase 1*) de *Aedes aegypti*, com 77% de identidade e 9% de substituições conservativas (Score: 527, E-value: 7e-148). Com *Drosophila melanogaster*, viu-se 72% de identidade e 10% de substituições conservativas. A CDK7 de *R. americana* é menor que seus homólogos, que podem apresentar 360 aminoácidos. Como esperado, CAK1/CDK7s são altamente conservadas, principalmente entre os aminoácidos 50 e 244, porção que contém o motivo característico da família e a maior parte dos sítios ativos dessas proteínas. Mesmo em organismos evolutivamente distantes de *Rhynchosciara*, como *zebrafish* e humanos, a similaridade foi de 82%.

Em uma análise de filogenia usando o método de *Maximum Likelihood*, mostrado na figura 16, nota-se claramente que essas proteínas se segregam em dois grupos, vertebrados e invertebrados, com *C. elegans* como um grupo externo, como esperado. CDK7 de *R. americana* permaneceu agrupada entre os dípteros, devido a sua grande similaridade.

5.2 Expressão de cdk7 durante o desenvolvimento larval

A partir dos dados obtidos em relação à presença da mensagem de cdk7 em diferentes tecidos (Figura 17), foi realizada a análise do perfil de expressão do mRNA de cdk7 em três diferentes tecidos durante o desenvolvimento larval do inseto: glândula salivar, corpo gorduroso e ovário. Todos os pontos estudados se encontram dentro do quarto estágio do desenvolvimento larval de *R. americana*, pois é nesse período que ocorrem as mais intrigantes alterações moleculares no modelo.

O perfil de expressão em glândula salivar mostrou, como visto na figura18, um nível de expressão da mensagem com dois picos no início das fases de maior amplificação gênica, sendo que o maior dos picos apresentou uma expressão cinco vezes maior que em segundo período. Durante a fase C (fase de expansão máxima do pufe C3), verifica-se uma regressão a níveis de expressão mais baixos que em segundo período, mantidos até o fim do período analisado. É importante notar também os processos fisiológicos que permeiam todas essas alterações moleculares: a glândula salivar é um tecido de função fundamental no desenvolvimento larval de R. americana, apresentando aproximadamente 1.5 vezes o tamanho da larva. É também o principal órgão para a secreção de proteínas relacionadas à construção do casulo comunal (Winter et al., 1977), sendo que, em início de rede, esse tecido começa a ser mobilizado para a construção de uma tênue rede sobre o grupo e posterior adensamento dessa rede e, na fase de expansão do pufe C, ocorre um enrijecimento de toda essa estrutura, que permanece relativamente estática até quando as moscas adultas emergem. Além da alta demanda sintética que ocorre durante o desenvolvimento larval, é importante levar em consideração que esse tecido é exclusivamente larval nesse inseto, sendo que no adulto esse órgão inexiste. Assim sendo, no fim do último instar do desenvolvimento larval, esse tecido passa por um processo de involução e regressão até desaparecer no fim da fase de pupa, sendo inexistente no adulto (Brandão, 2011).

Diferente da glândula salivar, que desaparece no organismo adulto, o corpo gorduroso permanece durante a fase seguinte, porém sua organização se torna completamente diferente. Na fase larval, o tecido apresenta-se como uma estrutura folhosa, composta por uma única camada de células, distribuída paraxialmente ao tubo digestivo. Apresenta função de biossíntese e mobilização de reservas energéticas na forma de gordura e glicogênio, além de desempenhar papel fundamental no metabolismo intermediário do organismo, como metabolismo de lipídios e carboidratos, síntese de aminoácidos e proteínas e metabolismo de nitrogênio, além de participar ativamente na síntese de proteínas do vitelo (Arrese e Soulages, 2010). Durante a fase final do desenvolvimento larval, o tecido perde sua continuidade e começa a promover uma histólise, deixando-o frágil e quebradiço, passando por um intenso processo de remodelação (Nelliot et al., 2006). Em *Rhynchosciara*, durante a fase de Pupa, há uma reorganização das células remanescentes em pequenas ilhotas (Brandão, 2011). No adulto, essas ilhotas se

encontram dispostas no abdome, que é ocupado em sua quase totalidade pelas gônadas. Isso justificaria o deslocamento dos picos no perfil de expressão de cdk7 em corpo gorduroso (Figura 19) quando comparado com o perfil de glândula salivar. Enquanto na glândula salivar, a mensagem parece estar relacionada com o grau de amplificação gênica do tecido, os picos de expressão em início de rede, que chega a três vezes em relação ao segundo período, e em pupa um pouco menor, parecem sugerir uma demanda diferente dessa mensagem. Isso se torna mais evidente ao analisar as fases em que há uma grande amplificação gênica (B e C); nessas fases, vê-se uma intensa diminuição na expressão dessa mensagem, chegando a quase um guarto do encontrado em segundo período. Conforme mencionado anteriormente, o início de rede e a fase de pupa apresentam alta atividade transcricional, tanto para o início da síntese das proteínas do casulo quanto para a reorganização do tecido para a transição entre a vida larval e adulta e maturação dos ovários. Interessantemente, enquanto em Drosophila o tempo entre a parada de alimentação da larva até o início da alimentação do adulto jovem é de no máximo 32 horas (Aguila et al., 2007), Rhynchosciara pára de comer na fase de início de rede e permanece nessa fase não-allimentada por um período de até 7 dias.

Já em ovário (Figura 20), o perfil de expressão apresenta-se ainda mais interessante. Durante quase todo o desenvolvimento larval, o nível de expressão se mantém estável; entretanto, na fase de pré-pupa, ocorre um aumento de guase 25 vezes na expressão de cdk7 em relação ao segundo período e uma grande regressão na fase de pupa. Essa alteração descomunal é consistente com o aumento no nível de mitoses das glândulas foliculares dos ovos, pois durante boa parte do desenvolvimento larval de R. americana, o ovário pouco cresce em volume, sofrendo um boom na metade da fase de pupa (Basile, 1969; Basile, 1979). É interessante notar que durante a ovogênese de Drosophila, as células foliculares apresentam um alto nível de amplificação de genes coriônicos antes do início da síntese de mRNA, levando a um nível muito maior de expressão quando comparado com um gene regular (Spradling, 1981). Esse processo é extremamente importante para a biosíntese do córion, tornando possível sintetizar uma grande quantidade de proteínas do córion em um curto período de tempo. Para tanto, a amplificação de clusters de genes coriônicos presentes nos cromossomos X e 3 podem atingir até 15-20 e 60-80 vezes, respectivamente (Calvi et al., 1998). Devido à proximidade evolutiva, a maior parte dessas descobertas poderia ser extrapolada para o desenvolvimento ovariano de *Rhynchosciara americana* e possivelmente explicariam os resultados encontrados para os altos níveis de expressão neste tecido depois da fase de Pré-Pupa.

Após a análise do perfil de expressão de mRNA nesses três tecidos, foram realizadas análises do perfil de expressão protéica em dois tecidos: glândula salivar e corpo gorduroso, uma vez que mRNAs podem passar por regulações póstranscricionais. A análise do perfil protéico de CDK7 em ovário não foi realizada devido à dificuldade de obtenção de material suficiente, pois durante boa parte do desenvolvimento larval, os ovários apresentam um volume muito pequeno, crescendo consideravelmente apenas próximo ao fim da fase de pupa (Baslie, 1979).

Para a análise do perfil de expressão protéica de CDK7 em glândula salivar, foram realizados vários experimentos (dados não mostrados) que apresentaram diferentes situações contraditórias e até mesmo opostas, apresentando desde ablação completa da expressão em Início de Rede e recuperação em B, com um pico de expressão em C; até um pico de expressão em Início de Rede com um leve declínio durante os estágios B e C. A primeira condição encontrada (depleção em IR e recuperação em B e C) é consistente com o perfil de expressão de mRNA em glândula salivar (Figura 18), porém ainda não condizia com o padrão estabelecido em outros metazoários, de que CDK7 apresenta um perfil de expressão estável durante todo o ciclo celular (Fisher, 2005). Assim sendo, as condições encontradas se mostravam tão díspares que seria necessária uma terceira análise para verificar qual das duas situações se apresentava mais próxima da realidade.

Em uma terceira condição encontrada (Figura 21), o grupo analisado parece apresentar um aumento da concentração da proteína em Início de Rede, quando comparado com 2° Período, mantendo a partir daí um nível estável até o fim do desenvolvimento larval. Outro experimento, com certa distância no tempo de realização, mostrou condições similares às encontradas no terceiro grupo (Figura 22), com um leve aumento no Início de Rede e posterior estabilização da expressão. O panorama proteico encontrado em glândula salivar foi bem diferente ao encontrado no perfil de expressão de mRNA (Figura 18), que apresentava picos nas fases B e C, o que pode ser resultado de regulações pós-transcricionais. Entretanto, os resultados são consoantes com o fato de que CDKs não apresentam flutuações nos níveis proteicos durante o ciclo celular, como acontece com as ciclinas.

A expressão proteica de CDK7 em corpo gorduroso (Figura 23) apresentou as mesmas condições temporais que em glândula salivar: um leve aumento em início de rede e manutenção desse nível durante todo o desenvolvimento larval até a fase de pupa. A normalização do perfil de expressão proteica em corpo gorduroso foi feita em relação à expressão de Hsp70, uma vez que os controles mais usuais (βactina, β-tubulina, α-tubulina) apresentaram um padrão irregular de marcação e foi visto que a proteína Hsp70 apresenta um padrão de expressão constitutiva durante o desenvolvimento larval de *R. americana* (Andrade, 2005).

Embora haja diferenças nítidas entre os perfis de expressão de mRNA de glândula salivar (Figura18) e de corpo gorduroso (Figura 19), os perfis de expressão proteica apresentam uma grande similaridade, o que corrobora a ideia de que essa proteína está submetida a um processo de controle pós-transcricional, bem como a possibilidade de um controle pós-traducional. Entretanto, é importante lembrar que as larvas são coletadas na natureza, apresentando diferentes condições nutricionais e ambientais. Além disso, na análise de todos os tecidos, não se pode ignorar o fato de que, em metazoários, CDK7 está envolvida ativamente tanto em transcrição quando em regulação do ciclo celular, tornando difícil diferenciar as circunstâncias em que cada uma delas ocorre e sua correlação com o aumento da expressão de CDK7.

5.3 Modificações pós-traducionais

Nos ensaios de western blot em 2D, foi possível observar dois conjuntos principais de spots, entre os pls 8.0 e 7.4. Esses valores de pl são compatíveis com o esperado para a forma não-fosforilada e a forma contendo uma fosforilação, entretanto a análise da sequência de aminoácidos prevê 13 sítios passíveis de Durante boa parte do desenvolvimento larval, a maior fosforilação (NetPhos). concentração de isoformas era próximo ao pl 8.0 (spots A e B), correspondentes à forma não-fosforilada, enquanto no máximo 40% do total de spots correspondiam às outras quatro isoformas (C, D, E e F). Enquanto os spots A (pl 8.0) e F (pl 7.4) representam, respectivamente, as formas nativa e fosforilada, as isoformas presentes entre esses dois spots não parecem estar relacionadas com fosforilações, uma vez que a alteração de carga é muito sutil para ser relacionada a fosforilações e praticamente não há alteração de peso molecular nessas isoformas, que seriam geradas em adições de grupamentos pesados. Presume-se que essas leves alterações de carga total da proteína sem alteração do peso molecular estejam relacionadas a modificações na cadeia lateral de alguns aminoácidos ou deaminação de resíduos de glutamina ou asparagina.

Pelo menos uma fosforilação é claramente importante para a regulação da ativação de CDK7, Thr167 em *Rhynchosciara* (a posição do resíduo de treonina pode variar em diferentes animais, ex. Thr170 em *Drosophila* e Thr176 em *Xenopus*). Mutações nessa posição levaram a expressão anormal de alguns genes durante a embriogênese de *Drosophila*, causando malformações (Leclerc et al., 2000). Além disso, essa fosforilação também é parte da regulação da atuação de CDK7 como CAK ou como componente do fator geral de transcrição TFIIH (LaRochelle et al., 2001). Esse endereçamento depende da necessidade da célula e do tecido durante seu desenvolvimento, mas não se pode garantir por esses ensaios se algum dos dois processos está mais ativo.

Para verificar qual a porcentagem do total de *spots* estaria relacionada a fosforilações, foi realizado um ensaio de fosfatase. A enzima fosfatase promove a remoção de grupamentos fosfato, ou seja, após o tratamento das amostras com

fosfatase, as alterações nos pontos isoelétricos seriam restabelecidas a uma condição não-fosforilada em análises em géis 2D. Para tanto, um extrato celular de tecidos em início de rede foi separado em duas alíquotas; foi escolhido esse ponto do desenvolvimento larval por ter apresentado o maior número de *spots* divisáveis (5) dentre os pontos estudados na análise bidimensional (Figura 24 – IR). O pH de ambas as amostras foi ajustado para o pH ótimo de funcionamento da fosfatase ácida (pH = 6.0) e uma das alíquotas foi tratada com fosfatase por 30 minutos a 37 °C (F+) e outra foi incubada sob as mesmas condições sem a adição da enzima (F-). Então, foram realizados experimentos de eletroforese em 2D para essas amostras e posterior *western blotting*, com detecção com o mesmo anticorpo usado para as análises dos perfis de expressão protéica e os experimentos de 2D, sendo realizado em glândula salivar e corpo gorduroso (Figura 25).

Na análise de fosfatase em glândula salivar, é possível notar dois spots: um que compreende os spots A e B e outro que corresponderia ao spot F nas análises anteriores de 2D. A diferença entre a amostra tratada e não-tratada é bem sutil, pois a amostra não tratada já apresentava uma quantidade muito pequena de isoformas além de A e B; ainda assim, a amostra tratada apresentou uma leve diminuição na quantidade do spot F. Interessante notar também que a área total do spot A+B também diminuiu consideravelmente, porém deve-se levar em consideração que se trata de amostras diferentes e de grupos diferentes, com diferentes históricos nutricionais, de estresse, etc; além disso, pode ter ocorrido perda na quantidade total de proteína após o equilíbrio de pH e tratamento com fosfatase. Em corpo gorduroso, é possível notar uma maior quantidade de isoformas na amostra nãotratada, correspondendo aos spots A+B, C, E e F. Do mesmo modo que as amostras de glândula salivar, houve uma diminuição expressiva na área total do spot A+B, enquanto a isoforma C parece sofrer somente uma pequena diminuição. Como esperado, a isoforma F apresentou uma ablação quase completa após o tratamento, acompanhada pela isoforma E, que se limitou a menos de 10% da área da amostra não-tratada. Entretanto, devido ao fato de as amostras desta análise não apresentarem o mesmo padrão de cinco spots como as amostras de início de rede da análise em 2D, não se pode inferir se as isoformas correspondem exatamente àquelas a que relacionamos nas análises em 2D, o que torna difícil uma transposição de interpretações entre a análise em 2D e o tratamento com fosfatase.

5.4 Ensaios de imunolocalização

Foram realizados experimentos de imunolocalização de CDK7 nos três tecidos estudados (glândula salivar, corpo gorduroso e ovário), porém somente a marcação no ovário foi consistente. As grandes dificuldades em estudar os outros dois tecidos são o fato de que, em insetos, a glândula salivar é revestida por uma espessa camada de quitina, sendo que em *Rhynchosciara* ela se apresenta ainda mais espessa, enquanto o corpo gorduroso apresenta auto-fluorescência das gotículas de gordura presentes em suas células de gordura da porção anterior do corpo gorduroso (Nelliot et al., 2006).

Em ovário, a marcação de CDK7 aparecia ubíqua no tanto no citoplasma das células foliculares quanto da célula nurse (Figura 26), enquanto no ovócito não havia nenhum tipo de marcação citoplasmática ou nuclear. Para confirmar a localização citoplasmática da proteína, foi realizado um corte ortogonal de um par de ovaríolos. No corte horizontal, pode-se ver claramente que não há marcação de CDK7 no ovócito, enquanto as células foliculares e a célula *nurse* apresentam um sinal no citoplasma, que é mais intenso no citoplasma da célula *nurse*. No corte vertical, pode-se ver que o núcleo da célula nurse não apresenta marcação para CDK7. Para verificar sua presença de no núcleo das células foliculares, foi realizado um perfil (seta branca na figura 27) passando sobre o citoplasma e o núcleo de uma célula folicular. Como evidencia o gráfico (Figura 27, abaixo), o sinal de fluorescência de CDK7 no núcleo está abaixo do mínimo considerável, sendo que no citoplasma a expressão da proteína é muito marcante.

As proteínas da família CDK apresentam sinais de localização nuclear, uma sequência bipartida, contendo alguns pares de resíduos de lisina e arginina separados por 10-12 aminoácidos, próxima à extremidade carboxi-terminal (Boulikas, 1996[§] apud Kaldis, 1999). Esta sequência determina a translocação nuclear da proteína para a realização de sua função, e está presente em CDK7 de diferentes organismos como se pode visualizar na figura 14. Em eucariotos superiores a localização celular de CDK7 é nuclear, evidenciada por experimentos de imunofluorescência (Tassan et al., 1995) e fracionamento subcelular (Tassan et al., 1995).

[§] Boulikas T. Nuclear import of protein kinases and cyclins. J Cell Biochem. 1996; 60(1):225-242.

al., 1994). Isto foi verificado tanto para o complexo CAK livre, presente na regulação do ciclo celular, quanto para o fator de transcrição TFIIH. Para a função de CDK7 no complexo CAK, além da associação com sua ciclina regulatória (Ciclina H) e fosforilação ativatória em um resíduo treonina no *T-Loop*, ainda é necessária a translocação para o núcleo (Labbé et al., 1994). No complexo TFIIH, o complexo CAK co-localiza com *coiled bodies*, estruturas subnucleares transcrição-dependentes e enriquecidas com pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) (Jordan et al., 1997).

Em leveduras, Cak1p, correspondente a todo o complexo CAK (CDK7/Ciclina H/MAT1) em eucariotos superiores, apresenta localização celular citoplasmática, tanto em células estacionadas em G1 quanto em células com ciclo celular ativo. A verificação da localização celular de Cak1p em leveduras também foi realizada através de imunofluorescência e fracionamento subcelular (Kaldis et al., 1998;Wittenberg et al., 1987).

Assim sendo, o complexo CAK se divide em duas classes: próximas a Cak1p e próximas a MO15 (CDK7). Ambas as classes são muito divergentes, sendo que sua única similaridade são os substratos (Kaldis, 1999). A partir das análises realizadas, é difícil dizer qual a proximidade de *Rhynchosciara americana*, pois a sequência é próxima à de *Drosophila* e, portanto, próxima a MO15; entretanto, a localização exclusivamente citoplasmática sugere uma proximidade maior à classe Cak1p. Ainda assim, seriam necessários mais experimentos para entender o estado funcional da proteína, bem como suas associações e especificidade de substrato.

6 CONSIDERAÇÕES **FINAIS**

Neste trabalho, foi iniciada a caracterização do gene cdk7 e analisou-se sua possível participação nos endociclos de glândula salivar, corpo gorduroso e ovário de Rhynchosciara americana, durante o último estágio de seu desenvolvimento larval. Análises do perfil de expressão, tanto de mRNA quanto de proteína, nos levam a crer que há o envolvimento de CDK7 nos endociclos de R. americana, devido às interessantes alterações visualizadas nos diferentes tecidos, bem como a diferença entre o perfil de expressão proteico e de mRNA. Além disso, análises de alterações pós-traducionais nos levam a acreditar em modificações nas cadeias laterais de alguns aminoácidos além das fosforilações necessárias para a ativação da proteína. Dados de imunolocalização sugerem que sua função estaria relacionada a transcrição e controle do ciclo celular, porém através de vias não usuais, pois as análises apresentaram um perfil de localização citoplasmática, sem marcação nuclear; isso difere do padrão encontrado em eucariotos superiores, sendo mais próximo do funcionamento de leveduras. Entretanto, muito ainda há a ser entendido sobre o controle dos ciclos celulares diferenciados neste modelo, bem como a atuação de CDK7 em outros tecidos através de abordagens funcionais, como silenciamento por RNA de interferência.



REFERÊNCIAS*

Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. J Exp Biol. 2007;210(6):956-963.

Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD, Eick D, Ansari AZ. TFIIH kinase places bivalent markers on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. Mol Cell, 2009;34(3):387-393.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell Cycle, in: Molecular biology of the cell. 5 ed. Garland Science, New York, 2008. 1060-1061.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403-410.

Amabis D, Amabis JM, Simões LC. Puffing activity in salivary gland chromosomes of *Rhynchosciara* under experimental conditions. Chromosoma, 1977;62(2):139-154.

Amabis JM, Janczur C. Experimental induction of gene activity in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae). J Cell Biol. 1978;78(1):1-7.

Andrade, A. Identificação, caracterização e estudo da expressão dos genes hsc70 e hsp83 em *Rhynchosciara americana*. [tese (Doutorado em Bioquímica)]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2005.

Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu Rev Entomol. 2010;55:207-225.

Bai L, Santangelo TJ, Wang MD. Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2006;35:343-360.

Basile R. Aspects of ovary development in *Rhynchosciara*. Rev Bras Genet II. 1979;2:145-160.

Basile R. Nucleic acid synthesis in nurse cells of *Rhynchosciara angelae* Nonato and Pavan, 1951. Genetics, 1969;61(1):261-273.

Beyaert R, Kidd VJ, Cornelis S, Van De Craen M, Denecker G, Lahti LM, Gururajan R, Vandenabeele P, Fiers W. Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumour necrosis factor. J Biol Chem. 1997;272(18):11694-11697.

Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. Reference points for comparisons of twodimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. Electrophoresis, 1994;15:529-539.

^{*} De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali CH, Paquet N, Ravier F, Sanchez JCH, Frutiger S, Hochstrasser DF. The focusing position of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis, 1993;14:1023-1031.

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. NCBI [software online]. Bethesda, MD; 2011. Disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. [2010 dez 25].

Brandão AS. Aspectos celulares e moleculares das glândulas salivares e do corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* durante o desenvolvimento. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Breuer ME, Pavan C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma, 1955;7:371-386.

Breuer ME. Revision of the *Rhynchosciara Rübsaamen* (Diptera, Sciaridae) in the Neotropical Region. Arq Zool. 1969;17:167-198.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000;25:169-193.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. J Mol Endocrinol. 2002;29:23-39.

Calvi BR, Lilly MA, Spradling AC. Cell cycle control of chorion gene amplification. Genes Dev. 1998;12(5):734-744.

Campsteijn C, Ovrebø JI, Karlsen BO, Thompson EM. Expansion of cyclin D and CDK1 paralogs in *Oikopleura dioica*, a chordate employing diverse cell cycle variants. Mol Biol Evol. In press.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 2003;31:3497-3500.

Claycomb JM, Orr-Weaver TL. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. Trends Genet. 2005;21(3):149-162.

ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment. EMBL-EBI [software online]. Heidelberg; 2011. Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/. [2010 nov. 21].

Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. Mol Cell, 2000;5(4):597-605.

Davoli T, De Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:585-610.

Devault A, Martinez AM, Fesquet D, Labbé JC, Morin N, Tassan JP, Nigg EA, Cavadore JC, Dorée M. MAT1 ('menage à trois') a new RING finger protein subunit

stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. EMBO J. 1995;14(20):5027-5036.

Doonan JH, Kitsios G. Functional evolution of cyclin-dependent kinases. Mol Biotechnol. 2009;42(1):14-29.

Dreyfus A, Nonato E, Breuer ME, Pavan C. Cromossomos politênicos em vários órgãos de *Rhynchosciara angelae*. Rev Bras Biol. 1951;11:439-450.

Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: More for Less. Cell, 2001;105:297-306.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science, 1996;274(5293):1664-1672.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is required at each cleavage division. Cell, 1983;33(2):389-396.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, Genome Res. 1998;8:186-194.

Ewing B, Hillier LD, Wendl MC, Green P. Basecalling of automated sequencer traces using phred, I. Accuracy assessment, Genome Res. 1998;8:175-185.

ExPASy Compute pl/Mw. SIB [software online]. Suécia; 2011. Disponível em: http://web.expasy.org/compute_pi/. [2011 jan 16].

ExPASy ScanProsite Tool. SIB [software online]. Suécia; 2011. Disponível em: http://prosite.expasy.org/scanprosite/. [2011 mar 27].

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 1985;39:783-791.

Ficq A, Pavan C. Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Nature, 1957;180:983-984.

Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. J Cell Sci. 2005;118(22):5171-5180.

Follette PJ, Duronio RJ, O'farrell PH. Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in *Drosophila*. Curr Biol. 1998;8(4):235–238.

Foulk MS, Liang C, Wu N, Blitzblau HG, Smith H, Alam D, Batra M, Gerbi SA. Ecdysone induces transcription and amplification in *Sciara coprophila* DNA puff II/9A. Dev Biol. 2006;299(1):151-163.

Frydman HM, Cadavid EO, Yokosawa J, Henrique Silva F, Navarro-Catapan LD, Santelli RV, Jacobs-Lorena M, Graessman M, Graessman A, Stocker AJ, Lara FJS. Molecular characterization of the DNA puff C-8 gene of *Rhynchosciara americana*. J Mol Biol. 1993;233(4):799-803.

Garriga J, Graña X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. Gene, 2004;337:15-23.

GenBank. NCBI [software online]. Bethesda, MD; 2011. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. [2010 dez 25].

Gerard GF, Miller K. Comparison of glyoxal and formaldehyde gels for sizing rRNAs. Focus, 1997;19(1):17-18.

Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene, 2006;25(38):5220-5227.

Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat Genet. 1993;3(3):266-272.

Glover DM, Zaha A, Stocker AJ, Santelli RV, Pueyo MT, Toledo SM, Lara FJS. Gene amplification in *Rhynchosciara* salivary gland chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;79:2947-2951.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consedi a graphical tool for sequencing finishing. Genome Res. 1998;8:195-202.

Guevara M, Basile R. DNA and RNA puffs in *Rhynchosciara*. Caryologia, 1973;26(2):275-295.

Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. Nat Struct Mol Biol. 2004;11(5):394-403.

Halligan BD, Ruotti V, Jin W, Laffoon S, Twigger SN, Dratz EA. ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. Nucleic Acids Res. 2004.32:W638-W644.

Harper JW, Elledge SJ. The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. Genes Dev. 1998;12(3):285-289.

Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(7):478-487.

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem Sci. 1998;23:403-405.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput Appl Biosci. 1992;8:275-282.

Jordan P, Cunha C, Carmo-Fonseca M. The cdk7-cyclin H-MAT1 complex associated with TFIIH is localized in coiled bodies. Mol Biol Cell, 1997;8(7):1207-1217.

Kaldis P, Pitluk ZW, Bany IA, Enke DA, Wagner M, Winter E, Solomon MJ. Localization and regulation of the cdk-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. J Cell Sci. 1998;111(Pt24):3585:3596.

Kaldis P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. Cell Mol Life Sci. 1999;55(2):284-296.

Kobor MS, Greenblatt J. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. Biochim Biophys Acta, 2002;1577(2):261-275.

Labbé JC, Martinez AM, Fesquet D, Capony JP, Darbon JM, Derancourt J, Devault A, Morin N, Cavadore JC, Doreé M. p40MO15 associates with a p36 subunit and requires both nuclear translocation and Thr176 phosphorylation to generate cdk-activating kinase activity in *Xenopus* oocytes. EMBO J. 1994;13(21):5155-5164.

Lara FJS, Tamaki H, Pavan C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. Am Nature, 1965;99:189-191.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 2007;23:2947-2948.

Larochelle S, Chen J, Knights R, Pandur J, Morcillo P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Suter B, Fisher RP. T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity. EMBO J. 2001;20(14):3749-3759.

Leclerc V, Raisin S, Léopold P. Dominant-negative mutants reveal a role for the Cdk7 kinase at the mid-blastula transition in *Drosophila* embryos. EMBO J. 2000;19(7):1567-1575.

Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. Genes Dev. 2009;23(21):2461-2477.

Lee LA, Orr-Weaver TL. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. Annu Rev Genet. 2003;37:545-578.

Li X, Urwyler O, Suter B. *Drosophila* Xpd regulates Cdk7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics, and chromosome segregation. PLoS Genet. 2010;6(3):e1000876.

Lilly MA, Duronio RJ. New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle. Oncogene, 2005;24:2765-2775.

Lilly MA, Spradling AC. The *Drosophila* endocycle is controlled by cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. Genes Dev. 1996;10(19):2514-2526.

Lolli G, Johnson LN. CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? Cell Cycle, 2005;4(4):572-577.

Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. Cell Signal. 2005;17(9):1033-1051.

Machado-Santelli GM, Basile R. Action of hydroxiurea on chromosome physiology in *Rhynchosciara angelae*. Genetica, 1978;48(2):131-135.

Machado-Santelli GM, Basile R. Studies of DNA puff development in *Rhynchosciara*. Genetics, 1973;74:168.

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci. 2005;2(4):239-249.

Morgan DO. Cyclin-Dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:261-291.

Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. Cell, 1995;81(2):149-152.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell, 2004;116(2):221-234.

Nelliot A, Bond N, Hoshizaki DK. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. Genesis, 2006;44(8):396-400.

NetPhos 2.0 Server. CBS [software online]. Reino Unido; 2007. Disponível em: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/. [2011 mai 22].

Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(1):15-22.

Nonato E, Pavan C. A new species of *Rhynchosciara Rübsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). Rev Bras Biol. 1951;11:435-437.

Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. Cell, 1994;79(4):547-550.

ORF Finder – Open Reading Frame Finder. NCBI [software online]. Bethesda, MD; 2011. Disponível em: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/. [2010 nov 28].

Pavan C, Breuer ME. Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. J Hered. 1952;63:151-157.

Pavan C, Da Cunha AB. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other Sciaridae. Annu Rev Genet. 1969;3:425-449.

Perondini AL, Dessen EM. Polytene chromosomes and puffing pattern of salivary gland of *Sciara ocellaris*. Rev Bras Genet. 1985;8:465-478.

ProMoST: Protein Modification Screening Tool. MCW [software online]. Wisconsin; 2011. Disponível em: http://proteomics.mcw.edu/promost.html. [2011 fev 20].

Rudkin GT, Corlette SL. Disproportionate synthesis of DNA in polytene chromosome region. Proc Natl Acad Sci U S A. 1957;43:964-968.

Santelli RV, Machado-Santelli GM, Pueyo MT, Navarro-Catapan LD, Lara FJS. Replication and transcription in the course of DNA amplification of the C3 and C8 DNA puffs on *Rhynchosciara americana*. Mech Dev. 1991;36(1-2):59-66.

Santelli RV, Siviero F, Machado-Santelli GM, Lara FJ, Stocker AJ. Molecular characterization of the B-2 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma, 2004;113(4):167-176.

Sauaia H, Laicine EM, Alves MA. Hydroxiurea-induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. Chromosoma, 1971;34(2):129-151.

Saunders A, Core LJ, Lis JT. Breaking barriers to transcription elongation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(8):557-567.

Sherr CJ, Mccormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell, 2002;2(2):103-112.

Sindelka R, Ferjentsik Z, Jonak J. Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes. Dev Dyn. 2006;235:754-758.

Siviero F, Rezende-Teixeira P, Andrade A, Machado-Santelli GM, Santelli RV. Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands. Insect Mol Biol. 2006;15(2):109-118.

Spradling AC. The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. Cell, 1981;27:193-201.

Stocker AJ, Gorab E, Amabis JM, Lara FJS. A molecular cytogenetic comparison between *Rhynchosciara americana* and *Rhynchosciara hollanderi* (Diptera, Sciaridae). Genome, 1993;36:831-843.

Stocker AJ, Troyano-Pueyo M, Pereira SD, Lara FJS. Ecdysteroid titers and changes in chromosomal activity in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma, 1984;90:26-38.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. In Press.

Tassan JP, Jaquenoud M, Léopold P, Schultz SJ, Nigg EA. Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(19):8871-8875.

Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J, Nigg EA. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). J Cell Biol. 1994;127(2):467-478.

Terra WR, De Bianchi AG, Gambarini AG, Lara FJS. Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly *Rhynchosciara americana*. J Insect Physiol. 1973;19:2097-2106.

The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics, 2000;25:25-29.

Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2006;41(3):105-178.

Trembley JH, Hu D, Hsu LC, Yeung CY, Slaughter C, Lahti JM, Kidd VJ. PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. J Biol Chem. 2002;277(4):2589-2596.

Tyson JJ. Models of cell cycle control in eukaryotes. J Biotechnol. 1999;71(1-3):239-244.

Vignery A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. Int J Exp Pathol. 2000;81(5):291-304.

Winter CE, Bianchi AG, Terra WR Lara FJS. The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. J Insect Physiol. 1977;23:1455-1459.

Wittenberg C, Richardson SL, Reed SI. Subcellular localization of a protein kinase required for cell cycle initiation in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an association between the CDC28 gene product and the insoluble cytoplasmic matrix. J Cell Biol. 1987;105(4):1527-1538.

Wu N, Liang C, Dibartolomeis SM, Smith HS, Gerbi SA. Developmental progression of DNA puffs in *Sciara coprophila*: amplification and transcription. Dev Biol. 1993;160:73-84.

Yankulov KY, Bentley DL. Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH. EMBO J. 1997;16(7):1638-1646.

Young RA. RNA polymerase II. Annu Rev Biochem. 1991;60:689-715.

Zhang Z, Schwarts S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 2000;7(1-2):203-214.

Zhimulev IF, Belyaeva ES, Semeshin VF, Koryakov DE, Demakov SA, Demakova OV, Pokholkova GV, Andreyeva EN. Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. Int Rev Cytol. 2004;241:203-275.