

**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

## 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 TFIID 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 sequência 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.

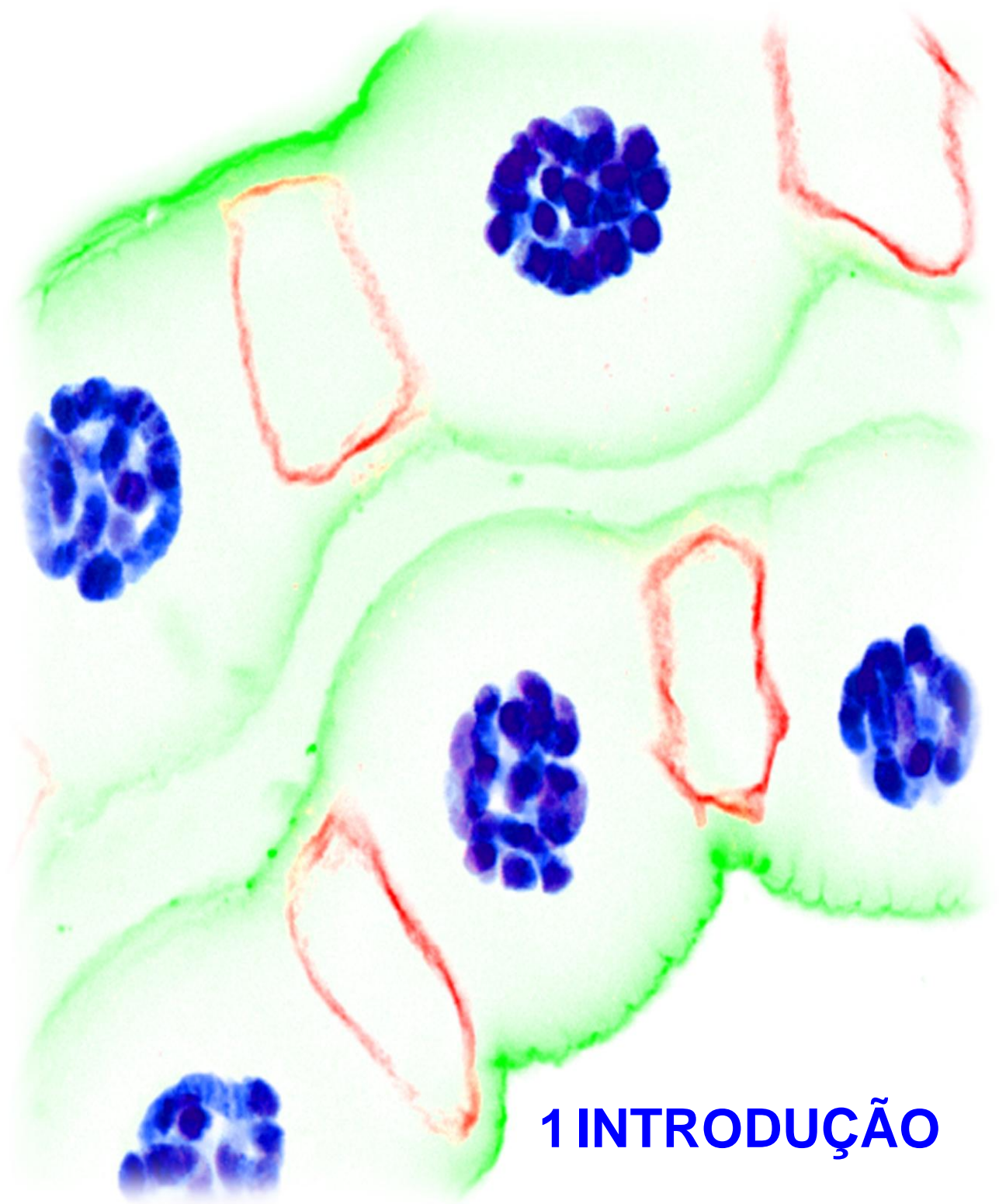
**Palavras-chave:** Ciclo celular. Desenvolvimento larval. Biologia molecular. Diptera. Sequenciamento genético.

## 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.



## 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 quanto 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).

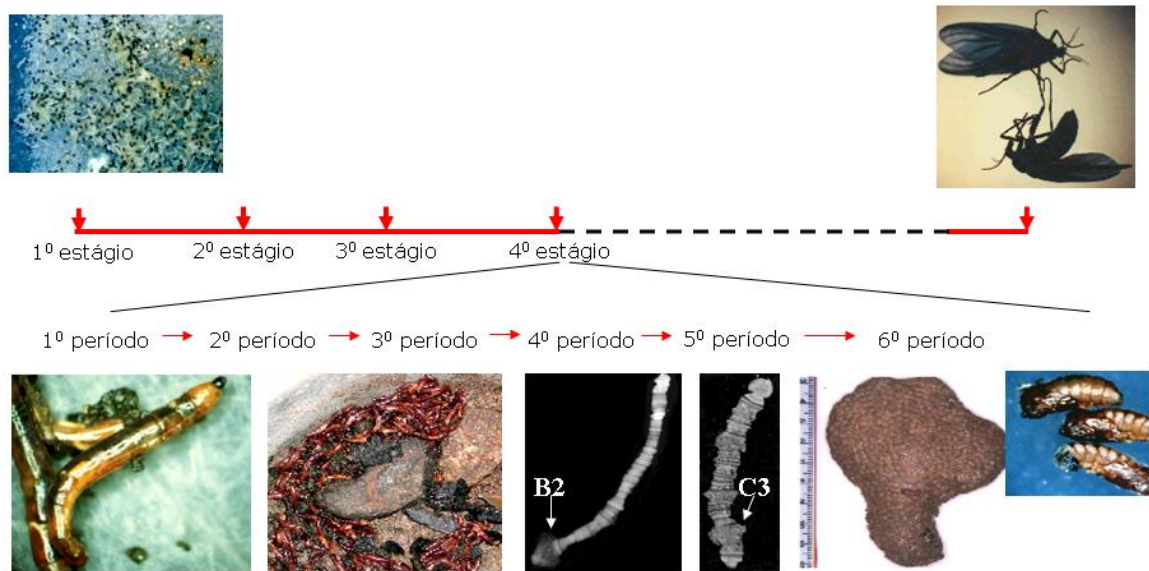
---

\* Wiedemann CRW. Diptera exótica [Kiliae]. 1821;p.244.

† Edwards, FW. Diptères, Nematocères, in Mission de L'Armée por la mesure 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 quatro 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 (*Ilex 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 (nematóides 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*.



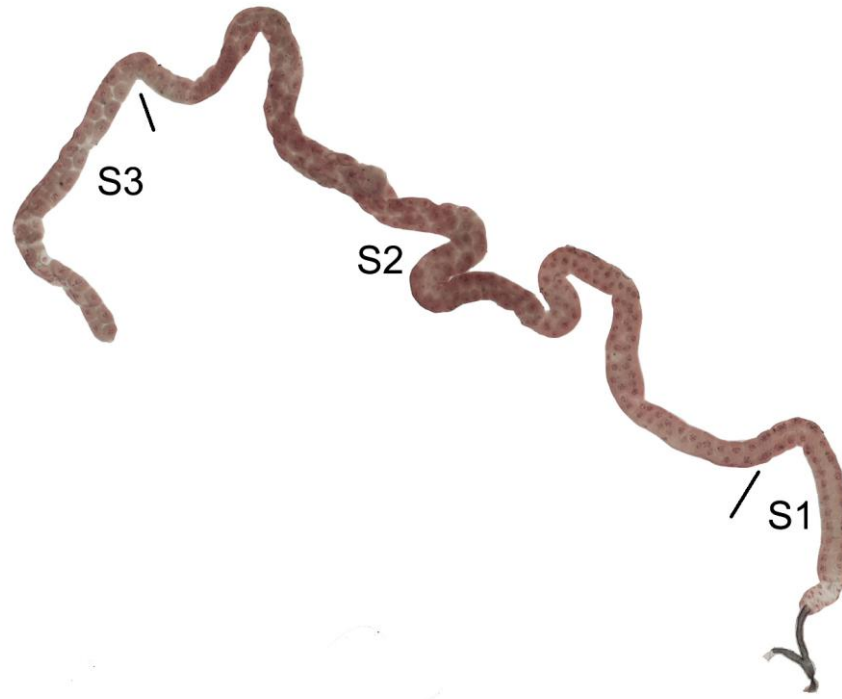
As latas são suplementadas com mate e folhas e ramagens para mimetizar o ambiente natural do inseto. Em destaque, larvas de 2° período em cultura.

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).



Figura 3 – Glândula salivar de *R. americana* corada com orceína.



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 determinada 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/E-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 quinase 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, atuando como subunidade catalítica de fatores de transcrição geral (GTFs – General Transcription Factors) e fosforilando domínios carboxi-terminais (CTDs – Carboxyl-Terminal Domains) 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 (Positive-Transcription Elongation Factor b) e é responsável pela liberação da repressão transcricional e o início do alongamento transcricional (Garriga e Graña, 2004). CDK11 possui três isoformas (CDK11<sup>p46</sup>, CDK11<sup>p58</sup> e CDK11<sup>p110</sup>), 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 complexos 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

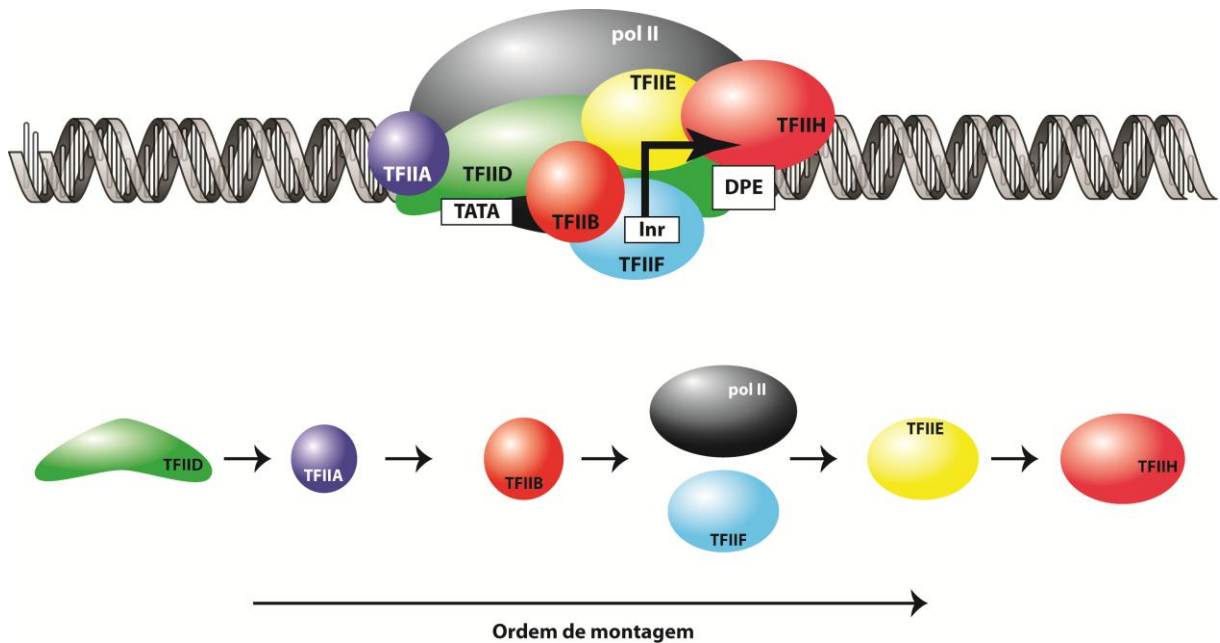
A transcrição é um dos processos mais importantes em qualquer organismo, seja ele eucarioto ou procarioto, e sua regulação é uma etapa crucial na expressão gênica e sua regulação. Enquanto em procariotos, há uma única enzima RNA polimerase composta por três subunidades responsáveis por todas as transcrições, 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  $Mg^{2+}$  firmemente ligado (Bai et al., 2006).

As três principais fases do ciclo transcricional são iniciação, alongamento 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 alongamento 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 alongamento (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.

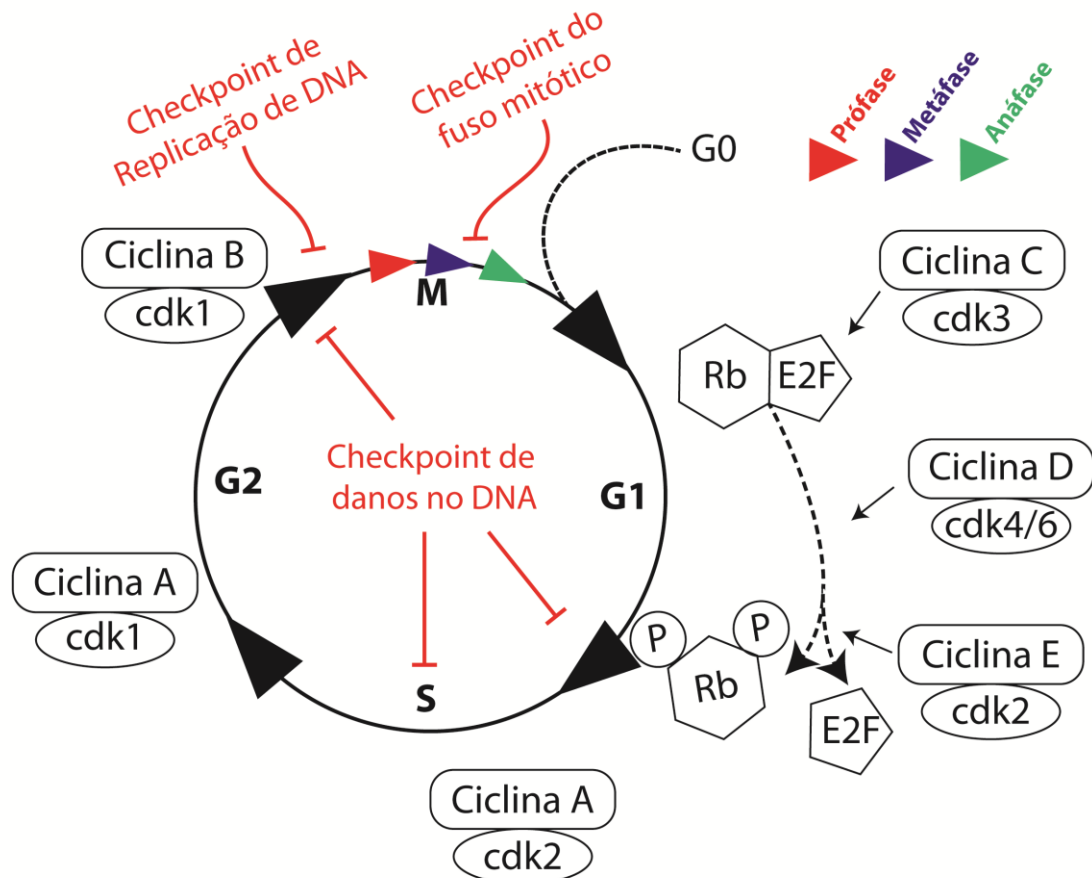
O TFIIH é um fator geral de transcrição essencial composto por 10 subunidades que apresenta atividades helicase e quinase, sendo que sua subunidade catalítica é composta pelo complexo CAK (CDK7/Ciclina H/MAT1), responsável pela progressão do ciclo celular. Entretanto, quando em associação com o *core* 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).

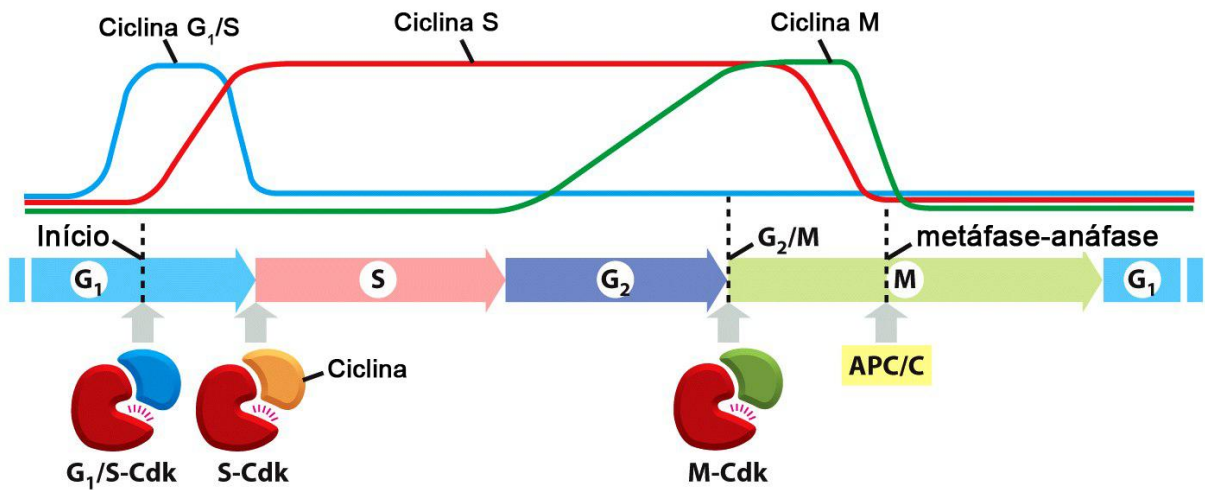
No ciclo celular canônico, as células passam por fases S, em que há a síntese e consequente duplicação do conteúdo genômico, e fases M (Mitose), em que há a divisão simétrica do conteúdo de DNA entre duas células filhas. Essas duas fases são interpoladas por fases G (Gap), em que as células se recuperam e se preparam para a fase seguinte. 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.

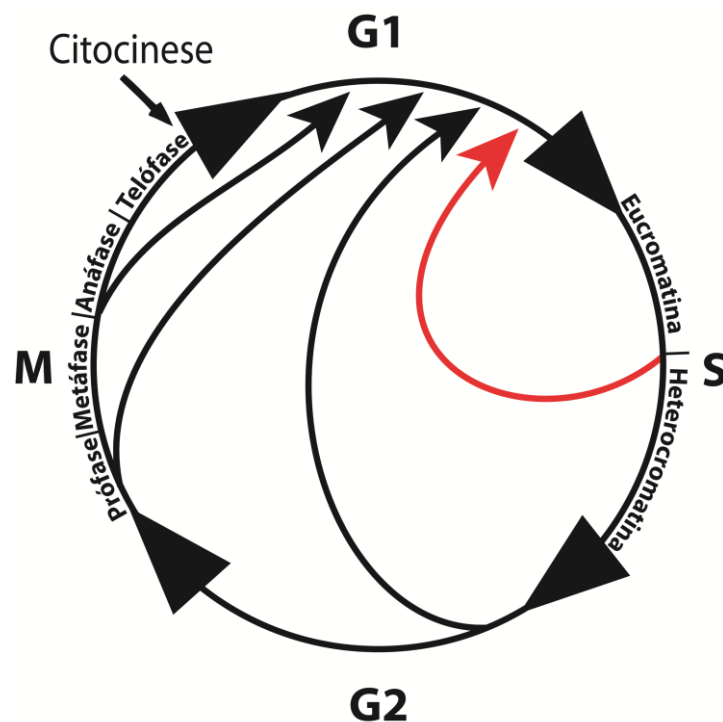


Conforme mencionado anteriormente, o ciclo celular apresenta fases G em que as células se preparam para a fase seguinte do ciclo: em G1, a célula se prepara para entrar na fase S; e em G2, a célula se prepara para entrar em mitose. Nessas fases G, há pontos de checagem (chamados de *checkpoints*), em 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, mantendo-se 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 *Rhynchosciara americana* (Machado-Santelli, comunicação pessoal<sup>‡</sup>). Em *Rhynchosciara*, 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

---

<sup>‡</sup> Machado-Santelli GM. São Paulo, 2011.

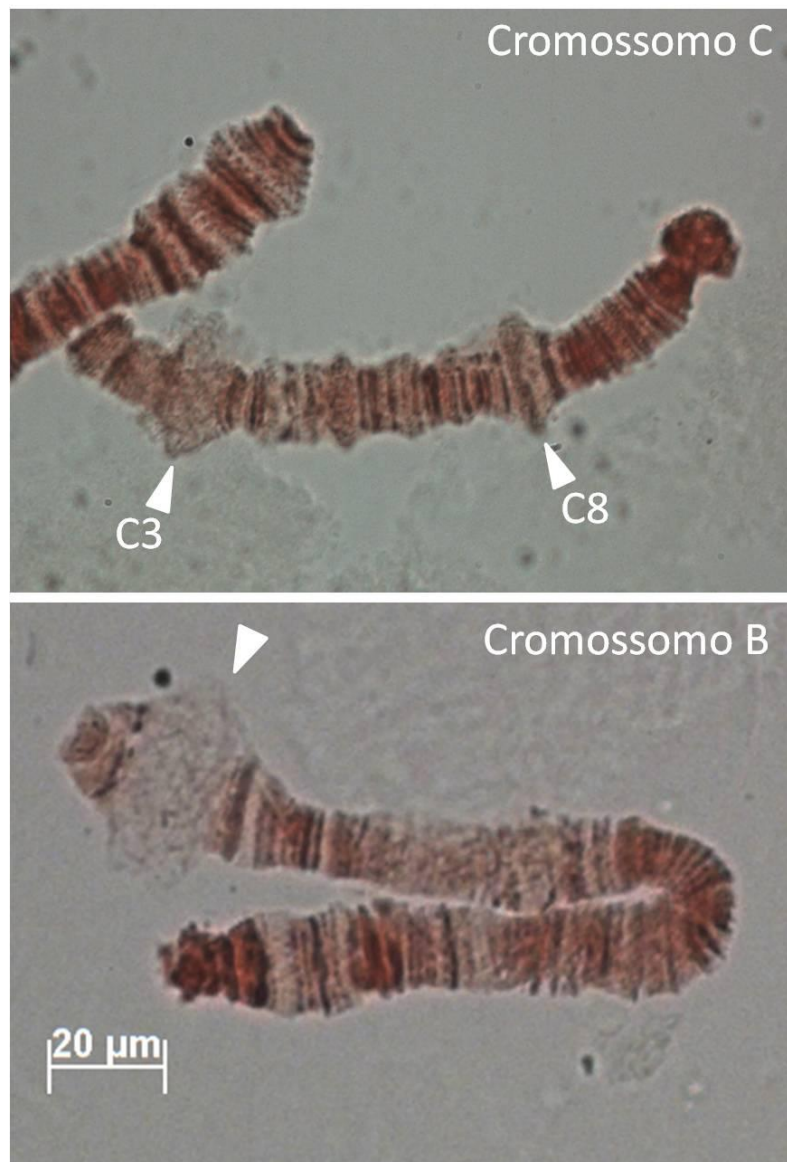
salivar (Figura 8), devido ao tamanho que atingem (maior número de ampliações) e também por se apresentarem menos compactados, quando comparados com os cromossomos encontrados em outros tecidos. Além da politenização amplamente disseminada entre os dípteros, entre os sciarídeos há um processo de amplificação 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 8 – Fotomicrografia dos 4 cromossomos politênicos de *R. americana* (A, B C e X).

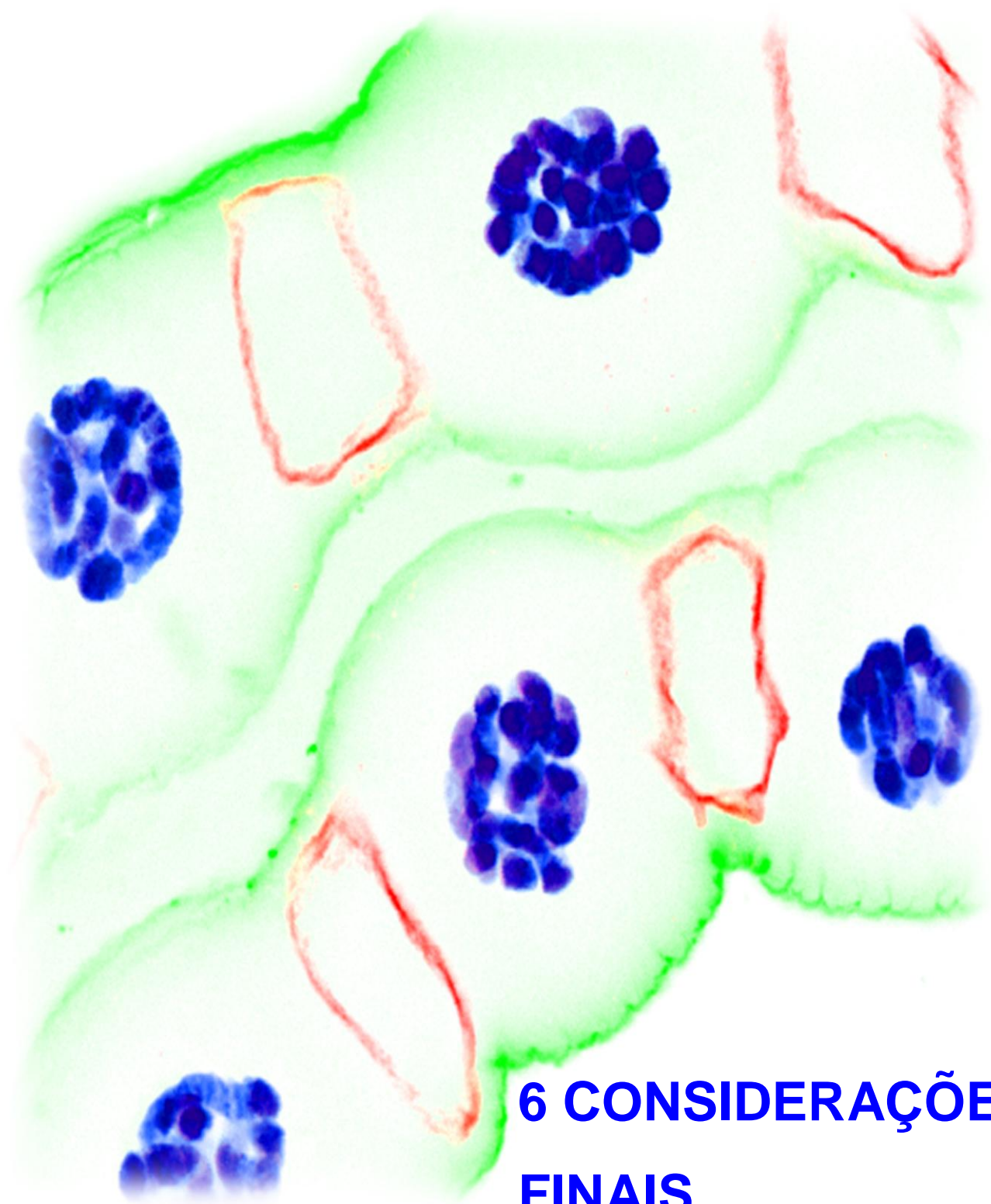


A diferenciação entre os cromossomos é feita analisando o padrão de bandeamento, características das extremidades e padrão de abertura de pufes. Um pufe é evidenciado na cabeça de seta.  
 Fonte: Martens, 2011

Figura 9 – Pufes mais estudados de *Rhynchosciara americana*.

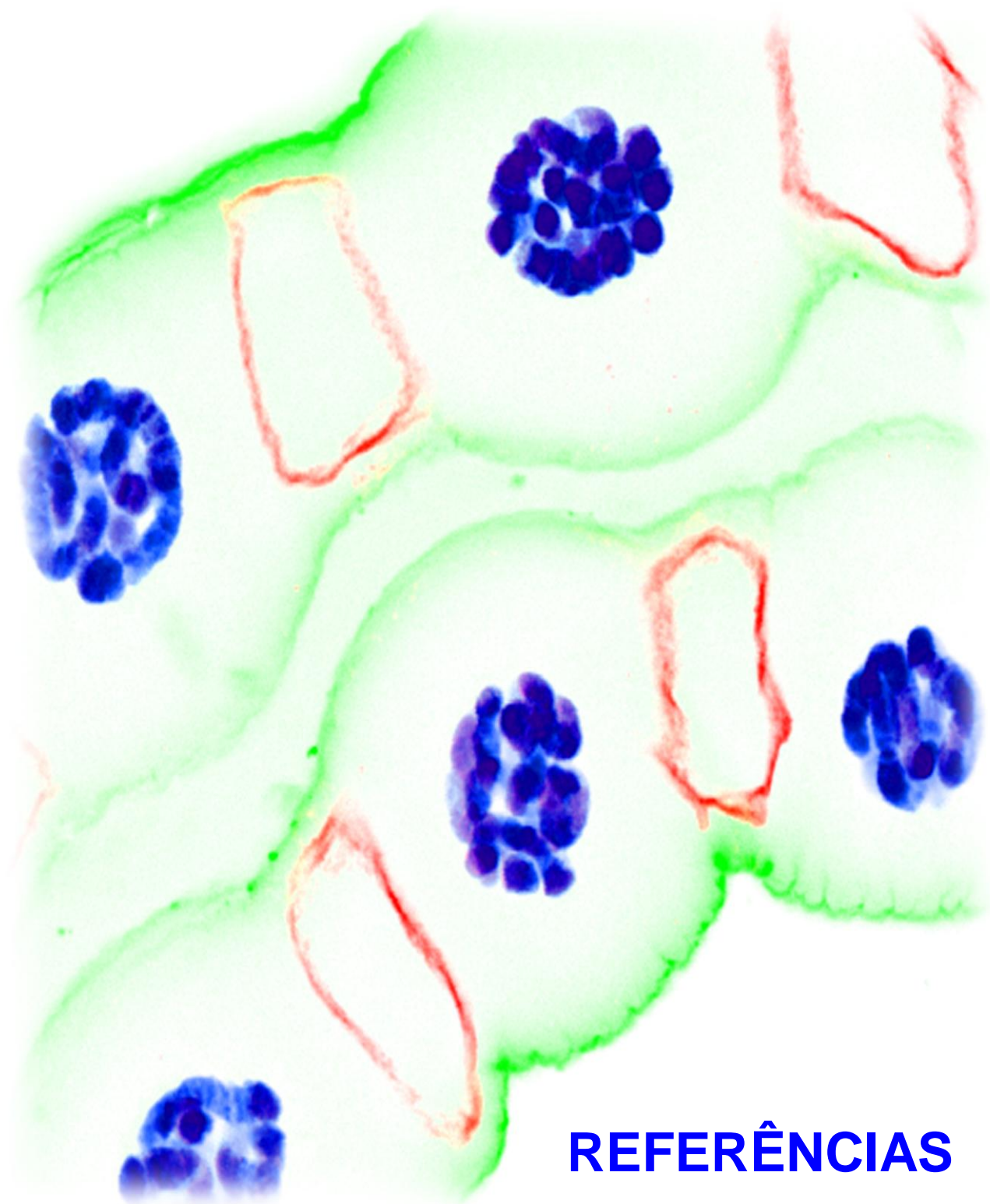


Notar no cromossomo C a presença dos dois pufes mais estudados (C3 e C8) e no cromossomo B, a presença do pufe B2 (Cabeça de seta).  
Fonte: Martens, 2011



**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**



## 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 two-dimensional 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 pI/Mw. SIB [software online]. Suécia; 2011. Disponível em: [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](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.
- Fouk 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 TFIIF 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 Rübсаamen*, 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, Schwartz 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.