

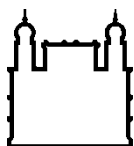
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ANÁLISE FUNCIONAL E EVOLUTIVA DOS GENES DA PRIMEIRA  
ALÇA REGULATÓRIA DO RELÓGIO CIRCADIANO  
DE *Lutzomyia longipalpis*

PAULO ROBERTO DE AMORETTY

Rio de Janeiro  
Julho / 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Paulo Roberto de Amoretty*

Análise funcional e evolutiva dos genes da primeira alça regulatória do relógio circadiano de *Lutzomyia longipalpis*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto

**RIO DE JANEIRO**

**JULHO DE 2014**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A524 Amoretty, Paulo Roberto de

Análise funcional e evolutiva dos genes da primeira alça regulatória do relógio circadiano de *Lutzomyia longipalpis* / Paulo Roberto de Amoretty.  
– Rio de Janeiro, 2014.

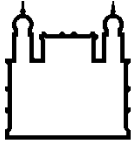
xx,94 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 95-105

1. *Drosophila melanogaster*. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Relógio circadiano. I. Título.

CDD 571.986



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AUTOR: PAULO ROBERTO DE AMORETTY**

**ANÁLISE FUNCIONAL E EVOLUTIVA DOS GENES DA PRIMEIRA ALÇA REGULATÓRIA DO  
RELÓGIO CIRCADIANO DE *Lutzomyia longipalpis***

**ORIENTADOR (ES):** Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto

**Aprovada em:** 24/07/2014

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.– Milton Osório de Moraes - Presidente**

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dr. Samira Chahad-Ehlers**

Universidade Federal de São Carlos

**Prof. Dr. Patricia Hessab Alvarenga**

Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro

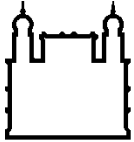
**Prof. Dr. Leila Mendonça Lima**

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine**

Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 24 de julho de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Aos meus mestres  
Alexandre Afranio Peixoto e Rafaela  
Vieira Bruno  
Aos meus pais Roberto de Amoretty e  
Hercília da Silva Amoretty.

## AGRADECIMENTOS

Eu acredito que ciência e religião podem ter uma convivência pacífica, uma vez que foram criadas com propósitos distintos. Assim, é possível ser um cientista e acreditar em um poder superior (como meu pai gosta de falar) que rege o universo. A ciência mede, quantifica, mensura enquanto a religião cuida das inquietações da alma. A alguns anos, li a biografia de um botânico norte-americano chamado George Washington Carver, filho de escravos. Carver sempre pedia ajuda de Deus antes de realizar seus experimentos e teve grande êxito ao criar inúmeros subprodutos para amendoim. Embora um tese seja ciência em sua essência, ela é produzida por uma pessoa, dotada de alma, e portanto de conflitos, medos e inquietações próprias do ser humano. Porém, sempre que um obstáculo aparece na minha frente, papai do céu coloca um anjo ao meu lado, por isso agradeço a Deus por cada momento da minha vida. Eu chamo de anjos o que alguns chamam de amigos, obrigado amigos do LABIMI, UniFOA, UFRJ por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

Minha família foi fundamental nesse processo, Natalia e minhas filhotas Alice, Aline e a mais importante produção do doutorado Ana Sofia. Meus pais Roberto e Hercília, minha irmã Patrícia e meu cunhado artista que me ajudou (salvou) nas figuras Henrique. Os tios Gilberto e Zuila que sempre foram muito presentes na minha vida e meu irmão Eliseu. Esses atuaram diretamente mas a família toda sofreu junto e quero agradecer a todos.

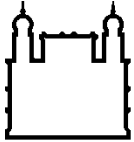
Agradeço também a Dra Rafaela Bruno que me adotou nesse final de doutorado e teve um trabalhão para que essa tese saísse, nunca vou esquecer o que fez por mim. Foram poucos meses mas aprendi bastante nesse período.

Obrigado Guga e Antônio pelas correções. Agradeço também aos meus irmãos de outras mãos que ganhei na FIOCRUZ Gabriel e Robson, pessoas extremamente generosas que doaram grande parte do tempo deles para incentivar, dar bronca e me ajudar quando eu precisei.

Acredito que a vida é um lento processo de transformação, os lugares que você vai, os livros que lê, as pessoas que encontra atuam diretamente nesse sentido. Certamente, todos que tiveram algum tipo de convivência com Alexandre saíram diferentes. Logo depois da minha qualificação do doutorado, ele me disse que tinha sido legal (nunca tinha ouvido ele falar isso antes) e que estava perto de completar a minha formação. Ele disse que ficaria feliz quando eu defendesse o doutorado. Mas uma fatalidade o tirou de nossas vidas. Eu achava que no futuro, iria trabalhar em alguma universidade em colaboração com ele, ouvindo as constantes reclamações que o artigo estava mal escrito ou que o resultado estava redondinho demais para estar correto. Mas enfim o destino tinha outros planos. Aprendi muito com ele e sei que saí transformado dessa experiência e espero que no futuro possa também me dedicar aos meus alunos como ele se dedicou à nós. Alexandre, espero que daí você possa ver esse trabalho, que foi escrito por mim e corrigido por algumas das mãos que você treinou, tenha paciência com os erros alguns passaram.



“Amigo é coisa para se guardar  
Debaixo de sete chaves  
Dentro do coração  
Assim falava a canção que na América ouvi  
Mas quem cantava chorou  
Ao ver o seu amigo partir  
(Milton Nascimento)”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

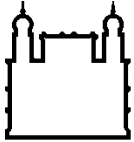
### ANÁLISE FUNCIONAL E EVOLUTIVA DOS GENES DA PRIMEIRA ALÇA REGULATÓRIA DO RELÓGIO CIRCADIANO DE *Lutzomyia longipalpis*

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Paulo Roberto de Amoretty

Os ritmos diários de atividade e repouso de insetos vetores são controlados pelo relógio circadiano. Este mecanismo endógeno que controla diferentes aspectos da fisiologia, metabolismo e comportamento, pode ser sincronizado pela luz (ciclos de claro e escuro) e outros ciclos ambientais como as oscilações diárias na temperatura, disponibilidade de alimentos, etc. Os genes diretamente envolvidos no controle molecular do relógio circadiano foram primeiramente descritos no modelo *Drosophila melanogaster*. Nosso grupo tem estudado genes do relógio circadiano em insetos vetores utilizando *D. melanogaster* como modelo, o que tem revelado uma série de diferenças marcantes entre os ortólogos do relógio de insetos. Em *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da *Leishmania infantum* nas Américas, e *Aedes aegypti*, vetor do vírus Dengue, a proteína codificada pelo gene *cycle* (*cyc*) possui uma cauda de ativação do tipo BCTR muito semelhante à de vertebrados. Esse sítio (BCTR) corresponde a região de interação de CYC com a proteína CRYPTOCHROME 2, um repressor transcricional encontrado em diversos insetos mas ausente em *D. melanogaster*. Outra diferença importante entre esses insetos é em relação ao tamanho da cauda poli-Q, implicada na ativação gênica, pois tanto em *L. longipalpis* quanto em *Ae. aegypti* esta cauda é reduzida em relação ao modelo *Drosophila*. Isto sugere que durante a evolução o domínio BCTR foi substituído funcionalmente em algumas espécies pelo domínio poli-Q no heterodímero CLOCK/CYCLE (CLK/CYC). Neste trabalho, iniciamos uma investigação dos aspectos relacionados à conservação evolutiva e funcional da principal alça regulatória do relógio circadiano de insetos. Para isto, através de uma análise *in vivo*, dirigimos a expressão do gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) na tentativa de reconstruir, em parte, a primeira alça do relógio circadiano de *L. longipalpis* em mutantes de *D. melanogaster*. Além disso, utilizamos uma abordagem evolutiva comparando sequências de diferentes grupos de insetos para investigar as transformações sofridas por CLK-CYC ao longo do processo evolutivo dos insetos. Nossos resultados sugerem que a proteína CYC de *L. longipalpis* foi capaz de resgatar, ainda que parcialmente, o funcionamento do relógio circadiano de *D. melanogaster*, embora esses insetos tenham se separado a mais de 250 milhões de anos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### FUNCTIONAL AND EVOLUTIONARY ANALYSIS OF THE FIRST REGULATORY LOOP OF THE CIRCADIAN CLOCK IN *Lutzomyia longipalpis*

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Paulo Roberto de Amoretty

Daily rhythms of activity and rest in insect vectors are controlled by the circadian clock. This endogenous mechanism that controls various aspects of physiology, metabolism and behavior can be synchronized by the light (light and dark cycles) and other environmental cycles as the daily fluctuations in temperature, food availability, etc. The genes directly involved in the molecular circadian clock control were first described in *Drosophila melanogaster*. Our group has been studying circadian clock genes in insect vectors using *D. melanogaster* as a model, revealing a series of marked differences among the orthologs of the insects clock. In *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania infantum* in the Americas, and *Aedes aegypti*, the Dengue virus vector, the protein encoded by cycle (*cyc*) gene has a BCTR type tail activation, very similar to that of vertebrates. This BCTR tail is the site of interaction with the CRYPTOCHROME 2 protein, a transcriptional repressor found in many insects, but absent in *D. melanogaster*. Another important difference among these insects is relative to poly-Q tail size, implicated in gene activation, since both *L. longipalpis* and *Ae. aegypti* have a reduced tail compared to *Drosophila*. This suggests that during the evolution the BCTR domain was functionally replaced in some species by poly-Q domain in the heterodimer CLOCK/CYCLE (CLK/CYC). In the present work, we have started an investigation of aspects related to the evolutionary and functional conservation of the main regulatory circadian clock in insects. For this purpose, through an *in vivo* analysis we drove the *L. longipalpis cyc* (*llcyc*) gene expression in an attempt to rebuild, in part, the first circadian clock loop of *L. longipalpis* in mutants of *D. melanogaster*. In addition, we used an evolutionary approach by comparing sequences of different insect groups to investigate the transformations suffered by CLK-CYC along the evolutionary process of insects. Our results suggest that the CYC *L. longipalpis* protein was able to rescue, at least partially, the functioning of the circadian clock of *D. melanogaster*, although these insects has been separated for more than 250 million years.

## ÍNDICE

RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XII
LISTA DE ABREVIACÕES: .....	XVIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
4. RESULTADOS .....	41
5. DISCUSSÃO .....	85
6. REFERÊNCIAS .....	95
7. ANEXO I .....	106
8. ANEXO II .....	109

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Representação gráfica do experimento de D’Mairan.....	2
<b>Figura 1.2.</b> Esquema geral do funcionamento molecular do relógio circadiano de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	4
<b>Figura 1.3.</b> Diagrama esquemático do mecanismo molecular da primeira alça do relógio circadiano de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
<b>Figura 1.4.</b> Diagrama da segunda e terceira alças do relógio circadiano de <i>D. melanogaster</i> .....	7
<b>Figura 1.5.</b> Esquema do ajuste do relógio pela luz.....	9
<b>Figura 1.6.</b> Representação de um corte transversal do cérebro de <i>D. melanogaster</i> .....	11
<b>Figura 1.7.</b> Comparação entre a primeira alça do relógio circadiano de <i>D. melanogaster</i> e o mecanismo de mamíferos.....	13
<b>Figura 1.8.</b> Diagrama comparativo do dímero CLK-CYC de <i>D. melanogaster</i> , <i>L. longipalpis</i> e <i>A. aegypti</i> .....	14
<b>Figura 1.9.</b> Diagrama que representa a comparação do perfil de expressão dos genes da primeira alça do relógio circadiano de <i>D. melanogaster</i> e <i>L. longipalpis</i> .....	15
<b>Figura 1.10.</b> Representação esquemática dos possíveis modelos de funcionamento do relógio circadiano de insetos.....	17
<b>Figura 1.11.</b> Comparação entre a atividade locomotora de <i>L. longipalpis</i> e <i>D. melanogaster</i> .....	18
<b>Figura 1.12.</b> Representação esquemática dos possíveis modelos de funcionamento do relógio circadiano de insetos. ....	20
<b>Figura 3.1.</b> Série de cruzamentos realizados para obter a linhagem <i>timgal4/CYO; Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>/TM3sb</i> .....	27

<b>Figura 3.2.</b> Série de cruzamentos realizados para obter a linhagem recombinante <i>uasIIcyc, Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup></i> .....	28
<b>Figura 3.3.</b> Esquema do cruzamento para obter as moscas duplo mutantes ( <i>Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup></i> ) homozigotas carregando <i>uasIIcyc</i> sob o controle de <i>timgal4</i> . .....	29
<b>Figura 3.4.</b> Exemplo da visualização do sistema de identificação de mutantes em gel de poliacrilamida 12%. .....	32
<b>Figura 3.5.</b> Exemplo do funcionamento do sistema UAS-GAL4 em <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	34
<b>Figura 3.6.</b> Esquema do Sistema de monitoramento de Atividade Locomotora de <i>Drosophila</i> (Trikinetics). .....	35
<b>Figura 4.1.</b> Os gráficos mostram o padrão de atividade locomotora por dois dias, um de LD 12:12 seguido de um de DD (escuro constante). .....	42
<b>Figura 4.2.</b> Atividade locomotora de moscas selvagens carregando <i>IIcyc</i> em regime de LD. .....	44
<b>Figura 4.3.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas selvagens carregando <i>IIcyc</i> . .....	45
<b>Figura 4.4.</b> Atividade locomotora de moscas selvagens carregando <i>IIcyc</i> em regime de DD. .....	46
<b>Figura 4.5.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas selvagens carregando <i>IIcyc</i> em DD. .....	47
<b>Figura 4.6.</b> Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para <i>Clk<sup>Jrk</sup></i> carregando <i>IIcyc</i> . .....	50
<b>Figura 4.7.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação <i>Clk<sup>Jrk</sup></i> . .....	51

<b>Figura 4.8.</b> Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para $Clk^{Jrk}$ carregando $Ilcyc$ .....	52
<b>Figura 4.9.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação $Clk^{Jrk}$ .....	53
<b>Figura 4.10.</b> Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	54
<b>Figura 4.11.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação $cyc^0$ .....	55
<b>Figura 4.12.</b> Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	56
<b>Figura 4.13.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação $cyc^0$ .....	57
<b>Figura 4.14.</b> Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para dupla mutação $Clk^{Jrk}$ , $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	59
<b>Figura 4.15.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação $Clk^{Jrk}$ , $cyc^0$ .....	60
<b>Figura 4.16.</b> Atividade locomotora do duplo mutante heterozigoto para $Clk^{Jrk}$ , $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	61
<b>Figura 4.17.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação $Clk^{Jrk}$ , $cyc^0$ .....	62
<b>Figura 4.18.</b> Atividade locomotora do mutante $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	65
<b>Figura 4.19.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas homozigotas para a mutação $cyc^0$ .....	66
<b>Figura 4.20.</b> Atividade locomotora do mutante $cyc^0$ carregando $Ilcyc$ .....	67

<b>Figura 4.21.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação <i>cyc</i> <sup>0</sup> .....	68
<b>Figura 4.22.</b> Atividade locomotora do duplo mutante <i>Clk</i> <sup>Jrk</sup> , <i>cyc</i> <sup>0</sup> carregando <i>l1cyc</i> . 70	
<b>Figura 4.23.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas com a dupla mutação <i>Clk</i> <sup>Jrk</sup> , <i>cyc</i> <sup>0</sup> .....	71
<b>Figura 4.24.</b> Atividade locomotora do duplo mutante <i>Clk</i> <sup>Jrk</sup> , <i>cyc</i> <sup>0</sup> carregando <i>l1cyc</i> . 72	
<b>Figura 4.25.</b> Comparação entre as médias diurna e noturna do duplo mutante carregando <i>l1cyc</i> .....	73
<b>Figura 4.26.</b> A expressão de <i>l1cyc</i> em células do relógio circadiano recuperou a atividade locomotora do duplo mutante arritmico ( <i>Clk</i> <sup>Jrk</sup> , <i>cyc</i> <sup>0</sup> ).....	74
<b>Figura 4.27.</b> Análise dos transcritos dos genes da primeira alça do relógio circadiano. As barras brancas e pretas representam a abundância relativa dos transcritos com seus respectivos erros-padrão.....	76
<b>Figura 4.28.</b> Representação das formas apresentadas por CLK / CYC.....	79
<b>Figura 4.29.</b> Árvores de NJ construídas a partir das sequencias completas de CLK/CYC.....	81
<b>Figura 5.1.</b> Diagrama esquemático do provável funcionamento de <i>l1cyc</i> em <i>D. melanogaster</i> .....	90



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Lista de espécies utilizadas nesse estudo e números de acesso no GeneBank.....	39
<b>Tabela 4.1.</b> Efeito de <i>llcyc</i> no período de moscas selvagens.....	48
<b>Tabela 4.2.</b> Efeito de <i>llcyc</i> em moscas heterozigotas para a mutação <i>Clk<sup>Jrk</sup></i> . ....	53
<b>Tabela 4.3.</b> Efeito de <i>llcyc</i> em moscas heterozigotas para a mutação <i>CYC<sup>0</sup></i> .....	58
<b>Tabela 4.4.</b> Efeito de <i>llcyc</i> em moscas heterozigotas para a dupla mutação <i>Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup></i> .....	63
<b>Tabela 4.5.</b> Efeito de LLCYC no período dos mutantes <i>cyc<sup>0</sup></i> .....	68
<b>Tabela 4.6.</b> Efeito de LLCYC no período do duplo mutante ( <i>Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup></i> ).....	75
<b>Tabela 4.7.</b> Cálculo da identidade entre os homólogos da proteína CYCLE.....	83
<b>Tabela 4.8.</b> Cálculo da identidade entre os homólogos de CLK.....	84

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### Lista de abreviações:

Act - ativador independente do relógio.

AVL - Leishmaniose Visceral Americana.

BCTR - *Bmall C-terminal region* (região C-terminal de Bmall).

bHLH – domínio de ligação ao DNA do tipo hélice volta hélice.

CK2 – proteína Caseína quinase 2.

*Clk* –RNAm ou gene Clock.

CLK - proteína Clock.

*Clk<sup>Jrk</sup>* - RNAm ou gene mutante *Clock<sup>Jrk</sup>*.

CLK<sup>Jrk</sup> – proteína mutante Clock<sup>Jrk</sup>.

*Cry* –RNAm ou gene Cryptochrome 1.

CS – Canton S - linhagem selvagem de *Drosophila melanogaster*

CYC - proteína Cycle.

*cyc<sup>0</sup>* – mutação *cycle<sup>0</sup>*.

DBT – proteína Doubletime.

DN1- neurônio dorsais 1.

DN2 - neurônio dorsais 2.

DN3 - neurônio dorsais 3 .

EPM – erro padrão da média.

Gal4 – Ativador transcricional.

h - horas.

KW – Teste estatístico não paramétrico de Kraskal-Wallis

llcyc – gene *cycle* de *L. longipalpis*.

LLCYC – proteína *cycle* de *L. longipalpis*

l-LN<sub>v</sub> – grandes neurônios ventro-laterais.

LN<sub>d</sub> - neurônios dorso-laterais.

LPN - neurônio postero-lateral.

n - número de indivíduos testados.

OL - lobo óptico.

ORF - *open reading frame* (fase de leitura aberta).

PAS A –domínio denominado “*period Arnt single-minded*” A.

PAS B – domínio denominado “*period Arnt single-minded*” B.

pb – pares de base.

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDF – *peptide dispersing factor*.

PDP1 $\epsilon$  - *PAR domain protein 1 $\epsilon$* .

PER - proteína Period.

*per*- RNAm ou gene *period*.

*per*<sup>+</sup> - alelo selvagem do gene *period*.

*per*<sup>0</sup> – alelo mutante essencialmente arritmico do gene *period*.

*per*<sup>L</sup> - alelo mutante com período endógeno longo (*long*) do gene *period*.

*per*<sup>S</sup> - alelo mutante com período endógeno curto (*short*) do gene *period*.

poli-Q - repetição de glutaminas.

PP2a – proteína Fosfatase 2A.

qPCR – PCR quantitativo.

RNAm – RNA mensageiro.

Rpm – rotações por minuto.

SGG – proteína Shaggy.

s-LN<sub>v</sub> - pequenos neurônios ventro-laterais.

*tim* - mRNA ou gene *timeless*.

TIM - proteína Timeless.

*timgal4* - Gal4 sob o controle do promotor *tim*.

TM3Sb – balanceador para o terceiro cromossomo com marcador dominante que confere cerdas curtas.

UAS – *upstream activation site* (sítio de ativação à montante).

*uasdmcyc* – construção em que o gene *cycle* de *D. melanogaster* é controlado pela região UAS.

*uasllcyc* – construção em que o gene *cycle* de *L. longipalpis* é controlado pela região UAS.

V/P-boxes – sítios alvo de VriIle e Pdp1ε.

*Vri* - mRNA ou gene *vriIle*.

VRI - proteína vriIle.

*w<sup>-</sup>* – gene *white*.

τ – tau (indicador de período).

ZT – *Zeitgeber*. Sincronizador ambiental.

+/*Clk<sup>Jrk</sup>* - *Clk<sup>Jrk</sup>* heterozigoto.

+/*cyc<sup>0</sup>* - *cyc<sup>0</sup>* heterozigoto.

+/*cyc<sup>0</sup>*, *Clk<sup>Jrk</sup>* – duplo mutante heterozigoto.

+/*timgal4* ; +/*uasllcyc*, *Clk<sup>Jrk</sup>* - *Clk<sup>Jrk</sup>* heterozigoto, expressando *llcyc* sob o controle de *timgal4*.

+/*timgal4*; +/*uasllcyc*, *Clk<sup>Jrk</sup>*, *cyc<sup>0</sup>*- duplo mutante heterozigoto, expressando *llcyc* sob o controle de *timgal4*.

# 1. Introdução

## 1.1. Ritmo circadiano

As interações entre o sol, a terra e a lua e tem como consequência uma série de ciclos ambientais, como o dia e a noite, fases da lua, estações do ano e oscilação das marés. A princípio, parece “natural” que os organismos também apresentem ritmos no metabolismo e comportamento, como uma mera resposta aos ciclos ambientais (Moore-Ede *et al.*, 1984).

Uma das primeiras tentativas de demonstrar que os ciclos ambientais eram as forças dirigentes que estariam por trás dos diversos ciclos biológicos foi feita pelo historiador Andróstenes de Thasos, acompanhante das explorações de Alexandre, O Grande (Schildknecht, 1983). Thasos foi o primeiro a descrever o ciclo diário de atividade/reposo das folhas de tamarindo (*Tamarindos indicus*) em 325 a.C. e, desta forma, deu início a uma linha de pesquisa em plantas (Marques & Menna-Barreto, 2003).

Quase dois mil anos depois, em 1729, o astrônomo francês chamado Jean Jacques D’Mairan, em um trabalho com a planta *Mimosa pudica* demonstrou que o movimentos foliares dessa planta não eram uma simples resposta ao ambiente, mas que estariam sob o controle de um mecanismo endógeno. D’Mairan percebeu que essa planta fechava suas folhas durante a noite e as mantinha abertas durante o dia. Após colocar estas plantas dentro de uma caixa onde elas não poderiam perceber a luz (Figura 1.1), ele observou que no momento correspondente ao dia subjetivo (ou seja, onde deveria haver luz) as plantas abriram as folhas e no

correspondente à noite subjetiva elas se fecharam. Com esse experimento simples, D'Mairan sugeriu pela primeira vez que havia um mecanismo endógeno que controlava o ritmo de atividade e repouso dos organismos (Saunders, 2002).



**Figura 1.1.** Representação gráfica do experimento de D'Mairan. As plantas da espécie *Mimosa pudica* naturalmente abrem suas folhas durante o dia e fecham durante a noite. D'Mairan utilizou uma caixa para isolar as plantas de qualquer pista em relação à luz. Ele percebeu que durante o dia subjetivo as plantas abriram suas folhas, mesmo isoladas dentro da caixa, e durante a noite subjetiva elas se fechavam. Com esse experimento D' Mairan mostrou a natureza endógena dos ritmos circadianos (Retirado de Amoretty et al., 2013).

Esse mecanismo endógeno evidenciado por D'Mairan corresponde a um tipo de ritmo biológico conhecido como “ritmo circadiano” (do latim *circa*= cerca ; *dien*= dia), que se manifesta em diversos aspectos da fisiologia e comportamento,

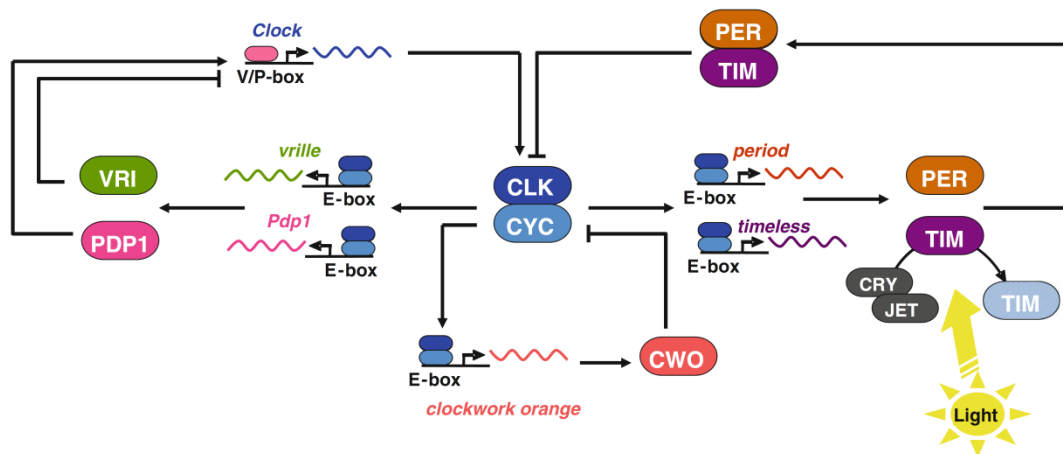
não apenas de plantas, mas da maioria dos seres vivos, com periodicidade próxima a 24 horas (Saunders, 2002).

Diversos trabalhos sucederam ao de D'Mairan para determinar as propriedades do relógio circadiano. Quase cem anos depois, trabalhando possivelmente com a mesma planta utilizada por D'Mairan, August De Candolle observou que o movimento das folhas variava entre 22-23 horas em condições constantes, diferente do ciclo de 24 horas observado na natureza. De Candolle e em seguida Bünning (1967) mostraram que os ritmos circadianos eram próximos, e não exatamente, 24 horas.

Atualmente, se sabe que o relógio circadiano é o mecanismo endógeno que controla os ritmos circadianos e possui três propriedades principais. A primeira delas mostra que mesmo em condições ambientais constantes, onde o organismo é mantido isolado de qualquer pista ambiental, o ritmo é mantido com duração próxima a 24 horas (daí o nome circadiano; do latim: *circa*= cerca de + *diem*= dia) (Marques & Menna-Barreto, 2003). A segunda propriedade diz respeito a sincronização do relógio endógeno com os ciclos ambientais. Embora o relógio possa manter o ritmo em livre curso, a sincronização permite que o organismo se prepare para as transições, organizando os recursos necessários, fazendo com que, nestes casos, ele tenha a duração exata de 24 horas. A terceira propriedade do relógio é a compensação térmica, que permite que um organismo mantenha o seu período endógeno quando ocorre variação de até 10°C na temperatura (Marques & Menna-Barreto, 2003).

## 1.2. Controle molecular do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster*

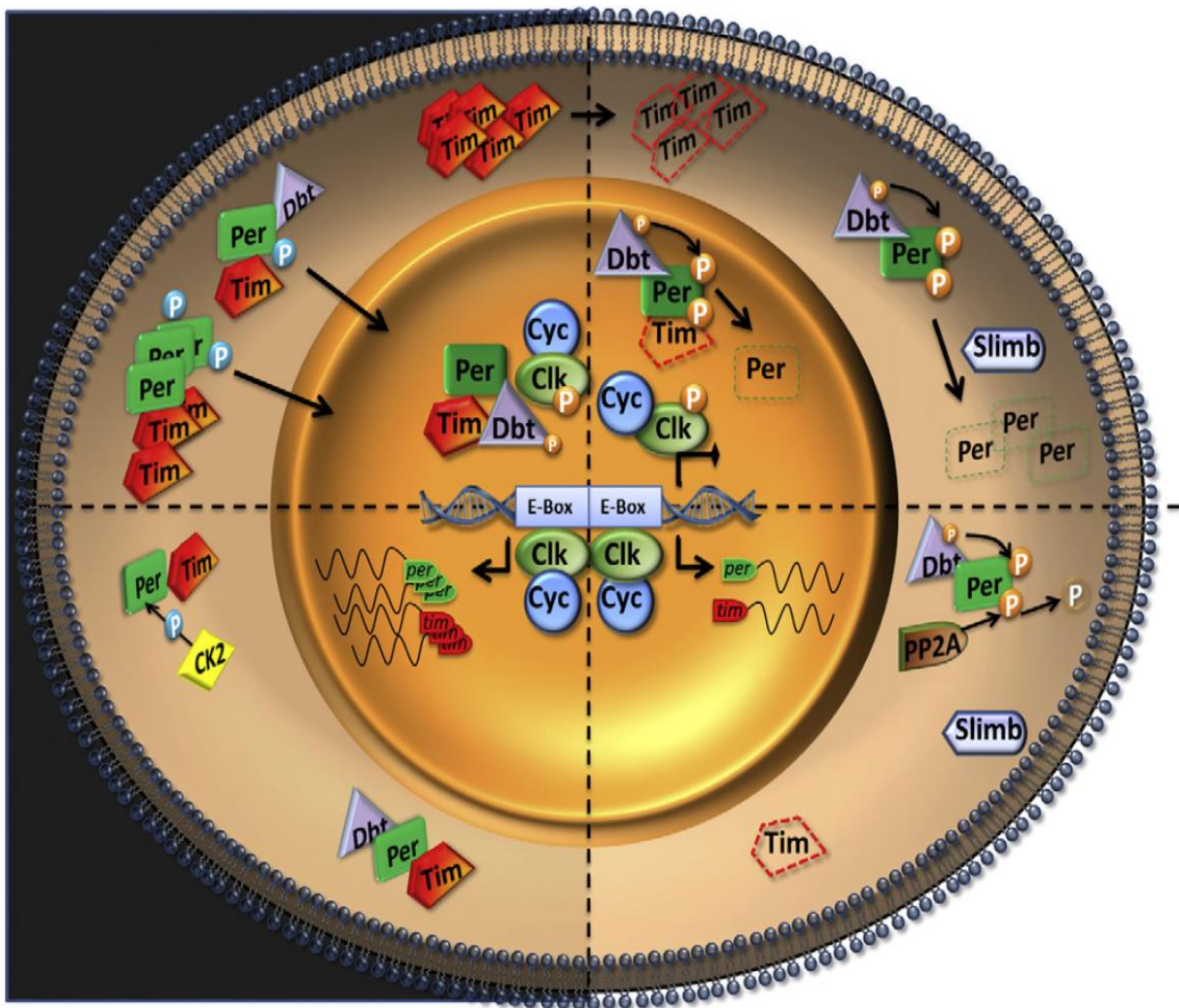
Até a década de 1970 as propriedades do relógio já eram bem conhecidas, porém não haviam sido descritos como de fato esse mecanismo endógeno controlava o comportamento e a fisiologia dos organismos. Konopka e Benzer (1971), em um trabalho com *Drosophila melanogaster*, caracterizaram o primeiro gene do relógio que chamaram de *period*. Desde então, inúmeros trabalhos foram publicados mostrando o quão complexo é o funcionamento do relógio, onde diversos genes e proteínas interagem através de alças de autoregulação negativa para gerar o ritmo, e de que forma esse mecanismo responde a sinais externos, como a luz, por exemplo (Figura 1.2) (revisado em Tomioka et al., 2012).



**Figura 1.2.** Esquema geral do funcionamento molecular do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster*, formado por três alças de autoregulação negativa. Esse mecanismo tem a capacidade de responder a sinais externos, como a luz por exemplo (Retirado de Tomioka, 2012).



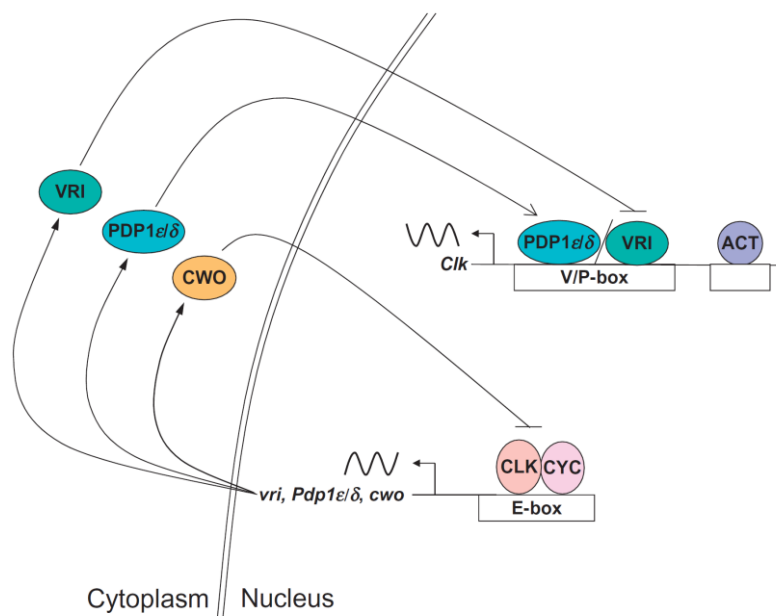
Em *D. melanogaster*, na primeira alça regulatória, os dois fatores de transcrição da família bHLH/PAS, CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), formam um heterodímero e se ligam no E-BOX (motivo CACGTG) da região promotora dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) no meio do dia, para ativar a transcrição desses genes (Allada et al., 1998; Darlington et al., 1998; Rutila et al., 1998; Hardin et al., 2000) (Figura 1.3). No final da tarde para o início da noite as proteínas PER e TIM começam a se acumular no citoplasma, com um atraso de aproximadamente 6-8h entre o pico de transcrição do RNAm e o pico de tradução da proteína, causado pela regulação pós traducional sofrida por PER e TIM (Price et al., 1998). Esta regulação pós traducional envolve as proteínas DOUBLETIME (DBT), SHAGGY (SGG) e CASEIN KINASE II (CKII). Quando PER não está ligado a TIM, é fosforilada pela quinase DBT, depois sofre ubiquitinação por SLIMB, e desta forma, é levada a degradação via proteossomo (Price et al., 1998; Grima et al., 2002). Ao mesmo tempo, a quinase SGG também fosforila TIM para degradação (Martinek et al., 2001). Esse processo é contrabalanceado pela fosfatase 2A (PP2A) (Sathyanarayanan et al., 2004). No entanto, quando as proteínas PER e TIM se acumulam em altos níveis, formam um dímero estável. A entrada de PER e TIM no núcleo é mediada por CKII, que fosforila PER, associado a TIM, a DBT ou a ambos formando um complexo (Shafer et al., 2002; Akten et al., 2003). Uma vez no núcleo, o complexo PER-TIM-DBT interage com CLK-CYC através da ligação de CLK com PER. Essa ligação causa a hiperfosforilação de CLK o que faz com que o complexo se desprenda do DNA, inibindo desta forma a transcrição de *per* e *tim* (Lee et al., 1999; Lin et al., 2002; Revisado por Peschel & Helfrich-Förster, 2011 ; Hardin, 2011).



**Figura 1.3.** Diagrama esquemático do mecanismo molecular da primeira alça do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster*. A figura mostra o núcleo e o citoplasma de uma célula do relógio. Cada quarto corresponde a seis horas do dia circadiano, onde o lado esquerdo representa a fase escura (escotofase) e o lado direito a fase clara (fotofase). A letra “P” representa fosfato/fosforilação; a seta indica transferência de fosfato. Proteínas com contorno pontilhado indicam degradação via proteossomo (Retirado de Peschel & Helfrich-Förster, 2011).

O dímero CLK-CYC atua também na segunda alça regulando a expressão cíclica do RNAm de *Clk* de uma forma indireta, mas interligada com a primeira alça. A transcrição de *Clk* ocorre de forma cíclica acentuada por um

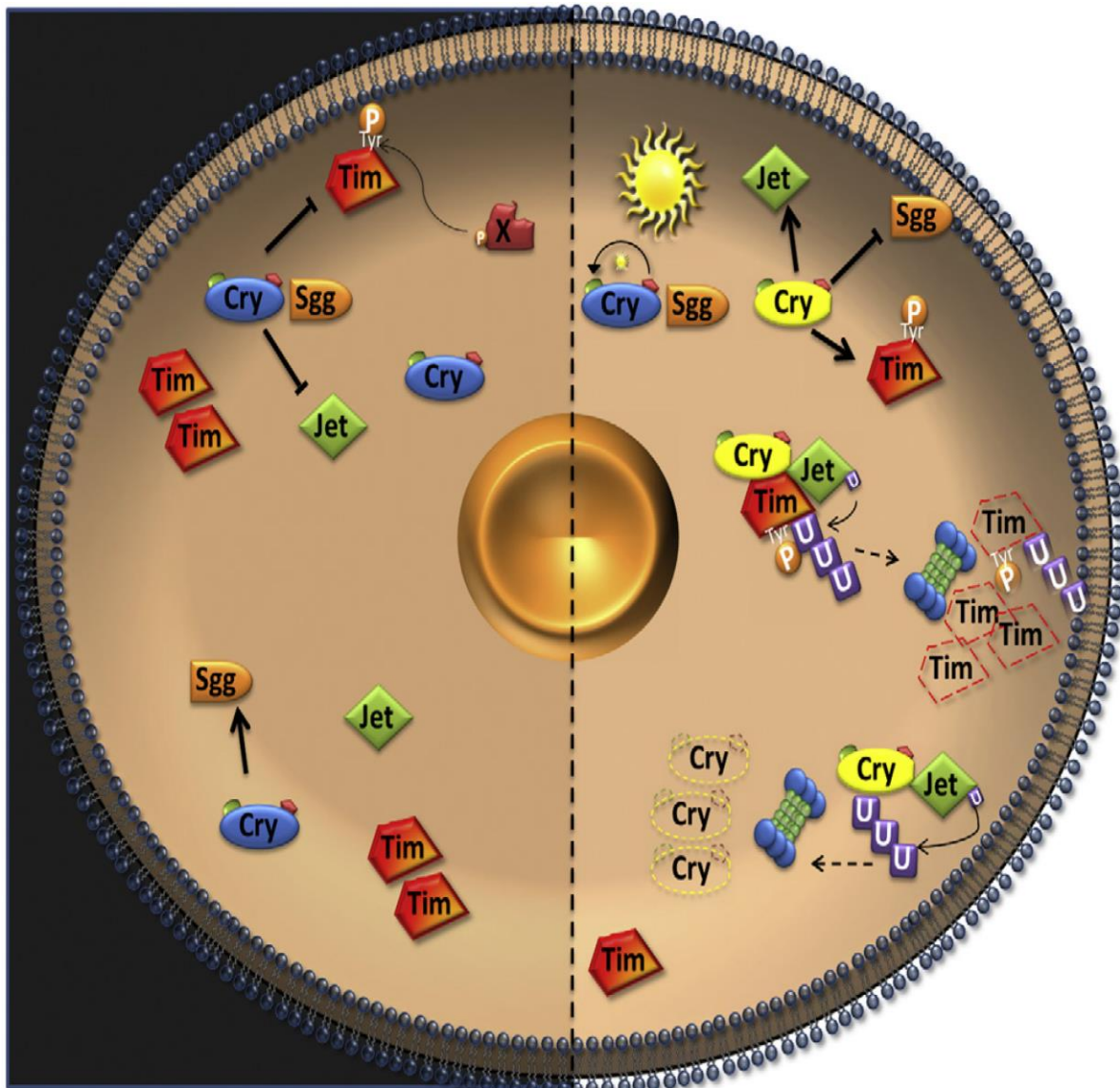
ativador independente do relógio (ACT) (Figura 1.4). O dímero CLK-CYC ativa a transcrição das proteínas zíper de leucina VRILLE (VRI) e PAR DOMAIN PROTEIN 1(PDP1). Essas proteínas competem pela ligação ao sítio V/P localizado na região promotora de *Clk*, onde PDP1 ativa a transcrição de *Clk* e VRI atua na fase oposta à de PDP1 inibindo a transcrição de *Clk* (Revisado por Peschel & Helfrich-Förster, 2011; Hardin, 2011).



**Figura 1.4.** Diagrama da segunda e terceira alças do relógio circadiano de *D. melanogaster*. São representados dois compartimentos, setas indicam deslocamento das proteínas; setas cortadas indicam repressão da transcrição (Retirado de Hardin, 2011).

O dímero CLK-CYC também regula uma terceira alça formada pelo gene *clockwork orange (cwo)*, onde este gene é ativado pelo heterodímero CLK-CYC na região E-box de seu promotor e atua como repressor de *per* e *tim*. Essa alça de retroalimentação negativa seria importante na amplitude da oscilação circadiana dos genes do relógio (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Hardin 2011).

Embora o mecanismo do relógio seja auto-sustentável, ele pode ser sincronizado pela luz, temperatura, interações sociais e qualquer outra variável ambiental, obedecendo uma certa hierarquia. Porém, de todos os ciclos ambientais conhecidos, definitivamente a luz, causada pelo movimento da Terra em torno de seu próprio eixo, é o mais previsível deles. A sincronização ou arrastamento do relógio pela luz, é realizado pela proteína *Cryptochrome (dCRY)* (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). O mecanismo pelo qual o relógio é diariamente ajustado pela luz ainda não foi completamente esclarecido, porém já se sabe que a luz causa uma mudança conformacional em dCRY, que desta forma é capaz de reconhecer TIM ligado e fosforilado por uma tirosinase. Esse complexo é detectado por JETLAG (JET) e, como consequência, TIM sofre ubiquitinação e é levado para degradação via proteossomo. A degradação de CRY também é mediada por JET, que através de um processo de ubiquitinação leva CRY para degradação via proteossomo, entretanto, isso ocorre posterior a degradação de TIM (Figura 1.5). Sem TIM, a proteína PER também é fosforilada pela DBT e degradada, e desta forma o relógio é reiniciado (Revisado por Peschel & Helfrich-Förster, 2011; Hardin, 2012). Durante a noite, Shaggy (SGG) pode se ligar a CRY estabilizando-o, nessa fase não há interação de CRY com JET e TIM (Figura 1.5) (Revisado por Peschel & Helfrich-Förster, 2011 ; Hardin, 2011).

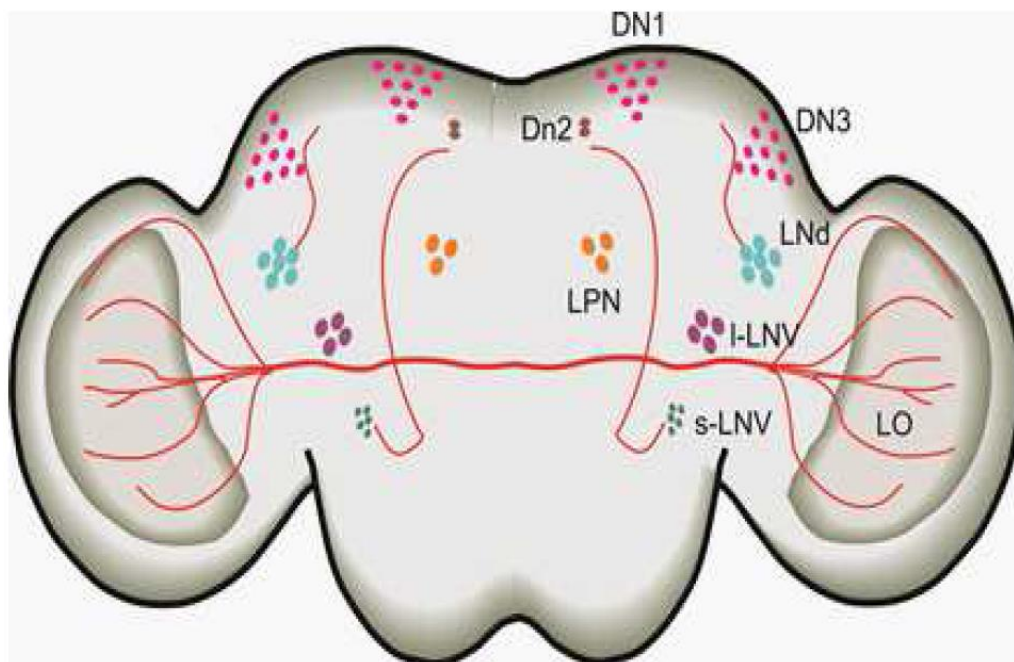


**Figura 1.5.** Esquema do ajuste do relógio pela luz. O lado esquerdo representa a escotofase (noite) e o lado direito a fotofase (dia). CRY inativo aparece na cor azul enquanto CRY ativo, na cor amarela. Setas inteiras indicam interação entre proteínas; setas cortadas representam ausência de interação. Linhas pontilhadas indicam eventos de degradação; setas em curva indicam transferência de fosfato (P), ubiquitina (U) ou luz (sol) (Retirado de Peschel & Helfrich-Förster, 2011).

O mecanismo molecular que controla a ritmicidade circadiana é bem caracterizada em *Drosophila* e em muitos organismos, porém os genes com o potencial de controlar o “output” como atividade locomotora, sono e metabolismo, por exemplo, ainda não são bem conhecidos (Benito et al., 2009). No entanto, se sabe que os principais reguladores desse processo são fatores de transcrição de diferentes vias de sinalização, controlados pela expressão cíclica de genes do relógio circadiano (Keegan et al, 2007).

### **1.3. Controle celular do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster***

Em *D. melanogaster* foram identificados os grupos celulares requeridos para o funcionamento do relógio circadiano central. Esses neurônios, aproximadamente 300, estando 150 em cada hemisfério cerebral, são classificados de acordo com seu tamanho, expressão de genes do relógio e posição anatômica (Peschel & Helfrich-Förster, 2011). São três grupos dorsais (DN1, DN2 e DN3) e quatro grupos laterais (LNd, l-LNv, LPN, and s-LNv) (Figura 1.6) (Peschel e Helfrich-Förster, 2011). Além dessa classificação mais geral, a função, o conteúdo protéico e a localização podem ser utilizados para subdividir os neurônios. O fotorreceptor do relógio circadiano CRY é expresso nos neurônios dorsais 1 (DN1). O neuropeptídeo PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF) é expresso somente nos pequenos e grandes neurônios laterais (s-LNvs e l-LNvs). Os neurônios laterais dorsais (LNds) expressam outros neurotransmissores como acetilcolina, por exemplo. O grupo neuronal relacionado ao arrastamento pela temperatura são os neurônios laterais (LPN) e os dorsais (DN1, DN2 e DN3) (Miyasako et al., 2007; Peschel & Helfrich-Förster, 2011).



**Figura 1.6.** Representação de um corte transversal do cérebro de *D. melanogaster* mostrando a disposição dos grupos neuronais requeridos para o funcionamento do relógio circadiano (Retirado de Amoretty et al., 2013).

#### 1.4. O relógio circadiano de *Lutzomyia longipalpis*

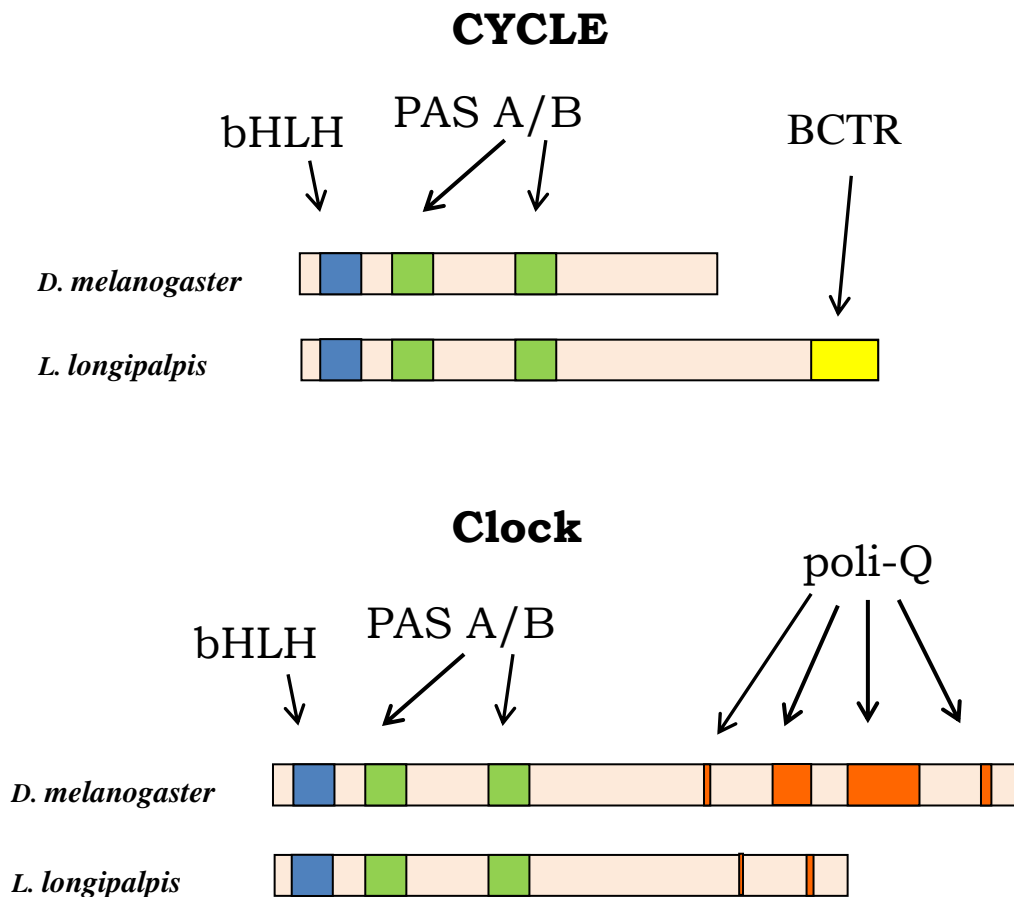
O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é um díptero da família Psychodidae com grande importância médico-veterinária, por ser o principal vetor da *Leishmania*

*infantum*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (AVL) (Soares & Turco, 2003; Lainson & Rangel, 2005).

Utilizando *D. melanogaster* como modelo, o grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (LABIMI), liderados pelo Dr Alexandre Afranio Peixoto, caracterizou os principais genes do relógio circadiano de *Lutzomyia longipalpis*. Essa abordagem revelou diferenças marcantes entre *D. melanogaster* e *L. longipalpis*, principalmente no dímero CLK-CYC.

A proteína CLK de *D. melanogaster* possui o domínio bHLH de ligação ao DNA, os domínios de interação entre proteínas PAS A e B, e uma repetição de glutaminas (poli-Q) na região C terminal responsável pela ativação transcricional (Allada *et al.*, 1998). O seu homólogo em *L. longipalpis* apresenta os domínios bHLH e PAS muito conservados entre as duas espécies, contudo, a região de transativação encontra-se bastante reduzida (Gesto, 2006) (Figura 1.7). Por outro lado, a proteína CYC de *L. longipalpis* possui uma região de ativação chamada de BCTR, encontrada também nos seus ortólogos em mamíferos, e alguns outros insetos (Meirelles-Filho *et al.*, 2006a; Sandrelli *et al.*, 2008), mas que possivelmente foi perdida em *D. melanogaster* (Rutila *et al.*, 1998) (Figura 1.7).

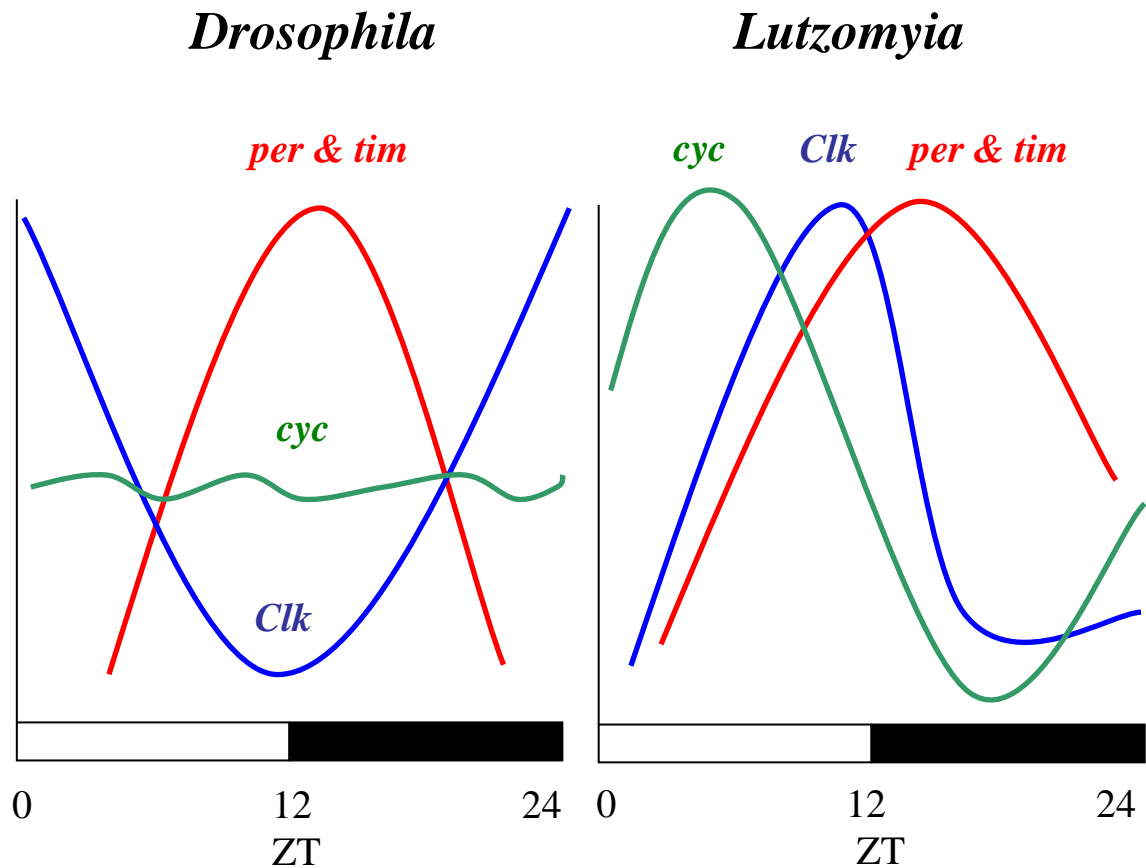




**Figura 1.7.** Diagrama comparativo dos domínios funcionais presentes nas proteínas CLOCK e CYCLE de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. Nas duas espécies, CYC e CLK compartilham os grupamentos bHLH (ligação ao DNA), PAS-A e PAS-B (interação entre proteínas) sendo muito conservados entre elas. No entanto, somente em CYC de *L. longipalpis* está presente o domínio de transativação BCTR (*bmall C-terminal region*, região C-terminal de Bmall, proteína ortóloga de CYC em mamíferos). Em *D. melanogaster* o domínio de ativação está presente em CLK, e é formado por uma grande repetição de glutaminas (poli-Q).

Meirelles-Filho e colaboradores (2006a) evidenciaram também diferenças no perfil de expressão dos genes do relógio entre *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. Em *D. melanogaster*, a expressão de *cyc* se mantém constitutiva ao longo das 24h (Rutila et al, 1998); no entanto *per* e *tim* tem expressão cíclica em antifase a *Clk* (So & Rosbash, 1997; Goto & Denlinger, 2002; Hall, 2003) (Figura 1.8). Em *L. longipalpis*, todos os genes da primeira alça tem expressão cíclica, incluindo *cyc*. Além disso, *cyc* tem o pico de expressão no início da manhã, *Clk* tem

o pico de expressão na transição claro-escuro e *per* e *tim* tem pico de expressão no início da noite (Meirelles-Filho *et al.*, 2006a,b).

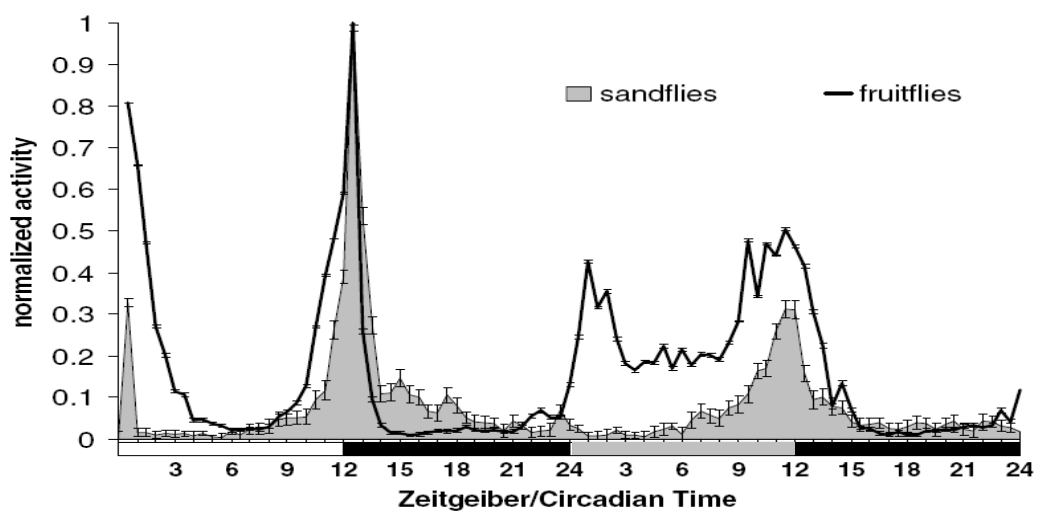


**Figura 1.8.** Diagrama que representa a comparação do perfil de expressão dos genes da primeira alça do relógio circadiano de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. Barras horizontais brancas representam a fotofase (fase clara), barras pretas representam a escotofase (fase escura). Enquanto *per* e *tim* de *L. longipalpis* ciclam como em *D. melanogaster*, com pico de abundância em torno do início da noite, o nível máximo de *Clock* de *L. longipalpis* ocorre em anti-fase ao de *D. melanogaster*. Além disso, os níveis de *cycle* de *D. melanogaster* se mantêm constitutivos, e em *L. longipalpis* os níveis ciclam, sendo mais abundante no meio do dia (Adaptado de Alvarenga *et al.*, 2007).

As diferenças no comportamento entre *D. melanogaster* e *L. longipalpis* também foram observadas. Meireles-Filho (2006b) e colaboradores testaram a atividade locomotora de *L. longipalpis* e compararam com *D. melanogaster*, utilizando um monitor de atividade locomotora de *Drosophila* (Trikinetics ink.). Com essa abordagem foi observado que *D. melanogaster* apresentou um padrão bimodal diurno em ciclos de claro-escuro (LD 12:12) enquanto que, nas mesmas condições,

*L. longipalpis* apresentou um padrão de atividade locomotora essencialmente unimodal, com pico no horário correspondente ao crepúsculo e mais atividade noturna (Figura 1.9). No primeiro dia em escuro constante (DD) esta diferença entre as duas espécies foi mantida, com *D. melanogaster* apresentando muito mais atividade no “dia subjetivo” (horário em que as luzes estariam ligadas) do que *L. longipalpis* (Meireles-Filho *et al.*, 2006b) (Figura 1.9).

Nesse projeto, através de uma análise *in vivo*, utilizamos o sistema binário UAS-GAL4 para dirigir a expressão dos genes *cyc* de *L. longipalpis* (*llyc*) em moscas transgênicas geradas no laboratório. Com esse sistema e o uso de mutantes de *D. melanogaster*, tentamos reconstruir, em parte, a primeira alça do relógio circadiano de *L. longipalpis*. Assim, foi possível investigar diversos aspectos do funcionamento desses fatores de transcrição, inclusive se eles trazem alguma informação espécie-específica em relação ao comportamento circadiano.



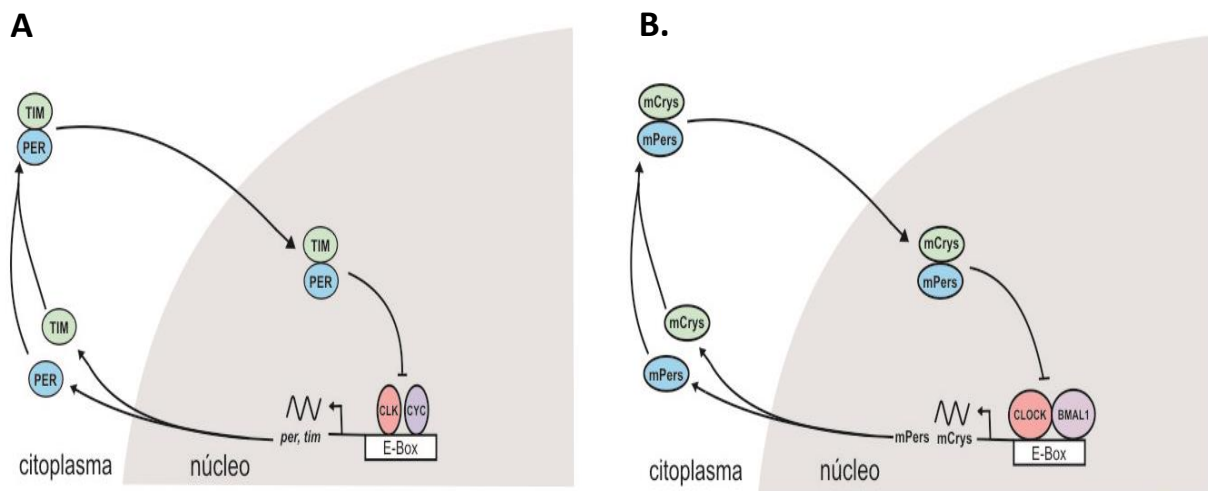
**Figura 1.9.** Análise da atividade locomotora de *L. longipalpis* (sandflies) e *D. melanogaster* (fruitflies). O gráfico mostra a atividade normalizada durante um dia de LD 12:12 seguido de um dia de DD. Barras representam erro padrão. Barra horizontal branca representa o dia, barra horizontal cinza representa o “dia subjetivo”, barras horizontais pretas representam a noite e “noite subjetiva”. Fonte: Meireles-Filho *et al.*, 2006b.

## 1.5. Evolução do relógio circadiano

Nos últimos quinze anos têm surgido trabalhos que caracterizaram genes do relógio circadiano, homólogos aos que têm sido estudados em *D. melanogaster* desde a década de 1970, em diferentes espécies. Essa abordagem apoia a hipótese de que o relógio circadiano, possivelmente, teria surgido de maneira independente pelo menos três vezes ao longo da evolução: em plantas, em cianobactérias e nos metazoários (Rosbash, 2009). O mecanismo central do relógio é conservado entre diversas espécies de metazoários que habitam o planeta, onde, em função do movimento de rotação, todos estão submetidos ao ciclo de claro e escuro.

A maioria dos genes do relógio circadiano foi descrita em *D. melanogaster* e *Mus musculus* e comparações entre os componentes do relógio dessas espécies mostraram muitas similaridades entre eles, além de algumas diferenças (Yu & Hardin 2006).

Nos dois sistemas, CLK-CYC em *D. melanogaster* e CLK-BMAL1 em mamíferos ativam a transcrição de seus repressores: *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) em moscas e *period1* (*mper1*) *period2* (*mper2*), *cryptochrome1* (*mcry1*) e *cryptochrome2* (*mcry2*) em camundongos (Figura 1.10) (Hardin & Panda, 2013). De forma semelhante ao que ocorre em *D. melanogaster*, onde o dímero formado por PER-TIM se acumula no citoplasma e entra no núcleo para reprimir suas transcrições indiretamente, o mesmo ocorre em mamíferos, com a diferença que o dímero neste caso é formado por mPER-mCRY. Assim, no início da manhã essas proteínas são degradadas e um novo ciclo tem início (revisado por Hardin & Panda, 2013).



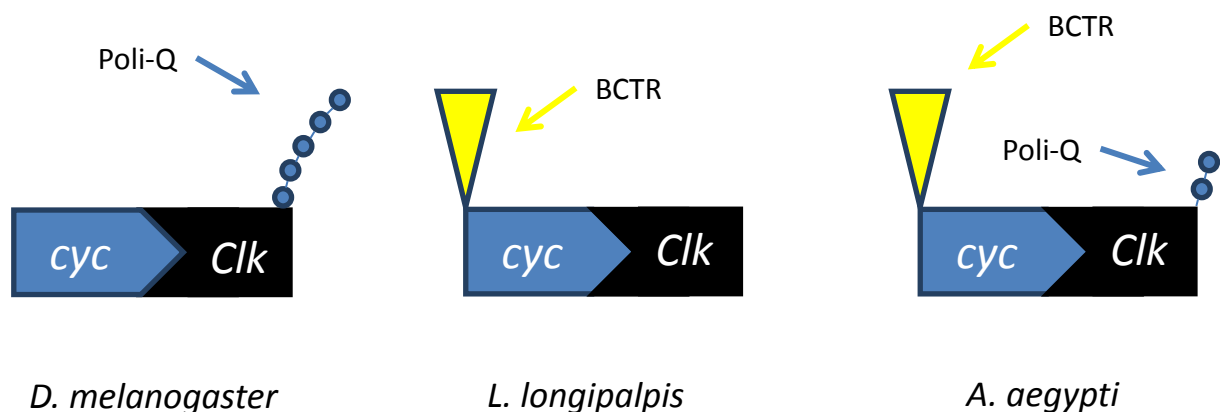
**Figura 1.10.** Comparação entre a primeira alça do relógio circadiano de *D. melanogaster* e o mecanismo de mamíferos. **(A)** Primeira alça do relógio circadiano de *D. melanogaster*. **(B)** Primeira alça regulatória do relógio circadiano de mamíferos (Modificado de Hardin & Panda, 2013).

As comparações iniciadas entre *D. melanogaster* e mamíferos foram estendidas para outros insetos a medida que seus ortólogos foram gradativamente sendo identificados. Os insetos correspondem ao grupo de animais mais bem adaptados do planeta. Ocupam com sucesso os mais diversos e inóspitos ambientes, e o número de espécies conhecidas é em torno de três vezes maior que todos os outros grupos de animais combinados (Brusca & Brusca, 2003). A maioria dos insetos apresenta ritmos diários em diversos aspectos do seu comportamento, como hematofagia, postura de ovos, ciclos de desenvolvimento e atividade locomotora (Saunders, 2002).

Os dípteros *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) e *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) são potencialmente interessantes devido a sua importância médico-veterinária, uma vez que são vetores do vírus Dengue e da

*Leishmania infantum* nas Américas respectivamente (Consoli; Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lima-Câmara et al., 2006; Soares; Turco, 2003). O hábito hematofágico das fêmeas é a principal forma de transmissão de patógenos.

Usando *D. melanogaster* como modelo foram identificados similaridades e diferenças entre as proteínas da primeira alça do relógio circadiano, principalmente no dímero CLK-CYC. A proteína CYC de *L. longipalpis* e *Ae. aegypti* apresenta uma cauda de ativação do tipo BCTR (*Bmal C-Terminal region*) com grande identidade com a de mamíferos e alguns outros insetos, enquanto seu ortólogo em *D. melanogaster* não apresenta esse domínio funcional (Figura 1.11) (Meirelles-Filho et al, 2006b). Por outro lado, o domínio de ativação poli-Q, presente na proteína CLK de *D. melanogaster*, encontra-se reduzido em *Ae. aegypti* em relação a *D. melanogaster* e ainda menor em *L. longipalpis* (Figura 1.11) (Gesto, 2006).

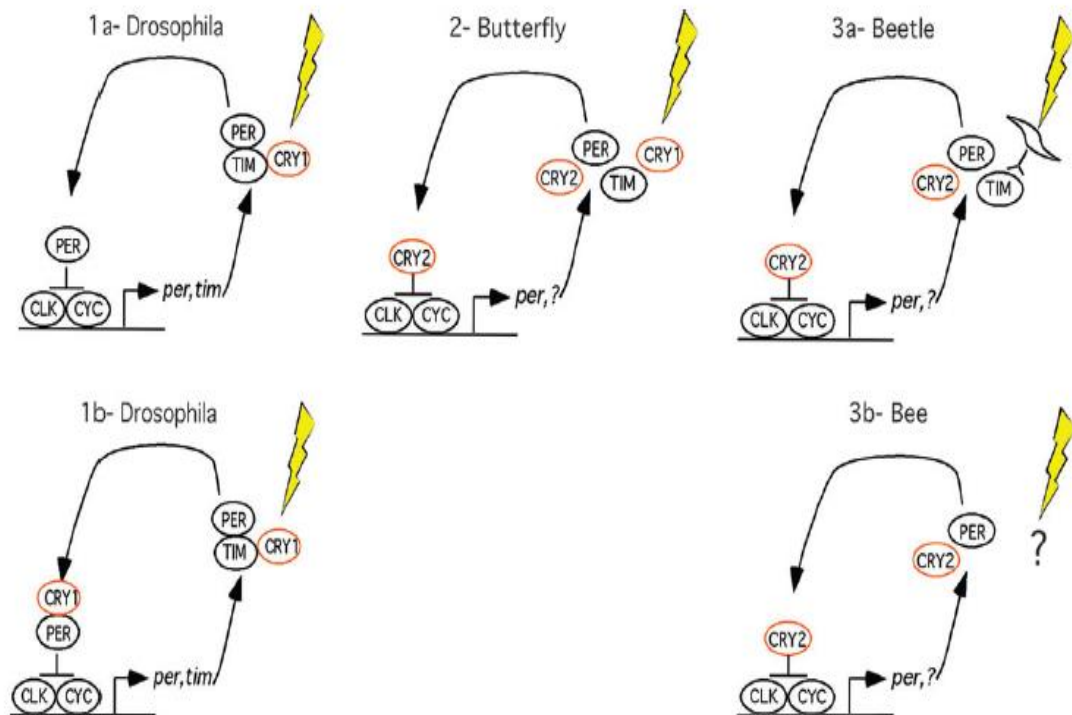


**Figura 1.11.** Diagrama comparativo do dímero CLK-CYC de *D. melanogaster*, *L. longipalpis* e *A. aegypti* e alguns de seus domínios funcionais. A proteína CYC está representada em azul; CLK em preto. Os domínios poli-Q (repetição de glutaminas) está representado por círculos e BCTR por um triângulo amarelo.

Além do dímero CLK-CYC, o gene *cryptochrome* (*cry*) tem despertado a curiosidade de muitos pesquisadores. Em mamíferos existem dois *cry* (*mcry1* e *mcry2*), que funcionam na alça principal do relógio, formando dímeros com PER para reprimir a transcrição ativada por CLK-BMAL1, através de sua ligação ao sítio BCTR (Griffin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999).

Em insetos, uma análise comparativa realizada por Yuan e colaboradores (2007) mostrou a evolução do gene *cry*. Eles observaram que *D. melanogaster* tem apenas a proteína dCRY ou CRY1, responsável pela sincronização do relógio de uma maneira dependente de luz. No entanto, Lepidópteras possuem duas proteínas CRY (CRY1 e CRY2), onde CRY1 atuaria de uma forma dependente de luz, tal como em *D. melanogaster* e CRY2 participaria da alça principal com repressor transcricional. Outras espécies como *Apis mellifera* e *Tribolium castaneum* possuem apenas CRY2 (Yuan *et al.*, 2007; Sandrelli *et al.*, 2008), que atua como repressor transcricional enquanto a molécula que atua de maneira dependente da luz ainda não foi descrita. Uma observação decorrente dos tipos de CRYs apresentados pelos organismos é que as espécies que possuem o domínio BCTR necessariamente também expressam CRY2 (CRYm) e podem ou não apresentar CRY1 (dCRY) (Yuan *et al.*, 2007; Sandrelli *et al.*, 2008). Por outro lado, em *D. melanogaster* que apresenta apenas CRY1, o ativador é o domínio poli-Q presente em CLK. No entanto, das três espécies (*Mus musculus*, *Apis mellifera* e *Anopheles gambiae*) que apresentaram simultaneamente os domínios poli-Q e BCTR, apenas *Anopheles gambiae* apresentou os dois CRYs. Contudo, o poli-Q desses organismos possivelmente deve ter uma função secundária, uma vez que ele se encontra reduzido em relação ao de *D. melanogaster* (Young *et al.*, 2007). Após

reunir todas essas informações acerca do mecanismo molecular de diversos organismos, Yuan e colaboradores (2007) propuseram um modelo de como funcionariam o relógio de diferentes insetos (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Representação esquemática dos possíveis modelos de funcionamento do relógio circadiano de insetos. **(1)** O primeiro modelo, representa o relógio central de *D. melanogaster*, onde CRY1 participa tanto da sincronização do relógio de uma maneira dependente de luz **(1a)** quanto, da repressão de CLK-CYC em relógios periféricos **(1b)**. O segundo esquema, que dá o exemplo de lepidóptera, mostra a maquinaria de um inseto que teria simultaneamente CRY1 e CRY2, onde CRY1 teria uma função dependente de luz e CRY2 seria o parceiro de PER na repressão de CLK-CYC **(2)**. O terceiro modelo, similar a besouros e abelhas representa insetos que possuem apenas CRY2, que funcionaria como repressor de CLK-CYC, e não se conhece a molécula que sincronizaria o relógio pela luz (Retirado de Yuan et al., 2007).

O modelo sugere que existe uma relação intrínseca entre a evolução das criptocromos e dos fatores transcricionais CLK e CYC. Neste trabalho,



iniciamos uma investigação dos aspectos relacionados à evolução e conservação funcional da principal alça regulatória do relógio circadiano de insetos. Para isto, utilizamos uma abordagem evolutiva comparando sequências de diferentes grupos de insetos para investigar as transformações sofridas por *Clk-cyc* ao longo do processo evolutivo dos insetos, inferindo, desta forma, qual seria o caráter apomórfico ou pleisiomórfico desses genes.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar a conservação funcional e a evolução dos genes da primeira alça regulatória do relógio circadiano de *D. melanogaster* e *Lutzomyia longipalpis*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a função do gene *cyc* de *Lutzomyia longipalpis* através do sistema UAS-GAL4, em mutantes nulos para os genes *Clk* e *cyc* de *Drosophila melanogaster*.
- Investigar a evolução das proteínas ortólogas a CLK / CYC em insetos.
- Investigar se existe alguma informação espécie-específica em relação ao comportamento circadiano nas proteínas estudadas de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 - Insetos

Os espécimes de *Lutzomyia longipalpis* utilizados neste projeto foram provenientes de colônia iniciada com insetos da Gruta da Lapinha, localizada no município de Lagoa Santa, Minas Gerais. Esse material foi cedido pela Dra. Nataly Araújo de Souza (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ).

As linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas foram:

- a) Canton S - linhagem selvagem;
- b) *cycle*<sup>0</sup> - mutante nulo para o gene *cycle*;
- c) *Clock*<sup>Jrk</sup> - mutante nulo para o gene *Clock*;
- d) *timGal4/CyO* - linhagem transgênica que possui o ativador transcricional GAL4 sob o controle do promotor do gene *timeless*, balanceadas no segundo cromossomo contendo o marcador CyO. Esta linhagem ativa a expressão de GAL4 em todas as células requeridas para o funcionamento do relógio circadiano de *D. melanogaster*.
- e) *uasdmcyc* - gene *cyc* de *D. melanogaster* controlado pela região UAS – *Upstream Activation Site*, sequencia alvo de GAL4.
- f) *uasllcyc* – região codificante do gene *cyc* de *L. longipalpis* controlado pela região UAS.
- g) *Clk*<sup>Jrk</sup>, *cyc*<sup>0</sup> – duplo mutante nulo para os genes *Clock* e *cycle*.

As linhagens citadas anteriormente (a - d) foram doadas pelo Dr. Charalambos Kyriacou (*Department of Genetics, University of Leicester, Reino*

Unido), a linhagem (e) foi disponibilizada pelo Dr. Paul Hardin (*Department of Biology and Center for Biological Clock Research, Texas A&M University*) e as linhagens (f - g) foram produzidas durante minha dissertação de mestrado (Amoretty, 2010).

### **3.2 - Manutenção dos Insetos**

As moscas foram mantidas em tubos plásticos reutilizados (tubo de centrifuga lavados e esterilizados) ou garrafas de vidro de 400ml, contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster* feito a base de aveia ou fubá. Em intervalos de quinze dias as moscas eram transferidas para tubos ou garrafas novos.

#### **3.2.1 – Meios de cultura e postura de ovos de Drosophila**

##### **A) Meio de cultura a base de aveia**

Ingredientes:

Bacto agar	18,28g
Extrato de levedura	52g
Aveia em flocos finos	65g
Melado	128,8ml
Água destilada	1752ml

Os ingredientes eram misturados e cozidos por aproximadamente 10 minutos em forno de micro-ondas. Posteriormente a mistura era esfriada em banho-

maria até atingir a temperatura de 60°C. Quando a mistura atingia esta temperatura era acrescida de 27,6ml de fungicida 10% (Nipagin® - Pharma Special) e de 10ml de ácido propiônico. Após atingir a temperatura ambiente, era distribuída nos tubos, que eram tampados com algodão hidrofílico e armazenados a 4°C.

### **B) Meio de cultura a base de fubá**

Ingredientes:

Água destilada	3000ml
Açúcar	140g
Bacto agar	35g
Extrato de levedura	35g

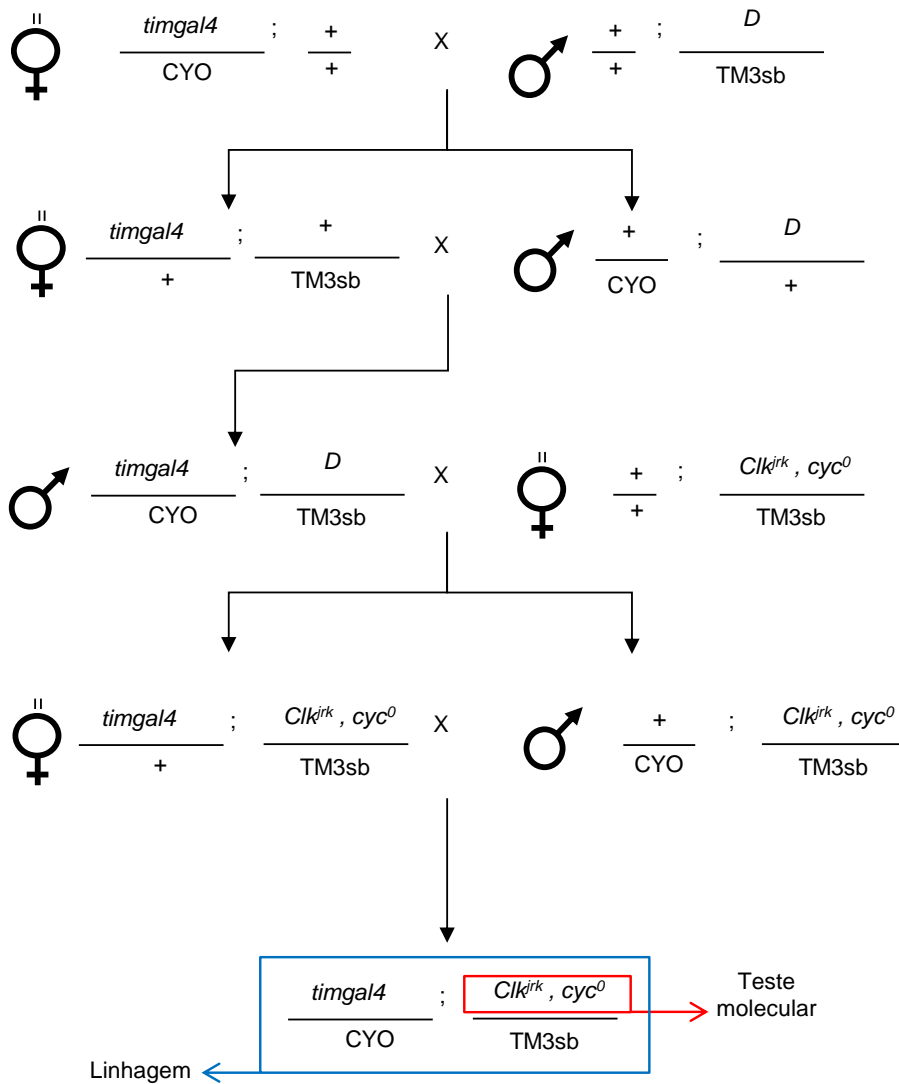
Os ingredientes eram misturados, fervidos e acrescidos de 233g de fubá. Após esta etapa, a mistura era fervida por mais 10 minutos em forno de micro-ondas e esfriada em banho-maria até atingir a temperatura de 60°C. Quando a mistura atingia esta temperatura era acrescida de 22,4ml de fungicida 10% (Nipagin® - Pharma Special) e de 15,75ml de ácido propiônico P.A. A mistura era então diluída em 500ml de água a temperatura ambiente, resfriada e distribuída em tubos, que eram tampados com algodão hidrofílico e armazenados a 4°C.

### 3.3 – Geração das moscas utilizadas para avaliação funcional de *llyc* (gene *cycle* de *L. longipalpis*)

Para a geração das moscas para avaliação da função de *llyc*, realizamos séries de cruzamentos entre as linhagens de *D. melanogaster* descritas no item 3.1.

#### 3.3.1 – Geração da linhagem *timgal4/CyO; Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>/TM3Sb*

O cruzamento para a geração da linhagem *timgal4/+; Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>/uasllyc, Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>* foi realizado em quatro etapas e levou em torno de 6 a 7 semanas para ser concluído (Figura 3.1). No final desse período, conseguimos obter as moscas carregando o transgene *timgal4* balanceado por *CyO* no cromossomo 2 e as mutações nulas para os genes *Clk* e *cyc* balanceados por *TM3Sb* no cromossomo 3.

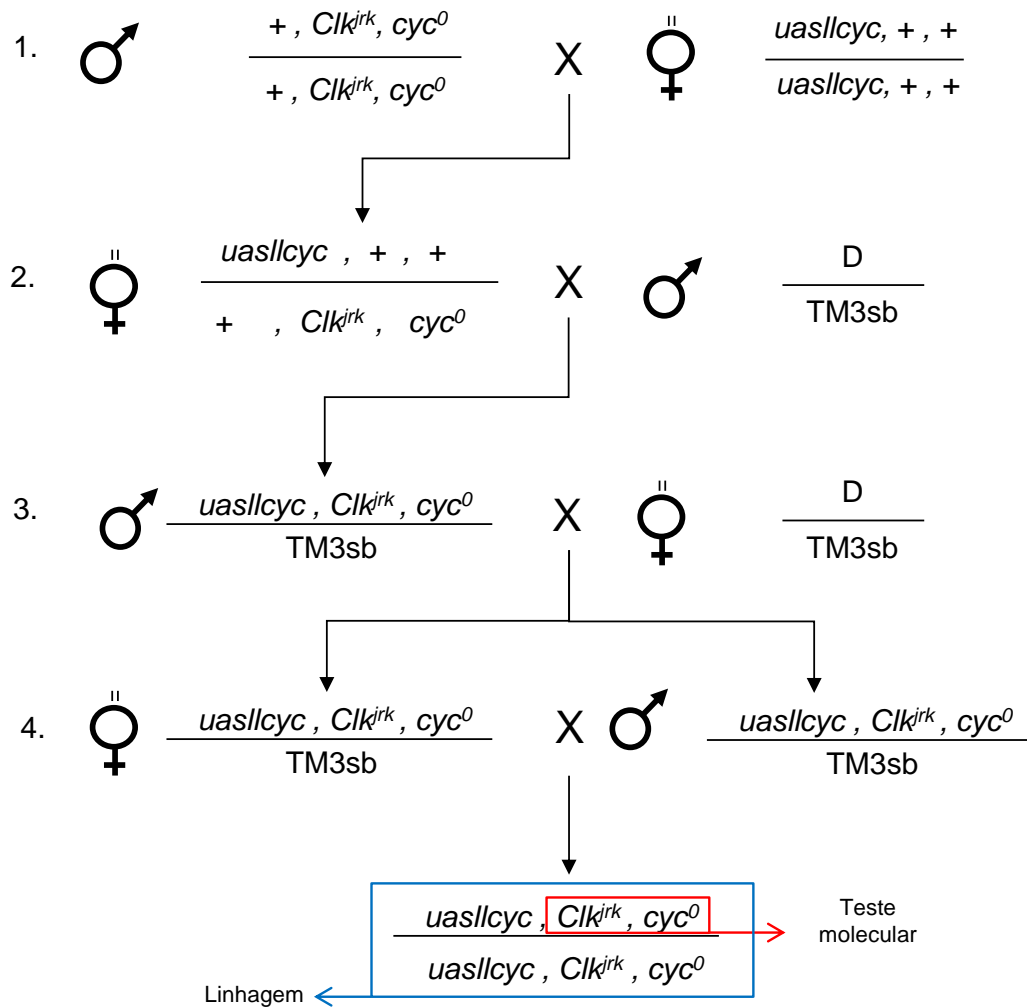


**Figura 3.1.** Série de cruzamentos realizados para obter a linhagem *timgal4*/CYO; *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*/TM3sb. Como as mutações *Clk<sup>Jrk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* não possuem marcadores visíveis no final do cruzamento as moscas foram submetidas a um teste molecular desenvolvido no laboratório (ver seção 3.4.).

### 3.3.2 – Geração da linhagem homozigota *uasIIcyc, Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*

A geração da linhagem homozigota *uasIIcyc, Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* foi um pouco mais laboriosa que a anterior, pois deveríamos acompanhar um evento de

recombinação homóloga entre as mutações  $Clk^{Jrk}, cyc^0$  e o transgene  $uasIIcyc$ , ambos localizados no cromossomo 3 (Figura 3.2).

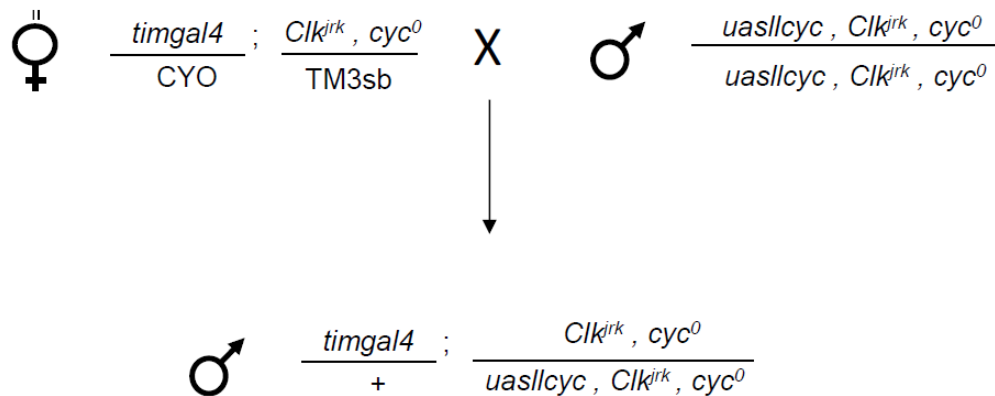


**Figura 3.2.** Série de cruzamentos realizados para obter a linhagem recombinante  $uasIIcyc, Clk^{Jrk}, cyc^0$  (duplo mutante nula recombinada com  $uasIIcyc$ ). A construção  $IIcyc$  foi inserida no cromossomo três, onde se localizam as mutações  $Clk^{Jrk}$  e  $cyc^0$ . Por isso, os cruzamentos foram desenhados de forma que pudesse ser acompanhado um evento de recombinação. Como as mutações  $Clk^{Jrk}$  e  $cyc^0$  não possuem marcadores visíveis no final do cruzamento as moscas forma submetidas a um teste molecular desenvolvido no laboratório.



### 3.3.3. – Geração da linhagem $timgal4/+; Clk^{Jrk},cyc^0/uasIlyc,Clk^{Jrk},cyc^0$

A partir das linhagens geradas, realizamos apenas um cruzamento para a avaliação dos fenótipos resultantes de moscas contendo o gene *cycle* de *L. longipalpis* dirigido pelo promotor do gene *timeless* num background genético nulo para os genes *Clock* e *cycle* de *Drosophila*. Desta forma, apenas um cruzamento entre eles seria suficiente para permitir o teste de atividade locomotora de moscas com a dupla mutação  $Clk^{Jrk},cyc^0$  carregando *uasIlyc* (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema do cruzamento para obter as moscas duplo mutantes ( $Clk^{Jrk}, cyc^0$ ) homozigotas carregando *uasIlyc* sob o controle de *timgal4*. A partir das linhagens estabelecidas no laboratório, apenas um passo seria necessário para o teste com o genótipo desejado. Somente os machos nascidos desse cruzamento foram coletados para o experimento de atividade locomotora.

Para os testes com os heterozigotos os mutantes e os controles foram cruzados com moscas selvagem (CS).

### 3.4 - Sistema de identificação de mutantes

O sistema de identificação consiste na amplificação por PCR de uma região do genoma da mosca contendo o sítio da mutação (*Clk<sup>Jrk</sup>* ou *cyc<sup>0</sup>*), e sua posterior digestão com enzimas de restrição. Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores:

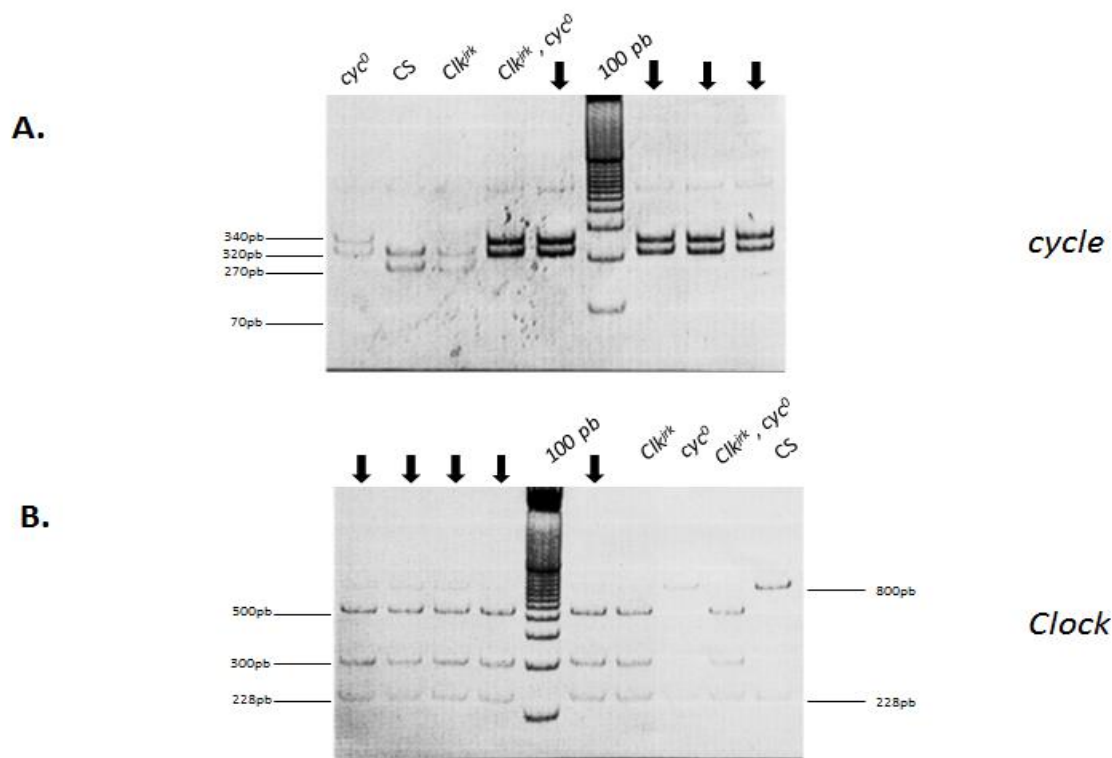
- 5'CLK-BFA                    5'CGAGAACACCATCGAGAAAA3'
- 3'CLK-BFA                    5'CTGCCTCCATTGTAGCTTTG3'
- 5'CYC-HPY188I            5'GGTGTCCAGTGTGCTGAACA3'
- 3'CYC-HPY188I            5'ATCGTACCTACCGCTGGTCT3'

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 µl contendo: 2,0 µl de tampão (10X), 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,08 µl de dNTPs (25 mM) e 0,4 µl de TTH 1 U/µl (*Biotools*). A amostra foi transferida para um termociclador e submetida ao seguinte programa: 94°C por 30 segundos; 60,6°C por 30 segundos; 72°C por 1,5 minutos, 35 ciclos.

Os produtos desta PCR foram purificados de acordo com o protocolo abaixo adaptado de Sambrook et al., 2000. Foi adicionado NaAc (Acetato de sódio 5M, pH 5,2) na proporção de 1µl de acetato de sódio para cada 10 µl (1/10) do produto de PCR. Em seguida foi adicionado etanol absoluto na proporção de duas vezes o volume final. As amostras então foram incubadas a - 20°C por 30 minutos. Após o período de incubação foram centrifugadas a 15000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet formado foi lavado com etanol 80% e ressuspenso em água.

Os fragmentos amplificados foram digeridos separadamente com as enzimas Hpy188I (10 U/μl) e Bfal (5 U/μl) (*New England BioLabs*), para *cyc*<sup>0</sup> e *Clk*<sup>Jrk</sup>, respectivamente. As reações de digestão foram preparadas em volume final de 20 μl, que continham: 10 μl do produto da PCR purificado, 1 μl de enzima de restrição, 2 μl de tampão 10X e 7 μl de água milli-Q. Os tubos foram acondicionados em banho maria à 37°C onde permaneceram por um período de três horas a 16 horas (preferencialmente). Os perfis eletroforéticos dos produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 'low melting' 4% (*Biotools*) ou em gel de poliacrilamida 12% (1,0 mL de TBE 10X; 4,0 mL de acrilamida / Bis 29/1 (*BioRad*); 70 μl de APS 10%; 6,0 μl de Temed (GiBco BRL), para uma melhor resolução das bandas.

Um exemplo da visualização desse sistema no gel é apresentado na figura 3.4, onde a clivagem do produto da PCR com Hpy188I gera duas bandas para moscas homozigotas para a mutação *cyc*<sup>0</sup>: uma de 320 pb e outra de 340 pb. Em moscas selvagens, esse mesmo procedimento gera três bandas: uma de 320 pb, uma de 270 pb e uma terceira banda de 70 pb (figura 3.4A). Por outro lado, a digestão do produto de PCR com Bfal gera três bandas para moscas homozigotas para a mutação *Clk*<sup>Jrk</sup>: uma de 500 pb, uma de 300 pb e uma de 228 pb. Em moscas que não carregavam a mutação, foi obtido um padrão de duas bandas: uma de 800 pb e uma de 228 pb (figura 3.4B).



**Figura 3.4.** Exemplo da visualização do sistema de identificação de mutantes em gel de poli-acrilamida 12%. CS refere-se a moscas selvagens e *Clk<sup>Jrk</sup>*, *cyc<sup>0</sup>*, e *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* representam os mutantes. As setas marcam amostras, meramente ilustrativas, das genotipagens realizadas no laboratório. **(A)** A digestão com Hpy188I, gerou para o mutante *cyc<sup>0</sup>* duas bandas, uma com 320 pb e outra com 340 pb. Para moscas que não carregavam a mutação o padrão observado foi de uma banda de 320 pb, uma de 270 pb e uma terceira banda de 70pb (muito fraca na foto). **(B)** A digestão de produto da PCR com Bfal, gerou para o mutante *Clk<sup>Jrk</sup>* uma banda de 500pb, uma de 300pb e uma de 228pb. Para moscas que não carregavam a mutação o padrão obtido foi de uma banda de 800pb e uma de 228pb.

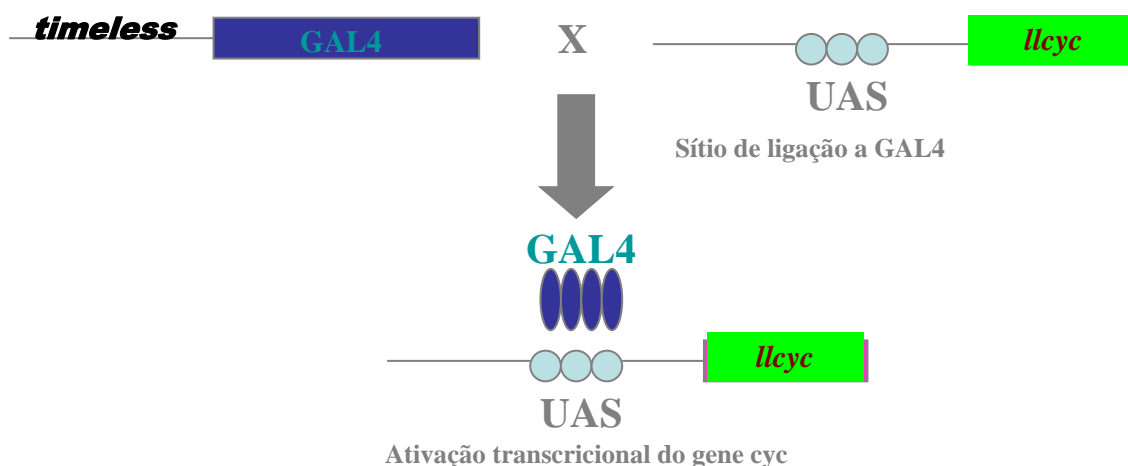
### 3.5 - Sistema de expressão ectópica UAS - GAL4

O sistema UAS-GAL4 é um sistema binário que consiste basicamente de um ativador transcricional (GAL4) dirigido pelo promotor de escolha, e uma seqüência alvo de GAL4 chamada de UAS controlando a expressão do gene de interesse (Brand & Perrimon, 1993).

Gal4 codifica uma proteína de 881 aminoácidos, identificados em leveduras *Sacharomyces cerevisiae* como um regulador de genes (GAL10 e GAL1, por exemplo), induzido por galactose (Laughton *et al.*, 1984; Laughton & Gesteland, 1984; Oshima, 1982). Gal4 regula a transcrição de GAL10 e GAL1 por se ligar diretamente aos quatro sítios de 17 pb localizados entre esses loci (Giniger *et al.*, 1985). Esses sítios definem o elemento UAS, que é essencial para a ativação transcricional desses genes regulados por GAL4 (Duffy, 2002).

No sistema UAS-GAL4, a expressão do gene de interesse fica sob o controle da sequência-alvo UAS que, na ausência de GAL4, não será expresso. Para ativar sua transcrição, é necessário cruzar as moscas que carregam a construção (*uas*-gene de interesse) com outras que expressam GAL4 em um padrão particular, determinado pelo promotor a ele fusionado, usualmente específico de um determinado tecido (Figura 3.5) (Duffy, 2002). Essa abordagem permite o controle temporal e espacial de um gene inserido em *Drosophila* (Brand & Perrimon, 1993).

Moscas selvagens transformadas com o gene *cyc* de *L. longipalpis* dirigido por UAS (*uas//cyc*), foram cruzadas com estirpes contendo GAL4 sob o controle dos promotores do gene *timeless*, que é expresso em todas as células do relógio. O mesmo procedimento foi adotado com moscas selvagens carregando o gene *cyc* de *D. melanogaster* dirigido por UAS (*uascyc*), utilizado como controle.

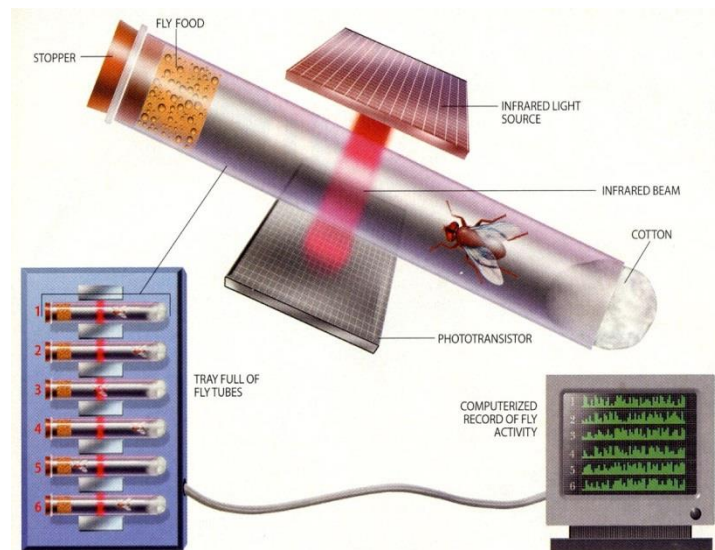


**Figura 3.5.** Exemplo do funcionamento do sistema UAS-GAL4 em *Drosophila melanogaster*. O gene *cycle* de *Lutzomyia longipalpis* (*Ilcyc*) está sob o controle da seqüência UAS e o ativador transcricional GAL4 sob o controle do promotor do gene *timeless* (*tim*). A construção *uasIlcyc* não é expressa na ausência de GAL4, por isso as moscas carregando as construções *uasIlcyc* e *timgal4* precisam ser cruzadas. Após o cruzamento, o gene *cycle* de *Lutzomyia longipalpis* (*Ilcyc*) será expresso no momento e nas células em que a proteína Timeless (Tim) normalmente é expressa. (Adaptado de Brand & Perrimon, 1993).

### 3.6 Atividade Locomotora

Para avaliar a atividade locomotora das moscas, utilizamos um Sistema de Monitoramento de Atividade de *Drosophila* (*Trikinetics*) (Figura 3.6). As moscas foram individualmente acondicionadas em tubos de vidro, contendo meio de cultura em uma extremidade e fechados com algodão na outra. Esse tubo foi posicionado em um monitor de atividade locomotora, de tal forma que na região central do tubo passasse um feixe de luz infravermelha e, cada vez que a mosca interrompia a passagem da luz, era computado um evento de atividade. As contagens realizadas por esse equipamento foram registradas em um computador em intervalos de 5 a 30 minutos e, posteriormente, analisadas no programa Microsoft Excel versão 2010 (*Microsoft*) e na versão 'on line' do teste de qui-quadrado para cálculo do período

(<http://www.circadian.org/periodogram.html>). Os monitores foram acondicionados em incubadoras à temperatura constante de 25° C, e submetidos a ciclos de doze horas de luz e doze horas de escuro (LD) por cinco dias, seguidos de 10 dias em escuro constante (DD).



**Figura 3.6.** Esquema do Sistema de monitoramento de Atividade Locomotora de *Drosophila* (Trikinetics). Cada mosca testada foi colocada em um tubo de vidro, contendo alimento de um lado e fechado com algodão na face oposta. Os movimentos da mosca dentro desta câmara foram contados por uma luz infravermelha que atravessa o tubo. Os dados da atividade acumulada em intervalos periódicos foram armazenados em um computador e as análises realizadas em programas apropriados (Retirado de Young, 2000).

### 3.7 – Extração de RNA total

Para verificação dos níveis de transcritos dos genes da primeira alça do relógio, inicialmente foi realizada a extração do RNAm de um *pool* de 10 cabeças de machos de *D. melanogaster* coletadas nos ZTs 9 e 21 (ou seja, 9 horas após o acender das luzes e 9 horas após o apagar das luzes). Para isso as moscas foram mantidas em incubadoras por três dias em regime de LD 12:12 (12 horas de claro seguidas de 12 horas de escuro) a 25°C e coletadas no quarto dia.

A extração de RNA foi iniciada com a homogeneização das 10 cabeças em 200 $\mu$ L de Trizol (Life Technologies). Após a ruptura dos tecidos, adicionou-se 800 $\mu$ L de Trizol, perfazendo um volume final total de 1000 $\mu$ L. Após esta homogeneização inicial, o material foi mantido por 5 min a temperatura ambiente para que os complexos protéicos nucleares fossem dissolvidos. Para a separação de fases, foram adicionados 200 $\mu$ L de Clorofórmio e a solução foi agitada vigorosamente e posteriormente deixada em temperatura ambiente por 5 minutos. Para separar o material, a solução foi centrifugada por 15min a 12.000 x g, em baixa temperatura (4°C). O Sobrenadante (fase hidrofílica) foi transferido com auxílio de uma micropipeta para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram então acrescentados 500 $\mu$ L de isopropanol e a solução foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado. Ao precipitado foram adicionados 500 $\mu$ L de etanol 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Por fim, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e diluído em 100 $\mu$ L de água milli-Q. Essa solução é aquecida a 60°C por 10 minutos e depois são adicionados 50  $\mu$ L de cloreto de lítio (LiCl) 7,5M e a solução final foi armazenada em refrigerador a -20°C por aproximadamente 16 horas. O material foi centrifugado por 15min a 12.000g, a 4°C, o sobrenadante é descartado e o precipitado lavado com 500 $\mu$ L de álcool 75% gelado (previamente mantido em refrigerador a -20°C). A solução foi centrifugada por 15min a 12.000g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Por fim, o RNA foi diluído em 50 $\mu$ L de água milli-Q e armazenado a – 80°C.



### 3.8 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

A dupla fita de DNA complementar foi sintetizada a partir do RNAm contido no RNA total extraído, utilizando-se o kit TaqMan Reverse Transcriptase Reagents (Life Technologies) e o protocolo de transcrição foi feito seguindo as recomendações do fabricante. Após o preparo do mix de reagentes, a amostra foi transferida para um termociclador e submetida ao seguinte programa: 25°C por 10 minutos; 48°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos. Ao final da reação, as amostras foram mantidas a -20°C.

### 3.9 - PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para avaliar os níveis dos transcritos dos genes da primeira alça do relógio, foram feitos ensaios de PCR quantitativo em tempo real. A preparação da reação de qPCR foi feita com o uso do kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), de oligonucleotídeos específicos cedidos pelo Dr. Antonio Meireles-Filho (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suíça) e do molde de cDNA. A leitura da reação foi feita pelo programa indicado para o aparelho Step One Plus (Applied Biosystems).

Os oligonucleotídeos utilizados foram:

5expPER1	5' CCCGCCAACAACAAGAAA 3'
3expPER1	5' ATCCGTCCGTGGTCTTGAT 3'
5expRp49	5' GCTAAGCTGTCGCACAAATG 3'
3expRp49	5' GTTCGATCCGTAACCGATGT 3'
5expCLK1	5' CTACAACAACCGGGGAAT 3'
3expCLK1	5' GTTGGCTTTGCGAACTGAC 3'

5expTIM1	5' AGATCCCACGCCTCCAGT 3'
3expTIM1	5' ACGAGGAGCCAATGCAATC 3'
5expCYC1	5' ACGTTCGCAACTCCACAGTA 3'
3expCYC1	5' GTGGCACGCTGGTCTATGA 3'

### 3.10. Análises Filogenéticas

Para avaliar as transformações ocorridas em CLK e CYC ao longo do processo evolutivo de artrópodes foram utilizadas sequências de 21 espécies entre vertebrados e invertebrados obtidas do NCBI, ou geradas em outros projetos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (Gesto, 2006). As espécies utilizadas e os números de acesso das sequências estão listados na Tabela 3.1. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o ClustalW (Thompson et al., 1994) e o alinhamento e construção das árvores no MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013).

**Tabela 3.1.** Lista de espécies utilizadas nesse estudo e números de acesso no GeneBank.

Espécies	Número de Acesso	
	CLK	CYC
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAC39101.1	AAF49107.1
<i>Anopheles darlingi</i>	ETN62614.1	ETN65090.1
<i>Antheraea pernyi</i>	AAR14936.1	AAR14937.1
<i>Apis mellifera</i>	XP_394233.4	XP_006558087.1
<i>Bombus impatiens</i>	XP_003493431.1	XP_003490169.1
<i>Camponotus floridanus</i>	EFN61630.1	EFN72014.1
<i>Danaus plexippus</i>	EHJ69324.1	AAR13012.1
<i>Gryllus bimaculatus</i>	BAM76759.1	BAN28450.1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Gesto, 2008	DQ841151
<i>Megachile rotundata</i>	XP_003708362.1	XP_003705585.1
<i>Pediculus humanus</i>	XP_002429283.1	XP_002432327.1
<i>Riptortus pedestris</i>	BAN20981.1	BAG07409.1
<i>Solenopsis invicta</i>	AGD94516.1	AGD94518.1
<i>Thermobia domestica</i>	BAJ16353.1	BAJ16354.1
<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001106937.1	NP_001107795.1
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AAX44045.1	ADK55596.1
<i>Gallus gallus</i>	AAL98708.1	NP_001001463.1
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001276761.1	NP_077338.2
<i>Mus musculus</i>	NP_031741.1	BAD26600.1
<i>Aedes aegypti</i>	Gesto, 2006	Gesto, 2006

### 3.11. Teste estatístico:

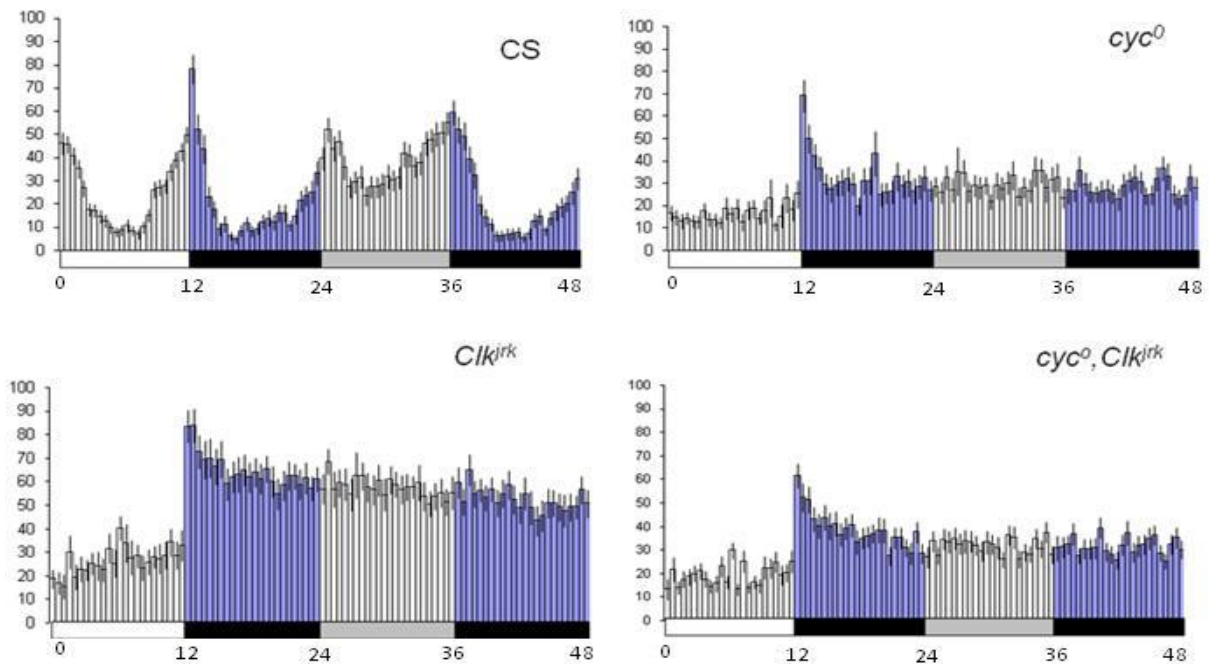
Os testes estatísticos foram realizados nos programas PAST 3.8 (Hammer, 2001) e BioEstat 5.0 (Ayres et al, 2001). Inicialmente utilizando o programa BioEstat foi verificado que os dados não apresentavam distribuição normal. Em seguida, no programa PAST 3.8 foi calculado o equivalente não

paramétrico de ANOVA, o teste de Kruskal-Wallis (KW). O teste de KW deriva do teste Wilcoxon-Mann-Whitney, e é utilizado para comparações entre três ou mais populações. Diferente dos testes de variância que assumem distribuição normal e que as populações são independentes, esse método não possui esses pressupostos.

## 4 – Resultados / Discussão

Durante minha dissertação de mestrado foram geradas algumas linhagens utilizadas nesse projeto. O duplo mutante nulo *cycle*<sup>0</sup>, *Clock*<sup>Jrk</sup> foi uma delas e a análise da atividade locomotora revelou um padrão essencialmente arritmico (Figura 4.1). As moscas são consideradas rítmicas ou arrítmicas a partir da observação de algumas propriedades do relógio observadas tanto através da análise dos gráficos, quanto do cálculo do período endógeno “Tau” ( $\tau$ ). Moscas selvagens apresentam padrão bimodal essencialmente diurno e, no gráfico, é possível identificar esta bimodalidade pela presença de um pico na transição escuro-claro (pico da manhã) e outro na transição claro-escuro (pico da noite). Também é possível observar outra propriedade do relógio circadiano, a antecipação. No gráfico de CS (selvagem) se observa um aumento gradual da atividade locomotora das moscas antes das transições (Figura 4.1) (Amoretty, 2010). A mutação *cycle*<sup>0</sup> leva a um códon de parada prematuro (troca de uma lisina na posição 159 da proteína por um códon de parada) o que gera uma proteína truncada e não funcional, dessa forma o dímero CLK-CYC não se forma e, conseqüentemente, a transcrição de *per* e *tim* é abolida (Allada et al., 1998; Rutila et al., 1998). Como o mecanismo do relógio não é funcional nos mutantes *cyc*<sup>0</sup>, essas moscas são arrítmicas, portanto não apresentam a antecipação e os picos das transições em DD (escuro constante – do inglês *dark-dark*) permanecendo apenas o pico da transição noite-dia no LD (12h de claro seguidos por 12h de escuro– do inglês *light-dark*) que corresponde a um reflexo ao apagar das luzes (Figura 4.1) (Amoretty, 2010). Já a mutação *Clock*<sup>Jrk</sup> leva a um códon de parada no aminoácido 776 da proteína, impedindo a formação da cauda de transativação poli-Q, que por conseqüência tem as transcrições de *per*

e *tim* drasticamente reduzida (Allada et al., 1998). Os mutantes  $Clk^{Jrk}$  tornam-se arrítmicos e, desta forma, também não apresentam antecipação ou a permanência dos picos em DD (Figura 4.1). No duplo mutante ( $Clk^{Jrk}, cyc^0$ ), onde as duas proteínas estão ausentes, o padrão arrítmico é mantido (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Os gráficos mostram o padrão de atividade locomotora por dois dias, um de LD 12:12 seguido de um de DD (escuro constante). Em LD, barras horizontais brancas, fotofase (12h); barras horizontais pretas, escotofase (12h). Em DD, barras horizontais de cor cinza, dia subjetivo (12h); barras pretas, noite subjetiva (12h). Cada barra do histograma representa meia hora de atividade locomotora, barras brancas, fotofase; barras azuis escotofase. CS (selvagem), n=52;  $Clk^{Jrk}$ , n=33;  $cyc^0$ , n=32;  $Clk^{Jrk}, cyc^0$  (recombinante), n=54. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas. (Amoretty, 2010).

Avaliamos também se esses mutantes seriam diurnos ou noturnos através do cálculo de suas médias de atividade locomotora, e foi observado que tanto os mutantes simples quanto o duplo mutantes se tornaram noturnos (Amoretty,

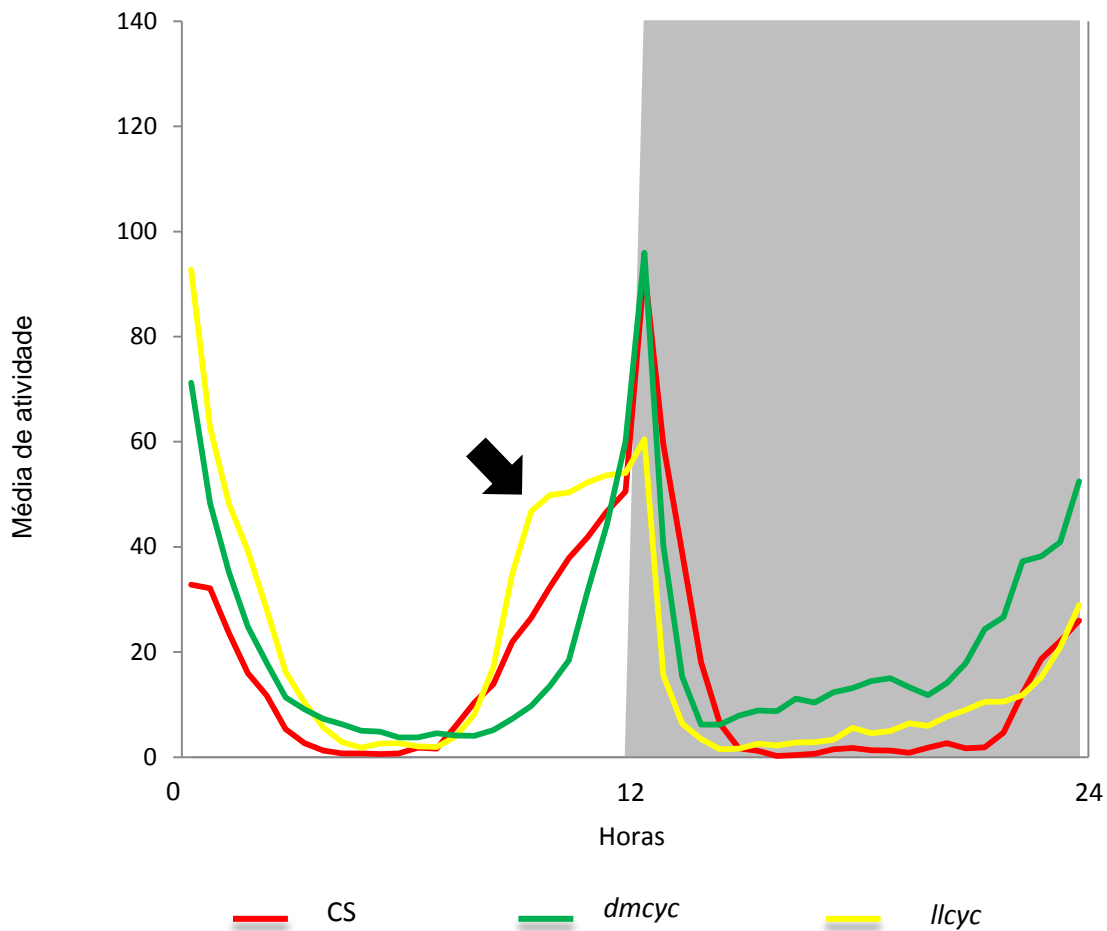
2010). Assim, nos mutantes de *D. melanogaster* gradativamente substituímos os componentes ausentes, através da expressão de *llycyc*.

Nesse projeto extendemos essa análise através do uso de *D. melanogaster* mutantes homocigotos, para gradativamente substituir os componentes do relógio das moscas pela proteína CYC de *L. longipalpis* (*llycyc*). Além disso, em uma abordagem evolutiva, houve a tentativa de investigar a forma pleisiomórfica ou apomórfica do dímero CLK-CYC.

#### **4.1. Expressão de *llycyc* em moscas selvagens**

Inicialmente, para testar o efeito que a construção *uasllycyc* teria no relógio circadiano de *D. melanogaster*, dirigimos a expressão do transgene sob o controle de *timgal4* em moscas selvagens. Essa escolha permitiu localizar a expressão de *uasllycyc* nas células do relógio circadiano.

A expressão de *llycyc* em moscas selvagens causou um aumento da atividade locomotora na fotofase em LD 12:12, sugerindo que a proteína formada estaria contribuindo para redução do período (Figura 4.2, seta). Além disso, a superexpressão de *cycle* de *D. melanogaster* (*dmcyc*) não causou o mesmo efeito que *llycyc* sugerindo que o efeito distinto pode ter sido causado pela diferença entre as proteínas, possivelmente acentuada pela presença da cauda de transativação presente em *llycyc* (Figura 4.2).

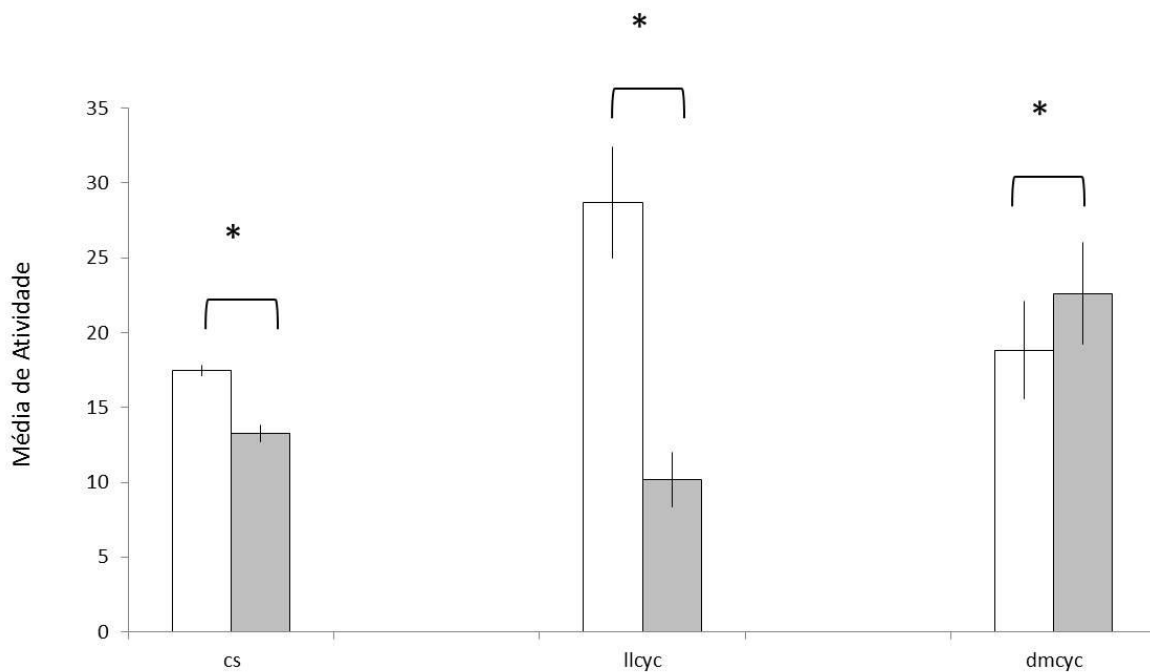


**Figura 4.2.** Atividade locomotora de moscas selvagens carregando *Ilcyc* em regime de LD 12:12. Fundo branco representa 12h de luz e fundo cinza 12h de escuro. Linha vermelha representa atividade locomotora da linhagem CS (selvagem), n=20; amarela, das moscas *Ilcyc* (*timgal4/uasIlcyc*), n=48; verde, das moscas *dmcyc-timgal4* (*timgal4/uasdmcyc*) n=36. Média de dois experimentos. Foram encontradas diferenças significativas entre as moscas com os três genótipos testados (ANOVA-Kruskal Wallis  $p < 0.0001$ ).

Dado o comportamento diurno de *D. melanogaster* versus o comportamento crepuscular noturno de *L. longipalpis*, nós investigamos se a expressão de *Ilcyc* em moscas selvagens poderia alterar esse comportamento. LLCYC não alterou o caráter diurno de *D. melanogaster*, e parece tornar as moscas ainda mais diurnas ao



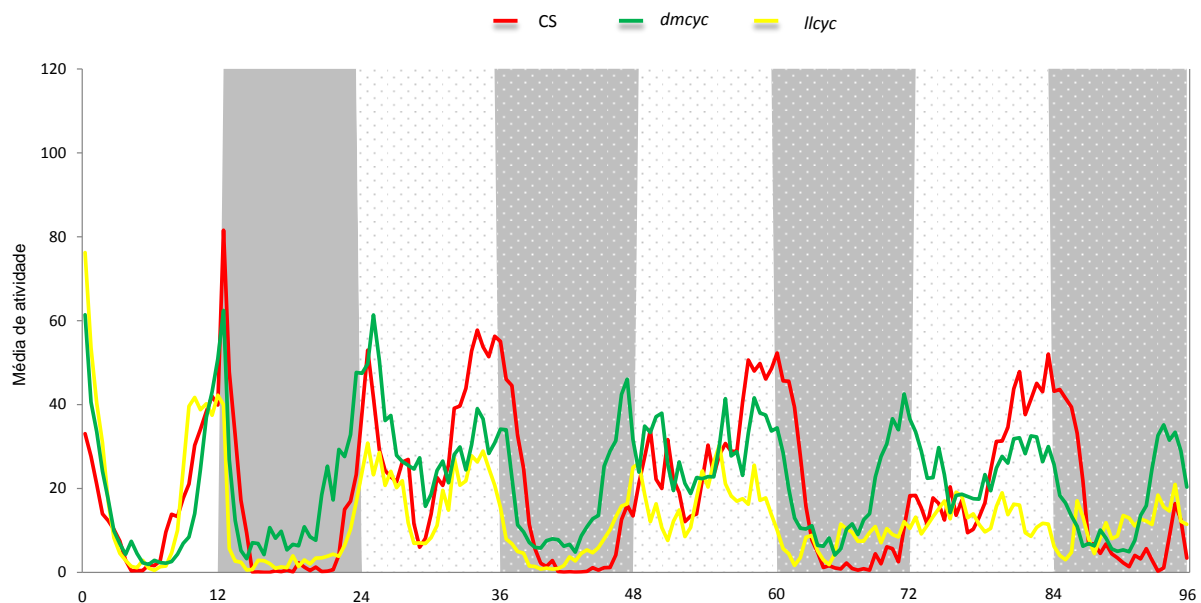
acentuar a diferença entre o comportamento na fotofase e na escotofase (Figura 4.3). A superexpressão de *dmcyc* causou um aumento da atividade noturnas das moscas (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ) (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas selvagens carregando *llcyc*. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras horizontais de cor cinza, média noturna. CS (moscas selvagens),  $n=20$ ; *uasllcyc-timgal4* (moscas selvagens carregando *cyc* de *L. longipapis*),  $n=48$ ; *uasdmcyc-timgal4* (moscas selvagens com superexpressão de *cyc* de *D. melanogaster*),  $n=36$ . Média de dois experimentos. Asteriscos mostram diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

Moscas selvagens apresentam padrão rítmico em LD que persiste mesmo sem a informação da luz (DD), porém a partir do segundo dia de DD o pico da manhã vai reduzindo gradativamente até que desaparece em poucos dias (Figura 4.4). A expressão de *llcyc* não alterou completamente esse comportamento, embora tenha causado arritmicidade nas moscas nessa condição. No entanto, a

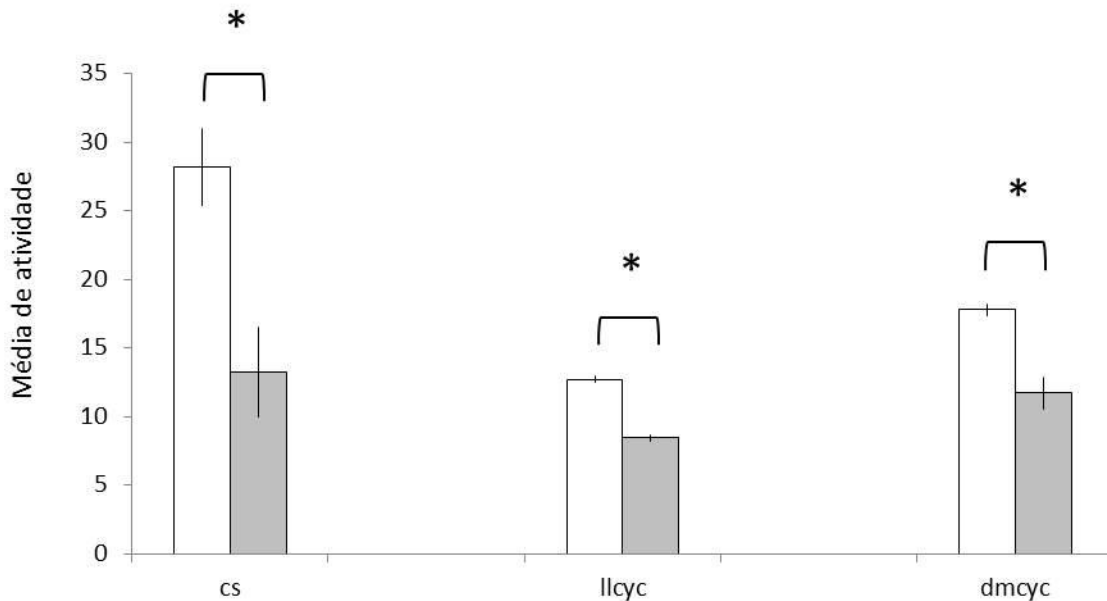
superexpressão de *dmcyc* causou um efeito inesperado mantendo o pico da manhã por vários dias em DD (Figura 4.4). Tanto as moscas *uas//cyc/timgal4* quanto as moscas *uasdmcyc/timgal4* apresentaram menor amplitude do ritmo de atividade se comparadas com as moscas selvagens e um deslocamento do pico da noite para dentro da fotofase sugerindo um encurtamento do período (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Atividade locomotora de moscas selvagens carregando *l/cyc* em regime de DD. No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. Linha vermelha representa atividade locomotora de CS (selvagem), n=19; amarela *uas//cyc-timgal4* (*cyc* de *L. longipalpis*), n=36; verde *uasdmcyc-timgal4* (*cyc* de *D. melanogaster*), n=32. A área branca representa o dia (12h) e a cinza, a noite (12h). As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Foram encontradas diferenças significativas na condição de DD entre as moscas dos três genótipos testados (ANOVA-Kruskal Wallis  $p < 0.0001$ ).

Em seguida, avaliamos se as mudanças observadas em ciclo de claro e escuro se mantêm em escuro constante. Ao contrário do que foi observado no regime de LD, a diferença entre as médias diurnas e noturnas em *uas//cyc/timgal4*

foi menor, no regime de DD, embora a presença da proteína LLCYC não tenha tornado as moscas noturnas (Figura 4.5). Observamos também que proteína DMCYC nessa condição não altera o comportamento e as moscas permanecem diurnas (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas selvagens carregando *llcyc* em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. Na comparação entre as médias, todos os genótipos foram mais diurnos em DD. CS (selvagem), n=19; *llcyc-timgal4*, n=36; *dmcyc-timgal4*, n=32. Média de dois experimentos. Asteriscos marcam diferença significativa entre a atividade diurna e noturna (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

Para testar o efeito de LLCYC no período de moscas selvagens em DD, foi calculado o  $\tau$  que corresponde ao período. Moscas selvagens apresentaram  $\tau$  próximo a 24h, porém a presença das proteínas LLCYC e DMCYC causaram uma redução no período de 1,5h e 0,6h (36 minutos) respectivamente (Tabela 4.1). LLCYC parece atrapalhar o funcionamento do relógio em *D. melanogaster*, uma vez

que apenas 59% das moscas são rítmicas, um número menor ao apresentado por CS e *dmcyc* (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Efeito de LLCYC no período de moscas selvagens (CS) em DD.

Linhagem	Período(h)	±EPM(h)	Rítmicos(%)	n
CS	24,10*	0,05	83	18
<i>dmcyc</i>	23,50	0,07	81	31
<i>llcyc</i>	22,60	0,26	59	34

n – número de indivíduos testados

Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

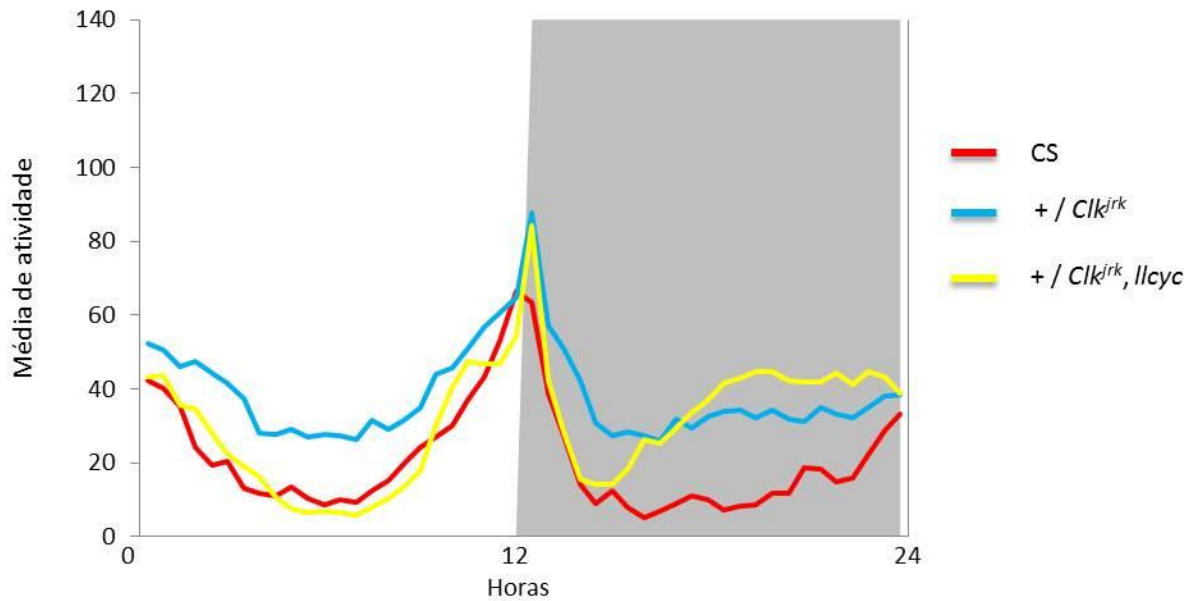
\* - Diferença significativa entre CS e as moscas com as construções (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

## 4.2. Expressão de *llyc* em moscas mutantes heterozigotas

### 4.2.1 LLCYC em mutantes heterozigotos para *Clk<sup>Jrk</sup>*

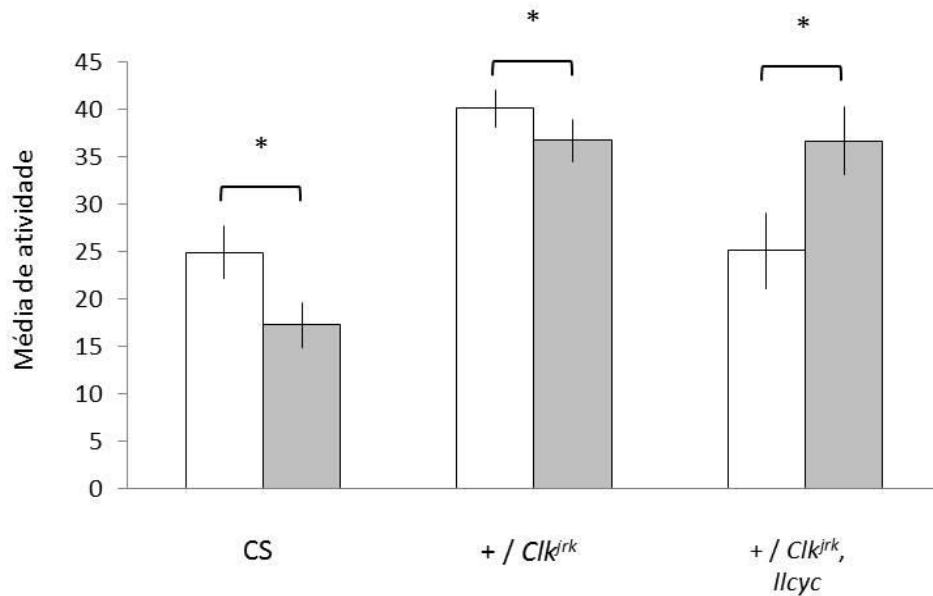
Como LLCYC apresentou efeito em moscas selvagens alterando diversos parâmetros utilizados no estudo do comportamento circadiano, utilizamos mutantes nulos de *D. melanogaster* para avaliar se LLCYC poderia substituir os domínios proteicos ausentes nos mutantes, ou se poderia revelar algum aspecto espécie-específico em relação ao comportamento circadiano.

Assim, testamos o efeito de LLCYC no mutante *Clk<sup>Jrk</sup>*, onde a cauda de transativação poly-Q está ausente. Na condição heterozigota, esses mutantes apresentaram comportamento rítmico, mas com uma amplitude superior ao de moscas selvagens (Figura 4.6). Inesperadamente, LLCYC mostrou atividade locomotora similar a moscas selvagens durante fotofase, mas com um aumento da atividade na escotofase (Figura 4.6).



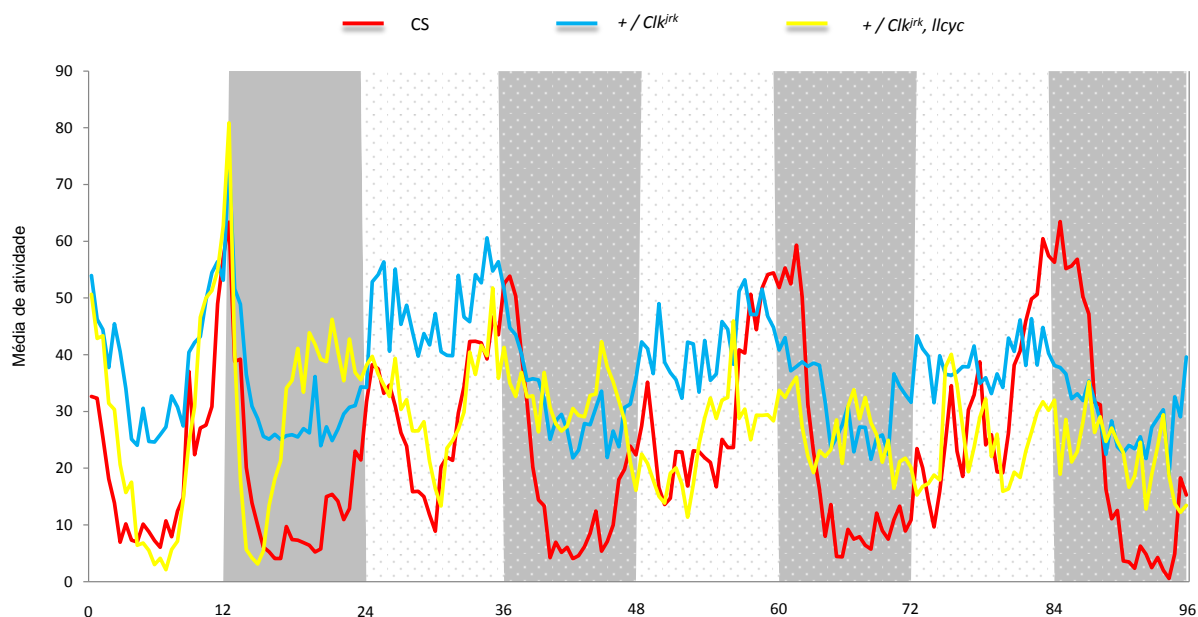
**Figura 4.6.** Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para *Clk<sup>Jrk</sup>* carregando *Ilcyc*. Regime de LD, área branca representa 12h de claro e área cinza, 12h de escuro. Linha azul representa atividade locomotora de + / *Clk<sup>Jrk</sup>*, n=36; vermelha CS (selvagem), n=31; amarela + / *Clk<sup>Jrk</sup>, Ilcyc*, n=17. Média de dois experimentos. Diferença significativa entre os três genótipos testados (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.0001$ ).

O padrão apresentado por *Ilcyc-timgal4* no *background* genético +/*Clk<sup>Jrk</sup>* em LD 12:12 sugeriu que poderia ter ocorrido uma inversão no comportamento diurno das moscas, desta forma, calculamos as médias diurnas e noturnas das moscas. De fato, LLCYC tornou as moscas mais noturnas, diferente do padrão observado para moscas selvagem e os mutantes nessa condição (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação *Clk<sup>Jrk</sup>*. Média de dois experimentos em LD 12:12. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais na cor cinza, média noturna. CS, n=31; + / *Clk<sup>Jrk</sup>*, n=36; + / *Clk<sup>Jrk</sup>, Ilcyc*, n=17. Asteriscos marcam diferença significativa entre as médias (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

A inversão da atividade diurna sofrida pelas moscas + / *Clk<sup>Jrk</sup>*, *Ilcyc* não foi observada na ausência de luz. Em DD os mutantes carregando *LLCYC* apresentaram atividade locomotora maior que a de moscas selvagens, tanto na fotofase quanto na escotofase (Figura 4.8). Além disso, devido a grande variação individual no comportamento dessas moscas em DD, o padrão da média de vários indivíduos é quase arritmico (Figura 4.8), semelhante ao mutante heterozigoto sem *LLCYC*.



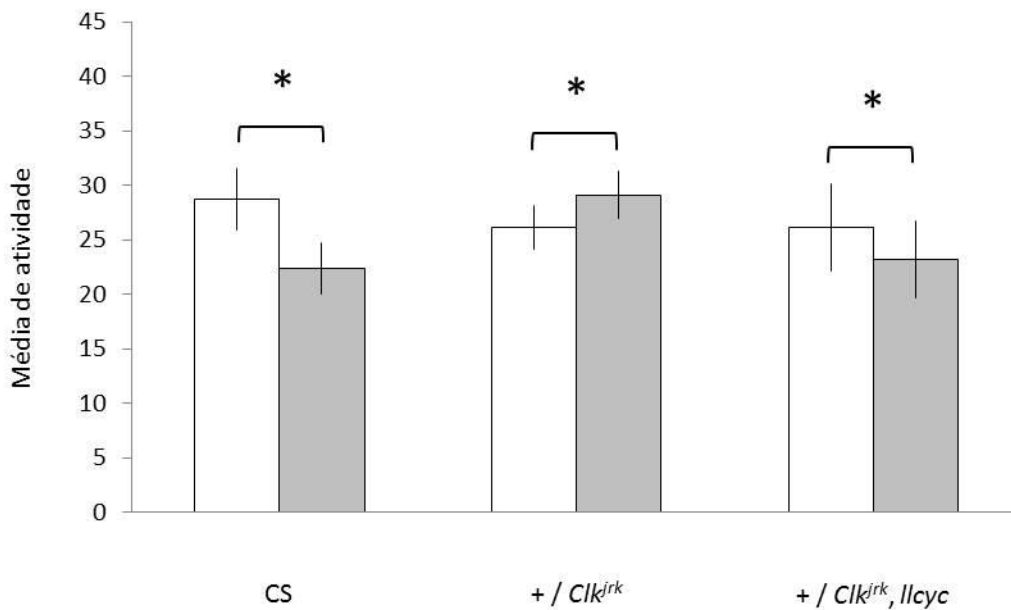
**Figura 4.8.** Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para  $Clk^{Jrk}$  carregando  $Ilcyc$ . No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. Fundo branco representa o dia e fundo cinza a noite. As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Linha azul representa atividade locomotora de  $+ / Clk^{Jrk}$ ,  $n=35$ ; vermelha CS (selvagem),  $n=26$ ; amarela  $+ / Clk^{Jrk}, Ilcyc$ ,  $n=17$ . Foram encontradas diferenças significativas na condição de DD entre os três genótipos testados (ANOVA-Kruskal Wallis  $p < 0.0001$ ).

Assim como mostrado na atividade locomotora, as médias noturnas e diurnas também não acompanharam o padrão observado em LD. Na condição de escuro constante (DD), os mutantes  $+ / Clk^{Jrk}$  inverteram a fase e mostraram um comportamento predominantemente noturno (Figura 4.9). A expressão de LLCYC retomou a condição diurna das moscas em níveis parecidos com moscas selvagens (Figura 4.9), sugerindo que o mecanismo de funcionamento dessa proteína poderia ser influenciada pela luminosidade.

O cálculo do período revelou que a mutação  $Clk^{Jrk}$  em heterozigose reduz o período para 23,26h, quando LLCYC é expresso nesse *background* a redução torna-se mais acentuada (22,57h) (Tabela 4.2). O transgene também



causou uma tendência de aumento de indivíduos rítmicos de 57% nos mutantes para 59% (Tabela 4.2).



**Figura 4.9.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação *Clk<sup>Jrk</sup>*. Média de dois experimentos em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. + / *Clk<sup>Jrk</sup>*, n=35; CS (selvagem), n=26; + / *Clk<sup>Jrk</sup>, Ilcyc*, n=17. Média de dois experimentos. Asteriscos mostram diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

**Tabela 4.2.** Efeito de *Ilcyc* em moscas heterozigotas para a mutação *Clk<sup>Jrk</sup>*.

Linhagem	Período(h)	±EPM(h)	Rítmicos(%)	n
CS	24,23*	0,08	100	11
+/ <i>Clk<sup>Jrk</sup></i>	23,26	0,14	57	30
+ , <i>Ilcyc/Clk<sup>Jrk</sup></i>	22,57	0,31	59	10

n – número de indivíduos testados

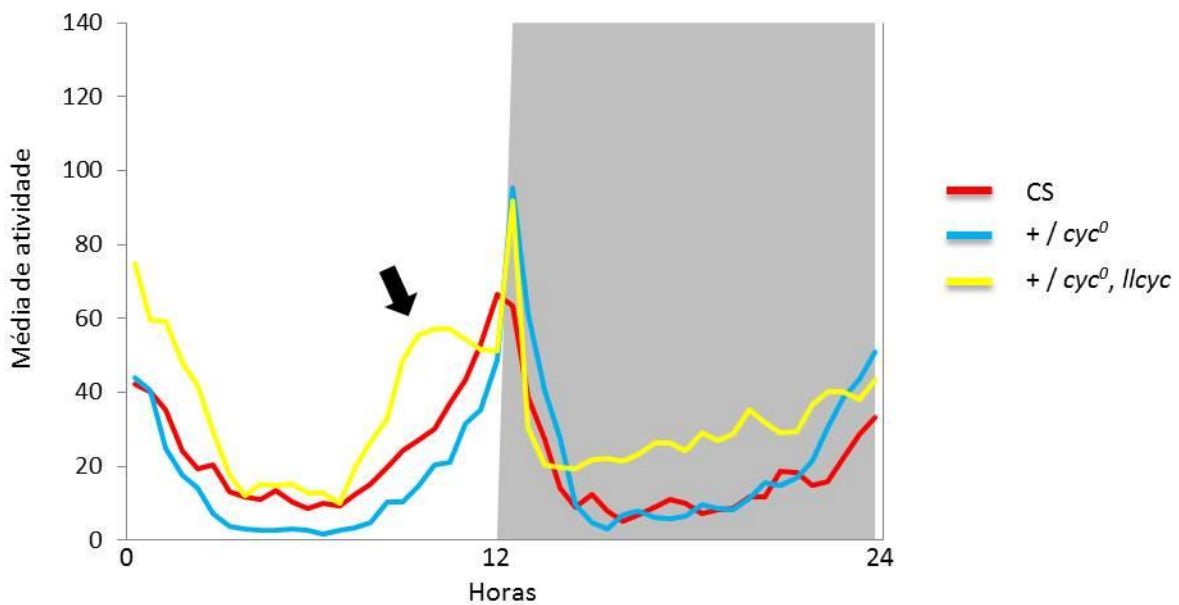
Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

\* - Marca diferença significativa entre CS e as moscas com as construções (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.0001$ )

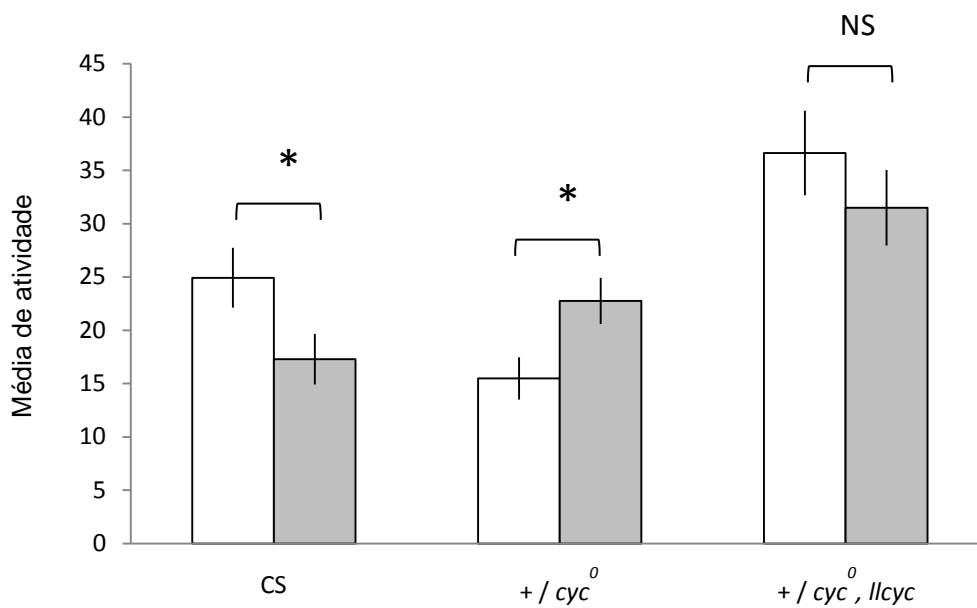
#### 4.2.2. Expressão de *llyc* em moscas heterozigotas para a mutação *cyc<sup>0</sup>*

Avaliamos também o padrão de atividade de moscas com a mutação *cyc<sup>0</sup>* em heterozigose. A expressão de LLCYC nessas moscas mostrou um efeito ainda mais pronunciado na fotofase do que o observado em moscas selvagens (compare Figura 4.10 com 4.2). Além disso, na escotofase a amplitude da atividade locomotora foi maior do que moscas selvagens e o mutante *+ / cyc<sup>0</sup>* (Figura 4.10).



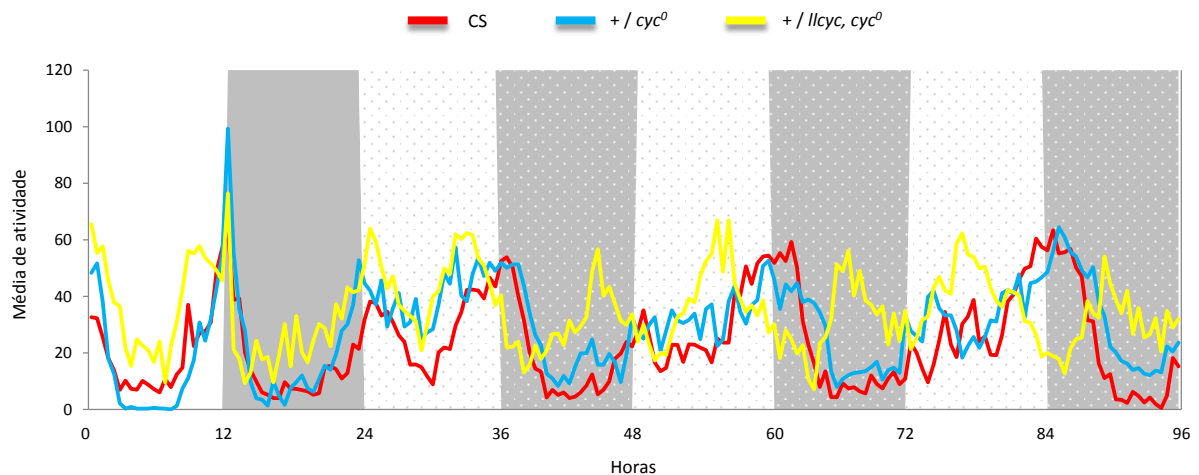
**Figura 4.10.** Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para *cyc<sup>0</sup>* carregando *llyc*. Regime de LD 12:12, fundo branco representa 12h de claro e fundo cinza 12h de escuro. Linha azul representa atividade locomotora de *+ / cyc<sup>0</sup>*, n=10; vermelha, CS (selvagem), n=31; amarela *+ / cyc<sup>0</sup>, llyc*, n=23. A expressão de LLCYC nessas moscas causou um efeito ainda mais pronunciado (seta) na fotofase do que o observado em moscas selvagens. Foram encontradas diferenças significativas entre os três genótipos testados (ANOVA-Kruskal Wallis  $p < 0.0001$ ).

Moscas heterozigotas para a mutação *cyc<sup>0</sup>* invertem a fase em relação as moscas selvagens e apresentaram média de atividade noturna superior a média diurna (Figura 4.11). Nos mutantes com LLCYC mostraram uma tendência de comportamento diurno, porém a diferença não foi significativa (Figura 4.11).



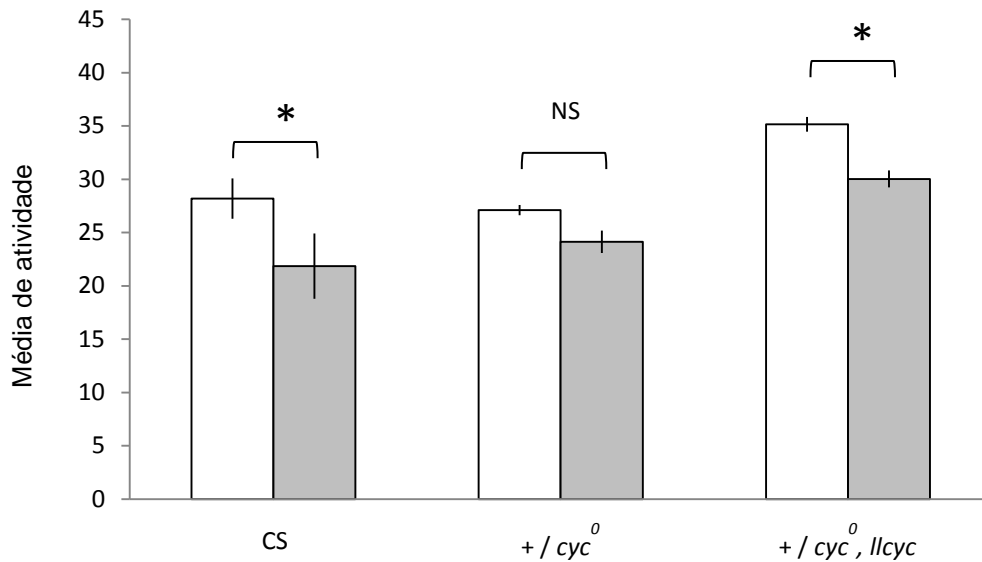
**Figura 4.11.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação  $cyc^0$ . Média de dois experimentos em LD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna.  $+ / cyc^0$ , n=10; CS (selvagem), n=31;  $+ / cyc^0, llcyc$ , n=23. Asteriscos mostram diferenças significativas CS (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ) e  $+ / cyc^0$  (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.005$ ).

Em DD, a expressão de LLCYC nos mutantes  $+ / cyc^0$  parece ter alterado o funcionamento do relógio, pois há um aumento na amplitude do ritmo e uma clara antecipação dos picos matutino e noturno (o que sugere diminuição do período), quando comparados ao mutante sem LLCYC e ao selvagem (Figura 4.12). Além disso, as moscas com o transgene não perdem o pico da manhã conforme foi observado em CS (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para *cyc*<sup>0</sup> carregando *llcyc*. No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Linha azul representa atividade locomotora de +/- *cyc*<sup>0</sup>, n=9; vermelha CS (selvagem), n=21; amarela +/- *cyc*<sup>0</sup>, *llcyc*, n=18. Foram encontradas diferenças significativas na condição de DD entre moscas selvagens e as que carregavam a construções (*llcyc*) ou a mutação *cyc*<sup>0</sup> (ANOVA-Kruskal Wallis p<0.0001).

A análise da média de atividade locomotora no regime de DD revelou que, embora os mutantes não apresentem diferença significativa entre as médias diurna e noturna, moscas mutantes com a construção recuperam a condição diurna e apresentaram um padrão mais parecido com o apresentado por moscas selvagens (figura 4.13), o que sugere que LLCYC resgata o fenótipo selvagem em relação à média de atividade diurna e noturna.



**Figura 4.13.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a mutação *cyc*<sup>0</sup>. Média de dois experimentos em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. + / *cyc*<sup>0</sup>, n=9; CS (selvagem), n=21; + / *cyc*<sup>0</sup>, *llcyc*, n=18. Asteriscos marcam diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

Os mutantes + / *cyc*<sup>0</sup> apresentaram período maior que moscas selvagens, média de 24,92h, ao passo que os mutantes com a construção mostraram uma redução significativa do período para 21,61h, ou seja, muito menor que o observado em moscas selvagens e nos mutantes sem a construção. Estes dados corroboram as observações vistas na figura 4.12 (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Efeito de *llcyc* em moscas heterozigotas para a mutação *cyc*<sup>0</sup>.

Linhagem	Período(h)	±EPM(h)	Rítmicos(%)	n
CS	24,23	0,08	100%	11
+/ <i>cyc</i> <sup>0</sup>	24,92	0,07	75%	30
+ / <i>cyc</i> <sup>0</sup> , <i>llcyc</i>	21,61*	0,11	78%	18

n – número de indivíduos testados

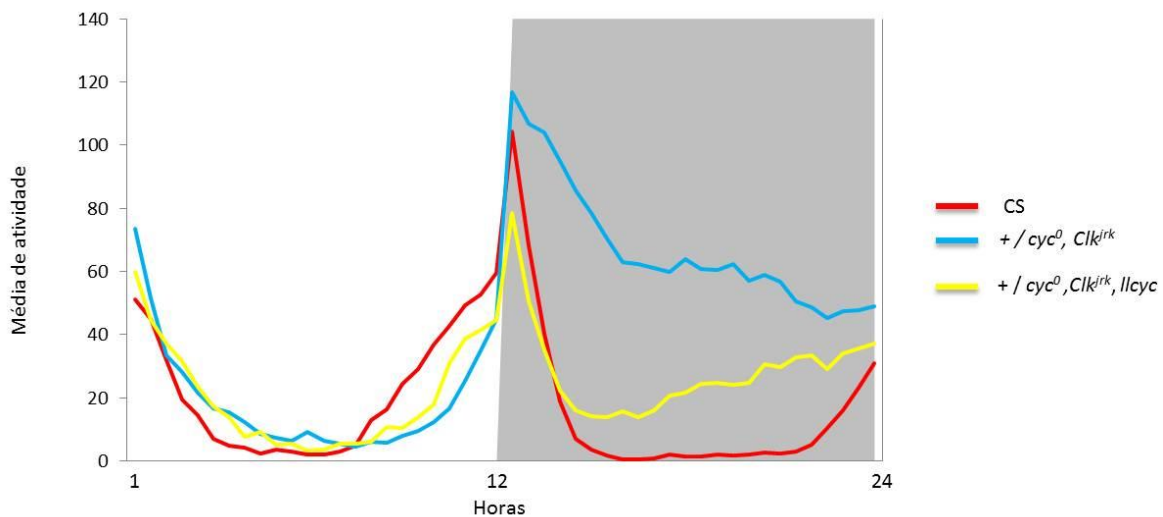
Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

\* - Diferença significativa entre CS e as moscas com a construção *llcyc* (ANOVA,  $p < 0.0001$ )

#### 4.2.3. Expressão de *llyc* em moscas heterozigotas para a dupla mutação *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*

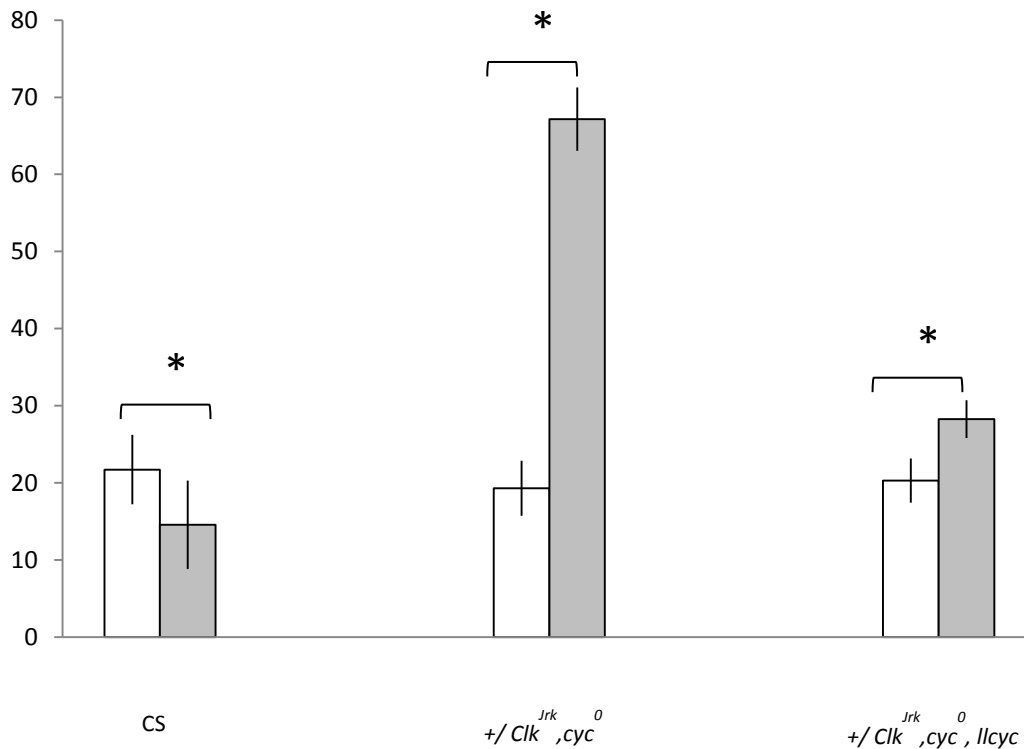
A expressão de LLCYC em moscas com a dupla mutação *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* em heterozigose, na condição de LD12:12 alterou o padrão de atividade locomotora em relação ao duplo mutante sem o transgene (Figura 4.14). Durante a fase escura, a atividade locomotora dos mutantes com a construção foi maior do que moscas selvagens e menor do que os mutante sem a construção (Figura 4.14).



**Figura 4.14.** Atividade locomotora dos mutantes heterozigotos para dupla mutação *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* carregando *llyc*. Regime de LD12:12, fundo branco representa 12h de claro e fundo cinza 12h de escuro. Linha azul representa atividade locomotora de +/ *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*, n=37; vermelha CS (selvagem), n=25; amarela + / *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>, llyc*, n=24. Foram encontradas diferenças significativas entre moscas selvagens e as que carregavam as construções *llyc* e *dmcyc* (ANOVA-Kruskal Wallis p<0.0001).

As moscas heterozigotas para a dupla mutação (+ / *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*) apresentaram comportamento rítmico, em sua maioria, porém tornaram-se noturnas. A expressão de LLCYC em ciclos de claro-escuro também deixam as moscas noturnas, porém com amplitude do ritmo muito menor que os duplo mutantes (Figura

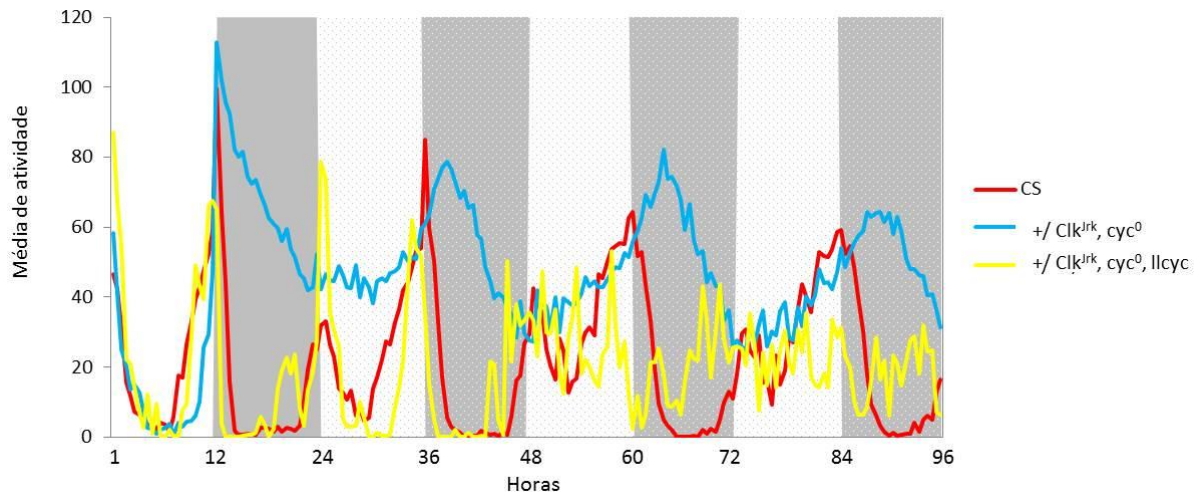
4.15). O cálculo da média de atividade diurna e noturna comprovam os dados observados no gráfico de atividade locomotora.



**Figura 4.15.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação  $Clk^{Jrk}, cyc^0$ . Média de dois experimentos em LD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. Asteriscos marcam diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

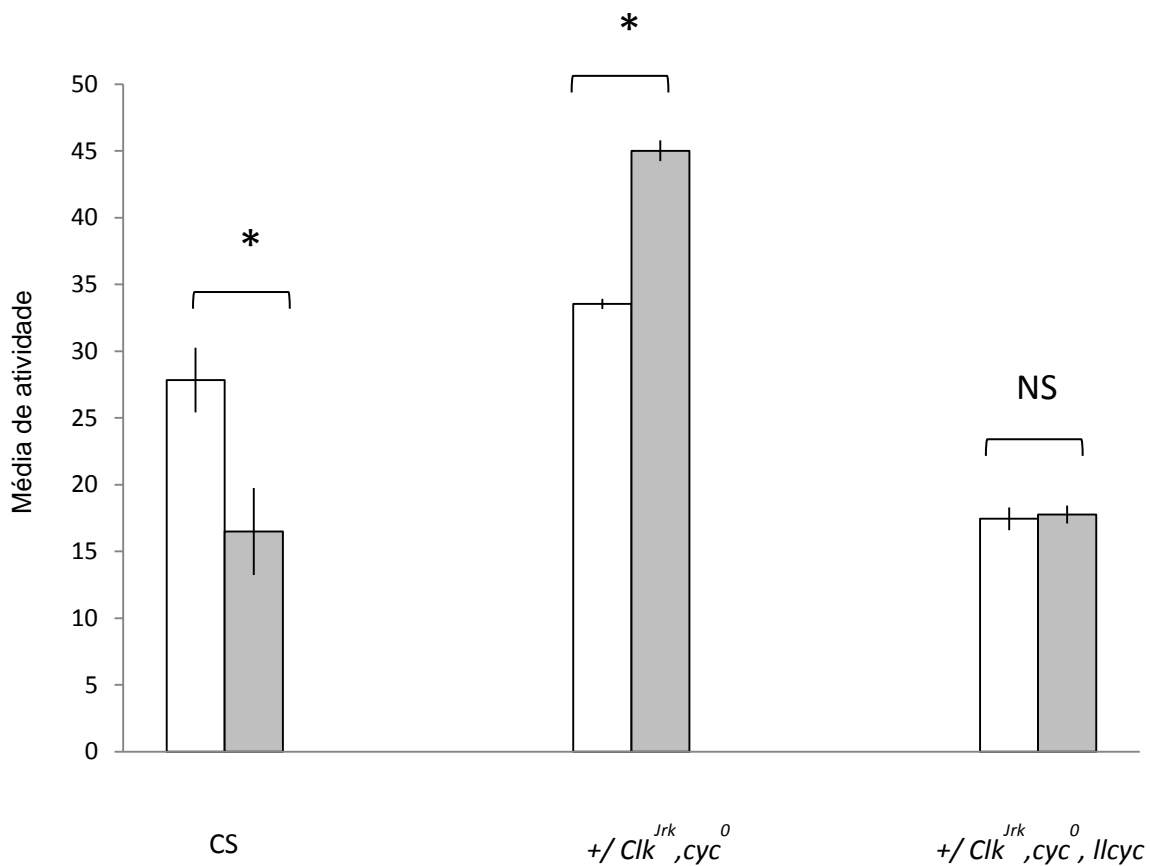
Em DD, moscas selvagens são rítmicas e continuam com o caráter essencialmente diurno em seu comportamento. No entanto, moscas com a dupla mutação, embora rítmicas, não apresentaram o pico da manhã desde o primeiro dia de DD, além disso a amplitude do ritmo foi maior que CS. Os mutantes que carregavam  $llyc$  foram, em sua maioria, arrítmicos, gerando um ruído no gráfico. Além disso, apresentaram perturbação no relógio somente no segundo dia de DD (Figura 4.16).





**Figura 4.16.** Atividade locomotora do duplo mutante heterozigoto para  $Clk^{Jrk}$ ,  $cyc^0$  carregando  $Ilcyc$ . No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Linha azul representa atividade locomotora de  $+/Clk^{Jrk}$ ,  $cyc^0$ ; n=31; vermelha CS (selvagem), n=23; amarela  $+/Clk^{Jrk}$ ,  $cyc^0$ ,  $Ilcyc$ , n=14 (ANOVA-kruskal wallis  $p<0.001$ ).

Ainda na condição de DD, foi observado que o duplo mutante inverte a fase em relação às moscas selvagem tornando-se noturno. A expressão de  $Ilcyc$  reduziu a atividade noturna das moscas, porém não foi suficiente para diferenciar significativamente o dia da noite (Figura 4.17).



**Figura 4.17.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação  $Clk^{Jrk}, cyc^0$ . Média de dois experimentos em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna.  $+ / Clk^{Jrk}, cyc^0$ ; n=31; CS (selvagem), n=23;  $+ / Clk^{Jrk}, cyc^0, llcyc$ , n=14 Asteriscos mostram diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

O duplo mutante sem a construção apresentou o período um pouco maior que o de moscas selvagens (25,0h). Porém, em moscas com a construção ele é bastante reduzido 22,5 (Tabela 4.4). Além disso, muitos indivíduos que carregam LLCYC se tornaram arrítmicos, apenas 37% dos indivíduos foram rítmicos (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4.** Efeito de *llyc* em moscas heterozigotas para a dupla mutação *Clk<sup>Jrk</sup>*, *cyc<sup>0</sup>*.

Genótipo	período(h)	±EPM(h)	rítmicos(%)	n
CS	24,1	0,05	96	23
<i>llyc,clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup> / +</i>	22,5	0,13	37	31
<i>dClk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup> / +</i>	25,0*	0,14	84	14

n – número de indivíduos testados

Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

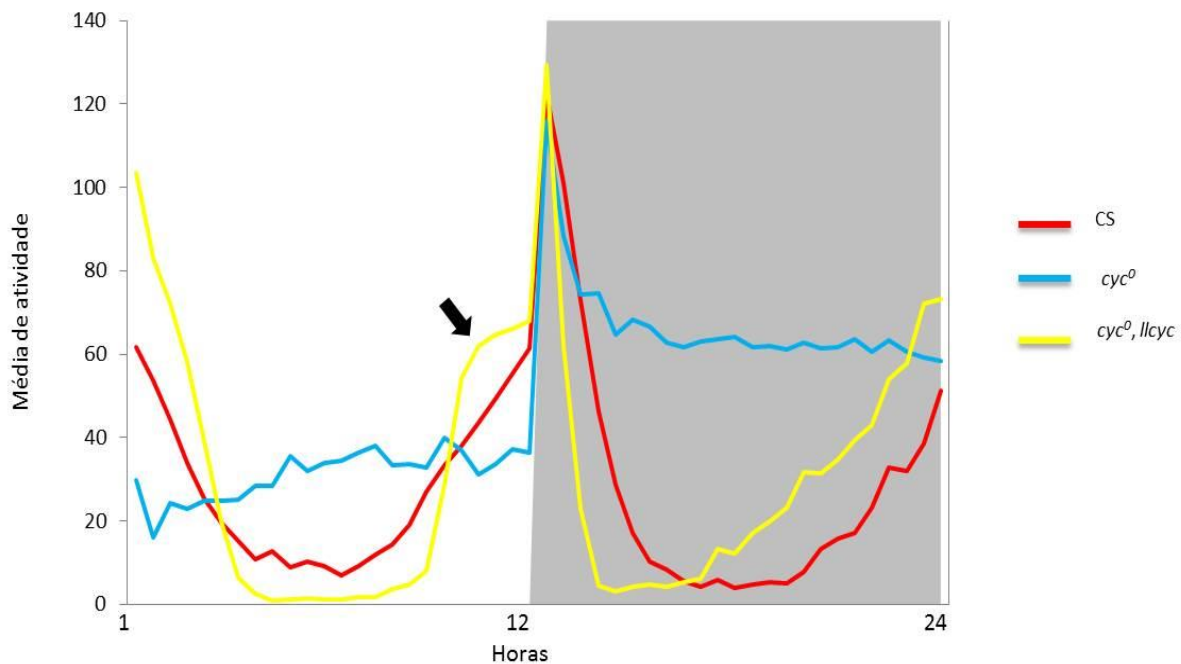
\* - Marca as linhagens que apresentaram diferença significativa de CS (ANOVA, p<0.001)

### 4.3. Expressão de *llcyc* em moscas mutantes homozigotas

Os testes do efeito da proteína CYC de *L. longipalpis* em *D. melanogaster* em indivíduos selvagens e mutantes heterozigotos para uma ou ambas as mutações (*Clk<sup>Jrk</sup>* e/ou *cyc<sup>0</sup>*) mostraram um efeito de LLCYC no relógio de *D. melanogaster*, porém a dose selvagem das proteínas poderiam compensar a dose ausente e desta forma influenciar no resultado observado. Por isso, observamos resultados divergentes em alguns casos. Desta forma, testamos as moscas em *backgrounds* genéticos onde os mutantes fossem homozigotos, pois só assim poderíamos inferir o real efeito do transgene.

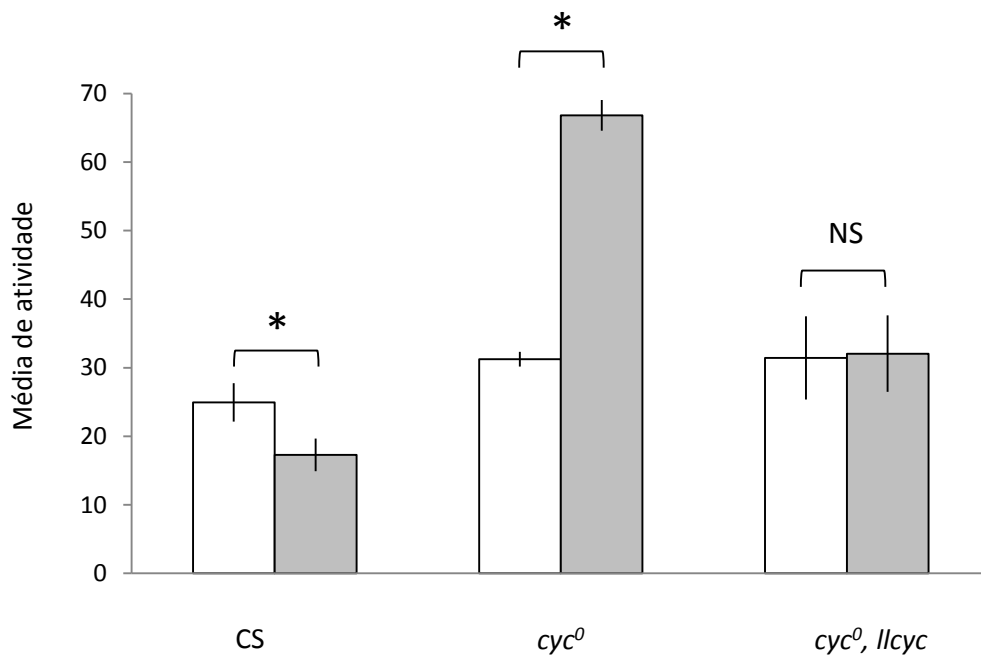
#### 4.3.1. Expressão de *llcyc* nos mutantes *cyc<sup>0</sup>* de *D. melanogaster*

Sob o controle de *timgal4*, dirigimos a expressão de LLCYC nos mutantes homozigotos *cyc<sup>0</sup>* de *D. melanogaster*. As moscas com a mutação *cyc<sup>0</sup>* apresentam comportamento arritmico e se tornam mais ativas durante à noite (Allada, 1998). A expressão de LLCYC nos mutantes *cyc<sup>0</sup>* resgatou o comportamento rítmico e reduziu a atividade noturna (Figura 4.18). No entanto é possível observar uma atividade pronunciada no final da fotofase indicando um possível encurtamento do período dessas moscas (Figura 4.18 – seta).



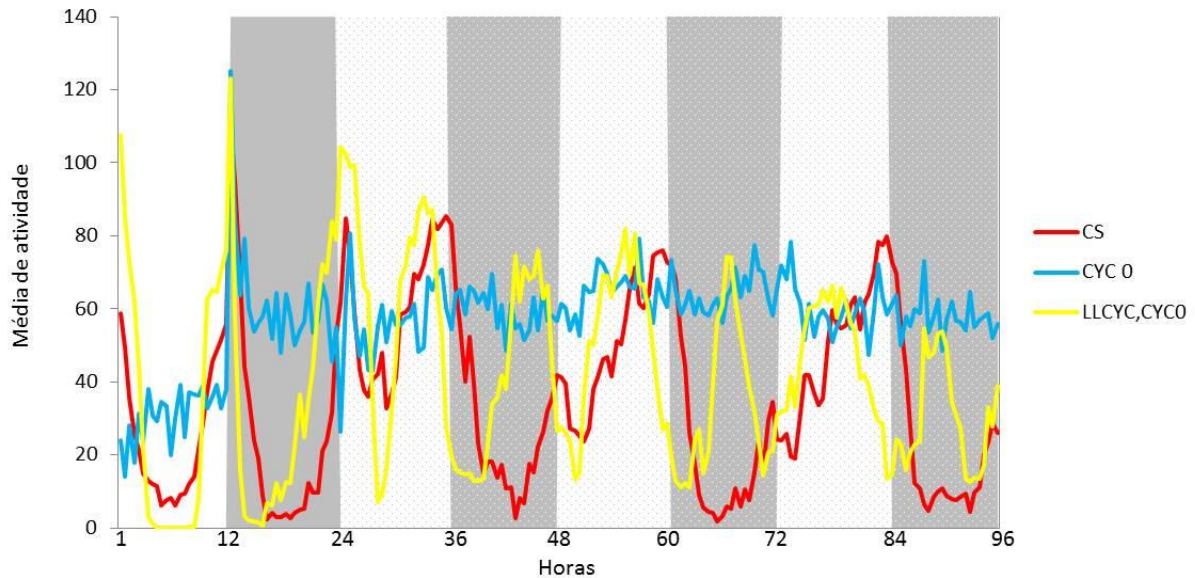
**Figura 4.18.** Atividade locomotora do mutante *cyc<sup>0</sup>* carregando *llyc*. Regime de LD12:12, fundo branco representa 12h de luz e fundo cinza 12h de escuro. Linha azul representa atividade locomotora de *cyc<sup>0</sup>*; n=30; vermelha CS (selvagem), n=31; amarela *cyc<sup>0</sup>*, *llyc*, n=30. Foram encontradas diferenças significativas apenas entre moscas selvagens e os mutantes *cyc<sup>0</sup>* (ANOVA-Kruskal Wallis p<0.0001).

Conforme observado no padrão de atividade locomotora, moscas mutantes apresentaram a atividade noturna muito maior que a atividade diurna, ao contrário de moscas selvagens (Figura 4.19). Contudo, LLCYC nesses mutantes reduziu a atividade noturna das moscas, e resgatou parcialmente o fenótipo selvagem, de forma que não foram encontradas diferenças significativas com CS (Figura 4.19).



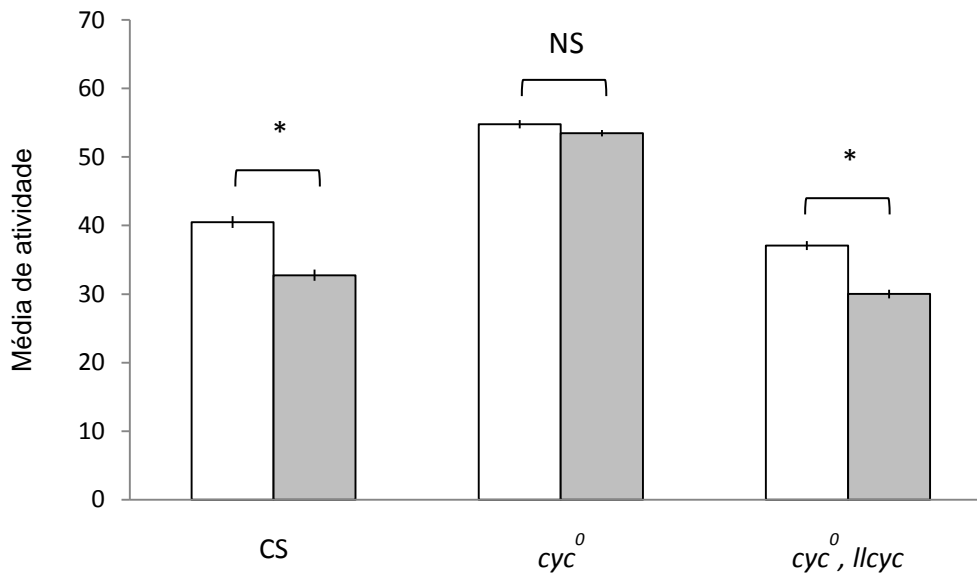
**Figura 4.19.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas homocigotas para a mutação *cyc*<sup>0</sup>. Média de dois experimentos em LD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. *cyc*<sup>0</sup>; n=30; CS (selvagem), n=31; *cyc*<sup>0</sup>, *llcyc*, n=30. Asteriscos mostram diferença significativa (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

Como esperado, na condição de escuro constante (DD) moscas *cyc*<sup>0</sup> apresentaram um padrão arritmico diferente do regime de LD, pois esses mutantes não percebem o dia nem a noite subjetivos e por isso seu padrão de atividade locomotora apresentado assemelha-se a uma linha reta (Figura 4.20). O padrão dos mutantes com LLCYC foi mais surpreendente nessa condição, pois apresentou um padrão bimodal por vários dias, e, além disso, os picos sofreram um deslocamento para esquerda, sugerindo uma acentuada redução no período dessas moscas (Figura 4.20).



**Figura 4.20.** Atividade locomotora do mutante *cyc*<sup>0</sup> carregando *llcyc*. No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Linha azul representa atividade locomotora de *cyc*<sup>0</sup>; n=24; vermelha CS (selvagem), n=28; amarela *cyc*<sup>0</sup>, *llcyc*, n=30. Foram encontradas diferenças significativas na condição de DD apenas entre moscas selvagens e os mutantes *cyc*<sup>0</sup> (ANOVA-Kruskal Wallis  $p < 0.0001$ ).

O padrão de atividade locomotora mostrou que os mutantes *cyc*<sup>0</sup> não percebem a diferença do dia para noite subjetivos e por isso, apresentam um padrão similar a uma linha reta. Assim, foi observado que a atividade desses mutantes no dia não foi distinguível da atividade na noite, ao contrário do que foi observado para moscas que carregavam LLCYC, onde a média diurna foi significativamente superior à média noturna, como visto em CS (selvagem) (Figura 4.21).



**Figura 4.21.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas heterozigotas para a dupla mutação *cyc*<sup>0</sup>. Média de dois experimentos em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. *cyc*<sup>0</sup>; n=24; CS (selvagem), n=28; *cyc*<sup>0</sup>, *llcyc*, n=30. Asteriscos mostram diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

A análise do tamanho do período dos mutantes *cyc*<sup>0</sup> carregando *llcyc* revelou uma redução no período acompanhada de poucos indivíduos arrítmicos, o que sugere fortemente, portanto, que houve o resgate da função selvagem nos 79% dos indivíduos que apresentaram comportamento rítmico (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5.** Efeito de LLCYC no período dos mutantes *cyc*<sup>0</sup>.

Linhagem	Período(h)	±EPM(h)	Rítmicos(%)	n
CS	24,05	0,06	97	29
<i>cyc</i> <sup>0</sup>	----	----	0	26
<i>llcyc</i> , <i>cyc</i> <sup>0</sup>	22,41*	0,12	79	29

n – número de indivíduos testados

Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

\* - Marca a diferença significativa entre CS e as moscas com a construção (ANOVA, p<0.001)

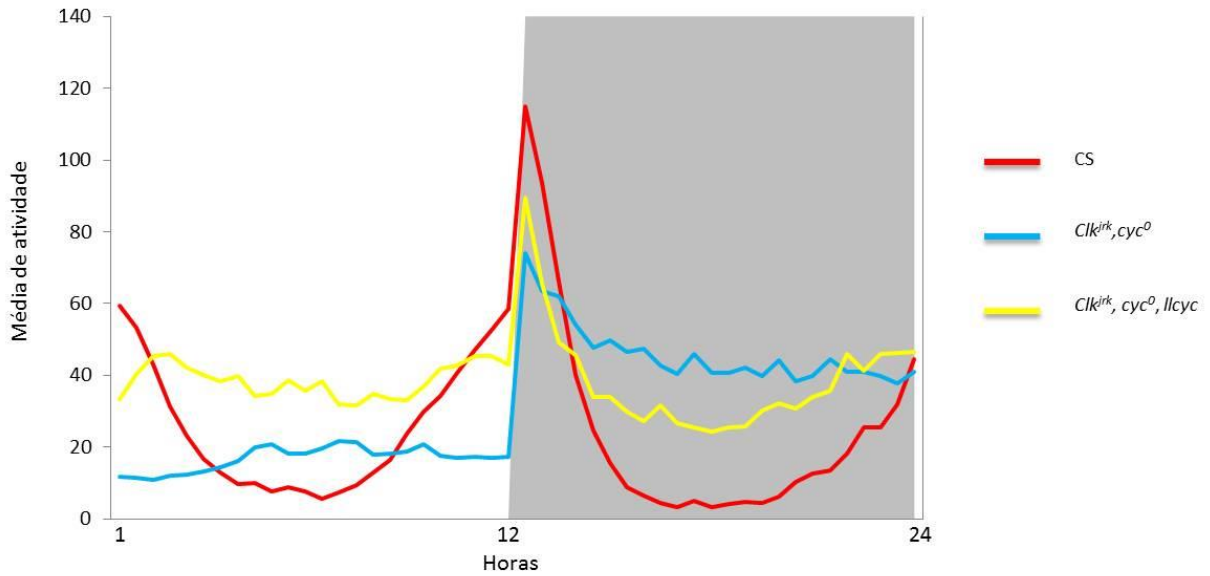


### 4.3.1 Expressão de *l/cyc* em moscas homocigotas para a dupla mutação

*cyc<sup>0</sup>, Clk<sup>Jrk</sup>*

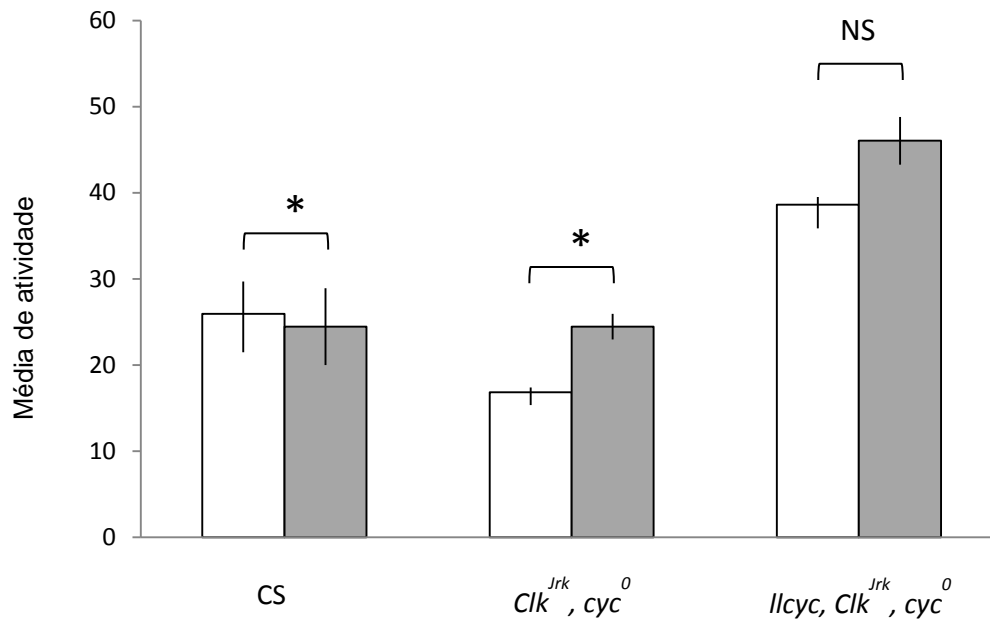
Tanto em LD 12:12, quanto em DD, moscas selvagens apresentam a antecipação das transições. A antecipação é uma característica intrínseca do relógio circadiano, e permite que o organismo se prepare para as mudanças no ambiente. Essa capacidade, percebida como um aumento gradual da atividade locomotora antes das transições, é perdida tanto nos mutantes arrítmicos *Clk<sup>Jrk</sup>* ou *cyc<sup>0</sup>*, quanto no duplo mutante (*Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*).

A expressão de *l/cyc* recuperou o ritmo de atividade locomotora no duplo mutante nulo *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* (Figura 4.22). A linhagem CS (selvagem) apresentou a antecipação das transições da fase clara para a fase escura, e do dia para a noite subjetivos, já o duplo mutante arrítmico não mostrou essas antecipações, apresentando apenas uma resposta abrupta ao apagar das luzes (*startle response*) (Figura 4.22). Contudo a expressão de *l/cyc* restaurou no duplo mutante a capacidade de antecipar as transições, mostrando um aumento gradual da atividade locomotora tanto em LD quanto em DD. No entanto, o pico da transição do dia para noite subjetivos, ocorreu um pouco mais cedo do que em CS, sugerindo que o período dessas moscas seria um pouco mais curto do que o observado em moscas selvagens (figura 4.24).



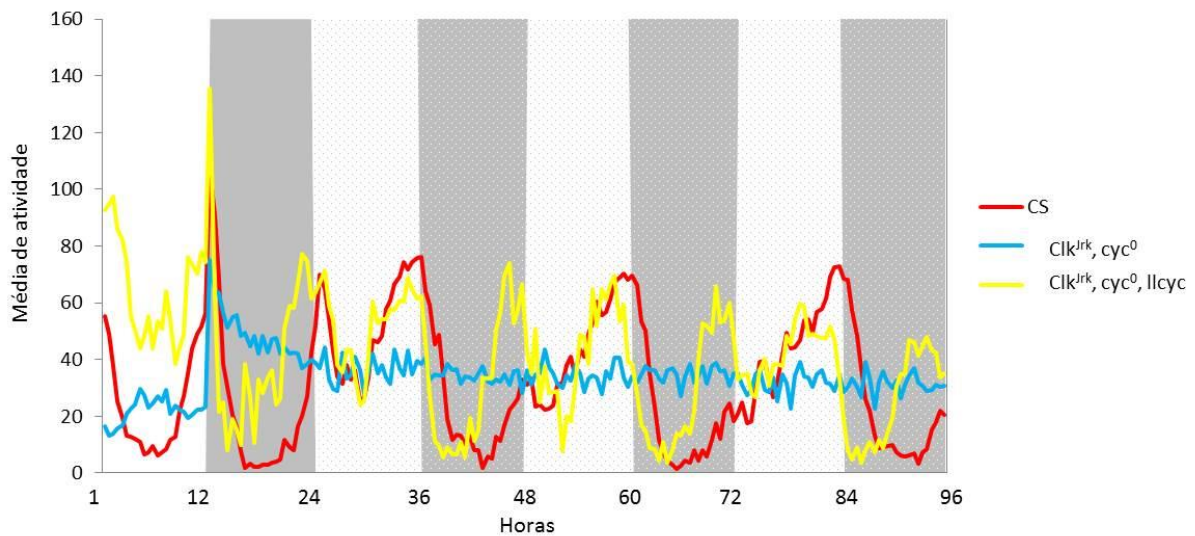
**Figura 4.22.** Atividade locomotora do duplo mutante *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* carregando *llcyc*. Regime de LD, fundo branco representa 12h de luz e fundo cinza 12h de escuro. Linha azul representa atividade locomotora do duplo mutante *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*, n=37; vermelha CS (selvagem), n=43; amarela *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>, llcyc*, n=29. Foram encontradas diferenças significativas entre os três genótipos testados (ANOVA-Kruskal Wallis p<0.0001).

O duplo mutante *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* inverteu a fase em LD em relação a CS e se tornou mais ativo durante à noite do que no dia. Ao contrário do que ocorre em moscas selvagens (Figura 4.23). A expressão de LLCYC reduziu a diferença do dia para a noite a ponto de não haver diferença significativa entre o dia e à noite, contudo não restaurou a condição selvagem (Figura 4.23).



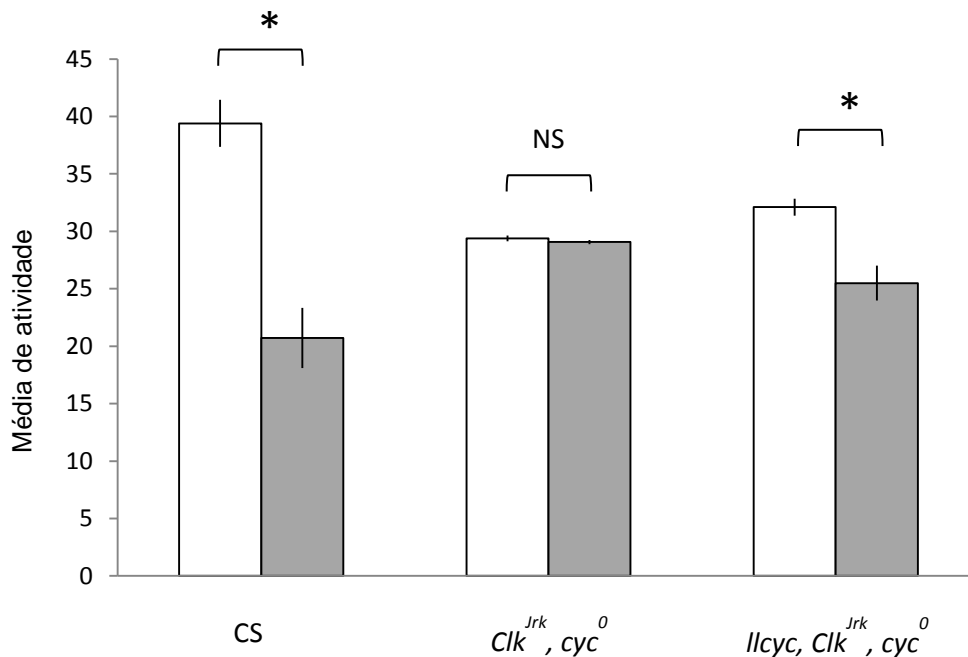
**Figura 4.23.** Comparação entre as médias diurna e noturna de moscas com a dupla mutação *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*. Média de dois experimentos em LD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*, n=37; CS (selvagem), n=43; *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>, Ilcyc*, n=29. Asteriscos marcam diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

Em DD, o duplo mutante arritmico, como esperado, não mostrou qualquer alteração do comportamento entre a fase clara e a fase escura. Já moscas selvagens (CS) apresentaram comportamento rítmico marcado pela antecipação (Figura 4.24). A expressão de *Ilcyc* recuperou a condição rítmica do duplo mutante, que mostrou um padrão bimodal por vários dias, que se deslocou à esquerda ao longo dos dias, sugerindo encurtamento de período. Além disso, na escotofase foi observado uma diferença marcante entre CS e LLCYC onde entram quase em antifase (Figura 4.24).



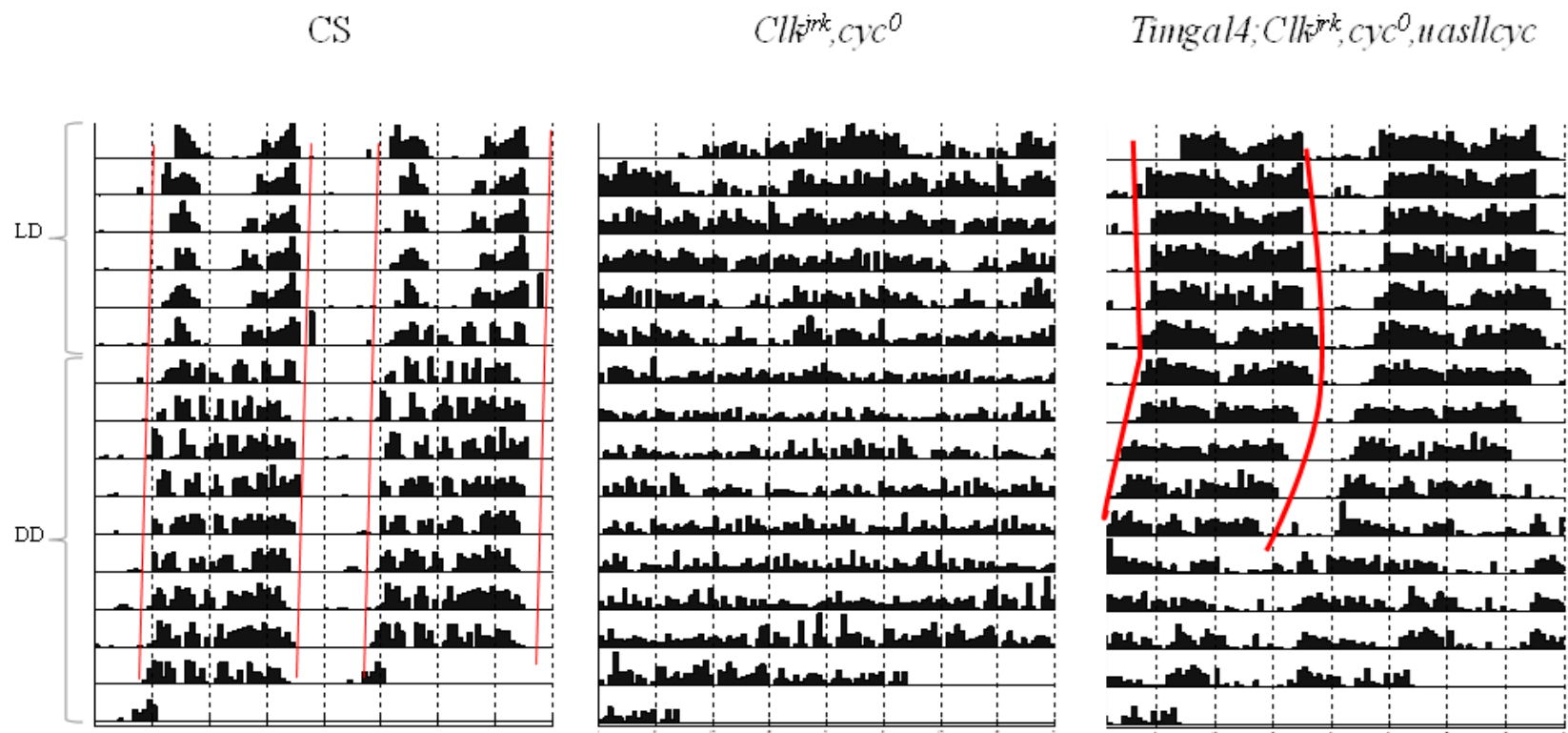
**Figura 4.24.** Atividade locomotora do duplo mutante  $Clk^{Jrk}, cyc^0$  carregando  $llcyc$ . No gráfico estão representados um dia de LD seguido de três dias de DD. Fundo branco representa o dia; fundo cinza, noite subjetiva. As áreas brancas hachuradas representam o dia subjetivo e as áreas hachuradas na cor cinza representam a noite subjetiva. Linha azul representa atividade locomotora do duplo mutante, n=42; vermelha CS (selvagem), n=32; amarela  $Clk^{Jrk}, cyc^0, llcyc$ , n=27. Foi encontrada diferença significativa apenas entre CS e o duplo mutante ( $Clk^{Jrk}, cyc^0$ ) (ANOVA-kruskal wallis  $p < 0.001$ ).

Ainda em DD, analisamos a diferença entre a atividade locomotora diurna e noturna das moscas, o duplo mutante arritmico não apresenta diferença significativa entre o dia e a noite ao passo que CS apresentou maior atividade diurna do que noturna. A expressão de LLCYC parece recuperar parcialmente essa condição ao tornar as moscas mais diurnas, assim como CS (Figura 4.25).



**Figura 4.25.** Comparação entre as médias diurna e noturna do duplo mutante carregando *Ilcyc*. Média de dois experimentos em DD. Barras verticais brancas representam a média diurna; barras verticais de cor cinza, média noturna. Duplo mutante, n=42; CS (selvagem), n=32; *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*, *Ilcyc*, n=27. Asteriscos marcam diferenças significativas (ANOVA-kruskal wallis p<0.001).

Como visto anteriormente, o padrão de atividade de *D. melanogaster* é bimodal diurno, no entanto alguns mutantes de relógio circadiano apresentam diferenças neste ritmo. Moscas duplo mutantes homocigotas (*Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*) são arrítmicas quando colocadas em escuridão constante (DD). Embora a expressão de *uasIlcyc* tenha restaurado parcialmente a ritmicidade nos mutantes, o padrão observado indica que ocorreu uma redução no tamanho do período em DD. Além disso, em LD, as moscas (*Timgal4; uasIlcyc, Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*) não apresentaram a “siesta” (redução da atividade no meio do dia) bem definida, presente em moscas selvagens (CS) (Figura 4.26).



**Figura 4.26.** A expressão de *IIcyc* em células do relógio circadiano recuperou a atividade locomotora do duplo mutante arritmico (*Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>*) Os actogramas acima correspondem a atividade locomotora de moscas submetidas a 5 dias de LD seguidos de 10 dias de DD, (duplamente representados no gráfico), média de dois experimentos. CS corresponde a linhagem selvagem, n=41. *Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* duplo mutante arritmico, n=19. *Timgal4; uasIIcyc, Clk<sup>Jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* duplo mutante carregando o gene *cyc* de *L. longipalpis* sob o controle de *timgal4*, n=17. As linhas vermelhas mostram o deslocamento do pico de atividade em DD, mais pronunciado no mutante com a construção.

O gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) restaurou o ritmo de atividade locomotora em apenas 24% dos mutantes testados, com uma redução significativa do período destas (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6.** Efeito de LLCYC no período do duplo mutante (*Clk<sup>Jrk</sup>*, *cyc<sup>0</sup>*).

<b>Linhagem</b>	<b>Período(h)</b>	<b>±EPM(h)</b>	<b>Rítmicos(%)</b>	<b>n</b>
<b>CS</b>	24,15	0,04	97	40
<b><i>Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup></i></b>	----	----	0	30
<b><i>llcyc</i>, <i>Clk<sup>Jrk</sup></i>, <i>cyc<sup>0</sup></i></b>	23,14*	0,05	24	25

n – número de indivíduos testados

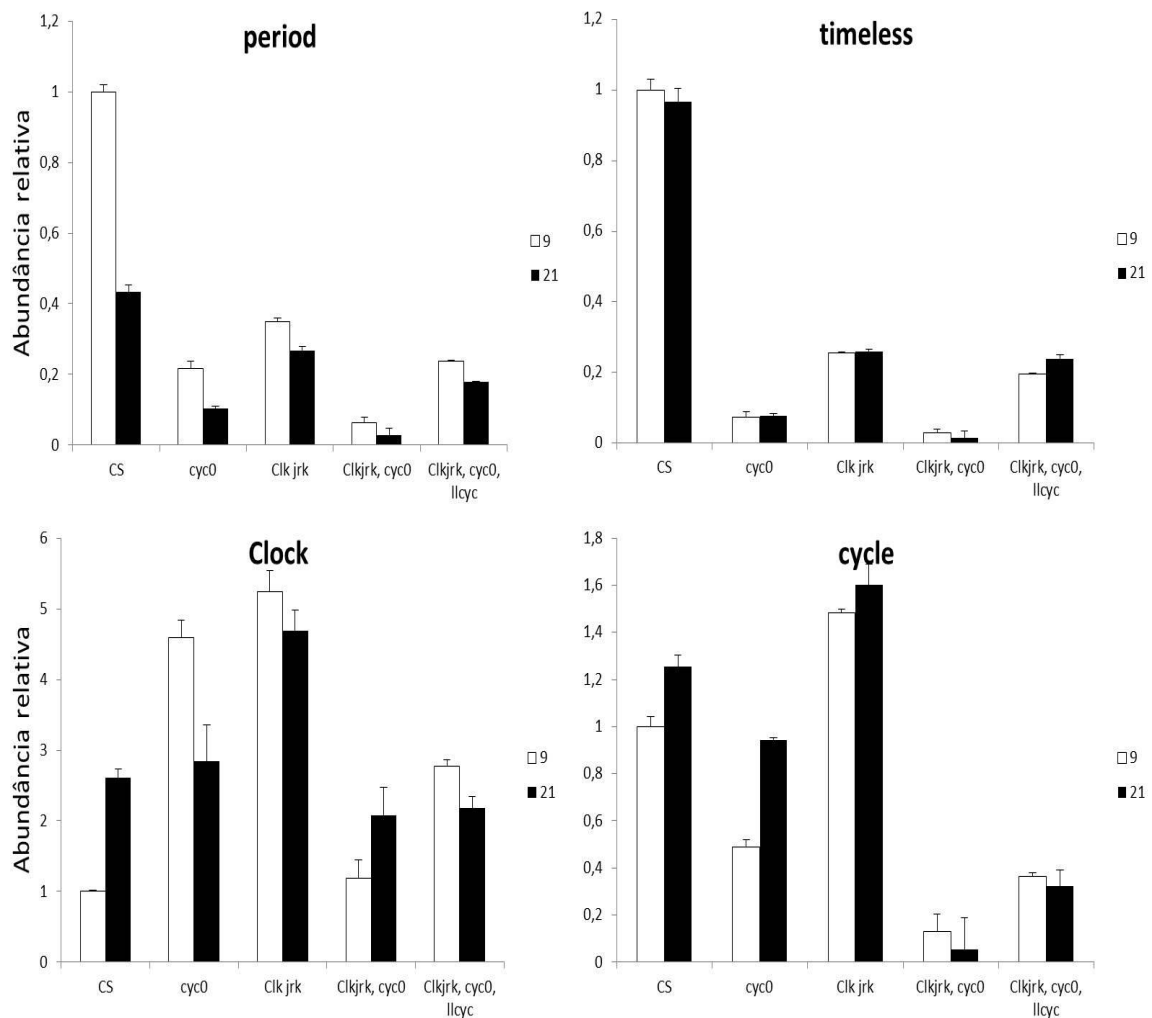
Período - período endógeno em horas

EPM – ± Erro padrão da média em horas

\* - Marca diferença significativa entre CS e os mutantes com a construção (ANOVA,  $p < 0.001$ )

#### 4.4. Quantificação dos transcritos dos principais genes de relógio nas diferentes linhagens de *D. melanogaster*

A fim de verificarmos o quanto a presença da proteína LLCYC foi capaz de interferir na regulação molecular do relógio circadiano de *D. melanogaster*, realizamos ensaios de PCR quantitativo em tempo real para avaliarmos os níveis dos transcritos dos genes da primeira alça regulatória. Coletamos moscas de 5 genótipos distintos em duas fases do período circadiano: no ZT 9 (na fase clara) e no ZT 21 (na fase escura).



**Figura 4.27.** Análise dos transcritos dos genes da primeira alça do relógio circadiano. As barras brancas e pretas representam a abundância relativa dos transcritos com seus respectivos erros-padrão.



Os níveis de *per* apresentam relação esperada em moscas CS: maior expressão em ZT 9 e menor expressão em ZT 21, de acordo com dados da literatura (Hardin et al, 1990). Nos mutantes heterozigotos *Clk<sup>Jrk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* vemos que os níveis de *per* diminuem e que esta redução é ainda maior no duplo mutante *Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>*. No entanto, quando o duplo mutante carrega LLCYC (o que significa a presença de uma cauda ativadora) os níveis de *per* aumentam em comparação aos mutantes sem a construção.

Os níveis de *tim* foram semelhantes quando comparamos as fases clara e escura em todos os genótipos. No entanto, vale ressaltar que os níveis caem nos mutantes para um ou outro genótipo e que tal como visto em *per*, o duplo mutante com LLCYC tem um aumento do RNAm de *tim* em relação ao duplo mutante sem LLCYC.

O gene *Clk* apresenta níveis maiores de seus transcritos na fase escura em relação à fase clara em moscas selvagens. No entanto, apesar de parecer surpreendente, seus níveis ainda maiores em mutantes nulos para este gene e nos mutantes para o gene *cyc* é esperado. Isto está relacionado com seu papel central na regulação do relógio e sua relação com o gene *vriIle* (ver Discussão). Por hora, vale ressaltar que nos mutantes nulos que carregam LLCYC, os níveis de *Clk* se assemelham aos níveis de moscas selvagens, sem no entanto resgatar o padrão cíclico vistos em CS.

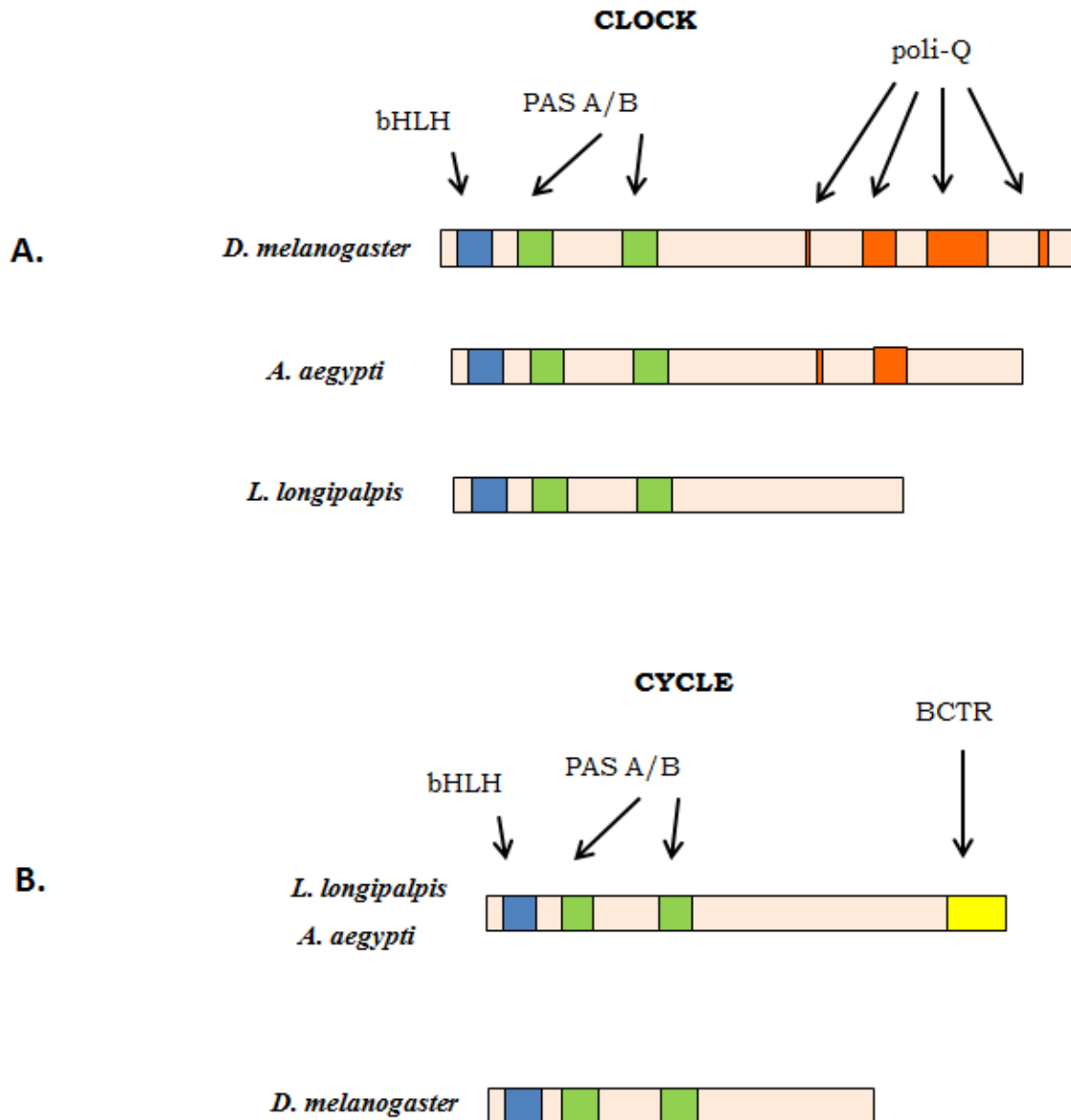
No caso de *cycle*, embora a presença de LLCYC não promova o retorno de níveis similares ao de moscas selvagens, seus níveis são maiores que o background genético ao qual foi inserido (duplo mutante *Clk<sup>Jrk</sup>,cyc<sup>0</sup>*) sugerindo uma tendência a recuperação do fenótipo também para este gene, mesmo que em menores proporções. O gene *cyc* tem expressão constitutiva em *Drosophila*.

Portanto, não seria esperada nenhuma variação entre as fases clara e escura em nenhum dos genótipos.

#### 4.5 – Análise da evolução molecular de CYC e CLK

Para investigar as similaridades genéticas de CLK e de CYC nos diferentes níveis taxonômicos, foram utilizadas sequências de diferentes espécies (ver material e métodos). Os alinhamentos mostraram três formas distintas para CLK e duas formas para CYC (Figura 4.27; Anexo 1; Anexo 2). Nesse projeto, essa análise foi estendida para outros artrópodes e alguns vertebrados na tentativa de identificar o caráter pleiomórfico do dímero CLK - CYC. Para CLK, um padrão similar a *D. melanogaster* (Rutila et al. 1998) foi observado em outras duas espécies, *Anopheles darlingi* e *Macrobrachium rosenbergii*, onde além dos domínios bHLH de ligação ao DNA e PAS A/B de interação entre as proteínas CLK-CYC, uma longa repetição de glutaminas (poli-Q) estava presente (Figura 4.28 A). Uma forma similar a *L. longipalpis* (Gesto, 2006), onde apenas os domínios bHLH-PAS estavam presentes foi observado em nove das 21 espécies estudadas (Figura 4.28 A). Uma terceira forma, aparentemente intermediária entre os outros dois citados e onde além dos sítios bHLH - PAS A/B, está presente uma poli-Q reduzida em relação ao observado em *D. melanogaster*, foi evidenciada em *Ae. aegypti* e outros cinco insetos, e vertebrados (Figura 4.28 A). A análise de CYC mostrou duas formas que já haviam sido descritas para *Ae. aegypti*, *L. longipalpis* e *D. melanogaster* (Allada et al. 1998; Gesto, 2006) onde somente o domínio de transativação BCTR está ausente em *D. melanogaster* e presente nas outras duas espécies

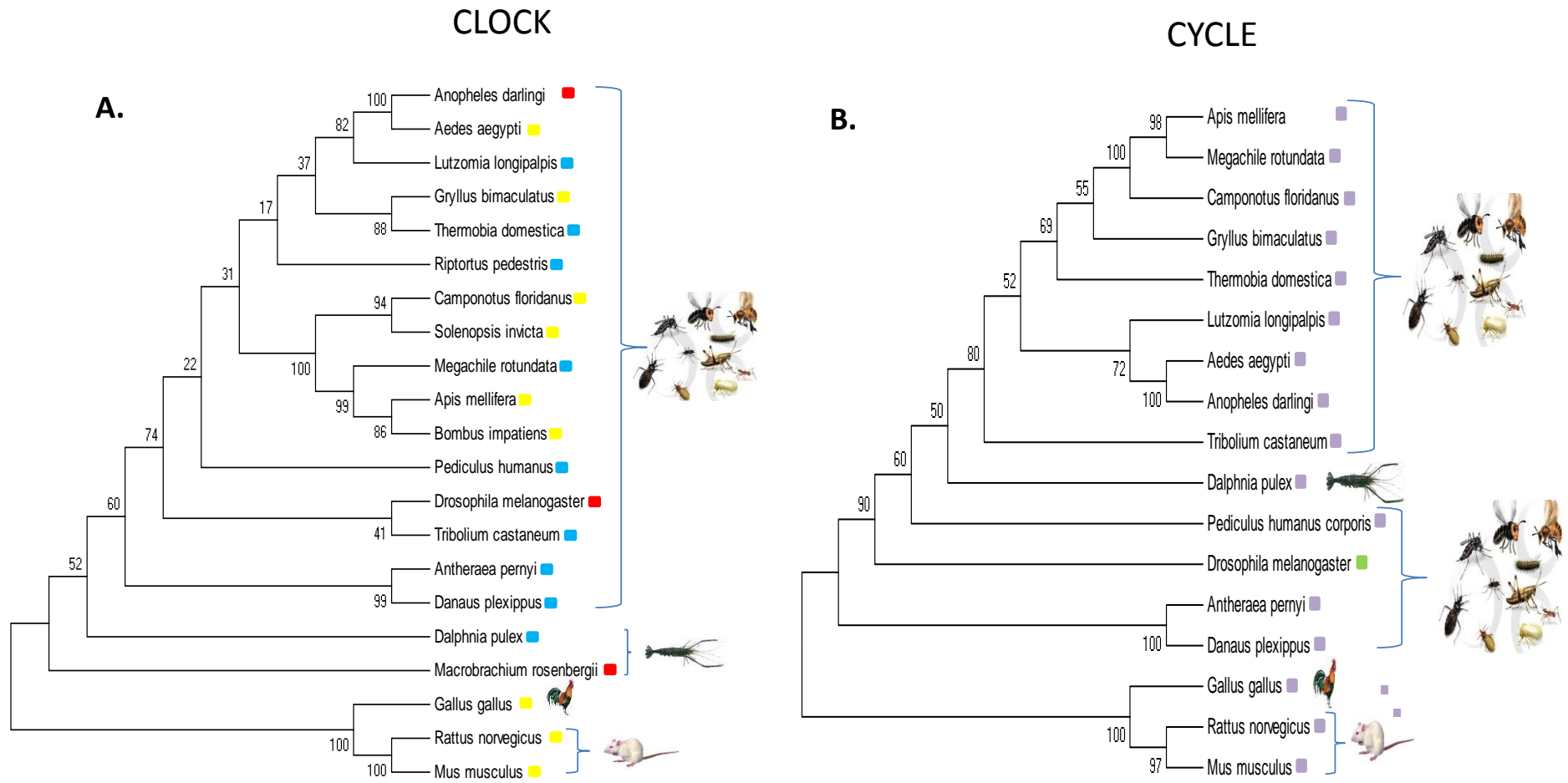
(Figura 4.28 B). Todas as espécies testadas com exceção de *D. melanogaster* apresentaram o domínio BCTR em CYC (Figura 4.28 B).



**Figura 4.28.** Representação das formas apresentadas por CLK - CYC. **(A)** Representação das formas observadas para CLK. **(B)** Representação das formas observadas para CYC.

Em uma análise preliminar, foram construídas árvores de Neighbor Joining (NJ) onde para a proteína CYC foi considerado a sequência a

partir do sítio bHLH até o final e para CLK, do bHLH até o PAS B, na tentativa de investigar qual seria a forma pleisiomórfica ou apomórfica (Alinhamento nos anexos 1 e 2). A NJ de CLK revelou que a forma dessa proteína com bHLH, PAS A/B e sem a poli-Q estava distribuída entre hexápodos e crustáceos e não formavam um grupo (Figura 4.29A). No entanto, a presença de poli-Q parece não ser exclusividade de *D. melanogaster*, pois repetições de glutaminas maiores do que as encontradas em *D. melanogaster* foram observadas também em *Macrobrachium rosenbergii* e *Anopheles darlingi* (Figura 4.29A).



**Figura 4.29.** Árvores de NJ construídas a partir das seqüências de CLK e de CYC. **(A)** NJ construídas com a seqüência de CLK de 21 espécies sem poli-Q. Quadrados vermelhos marcam forma de CLK similar a *D. melanogaster*, azul, forma similar a *A. aegypti*; amarelo, similar a *L. longipalpis* e vertebrados. **(B)** NJ construída a partir das 17 seqüências completas de CYC. Quadrados na cor lilás representam a forma da proteína com BCTR e em verde a forma sem poli-Q observada em *D. melanogaster*.

Para avaliar o grau de conservação dos ortólogos de CLK e CYC entre todos os grupos testados, foram calculadas a identidade da proteína completa e dos sítios funcionais utilizando o programa MEGA 6. Para CYC foi visto que todas as espécies com exceção de *D. melanogaster* possuem o domínio BCTR conservado, com valores de identidade superiores a 80% (Tabela 4.7). A mesma abordagem foi realizada para CLK, que mostrou que os sítios PAS B e bHLH apresentaram valores de identidade superiores aos evidenciados no PAS A (Tabela 4.8). Além disso, em uma análise quantitativa de poli-Q foi possível observar que *An. darlingi* possui uma quantidade relativa de poli-Q de 25,79% enquanto em *D. melanogaster* esse valor é de 20,34% (Tabela 4.8). O crustáceo *M. rosenbergii* apresentou uma proporção mais de duas vezes superior ao de *D. melanogaster*, 44,48% (Tabela 4.8). Essa abordagem tornou mais evidente o caráter intermediário de poli-Q, como visto em vertebrados, por exemplo, em torno de 19% (Tabela 4.8).

**Tabela 4.7.** Cálculo da identidade entre os homólogos da proteína CYC.

Espécies	Identidade*					aa
	Total	bHLH	PAS A	PAS B	BCTR	
<i>Aedes aegypti</i>	64%	94%	91%	92%	97%	843
<i>Anopheles darlingi</i>	63%	94%	91%	92%	97%	903
<i>Antheraea pernyi</i>	45%	85%	70%	63%	88%	589
<i>Apis mellifera</i>	60%	96%	88%	90%	97%	862
<i>Camponotus floridanus</i>	62%	96%	89%	88%	97%	890
<i>Daphnia pulex</i>	46%	60%	89%	73%	94%	654
<i>Danaus plexippus</i>	45%	85%	72%	69%	88%	649
<i>Drosophila melanogaster</i>	42%	85%	77%	69%	-	413
<i>Gallus gallus</i>	47%	74%	74%	67%	91%	633
<i>Gryllus bimaculatus</i>	57%	74%	91%	90%	97%	599
<i>Lutzomia longipalpis</i>	-	-	-	-	-	622
<i>Megachile rotundata</i>	61%	94%	88%	87%	97%	899
<i>Mus musculus</i>	47%	74%	74%	69%	91%	626
<i>Pediculus humanus corporis</i>	55%	89%	84%	71%	91%	607
<i>Rattus norvegicus</i>	47%	74%	74%	69%	91%	626
<i>Thermobia domestica</i>	62%	92%	91%	88%	97%	644
<i>Tribolium castaneum</i>	63%	94%	84%	79%	97%	675

\* - Os valores de identidade foram calculados no programa Bioedit, utilizando-se CYC de *L. longipalpis*.

**Tabela 4.8.** Cálculo da identidade entre os homólogos de CLK.

Espécie	Identidade* (CLK)				poli-Q**		
	Total	bHLH	PAS A	PAS B	aa	Absoluta	relativa (%)
<i>Aedes aegypti</i>	60%	76%	63%	85%	880	103	17.73
<i>Anopheles darlingi</i>	61%	76%	60%	89%	1107	196	25.79
<i>Antheraea pernyi</i>	53%	69%	42%	83%	611	29	9.21
<i>Apis mellifera</i>	58%	72%	51%	87%	724	66	16.14
<i>Bombus impatiens</i>	58%	72%	53%	87%	733	70	16.75
<i>Camponotus floridanus</i>	57%	74%	53%	87%	702	65	16.13
<i>Daphnia pulex</i>	49%	63%	35%	77%	892	48	8.76
<i>Danaus plexippus</i>	52%	70%	49%	87%	602	30	9.74
<i>Drosophila melanogaster</i>	-	-	-	-	1027	144	20.34
<i>Gallus gallus</i>	45%	58%	35%	85%	853	104	19.81
<i>Gryllus bimaculatus</i>	62%	76%	67%	85%	594	56	20.44
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	62%	76%	72%	85%	694	49	12.50
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	47%	69%	37%	80%	704	161	44.48
<i>Megachile rotundata</i>	59%	72%	53%	87%	724	55	13.45
<i>Mus musculus</i>	46%	58%	42%	83%	855	103	19.54
<i>Pediculus humanus</i>	52%	70%	49%	74%	660	34	9.44
<i>Rattus norvegicus</i>	46%	58%	40%	85%	832	97	19.25
<i>Riptortus pedestris</i>	56%	70%	58%	87%	571	26	9.96
<i>Solenopsis invicta</i>	57%	74%	53%	87%	673	59	16.57
<i>Thermobia domestica</i>	59%	76%	65%	83%	522	17	8.21
<i>Tribolium castaneum</i>	57%	78%	60%	80%	581	41	13.95

\* - Os valores de identidade foram calculados no programa Bioedit, utilizando-se CLK de *D. melanogaster*.

\*\* - Análise quantitativa de poli-Q foi realizada no programa MEGA 6.



## 5. Discussão

Nesse trabalho foram avaliados aspectos funcionais e evolutivos da primeira alça do relógio circadiano de insetos vetores. Para investigar a conservação funcional entre as espécies utilizamos *D. melanogaster* transformadas com a ORF completa do gene *l/cyc* sob o controle do sistema UAS/GAL4, já a análise evolutiva foi realizada através das sequências obtidas no GenBank e testadas em programas específicos para esse fim.

### 5.1. Expressão de *l/cyc* em moscas selvagens

Através do sistema binário UAS/GAL4, que é utilizado para dirigir expressão gênica em *D. melanogaster* desde o final dos anos 80 (Brand and Perrimon 1993), dirigimos a expressão de *l/cyc* em células do relógio circadiano de moscas selvagens. Esse sistema derivado de leveduras não é exclusivo de *D. melanogaster*. Esse mesmo mecanismo já foi utilizado também em *zebrafish* e, recentemente, foi apresentado seu uso em *Aedes aegypti* (Jones, 2009; Davison et al., 2007; Kokoza & Raikhel, 2011). Contudo, em *D. melanogaster* existem inúmeros trabalhos com essa técnica que a cada ano fica mais sofisticada e confiável, sendo utilizada, por exemplo, para especificamente fazer a ablação, inibição ou ativação de pequenos grupos de neurônios para, desta forma, permitir a investigação de modelos complexos de comportamento (Jones, 2009).

A clonagem e transformação das moscas com *l/cyc* foi realizada durante o meu mestrado. Durante esse período foi possível também fazer um

teste preliminar para avaliar qual seria melhor acentuador para dirigir a expressão de *llyc*. Foram testados os ativadores *timgal4*, *elavgal4* e *pdfgal* que são construídos com a região promotora dos genes *timeless*, *elav* e *pdf* respectivamente. Desta forma, caso fosse utilizado *elavgal4* a expressão de *llyc* ficaria localizada em todo sistema nervoso das moscas. Se *pdfgal4* fosse escolhido *llyc* ficaria restrito ao cerne do relógio circadiano e, caso fosse utilizado *timgal4*, a expressão de *llyc* seria localizada em todos os grupos celulares requeridos para o funcionamento do relógio circadiano, ou seja, os neurônios ventro-laterais (LN<sub>v</sub> - *lateral neurons ventral*), os neurônios dorso-laterais (LN<sub>d</sub> - *dorsal lateral neurons*), três grupos de neurônios dorsais (DN1, DN2, DN3 - *dorsal neurons*), e os neurônios postero-laterais (Renn *et al.*, 1999; Helfrich-Foster & Homberg, 1993; Emery *et al.*, 1998). Após testes feitos tanto em LD quanto em DD, e, utilizando como controle a ORF do gene *cyc* de *D. melanogaster* fusionada a UAS (*uasdmcy*), foi observado que o melhor ativador para *uaslllyc* seria *timgal4*. Por esta razão foi escolhido para realização desse trabalho (Amoretty, 2010).

A expressão de *uaslllyc* dirigida por *timgal4* em moscas selvagens revelou um efeito específico no relógio, embora a separação de *L. longipalpis* e *D. melanogaster* tenha sido há mais de 200 milhões de anos. Nas duas condições testadas (LD e DD), as moscas apresentaram um padrão sugestivo de encurtamento do período, porém com uma amplitude da atividade locomotora menor que CS na condição de DD (Figuras 4.2 e 4.4). Como esse mesmo efeito não foi observado em *dmcyc* (*uasdmcy* - *cyc* de *D. melanogaster*) é possível que tenha sido causado pela presença da cauda de ativação BCTR presente na região C-terminal de LLCYC. A presença desse

potente ativador transcricional (BCTR) poderia ter elevado os níveis de transcrição de *per* e *tim*, cujas proteínas se acumulariam mais rápido no citoplasma e conseqüentemente os dímeros PER-TIM entrariam mais cedo no núcleo para reprimir sua própria transcrição (Zhu et al., 2008; Yuan et al., 2007).

Embora LLCYC tenha mostrado efeito específico em moscas selvagens, sua expressão causou uma redução no número de indivíduos rítmicos em relação a moscas selvagens (CS) e a superexpressão de *cyc* (*dmcyc*) (Tabela 4.1). Além disso, *l/cyc* parece ter acentuado a diferença entre a atividade diurna e noturna em LD e se manteve parecida com CS em DD. É possível que a presença das duas caudas de ativação (BCTR presente em LLCYC e poly-Q presente em *Clk*) tenha atrapalhado a ligação desses domínios com o complexo transcricional, pela competição dos fatores entre os sítios de ligação ao DNA. Contudo, foi observado um efeito inesperado causado pela superexpressão de *dmcyc* em moscas selvagens apenas em LD, onde ocorreu um aumento da atividade noturna (ANOVA – kruskal wallis  $p < 0.001$ ). Como os genes do relógio sofrem efeito de dosagem é possível que a dose extra de *dmcyc* tenha interferido a ponto de, embora em uma escala menor, ter elevados os níveis do repressor deslocando a atividade da mosca para dentro da escotofase (Figura 4.4) (Kadener et al., 2008).

## **5.2 Expressão de *l/cyc* em moscas mutantes**

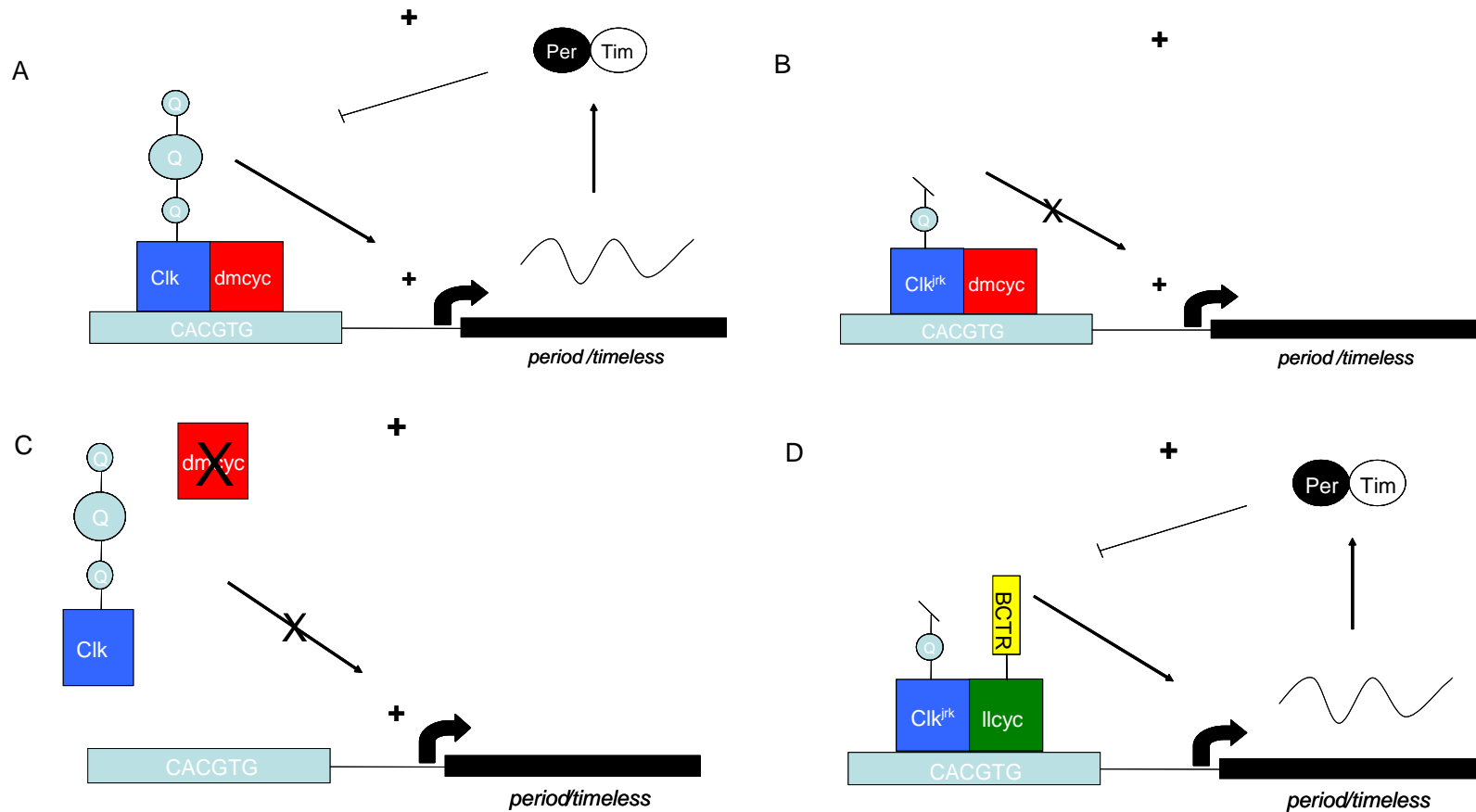
Os testes para avaliar o efeito de *l/cyc* em moscas mutantes foram realizados vislumbrando a substituição gradativa de alguns componentes

moleculares da primeira alça do relógio circadiano de *D. melanogaster* por aqueles presentes em *L. longipalpis*, a fim de reconstruir *in vivo*, parte do relógio circadiano desse inseto vetor.

Mutantes de *D. melanogaster* no estudo do Relógio Circadiano são utilizados desde de 1971, quando Konopka e Benzer identificaram três alelos mutantes para o *locus period*, através de ensaios de mutagênese seguido de uma triagem pelo comportamento de atividade locomotora (Konopka and Benzer, 1971). Desde então, a maioria dos genes requeridos para funcionalidade do relógio em *D. melanogaster* foram identificados dessa maneira. A mutação *cycle*<sup>0</sup> é causada por uma mudança em uma única base que leva a um códon de parada prematuro, desta forma a proteína CYC é truncada e não funcional, condição que causa arritmicidade em homozigose e aumento do período em heterozigose (25h) (Figuras 4.1 e 5.1C) (Rutila et al., 1998). A mutação *Clock*<sup>Jrk</sup> também é pontual e leva a um códon de parada no final da proteína, portanto, não ocorre a formação da porção C-terminal que contém a poly-Q, tornando os homozigotos arrítmicos e os heterozigotos com período maior que moscas selvagens (24,8h) (Figuras 4.1 e 5.1B) (Allada et al., 1998).

O duplo mutante *Clock*<sup>Jrk</sup>, *cycle*<sup>0</sup> representa a condição onde estão ausentes duas peças fundamentais para a função do relógio circadiano: a proteína CYC em sua totalidade e porção C-terminal de poli-Q de CLK (Figura 5.2 B,C). Essa linhagem obtida através da recombinação homóloga entre os mutantes simples *Clock*<sup>Jrk</sup> e *cycle*<sup>0</sup> é arrítmica em homozigose e, na condição heterozigótica assim como nos mutantes simples, também é marcada por um aumento do período (25h).

Os primeiros testes, iniciados com o mutante  $Clk^{Jrk}$  em heterozigose (+ /  $Clk^{Jrk}$ ) onde apenas uma dose do  $Clk$  selvagem está presente, revelaram que a expressão de LLCYC melhorou a atividade locomotora dos mutantes, pois tornou o comportamento deles mais próximo ao que é observado na condição selvagem (CS) (Figuras 4.6; 4.8). Os mutantes + /  $Clk^{Jrk}$  se mostraram ainda mais ativos na escotofase do que na fotofase na condição de LD. Em DD, inverteram esse comportamento, a expressão de LLCYC fez com que esses mutantes se tornassem noturnos em LD e diurnos em DD (Figuras 4.6 e 4.8). Isto sugere que LLCYC possivelmente interagiu com alguma proteína de uma maneira dependente de luz, ainda de maneira desconhecida para nós.



**Figura 5.1.** Diagrama esquemático do provável funcionamento de *Ilcyc* em *D. melanogaster*. **(A)** Em moscas selvagens CLK e CYC formam um heterodímero e ativam a transcrição de *per* e *tim*. Posteriormente as proteínas PER e TIM entram no núcleo e reprimem a transcrição mediada por CLK e CYC. **(B)** A mutação *Clk<sup>rk</sup>* causa um códon de parada prematuro impedindo a tradução da região de ativação poli-Q, desta forma, abole a transcrição de *per* e *tim*. **(C)** A mutação *cyc<sup>0</sup>* causa um códon de parada no início da tradução, dando origem a uma proteína troncada e não funcional, abolindo também a transcrição de *per* e *tim*. **(D)** No duplo mutante, LLCYC por possuir o domínio BCTR, possivelmente se liga a proteína codificada por *Clk<sup>rk</sup>* e substitui o domínio de ativação ausente nesse mutante. Setas indicam a transcrição, linhas cortadas por uma barra indicam repressão (Modificado de Rutila et al., 1998).

O efeito de LLCYC nos mutantes + / *cyc*<sup>0</sup> foi ainda mais nítido, tanto em LD, onde se vê um aumento da atividade locomotora aproximadamente 2h antes da transição ainda na fotofase (Figura 4.10), quanto em DD, onde esse adiantamento de fase foi maior no meio da escotofase (Figura 4.11). Vale ressaltar que esse momento é marcado pela redução da atividade locomotora de + / *cyc*<sup>0</sup> e CS (Figura 4.11). Contudo as moscas não se tornam mais noturnas; enquanto + / *cyc*<sup>0</sup> apresentou maior atividade durante à noite em DD, a expressão de LLCYC nesses mutantes reduziu a atividade noturna e desta forma tornou os mutantes mais parecidos com CS (Figura 4.12). Esses resultados sugerem que a presença de apenas uma cópia selvagem de *cyc*, associada à presença de *l/cyc*, permitiu um melhor funcionamento do relógio circadiano no mutante + / *cyc*<sup>0</sup> do que em + / *Clk*<sup>Jrk</sup>.

Embora o efeito no padrão de atividade locomotora não tenha sido tão evidente no duplo mutante heterozigoto, o efeito no período foi similar ao observado nos mutantes simples, onde houve uma redução de aproximadamente 1,5h para + / *Clk*<sup>Jrk</sup> e + / *Clk*<sup>Jr</sup>, *cyc*<sup>0</sup> e em torno de 2,5h para + / *cyc*<sup>0</sup> (Tabelas 4.2; 4.3; 4.4).

Como mencionado anteriormente, moscas homozigotas para *cyc*<sup>0</sup> são essencialmente arrítmicas (Rutila et al. 1998), porém a expressão de LLCYC nesses mutantes recuperou o comportamento rítmico de 79% dos indivíduos testados (Tabela 4.5; Figuras 4.17; 4.19). Esse resultado mostra que LLCYC foi suficiente para recuperar a função da proteína CYC de *D. melanogaster* ausente nesses mutantes.

No duplo mutante (*Clk*<sup>Jr</sup>, *cyc*<sup>0</sup>), onde a proteína CYC e a cauda de ativação poly-Q estavam ausentes, foi testada se LLCYC poderia repor os dois

componentes moleculares essenciais ao funcionamento do relógio e, desta forma, recuperar o ritmo desses mutantes. A princípio, isso seria possível, uma vez que LLCYC possui grande homologia com dCYC, além de possuir o domínio de transativação (BCTR) (Meireles-Filho et al. 2006b). De fato, LLCYC restaurou o ritmo dos mutantes, que apresentaram um padrão tão diurno quanto o apresentado por CS (Figuras 4.21; 4.24). O fato de LLCYC recuperar o ritmo no duplo mutante mostra que os domínios das proteínas de relógio compartilhadas por essas espécies que estão separadas há pelo menos 250 milhões de anos, são bastante conservados e, aparentemente não guardam informações espécie- específicas acerca do comportamento. *L. longipalpis* é um inseto crepuscular noturno e *D. melanogaster* é essencialmente diurna, porém as moscas não se tornaram crepusculares com LLCYC, mantiveram o comportamento diurno (Meireles-filho et al. 2006b).

Em 2005, foi descrito em diversos insetos o gene *cryptochrome2* (*cry2*), que ainda não foi encontrado em drosofilídeos (Zhu et al., 2005; Yuan et al., 2007) e apresenta maior homologia com os genes *cryptochrome* de vertebrados, do que com o de *D. melanogaster*, chamado também de *cry1*. Nesses insetos não-drosofilídeos, como borboletas e mosquitos, esta proteína mostrou-se um potente repressor do dímero CLK-CYC (Zhu et al., 2008). Essa repressão provavelmente ocorre através da ligação de CRY2 à cauda BCTR de CYC, como observado em mamíferos (Griffin et al., 1999; Kume et al., 1999).

Em *D. melanogaster* foi visto que a superexpressão de CRY1 e PER nos olhos das moscas, reprime CLK-CYC, sugerindo que CRY1 também poderia funcionar como um repressor transcricional do oscilador circadiano em tecidos periféricos (Collins et al., 2006). Contudo, é importante ressaltar que essa



função de repressor transcricional de CRY1 foi dependente da co-expressão de PER (Yuan *et al.*, 2007). Deste modo, é plausível que a maior redução no período e o grande número de indivíduos arrítmicos observados com a expressão de LLCYC tenha ocorrido, não apenas pelo aumento da expressão de PER, mas também, pela possível interação de CRY1 (ou alguma outra proteína) ao domínio BCTR. Isto sugere também que a cauda BCTR, quando introduzida em *D. melanogaster* poderia permitir que CRY1 funcionasse como repressor do dímero CLK-CYC de forma semelhante ao funcionamento de Cry2 em outros insetos e mamíferos (Ikeno *et al.*, 2011).

Para corroborar os dados de atividade locomotora, realizamos um primeiro ensaio preliminar de PCR quantitativo em cabeças de moscas coletadas em dois pontos em antifase do período circadiano: ZT 9 e ZT 21. Nossa ideia era avaliar se os efeitos vistos nos actogramas eram resultado direto de alterações moleculares no relógio. De maneira geral, vimos que para todos os genes, os níveis de transcritos em moscas selvagens apareceram como esperado (como visto em Hardin *et al.*, 1990), com exceção de *tim* e *cyc* (Rutila *et al.*, 1998).

No caso de *period*, os níveis do RNAm deste gene diminuem nos mutantes *Clk<sup>ir</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* e são ainda mais reduzidos no duplo mutante *Clk<sup>ir</sup>, cyc<sup>0</sup>*. Uma vez que há diminuição da força de seus ativadores, seus níveis tendem mesmo a diminuir. No entanto, o que nos chama a atenção é que no duplo mutante com LLCYC, os níveis do transcrito aumentam em relação ao duplo mutante, numa indicação que a presença de LLCYC, contendo a cauda de ativação BCTR foi capaz de restaurar, mesmo que parcialmente, o relógio circadiano de *D. melanogaster*. Este aumento de transcritos comparando

moscas duplo mutantes com e sem LLCYC pode também ser visto de forma clara quando avaliamos os níveis de *tim*, *Clk* e *cyc*. No entanto, nestes casos podemos inferir que o resgate não foi tão bem sucedido pois as relações de fase não foram as mesmas quando comparadas às moscas selvagens. Um maior número de repetições destes experimentos nos trarão luz acerca desta questão.

O alto nível dos transcritos de *Clk* e *cyc* nos mutantes nulos pode estar diretamente ligado à relação destes genes com a segunda alça de regulação, que envolve os genes *Pdp1* (ativador de *Clk* e *cyc*) e *vri* (repressor de *Clk* e *cyc*). Experimentos realizados no final da década de 90 mostraram que moscas duplo mutantes para os genes *per* e *Clk* apresentavam altos níveis de RNAm de *Clk* (Glossop et al, 1999). Isto se explicaria graças à seguinte relação: diminuição de *Clk* leva a diminuição da transcrição de *vri*, que por sua vez é repressor de *Clock*, fenômeno característico de uma alça de regulação negativa. Portanto, acreditamos que além da repetição destes experimentos, também valha a pena a avaliação dos transcritos de *vri* e *Pdp1* nestas moscas para uma compreensão mais completa de como a presença de LLCYC afeta os perfis de expressão dos genes de relógio.

#### **5.4 Análise evolutiva**

O relógio circadiano é um sistema complexo que está presente em uma variedade de organismos. Provavelmente, esse mecanismo deve ter surgido pelo menos de três maneiras independentes ao longo da evolução, uma em plantas, uma em cianobactérias e uma em metazoários (Rosbash, 2009). Essa ideia é constantemente reforçada pelos achados de proteínas do

relógio homólogas em espécies tão distantes quanto mamíferos e moscas, por exemplo (Yu & Hardin 2006).

A partir da evidência de que LLCYC foi suficiente para restaurar o ritmo do duplo mutante ( $Clk^{Jrk}$ ,  $cyc^0$ ), foi iniciada uma análise evolutiva para investigar as transformações ocorridas nessas duas proteínas ao longo do processo evolutivo dos insetos.

Em *D. melanogaster*, CLK-CYC formam um heterodímero, se ligam nos promotores de *per* e *tim* para dirigir a expressão desses genes. Essas proteínas da família bHLH/PAS possuem os sítios bHLH de ligação ao DNA, PAS A/B de interação entre as proteínas e, em dCLK, além dos sítios mencionados está presente o domínio de ativação poli-Q, que consiste em repetições em tandem de Glutaminas (revisto em Hardin, 2011). Em outros insetos, como borboletas e mosquitos, o domínio de transativação observado é BCTR, o mesmo evidenciado em mamíferos, presente em CYC (Yu and Hardin 2006; yuan et al., 2007). Diante disso, investigamos a existência de uma forma pleiomórfica do heterodímero, e quando teria ocorrido a transferência de função entre as proteínas.

Com essa abordagem, foram encontrados três tipos diferentes das proteínas CLK e dois para CYC e, como os sítios presentes nessas proteínas são fundamentais para sua função, diferentes tipos podem indicar estágios intermediários das proteínas que poderiam ter outra função. Yuan e colaboradores (2007) propuseram três modelos para o funcionamento do relógio circadiano de insetos: um modelo, como de *D. melanogaster*, onde a repressão de CLK-CYC é realizada por PER-TIM e CRY1 funciona como um sincronizador do relógio de uma forma dependente de luz; um segundo

modelo, que foi visto em borboletas, onde CRY2 funciona como repressora do relógio e CRY1 funciona de uma maneira dependente de luz; e um terceiro modelo onde somente CRY2 está presente (Yuan et al., 2007). É possível que a evolução do dímero tenha ocorrido em conjunto com as CRYs, uma vez que a interação entre essas proteínas é fundamental para o funcionamento do relógio. CRY2, por exemplo, desempenha a função de repressora do dímero CLK-CYC em borboletas através da interação com a cauda BCTR presente na CYC desses insetos (Yuan et al., 2007). Assim CRY2 possivelmente participaria da alça principal de osciladores que teriam necessariamente BCTR, ao passo que aqueles onde esse domínio estivesse ausente haveria a repressão realizada por PER, e CRY1 funcionaria como sincronizadora do relógio ativado pela luz.

Os resultados da análise evolutiva sugeriram que BCTR seria o domínio de transativação que precedeu poli-Q nessa função no relógio circadiano, e poli-Q de tamanho reduzido teria um papel acessório na ativação (Sandreli et al., 2008). O alinhamento mostrou que apenas duas das 21 espécies testadas apresentaram poli-Q comparável com *D. melanogaster*, ao passo que todas as espécies testadas com exceção *D. melanogaster* apresentaram BCTR bastante conservada (Anexos I e II). Embora seja uma análise preliminar, é plausível que BCTR tenha sido perdida e substituída por poli-Q em *D. melanogaster*. Contudo, não é possível afirmar que essa perda tenha ocorrido somente em *D. melanogaster*, uma vez que *M. rosenbergii* também apresentou um longo poli-Q, uma análise mais completa de CYC, incluindo essa espécie, poderia revelar um processo semelhante a *D. melanogaster* nesse crustáceo (Figura 4.28). Contudo para corroborar a

hipótese de que houve em algum momento a substituição de um domínio pelo outro, seria necessário encontrar uma espécie onde os dois domínios coexistissem, e de fato em *An. darlingi* foi observado a presença de um poli-Q maior que o de *D. melanogaster* e a cauda BCTR (Anexo I; Tabelas 4.7; 4.8). Um ponto interessante é que diversos autores (Sandrelli et al., 2008) afirmam que a presença da poli-Q como principal ativador seria uma característica exclusiva de *D. melanogaster*, mas, como descrito por Yang (2006) para *M. rosenbergii* e nossas observações para *An. darlingi*, essa característica precisa ser melhor investigada em outros grupos. Além disso, foi observado a presença de um poli-Q aparentemente residual, aproximadamente de 13-19% de quantidade relativa em mais da metade das espécies testadas (Tabela 4.8), o que sugere que o estágio intermediário para CLK poderia conferir alguma vantagem adaptativa para os organismos que o possuem, e seria necessário uma padronização ou rediscussão do que consideramos presença ou ausência da poli-Q.

## **6 -Conclusões**

Nesse trabalho foram investigados aspectos evolutivos e funcionais da primeira alça do relógio circadianos de insetos vetores. Nesse processo, nossos achados nos levaram a aprofundar os conhecimentos acerca do controle molecular do relógio e de suas transformações sofridas ao longo do processo evolutivo dos insetos.

Foi visto que espécies separadas a milhares de anos compartilham uma série de proteínas homólogas, que no caso de *l/cyc* foi capaz de restaurar o ritmo de mutantes arrítmicos. Essas observações podem,

no futuro, nos levar a compreender melhor o que faz uma espécie ser noturna ou outra diurna e facilitar o desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes dos vetores da Dengue e da Leishmaniose, por exemplo. Nesse sentido, esse trabalho adicionou novas informações que certamente contribuirão para esse achado. Além disso, nesse projeto foram desenvolvidos alguns transgênicos de *D. melanogaster* que serão mantidos como linhagens e reutilizados em outros projetos como ferramentas no estudo do relógio circadiano de insetos vetores.

## 8 -Referências:

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*. 93: 791-804.

Alvarenga, PH; Meirelhes-Filho, ACA; Gentile, C; Peixoto, AA. 2007. Insetos com Relógio Interno. *Ciência Hoje*, v. 41, p. 73-75.

Amoretty PR, Padilha KP, Freitas RT, Bruno RV. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano de insetos vetores. *AS&T* [internet]. 2013[acesso em 2014 mai 10]; 1(1). Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/ojs/index.php/ast/article/view/1:Volume 1, Number 1>.

Amoretty PR. Análise dos ritmos circadianos de atividade locomotora de drosófilas transgênicas carregando o gene *cycle* do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* [dissertação]. Rio de Janeiro: IOC/FIOCRUZ; 2010.

Akten, B., Jauch, E., Genova, G.K., Kim, E.Y., Edery, I., Raabe, T. and Jackson, F.R. (2003). A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.* 6, 251–257.

Ayres M, Ayres JM, Ayres DL, SANTOS AA. *BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. 2007. Ong Mamiraua. Belém, PA.

Benito J, Hoxha V, Lama C, Lazareva AA, Ferveur JF, Hardin PE, Dauwalder B. The circadian output gene *takeout* is regulated by *Pdp1ε*. *PNAS*. February 9, 2010, vol. 107, no. 6, 2544–2549.

Blau J and Young MW. 1999. Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99:661-671.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118: 401-415.

Brusca, RC, BRUSCA, GJ. *Invertebrates*. 2003. 2a. Edição. Sinauer Ass. Inc. Publ., Sunderland. 936 p.

Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr. Biol.* 2006; 16:441–9.

Consoli RAGB and Lourenço-de-Oliveira R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

Curtin, K.D., Huang, Z.J. and Rosbash, M. (1995). Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron* 14, 365–372.

Darlington, T.K. et al. (1998.) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280, 1599–1603.

Davison, J. M., Akitake, C. M., Goll, M. G., Rhee, J. M., Gosse, N., Baier, H., Parsons, M. J. (2007). Transactivation from Gal4-VP16 transgenic insertions for tissue-specific cell labeling and ablation in zebrafish. *Developmental Biology*, 304, 811–824. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.033

Duffy, JB. GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis*. 2002; 34: 1–15.

Duffy, JB. GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis*. 2002; 34: 1–15.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 1998; 95:669–679.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 1998; 95:669–679.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC and Rosbash M. 2000. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26: 493–504.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*. 2000; 26:493–504.



Gesto, JSM. Genética molecular do gene Clock em insetos vetores [dissertação]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, mestrado, pós-graduação em biologia celular e molecular; 2006.

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*. 1985; 40: 767–774.

Goto SG, Denlinger DL: Short-day and long-day expression patterns of genes involved in the flesh fly clock mechanism: period, timeless, cycle and cryptochrome. *J Insect Physiol* 2002, 48:803-16.

Greenspan R. 2004. Fly pushing – The theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor, New York 2e, p155.

Griffin EA, Staknis A, Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*. 1999; 286: 768–71.

Grima, B., Lamouroux, A., Chelot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B. and Rouyer, F. (2002) The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature* 420, 178–182.

Hall JC: Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv Genet* 2003, 48:1-280.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

Hardin PE, Hall JC, and Rosbash M Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990; 343:536-540.

Hardin, P.E. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the Ebox and beyond. *J. Biol. Rhythms* 19, 348–360.

Hardin PE, Panda S. Circadian timekeeping and output mechanisms in animals. *Curr Opin Neurobiol*. 2013 October ; 23(5): 724–731. doi:10.1016/j.conb.2013.02.018.

Hardin PE. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv Genet.* 74, 141-73.

Helfrich-Förster C, Homberg U. Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wildtype *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. *J. Comp. Neurol.* 1993; 337: 177–190.

Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall JC and Stanewsky R. 2001. The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*; 30: 249-261.

Helfrich-Forster C. 2000. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J Biol Rhythms* 15:135-154.

Helfrich-Förster C. 2004. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190, 601-13.

Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J.C. and Stanewsky, R. (2001) The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30, 249–261.

Ikeno, T., Numata, H., & Goto, S. G. (2011). Biochemical and Biophysical Research Communications Photoperiodic response requires mammalian-type cryptochrome in the bean bug *Riptortus pedestris*. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, (June), 1–4.  
doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.142

Johnson CH, Elliott JA and Foster R. 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int* 20:741-774.

Jones, W. D. (2009). The expanding reach of the GAL4 / UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila*, (6), 705–712.

Kadener S, Menet JS, Schoer R, Rosbash M. Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLOS Biology.* 2008; 6, issue 5, e119.

Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P and Rosbash M. 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.* 21, 1675–1686.

Kim EY and Edery I. 2006. Balance between DBT/CK Iepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6178–6183.

King DP, Vitaterna MH, Chang AM, Dove WF, Pinto LH, Turek FW and Takahashi JS. 1997. The mouse clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of *kit*. *Genetics* 146, 1049–1060.

Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh, A, Wesley CS and Young MW. 1998. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase.

Kloss B, Rothenfluh A, Young MW and Saez L. 2001. Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron* 30, 699–706.

Kokoza, V. A., & Raikhel, A. S. (2011). Targeted gene expression in the transgenic *Aedes aegypti* using the binary Gal4-UAS system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8), 637–644.  
doi:10.1016/j.ibmb.2011.04.004

Konopka RJ and Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl. Acad Sci USA* 68:2112-2116.

Krupp JJ, Kent C, Billeter JC, Azanchi R, So AK, Schonfeld JA, Smith BP, Lucas C and Levine JD. 2008. Social Experience Modifies Pheromone Expression and Mating Behavior in Male *Drosophila melanogaster*. *Cell Press*. 23;18(18):1373-83.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*.1999; 98: 193–205.

Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF. Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984. 4: 268–275.

Laughon A, Gesteland RF. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984; 4: 260–267.

Lee, C., Bae, K. and Edery, I. 1999. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5316–5325.

Levine JD, Funes P, Dowse HB and Hall JC. 2002. Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. Science. 6; 298 (5600) : 2010-2.

Lim, C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J and Allada, R. 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17: 1082–1089.

Lim, C. et al. 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 1082–1089.

Lin, J.M., Kilman, V.L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M. and Allada, R. 2002. A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420, 816–820.

Lima-Camara TN, Honorio NA, Lourenço-de-Oliveira R. 2006. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Públ* 22: 2079–2084.

Marques N, Menna-Barreto L. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3a ed, Edusp, 2003.

Martinek S, Susan I, Manoukian AS, Young Michael W. A Role for the Segment Polarity Gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* Circadian Clock. 2001. *Cell*. Volume 105, Issue 6, p769–779.

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa, T, Moore-Ede MC, Sulzman FM and Fuller CA. 1982. *The clocks that time us- Physiology of the circadian timing system*. London: Harvard University Press.

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T and Ueda HR. 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 21: 1687–1700.

Meireles-Filho AC, Rivas GBS, Gesto JS, Machado RC, Britto C, Souza NA, Peixoto AA. 2006b. The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Letters.* 580:2-8.

Meirelles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. 2006a. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect. *BMC Molecular Biology* 7: 7-38.

Miyasako Y1, Umezaki Y, Tomioka K. Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. 2007 Apr. *J Biol Rhythms.* ;22(2):115-26.

Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M and Sehgal A. 1999. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* 285: 1737–1741.

Nitabach MN, Wu Y, Sheeba V, Lemon WC, Strumbos J, Zelensky PK, White BH and Holmes TC. 2006. Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *J Neuroscience.* 11; 26 (2) : 479-89.

Oshima Y. *Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

Peschel N and Helfrich-Förster C. 2011. Setting the clock by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters.* 585(10) 1435-1442.

Pittendrigh CS. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology* 55:16-54.

Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B and Young MW. 1998. double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94: 83–95.

Renn, SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*. 1999; 99: 791–802.

Reppert, SM and Weaver DR. 2000. Comparing clockworks: mouse vs. fly. *J Biol Rhythms* 15: 357–364.

Richier B, Michard-Vanhee C, Lamouroux A, Papin C and Rouyer F. 2008. The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *J. Biol. Rhythms* 23: 103–116.

Rieger D, Stanewsky R and Helfrich-Forster C. 2003. Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-buchner, eyelets and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*; 18 (5): 377-391.

Rivas GBS. 2012. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. *Revista da Biologia* 9(3): 19–25.

Roberts DB. 1998. *Drosophila, A Practical Approach*. 2a Ed. New York, NY: Oxford University Press.

Rosbash M. The Implications of Multiple Circadian Clock Origins. *PLoS Biology*. 2009 March. 7 (3): 421-425.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M and Hall JC. 1998. Cycle is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*. May 29; 93: 805–814.

Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP and Rosato E. 2008. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Mol Biol* 17:447-463.

Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R. and Sehgal, A. (2004). Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116, 603–615.

Saunders DS, Steel CGH, Vafopoulou X, Lews RD. *Insect clocks*. 3.ed. Elsevier; 2002.

Shafer OT, Helfrich-Förster C, Renn SC and Taghert PH. Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. 2006. *J Comp Neurol*. 498,180-93.

Shafer, O.T., Rosbash, M. and Truman, J.W. (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci*. 22, 5946–5954.

Sheeba V. The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. 2008. *Journal of Genetics*. 87 (5): 485-93.

Schildknecht, H. Turgorins, hormones of the endogenous daily rhythms in higher organized plants – Detection, isolation, structure, synthesis, and activity. 1983. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 22: 695-710.

So WV, Rosbash M: Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO Journal* 1997,16:7146-55.

Soares RPP and Turco SJ. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75(3): 301-330.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M and Hall JC. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*; 95: 681-692.

Stanewsky R. 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 309:11-26. Saunders DS. *Insect Clocks* 3rd edition. Amsterdam: Elsevier Science.

Sun FF, Johnson JE, Zeidler MP, Bateman JR. 2012. Simplified Insertion of Transgenes Onto Balancer Chromosomes via Recombinase-Mediated Cassette Exchange. *G3 (Bethesda)* May;2(5):551-3.

Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G and Lee CC. 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003–1011.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, and Kumar S 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M and Sakaki Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512–516.

Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, [Rongsriyam Y](#) and [Komalamisra N](#). 2001. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *J Vector Ecology* 26:172-180.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*

Tomioka K, Uryu O, Kamae Y, Umezaki Y, Yoshi T. Peripheral circadian rhythms and their regulatory mechanism in insects and some other arthropods: a review. *J Comp Physiol B*. 2012 26 January. DOI 10.1007/s00360-012-0651-1.

Venken KJT and Bellen HJ. 2007. Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* 134, 3571-3584.

Yang J, Dai Z, Yang F, Yang W. Molecular cloning of Clock cDNA from the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Brain Research* 2006 5 January. 1067(1) 13–24.

Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T and Tomioka K. 2005. Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci*. 22: 1176–84.

Yu W and Hardin PE. 2006. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci*. 119: 4793–4795.



Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, and Reppert SM. Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol.* 2007; 24: 948-55.

Keegan KP, Pradhan S, Wang JP, Allada R. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Computational Biology.* 2007, 3: 2087-2110.

Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, and Reppert SM. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.* 2008; 6:e4.

Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert SM. The two CRYs of the butterfly. *Curr Biol.* 2005; 15: 953-4.

**Alinhamento da proteína CLOCK de diferentes espécies.** Os sítios bHLH e PAS A/B foram marcados de azul e verde respectivamente. A região poli-Q foi retirada da análise.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55
Drosophila	KSFLCRKSRN	LSEKKRRDQF	NSLVDDLAL	ISTSSRKMDK	STVL-KSTIA	FLKNHNEATD
Anopheles	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NLLVNELSSM	VSSNSRKMDK	STVL-KSTIA	FLKSHNEIAY
Aedes aegy	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NLLVNELSSM	VSSNSRKMDK	STVL-KSTIA	FLKSHNEIAY
Lutzomia l	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NLLVNELSSM	VSSNNRKMDK	STVL-KSTIA	FLKNHNEIAL
Antheraea	K----RRTRN	LSEKKRRDQF	NLLINELSSL	VTSNSRKMDK	STVL-KSTIS	FLRNHNEITV
Apis melli	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	VSSNTRKMDK	STVL-KSTIL	FLKNHNEIAY
Bombus imp	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	VSSNTRKMDK	STVL-KSTIL	FLKNHNEIAY
Camponotus	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	ISANTRKMDK	STVL-KSTIL	FLKNHNEIAY
Danaus ple	K----RRTRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	VSTNNRKMDK	STVL-KSTIS	FLKNHNEITV
Gryllus bi	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLINELSSM	VSTNSRKMDK	STVL-KSTIS	FLKNHNEIAY
Megachile	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	VSSNTRKMDK	STVL-KSTIS	FLKNHNEIAY
Pediculus	K----RRSRN	LSEKKRRDQF	NMLINELSSM	VSTNNRKMDK	STVL-KSTIA	FLESHNELAV
Riptortus	K----RKTRN	LSEKKRRDQF	NLLINELSSM	VTTNNRKMDK	STVL-KSTIS	FLRKHNDLAV
Solenopsis	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLVNELGSM	ISANTRKMDK	STVL-KSTIL	FLKNHNEIAY
Thermobia	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NMLINELSSM	VSTNNRKMDK	STVL-KSTIA	FLKNHNEIAY
Tribolium	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NLLVNELSSM	VATGSRKMDK	STVL-KSTIA	FLKNHNEIAY
Dalphnia p	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NILINELCSM	VCTGKRKMDK	STIL-KSAIS	FIRNHNQVTM
Macrobrach	K----RKSRN	LSEKKRRDQF	NLLINELSSM	VASNNRKMDK	STVL-KATIA	FLKNQKEISV
Gallus gal	K----RVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKS-ID	FLRKHKEITA
Rattus nor	K----RVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKS-ID	FLRKHKEITA
Mus muscul	K----RVSRN	KSEKKRRDQF	NVLIKELGSM	LPGNARKMDK	STVLQKS-ID	FLRKHKETTA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	65	75	85	95	105	115
Drosophila	RSKVFE-IQQ	DWKPAFLSND	EYTHLMLESL	DGFMMVFSSM	GSIFYASESI	TSQLGYLPQD
Anopheles	RSRVHE-IQT	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIIVFSS	GRVIFYASESI	TSLLGHLPSD
Aedes aegy	RSRVHE-IQT	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIIVFSS	GRVIFYASESI	TSLLG-LPSD
Lutzomia l	RSRSHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GRIFYASESI	TSLLGHLPSD
Antheraea	RSRAHD-IQD	DWKPTFLSNE	EFTYLVLEAL	EGFVVVFST	GRIHYVSESI	SLLGYNPVD
Apis melli	RSRVHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GRIYYVSESV	TSLLGYPNE
Bombus imp	RSRVHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GRIYYVSESV	TSLLGYPNE
Camponotus	RSRVHE-IQE	NWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIIVFSS	GRIYYVSESI	TSLLGYPNE
Danaus ple	RSRAHD-VQE	DWKPAFLSNE	EFTYLVLEAL	EGFVMVFSA	GCIYYVSESV	TSLLGHTPGD
Gryllus bi	RSRAHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GRIFYASESI	TSLLGHLPSD
Megachile	RSRVHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GRIYYVSESV	TSLLGYPNE
Pediculus	RSRAHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFAHLILEAV	EGFIIAFST	GTIIYVSGSI	TSLLGYPGE
Riptortus	RSRANE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLFLEAL	DGFIIVFSS	GRLLYVSESI	TSLLGHPSPD
Solenopsis	RSRAHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFSS	GHIYYVSESV	TSLLGYPNE
Thermobia	RSRAHE-IQE	DWKPSFLSNE	EFTHLILEAL	DGFIMVFAS	GRILYASESI	TSLLGYPSPD
Tribolium	RSRVNE-IQE	DWKPTFLTNE	EFTHLILEAV	DGFIMVFSA	GQIFYASESI	TSLLGHLPNQ
Dalphnia p	QSHCQESVQE	DWKPSFLSNE	EFTHLMLEAL	DEFIIVFSS	GKILYVSENI	TCLLGHTPSD
Macrobrach	RTQSNE-IRE	DWKPSFLSNE	EFTHLMLEAL	DGFIMTVSC	GRVLYTSESI	TPLIGHLPSD
Gallus gal	QSDASE-IRQ	DWKPTFLSNE	EFTQLMLEAL	DGFFLAIMTD	GNIIYVSESV	TPLEHLPSD
Rattus nor	QSDASE-IRQ	DWKPTFLSNE	EFTQLMLEAL	DGFFLAIMTD	GSIIYVSETV	TSLEHLPSD
Mus muscul	QSDASE-IRQ	DWKPTFLSNE	EFTQLMLEAL	DGFFLAIMTD	GSIIYVSESV	TSLEHLPSD

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	125	135	145	155	165	175
Drosophila	LYN--MTIYD	LAYEMDHEAL	LNIFMNP	TPV IEPR-Q	TDIS SSNQIT	FYTH LRRGG--
Anopheles	LLN--MTVYD	MVYEDDQNDL	YHILLN	PPTI VDPL-Q	TGIS RENQV	TFSCY IKRGT--
Aedes aegy	LLN--MTVYD	MVYEDDQNDL	YNILLN	PAAV VDPL-Q	TGIS RENQV	TFSCY IKRGT--
Lutzomia l	LLN--MTIYD	LAYEEDHSEL	YNVILN	PAAI TDPL-Q	NNLT RENQI	LFSCH LKRGS
Antheraea	IIN--KSLFE	LVFEEDQOTL	YSLIQS	PGNI TD---P	HTTG KENEI	QFQCH IRRGG--
Apis melli	LEN--TTVYD	ITYQEDQSPL	YNVILN	PAIT KD---R	RNIR EEDKI	SFSCH IKRGG--
Bombus imp	LEN--TTIYD	ITYQEDQSPL	YNVILN	PAIT KD---Q	RNIK QEEKI	SFSCH IKRGG--
Camponotus	LEN--TTIYN	ITYQEDQPHL	YNVILN	PANT RD---K	RAVK KEDQI	SFTCH IKRGG--
Danaus ple	IIN--KSIFD	LAFVDDRPNL	YNILQNG	GTL DP---T	QVVT TDNP	SFRCR LQRG--
Gryllus bi	LMN--MTIYD	MVYEEHQSSL	YNVILN	PSNC VDGA-Q	YDDS KENQV	SFSCH LKRGG--
Megachile	LEN--TTIYD	ITYQEDQSSL	YNVILN	PVNT RD---R	RNIK KEDQI	SFSCH IKRGG--
Pediculus	LMKPSVTIFD	ILYEEDQPNI	YNILNS	SEHG FG---S	SNIG KENQM	EFSCH LRRGV--
Riptortus	LMS--MTIYD	LIYEGDHSEL	YSILGPT	AEG YD-----	KENEI	SFVCH IKRGG--
Solenopsis	LEN--TTIYD	ITYQEDQPHL	YNALN	PGST RD---R	RSVK KEDQI	SFTCH IKRGG--
Thermobia	LLN--MTIYD	LAYDDDRSEL	YSVLVN	PNTC ADPL-N	YTIT KENQV	SFSCH LKRGS--
Tribolium	VLN--MTIYE	MANEEHSHL	YNILLTP	S---E DQGQV	SFSCH LRRGD--	
Dalphnia p	LIG--SSLSD	LVWEEERIVV	ESLIGS	WGAD HESS-Q	VTGN KENHI	SLSCH LRRGNL
Macrobrach	LAG--TPLYD	LMLEEEERGEM	RRFLSN	PALA PNPS-T	CFDN TKEKY	TIAVH LRRGT--
Gallus gal	LVD--QSVFN	FIPEGEHSEI	YKILSSH	LLE SDSLT	PPEYLK SKNQ	LEFCCH MLRGT--
Rattus nor	LVD--QSIFN	FIPEGEHSEV	YKILSTH	LLE SDSLT	PEDLK SKNQ	LEFCCH MLRGT--
Mus muscul	LVD--QSIFN	FIPEGEHSEV	YKILSTH	LLE SDSLT	PPEYLK SKNQ	LEFCCH MLRGT--

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	185	195	205	215	225	235
Drosophila	VDANAYELVK	FVGYFRN---	-----DTNTS	TGSSSEV	SNG SNG	PAVLPR IFQ-----
Anopheles	RADVSYEHVQ	FTGYFR----	-----SDVD	---TESI	MTT -SRF	SGYTS-----
Aedes aegy	RTEVSYELVQ	FTGYFR----	-----SDVD	---ADSI	MTT -SRF	SGYMT-----
Lutzomia l	RDGLTYELVQ	FVGYFR----	-----TDVD	---IEN	MLPN -ARNC	IYPS-----
Antheraea	GEDVAYELIQ	FNGHFR----	-----SNVE	SLHADD	LSHY RQG-----	-----
Apis melli	EENPIYELVQ	FVGYFR----	-----SDVD	T-EVDN	LLPN -TKF	GNTT-----
Bombus imp	QENPIYELVQ	FVGYFR----	-----SDVD	T-DADN	LLPN -TKF	SNTS-----
Camponotus	REDSVYELVQ	FIGYFR----	-----SAMD	D-DVDN	LLPG -QKF	SNTN-----
Danaus ple	RDEVTYELVQ	FDGHFR----	-----KNLE	S-NENG	HHSY QDE-----	-----
Gryllus bi	REEVTYELVQ	FVGYFR----	-----TDVD	PLEVDN	LISS SSRY	SNVSG-----
Megachile	QDNPVYELVQ	FVGYFR----	-----SDVD	T-EVDN	LLPN -TKF	GNTT-----
Pediculus	RDEPVYQLVH	FVGYFK----	-----TDSS	KTDVDN	MVSS TNRY	TG-----
Riptortus	KGEPVYEAQ	FLGQFR----	-----SDID	SIHMDN	GLSC HYNYS	T-----
Solenopsis	REESIYELVH	FIGYFR----	-----SAMD	D-DVDN	LLSS -QKL	SNTS-----
Thermobia	HDEVTYELVQ	FIGYFRKWIR	QE---GSDRD	TSEVENI	ISS SSKF	SNTS-----
Tribolium	KQNPSFELVH	FVGYFRS---	-----DEDMV	Q--SEN	RYSG YSG-----	-----
Dalphnia p	FESSNYELVF	FSGYRQV--	-----GNPD	ISSVSR	VSSS WGDD	SKESTN FG-----
Macrobrach	SDATNYERVH	LMGYFERYSG	PSEDGVL	DFS CSEA	EDSVSV SSCS	SRMFGG NAGGGV
Gallus gal	KEQPTYEYVK	FIGNFKC---	-----LNNVP	NSAHNG	FEGT IQR	SHRPS-----
Rattus nor	KEPSTYEYVR	FIGNFKS---	-----LNSVS	TSTHNG	FEGT IQR	THRPS-----
Mus muscul	KEPSTYEYVR	FIGNFKS---	-----LTSVS	TSTHNG	FEGT IQR	THRPS-----

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	245	255	265	275	285	295
Drosophila	-----	--QNPNAEVD	KKLVFVGTGR	VQNPQLIREM	SIIDPTSNEF	TSKHSMLEWKF
Anopheles	-----	-----DAD	SRLVFGVTGR	LQTPQLIREM	SIVDNTKSEF	TSRHSLLEWKF
Aedes aegy	-----	-----DAD	TRLIFVGTGR	LQTPQLIREM	SIVDSSKSEF	TSRHSLLEWKF
Lutzomia l	-----	-----DAD	TRLIFVGTGR	LQTPQLIREM	SIVDSTKSEF	TSRHSLLEWKF
Antheraea	-----	-----SD	NRLLFVCTGR	LSNPQLIRDV	SLVDSRNEF	TSRHSLLEWKF
Apis melli	-----	-----GKD	TKLVFVGTGR	LQTPQLIREL	SVLDNTKSEF	TSRHSLLEWKF
Bombus imp	-----	-----GID	TKLVFVGTGR	LQTPQLIREL	SVMDNTKSEF	TSRHSLLEWKF
Camponotus	-----	-----ASD	NKLVFVGTGR	LQTPQLIREL	SVTDNTKSEF	TSRHSLLEWKF
Danaus ple	-----	-----HE	SRLLFVCTGR	LYMPQLVRDV	SLVDTIRSEF	TSRHSLLEWKF
Gryllus bi	-----	-----EPD	TRLVFGVTGR	LQTPQLIREM	SVVDSTKSEF	TSRHSLLEWKF
Megachile	-----	-----GID	TKLVFVGTGR	LQTPQLIREL	SVMDNTKSEF	TSRHSLLEWKF
Pediculus	-----	-----DGE	SSLMFVGTGR	LDTPQLIREM	TISDNLKSEF	TSRHSLLEWKF
Riptortus	-----	-----ESD	TRWVFGVTGR	LQIPQLIREL	SIIDSTKSEF	TSRHSLLEWKF
Solenopsis	-----	-----GSD	NKLVFVGTGR	LQTPQLIREL	SITDSAKSEF	ISRHSLLEWKF
Thermobia	-----	-----DSD	HRLVFGVTGR	LQTPQLIREM	SIVDSSKSEF	TSRHSLLEWKF
Tribolium	-----	-----EAD	TRLVFGVTGR	IKTPRLIREM	PLVDSSKSEF	TSRHSLLEWKF
Dalphnia p	-----	-----DALSQY	NGLVVASAR	LQTPQLSVEM	SIVDVKSEF	TSRHSLLEWKF
Macrobrach	NAGSGLCQSS	LVQTNPSQEP	TKLVFVAIGR	LERPQLVREM	MIIEPSKTEF	TSRHSLLEWKF
Gallus gal	-----	-----YE	DKVCFIATVR	LATPQFIKEM	CTVEEPNEEF	TSRHSLLEWKF
Rattus nor	-----	-----YE	DRVCFVATVR	LATPQFIKEM	CTVEEPNEEF	TSRHSLLEWKF
Mus muscul	-----	-----YE	DRVCFVATVR	LATPQFIKEM	CTVEEPNEEF	TSRHSLLEWKF

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	....
	305	315	325	335	
Drosophila	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLDSIVAC	HEEL
Anopheles	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLEKVVAC	HEAL
Aedes aegy	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLEKVVSC	HEAM
Lutzomia l	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLEKVITC	HEAL
Antheraea	LFLDRRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLEKVITC	HEAL
Apis melli	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDKVVTC	HESL
Bombus imp	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDKVVTC	HESL
Camponotus	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDNVVTC	HESL
Danaus ple	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	FDDLEKVVSC	HEAL
Gryllus bi	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLEKVVTC	HEAL
Megachile	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDKVVMC	HESL
Pediculus	LALDSRATPI	IGYVQLEVVG	TSG--YDYYH	IDDLKIVVC	HETL
Riptortus	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDKVVTC	HEAL
Solenopsis	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLDNVVTC	HESL
Thermobia	LFLDHRASPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	IDDLKVVTC	HEAL
Tribolium	LFLDHRAPPI	IGYLPFELLG	TSG--YDYYH	VDDLNIIG	HKAL
Dalphnia p	LFLDHRGPPI	IGYLPFEVLG	TSGYDYDYYH	VDDLEKVSTC	HEAL
Macrobrach	LFLDHRAPTI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VEDLKVASC	HEQL
Gallus gal	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLNLAKC	HEHL
Rattus nor	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLESLAKC	HEHL
Mus muscul	LFLDHRAPPI	IGYLPFEVLG	TSG--YDYYH	VDDLENLAKC	HEHL

Anexo II

**Alinhamento da proteína CYCLE de diferentes espécies. Os sítios bHLH, PAS A/B e BCTR foram marcados respectivamente de azul, verde e amarelo.**

	5	15	25	35	45	55
Lutzomia_l	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TESSMVPIC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Drosophila	RKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	NELSSMIPMC	FAMQRKLDKL	TVLRMAVQHL	RGIRGSGSLH
Aedes_aegy	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMIPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Dalphnia_p	-----	-----MNTYI	TELSRVVPMC	ITMSHKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AIH
Anopheles_	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMIPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Antheraea	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	SELSSMVPIC	GTMARKLDKL	TVLRMAVQHL	RSVRGALSSC
Apis mellii	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMVPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTILG--AVT
Camponotus	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMVPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTILG--AVT
Danaus_ple	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	SELSSMVPIC	GAMARKLDKL	TVLRMAVQHL	RSVRGALSAG
Gryllus_bi	----TARSR	GGRDKMNTYI	TELSAMVPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Megachile_	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMVPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTILG--AVT
Pediculus_	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELANMVPIC	HANPRKLDKL	TVLRMAVQHL	RSIRG--TVH
Thermobia	KKQNHSEIDK	RWRDKMNTYI	TELSAMVPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Tribolium	KKQNHSEIEK	RRRDKMNTYI	TELSAMIPMC	HAMSRKLDKL	TVLRMAVQHL	KTIRG--AVH
Gallus_gal	AREAHSQIEK	RRRDKMNSFI	DELASLVPTC	NAMSRKLDKL	TVLRMAVQHM	KTIRG--ATN
Rattus_nor	AREAHSQIEK	RRRDKMNSFI	DELASLVPTC	NAMSRKLDKL	TVLRMAVQHM	KTIRG--ATN
Mus_muscul	AREAHSQIEK	RRRDKMNSFI	DELASLVPTC	NAMSRKLDKL	TVLRMAVQHM	KTIRG--ATN

	65	75	85	95	105	115
Lutzomia_l	SYTEGHYKPA	FLSDEELKML	ILQAAEGGSF	LFVVGCDRGR	LLYISESVSQ	VLNYSQGDLL
Drosophila	PFNGSDYRPS	FLSDQELKMI	ILQASEG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSDSVSS	VLNSTQADLL
Aedes_aegy	SYTEGHYKPA	FLSDQELKML	ILQAAEG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSESVSQ	ILNYSQGDLL
Dalphnia_p	SYTEGHYKPS	FLSDEELKRL	ILQADG--F	LFVVGCDRGR	MLYVSESVSQ	VLNYSQGDLL
Anopheles_	SYTEGHYKPA	FLSDQELKML	ILQAAEG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSESVSH	VLNYSQGDLL
Antheraea	PLTAR-PRPA	FLSEKELNTL	ILQAGHD-CF	LLVVGCDRGR	LMYVSASVNK	VLVDQSELI
Apis mellii	SYTEGHYKPA	FLSDQELKTL	ILQAAEG--F	VFVVGCDRGR	ILYVSESVLQ	TLNYSQGDLL
Camponotus	SYTEGHYKPA	FLSDQELKTL	ILQAAEG--F	VFVVGCDRGR	ILYVSESVSQ	TLNYSQGDLL
Danaus_ple	PLTVR-PRPA	FLSETELNAL	VLQAARD-CF	LMVVGCDRGR	LLYVSASVSR	MLNYDQSELI
Gryllus_bi	SYTEGHYKPA	FLSDQELKTL	ILQAAEG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSESVSQ	VLSYSQGDLL
Megachile_	SYTEGHYKPA	FLSDQELKTL	ILQAAEG--F	VFVVGCDRGR	ILYVSESVLQ	TLNYSQGDLL
Pediculus_	SYTEGHYKPT	FLSDEELKML	ILQAADG--F	LFVVGCDRGR	ILFVSESVSE	ILNYSQSDLL
Thermobia	SYTEGHYKPS	FLSDEELKHL	ILQAAEG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSESVSQ	ILNYSQGDLL
Tribolium	SYTEGHYKPS	FLSDQELKHL	ILQAADG--F	LFVVGCDRGR	ILYVSESVSK	VLNFSQGDLL
Gallus_gal	PYTEANYKPA	FLSDDELKHL	ILRAADG--F	LFVVGCDRGR	ILFVSESVFK	ILNYSQNDLI
Rattus_nor	PYTEANYKPT	FLSDDELKHL	ILRAADG--F	LFVVGCDRGR	ILFVSESVFK	ILNYSQNDLI
Mus_muscul	PYTEANYKPT	FLSDDELKHL	ILRAADG--F	LFVVGCDRGR	ILFVSESVFK	ILNYSQNDLI

	125	135	145	155	165	175
Lutzomia_l	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGLS	RLCPGARRSF
Drosophila	GQSWFDVLHP	KDIGKVKEQL	SSLEQCPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQSLC	RLCPGARRSF
Aedes_aegy	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Dalphnia_p	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGLS	RLCPGARRSF
Anopheles_	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Antheraea	GQSLFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	FIDAKTMLPL	KSDVV-AGAS	RFSPGARRSF
Apis mellii	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Camponotus	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Danaus_ple	GQSLFDMLHP	KDVGKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPL	KPDVV-ADAS	RLCPGARRSF
Gryllus_bi	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Megachile_	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGVV	RLCPGARRSF
Pediculus_	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	FSSDLSPRER	LIDSKTMLPV	KTDVQVAGIS	RLCPGARRSF
Thermobia	GQSWFDILHP	KDVAKVKEQL	SSSDLSPRER	LIDAKTMLPV	KTDV-PQGLS	RLCPGARRSF
Tribolium	GQSLFDILHP	KDVAKAKEQL	SSSDLNPRER	LIDAKTMLPV	KADV-PQNGS	RLCPGARRSF
Gallus_gal	GQSLFDYLHP	KDIAKVKEQL	SSSDTAPRER	LIDAKTGLPV	KTDITP-GPS	RLCSGARRSF
Rattus_nor	GQSLFDYLHP	KDIAKVKEQL	SSSDTAPRER	LIDAKTGLPV	KTDITP-GPS	RLCSGARRSF
Mus_muscul	GQSLFDYLHP	KDIAKVKEQL	SSSDTAPRER	LIDAKTGLPV	KTDITP-GPS	RLCSGARRSF

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	185	195	205	215	225	235
Lutzomia_l	FCRMKYKAS-	-----IQVKE	ELDAP---AN	-----	---SHR-RKK	QMSSDKK-YS
Drosophila	FCRMKLRAS	N----NQIKE	ESDTSSSSRS	-----	---STK-RKS	RLTTGHK-YR
Aedes_aegy	FCRMKCKTN-	-----IQVKE	EAESNGSTSS	-----	---CHR-RKN	KVNSDKK-YS
Dalphnia_p	FCRMKCRAV-	-----QPAKD	SSDACGMSSS	-----	---KHR-KTQ	NISKEKK-FT
Anopheles_	FCRMKCKAN-	-----VQIKE	EADATSSTTN	S-----	ATVCHR-RKK	QVNSDKK-YS
Antheraea_	FCRIKCKALP	-----DDTAA	SVMSMK----	-----E	DPEPTSKLRK	KHS-EKK-YC
Apis_melli	FCRMKRKVEG	IRCGELQVKE	ESESASG---	-----	---CHR-RKK	QQNVDRK-YC
Camponotus	FCRMKRKVDG	VRCDEMQVKE	EVDTTTG---	-----	---CHR-RKK	QQNVDRK-YC
Danaus_ple	FCRIKCRTEP	-----SQASQ	SSQSSQACQP	CTNTQPSEVK	EEEPNSKMKK	KQAHEKK-YC
Gryllus_bi	FCRMKCKLS-	-----VQVKE	EADTTTG---	-----	---CHR-RKK	QQNLDRK-YC
Megachile_	FCRMKRKVDG	IRCGELQVKE	EADTTTSG---	-----	---CHR-RKK	QQNVDRK-YC
Pediculus_	LCRMKCRGS-	-----FHVKE	EADTTTG---	-----	---CHRPRKK	QNSDRK-YN
Thermobia_	FCRMRCKVAP	F-----VKE	EADTTTG---	-----	---CHR-RKK	QSSDRK-YC
Tribolium_	FCRMKCKVS-	-----SQVKE	EADTTTG---	-----	---CHR-RKK	QNSDKK-YN
Gallus_gal	FCRMKCNRPS	-----VKVED	KDFPSTC---	-----	---S---KKK	---ADRKSFC
Rattus_nor	FCRMKCNRPS	-----VKVED	KDFASTC---	-----	---S---KKK	---ADRKSFC
Mus_muscul	FCRMKCNRPS	-----VKVED	KDFASTC---	-----	---S---KKK	---ADRKSFC

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	245	255	265	275	285	295
Lutzomia_l	VIQCTGYLKS	WAPAKIGL--	-EEQEAD-DG	ESCNLSCLVA	IGR----IPP	NIFVP-----
Drosophila	VIQCTGYLKS	WTPIKD----	-EDQADSDE	QTTNLSCLVA	IGR----IPP	NVRN-----
Aedes_aegy	VIQCTGYLKS	WAPAKIGL--	-EEHETDGE	ESCNLSCLVA	VGR----VQP	SLFQ-----
Dalphnia_p	VVHCTGYLKS	WAPAKIGV--	-HD-QDEGDV	DACNLSCLVA	VGR----VQP	SNLQN-----
Anopheles_	VIQCTGYLKS	WAPAKIGL--	-EENETDGE	DSCNLSCLVA	VGR----IQP	NLHQPPQHG
Antheraea_	VVQCTGYLKS	WAPAESEAS	STTADCTEDG	EASNMSCLVA	VGRTLEDLTP	-----
Apis_melli	VIQCTGYLKS	WAPAKIDL--	-EEHEGDGDG	EACNLSCLVA	VGR----LQS	TIP-----
Camponotus	VIQCTGYLKS	WAPAKIGL--	-EEQEGEADG	EACNLSCLIA	VGR----VQM	AIST-----
Danaus_ple	VVQCTGYLKS	WAPAEMSDGC	CTDAGSEE--	ESCNLSCLVA	VGRALADLAQ	-----
Gryllus_bi	VIQCTGYLKS	WAPAKIGR--	-EEAEGDGDG	EACNLSCLVA	AGLGAGLGAG	PTTI-----
Megachile_	VIQCTGYLKS	WAPAKIDL--	-EEQEGDGDG	EACNLSCLVA	VGR----LQS	TIP-----
Pediculus_	VIQCTGYLKS	WPPVKLGL--	-EETEGENDS	ESCNLSCLVA	VGR----IQS	QMNNN-----
Thermobia_	VIQCTGYLKS	WAPAKIGI--	-QDQTDGDG	DTCNLSCLVA	VGR----LQP	LLFS-----
Tribolium_	VIHCTGYLKS	WAPAKIGL--	-EDQENDGEN	ESCNLSCLVA	VGR----VLP	HIST-----
Gallus_gal	TIHSTGYLKS	WPPTKMGL--	--DEDNEPDN	EGCNLSCLVA	IGR----LHP	HVVP-----
Rattus_nor	TIHSTGYLKS	WPPTKMGL--	--DEDSEPDN	EGCNLSCLVA	IGR----LHS	HMVP-----
Mus_muscul	TIHSTGYLKS	WPPTKMGL--	--DEDNEPDN	EGCNLSCLVA	IGR----LHS	HMVP-----

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	305	315	325	335	345	355
Lutzomia_l	-----	-----	-----	-----NVT	PP-----	-----
Drosophila	-----	-----	-----	-----ST	VPAS-----	-----
Aedes_aegy	-----	-NQISGNGNL	TN-----	-----RRVT	VDGGGNAST	GTNGCKG---
Dalphnia_p	-----	-----	-----	-----YKPRG	TPGKES-----	-----LV
Anopheles_	AMQRPSDAGT	GNGSNGGGPP	TNGGGGGGPN	SNGGNTGSAA	AAGGGGGGAG	GSNGTAGKSA
Antheraea_	-----	-----	-----	-----MS	VTT-----	-----
Apis_melli	-----	-----	-----	-----TS	LP-----	-----
Camponotus	-----	-----	-----	-----TT	LPS-----	-----
Danaus_ple	-----	-----	-----	-----HP	DS-----	-----
Gryllus_bi	-----	-----	-----	-----GA	LPPGP-----	-----
Megachile_	-----	-----	-----	-----TS	LP-----	-----
Pediculus_	-----	-----	-----	-----LHYY	FP-----	-----
Thermobia_	-----	-----	-----	-----SG	LPLGEG-----	-----L
Tribolium_	-----	-----	-----	-----VA	AA-----	-----
Gallus_gal	-----	-----	-----	-----QP	VNG-----	-----
Rattus_nor	-----	-----	-----	-----QP	VNG-----	-----
Mus_muscul	-----	-----	-----	-----QP	ANG-----	-----

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	365	375	385	395	405	415
Lutzomia_l	ISNN--LNLR	SIQFISRHAM	DGKFLFVDQR	ATLILGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHEDIPSLA
Drosophila	--LDNHPNIR	HVLFISRHS	EGKFLFIDQR	ATLVIGFLPQ	EILGTSFYEY	FHNEDIAALM
Aedes_aegy	FNRNNIPNLR	NVQFISRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHEDIPALA
Dalphnia_p	NDSSLRPRSL	NFEFISRHTI	DGKFLFVDQR	ATLLGLLPQ	ELLGTSMYEY	YHVDDIVALT
Anopheles_	VSRNSIPNLR	NVQFISRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHEDIPALA
Antheraea_	----PTVPTR	PLMYTSRHAT	DGKFLFVDQR	VTLALGFLPQ	ELLGTSLYEY	MSGPEIAEVA
Apis_melli	----KKPRLR	SIKFVSRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHDDIPHLA
Camponotus	----RKPHLR	PIQFVSRHAM	DGKFLFVDQR	ATPVLGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHDDIPHLA
Danaus_ple	-----APQTR	YLQYISRHAP	DGKFLFVDQR	VTIALGFLPQ	ELLGTSMYEY	ILAPELGSA
Gryllus_bi	----RRPNLR	AIQFISRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELHGTSMYEY	YHHEDISLLA
Megachile_	----KKPNLR	PIKFVSRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGTSMYEY	YHHDDIPHLA
Pediculus_	----TANIR	QFPFVSRHAI	DGTFLFVDQR	ATLMLGFLPQ	ELIGTNVYEY	FHQEDIRTLS
Thermobia_	RKGGFRPNIR	TIEFISRHAM	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGSSMYEY	YHHDDIPHLA
Tribolium_	--TQTRPNVQ	PIQFISRHTL	DGKFLFVDQR	ATLVLGFLPQ	ELLGSSMYEY	YHHDDITSA
Gallus_gal	-----EIRVK	PTEYVSRHAI	DGKFLFVDQR	ATAILAYLPQ	ELLGTSCEY	FHQDDIGHLA
Rattus_nor	-----EIRVK	SMEYVSRHAI	DGKFLFVDQR	ATAILAYLPQ	ELLGTSCEY	FHQDDIGHLA
Mus_muscul	-----EIRVK	SMEYVSRHAI	DGKFLFVDQR	ATAILAYLPQ	ELLGTSCEY	FHQDDIGHLA

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	425	435	445	455	465	475
Lutzomia_l	ESHKSALQIS	ERITTPYRL	RTKGGFVRL	QSEWKSFRNP	WTKDVEYLIA	KNSVILSD--
Drosophila	ESHKVMQVP	EKVTTQVYRF	RCKDNSYIQL	QSEWRAFKNP	WTSEIDYIIA	KNSVFL----
Aedes_aegy	ESHKAALQGN	QCVTTPVYRL	RTKENGFVRL	QSEWKSFRNP	WTKEIEYLIA	KNNVILVDLA
Dalphnia_p	EVHKSALQTT	ETVTTAVYRF	RVKEGTFVRL	QSRWKSFRNP	WTKDIEFLVA	KNSYIEAECS
Anopheles_	ESHKAALQGT	QCVTTSVYRL	RTKESGFVRL	QSEWKSFRNP	WTKDIEYLIA	KNNVILSELL
Antheraea_	GTHKAALLNR	NTLQTPAYSF	RKKDGTFAFI	RTHFKPFRNP	WTKDVECLVA	NNTVLSDN--
Apis_melli	ESHKAALQAS	ESVTTQIYRF	RTKGASFVKL	QSEWKSFRNP	WTKDIEYLIA	KNSVTSNDSR
Camponotus	ESHKAALQTP	ERITTPYRL	RSKDNFVRL	QSEWKSFRNP	WTKDIEYLIA	KNSAIFCDAL
Danaus_ple	RIHKAALLRR	DSLRTPPYCF	RKKDGTVYRI	QTHFKPFRNP	WTKDVECLVA	NNTVVVGN--
Gryllus_bi	EAKHVALQGS	ERVITQVYRF	RSKDGSFVRL	QSEWKSFRNP	WTKDVEYLVA	KNSLVLTEH-
Megachile_	KSHKAALQAT	ECITTPYRL	RTKGASFVRL	QSEWKSFRNP	WTKDIEYLIA	KNSVTSNDSR
Pediculus_	ETHKLALQSL	QVTKTQSYRL	RTKDGSIYRI	QSEWKPFRNP	WTKDIEYLIS	KNSVILTV--
Thermobia_	ESHKAALQSS	ERVTTQIYRF	RSKEGSFIRL	QSEWKSFRNP	WTKDVEYLIA	KNSVILSDIR
Tribolium_	ECHKALQNS	EHTTTKIYRF	RTKGGFVVKL	QSEWKSFRNP	WTKEIEYLIA	KNTLVLTD--
Gallus_gal	ECHRQVLQTR	EKITTNCYKF	KIKDGSFITL	RSRWFSFMNP	WTKEVEYIVS	TNTVVVSTSVL
Rattus_nor	ECHRQVLQTR	EKITTNCYKF	KIKDGSFITL	RSRWFSFMNP	WTKEVEYIVS	TNTVVLANVL
Mus_muscul	ECHRQVLQTR	EKITTNCYKF	KIKDGSFITL	RSRWFSFMNP	WTKEVEYIVS	TNTVVLANVL

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	485	495	505	515	525	535
Lutzomia_l	----TKVDEA	ASCAATNTTG	NGVTYRTGNG	AGGAENNAPG	NFDFFNQASN	GREMHRINT
Drosophila	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aedes_aegy	EG--TGGSYG	GTSANVQSRC	NGNGTTTNE	ISDGNNESEN	G-----QTN	GREIQRMINS
Dalphnia_p	-----E	VANSCIDSSS	VNFSNDMFY	QSGAGS---	-----NQT	TSTRVRLFSM
Anopheles_	LGGDVNANRN	GSGYGVGSDG	LGDGTGDGTG	VSGSTGQPNV	GYEFF-NHSN	GREIQRMINS
Antheraea_	-----	--HMPHQSA	EQSTFEIYKE	-----	-----KP	DTEMQRLIDS
Apis_melli	-----S	ITSSGNRSED	SS-VQGNQDY	FAQSN-----	-----G	G--LERLISS
Camponotus	-----S	GN---NGSED	SS-VQDNQDY	FTQSN-----	-----D	G--LERLISS
Danaus_ple	-----	--RVQPPP-E	DCSQYDIYKI	NDMDRPL---	-----SEA	DVEMQRLIDS
Gryllus_bi	-----V	AESTLLRPEC	TS--HTSFDY	FSQCE-----	-----	-----LRS
Megachile_	-----S	ITNSGNRSED	SS-VQGNQDY	FTQSN-----	-----G	G--LERLISS
Pediculus_	-----	-DSSVIRSEG	PTQSNRNYDP	FSTN-----	-----	---VQRPVSS
Thermobia_	-----V	VESSAVRSEG	SSQSQENFDF	FNQSNG----	-----MLG	GREMQRLISS
Tribolium_	-----FRT	VESSASRPDG	MQENLDFLT-	-----	-----QSD	GKNIQRLINT
Gallus_gal	D-----S	GDAAFPQLAA	SPHSMDSVLQ	AGEGGPK---	-----RSH	PTVPGIPGGT
Rattus_nor	E-----G	GDPTFPQLTA	SPHSMDSMLP	SGEGGPK---	-----RTH	PTVPGIPGGT
Mus_muscul	E-----G	GDPTFPQLTA	PPHSMDSMLP	SGEGGPK---	-----RTH	PTVPGIPGGT

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	545	555	565	575	585	595
Lutzomia_l	HVEASKIGRQ	IAEQVLDHQR	RVGDSSSAES	SPDPEVTD--	-----	-----
Drosophila	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aedes_aegy	HVEASKIGRQ	IAEQVLDHQR	RIGDSS-SES	SPDPTDSA--	-----	-----
Dalphnia_p	EVEASKIGQT	VADEVLDHQR	SRSRSSASAI	SSSAVRSFGS	IISCSATASP	FSNVGSPFLDS
Anopheles_	HVEASKIGRQ	IAEQVLDHQR	RLGDSS-SES	SPNPNEAA--	-----	-----
Antheraea	RVESHQIGST	IAEEVLRSP	TEYIPELPPD	LLQDAVFN--	-----	-----
Apis_melli	HVEVSKIGRQ	IAEEVLDLQR	RGEDSS-SGS	SPGP-----	-----	-----
Camponotus	HVEVSKIGRQ	IAEEVLDLQR	RGEDSS-SGS	SPGPAVT--	-----	-----
Danaus_ple	QVESHKIGST	IAEEALRRSS	SDFS-DLTS	LLQDAVFS--	-----	-----
Gryllus_bi	PAMQGRQGWL	ADPTVRD---	---DMS-SGS	-----	-----	-----
Megachile_	HVEVSKIGRQ	IAEEVLDLQR	RGEDSS-SGS	SPGPGP----	-----	-----
Pediculus_	HVGPSLIGQQ	IAREIVLRRC	DDNNYANTPS	PSGIDAS---	-----	-----
Thermobia_	HVEASKIGQQ	IADEVLDAQR	RG-DSS-TGS	SPSPGLET--	-----	-----
Tribolium	HVEASKIGRQ	IAEQVMDSQR	RGGELS-SGG	SPDSEAES--	-----	-----
Gallus_gal	RAGAGKIGRM	IAEEIMEIHR	IRGSSPSSCG	SSPLNITS--	-----	-----
Rattus_nor	RAGAGKIGRM	IAEEIMEIHR	IRGSSPSSCG	SSPLNITS--	-----	-----
Mus_muscul	RAGAGKIGRM	IAEEIMEIHT	IRGSSPSSCG	SSPLNITS--	-----	-----

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	605	615	625	635	645	655
Lutzomia_l	-----	-----	-----TNPHQ	HIHLESS--	----ISASEV	SLDRR--IVQ
Drosophila	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aedes_aegy	-----	-----	-----IAQSF	NPAIQEANNL	SSEAIAAVER	SLASSSGVSP
Dalphnia_p	EPNYLVTGVL	PSPFSNEVCD	MRRNPIAVVG	NTPSVQSTTS	TTMNTSTNSE	SVAAILSVQV
Anopheles_	-----	-----	-----MQPAF	SSALSETN-H	SNDASTSGEH	SMATSSGVSP
Antheraea	-----	-----	-----	-----	--QQTSLVDN	ILGLEVPEYL
Apis_melli	-----	-----	-----	-ESALLNTES	QITTTASPER	VQDVAQSTRG
Camponotus	-----	-----	-----	-EPALLNTES	QITTTASPER	VPDVSRTGGI
Danaus_ple	-----	-----	-----	-----	--QSSSLVDN	ILGGEVNYSN
Gryllus_bi	-----	-----	-----	-----	-MAAVAAANG	GRD-----
Megachile_	-----	-----	-----	-ESTLLNTES	RITTTASSQR	VQDLTQPTRG
Pediculus_	-----	-----	-----	--DVTIQTTS	NPESVMSTSD	NDGRISLQR
Thermobia_	-----	-----	-----ILGAA	GEAPVNSLS	QISTTNTMDG	QHGGGIVQRP
Tribolium	-----	-----	-----TVPIS	SAESHIST--	---SVQPESN	SIMHDFSQSP
Gallus_gal	-----	-----	-----	-----TPP	PDTSSPGSKK	ILNGGTPDIS
Rattus_nor	-----	-----	-----	-----TPP	PDASSPGGKK	ILNGGTPDIP
Mus_muscul	-----	-----	-----	-----TPP	PDASSPGGKK	ILNGGTPDIP

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	665	675	685	695	705	715
Lutzomia_l	ANPQ-----	-----	-----	-----RLN	GTLPGY-HVR	NN-----
Drosophila	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aedes_aegy	ASSSGAGATG	GANGSGGAGT	ASTVGPNGGQ	ATGPPPQRIN	GTLPGYNHVR	NN-----
Dalphnia_p	NSNGSG----	-----	SNSSGSNSGL	RGNENHHNR	NNNHNHVKVR	NNAQLLHILN
Anopheles_	SSVS-----	-----	---VVPSSVV	TT-----RIN	GTLPGYSHVQ	TN-----
Antheraea	HVRN-----	-----	-----	-----NVPLS	VAGVRDSPPPQ	SE-----
Apis_melli	S-NN-----	-----	-SSSNPTPTY	NHIANNLQLN	SIANDQGASP	DEGHETTFL-
Camponotus	SNDN-----	-----	-CSNNPTSTF	NHVANNVQLN	SIANDQGASP	DE-----
Danaus_ple	QVRN-----	-----	-----	-----NVPLS	AAGGSSPSPE	-----
Gryllus_bi	-----	-----	-----	---IQCLIK	TMLSDPGVEA	DD-----
Megachile_	STNN-----	-----	-STATPAPTY	NHIANNLQLN	SIANDQGTSP	DE-----
Pediculus_	INLN-----	-----	-----	-----DMN	NVNIKHHSIR	NN-----
Thermobia_	NHNN-----	-----	-NMTN----F	NNIRNNAQLS	NAVNDGGPRP	DD-----
Tribolium	HTYN-----	-----	-----	-----HVRNN	LPLSSVANDQ	GNTTEE----
Gallus_gal	SAG-----	-----	-----	-----LLS	GQIQDSSGYP	YS-----
Rattus_nor	SAG-----	-----	-----	-----LLP	GQAQETPGYP	YS-----
Mus_muscul	STG-----	-----	-----	-----LLP	GQAQETPGYP	YS-----



	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	725	735	745	755	765	775
Lutzomia_l	-----SI	INANHSNTEV	LQMMTPGMA	TEAPNQTGTT	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Drosophila	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aedes_aegy	-----EI	VSPEHE----	-----	-VPHSQANST	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Dalphnia_p	EAGLHADEDM	MEVIGGLMMD	QS-----Q	SSSRENSSPG	DGNDEAAMAV	VMSLLEADAG
Anopheles_	-----AI	ISPEHD----	-----	-VSQAQANST	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Antheraea_	-----NG	IELPVGSPLP	VS-----	--PPLPSLGI	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Apis_melli	-----TKDV	MDMIGGTIN	-----	-ESPNN-VPS	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Camponotus	-----DM	MDMIGGTAIN	-----	-ESPNN-IPS	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Danaus_ple	-----	AELPL-SPLP	VS-----	--PPLPPLGL	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Gryllus_bi	-----M	MEMIGGSILP	-----	-DSPHPSAFN	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Megachile_	-----DM	MDMIGGTIN	-----	-ESPNN-VPS	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Pediculus_	-----	VSLTAAASSG	-----	IDSDAEMLE	MMSGTAAMAV	IMSLLEADAG
Thermobia_	-----EM	ISMISGAALP	-----	-ESPNNVSN	DGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Tribolium_	-----GI	IEIMEDAVR-	-----	-ESPNEPVS	EGNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Gallus_gal	-----DN	SSILGENSHI	G-----ID	MIDNDQGSSS	PSNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Rattus_nor	-----DS	SSILGENPHI	G-----ID	MIDNDQGSSS	PSNDEAAMAV	IMSLLEADAG
Mus_muscul	-----DS	SSILGENPHI	G-----ID	MIDNDQGSSS	PSNDEAAMAV	IMSLLEADAG

	.... ....	....
	785	795
Lutzomia_l	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Drosophila	-----	-----
Aedes_aegy	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Dalphnia_p	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Anopheles_	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Antheraea_	LGGQVNFSTGL	PWPLP
Apis_melli	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Camponotus	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Danaus_ple	LGGPVNISTGL	PWPLP
Gryllus_bi	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Megachile_	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Pediculus_	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Thermobia_	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Tribolium_	LGGPVDFSTGL	PWPLP
Gallus_gal	LGGPVDFSTDL	PWPLP
Rattus_nor	LGGPVDFSTDL	PWPLP
Mus_muscul	LGGPVDFSTDL	PWPLP