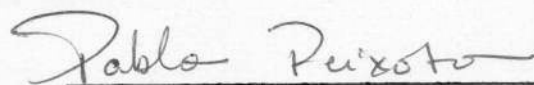


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

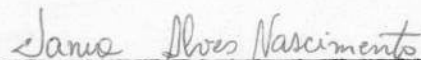
Identificação de motores moleculares em larvas de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, como requisito para aquisição do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia.

Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Profª Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Acadêmico



Co-orientador



Orientador

Uberlândia
Julho-99

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Identificação de motores moleculares em larvas de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*

Pablo Marco Veras Peixoto

Monografia homologada em
09/07/99 pela Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de
Uberlândia.

Universidade Federal de Uberlândia
Ana Maria Carvalho
Coordenadora
Prof.ª Ana Maria Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca examinadora:

Foued Espindola

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Vânia Alves do Nascimento

Doutoranda Vânia Alves do Nascimento

Jair Pereira da Cunha Junior

MSc. Jair Pereira da Cunha Junior

Uberlândia
Julho-99

A quem possa interessar.

AGRADECIMENTOS

Começo desculpando-me pelas injustiças que seguramente vou cometer, não mencionando nomes os quais, sinceramente, considero tão importantes quanto os que seguem abaixo relacionados. Todas essas pessoas possuem inúmeros méritos. Não posso relacioná-los com justiça. Posso sim, dizer que guardarei um pouco de cada um delas neste caminho que agora inicio. Por isso lhes sou grato e devedor.

Começo por quem?

...minha mãe, por TUDO...

...a deus, pela minha mãe...

a toda a equipe técnica que dá suporte ao curso de Ciências Biológicas desta ainda boa e gratuita universidade

...professores não são técnicos?

NÃO. São produtores e divulgadores de conhecimento. Foram meus formadores:

Ana Maria, Elaine, Paula Dechichi, Zenon, Maria Teresa, Lila, Osvaldo, Renata, Arlete, Sandro, Marco Aurélio, Domingos (sobrevivente do bidê explosivo), Eneida, Roberto "enrolemos", Rejane (impinadinha), Maria Inês (vovó garotinha), Luis Ricardo, Bonetti, Nora Ney, Adriano, Ignácio, Benvinda (só pensa... no Ca^{++}), José Fernando (que sono!), Ângela, Kleber (os cara são doido!), Sandra Moreli, Miltinho, Juninho (Jair), Rodolfo, Margareth, Wagner (você!).
A vocês, um grande beijo.

Agradecimento especial ao Professor Mineo, a quem eu devo a oportunidade de um estágio no exterior, e seus benefícios. Não vamos deixar isso acabar!

À Cecília.

Despertou-me para a ética científica.

À 44ª Turma de Ciências Biológicas.

Ao PET/Biologia (acreditem, a reprovação me fez crescer)

A meus amigos, Fredy (vai, viaja em toda a maionese que encontrar. Volte e me conte histórias de rir e chorar), AlBarcelos (eu sem vc...), Letícia Borges Euquero Batata (ops), Lucia Maria (aqui,...), Lisandra (que seja feliz!), Andreia Lelis (piu-piu!), Louislayne (oxigenada, mas os olhos são verdes), Léo-Frajola (grande amigo, ator, artista plástico... ...cantor, nem tanto.) Vânia (cócó-orientadora), Fernando (GraNa), Rosa (Boluda), Olenka (óin), Catalina (mí hermanita), Ivonne (primita), Ângela (loirosa), Christina (ich lieb), Nöella Markstein (minha inspiradora), Idê NazareTH Costa (fica triste naum...), Dri (basófila), Rê Cesário (Renatão), Giban, (origem da virtude), Sidamoneide, à Frã e à TODOS os graduandos e graduados deste curso, que ainda vai dar o que falar!

Ao Tufo,

Aos tios Toin (te amo), Carlos (chucalho), Alumilton, Zé Bruga, e Francisco Sales, obrigado pelo apoio,, e pelos dólares (hehehe).

Ao meu amigo e ORIENTADOR, com orgulho e profunda admiração,
FOUED SALMEN ESPINDOLA

SUMÁRIO

I.	Introdução	1
II.	Material e Métodos	13
III.	Resultados e Discussão	17
IV.	Conclusão	20
V.	Referências Bibliográficas	21

I. INTRODUÇÃO

A migração de neurônios, células da glia e a formação de cones de crescimento no sistema nervoso dos animais são devidos a eficientes mecanismos de motilidade celular. Tais mecanismos são mediados por mecanoenzimas associadas ao citoesqueleto formado por microtúbulos e actina. Estas moléculas motores geram, através da energia liberada pela hidrólise de ATP, força mecânica e mobilidade ao longo do citoesqueleto (Harrington e Rodgers, 1984).

As proteínas motoras capazes de locomover-se sobre filamentos de actina pertencem à família das miosinas, que compreende atualmente 14 classes (fig.1) distintas. A primeira classe foi descoberta em 1856. Trata-se da uma miosina convencional da classe II. Ela é constituída por duas cadeias pesadas (200 kDa) e cadeias leves que variam em número e de acordo com o tecido e a espécie estudada. As demais, por apresentarem

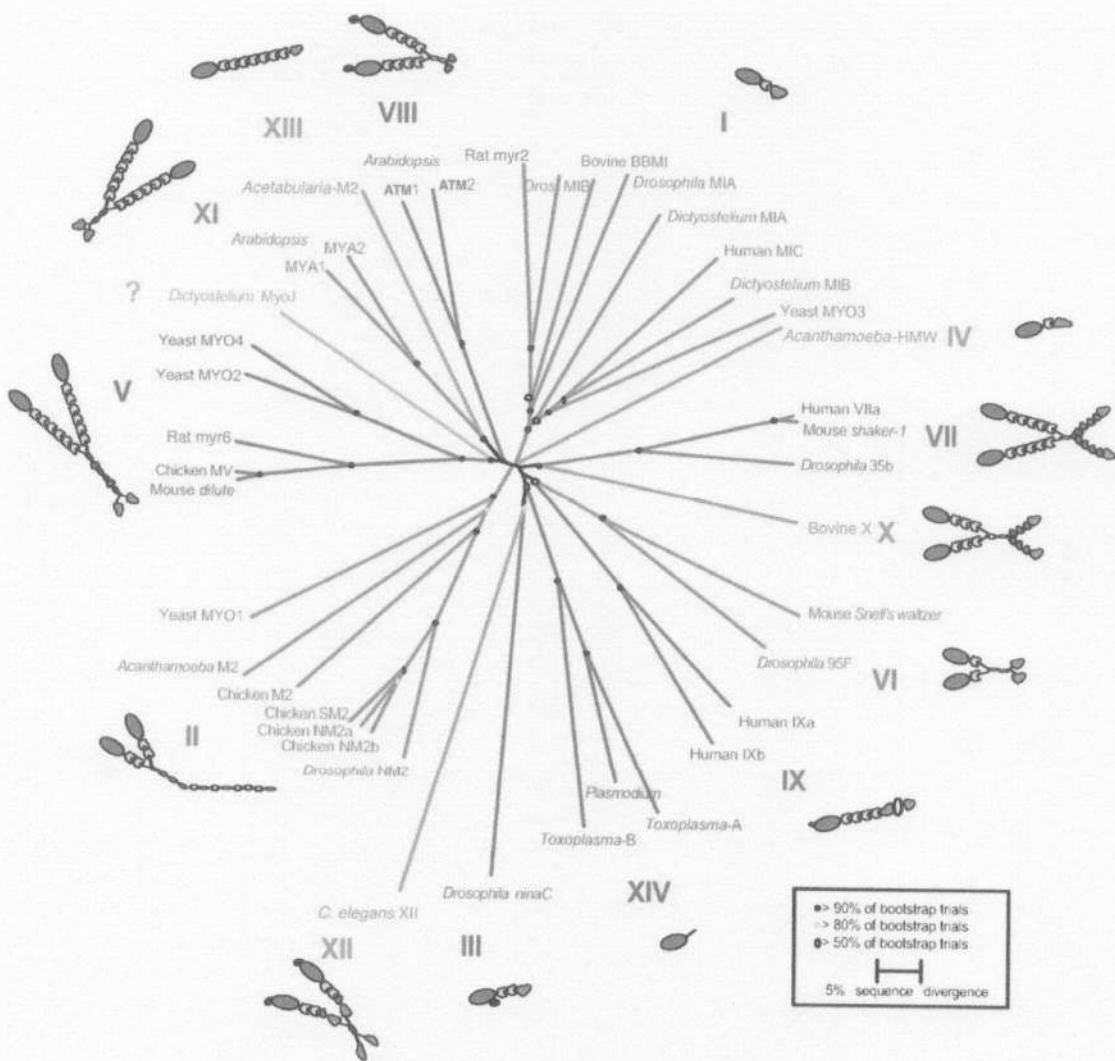


Figura 1: Árvore filogenética das classes de miosinas (Mermall *et al* 1998).

divergências estruturais, foram denominadas miosinas não convencionais (Spudich, 1994).

Por outro lado, as mecanoenzimas que se associam a microtúbulos foram denominadas dineína e cinesina. Elas são apontadas como responsáveis por fenômenos de movimento ao longo de microtúbulo, como o transporte axonal (Hirokawa, 1998).

As dineínas representam uma família de proteínas estruturalmente semelhantes mas funcionalmente diversificada. Há três classes distintas: a dineína axonemal de braço interno e externo, ambas distribuídas no axonema de cílios e flagelos e a dineína citoplasmática, enzima esta implicada em uma gama variada de funções intracelulares (Holzbaur e Vallee, 1994). As dineínas executam transporte retrógrado e/ou centrípeto ao longo dos microtúbulos. Sua função parece estar relacionada à localização centrossomal do complexo de Golgi e de endossomos iniciais e tardios (Hirokawa, 1998).

São motores moleculares complexos, possuindo mais de 15 polipeptídeos associados, com uma massa total entre 1 e 2MDa. O domínio motor da dineína, localizado na porção C-terminal da molécula, é consideravelmente mais complexo que de miosinas e cinesinas e abriga, ao invés de um, quatro domínios ligantes de ATP (designados "loop-P") e um único domínio ligante de microtúbulos (Valle e Gee, 1998).

A região N-terminal das dineínas (domínio cauda) associa-se ao conjunto de cadeias intermediárias e leves, propiciando a interação dineína-carga (Hirokawa, 1998). Além da complexa estrutura da dineína, essa biomolécula pode se associar a outro complexo proteico, a dinactina. A associação da dinactina com a dineína parece ser feita pela cadeia intermediária de 74 KDa e é provavelmente o elemento crucial para a interação dineína-carga (Hirokawa, 1998).

A família das cinesinas, por sua vez, é composta de proteínas, a maioria muito alongadas, medindo cerca de 110 nm de comprimento. Elas estão relacionadas primariamente ao transporte anterógrado de vesículas, podendo também atuar no transporte retrógrado.

A primeira cinesina descoberta foi obtida de axônios gigantes de lulas (Brandy, 1985 e Vale *et al*, 1985). Desde então, um grande número destes motores tem sido descoberto, compondo esta superfamília de proteínas. Esta superfamília subdivide-se em três grupos, de acordo com a posição de seus respectivos domínios motores. As sequências altamente conservadas de aminoácidos do domínio motor correspondem aos sítios de ligação a ATP e microtúbulos. Assim, tem-se os grupos de cinesinas, que são: Tipo-N (domínio motor na região N-terminal), tipo-M (domínio motor central) e tipo-C (domínio motor na região C-terminal da molécula) (Hirokawa, 1996 e 1998).

Associadas à molécula de cinesina, encontram-se cadeias leves que modulam a interação cinesina-carga. A carga a ser por ela transportada pode ser lisossomas, endossomas, mitocôndrias ou retículo endoplasmático (Hirokawa, 1996 e 1998).

Adams e Pollard, em 1989, propuseram que uma miosina não convencional (miosina-I) liga-se à membrana de *Achantamoeba* e é capaz de mover organelas ao longo de filamentos de actina dentro do citoplasma. Fukuit *et al.*, em 1989, localizaram as miosinas I e II em pseudópodes de *Dyctiostelium* e apresentaram evidências de que a miosina-I é responsável por movimento celular associado à membrana. A miosina-II participa de processos de citocinese e capeamento de receptores e contribui para o estabelecimento da polaridade e diferenciação celulares em *Dyctiostelium* (Kiehart, 1990).

Várias miosinas, de múltiplas classes são expressas em vertebrados (Mermal *et al.*, 1998) e muito pouco se conhece sobre as funções da maioria destas proteínas (tab. 1).

Tabela 1: Funções das miosinas.

CLASSE	FUNÇÃO
I	Controle de extensões de membrana
II	Localização determinante
III	Manutenção de rabdômeros em <i>Drosophila</i>
V	Tráfego de vesículas
	Herança vacuolar
	Localização de organelas
VI	Localização de mensagem
	Ancoramento de estereocílios e movimento de partículas
VII	Manutenção de extensões ricas em actina

A miosina-V é encontrada predominantemente em neurônios, tendo sido localizada no terminal pré-sináptico (Mochida *et al.*, 1994). As mutações dos genes que expressam a miosina-Va em camundongos e humanos foram identificadas (Pastural, 1997). Camundongos afetados (*dillute*) por mutações recessivas no gene que codifica esta proteína morrem em até três semanas, por convulsões. Este camundongo apresenta uma diluição da pigmentação de sua pele, resultante de defeitos na transferência de grânulos de melanina dos melanócitos para os queratinócitos (Mercer *et al.*, 1991).

Foi descrita em 1978 por Griscelli *et al* uma doença muito rara, realcionada à miosina-V. Nos casos estudados recentemente, os indivíduos afetados apresentaram albinismo parcial, problemas neurológicos e imunodeficiência celular severa, com uma fase aguda de ativação fagocitária e linfocitária descontrolada, levando à morte na ausência do transplante de medula óssea. Esta doença é autossômica recessiva.

Todos os dados funcionais sugerem que a miosina-V de cérebro (BM5) atua no crescimento polarizado e tráfego de vesículas do pós-Golgi. Imagens de miosina-V obtidas de microscopia eletrônica por técnica de sombreamento rotatório (Cheney *et al.*, 1993) mostram tratar-se de um dímero (fig. 2) com duas cabeças gigantes, orientadas em T ou Y, ligadas por segmentos de dupla alfa-hélice, e uma região C-terminal globular. A cauda se divide nas regiões proximal, medial e distal. Na região proximal predomina a estrutura em alfa-hélice, que não acarreta a formação de filamento. A região medial da cauda contém a sequência PEST, associada à proteólise intracelular por calpaína (Larson, 1996).

Foi demonstrado por Prekerris e Terrian, em 1997, através da combinação de técnicas de imunopurificação, extração, ligações cruzadas e ensaios de co-precipitação, que o domínio cauda da miosina-V forma um complexo estável com proteínas da membrana de vesículas sinápticas,

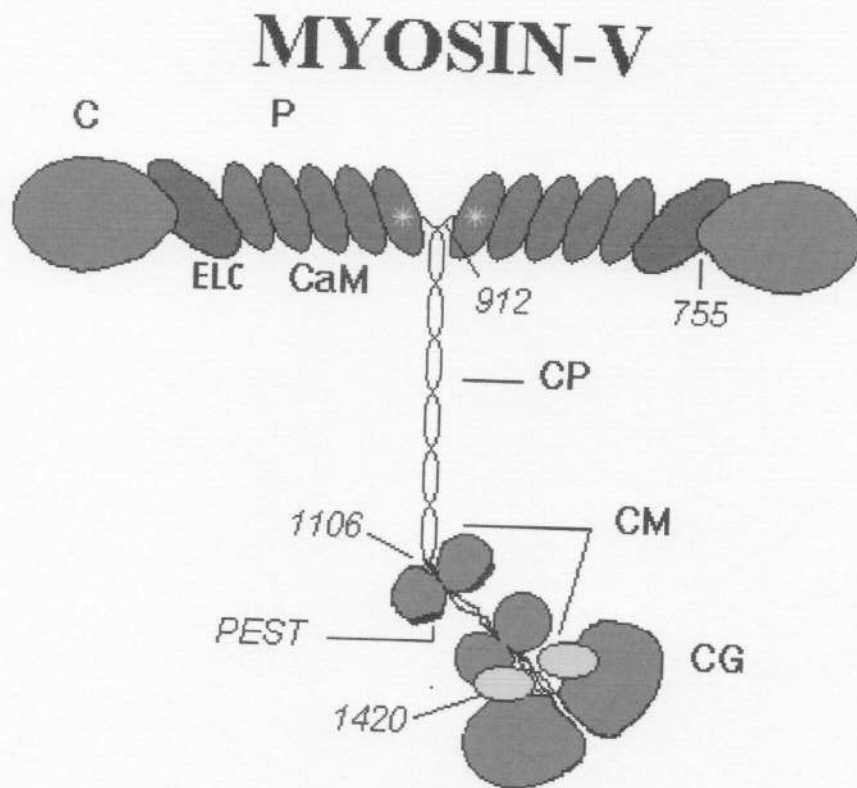


Figura 2: Modelo esquemático da estrutura quaternária de miosina-V.

sinaptobrevina-II e sinaptofisina. O domínio citoplasmático do complexo sinaptofisina-sinaptobrevina pode funcionar como um compartilhador da ligação de miosina-V, formando um complexo multimérico.

O domínio pescoço ou regulatório de miosina-V, presente na maioria das miosinas, é responsável pela ligação das cadeias leves. Nele há seis motivos (IQ) para ligação de cadeias leves da superfamília das calmodulinas.

O controle da motilidade é bastante complexo, e deve haver uma rede de conexões entre os sistemas motores. Uma evidência deste fato foi a caracterização molecular do complexo dinactina sugere que este possa ser o local de coordenação dos sistemas de motilidade baseados em tubulina e actina (Langford, 1995).

Montell e Rubin, 1988 mostraram que o gene *NinaC* de *Drosophila* codifica um par de proteínas, essencial para a formação normal dos rabdômeros dos olhos compostos. A estrutura primária desta proteína apresenta em sua região C-terminal, homologia com o domínio cabeça de miosina-I, e do lado N-terminal, homologia com o domínio catalítico de uma serina-cinase. Neste mesmo inseto identificou-se o gene que codifica miosina-V. Estudos de caracterização molecular mostraram que o domínio motor desta proteína apresenta maior semelhança à miosina-V de humanos e outros mamíferos do que à de *S. cerevisiae* e *C. elegans* (fig. 3). Verificou-se abundância desta proteína nos estágios embrionários de drosófilas, período em que há alta atividade celular (Bonafé e Sellers, 1998).

Associada às membranas do complexo de Golgi, foi detectada por Baumann *et al.*, a presença de dineínas e miosinas não convencionais em células fotorreceptoras de abelhas. Entretanto, nada se conhece sobre os

mecanismos de motilidade celular nestes insetos. Seu sistema nervoso é bastante complexo, se comparado ao de outros insetos. Consiste de um

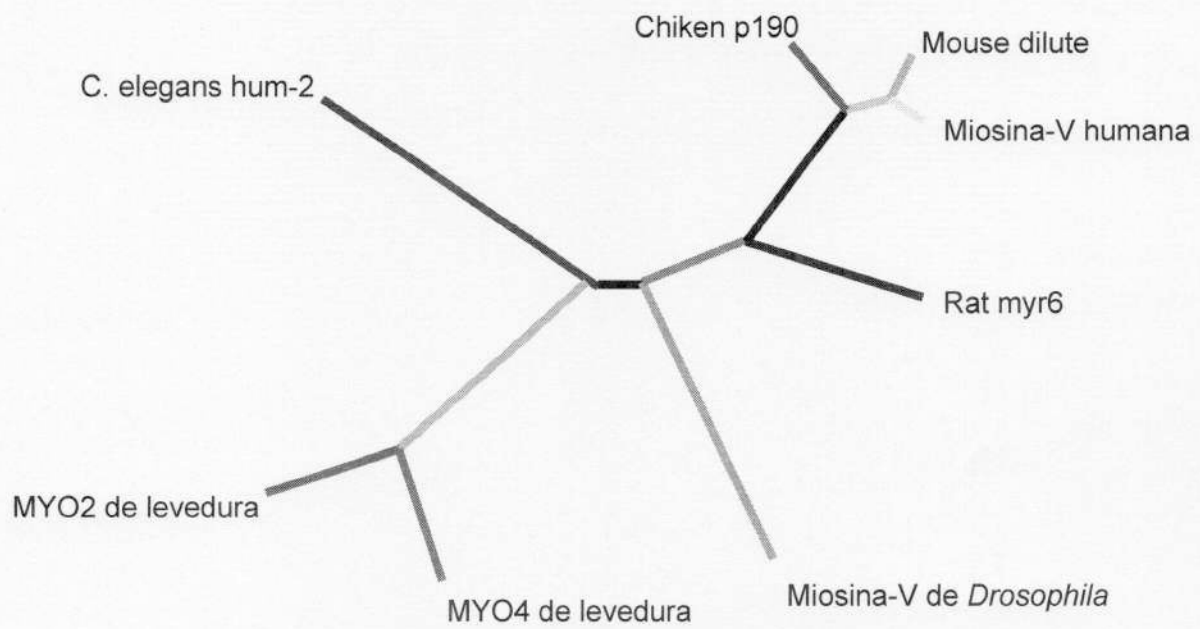


Figura 3: Modelo esquemático das relações filogenéticas das miosinas da classe V (Bonafé e Sellers, 1998).

cérebro e um cordão nervoso ventral. Cerca de trezentos e quarenta mil neurônios (aproximadamente um terço do cérebro das abelhas), denominados em conjunto "corpos de cogumelo" (fig 4.) , estão associados à memória olfatória e tomada de decisão. Existem dois cálices em cada corpo de cogumelo (MB), contendo dois tipos morfológicamente distintos de neurônios: células Kenyon grandes e pequenas. Em *Drosophila* há somente um cálice em cada MB, contendo neurônios indistintos morfológicamente. Oleskevich *et al.*, (1997) relatam que uma resposta monossináptica pode ser registrada após estimulação olfatória e que a plasticidade sináptica exibida pela abelha é semelhante, em muitos modos, à plasticidade relatada no hipocampo de mamíferos.

As estruturas dos MB de cérebro de abelhas, além de bem desenvolvidas em relação às de outros insetos, apresentam-se plásticas, podendo sofrer alterações estruturais e de volume, mesmo no inseto adulto. A relação entre o volume do MB e o corpo de uma operária é de cerca de 12%, enquanto em *Musca domestica* (mosca) e *Schistocerca gregaria* (gafanhoto) esta relação é de apenas 2% (Kamikouchi *et al.*, 1998).

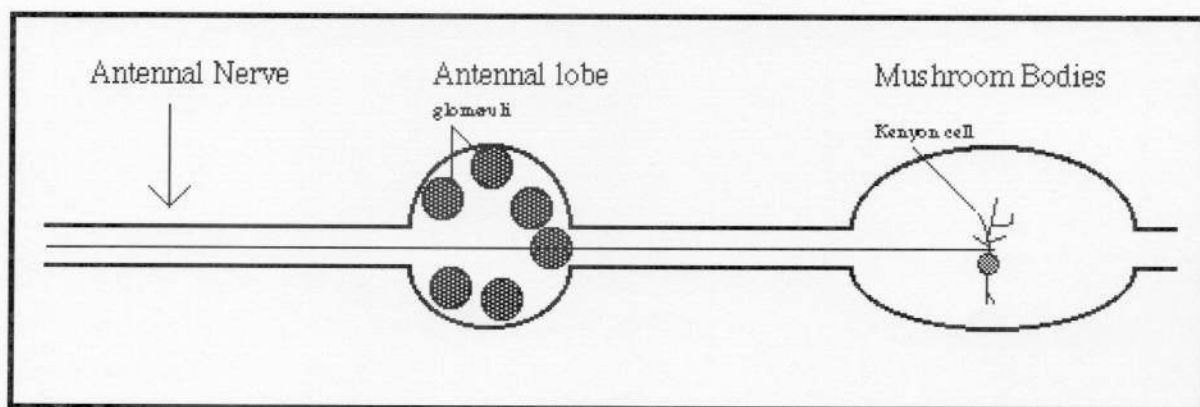


Figura 4: Modelo esquemático do sistema olfatório de abelhas.

II. OBJETIVO

A escassez de estudos bioquímicos de motores moleculares em invertebrados, especialmente em abelhas motivou a execução do presente estudo, que visou a identificação de motores moleculares, principalmente miosina-V em gânglios cerebrais de larvas de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

As larvas (pré-pupas) de *M. scutellaris* foram obtidas no Meliponário Uberlândia da UFU. As de *A. mellifera* foram retiradas de colônias no Campus Umuarama da UFU e Apiário Girassol. Quando ainda não haviam atingido o estágio desejado, as larvas eram mantidas em estufa FANEM à 32°C, acondicionadas em placas de petri, com papel de filtro e chumaço de algodão úmido.

Dissecação dos Gânglios (Imai *et al.*, 1988)

Para a obtenção dos gânglios cerebrais, realizou-se a dissecação das larvas com auxílio de um esteromicroscópio. Separou com pinças a região

anterior, descartando-se a posterior. O tegumento interno foi então retirado. Pingou-se três gotas de água desionizada, para evitar desidratação do material. Separou-se o gânglio do resto do material. Seu aspecto é semelhante a um coração, geralmente associado ao cordão nervoso ventral. O gânglio foi então conservado em nitrogênio líquido, e o processo se repetiu, até a obtenção de aproximadamente 50 gânglios.

Preparação de amostras de proteína para eletroforese

Os gânglios foram homogeneizados em 500 μ l tampão A (2M HEPES, pH 7,7; 10mM EDTA; 2mM EGTA; 5mM ATP; 2mM DTT; 1mM Benzamidina; 0,1mM Aprotinina; 0,5mM PMSF) à baixa temperatura, com um mini-homogeneizador OMNI-MIXER. Retirou-se uma alíquota de 100 μ l para dosagem protéica pelo método de Bradford. Posteriormente centrifugou-se a amostra à 40.000xG, por 30 minutos, à 4°C. (Hitachi, rotor 27). Descartou-se o precipitado. Ao sobrenadante adicionou-se 50 μ l de tampão da amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glicerol; 1% SDS; 0,025% Azul de Bromofenol; 10% Sacarose; 10 μ l 2-Betamercaptoetanol).

As amostras de homogeneizado foram aplicadas à concentração de 20 μ g de proteínas/poço em mini gel gradiente de 5-22% de acrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1973). A corrente foi mantida constante (30 mA), até que a frente do gel saísse da placa. Para determinação do peso molecular das proteínas do gel, utilizou-se padrão SIGMA SDS-7B.

Deteção de motores moleculares (Western Blot, quimioluminescência e fosfatase alcalina)

As bandas protéicas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose pela técnica de Western blot, segundo Towbin (1979). A

transferência foi realizada overnight a 100mV. Deixou-se o blot secar em papel de filtro, à temperatura ambiente, sendo depois marcadas com lapis os pesos moleculares das bandas transferidas do padrão 7B. Guardou-se em refrigerador a 4°C. Os blots foram então incubados overnight em solução contendo 0,5% leite em pó desnatado diluído em TBS (150mM NaCl, 50mM Tris-base, pH 8,0), lavados 3 vezes, durante cinco 5 minutos em TBS. Desta vez as membranas foram incubadas overnight com anticorpos primários, produzidos contra os domínios cabeça e cauda de miosina-V, contra miosinas I, II, e IX, e contra cadeia intermediária de dineína. No dia seguinte, lavou-se novamente as mebranas 3 vezes com TBS. Incubou-se as membranas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina. Após uma hora de incubação, as membranas foram lavadas pela última vez com TBS, 3 vezes por 5 minutos.

As membranas em anticorpo conjugado com fosfatase alcalina foram reveladas no escuro, incubadas com NBT/BCIP. A reação foi paralizada com TCA 5%, quando fosse bem visível a coloração roxa da banda marcada. As membranas em anticorpo conjugado com peroxidase, foram reveladas em câmara escura. Para isso, incubou-se 1 minutos com luminol. Então colocou-se em um cassete com um filme de raio X e fechou-se o cassete. Após 2 minutos de exposição, retirou-se o filme do cassete para mergulhá-lo em solução reveladora, por 1 minuto. O passo seguinte foi mergulhar o filme em água, e depois, em solução fixadora, ambos por 1 minuto. Lavou-se exaustivamente o filme, que foi deixado para secar, à temperatura ambiente.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético visualmente satisfatório, bem como a concentração protéica ótima (20 μ l) dos homogeneizados foram atingidos quando dissecados aproximadamente 50 gânglios larvais.

Outro procedimetno cuja padronização foi crucial para a execução deste trabalho, foi a escolha do melhor tampão de homogeneização. Inicialmente utilizou-se a técnica de precipitação com TCA 5%, que nem sempre oferecia resultados satisfatórios. Recorreu-se então à precipitação com uréia, inicialmente eficiente; contudo, não se pôde reproduzi-la com perfeição. Finalmente optamos por testar o tampão de homogeneização comumente utilizado na extração de miosina V de cérebros de bovinos e pintainhos, descrito anteriormente na seção "Material e Métodos". Obteve-se então o resultado desejado e reprodutível.

Detectamos nos homogeneizados totais de gânglios cerebrais de *M. scutellaris* a presença de β -tubulina (componente do citoesqueleto de microtúbulos) e cadeia intermediária de dineína (fig. 6). Lembramos que a dineína utiliza microtúbulos como “trilho” para mover-se.

Infelizmente não dispúnhamos de anticorpos contra actina. Pudemos contudo, detectar a presença das miosinas I-C, II, V, VI e VII em homogeneizados de *M. scutellaris* (figuras 6 e 7).

Os anticorpos por nós utilizados foram obtidos de coelhos, à exceção dos anticorpos anti- β -tubulina e anti-cadeia intermediária de dineína, que foram obtidos de camundongos. Anticorpos de coelhos reconheceram miosinas de abelhas. Este fato prova que existe homologia entre os epítomos das miosinas de abelhas e coelhos. O mesmo pode ser dito para a tubulina e cadeia intermediária de dineína detectados por anticorpos obtidos de camundongos.

Os corpos de cogumelo dos himenópteros em geral, e das abelhas em particular, são proporcionalmente maiores do que os da maioria dos insetos. Neles se processam grande parte dos eventos bioquímicos responsáveis pela memória olfatória, aprendizado e complexidade etológica das abelhas.

As proteínas detectadas detectadas nos homogeneizados certamente estão distribuídas ao longo dos neurônios cerebrais e células Kenyon, que constituem os corpos de cogumelo. Pode-se inferir que a presença dos motores moleculares imunodetectados seja indício da existência de um complexo sistema de transporte de organelas. É possível que haja alguma relação entre o nível de expressão destas proteínas e o nível de desenvolvimento dos corpos de cogumelos nos insetos. Estudos futuros de imunolocalização, sequenciamento e clonagem do(s) gene(s) que codificam miosina-V poderão ser de grande importância para sua caracterização molecular em *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*.

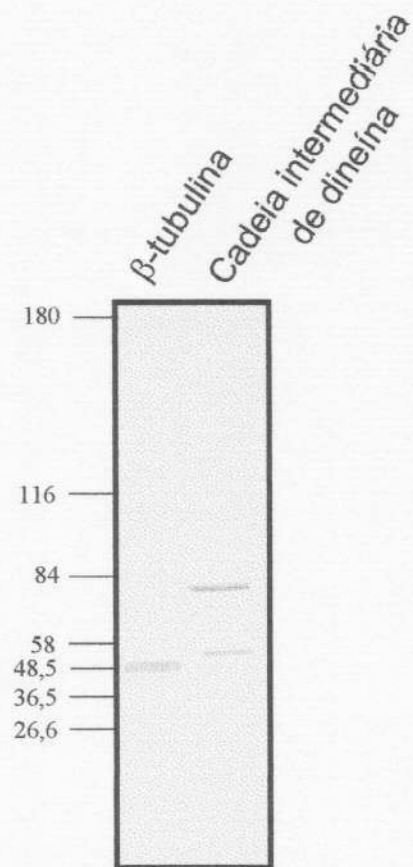


Figura 5: Imunodeteção revelada por fosfatase alcalina de homogeneizados totais de gânglios cerebrais de larvas de *M. scutellaris*.

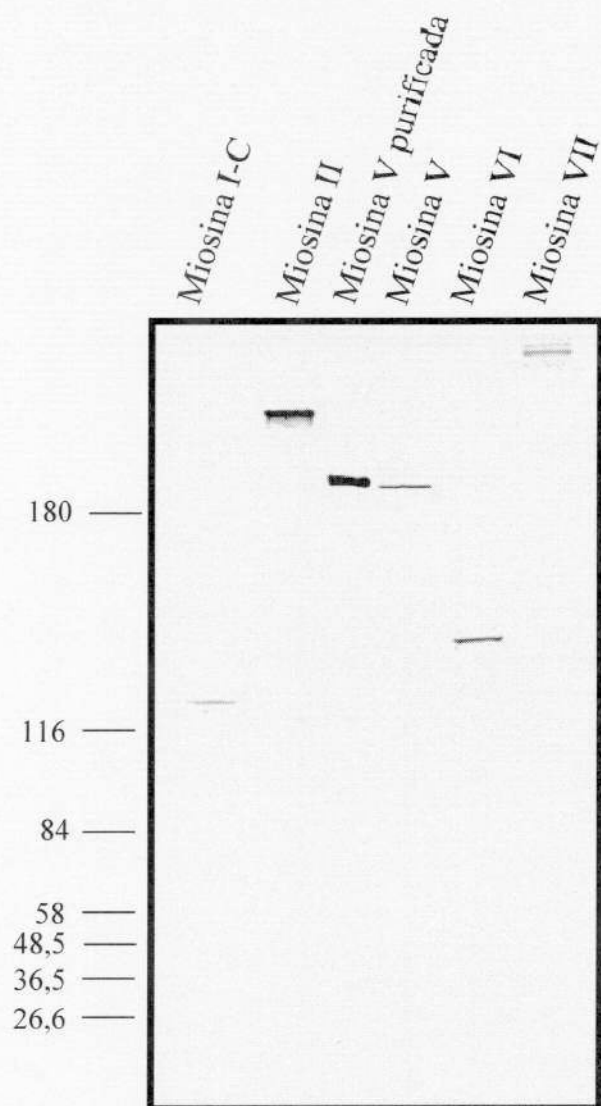


Figura 6: Imunodeteccção revelada por fosfatase alcalina de homogeneizados totais de gânglios cerebrais de larvas de *M. scutellaris*.

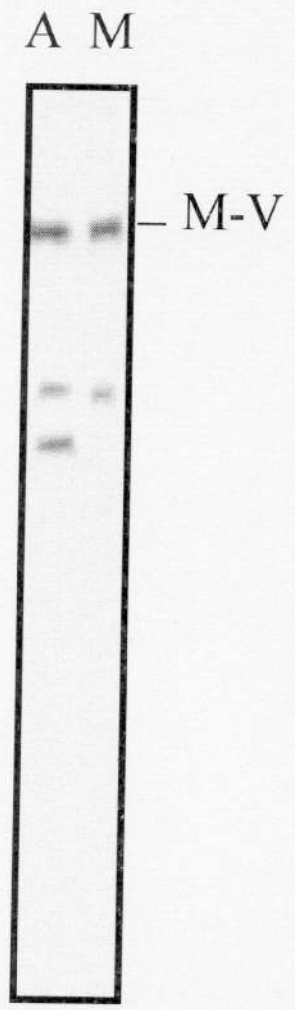


Figura 7: Imunodeteccção de miosina-V em homogeneizados totais de gânglios cerebrais de larvas de *A. mellifera* e *M. scutellaris*.

V. CONCLUSÕES

- O tampão de homogeneização utilizado na extração de miosina-V de cérebros de bovinos e pintainho é eficiente para se produzir extratos protéicos totais de gânglios cerebrais de abelhas.
- Beta-tubulina e cadeia intermediária de dineína citoplasmática estão presentes nos gânglios cerebrais de *Melipona scutellaris*.
- As miosinas I, II, VI e VII estão presentes em gânglios em gânglios cerebrias de *Melipona scutellaris*.
- Miosina-V está presente em gânglios cerebrais de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*.

V. BIBLIOGRAFIA

- Baumann, O. 1998. The Golgi apparatus in honeybee photoreceptor cells: structural organization and spatial relationship to microtubules and actin filaments. Cell Tissue Res. 291: 351-361.
- Bicker G. 1998. Behav Biogenic amines in the brain of the honeybee: cellular distribution, development, and behavioral functions. Brain Res. 96(1-2):115-24.
- Bonafé, N. and Sellers, J. R. 1998. Molecular characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. J. Musc. Res. Cell Mot. 19: 129-141.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bernstein, B. W. e Bamberg, J. R. 1989. Cycling of actin assembly in synaptosomes and neurotransmitter release. Neuron. 3: 257-265.

- Calakos, N. e Scheler, R. H. 1994. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. J. Biol. Chem. 269: 24534-24537.
- Cameron, L.C. ; Nunes-carvalho, R. Araújo, J.R.V. , Santos, A .C.; Tauhata, S.B.F.; Larson, R.E. and Sorenson, M. 1996. Actin changes the association between calmodulin and brain myosin V. Mol. Biol. Cell 7, 372.
- Cayre M, Buckingham SD, Strambi A, Strambi C, Sattelle DB. 1998. Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. Cell Tissue Res 291(3):537-47.
- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, et al. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. Cell 75:13-23.
- Coelho, M. V., and Larson, R. E. 1993. Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. Bras. J. Med. Biol. Res. 26: 465-472.
- Costa, M.C.R.; Santoro,Jr., W.; Espreafico, E.M and Larson, R.E. 1996. Brain myosin-V binds to calmodulin-dependent protein kinase-II and activates its phosphorylating activity. Molecular Biology of the Cell. 7 (supplement):373a.
- Edelman, L., P.I. Hanson, E.R. Chapman e Jahn, R. 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. EMBO J. 14: 223-24.
- Espindola, F.S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A. R., Costa, F. R. C., Mooseker, M. S., Larson, R. E. 1992. Biochemical and immunological characterization of p190- calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. J. Cell Biol. 118(2): 359-68.

Espindola, F.S.; Suter, D.M.; Lin, C.H.; Forscher, P. and Mooseker, M.S. 1996a. Localization of unconventional myosins V and VI in nerons. Molecular Biology of the Cell. (suplplement) 7:372a,

Espreáfico, E.M.; Cheney, R.E.; Matteoli, M.; Nascimento, A.A.C.and

De Camilli, P. V. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. J. Cell Biol. 119:1541-58.

Govidan, B., Bowser, R., and Novick, P. 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. J.Cell Biol. 128: 1055-1068,

Griscelli, C.; Durandy, A.; Guy-Grand, D.; Daguillard, F.; Herzog, C. and Prunieras, M. 1978. A Syndrome Associating Partial Albinism and Immunodeficiency. Amer. J. Med.. 65:691-702.

Harrington, W.F. and Rodgers, M.E. 1984. Myosins. Ann. Rev. Biochem., 53: 35-73.

Hirokawa N. 1998. Kinesin and dinein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science. 279:519-526.

Holzbaur, E. L. F e Vallee, R. B. 1994. Dyneins: molecular structure and cellular dunctions. Annu. Rev. Cell. Biol. 10: 339-72.

Imai, H. T. ; Taylor, R. W. ; Crosland, M. W. J. & Crozier R. H. 1988. Modes of spontaneous chromossomal mutation and karyotipe evolution in ants with reference to the minimum interation hypotesis. Jpn. J. Genet. 63: 160-165.

Jaffrey, S. R., e Snyder, S. H. 1996. PIN: na associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. Science, 274: 774-776.

Kamikouchi, A; Takeuchi, H; Sawata, M; Ohashi, K; Natori, S; Kubo, T.J. 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera*. Biochem Biophys Res Commun 242(1):181-6.

- Kiehart, D.P. 1990. Molecular genetic dissection of myosin heavy chain function. Cell, 60: 347-350.
- King, S.M.; e Patel-King, R.S. 1995. The Mr=8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from chlamydomonas flagella have cytoplasmic homologues. J. Biol. Chem. 270: 11445-11452.
- Laemmli, U.K. and Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 80:575-599.
- Langford, G.M. 1995. Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 82-88.
- Larson, R.E. 1996. Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. Brazilian J. Med. and Biol. Research. 29:309-318.
- Mercer, J.A.; Seperack, P.K.; Strobel, M.C.; Copeland, N.G. and Jenkins, N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. Nature 349: 709-713.
- Mermall, V., Post, P.L. and Mooseker, M.S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. Science, 279:527-33.
- Miller, M., E. Bower, P. Levitt, D. Li, e Chantler, P. D. 1992 Myosin II distribution in neurons is consistent with a role in growth cone motility but not synaptic vesicle mobilization. Neuron. 8: 25-44.
- Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y. Muramoto, K. e Nonomura. 1994. Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. Neuron. 13: 1131-1142.
- Murakami, N., Singh, S. S. Chautan, V.P.S. e Elzinga, M. 1995. Phospholipid binding, phosphorylation by protein kinase C and filament assembly of the COOH terminal heavy chain fragments of nonmuscle myosin II isoforms MIIA e MIIIB. Biochemistry. 34: 16046-16055.

- Montell C, Rubin GM. 1988. The *Drosophila ninaC* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. Cell 52:757-72.
- Nascimento AAC, Cheney RE, Thauata SBF, Larson RE, Moosseker MS. 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. J. Biol. Chem.132: 1053-1060.
- Oleskevich S, Clements JD, Srinivasan M.V.J. 1997. Long-term synaptic plasticity in the honeybee. J Neurophysiol. 78(1):528-32.
- Pastural, E.; Barrat, F.J.; Lagelouse, R.D.; Certain, S.; Sanal, O.; Jabado, N.; Seger, R.; Griscelli, C.; Fischer, A. and Basile, G. S. 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the Myosin-Va gene. Nat. Gen. 16:289-292.
- Pollard, T.D. e Cooper, J.A. 1982. Methodos to characterize actin filament networks. Meth. Enzymol. 85:211-233.
- Prekerris, R., and Terrian, D.M. 1997. Brain Myosin-V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{++} -dependente interaction with the sinaptobrevin-sinaptophysin complex . J. Cell Biol.,137: 1589-1601
- Provance, D.W. and Mercer, J.A. 1995. Association of dilute with melanosomes in melanocytes. Mol. Biol. Cell 6 (suplement), 146 a .
- Schoer, T. A., Bingham, J. B., Gill, S. R. 1996. Actin-related protein 1 and motility – what's the connection? Trends Cell. Biol. 6: 212-5.
- Valle, R. 1993. Molecular analysis of the microtubule motor dynein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8769-72.
- Verkhovskiy, A. B., Svitkina, T. M. e Borisy, G. G. 1995 Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. J. Cell. Biol. 131: 989-100.

- Wang, K. K., Villalobo, A., and Roufogalis, B. D. 1989. Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. Biochem. J. 262: 693-706.
- Wolenski, J. S., Cheney, R. E., Mooseker, M. S., e Forscher, P. 1995. In vitro motility of immunoadsorbed braisn myosin-V using acrosomal process and optical tweezer-based assay. J. Cell Sci. 108: 1489-1490.
- Zhao, Y., and Kawai, M. (1994). BDM affects nucleotide binding and force generation steps of the crossbridge cycle in rabbit psoas muscle fibers. Am. J. Physiol. 266: C437-447.