

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

**Identificação de Motores Moleculares em Cérebro de
Abelhas *Apis mellifera***

Camila Teixeira Mendes

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

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

**Identificação de Motores Moleculares em Cérebro de
*Abelhas *Apis mellifera****

Camila Teixeira Mendes

**Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Orientador**

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

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


Identificação de Motores Moleculares em Cérebro de
Abelhas Apis mellifera

Camila Teixeira Mendes

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 22/06/01 NOTA 100

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Biólogo Pablo Marco Veras Peixoto


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

MSc. Rosana de Cássia Oliveira

Uberlândia, 22 de junho de 2001

*Aos Companheiros do Laboratório
de Bioquímica e Biologia
Molecular – Labibi, de hoje e
sempre.*

ESCARAVELHOS

... "Há entre os coleópteros um inseto que, em pleno fulgor das belezas primaveris, só se interessa por uma coisa – o monturo.

Encontrar entre as flores dum canteiro um montículo de esterco é para ele inefável delícia.

Derramem rosas e violetas a fragância dos seus perfumes – o escaravelho só anseia pelas fétidas exalações de substâncias putrefatas. É este o seu elemento, o seu clima, o seu paraíso...

Almas mesquinhas existem que encontram intenso prazer em chafurdar na lama de escândalos e remexer latas de lixo em casa alheia.

Descobrir faltas no próximo, fazer estatísticas das fraquezas alheias e assoalha-las na mais larga publicidade – é nisto que se cifra a maior delícia dos escaravelhos humanos.

Floreça na alma do irmão um jardim de virtudes, viceje um paraíso de boas qualidades – o escaravelho descobre logo a imundície, por mais oculta e insignificante que seja.

Tão apurado é o faro do humano coprófilo que entre mil perfumes suaves distingue logo o mau cheiro da podridão que procura.

Quanto mais baixa e vil é uma alma, tanto maior o prurido de descobrir os pecados alheios para contrastarem com as virtudes próprias que julga posuir.

O homem que não “brinca de religião”, mas toma a sério aquilo em que acredita, acha ridículo reparar nas fraquezas dos outros, porque sabe que também ele tem faltas, ainda que talvez de outra natureza.

Quanto mais perfeito é um homem tanto mais indulgente é com os demais e tanto mais severo consigo mesmo. (...) Não começa a “reforma da humanidade” na casa do vizinho, mas sempre na própria casa...

Só teria o direito de condenar os outros quem fosse perfeito em todo o sentido – mas, coisa estranha! Precisamente o homem perfeito é o que menos censura os outros."...

(ROHDEN, 1980)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de explorar os mistérios contidos na natureza.

Ao Prof. Dr. Foued pela grande contribuição em minha formação científica. Obrigada pela amizade, pela liberdade de expressão, por todos ensinamentos no convívio acadêmico que contribuíram para me formar como pesquisadora e principalmente por ser um exemplo de formação científica.

Ao meu Co-orientador e amigo Pablo Marco Veras Peixoto por ser meu anjo da guarda e pelas inúmeras ajudas que tornaram possível minha formação profissional. Obrigada pela sua amizade, paciência, ensinamentos, incentivo e confiança.

À Rosana pelo interesse em fazer parte dessa banca, pela presteza, boa vontade em me auxiliar e pela valiosa contribuição na discussão desse trabalho.

Ao meu amigo André (Ceará) por me apresentar ao universo da pesquisa e com toda sua empolgação me despertar o desejo para a investigação científica.

Aos colegas do Labibi da "turma antiga", Fátima, Andreia, Lúcia, Letícia e Jair Júnior pela cooperação e pelo aprendizado não só de técnicas, mas de respeito e de convivência. E também aos novos colegas, Inez, Miguel, Juninho, Viviane, Tiago, Michel e Leonardo por criarem um ambiente agradável de convivência harmoniosa.

À todos os colegas e professores do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, em especial, às funcionárias Dona Maura e Dona Marlene pelo convívio diário.

Às minhas companheiras de graduação Gabriela, Ariane, Renata e Juliana por todos os momentos que vivenciamos juntas todos esses anos. Sem dúvida vocês também fazem parte da minha formação profissional. Compartilhamos nossos acertos e erros e aprendemos muito.

Aos meus pais, João e Jurema, e aos meus irmãos, Carol e Guilherme, com muito amor e admiração. Obrigada pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu namorado e acima de tudo meu amigo, Claudio, pelo companheirismo, amor e estímulo que sempre me dedicou.

RESUMO

Miosinas e dineínas são motores moleculares que usam a energia do ATP para gerar força para o movimento ao longo de filamentos de actina ou polímeros de microtúbulos. Dados de imunolocalização demonstraram a presença das proteínas motoras cinesina, dineína e miosinas na superfície da membrana do Golgi ou de vesículas derivada do Golgi dos fotorreceptores de *Apis mellifera*. Devido a este dado e à alta capacidade de aprendizado e memória, as abelhas constituem um modelo interessante para investigação genética e bioquímica de motores moleculares associados ao transporte intracelular polarizado de organelas e vesículas em neurônios. O objetivo do trabalho foi a identificação de motores moleculares em cérebro de operárias de *Apis mellifera* bem como o isolamento do gene de DLC em biblioteca de c-DNA do cérebro destas abelhas. O cérebro de abelhas operárias foram homogeneizados em tampão de extração de miosina-V. Os imunoblots foram revelados por quimioluminescência e detectaram a presença de miosinas V e VI e cadeias leves e intermediárias de dineínas. Os clones de cDNA codificando DLC foram isolados da biblioteca de cérebro de *A. mellifera* utilizando anticorpo policlonal de coelho que previamente detectaram esta proteína em extratos protéicos totais de cérebro da abelha. A biblioteca foi construída no vetor de expressão lambda-ZAP, principiada com *primers* de oligo-dT. Para inoculação das células hospedeiras (*E. coli* linhagem BB4), as mesmas foram incubadas com a biblioteca titulada de modo a se formarem aproximadamente 5.000 placas de lise por placa de *petri*. Isolamos os clones e procedemos a retransfecção, até que as placas de *petri* mostrassem exclusivamente clones codificando a proteína-alvo. Estes clones foram excisados do fagomídeo e amplificados por PCR. Estes resultados sugerem que os domínios reconhecidos tenham sido conservados durante a evolução, uma vez que os anticorpos foram gerados contra proteínas de vertebrados. O isolamento de clones imunoreativos mostra a expressão na biblioteca utilizada da DLC. Desse modo abre-se perspectiva para o sequenciamento do gene da cadeia leve de dineína em himenópteros. Em estudos futuros, a presença de proteínas motoras em abelhas poderiam tentar explicar a complexidade do sistema neural deste inseto.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	
1.1- Proteínas Motoras	01
1.2- Dineína	03
1.3- Cinesina	06
1.4- Miosinas	07
1.5- Miosina-V	09
1.6- Cadeia Leve de Dineína	12
1.7- Sistema Nervoso em Abelhas	14
2-MATERIAL E MÉTODOS	
2.1- Manutenção das Abelhas	16
2.2- Dissecção de Cérebro	16
2.3- Homogeneização dos Tecidos	16
2.4- Dosagem de Proteínas	16
2.5- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
2.6- Western Blot	17
2.7- Biblioteca de cDNA de Cérebro de Abelhas	18
2.8- Titulação da Biblioteca de cDNA de Cérebro de Abelhas	20
2.9- <i>Screening</i> de Biblioteca de cDNA de Cérebro de Abelhas	20
2.10- Processo de Excisão	20
2.11- Reação em Cadeia da Polimerase	22
2.12- Eletroforese em Gel de Agarose	22
3- RESULTADOS	
3.1- Detecção de Motores Moleculares	24
3.2- Presença de Clones Imunoreativos	29
3.3- Amplificação do Inseto que Expressa DLC	33
4- DISCUSSÃO	
4.1- Miosina-V, VI e Dineína estão presentes no cérebro da abelha	35
4.2- Isolamento de clones da biblioteca de cDNA de <i>Apis mellifera</i>	38
4.3- Amplificação do inserto de DLC por PCR	39
5- CONCLUSÃO	40
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1- INTRODUÇÃO

A revisão bibliográfica que se segue tem como intuito o embasamento teórico do estudo que apresentamos. Abordamos o estudo da expressão de motores moleculares no cérebro de abelhas *Apis mellifera*. Os dados aqui apresentados são inéditos para esse inseto, de modo que constantemente faremos alusões à *Drosophila melanogaster*, devido à sua proximidade filogenética com nosso modelo de estudos. Os trabalhos realizados com a mosca servem de apoio para as investigações de proteínas motoras em *Apis* e podem fornecer parâmetros comparativos da evolução funcional destas proteínas. As abelhas são consideradas paradigmas do complexo processo de aprendizagem dos insetos, principalmente por sua facilidade de mudanças entre tarefas comportamentais diferentes (HERMANN & HARTFELDER, 1998).

1.1-PROTEÍNAS MOTORAS

A capacidade que as células eucarióticas possuem de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos associados à proteínas motoras que se estendem por todo o citoplasma. Esta rede é chamada de citoesqueleto, uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, divide-se ou responde ao seu ambiente. O citoesqueleto, juntamente com proteínas motoras denominadas motores moleculares, fornece a maquinaria necessária para movimentos intracelulares. Como por exemplo, temos o transporte de organelas de um lugar a outro no citoplasma e a segregação dos cromossomos na mitose.

As proteínas motoras são mecanoenzimas capazes de hidrolizar a molécula de adenosina trifosfato (ATP) e transformar esta energia química em força para o movimento ao longo de filamentos de actina ou polímeros de microtúbulos. Essas proteínas motoras são essenciais para muitos processos celulares incluindo o movimento celular, motilidade de organelas e motilidade flagelar. Miosinas, dineínas e cinesinas são os principais motores moleculares que fazem parte da família das adenosinas trifosfatases (ATPases), cada um pertencendo a uma superfamília gênica com muitas classes distintas (RECK-PETERSON *et al.*, 2000; SELLERS *et al.*, 2000).

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos protéicos - filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os filamentos de actina consistem em uma hélice compacta de moléculas de actina polimerizadas (actina

globular ou G-actina) formando filamentos não covalentes (F-actina). Esses filamentos que se associam às miosinas por meio de um sistema de hidrólise de ATP e mudança conformacional são capazes de produzir por exemplo, a contração muscular. Os microtúbulos são polímeros rígidos formados por moléculas de tubulina, que permitem movimentos de longas distância, enquanto os filamentos de actina sustentam movimentos dirigidos a regiões locais do citoplasma, como por exemplo o domínio periférico dos cones de crescimento (actina cortical) (EVANS *et al.*, 1997; TABB *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1999). Eles se organizam pela adição, às suas extremidades livres, de moléculas de tubulina, sendo que uma das extremidades (extremidade "mais") cresce mais rapidamente que a outra (extremidade "menos"). Existem nos microtúbulos uma série de proteínas denominadas proteínas associadas aos microtúbulos (Microtubule Associated Proteins - MAPs) (OLMSTED *et al.*, 1986). Algumas dessas MAPs apresentam atividade motora ou ATPásica, entre elas, cinesinas e dineínas (FIGURA 1).

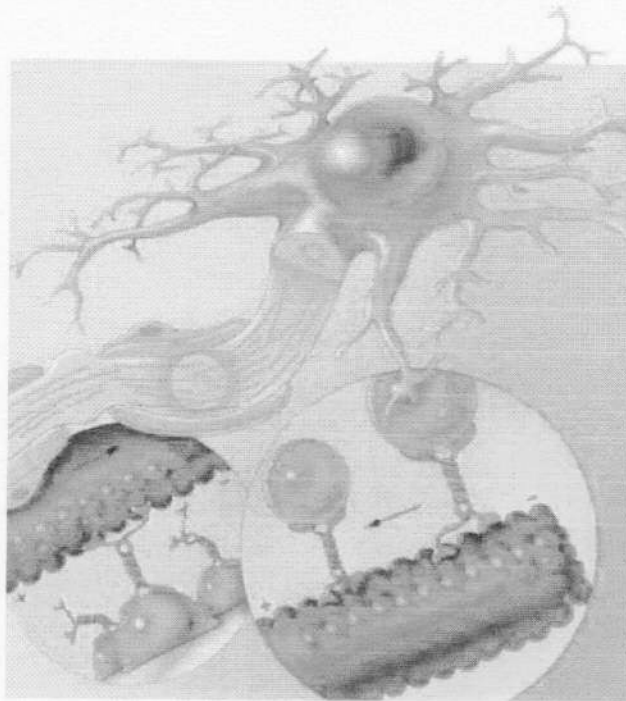


FIGURA 1 – Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAPs). As MAPs incluem cinesinas e dineínas que caminham ao longo dos microtúbulos em direções opostas. A cinesina move a vesícula na direção mais dos microtúbulos e a dineína na direção menos. Essas proteínas possuem domínios motores que se ligam aos microtúbulos e ao ATP, enquanto que o domínio motor se liga à organela para ocorrer o movimento. (<http://www.blocks.fhcr.org/~kinesin>).

A extrema polarização e o tamanho dos neurônios são pontos cruciais na sua habilidade de se comunicar a longas distancias e de formar complexos celulares no sistema nervoso. Assim o tamanho, a forma e a compartimentação dessas células tão especializadas somente são geradas e suportadas por um sistema de citoesqueleto envolvido no transporte intracelular. Um dos sistemas mais importantes é o sistema de transporte baseado em microtúbulos no qual cinesinas e dineínas geram força e dirigem o tráfego de muitos componentes celulares. Esses motores moleculares podem ser o aparato capaz de gerar algumas das propriedades únicas das células neuronais (GOLDSTEIN *et al.*, 2001).

1.2- DINEÍNAS

Dineínas são motores moleculares complexos que se translocam ao longo de microtúbulos, sendo responsáveis pelo movimento de lisossomos e endossomos, organização celular do complexo de Golgi, migração do núcleo e posicionamento do fuso mitótico (HAYS *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1994; SCHRÖER *et al.*, 1994; NURMINSKY *et al.*, 1998; MA *et al.*, 1999). Outras funções das dineínas incluem o transporte retrógrado (da extremidade do axônio para o corpo celular) de vesículas ao longo do axônio em células neuronais. Nos cílios e flagelos a dineína promove o deslize dos microtúbulos que forma a base para o batimento ciliar e flagelar (KING *et al.*, 1996). Em *Drosophila melanogaster*, está envolvida em processos como determinação e diferenciação celular durante a oogênese (MCGRAIL & HAYS, 1997), transporte e localização de ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) envolvidos na diferenciação de oocistos (DENG & LIN, 1997) e na manutenção da associação de centrossomos ao envelope nuclear durante a mitose (ROBINSON *et al.*, 1999).

Em células cancerosas a dineína citoplasmática desempenha um papel crucial no processo de divisão celular. De fato, dineína transporta os cromossomos e outros materiais para os lugares apropriados dentro da célula antes da divisão. Os estudos sobre como a dineína opera dentro da célula seriam importantes para saber como desarmar esta proteína no crescimento de células cancerosas. Estudos com a droga Taxol mostraram que esta é capaz de estabiliza os microtúbulos deixando-os incapazes de se polimerizar e despolimerizar impossibilitando a dineína de caminhar ao longo desses microtúbulos. Inativando a proteína ou mesmo seus caminhos haverá um impedimento da dineína em transportar cromossomos e, desse modo, células cancerosas não irão se dividir (BARBAR *et al.*, 2001).

O segmento carboxi-terminal da molécula forma um domínio globular que interage com microtúbulos e tem atividade motora, enquanto o segmento amino-terminal é conhecido

por ser o sítio ligante de cargas (HOLZBAUR & VALLEE, 1994). Dineína citoplasmática é composta de duas ou mais cadeias pesadas (~530kDa), três cadeias intermediárias (~74kDa), quatro cadeias leves intermediárias (~55kDa) e várias cadeias leves (de 30 a 7kDa). Cada cadeia pesada é formada por 3 regiões ou domínios principais: um domínio amino-terminal (ou cabeça globular) mais divergente, que interage com isoforma específica de cadeia leve e de cadeia intermediária; um domínio catalítico central que contém 4 motivos consensos "P-loop" e um domínio carboxi-terminal (ou cauda) que forma uma estrutura em α -hélice "coiled-coil". O primeiro loop, absolutamente conservado em todas as cadeias pesadas, é o sítio de hidrólise de ATP e os outros três, também conservados, são considerados sítios regulatórios (GIBBSONS *et al.*, 1995; PORTER *et al.*, 1996). As cadeias intermediárias e cadeias leves intermediárias estão associadas a um complexo de proteínas denominado dinactina cuja função é intensificar o processo de transporte de organelas para sítios específicos na célula. Este complexo contém dez subunidades: p150^{glued}, p135, p62, p50 (dinamitina), arp 1, actina, actina-capping subunidade α , actina-capping subunidade β , p27 e p24 (HOLLERAN *et al.*, 1998). A cadeia intermediária de 74kDa é responsável pela interação da dineína citoplasmática ao complexo dinactina associado com p150^{glued}. A p150^{glued} é uma possível ponte entre microtúbulos e filamentos de actina e pode ter uma importante função emparelhando actina e microtúbulos no citoesqueleto (VAUGHAN & VALLEE, 1995) (FIGURA 2).

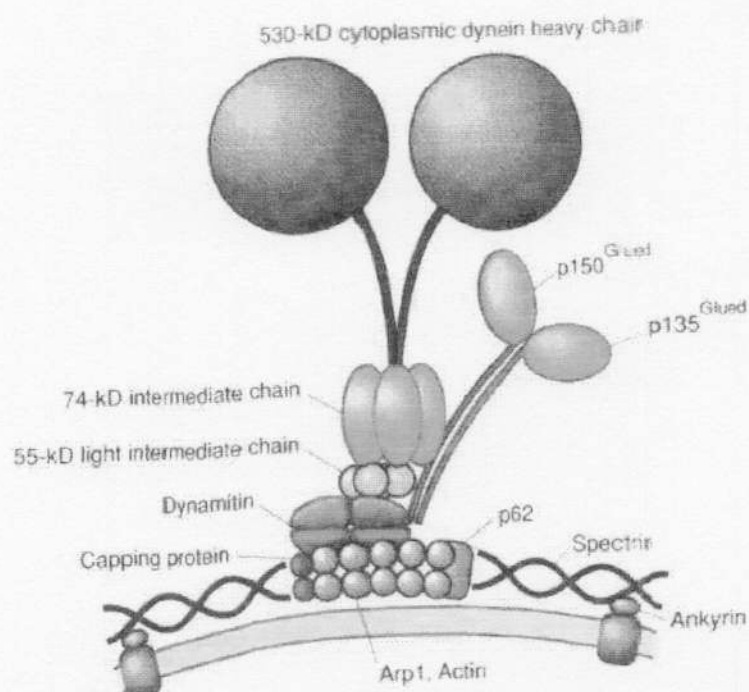


FIGURA 2 - Representação Esquemática do complexo dinactina e dineína citoplasmática (HIROKAWA, 1998).

Em *Drosophila* foram identificados 7 genes diferentes para a cadeia pesada de dineína (RASMUSSEN *et al.*, 1994). O gene para a cadeia intermediária, *Cdic*, sofre splicing alternativo gerando aproximadamente 10 isoformas estruturais, expressas de forma tecido-específico (NURMINSKY *et al.*, 1998). As variações estruturais entre as isoformas estão limitadas à região amino-terminal da proteína envolvida na interação com dinactina. A diversidade de ligações da dineína à sua organela-alvo mediada pelo complexo p150/Glued é fornecida pelo "pool" de isoformas de cadeias intermediárias presentes (NURMINSKY *et al.*, 1998).

Duas classes de cadeias leves de dineína foram identificadas. A primeira compreende uma série de proteínas diversas que associam-se diretamente com as cadeias pesadas. Esses polipeptídeos podem estar envolvidos no controle motor funcional como resposta regulatória. A segunda classe, inclui três famílias distintas, DLC, *LC7/roadblock* e *Tctex1/Tctex2* que se associam com as cadeias intermediárias da dineína em solução (DIBELLA *et al.*, 2001).

A cadeia leve de dineína de 8kDa (Dynein Light Chain - DLC) é dentre as cadeias leves conhecidas a mais estudada e caracterizada. Essa proteína interage com uma série de proteínas relacionadas a diversos mecanismos celulares, sendo umas das proteínas mais conservadas em diferentes organismos. A DLC foi primeiramente identificada como uma proteína que interage fisicamente com a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), inibindo-a (JAFFREY & SNYDER, 1996). A DLC foi também encontrada associada à miosina da classe V de cérebro de galinha (BENASHSKI *et al.*, 1997; ESPÍNDOLA *et al.*, 2000) (Esta associação será abordada mais adiante). A DLC interage também com o domínio N-terminal da proteína de controle transcricional IkappaB alfa (CREPIEUX *et al.*, 1997) e com mRNA 3'UTR do hormônio paratireóide, que é um transcrito localizado no microtúbulo do citoesqueleto (EPSTEIN *et al.*, 2000). Isto sugere que a DLC pode ter uma função na associação da miosina-V com transcritos particulares de mRNA. Recentemente foi demonstrada a interação específica entre DLC e Bim, uma nova proteína proapoptótica da família das Bcl-2 (PUTHALAKATH *et al.*, 1999). Em células sadias a formação do complexo DLC/Bim requer um grande número de proteínas Bim para a associação da dineína aos microtúbulos. Quando ocorre a estimulação apoptótica o complexo DLC/Bim se liberta dos microtúbulos e a Bim é assim liberada para neutralizar a atividade anti-apoptótica da Bcl-2

formando um heterodímero Bim/Bcl-2 (PUTHALAKATH *et al.*, 1999). A proteína pós-sináptica de 95 kDa (PSD-95) associada a proteína com domínio associado a guanilato kinase (GKAP) interage também diretamente com DLC, formando um complexo miosina-V, DLC e GKAP. A partir de leveduras tratadas com GKAP foi possível isolar uma segunda proteína, a DLC2, que apresenta 93% de identidade com a cadeia leve de dineína de 8kDa (DLC1) (NAISBITT *et al.*, 2000). Em *Drosophila*, a interação entre DLC e *Swallow* foi demonstrada como crítica para a localização assimétrica do mRNA (SCHNORRER *et al.*, 2000). Em dois lisavírus, Rabies vírus e Monkola vírus, DLC interage com a fosfoproteína (P). A alta divergência entre as seqüências dessas proteínas P (somente 46% de identidade) favorece a hipótese que esta interação é uma propriedade comum entre os lisavírus. A interação da DLC com a proteína P pode estar relacionada aos mecanismos fisiopatológicos dos rabies vírus (JACOB *et al.*, 2000).

Estudos de *screening* de duplo híbrido de levedura mostraram que DLC interage com a seqüência conservada "K/R-X-T-Q-T" em uma variedade de proteínas ligantes. O mesmo domínio também está presente na DIC de dineínas citoplasmáticas e funciona como mediador na associação da DLC e DIC no complexo dineína (LO *et al.*, 2001). Entretanto, análise das seqüências disponíveis em banco de dados (BLASTp) mostram não haver homologia óbvia entre as regiões de interação da DLC com diferentes proteínas ligantes. O que parece estar conservado nas proteínas ligantes é a conformação do domínio de interação com a DLC (FAN *et al.*, 2001). O arranjo da estrutura de DLC permite que esta proteína flexibilize sua estrutura para a interação com diferentes proteínas. Elucidar as bases moleculares das interações entre DLC e várias proteínas representa um importante passo no entendimento da função e versatilidade dessa proteína.

1.3- CINESINAS

Cinesinas, assim como dineínas, são capazes de se ligar e mover ao longo dos microtúbulos na presença de ATP. A principal distinção entre os motores de dineína e cinesina está no sentido do transporte de vesículas, enquanto que dineínas fazem o transporte retrógrado (da extremidade do axônio para o corpo celular), as cinesinas participam do transporte anterógrado em neurônios (do corpo celular para o axônio) (Como revisão ver VALLEE & SHEETZ, 1996).

Cinesinas são abundantes em todos os tipos celulares, em todos os estágios de desenvolvimento e em todos os organismos multicelulares testados. Enquanto a maioria das

cinesinas aparecem livres no citoplasma, algumas estão associadas a organelas, incluindo pequenas vesículas e retículo endoplasmático (Como revisão ver HOWARD, 1996).

Análises dos efeitos de mutações letais recessivas no gene da cadeia pesada de cinesina convencional da classe I de *Drosophila* (*Khc1*), indicam que cinesinas são necessárias para transporte axonal rápido. Antes de morrer os mutantes sofrem de uma paralisia distal progressiva. Este fenótipo é a manifestação de uma série de defeitos neuronais que se iniciam com uma interrupção no transporte axonal rápido (HURDD & SAXTON, 1996).

1.4- MIOSINAS

As miosinas são proteínas motoras que se translocam ao longo dos filamentos de actina de uma maneira dependente de ATP (BAKER & TITUS, 1998). Miosinas são tipicamente constituídas de três subdomínios funcionais: domínio motor ou aminoterminal, que interage com actina e hidroliza ATP; domínio pescoço, que se liga a cadeia leve ou calmodulina; e o domínio cauda ou carboxiterminal, que responde pelas diferentes funções das miosinas e é a região responsável pela interação com as cargas transportadas por miosinas (Como revisão ver SELLERS *et al.*, 2000). Com base na comparação das estruturas primárias do domínio motor para os genes de cadeia pesada de miosinas conhecidas, são estruturalmente distintas (Como revisão ver RECK-PETERSON *et al.*, 2000). Análises filogenéticas do domínio motor revelaram 17 classes distintas de miosinas, (Como revisão ver SELLERS *et al.*, 2000) (FIGURA 3).

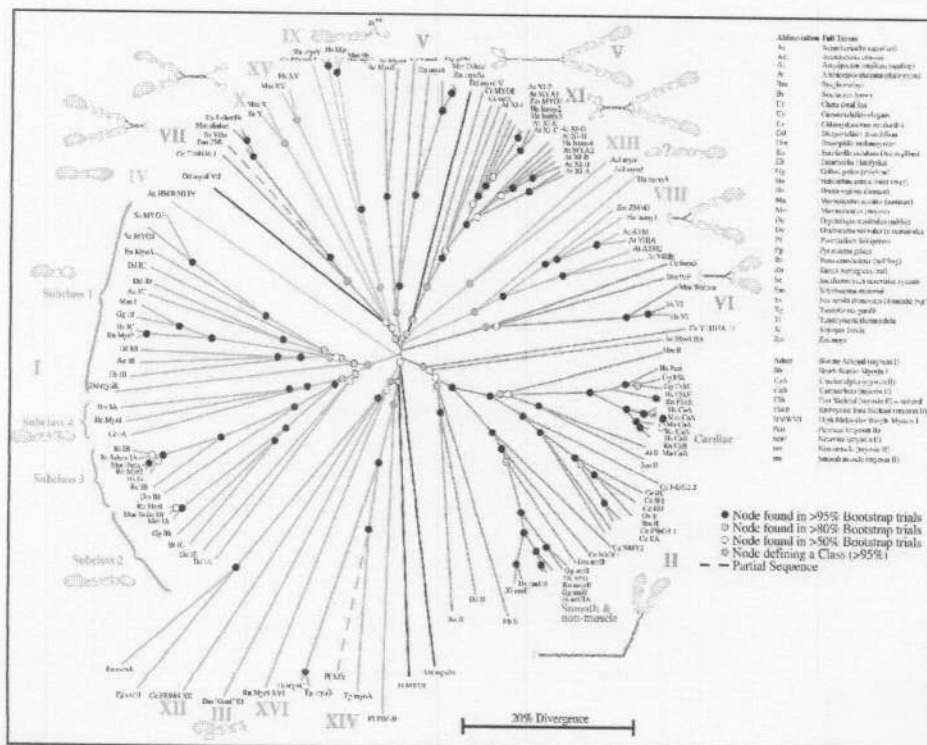


FIGURA 3 – Árvore filogenética das 17 classes de miosinas atualmente descritas.
(<http://www.mrc.lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>)

Enquanto novas classes de miosinas não convencionais são descobertas suas funções na célula ainda são bastante desconhecidas. Vários trabalhos têm tentado determinar as possíveis funções dessas proteínas. Estudos revelam a participação de miosinas no transporte de organelas e partículas de mRNA, na manutenção da arquitetura celular e no controle da dinâmica de extensões da célula ricas em actina. Miosinas também estão envolvidas na cooperação com proteínas que caminham em microtúbulos na determinação do tráfego e na distribuição de organelas. Outros estudos demonstraram a existência de complexos multimotores nas miosinas que coordenam a troca entre microtúbulos e actina e revelaram também a miosina-VI que é capaz de mover-se em sentido contrário nos filamentos de actina (WU *et al.*, 2000).

Existe uma associação física entre o domínio cauda miosina da classe V (miosina-V) e a proteína quinase dependente de calmodulina da classe II (CaMKII). A CaMKII é uma serina/treonina quinase multifuncional que fosforila um grande número de substratos e está envolvida em muitos processos celulares. Esse resultado sugere que a associação entre a miosina-V e a CaMKII envolve vários aspectos de importância funcional uma vez que essa miosina pode estar envolvida no transporte e na localização subcelular de calmodulina (COSTA *et al.*, 1998).

A miosina da classe III (NINAC) também exibe em uma região homóloga ao domínio motor uma quinase associada. A NINAC é a principal proteína ligante de calmodulina da retina de *Drosophila* e faz parte do complexo sinalizador envolvido na fototransdução (BÄHLER *et al.*, 2000). A miosina da classe IX também possui função sinalizadora. Essa proteína exibe no domínio cauda uma GTPase ativada por Rho que pertence à família das proteínas-G. Miosina-IX inativa a proteína-G Rho que atua como uma molécula chave. Assim a miosina-IX liga seu domínio motor à actina e transmite os sinais da transdução ao esqueleto de actina (BÄHLER *et al.*, 2000).

Estudos mostram que a miosina da classe VI (miosina-VI) tem papel no movimento de membranas e na endocitose, possivelmente a nível de reciclagem de membranas em células polarizadas (HASSON & MOOSEKER, 1995). É também essencial à audição em ratos e à fertilidade em moscas (AVRAHAM *et al.*, 1995; HICKS *et al.*, 1999). A mutação do gene para miosina-VI causa o fenótipo Snell's Waltez em camundongos, levando à severa perda de

audição e a disfunções vestibulares (HASSON & MOOSEKER, 1996). A recente descoberta de que a miosina-VI é a única miosina que se dirige à extremidade menos dos filamentos de actina (extremidade de crescimento lento) motor reverso, permite a possível existência de um novo mecanismo de motilidade celular (WELLS *et al.*, 1999).

O acesso à seqüências gênicas de humanos, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Dictyostelium discoideum* permitiram definir e comparar as regiões que codificam miosinas nesses organismos (BERG *et al.*, 2001). Em humanos foram encontrados 40 genes para miosinas incluindo duas novas miosinas da classe I, três novas miosinas II (miosina convencional), um segundo membro das miosinas da classe III (NINAC), um gene similar a miosina da classe IX e uma nova miosina que possui 33% de identidade com outros membros da superfamília (BERG *et al.*, 2001).

A partir do conhecimento do genoma da *Drosophila melanogaster* foram identificadas novas miosinas e confirmadas a presença das miosinas das classes I, II, V, VI e VII já identificadas nesse organismo. Três novas proteínas foram identificadas como novas miosinas não convencionais, duas pertencem à classe XV e uma à XVIII. Outras seqüências parciais parecem ser miosinas, porém não se encaixam a nenhuma classe específica. No futuro, análises genômicas comparativas irão auxiliar a categorização correta dessas miosinas em novas classes (YAMAHAITA *et al.*, 2001).

1.5- MIOSINA-V

A miosina não convencional da classe V é conservada de leveduras a cérebro de mamíferos, sendo uma das proteínas mais abundantes nos neurônios (ESPREADICO *et al.*, 1992; LANGFORD & MOLYNEAUX, 1998). Miosina-V é uma proteína motora processiva que possui múltiplas funções na célula que variam desde transporte de mRNA, polaridade da célula até transporte de membranas. Em leveduras a miosina-V está envolvida na herança vacuolar, exocitose e na polarização dos cones de crescimento. Já em camundongos a miosina-V possui várias funções incluindo transporte de melanossomos e de retículo endoplasmático rugoso em neurônios (Como revisão ver RECK-PETERSON *et al.*, 2000).

Atualmente existem nove seqüências completas da cadeia pesada de miosina-V. Análises do genoma completo de leveduras revelaram dois genes que expressam miosina-V, o *MYO2* e o *MYO4*, que apresentam funções distintas. A seqüência completa do DNA

complementar (cDNA) ao gene da miosina-V, inclui o produto do gene *dilute* em camundongo, p190 de cérebro de galinha (90% de identidade com o gene *dilute*), *didum* de *Drosophila*, e *myr6* em rato. Organismos nos quais a seqüência parcial de miosina-V foi determinada incluem lula e sapo. Três genes humanos para miosina-V foram parcialmente clonados e seqüenciados (Como revisão ver RECK-PETERSON *et al.*, 2000). Em vertebrados existem pelo menos três subclasses distintas de miosina-V. A seqüência da cadeia pesada mais relatada que é encontrada em cérebro de galinha, no gene *dilute* de camundongo e em humano é a miosina-Va. A miosina-V de rato *myr6* representa a seqüência completa da miosina-Vb, mas existem seqüências parciais de miosina-Vb encontrada em murinos e humanos (HUANG *et al.*, 1990). A terceira é a miosina-Vc encontrada em humanos (RODRIGUEZ *et al.*, 1998). A comparação do mRNA da miosina-Va, miosina-Vb e miosina-Vc mostrou que as três isoformas são expressas diferencialmente, entretanto resta saber se exercem funções distintas dentro da célula.

O estudo de mutações no gene da miosina-V fornece evidências sobre a bioquímica, biofísica e função celular dessa classe de proteínas motoras. Mutações identificadas nos genes responsáveis pela expressão de miosina-V em camundongos, revelaram que defeitos na transferência de grânulos de melanina dos melanócitos para os queratinócitos podem levar a distúrbios fenotípicos (MERCER *et al.*, 1991 e PASTURAL *et al.*, 1997). Esse fenótipo é conhecido como *dilute* e caracteriza-se pelo clareamento de sua pelagem. No camundongo *dilute*, o retículo endoplasmático não se estende até os dendritos e isso pode romper a regulação de Ca^{++} intracelular e resultar em crises convulsivas observadas nestes animais (TAKAGISHI *et al.*, 1996; DEKKER-OHNO *et al.*, 1996). Estudos de imunofluorescência mostraram que miosina-V colocaliza parcialmente com melanossomos e retículo endoplasmático (PROVANCE *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1997).

Miosina-V foi identificada como uma organela motora com funções importantes nos neurônios. Essa miosina é expressa abundantemente na densidade pós-sináptica do hipocampo, interagindo com proteínas envolvidas na plasticidade sináptica. Estudos fisiológicos do hipocampo em camundongos *dilute* testaram a hipótese de que miosina-V desempenha um papel importante na transmissão sináptica. As sinapses dos camundongos mutantes pareceram com funções normais. Isto sugere que miosina-V não é essencial para a maquinaria sináptica, composição de receptores pós-sináptico ou plasticidade sináptica, mas

não exclui o papel significativo das muitas classes de motores moleculares e a falta de um poderia ser superada por outro motor (SCHNELL & NICOLL, 2001).

A correta localização dos melanossomos na periferia da célula é mediada por Rab27a interagido com a proteína motora miosina-V. A família das Rab GTPases funciona na sinalização de vesículas intracelulares durante o tráfego de membranas (BAHADORAN *et al.*, 2001). Rab27a serve para capacitar a miosina-V na captura de melanossomos e levá-los até aos microtúbulos da periferia. Esses resultados sugerem que Rab27a serve como um receptor de miosina-V e as Rab GTPases funcionam como reguladoras do tráfego intracelular de membranas (WU *et al.*, 2001). Rab27a tem implicações em uma série de doenças como por exemplo a Síndrome de Griscelli em humanos. Esta doença foi associada com mutações no gene da miosina-V presente no cromossomo 15q21 (GRISCELLI *et al.*, 1978 e PASTURAL *et al.*, 1997). Mas atualmente descobriu que as implicações neurológicas da Síndrome de Griscelli pode ser devido a mutações no gene da miosina-V enquanto que as implicações imunológicas são devido as mutações no gene RAB27 (MÉNASCHE *et al.*, 2000). Trata-se de uma doença autossômica recessiva caracterizada por imunodeficiência grave e albinismo parcial com diluição da pigmentação, a exemplo do fenótipo *dilute* no camundongo, por causa do acúmulo de melanossomos nos melanócitos. O camundongo *dilute* é portador de mutações para Rab27a e no loci MyoVa. Miosina-V coimunoprecipita com Rab27a em extratos de melanossomos e ambos Rab27a e miosina-V colocalizam na face citoplasmática e periférica de melanossomos em melanócitos do mutante. Este resultado mostra que Rab27a é necessária para o abastecimento de miosina-V na célula (HUME *et al.*, 2001).

A purificação e a caracterização de miosina-V de cérebro de galinha revelaram que esse motor dirige-se para a porção *barbed-end* do filamento de actina. A molécula de miosina-V é formada por um dímero de duas cadeias pesadas (aproximadamente 190 kDa) que possuem atividade Mg^{2+} ATPase. Essas cadeias pesadas estão divididas em 3 regiões ou domínios: domínio motor ou amino terminal, altamente conservado, contendo os sítios ligantes de actina e ATP, o domínio pescoço ou regulatório, contendo 6 motivos IQs (repetições de 24-30 aminoácidos) ligantes da cadeias leves, entre elas a calmodulina (4-5 calmodulinas por cada molécula de cadeia pesada) e as cadeias leves de 17 e 23 kDa e o domínio cauda ou carboxi terminal no qual se liga a carga a ser transportada, podendo estar envolvido nos eventos de localização celular (CHENEY *et al.*, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 1996; HASSON & MOOSEKER, 1996) (FIGURA 4).

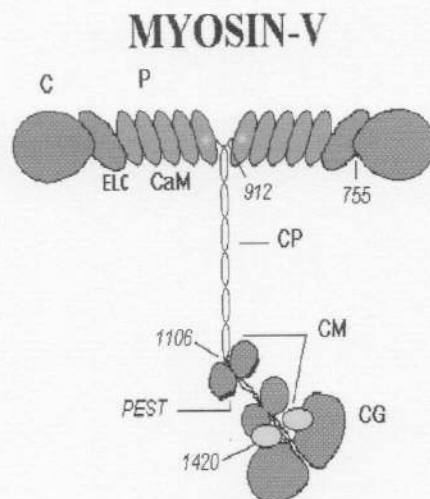


FIGURA 4 - Modelo Estrutural da Miosina da Classe V de Cérebro. C = região cabeça; P = região pescoço; ELC = cadeia leve essencial; CaM = calmodulina; CP = cauda proximal; CM = cauda medial; CG = cauda globular. Os números indicam as posições dos resíduos de aminoácidos nas junções entre os domínios (LARSON, 1996).

1.6- CADEIA LEVE DE DINEÍNA

Estudos de identificação e seqüenciamento parcial mostraram que a miosina-V de cérebro de galinha mostraram que além de calmodulina, cadeias leves de 17kDa e 23kDa homólogas às cadeias leves essenciais de miosina-II associa-se a uma cadeia leve de 10 kDa (ESPÍNDOLA *et al.*, 2000 e BENASHSKI *et al.*, 1997). Resultados da análise da seqüência de três peptídeos da cadeia leve de 10 kDa da miosina-V exibiram 85-100% de homologia com a cadeia leve de dineína (DLC) de *Chlamydomonas reinhardtii* (ESPINDOLA *et al.*, 2000). Outros homólogos também foram encontrados em leveduras, *Drosophila*, *Schistosoma mansoni*, e em alguns vertebrados incluindo rato, bovinos e humanos.

Mutações no gene da cadeia leve de dineína (DLC) e de miosina-V mostraram que DLC é essencial para a funcionabilidade da dineína citoplasmática no transporte intracelular retrógrado em *Chlamydomonas sp*, na migração nuclear e localização do complexo motor em *Aspergillus sp* (BECKWITH *et al.*, 1998). Mutações em *Drosophila sp* levam a uma alteração na trajetória do axônio, esterilidade das fêmeas, defeitos morfogênicos e morte apoptótica da célula (DICK *et al.*, 1996 e PHILIS *et al.*, 1996). Entretanto, a mutação da primeira cadeia leve de dineína não metazoária identificada em levedura *Saccharomyces cerevisiae* não provocou nenhuma alteração no crescimento vegetativo nas células de levedura (DICK *et al.*, 1996), sugerindo que esta cadeia leve pode desempenhar diferentes funções nas células eucarióticas, de acordo com a escala evolutiva.

Ensaio de ligações covalentes cruzadas de dineína e miosina-V usando 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (DFDNB) revelaram que DLC existe como um dímero *in situ* (BENASHSKI *et al.*, 1997). Em um monômero está presente uma molécula altamente polarizada possuindo em uma das partes um par de alfa hélices, e na outra, ligações hidrofóbicas do tipo beta pregueada. No outro monômero estão presentes dois peptídeos que se ligam à óxido nítrico sintase (FIGURA 5).

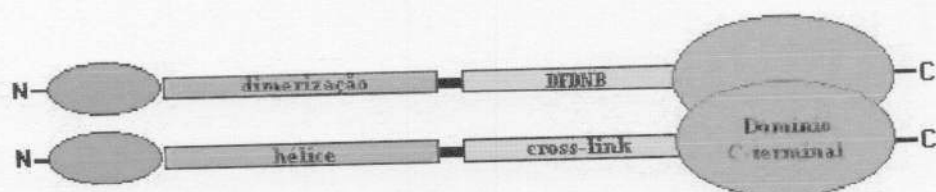


FIGURA 5 - Estrutura Dimérica da Cadeia Leve de Dineína. Dímeros paralelos com resíduos 14-32 formando interfase de dimerização e DFDNB nos resíduos 34-46. O segmento N-terminal contribui para a estabilização.

Ensaio de digestão da miosina V de cérebro de galinha com calpaína demonstram uma associação da DLC com o domínio cauda de miosina-V. Baseado nos estudos da estrutura, uma possível função da DLC seria a de estabilizar a interação cadeia pesada-cadeia pesada com a cauda globular de miosina-V (ESPINDOLA *et al.*, 2000).

Em invertebrados, já foram identificadas proteínas da superfamília de miosinas em organismos como *Dictyostelium*, *Acanthamoeba*, *Plasmodium falciparum*, *Caenorhabditis elegans*, *Loligo pelae*, *Drosophila* entre outros (BAKER & TITUS, 1997; MERMALL *et al.*, 1998; BONAFÉ & SELLERS, 1998; MOLYNEAUX *et al.*, 2000; COHEN, 2001). A árvore filogenética construída a partir do alinhamento de seqüências conhecidas para miosina-V mostra que a miosina-V de lula (p196) está mais relacionada à miosina-V de vertebrados (camundongo *dilute*, galinha, Myr 6 de rato e Myo V de humanos) que à miosina-V de *Drosophila* e levedura (COHEN, 2001).

1.7- SISTEMA NERVOSO EM ABELHAS

As primeiras *Apis mellifera* européias foram introduzidas no Brasil em 1839 pelo padre Antônio Carneiro. As africanas foram trazidas em 1956 pelo professor Warwick Estevan Kerr. Assim, nesse trabalho estudamos as abelhas resultantes de cruzamentos entre as abelhas européias com as africanas. A *Apis mellifera* é uma das espécies de abelhas mais conhecidas e estudadas, principalmente por sua grande importância econômica. Delas são extraídos o mel, a cera, a geléia real, a própolis e outros subprodutos.

As abelhas possuem um sistema nervoso central simples e grande capacidade de aprendizagem. Esse sistema nervoso é composto de um cérebro e um cordão nervoso ventral, fornecendo um bom modelo para o estudo dos mecanismos básicos de formação de memória (OLESKEVICH *et al.*, 1997). O cérebro não é um órgão tão importante para os insetos como o é para um animal vertebrado. A sua perda apenas priva o inseto dos sentidos ocular e antenal, abolindo as reações motoras que dependem de estímulos vindos dos olhos e antenas. No entanto, algumas ações como caminhar e voar podem ser feitas automaticamente sob controle dos corpos ganglionares (SNODGRASS, 1956).

Os corpos pareados em forma de cogumelo do cérebro são geralmente considerados o principal centro de memória, de associação e de tomada de decisão (KAMIKOUCHI *et al.*, 1998). Estudos de aprendizagem em *Apis mellifera* e *Drosophila* fornecem linha convergente de evidências de que os corpos de cogumelos (Mushroom Bodies - MB) são importantes para a formação da memória olfatória no cérebro de inseto.

Os MB das abelhas operárias são caracteristicamente mais desenvolvidos quando comparados com os de outros insetos. A relação do volume do MB para o corpo da operária é cerca de 12% maior quando comparamos com aqueles de *Musca domestica* (mosca) e

Schistocerca gregaria (gafanhoto) cuja relação é de apenas 2% (KAMIKOUCHI *et al.*, 1998). Assim as abelhas podem formar uma memória olfatória de longa duração associativa após uma triagem de aprendizagem (OLESKEVICH *et al.*, 1997).

Algumas evidências mostram que os MB de invertebrados equivalem ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem espacial (CAPALDI *et al.*, 1999). Mudanças na função sináptica comparáveis àquelas vistas na potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo também têm sido demonstradas nos corpos de cogumelo (OLESKEVICH *et al.*, 1997). Ainda, tanto hipocampo quanto corpos de cogumelo são caracterizados por elevados níveis de produtos gênicos relacionados à aprendizagem (DAVIS, 1993).

Mutantes de *D. melanogaster* com defeitos na aprendizagem olfatória apresentam MB anatomicamente anormais ou um padrão alterado de expressão de genes em seus neurônios, evidenciando mais uma vez o papel dessas estruturas nos processos de memória e aprendizagem (CAYRE *et al.*, 1998).

Os fotoreceptores de abelhas apresentam uma estrutura de citoesqueleto formada por microtúbulos e filamentos de actina. Estudos de imunolocalização nestas células fotoreceptoras revelaram que as membranas do complexo de Golgi estão embebidas nos microtúbulos e que as cisternas do Golgi associadas ao retículo endoplasmático têm numerosos filamentos de actina em sua periferia. Assim, é possível que vesículas derivadas do Golgi sejam transportadas por motores como miosinas até a região de microvilosidades e aquelas vesículas-alvo para sinapses tenham motores baseados em microtúbulos presentes em sua superfície (BAUMANN, 1998).

Neste trabalho procurou-se investigar a presença de miosina-V e VI, dineína citoplasmática e DLC no cérebro de abelhas *Apis mellifera*. A caracterização molecular parcial e bioquímica da DLC foi desenvolvida na tentativa de adicionar novos conhecimentos e propriedades dessa proteína no organismo modelo estudado.

Decifrar o código genético da DLC de abelhas nos disponibilizará importantes ferramentas para o estudo da participação desta proteína nos processos celulares de formação de memória e aprendizado olfatórios, nos quais nos atrevemos supor que ela esteja envolvida. Para a realização deste trabalho, dispomos de anticorpos que reconhecem DLC em extratos de cérebro de abelhas. Dispomos ainda de uma biblioteca de cDNA de cérebro de *A. mellifera*, gentilmente cedida pelo Dr. Robert Gene, University of Illinois.

2.- MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas abelhas operárias de *Apis mellifera* fornecidas pelo Apiário Girassol Ltda. (Uberlândia - MG). As abelhas foram coletadas no momento da saída para o vôo, na porta de entrada das colônias.

2.1- Manutenção das abelhas:

As abelhas foram mantidas em temperatura ambiente com umidade e disponibilidade de alimento. Em seguida foram anestesiadas com gás carbônico para facilitar o manuseio.

2.2- Dissecção de cérebro: (IMAI *et al.*, 1988)

As abelhas foram fixadas com auxílio de alfinetes entomológicos em placa de *Petri* contendo cera. Adicionou-se quantidade de água destilada suficiente para cobrir o material e facilitar o processo de remoção da estrutura alvo. A remoção da estrutura anatômica interna foi feita com auxílio de pinças e mini-tesouras de precisão previamente esterilizados. Após a remoção dos tecidos de interesse, estes foram colocados em nitrogênio líquido e posteriormente estocados em freezer -80°C .

2.3- Homogeneização

O tecido da abelha (10 cérebros) foi transferido diretamente para o tampão de homogeneização (40 mM HEPES pH 7.7, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM benzamidina, 100 μM aprotinina e 0,5 mM PMSF) resfriado e homogeneizado com a microssonda (Omini-mixer). Uma amostra do homogeneizado foi retirada e o restante do volume foi centrifugado a 40.000g por 40 minutos a 4°C . À seguir ressuspendeu-se o sedimento com o mesmo volume de tampão de homogeneização. Amostras do sobrenadante e sedimento foram retiradas para dosagem de proteínas e para eletroforese. Aliquotas para uso foram estocadas a -20°C .

2.4- Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas na fração foi determinada pelo método de BRADFORD, 1976 com base no princípio da ligação proteína corada, tendo como padrão a soro albumina bovina. As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância foi medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas das frações foi feita curva padrão de soro albumina bovina em concentrações crescentes variando de 5 a 30 μg . A concentração de proteínas em

mg/ml foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos à partir da curva-padrão.

2.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A análise do perfil de polipeptídeos foi feita usando o sistema descontínuo descrito por LAEMMLI & FAVRE, 1973 e o sistema de placas de vidro descrito por STUDIER, 1973. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita em placas de vidro de dimensões 7,1 x 10 x 0,075 cm apresentando um empilhamento de 3 % e um gel de separação com gradiente de 5 a 22%. As amostras para SDS-PAGE foram preparadas na proporção de 10:1, em volume de fração e tampão "TA 10 X" (Tris- HCl 31.2 mM, SDS 8.75%, sacarose 20%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.25%, EGTA 11 mM), respectivamente. Utilizou-se como tampão do eletrodo Tris 25mM, 1.95 mM de EDTA, Glicina 192.5 mM, SDS 0.75%.

As separações eletroforéticas foram conduzidas com amperagem constante de 30 mA, por um tempo médio de 60 minutos. Após a corrida, os géis foram corados pelo método descrito por WEBER & OSBOURN, 1969. Os géis foram descorados em solução de metanol a 30 % e ácido acético a 10%, e armazenados em solução de ácido acético a 7 %.

Os padrões de massa molecular SDS-6H (Sigma)- cadeia pesada da miosina II de músculo de coelho (205 kDa), β -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa) e SDS-7B- α 2 macroglobulina (180 kDa), β -galactosidase (116 kDa), frutose 6 fosfato (84 kDa), piruvato quinase (58 kDa), fumarose (48,5 kDa), lactato desidrogenase (36,5 kDa) e trisifosfato isomerase (26,6 kDa) .

2.6- Western Blot

As proteínas separadas em gel foram eletrotransferidas em corrente constante de 100mA por 12 horas para membrana de nitrocelulose utilizando como tampão de transferência Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (TOWBIN *et al.*, 1979). A retenção da cadeia leve de 10 kDa foram maximizadas pela incubação das membranas nitrocelulose (0,2 μ M) com 0,2% de glutaraldeído em TBS por 30 minutos a 45V, seguido por duas lavagens com TBS antes do bloqueio dos sítios inespecíficos. Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau 5% em ácido tricloroacético 0,3%. Para bloqueio dos sítios inespecíficos a membrana foi incubada em leite em pó

desnatado 5% preparado em TBS-T (Tri-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, TWEEN-20 0,05%) por um período mínimo de uma hora. A seguir, as membranas foram lavadas (3 x 5 minutos cada) em tampão TBS-T para remoção da solução anterior. A seguir procedeu-se da seguinte forma:

1 - Incubação com anticorpo primário por 12 horas; 2 - lavagem com TBS-T durante 15 por três vezes; 3 - incubação com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora; 4 - lavagem com TBS-T durante 10 minutos por três vezes.

Anticorpos primários utilizados: Anti-cabeça e anti-cauda de MV foram obtidos utilizando-se soro de animais imunizados contra proteínas de fusão desses domínios expressos em bactérias, (SUTER *et al.*, 2000), anti cauda de MVI, anti cadeia intermediária de dineína (anti-DIC) e anti-DLC8 - policlonal-coelho (Gentilmente cedido pelo Dr. Steven M. King - University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut). O anticorpo Secundário utilizado foi Anti-IgG coelho - conjugado com peroxidases ou fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim; Amersham - Pharmacia-Biotech).

A revelação por quimioluminescência utilizou o Kit ECL (Amersham-Pharmacia-Biotech). A revelação por método cromogênico utilizou NBT/BCIP na proporção de 2:1 diluído e tampão AP (0.1M de Tris, 0.1M de NaCl, 5mM de MgCl₂).

2.7- Biblioteca de cDNA de cérebro de abelha.

A biblioteca de cDNA de cérebro sem o lobo ótico de *A. mellifera* foi construída no vetor de expressão Lambda-ZAPII, principiada com *primers* de oligo-dT (FIGURA 6). Os cDNAs foram protegidos por metilação, adaptados ao adaptador EcoRI do sítio de clonagem múltipla (MCS - Multiple Cloning Site) do vetor. Essa biblioteca foi gentilmente cedida pelo Dr. Gene Robinson, University of Illinois USA.

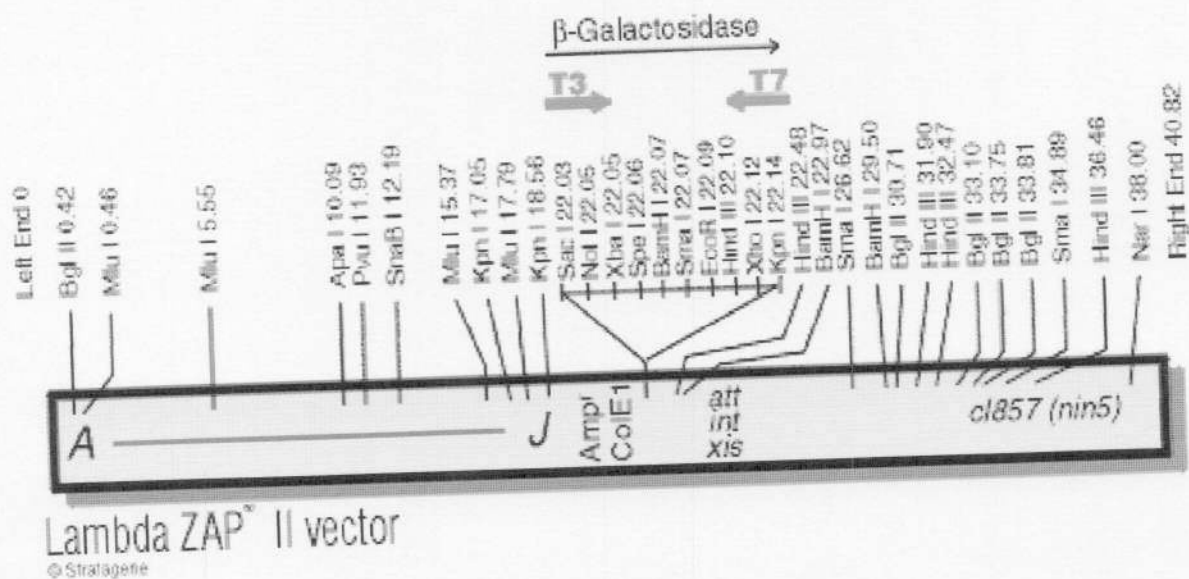


FIGURA 6 : Representação Esquemática dos Sítios de Restrição do Vetor Lambda Zap II.

2.8- Titulação da biblioteca de cDNA de cérebro de abelha

As diluições da biblioteca foram feitas em tampão Sulfato de Magnésio (*per Liter*: 5.8 de NaCl, 2g de MgSO₄, 50ml de Tris-HCl, 2% de gelatina) nas seguintes proporções: 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000, 1:100000, 1:200000, 1:1000000. Uma alíquota de 100µl foi retirada dos tubos já diluídos e incubada com bactérias *Escherichia coli* de linhagem BB4 na leitura OD₆₀₀ de 0.5 durante 15 minutos a 37°C. Em seguida adicionou-se 3ml do meio NZY top ágar (*per Liter*: 5g de NaCl, 2g de MgSO₄, 5g de extrato de levedura, 10g de caseína, 0.7% de agarose) e despejou em placas de *petri* contendo meio NZY ágar (*per Liter*: 5g de NaCl, 2g de MgSO₄, 5g de extrato de levedura, 10g de caseína, 15g de ágar). Verificou-se a partir de duas horas a formação de placas de lise. A placa da diluição de 1: 1000000 foi a única que foi possível contar o número de placas de lise que foram calculadas de acordo com a equação: número de placas de lise X diluição = x 10ⁿ P.F.U.(Unidade Formadora de Placa), resultando em 5.10⁸ P.F.U.

2.9- Screening da biblioteca de cDNA de cérebro de abelha (Stratagene).

Os clones de cDNA codificando proteínas motoras foram isolados da biblioteca de cérebro de *A. mellifera* utilizando anticorpos policlonais de coelhos que previamente detectaram estas proteínas em extratos protéicos totais de cérebro da abelha. Para inoculação das células hospedeiras *Escherichia coli* de linhagem BB4, as mesmas foram incubadas com a biblioteca titulada de modo a se formarem aproximadamente 5.000 placas de lise por placa de *petri*. Em cada placa de *petri* foi colocada uma membrana de nitrocelulose de 2µm já embebidas no fator de transcrição IPTG, para a transferência das proteínas do fago para a membrana. As membranas de nitrocelulose após seis horas de transferência foram submetidas às mesmas etapas de Western Blot (seção 2.6). As placas de lise imunoreativas foram visualizadas com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina e se procedeu a reação de detecção de acordo com as recomendações do fabricante (Promega Biotec, Madison, WI). Após o isolamento dos primeiros clones, os mesmos foram utilizados para infectar novas células hospedeiras, e o procedimento se repetiu até a obtenção de clones totalmente isolados, e que apresentaram fenótipo adequado (grandes, circulares e bem evidentes).

2.10- Processo de Excisão (Stratagene)

Em um tubo foram incubadas bactérias hospedeiras XL1-Blue, o clone isolado do item anterior, e o Helper Phage R408 a 37°C por 15 minutos. Um controle negativo também foi

feito com apenas bactérias XL1-Blue e o Helper Phage R4058 sem nenhum clone. Em seguida foi adicionado 5 ml de meio de cultura 2XYT e novamente incubado 4-6 horas a 37°C com agitação. Os tubos foram aquecidos a 70°C por 20 minutos para a morte das bactérias hospedeiras, em seguida foi centrifugado 1000xg por 5 minutos. O sobrenadante contém o p-Bluescript phagemid empacotado na porção f1 do fago. O p-Bluescript phagemid foi incubado novamente com bactérias XL1-Blue a 37°C por 15 minutos. Depois foram plaqueadas com meio LB-ágar contendo tetraciclina e ampicilina (ambas na concentração de 10mg/ml) e mantidas a 37°C por 12 horas. As colônias que surgiram foram em seguida mantidas em 150µl de meio 2XYT com ampicilina por 12 horas a 37°C (FIGURAS 7 e 8).

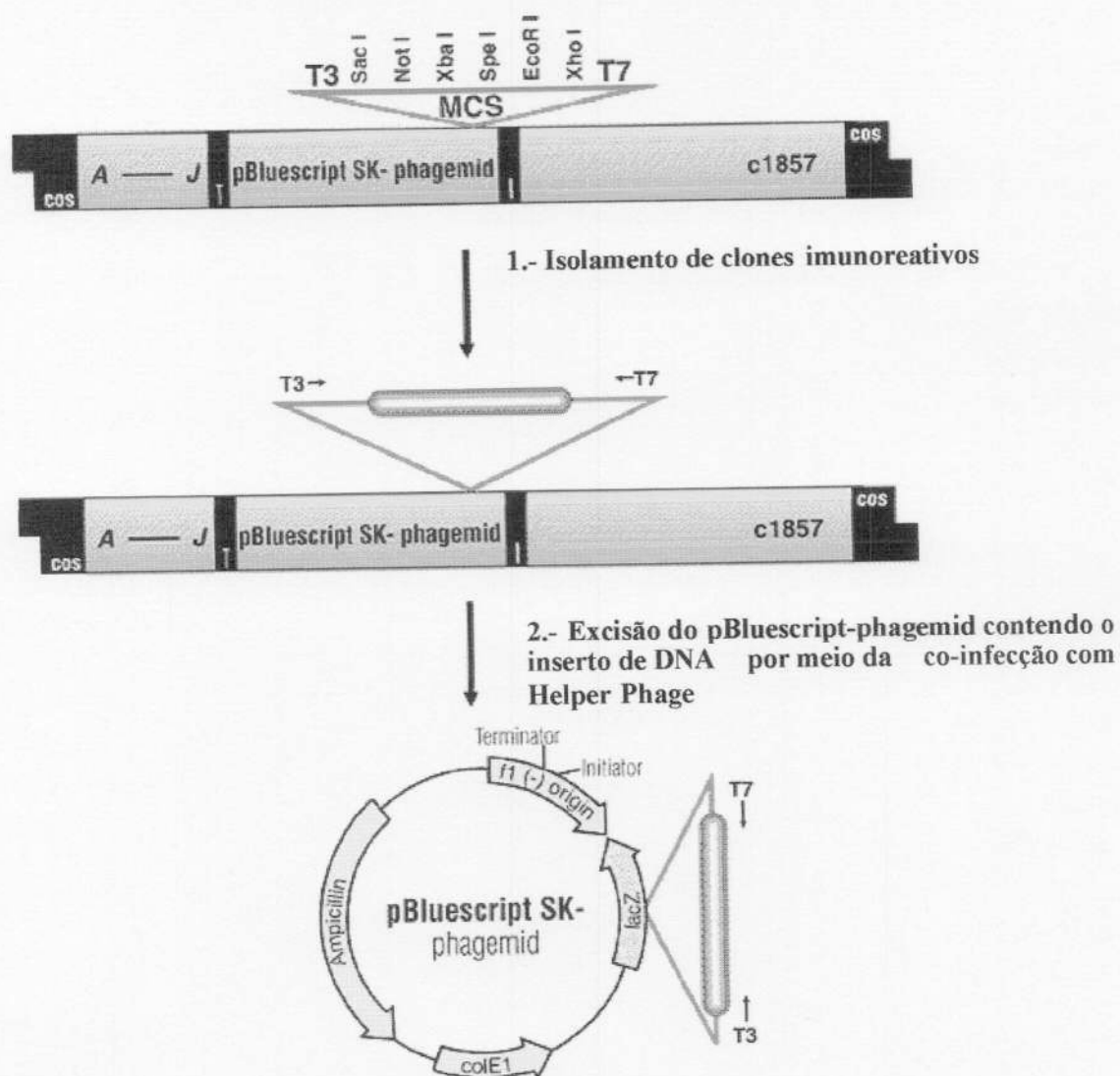


FIGURA 7 : Representação Esquemática do Processo de Excisão do Possível Clone de DLC.

2.11- Reação em cadeia da polimerase (PCR).

As reações de amplificações constaram de tampão Taq 10x concentrado, dNTPs 400 μ M, MgCl₂ 2mM, *primers* 8pmoles/ μ l, Taq 1U/ μ l e volume final completado com água ultrapura para 20 μ l. Esta mistura foi dividida em quatro tubos, três contendo diferentes alíquotas da cultura preparada no item anterior (1.0 μ l, 1.5 μ l, 2.0 μ l). Foi feito um controle negativo de reação, com ausência de DNA para verificar a presença de fragmentos contaminantes. Em seguida os tubos foram submetidos a 35 ciclos com uma desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos.

2.12- Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. Foi aplicado no gel a amostra (produto do PCR) misturada com Loading Buffer. Utilizou-se o padrão de peso molecular Ready Loading (Gibco) 1kb. As separações eletroforéticas foram conduzidas com voltagem constante de 100V, por um tempo médio de duas horas em tampão (TBE 0.5x). Após a corrida o gel foi analisado e fotografado em luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação UDS (Pharmacia).

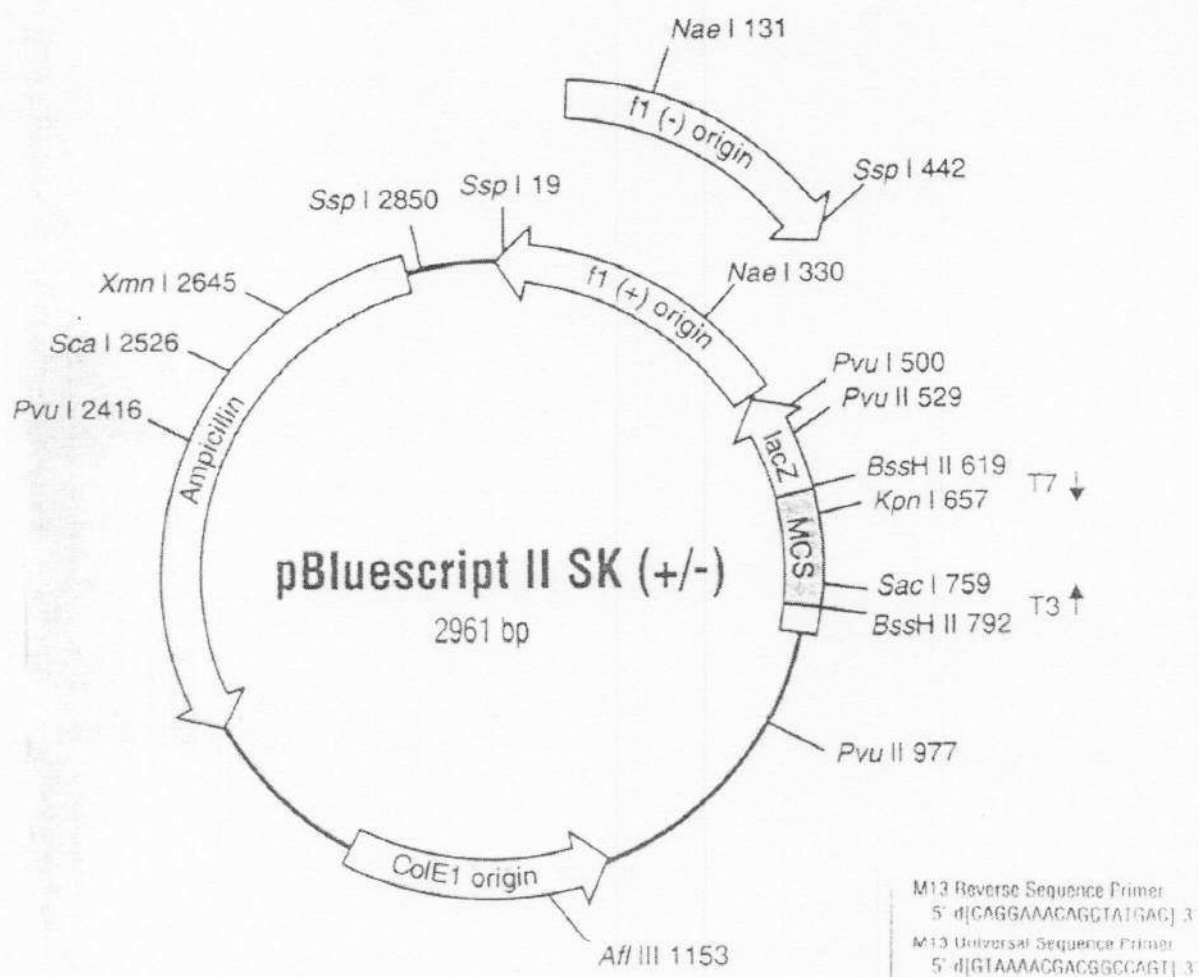


FIGURA 8 : Representação Esquemática do pBluescript-phagemid.

3- RESULTADOS

3.1- Detecção de Motores Moleculares

A fim de determinar a presença de motores moleculares em abelhas, foram homogeneizados cérebros de operárias de *Apis mellifera*. O tampão utilizado na homogeneização dos tecidos é específico para a extração de miosina-V, a qual permanece na fração solúvel, na presença de ATP (CHENEY *et al.*, 1998). As amostras do homogeneizado após a centrifugação foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (FIGURA 9).

Para detectar a presença de motores moleculares em *Apis mellifera* foram aplicadas uma mesma quantidade de proteínas em gel SDS-PAGE e transferidas para filtro de nitrocelulose através de Western blot. Em seguida esse filtro foi imunomarcado com anticorpos específicos. Desse modo, foi possível detectar a presença dos domínios cabeça e cauda globular (FIGURA 10) de miosina-V no cérebro de abelha. Marcação semelhante obtivemos nas amostras de sobrenadantes de cérebro de *Apis mellifera* incubadas com anticorpo contra o domínio cauda de miosina-VI (FIGURA 10).

As imunodeteccões de cadeia intermediária e cadeia leve de dineína foram possíveis utilizando respectivamente o anticorpo monoclonal anti-DIC e anticorpo policlonal anti-DLC (FIGURA 11). Utilizando a técnica cromogênica de revelação de imunoblots com NBT/BCIP (fosfatase alcalina), também foi possível a imunomarcção de DLC na fração sobrenadante de cérebro de *Apis mellifera* (FIGURA 12).

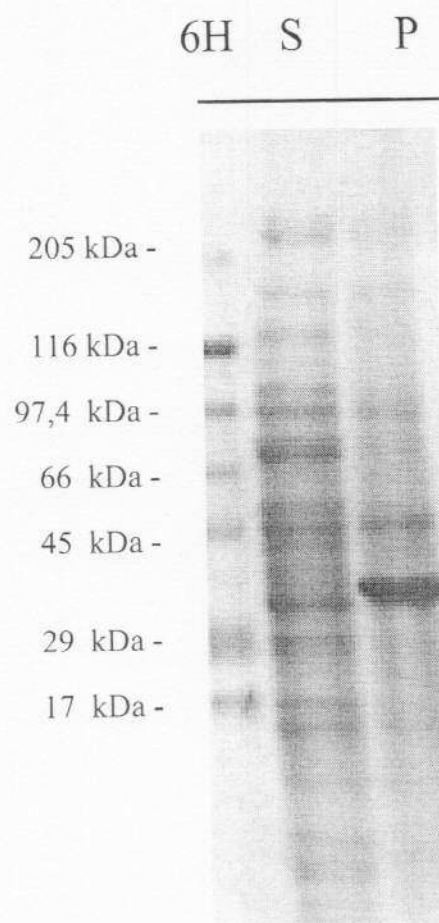


FIGURA 9: Perfil Eletroforético das Frações Sobrenadante e Sedimento do Cérebro de *Apis mellifera*. 6H é o padrão de massa molecular; S corresponde à fração sobrenadante e P à fração sedimento. As alíquotas aplicadas estavam a 20 μ g/poço.

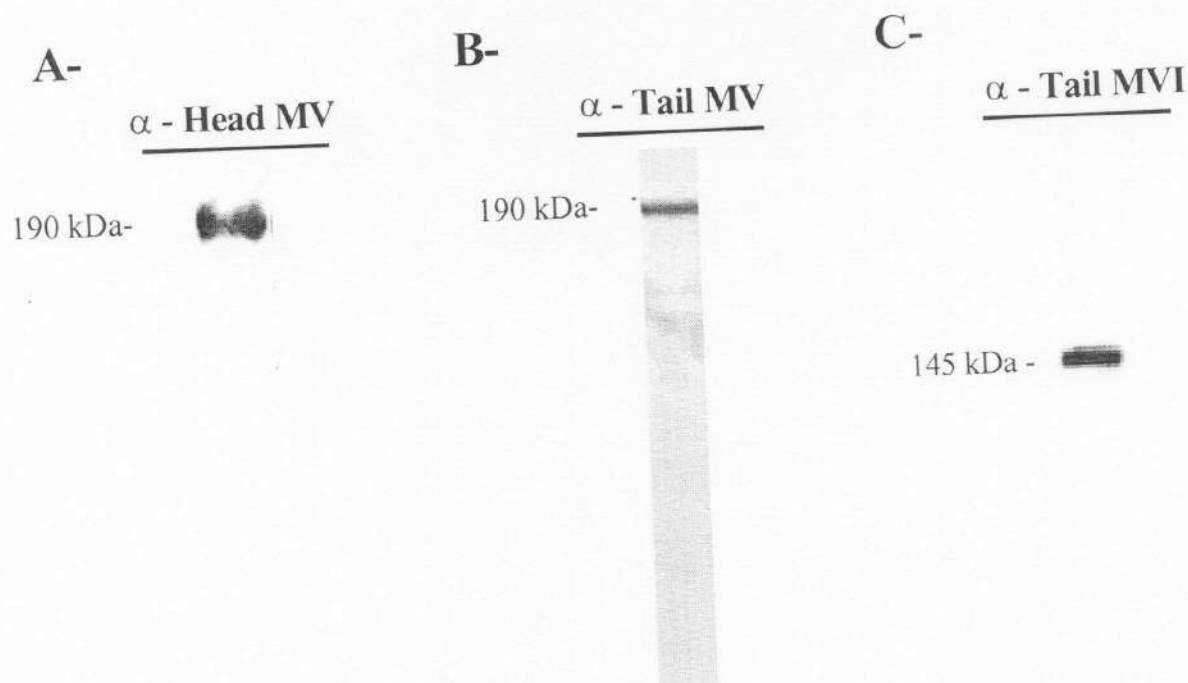


FIGURA 10: Identificação de Miosinas das Classes V e VI em cérebro de *Apis mellifera*. *Imunoblotting* das amostras sobrenadante de cérebro: A- Identificação do domínio cabeça de miosina-V, utilizando anticorpo específico α -Head de miosina-V. B- Identificação do domínio cauda de miosina-V, utilizando anticorpo específico α - Tail de miosina-V. C- Identificação do domínio cauda de miosina-VI, utilizando anticorpo específico α - Tail de miosina-VI.

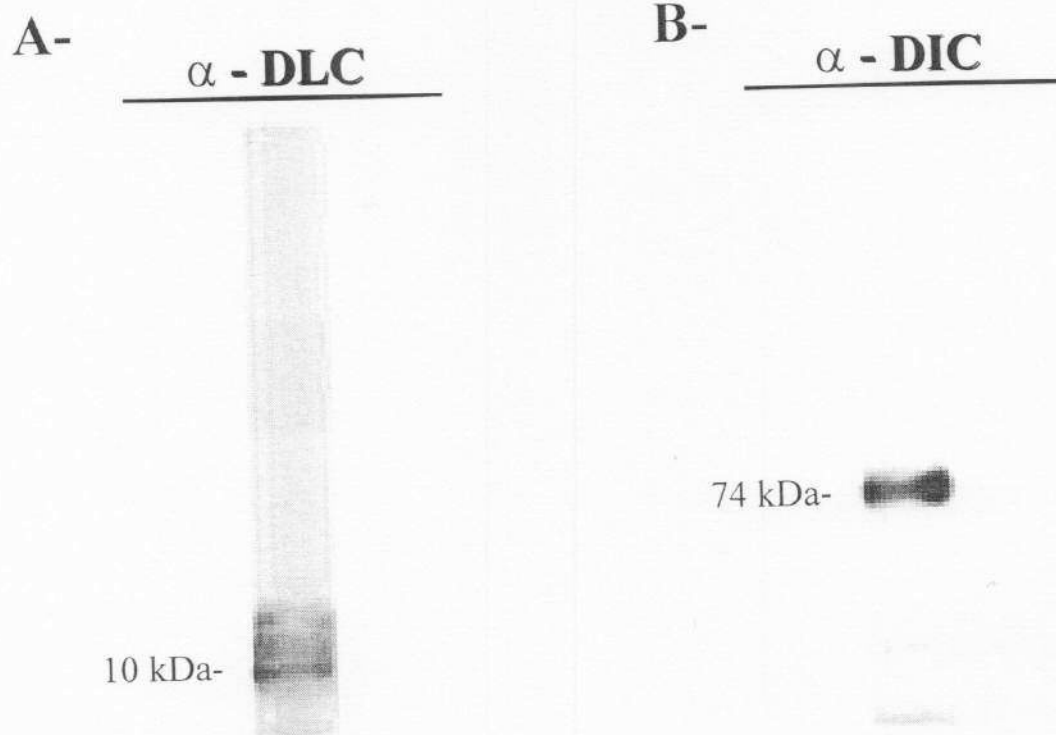


FIGURA 11 : Identificação de Dineínas Citoplasmáticas em cérebro de *Apis mellifera*. *Imunoblotting* das amostras sobrenadante de cérebro : A- Identificação da cadeia leve de dineína, utilizando anticorpo específico α -DLC. B- Identificação da cadeia intermediária de dineína, utilizando anticorpo específico α -DIC.

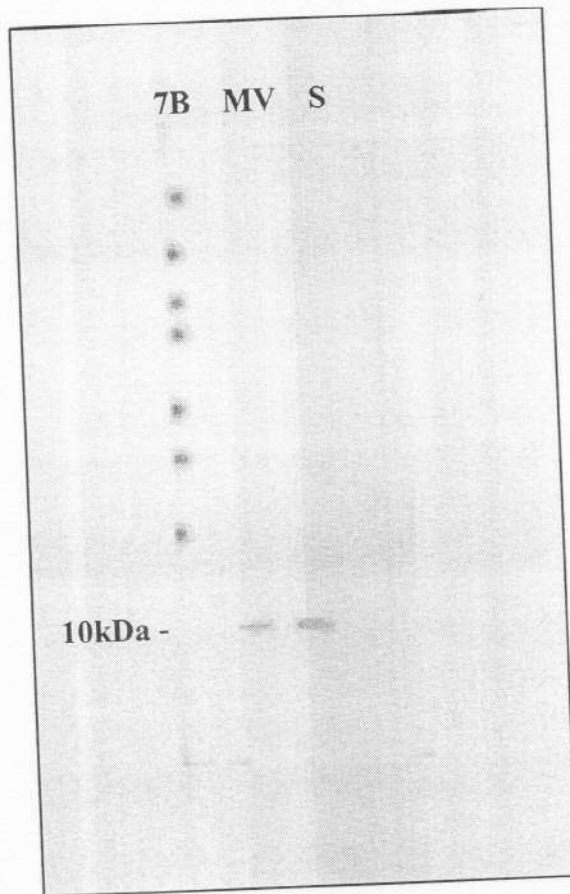


FIGURA 12: Imunodeteccção de DLC em Cérebro de *Apis mellifera* com Método Cromogênico (NBT/BCIP). 7B corresponde ao padrão de peso molecular conhecido: 180, 116, 84, 58, 48, 36 e 26 kDa. **MV** é o controle de miosina V pura de cérebro de pintainho **S** é a fração sobrenadante de cérebro de abelha.

3.2- Presença de Clones Imunorreativos

A biblioteca de cDNA representa a informação decodificada do RNA mensageiro (mRNA) de um tecido particular do organismo. A molécula de RNA é excepcionalmente instável e difícil de ser amplificada na sua forma natural. Por esta razão a informação codificada pelo RNA é convertida em uma estável dupla hélice de DNA e então inserida dentro de um vetor lambda autoreplicante. O vetor Lambda Zap II permite a expressão eucariótica. Os cinco sítios de clonagem do vetor Lambda Zap, *Sac* I, *Not* I, *Srf* I, *Eco*R I, e *Xho* I, acomodam insertos de DNA até 6,5 kb. Insertos clonados dentro do vetor Lambda Zap II podem ser excisados do fago na forma de vetor pBluescript-phagemid resistente à ampicilina (SHORT *et al.*, 1988; JERPSETH *et al.*, 1992).

Por meio da técnica de screening de biblioteca de cDNA de cérebro de *Apis mellifera* obtivemos um clone (4a) que expressa DLC (FIGURA 13). Num segundo ensaio transfectamos esse mesmo clone e obtivemos 13 clones (4b até o 4n) (FIGURA 14). Desses 13 clones escolhemos apenas seis baseado no fenótipo e na quantidade de placas de lise ao redor. Dos seis clones escolhidos (4b, 4c, 4d, 4e, 4f e 4h) transfectamos novamente o clone 4b e obtivemos 22 clones positivos (FIGURA 15).

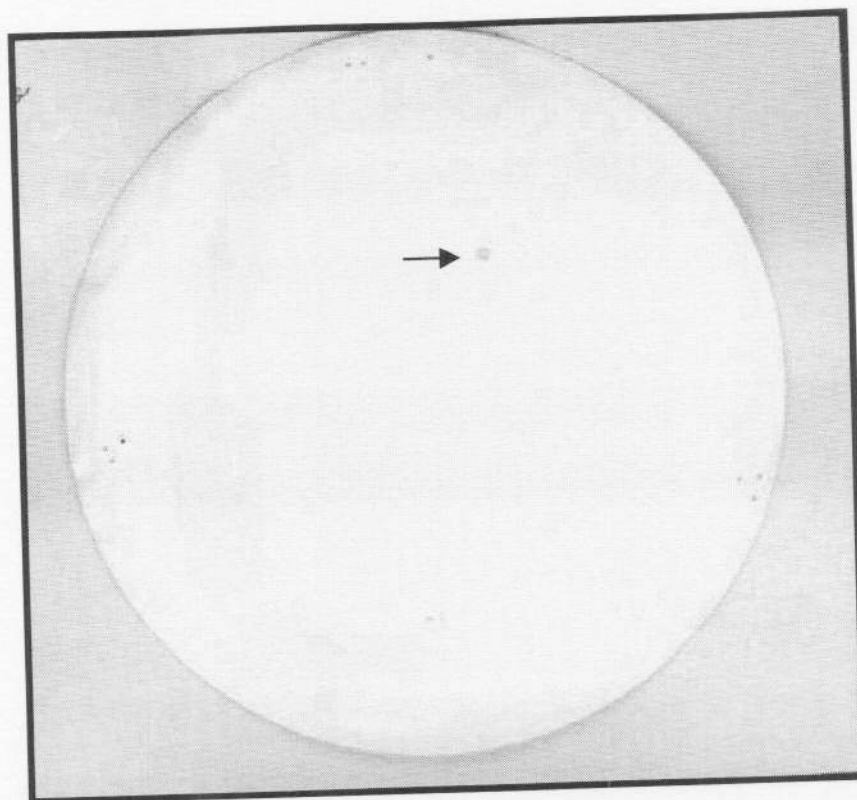


FIGURA 13: Identificação de Clones Imunoreativos. A seta indica o clone (4 a) que está expressando DLC no cérebro de *Apis mellifera*, esse clone foi reconhecido pelo anticorpo α -DLC utilizando método cromogênico (NBT/BCIP).

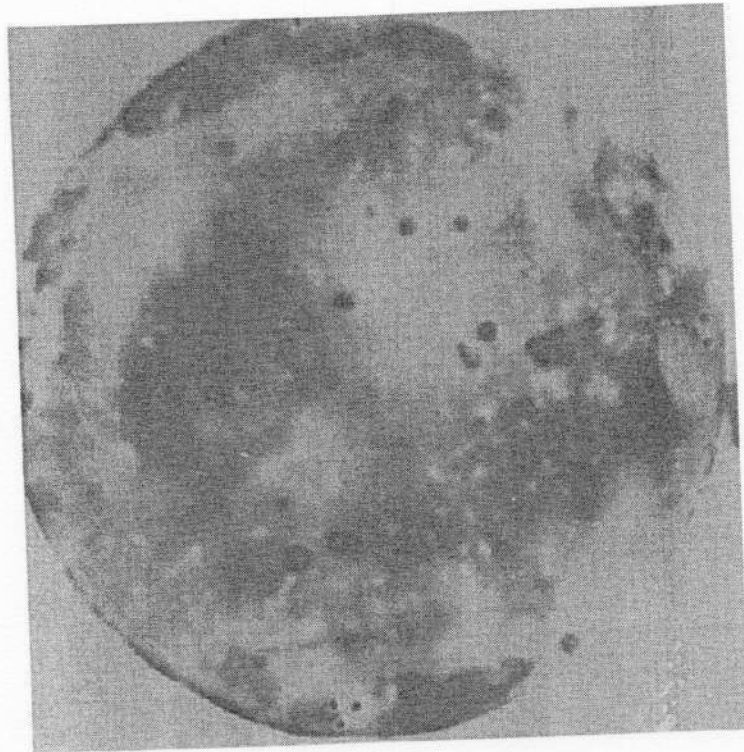


FIGURA 14: Clones Positivos (4b até 4n) Expressando DLC. A partir do clone 4a fizemos uma segunda transfecção e obtivemos 13 clones (4b até 4n), detectados pelo anticorpo α -DLC, expressando DLC. A membrana de nitrocelulose foi revelada por meio da técnica de quimioluminescência.

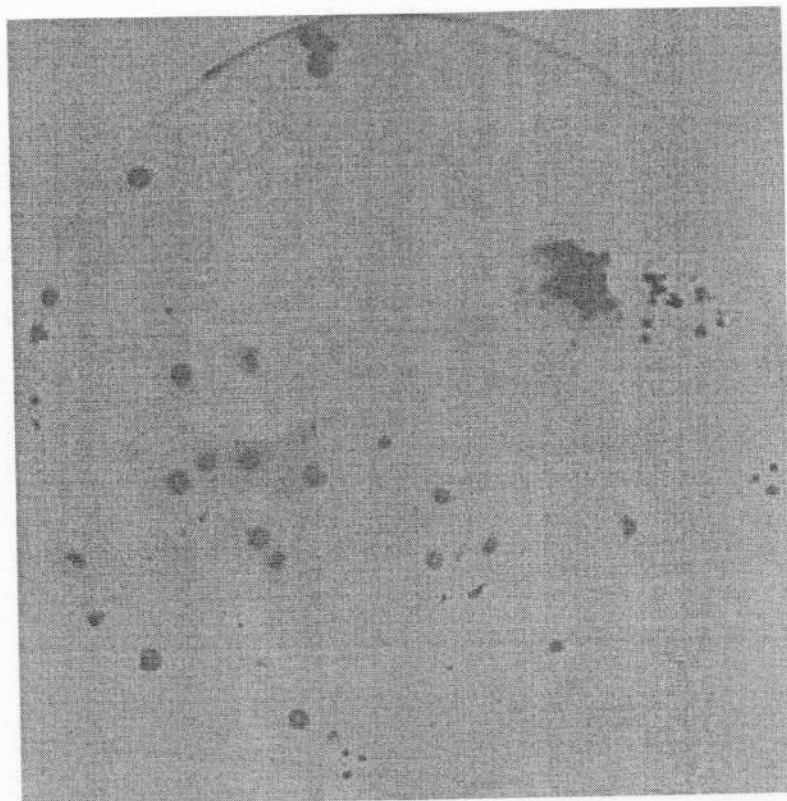


FIGURA 15: CLONES EXPRESSANDO DLC ORIGINADOS DO CLONE 4b. A partir do clone 4a fizemos uma segunda transfecção e obtivemos 13 clones (4b até 4n). Desses 13 isolamos o 4b e fizemos uma nova transfecção e detectamos novos clones pelo anticorpo α -DLC expressando DLC. A membrana de nitrocelulose foi revelada por meio da técnica de quimioluminescência

3.3- Amplificações do Inseto que Expressa DLC no Cérebro de *Apis mellifera*.

Na reação de amplificação do provável clone que expressa DLC obtivemos dois fragmentos amplificados (FIGURA 16). O fragmento amplificado da quantidade de 1 μ l de cultura de bactérias possui, com base no padrão de massa molecular utilizado, aproximadamente 1.800pb (asterisco vermelho), enquanto que o da cultura de 2 μ l está acima de 2.000pb (asterisco azul). O controle negativo não apresentou contaminações.

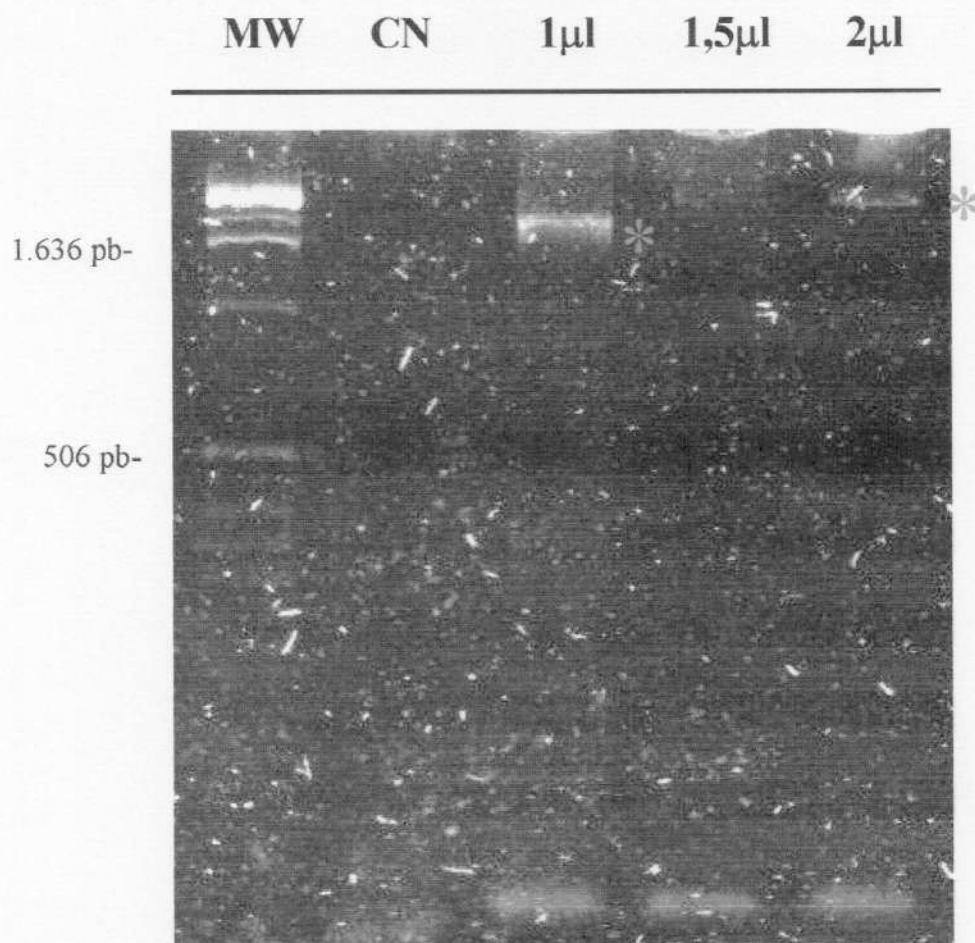


FIGURA 16: Amplificações do Inseto Correspondente ao Clone Positivo para DLC em Gel de Agarose 1,5% Corado com Brometo de Etídeo. Otimização da reação de amplificação com três quantidades diferentes de cultura de bactérias, 1 μ l, 1,5 μ l e 2 μ l. MW corresponde ao padrão de massas moleculares de 1kb, CN corresponde ao controle negativo da amplificação (sem template). Os asteriscos indicam os fragmentos amplificados. Foram aplicados 4 μ l de amostras por poço. Ao final do gel estão os primers que não foram utilizados na reação.

4- DISCUSSÃO

4.1- Miosina-V , VI e Dineína estão presentes no cérebro de *Apis mellifera*

Neste trabalho nós identificamos as proteínas motoras miosina-V, miosina-VI e dineína citoplasmática no cérebro de abelhas. O anticorpo monoclonal produzido em camundongo reconheceu a cadeia intermediária de dineína e o anticorpo policlonal produzido em coelho, reconheceu o domínio cabeça e cauda de miosina-V, o domínio cauda de miosina-VI e a cadeia leve de dineína. O fato de anticorpos contra proteínas de vertebrados reconhecerem proteínas de invertebrados demonstra que essas proteínas motoras apresentam epítomos específicos que estão conservados em abelhas.

Durante a homogeneização utilizamos um tampão previamente descrito para a purificação de miosina-V que contem ATP mantendo a miosina solúvel e desligada de actina. Quando se trata de frações de homogeneizados percebe-se a necessidade de se fazer *Western Blot* com anticorpos específicos para individualizar as proteínas de interesse.

Por meio dos clones que expressam proteína de fusão com os domínios específicos cabeça e cauda de miosina-V, foi possível a produção de anticorpos contra domínios específicos desta proteína constituindo ferramentas importantes para estudos de identificação e imunolocalização em diferentes organismos (LIMA *et al.*, 1999). Miosina-V é igualmente encontrada em organismos simples como leveduras e em vertebrados (LANGFORD *et al.*, 1998). Miosina-V foi detectada em abelhas utilizando um anticorpo contra o seu domínio motor, que não reconhece miosinas de outras classes. Apesar do domínio cauda das miosinas não ser uma porção conservada o anticorpo contra domínio cauda de miosina-V também reconhece esta isoforma em abelha.

Em *Drosophila*, já foi seqüenciado e caracterizado o gene da miosina de classe V. Neste organismo, a miosina-V pode estar envolvida em processos requeridos em uma variedade de tipos celulares (BONAFÉ & SELLERS, 1998; MACLVER *et al.*, 1998). Além disso, estudos mostraram que miosina-V de *Drosophila* está mais relacionada às isoformas de vertebrados (P190, mouse *dilute* e a Myo Vb de rato) que às de miosina-V de *C. elegans* e de levedura (BONAFÉ & SELLERS, 1998). A imunodeteção da miosina-V em abelhas sugere sua associação às vesículas para promover o transporte destas no sistema nervoso das abelhas, e pode ser relacionado também com os processos sensoriais de aprendizado e memória olfatória bem como outras funções do cérebro.

O anticorpo utilizado para reconhecer miosina-VI em abelha foi gerado contra o domínio cauda. Embora não seja a região mais conservada entre as miosinas, o domínio cauda é notavelmente conservado entre os ortólogos de miosina-VI já conhecidos (HASSOM & MOOSEKER, 1996). Miosinas da classe V e VI são duas das seis classes de genes de motores moleculares baseados em actina expressos em cérebros de vertebrados (Classe I, II, V, VI, IX e XV), são também conhecidas como motores de organelas. Essas duas classes de miosinas são expressas em cérebro de galinha durante a embriogênese. Em cultura de neurônios da raiz dorsal de glânglios, a imunolocalização de miosina-V e miosina-VI revelou uma distribuição similar dessas duas miosinas nos corpos celulares, dentritos e cones de crescimento. Isso sugere que essas miosinas estão associadas com as estruturas do citoesqueleto e organelas (SUTER *et al.*, 2000)

A miosina-VI de *Drosophila* 95F, está associada a movimentos de reciclagem citoplasmática. A inibição de sua função pode levar a uma formação anormal do citoesqueleto de actina, podendo causar defeitos no posicionamento e na divisão nuclear em blastoderma sincicial de embriões (MERMALL *et al.*, 1995; HASSON & MOOSEKER, 1995). A 95F é também requerida para a morfogênese epitelial de células foliculares (DENG, 1999). Além disso, a presença de miosina-VI no domínio central rico em microtúbulos é um dado relevante já que recentemente demonstrou-se que a miosina-VI de *Drosophila* co-imunoprecipita com uma proteína ligante de microtúbulo, a D-CLIP-190 (SUTER *et al.*, 2000).

Dineína foi detectada no cérebro da *A. mellifera* utilizando anticorpo monoclonal para a cadeia intermediária de 74kDa. Informações do fabricante indicam reatividade cruzada deste anticorpo em rato, bovino, peixe e *Drosophila*. Nossos dados mostram reatividade também para abelha. Dados da literatura mostram que a dineína citoplasmática de *D. melanogaster* é altamente similar em sequência e estrutura às outras isoformas encontradas em *Dictyostelium discoideum*, *Rattus norvegicus*, *S. cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans* (LI *et al.*, 1994; SCHRÖER, 1994).

As cadeias intermediárias da dineína em *Drosophila* são representadas por no mínimo 10 isoformas geradas por *splicing* alternativo do gene *Cdic* (NURMINSKY *et al.*, 1998). Esses transcritos são abundantes em embriões e adultos, dificilmente detectados em larvas e pupas e regulados para alta expressão na cabeça dos adultos. O grau de identidade para as isoformas de cadeias intermediárias de dineína é de cerca de 97 % (banco de dados / Blast e Clustal). Quando comparada a outros organismos, a identidade diminui: 52% para *Mus*

musculus, 63% para *Homo sapiens* e 31% para *S. cerevisiae*. As isoformas Cdis 5a e 5b são superexpressas na cabeça, representando aproximadamente 23% de expressão em relação às isoformas constitutivas. Esta alta representatividade deve-se provavelmente, aos tipos de processos que ocorrem no sistema nervoso. Assim, sugere-se que uma destas 2 isoformas poderia estar presente também no cérebro das abelhas.

O anticorpo contra DLC da alga *Chlamydomonas reinhardtii* reconheceu esta proteína no cérebro de *Apis mellifera* tanto pela técnica de quimioluminescência como por método cromogênico que é um método menos sensível mostrando que DLC está sendo altamente expressa em abelha. As três bandas reconhecidas pelo anticorpo contra DLC mostradas na figura 11 podem ser explicadas por duas hipóteses, a primeira seria que a DLC está formando dímeros como descrito por BENASHKI *et al.*, 1997; ou seria problemas de migração das proteínas no gel.

Na dineína citoplasmática a DLC está provavelmente associada às cadeias intermediárias assim como na dineína flagelar, entretanto ainda não existe nenhuma evidência direta para essa afirmação. A fragmentação proteolítica de miosina-V revelou que DLC associa-se à porção C-terminal do domínio cauda dessa miosina (ESPINDOLA *et al.*, 2000). Embora a DLC seja uma proteína altamente conservada, análise das sequências não revelaram nenhuma similaridade entre DIC de dineína citoplasmática e flagelar e o domínio cauda de miosina-V. Assim ainda não está claro como a estrutura dimérica de DLC interage com moléculas diferentes.

Análises genéticas em leveduras revelaram que o gene da DLC não é essencial. Enquanto que mutações para este gene em *Drosophila sp.*, causam perda de forma e estrutura celulares e desorganização dos filamentos de actina (Dick *et al.*, 1996). Essas evidências em conjunto, indicam uma função moduladora em potencial, para esta biomolécula altamente conservada em diferentes espécies.

Como já foi mencionado previamente, a larga escala de proteínas alvo de DLC sugere que esta proteína desempenha diferentes funções em múltiplos processos de regulação. Estes achados no sistema nervoso da abelha dirigem nossa investigação para clonagem e sequenciamento da DLC de *Apis mellifera* procurando esclarecer suas funções no cérebro destes insetos.

4.2- Isolamento de clones da biblioteca de cDNA de *Apis mellifera* imunoreativos para α -DLC.

O *screening* de biblioteca em células eucarióticas tem provado ser um meio efetivo de identificar clones que por outro lado não são identificados em células procarióticas. A técnica de *screening* depende do clone de interesse. Primeiramente precisa-se de uma linhagem de células apropriada para o *screening* e em segundo de reagentes capazes de identificar as células ou as proteínas alvo. O isolamento de clones imunoreativos mostra que, na biblioteca utilizada, está expresso o gene da cadeia leve de dineína.

O vetor Lambda ZapII permite uma excisão *in vivo* simples e eficiente e a recircularização de qualquer inserto clonado contido dentro do vetor lambda para formar um fagomídeo contendo o inserto (AUSUBEL *et al.*, 1990; KRETZ *et al.*, 1994). Esse processo de excisão depende da localização da seqüência de DNA dentro do fago lambda e da presença de uma variedade de proteínas por exemplo as M13. As proteínas M13 do fago reconhecem a região do DNA que normalmente serve como origem da replicação. Esta origem de replicação pode ser dividida em duas partes: o sítio de iniciação e o sítio de término para a síntese de DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989). O fago lambda se faz acessível às proteínas M13 pela infecção simultânea das bactérias XL1Blue com o vetor lambda e o Helper Phage.

Dentro das bactérias as proteínas M13 reconhecem a região iniciadora do DNA dentro do vetor lambda e uma nova fita de DNA é sintetizada e duplicada. A síntese desta nova fita continua passando pelo inserto clonado e pelo gene de resistência à ampicilina, até o sinal de término que se encontra no vetor lambda.

Essa fita simples de DNA é circularizada e empacotada pelo produto do gene II do Helper Phage na forma de fagomídeo, que em seguida é secretado pelas bactérias XL1Blue. Posteriormente à secreção das partículas do fago, as bactérias usadas no processo de excisão do clone de DNA são mortas por aquecimento à 70°C e o fago lambda é lisado, mas o fagomídeo não é afetado pelo aquecimento. As bactérias são infectadas com o fagomídeo e podem ser plaqueadas para a formação de colônias. Se omitimos o fago lambda na transfecção acima descrita, as bactérias XL1Blue não crescerão em meio de cultura contendo ampicilina. Esta transfecção nos serviu como controle negativo, previamente mencionado na seção "Material e Métodos". As colônias formadas a partir do pBluescript-phagemid são subseqüentemente amplificadas por PCR (ver adiante).

4.3- Amplificações do inserto de DLC por PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* de produção de grandes quantidades de fragmentos de DNA a partir de pequenas quantidades, por uma polimerase termo-estável (*Taq* DNA polimerase). Na amplificação pela polimerase, um fragmento é flanqueado por dois oligonucleotídeos que hibridizam com as cadeias opostas da seqüência alvo. Ciclos repetidos de desnaturação do DNA molde, anelamento dos *primers* e extensão destes pela *Taq* DNA polimerase, resultam em amplificação dos segmentos definidos pelo término dos *primers*. O produto de extensão de cada *primer* serve como molde para outro *primer* no ciclo seguinte. Assim, em cada ciclo, dobram-se as quantidades do fragmento produzido (WHITE *et al.*, 1989).

Como mencionado na seção “Material e Métodos” o inserto de DLC aloja-se no MCS do pBluescript-phagemid. As extremidades dessa região são reconhecidas pelos *primers* M13 *Reverse* (*primer* R) e M13 *Forward* (*primer* F) (FIGURA 8). O produto de amplificação da PCR com estes *primers* possui aproximadamente 1800 pb, dos quais se deve subtrair 196 pb correspondentes à região do MCS flanqueada pelos *primers*. Nota-se na figura 16 amplificação de um fragmento adicional acima de 2000 pb. Duas possibilidades poderiam explicar esta ocorrência: a) existem dois ou mais insertos no mesmo fagomídeo, de modo a formar uma quimera de tamanho desconhecido, devido à concentração do gel de agarose (1,5%); b) a outra possibilidade seria a presença de contaminantes na cultura de XL1Blue infectadas com o fagomídeo.

Este trabalho abre perspectivas para o conhecimento da seqüência dos genes de DLC até então inédita em himenópteros. Os fragmentos que amplificamos serão seqüenciados numa próxima etapa, permitindo determinar sua relação filogenética com as proteínas de diferentes organismos. Paralelamente poderiam ser geradas sondas contra fragmentos do mRNA para DLC, afim de ser estudado seus níveis de expressão em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de abelhas. A expressão destes fragmentos em fusão com Proteína Ligante de Maltose também tornariam possível a produção de anticorpos que abririam uma gama de abordagens acerca da função dessa cadeia leve em abelhas.

5- CONCLUSÕES

- ✓ São expressas em cérebro de *Apis mellifera* as seguintes proteínas:
 - ✓ Miosinas V e VI
 - ✓ Dineína citoplasmática
 - ✓ DLC

- ✓ Os epítomos reconhecidos pelos anticorpos de vertebrados estão conservados em abelhas.

- ✓ A biblioteca de cDNA de cérebro de *Apis mellifera* expressa DLC.

- ✓ O inserto de DLC foi excisado com sucesso, como verificado após amplificação por PCR.

- ✓ A amplificação do inserto dentro das XL1-Blue foi satisfatória, não havendo a necessidade de extração plasmidial.

6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990.
- AVRAHAM, K. B. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes a unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics*, New York, v. 25, p. 369-375, 1995.
- BAKER, J. P.; TITUS, M. A. A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 272, p. 523-535, 1997.
- BAHADORAN, P; ABERDAM, E.; MANTOUX, F. Rab27a A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol.* 152, 825-43, 2001.
- BÄHLER, M; KROSCHEWSKI, R.; STOFFLER, H-E.; BEHRMANN, T. Rat myr 4 defines a novel subclass of myosin I: Identification, distribution, localization and mapping of calmodulin binding sites with differential calcium sensitivity. *J. Cell Biol.* 126:375-89, 2000.
- BAUMANN, O.J. Association of spectrin with a subcompartment of the endoplasmic reticulum in honeybee photoreceptor cells. *J. Cell Motil Cytoskeleton*; 41(1):74-86, 1998.
- BARBAR, E.; KLEINMAN, B.; IMHOFF, D.; LI, M.; HAYS, T.S.; HARE M. Dimerization and Folding of LC8, a Highly Conserved Light Chain of Cytoplasmic Dynein. *Biochemistry* 40, 1596-1605, 2001.
- BECKWITH, S.M.; ROGHI, B.; LIU, C.H. The 8kDa cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization. *J Cell Biol.* 143: 1239-47, 1998.
- BENASHSKI, S. E.; HARRISON, A .; KING-PATEL, R.S. E KING, S.M. Dimerization of the highly light chain shared by dynein and myosin V. *J. Biol. Chemistry*, 1997.
- BERG, J.S.; POWELL, B.C.; CHENEY, R.E. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*; 12(4): 780-94, 2001.

- BONAFÉ, N.; SELLERS, J. R. Molecular characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, London, v. 19, p. 129-141, 1998.
- BRADFORD, M.M. 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, 1976.
- CAPALDI, E. A.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu. Rev. Psychol.*, Palo Alto, v. 50, p. 651-682, 1999.
- CAYRE, M. Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. *Cell Tissue Res.*, Berlin, v. 291. n. 3, p. 537-547, 1998.
- CHENEY, R.E., MK, O.S., HEUSER, J.E., COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S., ESPREAFICO, E.M., FORSCHER, P., LARSON, R.E. AND MOOSEKER, M.S. *Cell* 75, 13-23, 1993.
- COHEN, D.L. Squid p196 a new member of the myosin-V class of motor proteins is associated with motile axoplasmic organelles. *Brain Res*; 890(2): 233-245, 2001.
- COSTA, M. C. R. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, n. 22, p. 15811-15819, 1998.
- CREPIEUX, P., KWON, H., LECLERC, N., SPENCER, W., RICHARD, S., LIN, R. AND HISCOTT. *J. Mol Cell Biol* .17, 7375-85, 1997.
- DAVIS, R. L. Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron*, Cambridge, v. 11, p. 1-14, 1993.
- DEKKER-OHNO, K. Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 714, p. 220-230, 1996.
- DENG, W.; LIN, H. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, New York, v. 189, n. 1, p. 79-94, 1997.

DI BELLA, L.M.; BENASHSKI, S.E.; TEDFORD, H.W.; KING, S.M. The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. *J Cell Biol Chem*. 2001.

DICK, T.; RAY, K.; SALZ, H.K E CHIA, W. Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol*. 16:1966-1977, 1996.

EPSTEIN, E., SELA-BROWN, A., RINGEL, I., KILAV, R., KING, S. M. Dynein light chain binding to a 3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules. *J Clin Invest* 105:505-12, 2000.

ESPINDOLA, F. S. ; CHENEY, R. E. ; KING, S. M. ; SUTER, D. M.; MOOSEKER, M. S. Myosin-V and dinein share a similar light chain. *Molecular Biology of the Cell* (suplement) v. 7:372 a, 1996.

ESPINDOLA, F. S. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8 kDa dynein lighth chain/PIN. *Cell Mol. Cytoskeleton*, New York, v. 47, p. 269- 281, 2000.

ESPREADICO E. M. ; CHENEY, R. E. ; MATTEOLI, M. ; NASCIMENTO, A. A. C. DE CAMILI, P. V. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-v (p190), na unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell. Biol*. 119:1541-58, 1992.

EVANS , L.L., HAMMER, J. AND BRIDGMAN, P.C. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *J. Cell Science* 110,439-449, 1997.

FAN, J.; ZHANG, Q.; TOCHIO, H.; LI, M. Structural basis of diverse sequence dependent target recognition by the 8kDa dynein light chain. *J Mol Biol* 306(1):97-108, 2001.

GRISCELLI C, DURANDY A, GUY-GRAND D, DAGUILLARD F, HERZOG C, PRUNIERAS M. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am. J. Med*. 65:691-702, 1978.

GIBBONS, I. R. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, New York, v. 32, p. 136-144, 1995.

- GOLDSTEIN, L.S.; YANG, Z. Microtubule based transport systems in neurons: the roles of kinesin and dyneins. *Annu Ver Neurosci.* 23:39-71, 2000.
- HIROKAWA, N. Kinesin and dinein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 279:519-526, 1998.
- HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Philadelphia, v. 7, p. 587-594, 1995.
- HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. Vertebrate unconventional myosins. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 271, n. 28, p. 16431-16434, 1996.
- HAYS, T. S. A cytoplasmic dynein motor in Drosophila: identification and localization during embryogenesis. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v. 107, n. 6, p. 1557-1569, 1994.
- HERMANN, H. V.; HARTFELDER, K. Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int. Insect Morphol. E Embryol.*, v. 27, n. 4, p. 351-354, 1998.
- HICKS, J. L. Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in Drosophila. *Mol. Biol. Cell*, Bethesda, v. 10, p.4341-4353, 1999.
- HOLLERAN, E.A; KARKI, S.; HOLZBAUR, E.LF. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int. Rev Cytol* 182:69-109, 1998.
- HOLZBAUR, E.L.F.; VALLE, R.B. Dyneins: Molecular structure and cellular function. *Ann Rev. Cell Biol*; 10 : 339-72, 1994.
- HOWARD, J. *Ann. Rev. Physiol.* 58, 703-729, 1996.
- HUANG, W.M., REED-FOURQUET, L., WU, E. AND WU, J.Y. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8491-5, 1999.
- HUME, A.N.; COLLISON, L.M.; RAPAK, A; GOMES, AQ. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152(4): 795-808, 2001.
- HURDD, DD; SAXTON, WM. Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disruption fast axonal transport in Drosophila. *Genetics*, 144 : 1075-1085, 1996.

- IMAI, H. T. ; TAYLOR, R. W. ; CROSLAND, M. W. J. E CROZIER R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* 63 pp 160-165, 1988.
- JACOB, Y; BADRANE, H.; CECCALDI P.E.; TORDO, N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* 74(21): 10217-22, 2000.
- JAFFREY, S.M. AND. SNYDER, S.H. Pin: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 274,774-777, 1996.
- JESETH, B.; GREENER, A; SHORT, J.M. *Strategies Mol. Biol.* 5(3): 81-3, 1992.
- KAMIKOUCHI A, TAKEUCHI H, SAWATA M, OHASHI K, NATORI S, KUBO TJ. 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* .6;242(1):181-6, 1998.
- KING, S. J.; SCHROER, T. A. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biol.*, v. 2, p. 20-24, 2000.
- KRETZ, P.L.; WELLS, S.; SHORT, J.M. *Strategies Mol Biol.* 7(2): 44-5, 1994.
- LAEMMLI, U.K. E FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80:575-599, 1973.
- LANGFORD, G. M.; MOLYNEAUX, B. J..Myosin V in the Brain: Mutations Lead to Neurologicals Defects. *Brain Research Rewius* 28:1-8, 1998.
- LARSON, R .E. Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 29, p. 309-318., 1996.
- LI, M. Drosophila cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte. *J. Cell Biol.*, v. 126, p. 1475-1494, 1994.
- MA, S. Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interactions is required for interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in Dictyostelium. *J. Cell Biol.*, New York, v. 147, n. 6, p. 1261-1273, 1999.

- MACLVER, B. Identification of an essential gene encoding a class-V unconventional myosin in *D. melanogaster*. *Eur. J. Biochem.*, 257, p. 529-537, 1998.
- MCGRAIL, M.; HAYS, T. S. The microtubule motor cytoplasmic dynein is required for spindle orientation during germline cell divisions and oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development*, Cambridge, v. 124, n. 12, p. 2409-2419, 1997.
- MERCER, J. A. A novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, London, v. 349, p. 709-713, 1991.
- MERMALL, V.; POST, P. L.; MOOSEKER, M. S. Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction. *Science*. 279:527-533, 1998.
- MOLYNEAUX, B. J. Sequence and phylogenetic analysis of squid myosin-V: a vesicle motor in nerve cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, New York, v. 46, p.108-115, 2000.
- NASCIMENTO, A.A.C., CHENEY, R.E., TAUHATA, S.B.F., LARSON, R.E.; MOOSEKER, M.S. *J Biol Chem* 271, 17561-9, 1996.
- NAISBITT, S., ALLISON, D.W., KIM, E., WEINBREG, R.J.; SHENG, M. Interaction of Postsynaptic Density-95 / Guanylate Kinase Domain – Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein. *The Journal Science of Neurocince*. Jun, 20(12): 4524-4534, 2000.
- NURMINSKY, D. I. Cytoplasmic dynein intermediate-chain isoforms with different targeting properties created by tissue-specific alternative splicing. *Mol. Cell Biol.*, Washington, v. 18, n. 11, p. 6816-6825, 1998.
- OLESKEVICH S, CLEMENTS J.D. Srinivasan MVJ Long-term synaptic plasticity in the honeybee. *J Neurophysiol*. Jul;78(1):528-32, 1997.
- OLMSTED, J.B. Analysis of cytoskeletal structures using blot-purified monospecific antibodies. *Meths Enzymol*. 134: 467-472, 1986.
- PASTURAL, E. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.*, New York, v. 16, n. 3, p. 289-292, 1997.

- PHILLIS, R.; STATTON, D.; CARUCCIO, P.; MURPHEY, R.K. Mutations in the 8kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS. *Development* 122, 2955-2963, 1996.
- PORTER, M. E. Axonemal dyneins: assembly, organization and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, p. 10-17, 1996.
- PROVANCE, D. W, Jr.; MERCER, J. A. Association of dilute with melanosomes in melanocytes. *Mol. Biol. Cell* (6^o suplement), Bethesda, 146, 1995.
- PUTHALAKATH, H; HUANG, D.C.; O'REILLY, L.A.; KING, S.M.; STRASSER, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex *Mol Cell*. (3):287-96. 1999.
- RASMUSSEN, K. A family of dynein genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell*, Bethesda, v. 5, n. 1, p. 45-55, 1994.
- RECK-PETERSON, S. L. Class V myosins. *Biochem. Biophys. Acta, Amsterdam*, v. 1496, p. 36-51, 2000.
- ROBINSON, J. T. Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.*, New York, v. 146, n. 3, p. 597-608. 1999.
- RODRIGUEZ, O.C. E CHENEY, R.E. *Mol Biol Cell* 9, 20a (abstr), 1998.
- ROHDEN, H. Escaravelhos. De alma para alma, ed. Alvorada, p.120, 1980.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. E MANIATS. *Molecular cloning: A Laboratorial Manual*. 2nd ed., vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York, EUA, 1989.
- SCHRÖER, T. A. Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Philadelphia, v. 6, p. 69-73, 1994.
- SCHNORRER, F.; BOHMANN, K. The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *drosophila* oocytes. *Nature Cell Biol.* 2: 185-90, 2000.

- SELLERS, J. R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochem. Biophys Acta*, Amsterdam, v. 1, n. 1496, p. 3-22, 2000.
- SHORT, J.M.; FERNANDEZ, J.M.; SORGE, J.A. *Nucleic Acids Res.* 16:7583-7600, 1988.
- SNODGRASS, R. E. Anatomy of the honey bee. *Comstock Publ. Ass.* N. Y., USA, 1956.
- SUTER, D. M. Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. *J. Neurobiol.*, New York, v. 42, n. 3, p. 370-382, 2000.
- STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* v. 79: p. 237-248, 1973.
- TABB, J. S. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v. 111, p. 3221-3234, 1998.
- TAKAGISHI, Y.; ODA, S.; HAYASAKA, S. The dilute lethal gene attacks a Ca⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosc Lett.* 215: 169-172, 1996.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354, 1979.
- VAUGHAN, K.; VALLEE, R. *J Cell Biol.* 131, 1507-1516, 1995.
- VALLEE, R.B.; SHEETZ, M.P. *Sci.* 271, 1539-1544, 1996.
- YAMASHITA, R.A.; SELLERS, J.R.; ANDERSON, J.B. Identification and analysis of the myosin superfamily in *Drosophila*. *J Muscle Res Cell Motil*; 21(6): 461-505, 2001.
- WEBER, K., OSBORN, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* v. 244, p. 4406-4412, 1969.
- WELLS, AL., LIN, A.W., CHEN, L-Q., SAFER, D, CAIN, S.M., HASSON, T., CARRAGHER, B.O, MILLIGAN, R.A., SWEENEY, L. Myosin VI is an actin-based motor, 1999.

WU, X. Myosin V associates with melanossomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Biol.*, New York, v. 110, p. 847-859, 1997.

WU, X, GOEH JUNG; JOHN A HAMMER Functions of unconventional myosins *Current Opinion in Cell Biology* 12:42-51, 2000

WU, X.; RAO, K.; BOWERS, M.B. Rab27a enables myosin V dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci.* 114 (6): 1091-100, 2001.