

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abelhas
operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* L**

Aluno: Luciana Karen Calábria

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA - MG

2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abelhas
operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* L**

LUCIANA KAREN CALÁBRIA

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

UBERLÂNDIA-MG
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- 141i Calábria, Luciana Karen, 1981-
 Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abe-
 lhas operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* L / Luciana Karen
 Calábria. - 2007.
 63 f. : il.
- Orientador: Foued Salmen Espindola.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Abelha - Teses. 2. Proteínas - Teses. I. Espindola, Foued Salmen.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
 em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.799

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abelhas
operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* L**

LUCIANA KAREN CALÁBRIA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espindola

Examinadores:

Prof. Dr. Roy Edward Larson

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Data da Defesa: 28 /02 /2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Foued Salmen Espindola)

Agradecimentos

À essa energia onipresente chamada **Deus**, que me deu força para acreditar na possibilidade de “algo” melhor.

Aos meus pais **Querles** e **Olívio**, que foram meu “exemplo maior” de caráter e perseverança.

À **Luanda**, minha amiga, irmã e anjo da guarda por todos os momentos.

À toda minha **família**, principalmente minha avó, que soube entender a minha ausência e vislumbrar o melhor caminhar para todos os netos.

Ao meu amor **Renato (Tim)**, que esteve ao meu lado com uma palavra de apoio ou um sorriso, sendo o meu conforto, minha luz e minha paz.

Ao Prof. Dr. **Foued Salmen Espindola**, orientador, amigo e conselheiro. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança.

À **Universidade Federal de Uberlândia** e seus **funcionários**.

Ao **Instituto de Genética e Bioquímica**, seus **professores** (Profs. Warwick Estevam Kerr, Luiz Ricardo Goulart, Malcon Manfredi, Milton Vieira, Nilson Penha e Profas. Maria Inês Homsí, Veridiana de Melo, Ana Maria Bonetti) e **funcionários** (Da. Maura, Marlene, Sr. Vilmar e Gerson).

À **CAPES**, pelo financiamento.

Ao **Apiários Girassol** pelo fornecimento das abelhas e, de forma especial, ao **Cláudio Franco** pelo apoio, paciência e contribuição técnico-científica.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Valle de Sousa**, pela disponibilidade de seu laboratório (Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas - UNB), técnicos e reagentes.

À Ms. **Liudy Garcia Hernandez**, amiga e parceira em projetos envolvendo cérebro de abelha, agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e pelo enorme apoio nas análises de espectrometria de massa.

Aos amigos do **LABIBI** e **LABES**: Anibal, Élberth, Heitor, Ismair, Lara, Leonardo Bruno, Leonardo Gomes, Lourdes, Mundim, Nathalia, Rogério, Romeu, Vanessa e Vivian, que sempre estiveram de braços abertos e prontos para ajudar.

Às amigas de laboratório e reuniões femininas: **Ana, Déa, Carol**,

Claudinha, Let, Lorets, Lyvinha, Neire, Renatinha, Vilmets, agradeço pelo companheirismo nas horas ruins e nas melhores do MUNDO com boas gargalhadas!

Aos **amigos de hoje, de ontem e de sempre** que de alguma forma me apoiaram para que essa fase da minha vida fosse concretizada: Ana Maria dos Santos, Decivaldo Dias, Fabiana Paula, Fábio Machado Silva, Lidianne Karolline, Luciana Abdalla, Lysa Nepomuceno, Mariucha Guimarães, Pablo Peixoto, Priscila Alves Amado, Rafael Guércio, Renata Alves, Renata Roland, Roberta Cabral, Rosy Iara, Thiago Augusto, Viviane Moraes e Prof. Wilson (inglês).

Obrigada!

Luciana Karen Calábria

Lista de abreviaturas

μg	microgramas
μL	microlitros
1D	1 ^a . dimensão
2D	2 ^a . dimensão
aa	aminoácidos
EDTA	ácido etilenodiamínico tetracético
EGTA	ácido etilnaglicol-bis-(β mino etil éter) N', N'-tetracético
kDa	quilodalton
M	molar
mg	miligrama
MH	monoisotópico
mM	milimolar
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
v/v	volume/volume

Sumário

Resumo geral	1
Introdução geral	2
Calmodulina	2
Abelha <i>Apis mellifera</i>	5
Referências Bibliográficas	8
Capítulo único	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e métodos	21
Material biológico	21
Cromatografia de afinidade	21
Detecção de proteína e precipitação com TCA	22
<i>Peptide mass fingerprinting</i> (PMF)	22
Busca em bancos de dados	22
Resultados e Discussão	24
Figura	30
Tabela	31
Gráfico	32
Referências Bibliográficas	33
Anexo (Figuras complementares)	41

Resumo Geral

A calmodulina é uma proteína ligante de Ca^{+2} , importante em uma variedade de funções celulares. O complexo Ca^{+2} /calmodulina interage e regula várias enzimas e proteínas-alvo, conhecidas como proteínas ligantes de calmodulina (CaMBPs). Neste estudo, identificou-se de forma comparativa a composição de CaMBPs no cérebro de abelhas operárias *Apis mellifera*, visando relacioná-la com o comportamento destas abelhas na colônia. Para isto, as CaMBPs do cérebro de operárias campeira e nutridora foram purificadas através de cromatografia de afinidade, separadas em gel 1D, digeridas e submetidas à análise por *peptide mass fingerprinting* (PMF) para identificação. Em análise PMF, 21 proteínas diferentes foram identificadas, sendo duas somente em operária campeira e 13 em nutridora, consideradas proteínas comportamento-específicas. Todas as proteínas foram classificadas quanto a sua função e localização celular, em que se observou maior expressão de CaMBPs relacionadas ao metabolismo, para ambas operárias. Além disso, as seqüências foram analisadas quanto a presença do sítio ligante de calmodulina. Os resultados apresentados aqui indicam que a mudança de comportamento na colônia leva a uma alteração na composição de CaMBPs e, possivelmente, na função destas proteínas no cérebro das abelhas operárias *Apis mellifera*.

Palavras-chave: cálcio, calmodulina, cérebro, comportamento, *Apis mellifera*, MALDI-TOF.

Introdução Geral

Calmodulina

A calmodulina (CaM) é uma proteína pequena, com aproximadamente 149-150 aminoácidos, ponto isoelétrico entre 3.9-4.3 e massa molecular de 16 kDa (Polans *et al.*, 1996). É uma proteína ligante de cálcio (Ca^{+2}) e a análise da sua estrutura tridimensional mostrou dois domínios globulares conectados por uma alfa-hélice central onde residem *motifs helix-loop-helix* (EF-hands), que se ligam por afinidade ao Ca^{+2} . A CaM multifuncional contém um par N-terminal com EF-hand 1 e EF-hand 2, e C-terminal com EF-hand 3 e EF-hand 4 (Cheung, 1980; Babu *et al.*, 1988; Putkey *et al.*, 1988).

Kurokawa e colaboradores (2001) sugerem que a principal diferença na interação da CaM com seus alvos está relacionada com o domínio N-terminal que mostra diferença estrutural na orientação da *helix* EF-hand, enquanto o domínio C-terminal permanece inalterado.

A comparação da estrutura e função da CaM em diferentes organismos indica que essa molécula é altamente conservada (Waisman *et al.*, 1975; Dedman *et al.*, 1978; Krebs, 1981). Embora algumas espécies possuam mais que uma isoforma, a CaM tem se alterado pouco durante a evolução, tanto que a CaM de mamíferos e microorganismos eucarióticos diferem somente num pequeno número de aminoácidos funcionalmente idênticos (Klee *et al.*, 1988).

As duas metades da molécula são muito semelhantes, possuindo quatro domínios ligantes de Ca^{+2} . A ligação de Ca^{+2} à CaM causa uma mudança conformacional na molécula, de tal maneira que o complexo Ca^{+2} /CaM interage e regula várias enzimas e proteínas-alvo (CaMBPs) envolvidas em diferentes aspectos da atividade celular (Cheung, 1980; Means *et al.*, 1982; Babu *et al.*, 1988).

As CaMBPs compreendem um grupo diversificado, relacionado pelo fato de que essas proteínas interagem com a CaM. Essa interação é regulada usualmente pelo nível intracelular de íons Ca^{+2} e baseado nisso é possível que as CaMBPs se classifiquem em três categorias: Ca^{+2} -dependente, Ca^{+2} -independente e Ca^{+2} -inibido (O'Day, 2003).

Algumas CaMBPs Ca^{+2} -dependentes tem um ou mais domínios ligantes de

CaM com aproximadamente 20 resíduos de aminoácido, e têm sido agrupadas em dois *motifs* relacionados, baseados na posição dos resíduos hidrofóbicos conservados (Crivici & Ikura, 1995; Rhoads & Friedberg, 1997), como 1-8-14 (Dasgupta *et al.*, 1989) e 1-5-10 (Picciotto *et al.*, 1993).

A CaM pode também ligar CaMBPs de maneira Ca^{+2} -independente através de uma sequência consenso chamada *motif* IQ, mostrado em miosina-II e miosinas não-convencionais (Wolenski, 1995). Algumas regiões do cérebro de rato contêm poucas CaMBPs Ca^{+2} -independentes, mas expressam um grande número de CaMBPs Ca^{+2} -dependentes (O'Day *et al.*, 2001a, 2001b).

Existe um número limitado de CaMBPs Ca^{+2} -inibido, que somente liga à CaM na ausência de íons Ca^{+2} , como a neurogranina e neuromodulina (Jurado *et al.*, 1999; Gauthier & O'Day, 2001).

Técnicas variadas têm sido utilizadas para o estudo individual da interação proteína-proteína, incluindo *phage display* (Smith, 1985; Rossenu *et al.*, 1997), sistema duplo híbrido (Fields & Song, 1989), arranjos de proteínas (Macbeath & Schreiber, 2000), técnicas de cromatografia (Larson *et al.*, 1988; Beeckmans, 1999) e *overlay* (Larson *et al.*, 1990; O'Day, 2003; Reddy *et al.*, 2002), dentre outras. No entanto, esses métodos são geralmente usados para o *screening* de proteínas em um *pool*.

A CaM biotinilada também tem sido utilizada em gel de *overlay* e em *Western blots*, mas detecta poucas proteínas. Provavelmente devido o tamanho grande do grupo biotina cruzado que pode interferir na ligação da CaM. Outra técnica que tem sido utilizada na busca e identificação de CaMBPs é o SDS-PAGE 2D (O' Day, 2003).

Utilizando técnica de seleção de proteínas *in vitro* baseada em amplificação, Shen e colaboradores (2005) identificaram CaMBPs de humano. Das 77 seqüências, 48 eram de 6 classes bem conhecidas, incluindo diferentes isoformas (α , β , δ , ϵ) de proteínas kinase dependentes de Ca^{+2} /CaM (20 clones), isoformas (α , β , δ) de proteínas fosfatase Ca^{+2} /CaM-dependente (9 clones), ATPase Ca^{+2} /transportador (11 clones), alfa-spectrina II (4 clones), fosfoinositídeo-3-kinase (3 clones) e miosina-I (1 clone).

A CaM pode regular diversas unidades funcionais via a regulação de CaMBPs (Ilustração 01), e para estudar esses mecanismos tem se utilizado a

proteômica. O proteoma pode ser subdividido em unidades funcionais que fazem parte de grupos de proteínas que interagem por uma função específica ou são reguladas simultaneamente em um grupo. Uma nova área da proteômica envolve processos da dinâmica celular, onde novas estratégias experimentais estão surgindo incluindo genômicas celular, biofísica e fisiológica (O'Day, 2003).

Berggard e colaboradores (2006) mostraram em estudo recente que a associação da cromatografia de afinidade e a espectrometria de massa é útil na identificação de CaMBPs.

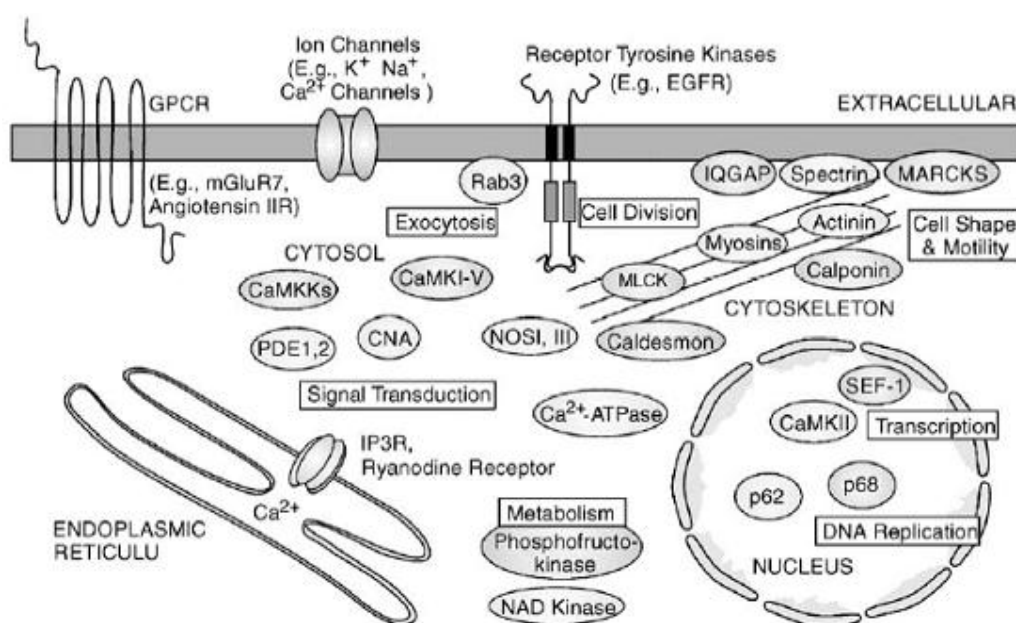


Ilustração 01. Algumas proteínas ligantes de calmodulina com a sua localização e função (O'Day, 2003).

Diferentes papéis podem ser desempenhados pela CaM associada a CaMBP, como síntese e degradação de nucleotídeos, transcrição de genes, regulação de diferentes sistemas de transporte, controle do metabolismo celular, organização do citoesqueleto, citocinese, contração muscular, regulação do volume osmótico, endocitose e exocitose, fertilização do zigoto, comunicação intercelular, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Klee & Vanaman, 1982; Carafoli, 1987; Chin e Means 2000; Carafoli *et al.*, 2001) .

A CaM também participa da regulação de muitas atividades celulares, através de enzimas que interagem com o complexo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ ou são fosforiladas

por proteínas quinases dependentes de $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$. A fosforilação de proteínas é considerada uma das importantes vias em que a transdução de sinal $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ regula a função celular (Kato *et al.*, 1992).

Abelha *Apis mellifera*

A abelha *A. mellifera* é um valioso organismo a ser estudado por sua importância econômica: para a agricultura, na polinização de várias culturas e na produção de mel; para a área da saúde, na produção de apiterápicos; e para as ciências biológicas, por suas características morfológicas, fisiológicas e comportamentais.

Estudos com *A. mellifera* tem valor agregado por ser uma espécie que integra interesses de muitas áreas, sendo que as implicações destes estudos representam um passo inicial para a compreensão de processos biológicos fundamentais, tais como: desenvolvimento ontogenético, formação de casta, aprendizagem e memória, envelhecimento, transporte e motilidade celular, bioassinalização e outros.

Os principais aspectos dos insetos sociais são, o altruísmo expresso nos membros da colônia, a complexa divisão de trabalho e a fascinante plasticidade demonstrada com as mudanças ambientais. Esse comportamento social é o resultado da interação dos diferentes níveis de organização biológica em que genes expressão proteínas e peptídeos que constituem os sistemas nervoso e muscular, regulando suas sínteses, interagindo com outras; e além de alguns hormônios peptidérgicos ou neurohormônios sintetizados e processados por neurônios e células neurosecretórias, afetando o comportamento dos indivíduos (O'Shea & Schaffer, 1985; Tublitz & Evans, 1986; Nässel, 1993; Page & Erber, 2002).

Em abelhas, a divisão de trabalho é mais bem visualizada por operárias que mudam suas funções conforme a idade e outros fatores. A relação da idade com a divisão de trabalho é a forma mais comum encontrada entre operárias em sociedades de insetos e é baseada nos padrões do desenvolvimento comportamental de cada indivíduo (Robinson, 1992). Tipicamente, nas abelhas jovens de 3-5 dias, a glândula hipofaríngea localizada na cabeça, produz a enzima invertase usada para processar néctar em mel. De 6-11 dias, a glândula

está completamente desenvolvida e as operárias realizam tarefas dentro da colônia (nutridora). De 17-20 dias, a glândula mostra a atividade primária da invertase (Maurizio, 1965; Simpson *et al.*, 1968), possibilitando o processamento do mel; além de secretar um feromônio de alarme (2-heptanona) (Cassier & Lensky, 1991). Quando as abelhas começam a guardar e forragear, com 2-3 semanas, a glândula do veneno já produz uma quantidade máxima de veneno (operária campeira) (Winston, 1987).

Esta divisão de trabalho é um politeísmo temporal flexível (Beshers *et al.*, 2001) e, também, um processo altamente regulado pela taxa de hormônio circulante (Sullivan *et al.*, 2000), por reações químicas no cérebro (Schulz & Robinson, 1999; Wagener-hulme *et al.*, 1999) e por mudanças estruturais do cérebro (Withers *et al.*, 1993). Todos os genes categorizados por Tsuchimoto e colaboradores (2004) como transportadores de neurotransmissores, canais de íons e componentes do padrão de sinais de transdução são mais expressos em operária campeira comparado com nutridora.

A experiência pode levar à mudanças no número, tamanho e complexidade das sinapses. As evidências de mudanças na estrutura do cérebro, por experiência induzida, têm sido mostradas em abelha (Gronenberg *et al.*, 1996; Julian & Gronenberg, 2002). Além disso, em *A. mellifera*, mudanças no volume cerebral mostram forte correlação com mudanças no comportamento e com a idade (Withers *et al.*, 1993; Withers *et al.*, 1995; Winnington *et al.*, 1996; Sigg *et al.*, 1997; Fahrbach *et al.*, 1998; Farris *et al.*, 2001).

Na colônia, tanto a divisão de trabalho quanto a plasticidade exibida pelas operárias adultas são regulados hormonalmente. Nesses processos, níveis de hormônio juvenil aumentam prematuramente no cérebro (Huang & Robinson, 1992; Fahrbach & Robinson, 1996) e as abelhas passam a forragear mais cedo (Robinson, 1987), além de servir como “marcapasso” no desenvolvimento comportamental (Huang *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 2000).

Enquanto as operárias nutridoras possuem comportamento higiênico bem desenvolvido, removendo membros da ninhada que estejam doentes ou contaminados para fora da colônia (Spivak *et al.*, 2003) e cuidando das larvas, nutrindo-as com geléia real (Winston, 1987); as operárias campeiras forrageiam, navegando vários quilômetros, visitando centenas de flores, de maneira rápida e

eficiente em busca de comida, aprendendo e memorizando os locais de interesse (Robinson *et al.*, 1997).

A partir disso, as diferenças entre as operárias nutridora e campeira foram analisadas quanto a aprendizagem olfatória e percebeu-se que não há diferenças em relação aos processos sensorial e motor, mostrando que ambas possuem tal habilidade (Ben-Shahar & Robinson, 2001). No entanto, em um estudo das mudanças estruturais do cérebro, duas regiões apresentaram volumes distintos para essas operárias. Enquanto a nutridora possui glomérulos olfatórios maiores, a campeira possui corpos de cogumelo com maior volume. Sugere-se que esse padrão de variação pode estar relacionado com a função desempenhada na colméia, já que as nutridoras necessitam de melhor olfato e as campeiras, por outro lado, demandam de mecanismos de memória e aprendizagem mais eficientes (Withers *et al.*, 1993).

Sendo assim, as abelhas garantiram seu sucesso adaptativo por possuírem um sistema sensorial eficiente (Oleskevich *et al.*, 1997), fazendo com que elas sejam consideradas um modelo neurobiológico para estudos de aprendizagem e memória comportamental nos níveis celular e molecular (Giurfa *et al.*, 2001) por três motivos: 1) por sua riqueza comportamental, incluindo sua capacidade de memória e aprendizagem (Menzel & Giurfa, 2001); 2) acesso experimental em termos de se controlar o treinamento do indivíduo, com poucas variáveis, como realizado em condicionamentos olfatório e visual (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983); 3) acessibilidade ao sistema nervoso central em experimentos que sejam necessários apenas a retirada da cutícula da cabeça e a exposição do cérebro, não ocorrendo o sacrifício do animal, mas estudando-o *in vivo* (Menzel, 2001).

Referências Bibliográficas

Babu, Y.S., Bugg, C.E., Cook, W.J. (1988) Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. J. Mol. Biol. 204, 191-204.

Beeckmans, S. (1999) Chromatographic methods to study protein-protein interactions. Methods 19, 278-305.

Ben-Shahar, Y., Robinson, G.E. (2001) Satiation differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees. J. Comp. Physiol. 187, 891-899.

Berggard, T., Arrigoni, G., Olsson, O., Fex, M., Linse, S., James, P. (2006) 140 mouse brain proteins identified by Ca²⁺-calmodulin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. J. Proteome Res. 5, 669-687.

Beshers, S., Huang, Z.Y., Oono, Y., Robinson, G.E. (2001) Social inhibition and the regulation of temporal polyethism in honey bee. J. Theor. Biol. 213, 461-479.

Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybee (*Apis mellifera*). J. Comp. Psychol. 97, 107-119.

Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. Annu. Rev. Biochem. 56, 395-433.

Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 36, 107-260.

Cassier, P., Lensky, Y. (1991) The ontogeny of juvenile hormone III, ecdysteroids and 2-heptanone level in developing and adult worker honey bees. Comptes. Rendus. Acad. Sci. 321, 343-348.

Cheung, W.Y. (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science

207, 19-27.

Chin, D., Means, A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol. 10, 322-328.

Crivici, A., Ikura, M. (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24, 85-116.

Dasgupta, M., Honeycutt, T., Blumenthal, T. (1989) The gamma-subunit of skeletal muscle phosphorylase kinase contains two noncontiguous domains that act in concert to bind calmodulin. J. Biol. Chem. 264, 17156-17163.

Dedman, J.R., Welsh, M.J., Means, A.R. (1978) Ca^{2+} -dependent regulator. Production and characterization of a monospecific antibody. J. Biol. Chem. 253, 7515-7521.

Fahrbach, S.E., Moore, D., Capaldi, E.A., Farris, S.M., Robinson, G.E. (1998) Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. Learn. Mem. 5, 115-123.

Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1996) Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure of the honey bee. Dev. Neurosci. 18, 102-114.

Farris, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2001) Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. J. Neurosci. 21, 6395-6404.

Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340, 245-247.

Gauthier, M.L., O'Day, D.H. (2001) Detection of calmodulin-binding proteins and calmodulin-dependent phosphorylation linked to calmodulin-dependent chemotaxis to folic acid and cAMP in *Dictyostelium*. Cell Signal 13, 1-10.

Giurfa, M., Zhang, S., Jenett, A., Menzel, R., Srinivasan, M.V. (2001) The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410, 930-933.

Gronenberg, W., Heeren, S., Holldobler, B. (1996) Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Exp. Biol.* 199, 2011-2019.

Huang, Z.Y., Robinson, G.E. (1992) Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11726-11729.

Huang, Z.Y., Robinson, G.E., Tobe, S.S., Yagi, K.J., Strambi, C., Stay, B. (1991) Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J. Insect Physiol.* 37, 733-741.

Julian, G.E., Gronenberg, W. (2002) Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. *Behav. Brain Evol.* 60, 152-164.

Jurado, L.A., Chockalingam, P.S., Jarrett, H.W. (1999) Apocalmodulin. *Physiol. Rev.* 79, 661-682.

Kato, M., Hagiwara, M., Hidaka, H. (1992) Identification of a 80 kDa calmodulin-binding protein as a new Ca^{+2} /calmodulin-dependent kinase by renaturation blotting assay (RBA). *Biochem. J.* 281, 339-342.

Klee, C.B., Draetta, G.F., Hubbard, M.J. (1988) Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 61, 149-200.

Klee, C.B., Vanaman, T.C. (1982) Calmodulin. *Adv. Protein Chem.* 35, 213-321.

Krebs, J. (1981) A survey of structural studies on calmodulin. *Cell Calcium* 2, 295-311.

Kurokawa, H., Osawa, M., Kurihara, H., Katayama, N., Tokumitsu, H., Swindells, M.B., Kainosho, M., Ikura, M. (2001) Target-induced conformational adaptation of calmodulin revealed by the crystal structure of a complex with nematode Ca^{+2} /calmodulin-dependent kinase peptide. *J. Mol. Biol.* 312, 59-68.

Larson, R.E., Espindola, F.S., Espreafico, E.M. (1990) Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.* 54, 1288-1294.

Larson, R.E., Pitta, D.E., Ferro, J.A. (1988) A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 213-217.

Macbeath, G., Schreiber, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289, 1760-1763.

Maurizio, A. (1965) Breakdown of sugars by inverting enzymes. *Ann. Abeille* 5, 215-232.

Means, A.R., Tash, J.S., Chafouleas, J.G., Lagace, L., Guerriero, V. (1982) Regulation of the cytoskeleton by Ca^{2+} -calmodulin and cAMP. *Ann. Acad. Sci.* 383, 69-84.

Menzel, R. (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* 8, 53-62.

Menzel, R., Giurfa, M. (2001) The cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn. Sci.* 5, 62-71.

Nässel, D.R. (1993) Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res.* 273, 1-29.

O'Day, D.H. (2003) CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding

proteins. Cell Signalling 15, 347-354.

O'Day, D.H., Lydan, M.A., Watchus, J., Fleming, A.S. (2001a) Decreases in calmodulin binding proteins and calmodulin dependent protein phosphorylation in the medial preoptic area at the onset of maternal behavior in the rat. Neurosci. Res. 64, 599-605.

O'Day, D.H., Payne, L-A, Drmic, I., Fleming, A.S. (2001b) Loss of calcineurin from the medial preoptic area of primiparous rats. Biochem Biophys. Res. Commun. 281, 1037-1040.

Oleskevich, S., Clements, J.D., Srinivasan, M.V.J. (1997) Long-term synaptic plasticity in the honeybee. J. Neurophysiol. 78, 528-32.

O'Shea, M., Schaffer, M. (1985) Neuropeptide function: the invertebrate contribution. Annu. Rev. Neurosci. 8, 171-198.

Page R.E., Erber, J. (2002) Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. Naturwissenschaften 89, 91-106.

Picciotto, M.R., Czernik, A.J., Nairn, C. (1993) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. cDNA cloning and identification of autophosphorylation site. J. Biol. Chem. 268, 26512-26521.

Polans, A., Baehr, W., Palczewski, K. (1996) Turned on by Ca^{+2} : The physiology and pathology of Ca^{+2} -binding proteins in the retina. Trends Neurosci. 19, 547-554.

Putkey, J., Ono, T., Vanberkum, M.F.A., Means, A.R. (1988) Functional significance of the central helix in calmodulin. J. Biol. Chem. 263, 11242-11249.

Reddy, V.S., Ali, G.S., Reddy, A.S. (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. J. Biol. Chem. 277, 9840-9852.

Rhoads, A.R., Friedberg, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* 11, 331-340.

Robinson, G.E. (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20, 329-338.

Robinson, G.E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 637-665.

Robinson, G.E., Fahrbach, S.E., Winston, M.L. (1997) Insect societies and the molecular biology of social behavior. *BioEssays* 19, 1099-1108.

Rossenu, S., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1997) A phage display technique for a fast, sensitive, and systematic investigation of protein-protein interactions. *J. Protein Chem.* 16, 499-503.

Schulz, D.J., Robinson, G.E. (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol.* 184, 481-488.

Shen, X., Valencia, C.A., Szostak, J.W., Dong, B., Liu, R. (2005) Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5969-5974.

Sigg, D., Thompson, C.M., Mercer, A.R. (1997) Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Neurosci.* 17, 7148-7156.

Simpson, J., Riedel, L.B.M., Wilding, N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honey bee. *J. Apic. Res.* 7, 29-36.

Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., Mesce, K.A. (2003) Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. J. Neurobiol. 55, 341-354.

Sullivan, J., Jassim, O., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (2000) Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. Horm. Behav. 37, 1-14.

Takeda, K. (1961) Classical conditioned response in the honeybee. J. Insect Physiol. 6, 168-179.

Tsuchimoto, M., Aoki, M., Takada, M., Kanou, Y., Sasagawa, H., Kitagawa, Y., Kadowaki, T. (2004) The change of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. Zoolog. Sci. 21, 23-28.

Tublitz, N.J., Evans, P.D. (1986) From behavior to molecules: an integrated approach to the study of neuropeptides. J. Neurosci. 8, 2451-2456.

Wagener-Hulme, C., Schulz, D.J., Robinson, G.E. (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. J. Comp. Physiol. 184, 471-479.

Waisman, D., Stevens, F.C., Wang, J.H. (1975) The distribution of the Ca^{+2} -dependent protein activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase in invertebrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 975-982.

Winnington, A.P., Napper, R.M., Mercer, A.R. (1996) Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. J. Comp. Neurol. 365, 479-490.

Winston, M.L. (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1993) Selective neuroanatomical

plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238-240.

Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1995) Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honeybees. *J. Neurobiol.* 26, 130-144.

Wolenski, J.S. (1995) Regulation of calmodulin-binding myosins. *Trends Cell Biol.* 5, 310-316.

Capítulo Único

**Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abelhas
operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* L.**

Resumo

A calmodulina é uma proteína ligante de Ca^{+2} , importante em uma variedade de funções celulares. O complexo Ca^{+2} /calmodulina interage e regula várias enzimas e proteínas-alvo, conhecidas como proteínas ligantes de calmodulina (CaMBPs). Neste estudo, identificou-se de forma comparativa a composição de CaMBPs no cérebro de abelhas operárias *Apis mellifera*, visando relacioná-la com o comportamento destas abelhas na colônia. Para isto, as CaMBPs do cérebro de operárias campeira e nutridora foram purificadas através de cromatografia de afinidade, separadas em gel 1D, digeridas e submetidas à análise por *peptide mass fingerprinting* (PMF) para identificação. Em análise PMF, 21 proteínas diferentes foram identificadas, sendo duas somente em operária campeira e 13 em nutridora, consideradas proteínas comportamento-específicas. Todas as proteínas foram classificadas quanto a sua função e localização celular, em que se observou maior expressão de CaMBPs relacionadas ao metabolismo, para ambas operárias. Além disso, as seqüências foram analisadas quanto a presença do sítio ligante de calmodulina. Os resultados apresentados aqui indicam que a mudança de comportamento na colônia leva a uma alteração na composição de CaMBPs e, possivelmente, na função destas proteínas no cérebro das abelhas operárias *Apis mellifera*.

Palavras-chave: cálcio, calmodulina, cérebro, comportamento, *Apis mellifera*, MALDI-TOF.

Abstract

The calmodulin is a Ca^{+2} -binding protein, important in a wide variety of cellular functions. The complex Ca^{+2} /calmodulin interacts and regulates several enzymes and target-proteins, known as calmodulina-binding proteins (CaMBPs). This study identified comparatively the composition of CaMBPs in the brain of the workers honeybees *Apis mellifera*, aiming to relate the their behavior in the colony. For that, the CaMBPS from the foragers workers and nurses brain were purified by affinity chromatography, separated in gel 1D, digested and analysed to *peptide mass fingerprinting* (PMF) for identification. In PMF, 21 proteins were identified, being 2 just in foragers workers and 13 in nurses, considered specific-behavior protein. All proteins were classified according to their function and cellular location, it was observed a bigger intensity of CaMBPs related to metabolism, for both workers. Besides, the sequences were analyzed as for that the presence of IQ motif. The results here presented indicate that behavior change in the colony changes the CaMBPs composition and, possibly, in the protein function in the *Apis mellifera* workers brain.

Key-words: calcium, calmodulin, brain, behavior, *Apis mellifera*, MALDI-TOF.

Introdução

A calmodulina (CaM) é uma proteína multifuncional pertencente a família das proteínas EF-hands ligantes de cálcio (Ca^{+2}), possuindo uma estrutura muito conservada durante a evolução (Klee *et al.*, 1988). O complexo Ca^{+2} /CaM interage e regula várias enzimas e proteínas-alvo (CaMBPs) envolvidas em diferentes aspectos da atividade celular, tais como transcrição de genes (Carafoli *et al.*, 1997), citoesqueleto (Espindola *et al.*, 1992), endocitose e exocitose (Colombo *et al.*, 1997; Chamberlain *et al.*, 1995), entre outras.

Muitas CaMBPs já foram e têm sido identificadas e caracterizadas em tecidos específicos de diferentes organismos. Esses estudos são importantes para o entendimento das principais vias de transdução de sinal mediadas por Ca^{+2} /CaM, e com este objetivo técnicas variadas têm sido utilizadas no estudo da interação proteína-proteína, incluindo *phage display* (Rossenu *et al.*, 1997), sistema duplo híbrido (Fields & Song, 1989), arranjos de proteínas (Macbeath & Schreiber, 2000), técnicas de cromatografia (Larson, 1988), RNAm *display* (Shen *et al.*, 2005) e *overlay* (O'Day, 2003; Larson *et al.*, 1990).

Estudos proteômicos envolvendo processos da dinâmica celular têm mostrado que essa estratégia experimental é favorável à identificação de novas CaMBPs utilizando cromatografia de afinidade associada à espectrometria de massa (Berggard *et al.*, 2006). Nesse modelo, a CaM quando ligada ao Ca^{+2} muda sua conformação permitindo a ligação de proteínas-alvo via sítio hidrofóbico. Por outro lado, a CaM também pode se ligar a CaMBPs de maneira Ca^{+2} -independente através de uma sequência consenso, *motif* IQ (Wolenski, 1995).

Por abordagem proteômica, de forma comparativa, nós identificamos as CaMBPs do cérebro de abelhas operárias campeira e nutridora *Apis mellifera*. Essas abelhas são insetos sociais interessantes como modelo de estudos neurobiológicos porque são dotadas de capacidade cognitiva e habilidade social, além de recentemente entrarem na lista dos insetos que possuem seu genoma totalmente seqüenciado (The honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Em colônia, operárias nutridoras alimentam e cuidam da abelha rainha, fazendo a manutenção da colméia, enquanto as campeiras trabalham fora da colônia buscando néctar e pólen. O forrageamento envolve aprendizagem e memorização

do local onde se encontra o alimento, capacidade de navegação e comunicação; e, por outro lado, o cuidado dentro da colméia necessita de olfato aguçado, principalmente na percepção de feromônios (Fahrbach *et al.*, 1995; Menzel & Muller, 1996; Menzel & Giurfa, 2001).

A alteração comportamental na colônia é acompanhada por mudanças no sistema endócrino, e na química e estrutura cerebral. Neste trabalho nós identificamos diferentes CaMBPs no cérebro das operárias *Apis mellifera* e agrupamos essas proteínas em classes distintas conforme sua função desempenhada no cérebro, como também analisamos suas seqüências quanto a presença do *motif IQ*.

Material e Métodos

Material biológico

Abelhas operárias campeira e nutridora *Apis mellifera*, fornecidas pelo Apiário Girassol Ltda, de Uberlândia-MG foram inicialmente anestesiadas em gelo e, a seguir, dissecadas. As operárias foram diferenciadas conforme suas estruturas anatômicas (quantidade de pêlos e danos nas asas) e quanto ao desenvolvimento da glândula hipofaríngea, que foi retirada durante a dissecação. Os cérebros foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em microtubo à -80°C.

Cromatografia de afinidade

Um volume de resina sepharose-4B contendo calmodulina acoplada (CaM-sepharose-4B, Amersham Pharmacia Biotech) foi preparada utilizando-se 10 volumes do tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM CaCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol) contendo 200 mM NaCl. Amostras com 150 cérebros de operária campeira ou nutridora foram homogeneizadas em três volumes de tampão de homogeneização (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM benzamidina, 0.2 mM PMSF, 0.1 M aprotinina, 20 µg/mL leupeptina, 0.1 mM pepabloc), em gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 50.000 xg por 1h à 4°C. Amostras de 3.5 mg de proteína foram preparadas para a cromatografia de afinidade CaM-sepharose-4B, pela adição de 2 mM CaCl₂, seguida de incubação com a resina por 2h, em gelo. Retirou-se o *void* e em seguida lavou-se a resina com 10 volumes de tampão de equilíbrio contendo 200 mM NaCl e 10 volumes do mesmo tampão com 500 mM NaCl, sendo estas frações coletadas para análise posterior. Nesta etapa todos os procedimentos foram realizados em tubo *falcon*, utilizando vórtex na sua menor rotação e centrifugação a 2000 xg a 4°C, para coletar as frações *void* e lavados. A resina foi montada em coluna de vidro (10 x 0.5 cm) e as CaMBPs eluídas com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 1 mM β-mercaptoetanol e 0.2 mM PMSF. A purificação foi realizada em triplicada.

Detecção de proteína e precipitação com TCA

Para visualizar dentro da curva de eluição quais os picos protéicos, realizou-se a detecção protéica utilizando microplacas de 96 *wells*, contendo em cada *well* 15 μ L de amostra e 45 μ L de reagente de Bradford (Bradford, 1976). As amostras detectadas como positivas foram destinadas ao procedimento de dosagem da concentração protéica, realizado em espectrofotômetro a 595 nm. As amostras com valores abaixo de 2 μ g de proteína/ μ L foram concentradas por precipitação com TCA 10% na proporção de 1:1 (v/v), sendo incubadas por 15 minutos em gelo e centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O precipitado concentrado em proteínas foi solubilizado em reduzido volume de tampão da amostra-padrão para eletroforese contendo adicionalmente 100 mM Tris-HCl pH 8.0 e glicerol. As amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE 1D 5-22% (Laemmli & Favre, 1973) e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Peptide mass fingerprinting (PMF)

A fração da coluna de CaM-sepharose-4B eluída com EGTA foi analisada em SDS-PAGE 1D. A digestão dos polipeptídeos corados em gel foi realizada para identificação das proteínas ligantes de calmodulina. O método baseou-se na redução de proteínas com DTT, alquilação com acetonitrila e digestão com tripsina. Os fragmentos obtidos foram submetidos a microcromatografia em ZipTip C18 Milipore (Billerica, MA, USA) seguida por espectrometria de massas em equipamento Bruker Reflex IV por tempo de voo com desorção à laser e ionização assistida por matriz (MALDI-TOF). Os picos conhecidos de produtos de autólise de tripsina e de contaminantes de queratina foram removidos.

Busca em bancos de dados

As proteínas foram identificadas por *peptide mass fingerprinting* e para busca em banco de dados utilizou-se o software *Mascot* (Perkins *et al.*, 1999) admitindo *scores* > 65 (correspondendo para o *p value* < 0.05), e *Profound* (Zhang e Chait, 2000) admitindo *Est'd Z* < 1.8, sendo ambos para NCBI nr. Não restringiu-se a massa molecular das proteínas ou a linhagem filogenética, e a tolerância de massa foi admitida no intervalo de 0.5-0.2 Da para dados monoisotópicos, MH⁺.

A sequência das proteínas que não foram identificadas para o organismo

Apis mellifera foram submetidas ao Blastp, utilizando o banco BeeBase (<http://racex00.tamu.edu/blast/blast.html>), admitindo para a busca todas as proteínas preditas. As proteínas também foram classificadas funcionalmente utilizando Swiss-Prot/TrEMBL (<http://br.expasy.org/sprot>), e as não-categorizadas foram classificadas conforme a localização celular, seguindo o banco PsortII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). Além disso, a sequência de todas as proteínas foram checadas no banco de dados quanto a presença de *motif* ligante de CaM (<http://calcium.uhnes.utoronto.ca/ctdb>).

Resultados e Discussão

Os resultados deste estudo foram obtidos por abordagem proteômica para identificar proteínas do cérebro das abelhas operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* que interagem com o complexo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$, utilizando cromatografia de afinidade e eluição com EGTA. Após a fração eluída da coluna de CaM-sepharose-4B ser submetida a SDS-PAGE 1D, visualizou-se um perfil protéico diferente para as operárias, sendo sete bandas para campeira e 19 para nutridora, prevalecendo proteínas de massa molecular menor que 100 kDa para ambas as abelhas (Figura 01). As bandas foram excissadas do gel, digeridas e a massa dos peptídeos identificada pelo MALDI-TOF. Através da busca em banco de dados, um total de 23 bandas mostrou presença de uma única proteína. Dessas, 21 proteínas diferentes foram identificadas como mostra a tabela 01.

Duas proteínas apresentaram seqüências comuns para campeira e nutridora, referidas como *predicted similar to* a) *clathrin heavy chain* (2C e 4N) e b) *choline o-acetyltransferase* (3C e 6N). Além disso, duas proteínas apresentaram função comum para as operárias, como *predicted similar to* a) *heat shock protein 8 isoform* (4C) e *heat shock cognate 70 protein* (7N), e b) *60 kDa heat shock protein* (6C) e *ENSANGP00000014839* (8N). Para as proteínas comportamento-específicas, duas foram identificadas somente em campeira e 13 em nutridora.

As seqüências que não foram identificadas diretamente para o organismo *Apis mellifera* (10N e 12N) foram submetidas ao Blastp, tendo como resultado proteínas com correspondência direta e funcional, como: a) *ENSANGP00000015039* (actin) *Anopheles gambiae* - *predicted similar to actin isoform 1* e b) *ODR-3 Caenorhabditis remanei* - *predicted similar to Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha*.

As proteínas também foram classificadas funcionalmente em: tráfego vesicular (1), sinalização (1), nuclear (2), citoesqueleto (3), metabolismo (8) e não-categorizadas (4). As não-categorizadas foram classificadas conforme a localização celular em citoplasma (1), mitocôndria (1) e extracelular (2) (Gráfico 01).

Tráfego vesicular: Além do papel na exocitose participando do complexo

SNARE (De Haro *et al.*, 2003), a CaM está envolvida na fusão endosomal (Colombo *et al.*, 1997). Nós identificamos como CaMBP, para ambas operárias, um predito para cadeia pesada de clatrina, uma proteína envolvida na endocitose de vesículas sinápticas (Brodin *et al.*, 2000)

Sinalização: Uma proteína de sinalização, proteína-G ligante de guanina, foi identificada como CaMBP no cérebro de nutridora. Pertencente a família das proteínas-G, participa das vias de olfato de vertebrados e invertebrados, principalmente na percepção de feromônios (Berghard & Buck, 1996). A transdução visual e a participação da proteína-G nesta cascata de sinalização já foram bem detalhadas para *Drosophila melanogaster* (Hardie & Raghu, 2001). Provavelmente, esta proteína esteja associada à alguma CaMBP pertencente à sinalização neuroquímica da abelha.

Nuclear: CaMBPs estão presentes no núcleo de diferentes tipos celulares, sugerindo que estejam envolvidas na regulação de suas funções. Nesta classe foram categorizadas duas proteínas. A proteína *similar to RIKEN cDNA 9330199A09 gene*, identificada em campeira (5C), é uma ligante de DNA, íons metálicos e zinco, e em *Gallus gallus* corresponde a uma *Zinc finger protein 629*. Por outro lado, surpreendentemente, o predito *similar to dyslexia susceptibility 1* foi identificado como CaMBP no cérebro de nutridora (18N). A dislexia é uma desordem neuronal humana com base genética, estando o gene expresso no cérebro, entre outros tecidos em humanos (Taipale *et al.*, 2003). No entanto, ainda não há relato da prevalência desta proteína no cérebro de abelha, apesar que para *D. melanogaster* quatro genes têm sido investigados como candidatos para dislexia (McGrath *et al.*, 2006).

Citoesqueleto: Três proteínas de cérebro de nutridora foram identificadas como CaMBPs: α -spectrina, α -tubulina e actina. A spectrina é uma proteína ligante de Ca^{+2} /CaM muito bem descrita e já demonstrada em células fotoreceptoras de abelha zangão *A. mellifera* (Baumann, 1998). A tubulina é o principal constituinte do microtúbulo e a sua estrutura é altamente conservada entre as espécies. A actina é também uma proteína conservada, envolvida em vários tipos de motilidade celular, sendo também descrita nas células fotoreceptoras de zangão (Baumann, 2001) e em ovários de *A. mellifera* (Schmidt Capella & Hartfelder, 2002).

Metabolismo: Neste trabalho, grande parte das proteínas identificadas foi reunida na classe de enzimas metabólicas (38%). De fato, dados descritos por Su e colaboradores (2003) sugerem que componentes ATPase e glicolíticos formam um *metabolon* para maximizar o abastecimento de energia; além disso, mudanças nas funções cognitivas podem indicar mudanças no metabolismo do cérebro (Korol & Gold, 1998). Em nosso trabalho, identificou-se como CaMBPs oito proteínas envolvidas no metabolismo, sendo uma identificada em campeira (7C), seis em nutridora (5N, 11N, 13N, 15N, 16N e 17N) e uma de ocorrência em ambas (3C e 6N).

A colina O-acetiltransferase, identificada em ambas operárias, é a enzima responsável pela síntese do neurotransmissor acetilcolina. Estudos em *D. melanogaster* mostraram que essa enzima e o seu RNAm estão expressos somente em neurônios que usam a acetilcolina como neurotransmissor (Ikeda & Salvaterra, 1989).

O predito *similar to CG4511-PA* (7C), identificado em campeira, é correspondente a tioredoxina redutase, uma flavoproteína que faz parte do sistema de proteção à reação com oxigênio de espécie citotóxica (Williams, 2000), atuando como anti-oxidante intracelular (Missirlis *et al.*, 2001) e expressando-se em condições de estresse (Horibe *et al.*, 2004). Desempenhando a mesma função de enzima antioxidante, a glutathione S-transferase identificada como CaMBP no cérebro de nutridora (17N), age no sistema nervoso de abelha (Corona *et al.*, 2005). Estudos mostram que os níveis de RNAm de genes que codificam as enzimas tioredoxina redutase e glutathione S-transferase têm sua expressão aumentada com o envelhecimento em abelhas *A. mellifera* (Corona *et al.*, 2005).

Para nutridora, outras cinco proteínas foram identificadas. Dentre elas, a proteína ligante de oxisterol (OSBP) (11N), uma proteína citosólica que se liga a uma gama de oxisteróis, regulando o metabolismo esterol e a ação do oxisterol ligado (Smith, 1996). A alta similaridade entre a sequência da OSBP de mamífero e de *D. melanogaster* sugere que essa proteína tem as suas funções conservadas, como a inibição do mevalonato na via do oxisterol e no ciclo celular (Alphey *et al.*, 1998).

A arginina kinase (5N), identificada somente em nutridora, é membro de uma

família altamente conservada de *phosphagen kinases* e é a principal guanidino kinase encontrada em invertebrados (Muhlebach *et al.*, 1994). Em *A. mellifera*, Kucharski e Maleszka (1998) clonaram e sequenciaram o cDNA da arginina kinase e revelaram que a expressão de RNAm é relativamente abundante no tórax, antenas e cérebro, principalmente nos olhos compostos, sugerindo o papel desta enzima na liberação de energia no sistema visual.

Outra enzima metabólica identificada em nutridora foi a frutose 1,6-bifosfatase aldolase da classe I (13N), uma enzima glicolítica que catalisa a clivagem da frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. Comparando aldolases de vertebrado e insetos, existem 62-70% de identidade entre os aminoácidos (Malek *et al.*, 1988) e isso, possivelmente, reflete nas funções também conservadas.

A 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (15N) é uma enzima solúvel monofuncional que participa da β -oxidação e também foi identificada como CaMBP em nutridora. É altamente expressa no sistema nervoso central, gônadas embrionárias e glândula salivar de *D. melanogaster* (Torroja *et al.*, 1998).

O predito similar para *CG17896-PB* (16N) identificado como CaMBP no cérebro de nutridora, corresponde a uma proteína da família aldeído desidrogenase. Através de um *screening*, Evans e Wheeler (2000) mostraram a superexpressão do gene desta proteína em operárias. Além disso, em estudo proteômico da glândula hipofaríngea, esta enzima foi relatada como participante do metabolismo energético desta glândula em nutridora (Santos *et al.*, 2005).

Não-categorizadas: Todas as proteínas identificadas como CaMBPs que não se enquadraram nas classes funcionais, foram reunidas dentro deste grupo e suas seqüências submetidas ao PsortII, sendo então determinada sua localização celular. Duas proteínas citoplasmáticas foram identificadas (4C e 7N), como proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70). Embora estudos revelem que a CaM se liga a HSP70 (Stevenson & Calderwood, 1990), o papel regulatório da CaM neste caso ainda não está claro. Sabe-se que membros da família das HSP70 podem atuar como chaperonas, regulando o enovelamento e estabilidade da proteína ou como marcador de morte celular, como já foi mostrado em abelha (Feder & Hofmann, 1999; Gregorc & Bowen, 1999).

Proteínas de choque térmico de 60 kDa (HSP60), de ordem mitocondrial,

também foram identificadas como CaMBPs (6C e 8N). As HSP60 são proteínas com propriedades de chaperonas, encontradas em *D. melanogaster* desempenhando função nos estágios da embriogênese (Kozlova et al., 1997) e espermatogênese (Timakov & Zhang, 2001).

As proteínas secretórias da família das principais proteínas da geléia real, MRJPs 1 e 2, foram as duas proteínas extracelulares identificadas somente em nutridora. As MRJPs 1 e 2 já foram identificadas em estudo proteômico da glândula hipofaríngea (Santos *et al.*, 2005); no entanto, os poucos relatos destas proteínas no cérebro de abelha, como a identificação da MRJP1 em homogeneizado (Peixoto *et al.*, 2006), o transcrito de *mrjp1* e o gene *mrjp2* expressos no tecido (Kucharski & Maleszka, 2002; Albert & Klaudiny, 2004) e o RNAm de *mrjp1* detectado em células Kenyon dos corpos de cogumelo (Kucharski *et al.*, 1998), não revelam a função destas MRJPs no cérebro de abelha, apesar de serem relatadas com papel na nutrição e no desenvolvimento da rainha *A. mellifera* (Ohashi *et al.*, 1997).

A sequência de todas as proteínas identificadas neste trabalho foram checadas no banco de dados quanto a presença de *motif* ligante de CaM. As proteínas foram classificadas em “potencial *motif* IQ” (1), “potencial sítio ligante de CaM” (13), “*motif* ligante de CaM não-específico” (3) e “ausência de *motif* ligante de CaM” (4), como mostra a tabela 01. O fato de 5% de todas as proteínas identificadas aqui conterem um potencial *motif* IQ, 62% potencial sítio ligante e 14% *motif* ligante não-específico, contabilizando 81%, sugere que grande parte das proteínas identificadas no cérebro de abelha interagem com a CaM de forma primária. As proteínas que não contêm sítio ligante (19%), provavelmente interagiram de forma secundária, o que é aceitável e provável quando se utiliza cromatografia de afinidade. Proteínas que interagem desta maneira são provavelmente complexos multi-protéicos que fornecem importante informação na via celular e que serão regulados pela Ca^{+2} /CaM (Newbell *et al.*, 1997; Means, 2000).

Apesar da sequência da CaM ser altamente conservada e idêntica entre vertebrados e invertebrados, algumas das importantes CaMBPs, como CaMKII, dineína, miosina, munc-18, iNOS e outras, já identificadas para outros organismos (Rhoads & Friedberg, 1997; O'Day, 2003; Berggard *et al.*, 2006), não apareceram

no gel 1D em análise das frações eluídas da coluna. Em abelha, a CaMKII já foi purificada e caracterizada mostrando suas propriedades similares às de outras espécies de vertebrado (Altfelder *et al.*, 1991). Apesar da CaMKII não ter sido aqui identificada como CaMBP, considera-se que isso pode ser justificado pela baixa homologia da região ligante de $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ de seus alvos e pequena dependência da sequência para que a ligação aconteça. Isso provavelmente reflete na rota evolucionária de cada proteína-alvo, mostrando variantes de uma região ligante comum (Bähler & Rhoads, 2002). Existe também a possibilidade de que algumas CaMBPs, incluindo as mencionadas anteriormente, terem sido ligadas muito fortemente a coluna de CaM-sepharose-4B e por isso não terem sido eluídas com EGTA. Tal fato ocorreu quando a miosina-Va foi descoberta como uma CaMBP190, em que foi necessário eluir a coluna com uréia para recuperar a proteína (Larson *et al.*, 1988; Larson *et al.*, 1990).

A identificação de CaMBPs no cérebro é uma tendência e esse é o primeiro estudo identificando proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de *A. mellifera*, através de estudo proteômico, abordando de forma comparativa dois diferentes comportamentos na colônia, forrageamento e nutrição. As operárias campeira e nutridora diferem quanto a estrutura e o volume de regiões específicas do cérebro (Withers *et al.*, 1993; Sigg *et al.*, 1997), a morfologia da glândula hipofaríngea (Ohashi *et al.*, 1999), a expressão de alguns genes (Whitfield *et al.*, 2003; Tsuchimoto *et al.*, 2004), como também quanto a diversidade de proteínas-alvo para $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ no cérebro e, possivelmente, quanto a função destas proteínas no sistema nervoso da abelha *Apis mellifera*.

Figura

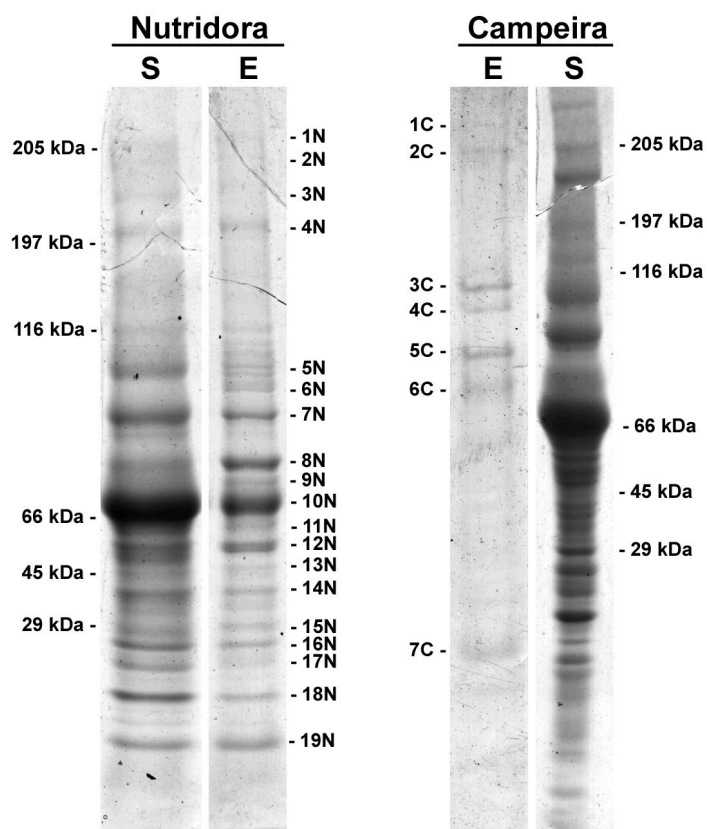


Figura 01. Perfil protéico do eluído para ligantes de calmodulina do cérebro de abelhas operárias campeira e nutridora *Apis mellifera*. **S** – sobrenadante de homogeneizado de cérebro. **E** – eluído da coluna CaM-Sepharose-4B. **1N-19N** e **1C-7C** – bandas de CaMBPs de cérebro de nutridora (N) e campeira (C) excissadas para análise PMF.

Tabela 01. Identificação de proteínas ligantes de calmodulina no cérebro de abelhas operárias *Apis mellifera*

ID	PROTEÍNA	MWt	MWe	Score	Est'd Z	Motif
1C	-	-	> 205	-	-	-
2C	PREDICTED similar to Clathrin heavy chain CG9012-PA, isoform A isoform 1 (XP_623111)	187.67	205-197	112	-	PIQM at 728aa
3C	PREDICTED similar to Choline O-acetyltransferase, partial (XP_392463)	75.35	116-66	91	-	UcM at 178aa
4C	PREDICTED similar to heat shock protein 8 isoform 1 (XP_392933)	72.07	116-66	97	-	UcM at 257aa
5C	Similar to RIKEN cDNA 9330199A09 gene (XP_392677)	79.85	116-66	-	0.23	NoM
6C	PREDICTED similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (XP_392899)	60.55	116-66	105	-	PcaMS
7C	PREDICTED similar to CG4511-PA (XP_624087)	25.40	< 29	76	-	PcaMS
1N	-	-	> 205	-	-	-
2N	PREDICTED similar to Spectrin alpha chain (XP_623691)	279.15	205-197	66	-	PcaMS
3N	(TBA_OCTDO) Tubulin alpha chain (XP_396338)	50.85	205-197	68	-	PcaMS
4N	PREDICTED similar to Clathrin heavy chain CG9012-PA, isoform A isoform 1 (XP_623111)	187.67	205-197	88	-	PIQM at 728aa
5N	PREDICTED similar to Oxysterol binding protein CG6708-PA isoform 1, partial (XP_392480)	96.63	116-66	83	-	PcaMS
6N	PREDICTED similar to Choline O-acetyltransferase 2, partial (XP_392463)	75.35	116-66	118	-	UcM at 178aa
7N	Similar to heat shock cognate 70 protein (XP_392933)	71.41	116-66	-	1.68	UcM at 257aa
8N	PREDICTED similar to ENSANGP00000014839 (XP_392899)	60.55	116-66	84	1.19	PcaMS
9N	Major Royal jelly protein MRJP1 (NP_001011579)	49.32	116-66	74	-	PcaMS
10N	ENSANGP00000015039 (XP_314406) <i>Anopheles gambiae</i> Blastp: PREDICTED similar to actin actin-87E isoform 1 (XP_623826) (Score: 726 - Evalue: 0.0)	44.10	116-66	-	1.68	NoM NoM
11N	Arginine kinase (NP_001011603)	40.33	66-45	87	1.76	PcaMS
12N	ODR-3 (AAN87175) <i>Caenorhabditis remanei</i> Blastp: PREDICTED similar to Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha 65A (XP_395172) (Score: 330 - Evalue: 4e ⁻⁹⁰)	38.73	66-45	68	1.20	PcaMS NoM
13N	PREDICTED similar to Aldolase CG6058-PF, isoform F (XP_623342)	39.98	45-29	83	-	PcaMS
14N	Major royal jelly protein MRJP2 (AAC61894)	51.44	45-29	100	-	NoM
15N	PREDICTED similar to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (XP_001120471)	27.08	< 29	91	-	PcaMS
16N	PREDICTED similar to CG17896-PB, isoform B (XP_393234)	56.74	< 29	73	-	PcaMS
17N	PREDICTED similar to Glutathione S-transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial (XP_624662)	17.68	< 29	96	-	PcaMS
18N	PREDICTED similar to Dyslexia susceptibility 1 candidate gene 1 protein (XP_394979)	40.72	< 29	78	-	PcaMS
19N	-	-	< 29	-	-	-

(**C**) operária campeira; (**N**) operária nutridora; (**MWt**) massa molecular teórica em kDa; (**MWe**) massa molecular experimental em kDa; (**Score**) determinado pelo *Mascot* (**Est'd Z**) determinado pelo *Profound*; (**PIQM**) potencial *motif* IQ; (**PcaMS**) potencial sítio ligante de CaM; (**UcM**) sítio ligante de CaM não-específico; (**NoM**) ausência de *motif* ligante de CaM.

Gráfico

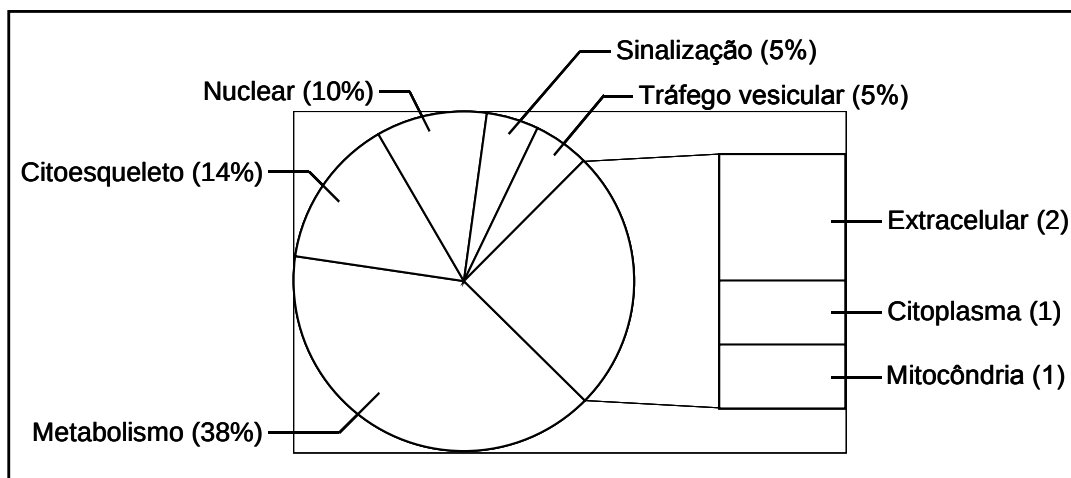


Gráfico 01. Classificação quanto a função e localização celular das 21 proteínas identificadas.

Referências Bibliográficas

Albert, S., Klaudiny, J. (2004) The MRJP/Yellow protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. J. Insect Physiol. 50, 51-59.

Alphey, L., Jimenez, J., Glover, D. (1998) A *Drosophila* homologue of oxysterol binding protein (OSBP) – implications for the role of OSBP. Biochem. Biophys. Acta 1395, 159-164.

Altfelder, K., Müller, U., Menzel, R. (1991) Ca^{+2} /calmodulin and Ca^{+2} /phospholipid-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem. 21, 479-486.

Bähler, M., Rhoads, A. (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. FEBS Lett. 513, 107-113.

Baumann, O. (1998) Association of spectrin with a subcompartment of the endoplasmic reticulum in honeybee photoreceptor cells. Cell Motil. Cytoskeleton 41, 74-86.

Baumann, O. (2001) Disruption of actin filaments causes redistribution of ryanodine receptor Ca^{+2} channels in honeybee photoreceptor cells. Neurosci. Lett. 306, 181-184.

Berggard, T., Arrigoni, G., Olsson, O., Fex, M., Linse, S., James, P. (2006) 140 mouse brain proteins identified by Ca^{+2} -calmodulin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. J. Proteome Res. 5, 669-687.

Berghard, A., Buck, L.B. (1996) Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. J. Neurosci. 16, 909-918.

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.

Brodin, L., Low, P., Shupliakov, O. (2000) Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 312-320.

Carafoli, E., Nicotera, P., Santella, L. (1997) Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium* 22, 313-319.

Chamberlain, L.H., Roth, D., Morgan, A., Burgoyne, R.D. (1995) Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis. *J. Cell Biol.* 130, 1063-1070.

Colombo, M.I., Beron, W., Stahl, P.D. (1997) Calmodulin regulates endosome fusion. *J. Biol. Chem.* 272, 7707-7712.

Corona, M., Hughes, K.A., Weaver, D.B., Robinson, G.E. (2005) Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1230-1238.

De Haro, L., Quetglas, S., Iborra, C., Leveque, C., Seagar, M. (2003) Calmodulin-dependent regulation of a lipid binding domain in the v-SNARE synaptobrevin and its role in vesicular fusion. *Biol. Cell* 95, 459-464.

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, 359-368.

Evans, J.D., Wheeler, D.E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.* 2, RESEARCH0001.

Fahrbach, S.E., Giray, T., Robinson, G.E. (1995) Volume changes in the

mushroom bodies of adult honey bee queens. *Neurobiol. Learn. Memory* 63,181-191.

Feder, M.E., Hofmann, G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Ver. Physiol.* 61, 243-282.

Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-247.

Gregorc, A., Bowen, I.D. (1999) In situ localization of heat-shock and histone proteins in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. *Cell. Biol. Int.* 23, 211-218.

Hardie, R.C., Raghu, P. (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413, 186-193.

Horibe, T., Gomi, M., Iguchi, D., Ito, H., Kitamura, Y., Masuoka, T., Tsujimoto, I., Kimura, T., Kikuchi, M. (2004) Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *J. Biol. Chem.* 279, 4604-4611.

Ikeda, K., Salvaterra, P.M. (1989) Immunocytochemical study of a temperature-sensitive choline acetyltransferase mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 280, 283-290.

Klee, C.B., Draetta, G.F.; Hubbard, M.J. (1988) Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 61, 149-200.

Korol, D.L., Gold, P.E. (1998) Glucose, memory, and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 764S-771S.

Kozlova, T., Perezgasga, L., Reynaud, E., Zurita, M. (1997) The *Drosophila*

melanogaster homologue of the hsp60 gene is encoded by the essential locus 1(1)10Ac and is differentially expressed during fly development. Dev. Genes Evol. 207, 253-263.

Kucharski, R., Maleszka, R. (1998) Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. Gene 211, 343-249.

Kucharski, R., Maleszka, R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. Genome Biol. 3, RESEARCH0007.

Kucharski, R., Maleszka, R., Hayward, D.C., Ball, E.E. (1998) A royal jelly protein is expressed in a subset of kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. Naturwissenschaften 85, 343-346.

Laemmli, U.K., Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 80, 575-579.

Larson, R.E., Espindola, F.S., Espreafico, E.M. (1990) Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. J. Neurochem. 54, 1288-1294.

Larson, R.E., Pitta, D.E., Ferro, J.A. (1988) A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. Braz. J. Med. Biol. Res. 21, 213-217.

Macbeath, G., Schreiber, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science 289,1760-1763.

Malek, A.A., Hy, M., Honegger, A., Rose, K., Brenner-Holzach, O. (1988) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Drosophila melanogaster*: primary structure analysis, secondary structure prediction, and comparison with vertebrate aldolases. Arch. Biochem. Biophys. 266, 10-31.

McGrath, L.M., Smith, S.D., Pennington, B.F. (2006) Breakthroughs in the search for dyslexia candidate genes. *Trends Mol. Med.* 12, 333-341.

Means, A.R. (2000) Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 14, 4-13.

Menzel, R., Giurfa, M. (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn. Sci.* 5, 62-71.

Menzel, R., Muller, U. (1996) Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 379-404.

Missirlis, F., Phillips, J.P., Jackle, H. (2001) Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 11, 1272-1277.

Muhlebach, S.M., Gross, M., Wirz, T., Wallimann, T., Perriard, J.C., Wyss, M. (1994) Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. *Mol. Cell Biochem.* 133-134, 245-262.

Newbell, B.J., Anderson, J.T., Jarrett, H.W. (1997) Ca^{2+} -calmodulin binding to mouse $\alpha 1$ syntrophin: syntrophin is also a Ca^{2+} -binding protein. *Biochemistry* 36, 1295-1305.

O'Day, D.H. (2003) CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. *Cell Signalling* 15, 347-354.

Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Eur. J. Biochem.* 249, 797-780.

Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T. (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur. J. Biochem.* 265, 127-133.

Peixoto, L.G., Calábria, L.K., Espindola, F.S. (2006) Identification and localization of major royal jelly related proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem. Mol. Biol. (*dispatched*)

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567.

Rhoads, A.R., Friedberg, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. FASEB J. 11, 331-340.

Rossenu, S., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1997) A phage display technique for a fast, sensitive, and systematic investigation of protein-protein interactions. J. Protein Chem. 16, 499-503.

Santos, K.S., dos Santos, L.D., Mendes, M.A., de Souza, B.M., Malaspina, O., Palma, M.S. (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 85-91.

Schmidt Capella, I.C., Hartfelder, K. (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honeybee ovary. Cell Tissue Res. 307, 265-272.

Shen, X., Valencia, C.A., Szostak, J.W., Dong, B., Liu, R. (2005) Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 5969-5974.

Sigg, D., Thompson, C.M.; Mercer, A.R. (1997) Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honeybee, *Apis mellifera*. J. Neurosci. 17, 7148-7156.

Smith, L.L. (1996) Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. Lipids 31, 453-487.

Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. (1990) Members of the 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved calmodulin-binding domain. *Mol. Cell Biol.* 10, 1234-1238.

Su, Y., Zhou, A., Al-Lamki, R.S., Karet, F.E. (2003) The α -subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans. *J. Biol. Chem.* 278, 20013-20018.

Taipale, M., Kaminen, N., Nopola-Hemmi, J., Haltia, T., Myllyluoma, B., Lyytinen, H., Muller, K., Kaaranen, M., Lindsberg, P.J., Hannula-Jouppi, K., Kere, J. (2003) A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11553-11558.

The honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931-949.

Timakov, B., Zhang, P. (2001) The hsp60B gene of *Drosophila melanogaster* is essential for the spermatid individualization process. *Cell Stress Chaperones* 6, 71-77.

Torroja, L., Ortuno-Sahagun, D., Ferrus, A., Hammerle, B., Barbas, J.A. (1998) Scully, an essential gene of *Drosophila*, is homologous to mammalian mitochondrial type II L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/amyloid-beta peptide-binding protein. *J. Cell Biol.* 141, 1009-1017.

Tsuchimoto, M., Aoki, M., Takada, M., Kanou, Y., Sasagawa, H., Kitagawa, Y., Kadowaki, T. (2004) The change of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoolog. Sci.* 21, 23-28.

Whitfield, C.W., Cziko, A.M., Robinson, G.E. (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302, 296-299.

Williams, C.H. Jr. (2000) Thioredoxin-thioredoxin reductase – a system that has come of age. *Eur. J. Biochem.* 267, 6101.

Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238-240.

Wolenski, J.S. (1995) Regulation of calmodulin-binding myosins. *Trends Cell Biol.* 5, 310-316.

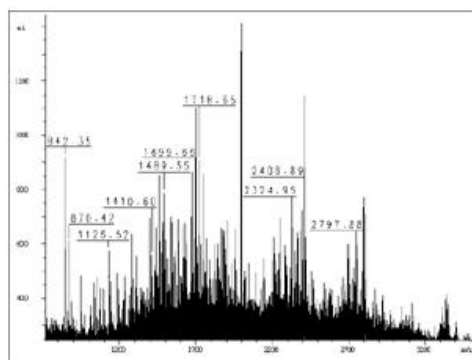
Zhang, W., Chait, B.T. (2000) ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal. Chem.* 72:2482-2489.

Anexos - Espectros e resultados da busca em bancos de dado *Mascot* e *Profound*

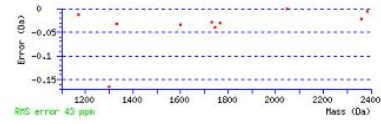
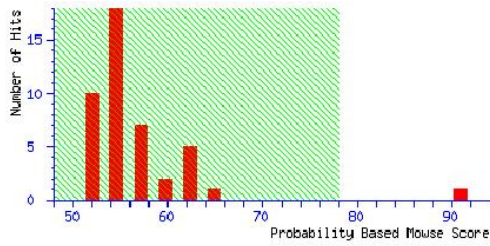
C2



[gi|110765224](#) **Mass:** 187667 **Score:** 112 **Expect:** 2.4e-05 **Queries matched:** 37
 PREDICTED: similar to Clathrin heavy chain CG9012-PA, isoform A isoform 1 [*Apis mellifera*]
[gi|71675519](#) **Mass:** 10542 **Score:** 46 **Expect:** 99 **Queries matched:** 6
 hypothetical protein TeryDRAFT_3046 [*Trichodesmium erythraeum* IMS101]

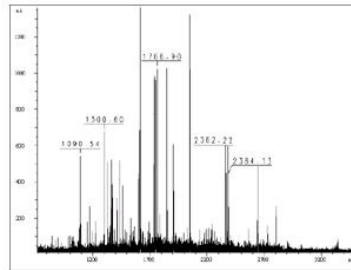


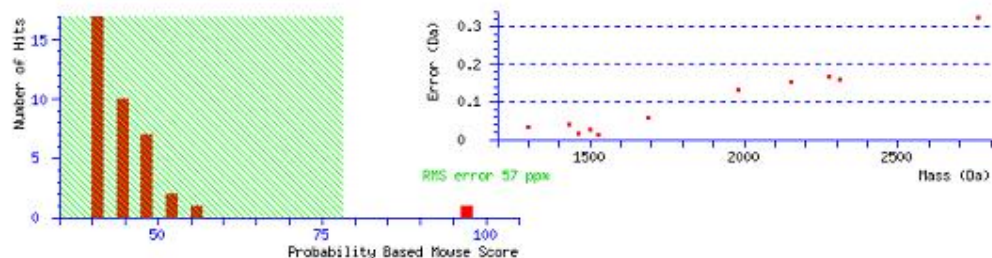
C3



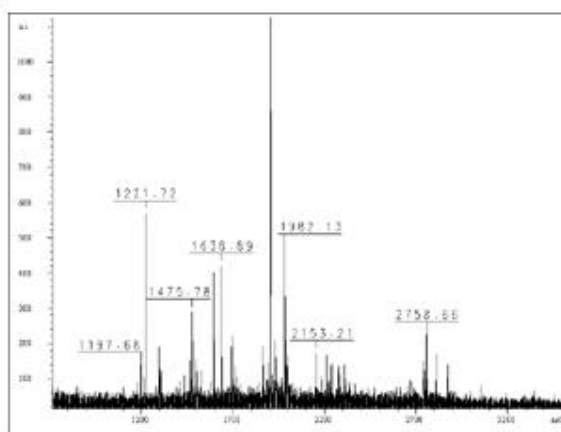
1. [gi|66512744](#) **Mass:** 75351 **Score:** 91 **Expect:** 0.003 **Queries matched:** 10
 PREDICTED: similar to Choline O-acetyltransferase (CHOACTase) (Choline acetylase) (Acetyl-CoA) (ChAT), partial [Apis]

2. [gi|67936039](#) **Mass:** 120862 **Score:** 66 **Expect:** 0.96 **Queries matched:** 10
 Protein of unknown function DUF323:NACHT nucleoside triphosphatase [Chlorobium phaeobacteroides DSM 266]



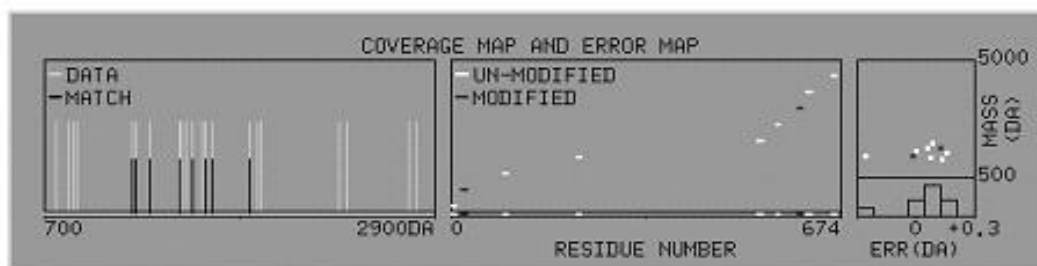


[gi|66537940](#) Mass: 72068 Score: 97 Expect: 0.00077 Queries matched: 11
 PREDICTED: similar to heat shock protein 8 isoform 1 [Apis mellifera]
[gi|25527326](#) Mass: 71784 Score: 47 Expect: 80 Queries matched: 7
 heat-shock protein 70 [Cotesia rubecula]

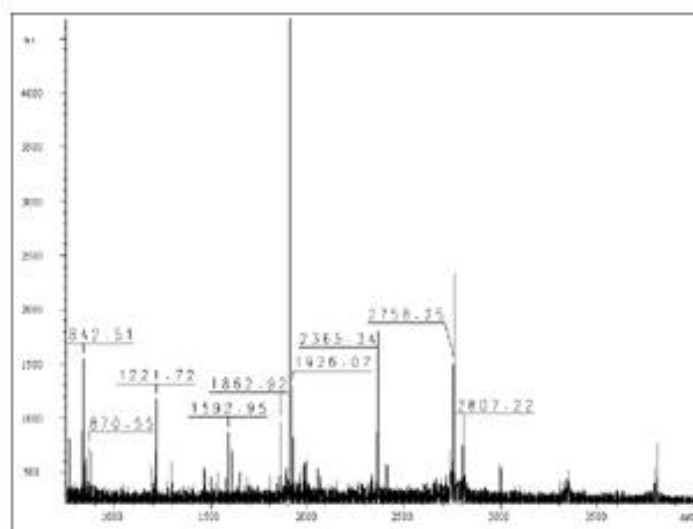


Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (I)	%	gV	kDa	®
+1	1.0e+000	2.30	I gi 48104289ref XP_392933.1 similar to heat shock cognate 70 protein [Apis mellifera]	25	5.4	71.41	®
2	1.4e-009	-	I gi 34910280ref NP_916487.1 helicase-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	9	9.2	139.19	®

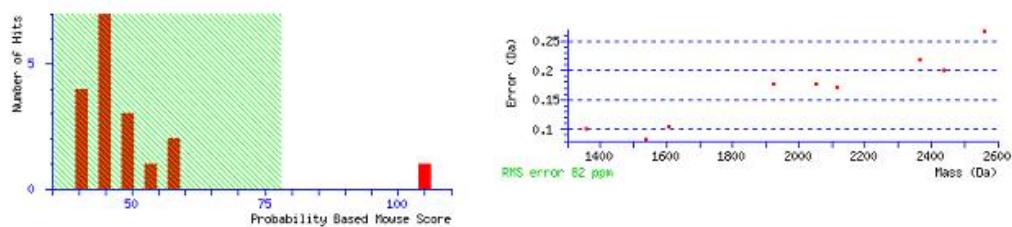
C5



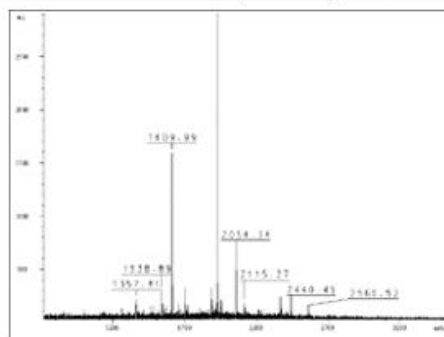
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	®
1	5.2e-001	0.23	T pI48101453refXP_392677.1 similar to RIKEN cDNA 9330199A09 gene [<i>Apis mellifera</i>]	15	9.2	79.85	®
2	1.6e-001	0.06	T pI39582763embCAE74228.1 Hypothetical protein CBG21912 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	13	6.2	36.98	®



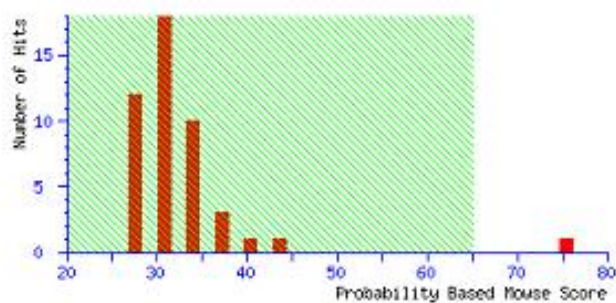
C6



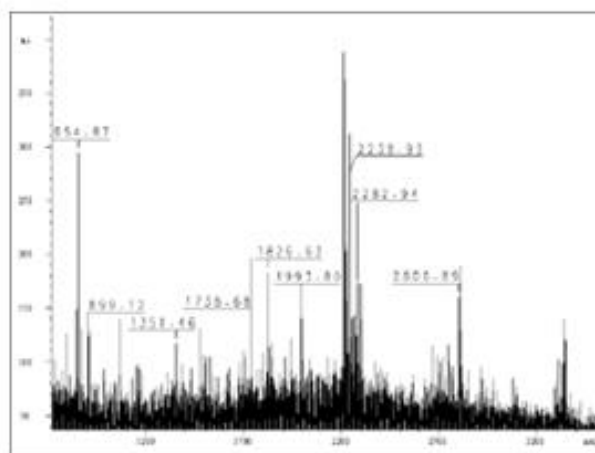
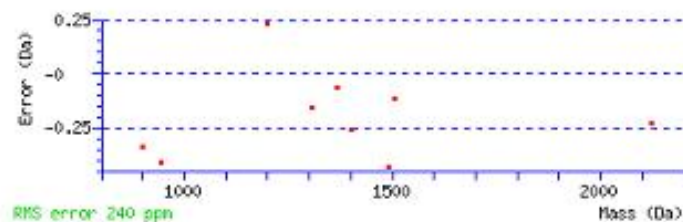
[gi|66547450](#) Mass: 60546 Score: **105** Expect: 0.00012 Queries matched: 9
 PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60)
[gi|109157751](#) Mass: 20184 Score: 50 Expect: 41 Queries matched: 4
 Chain B, The Crystal Structure Of The Human Rac3 In Complex With Gdp And Chloride



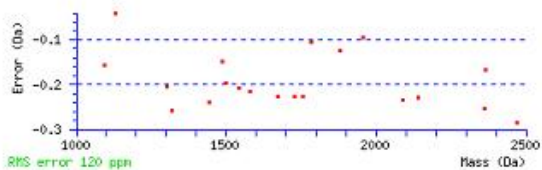
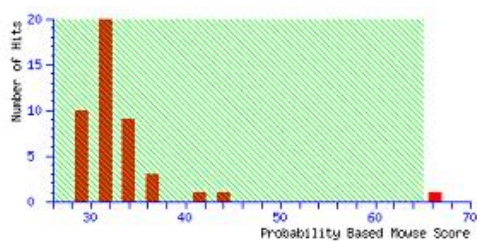
C7



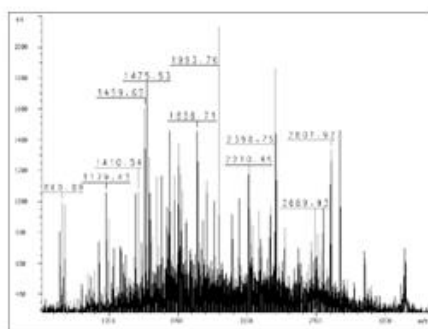
[gi|66535525](#) Mass: 25403 Score: 76 Expect: 0.0053 Queries matched: 9
 PREDICTED: similar to CG4511-PA [*Apis mellifera*]
[gi|15076618](#) Mass: 6310 Score: 33 Expect: 87 Queries matched: 3
 kynurenine 3-monooxygenase [*Bombyx mori*]



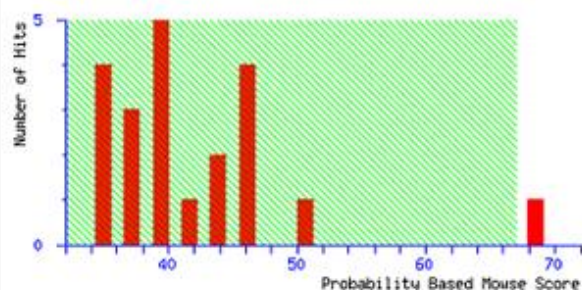
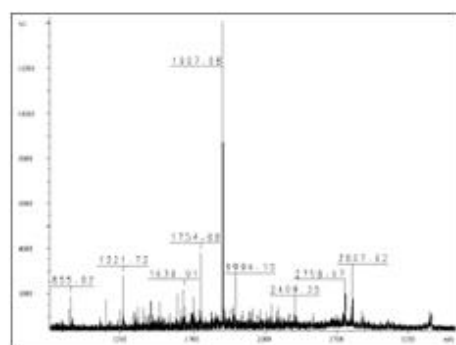
N2



[gi|66513649](#) Mass: 279152 Score: 66 Expect: 0.044 Queries matched: 20
 PREDICTED: similar to Spectrin alpha chain [Apis mellifera]
[gi|39593754](#) Mass: 33546 Score: 31 Expect: 1.4e+02 Queries matched: 5
 Hypothetical protein CBG06063 [Caenorhabditis briggsae]

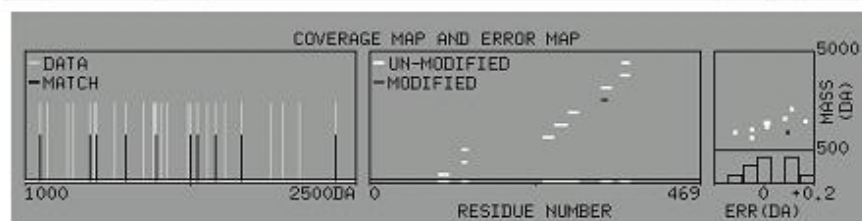


N3

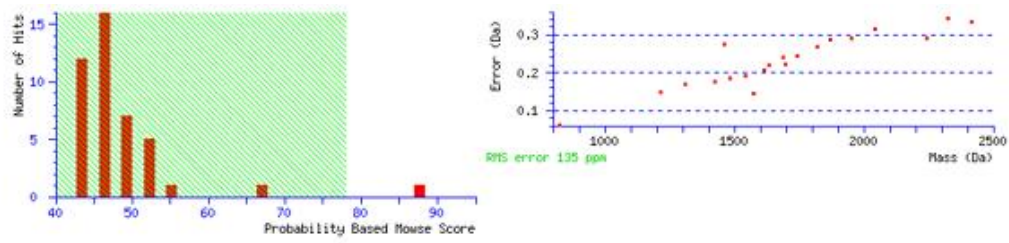


[Q06331](#) **Mass:** 50846 **Score:** 68 **Expect:** 0.041 **Queries matched:** 9
(TBA_OCTDO) Tubulin alpha chain Tubulin alpha chain
[P24635](#) **Mass:** 27343 **Score:** 52 **Expect:** 1.6 **Queries matched:** 6
(TBA_OCTVU) Tubulin alpha chain (Fragment) Tubulin alpha chain (Fragment)

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	gI	kDa	@
+1	1.0e+000	1.74	T p448112728refXP_396338.1 similar to putative alpha-tubulin [Apis mellifera]	23	5.0	53.18	@
2	4.9e-007	-	T p1181301084b[BAB3669.1] type 1 insulin-like growth factor receptor [Paralichthys olivaceus]	10	5.8	161.38	@

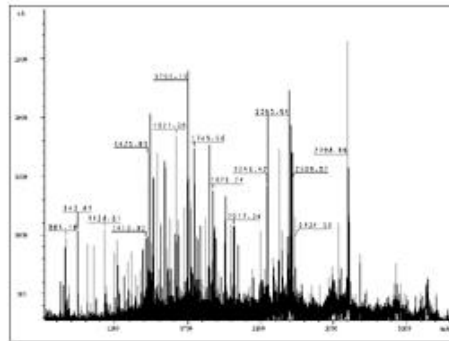


N4

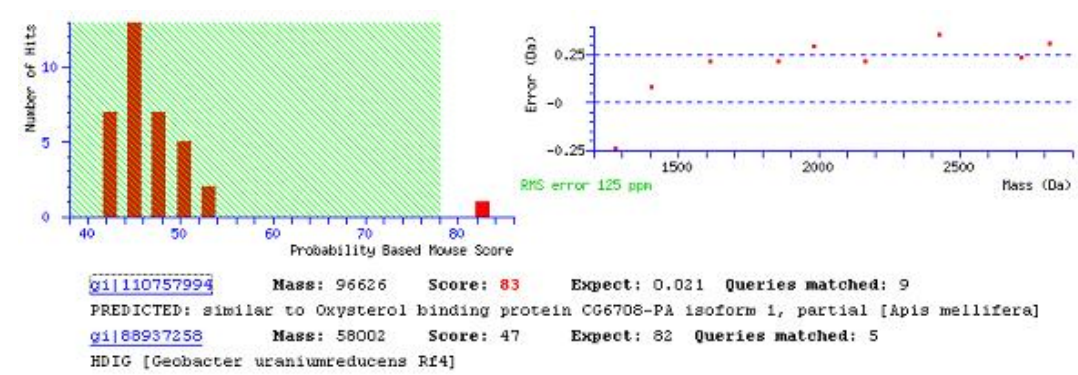


[gil110765224](#) Mass: 187667 Score: 88 Expect: 0.0069 Queries matched: 20
 PREDICTED: similar to Clathrin heavy chain CG9012-PA, isoform A isoform 1 [*Apis mellifera*]

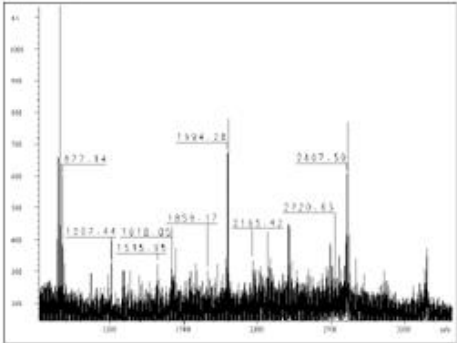
[gil17133726](#) Mass: 66673 Score: 66 Expect: 0.97 Queries matched: 11
 protease IV [*Nostoc* sp. PCC 7120]



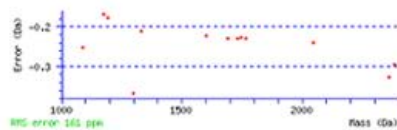
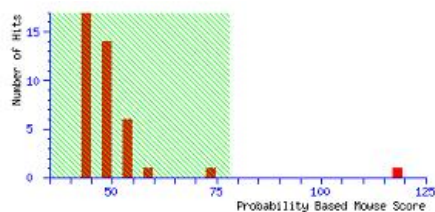
N5



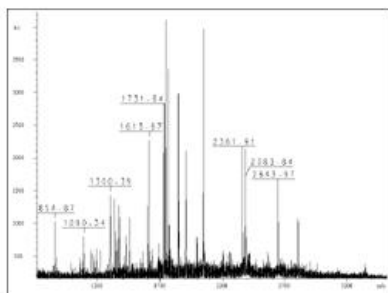
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	gi	kDa	@
1	1.0e+000	1.12	Tgi 48096523refXP_392480.1 similar to ENSANGP00000012534 [Apis mellifera]	14	5.9	98.34	@
2	4.5e-004	0.01	Tgi 31204043refXP_310971.1 ENSANGP00000019414 [Anopheles gambiae]	13	9.3	42.60	@



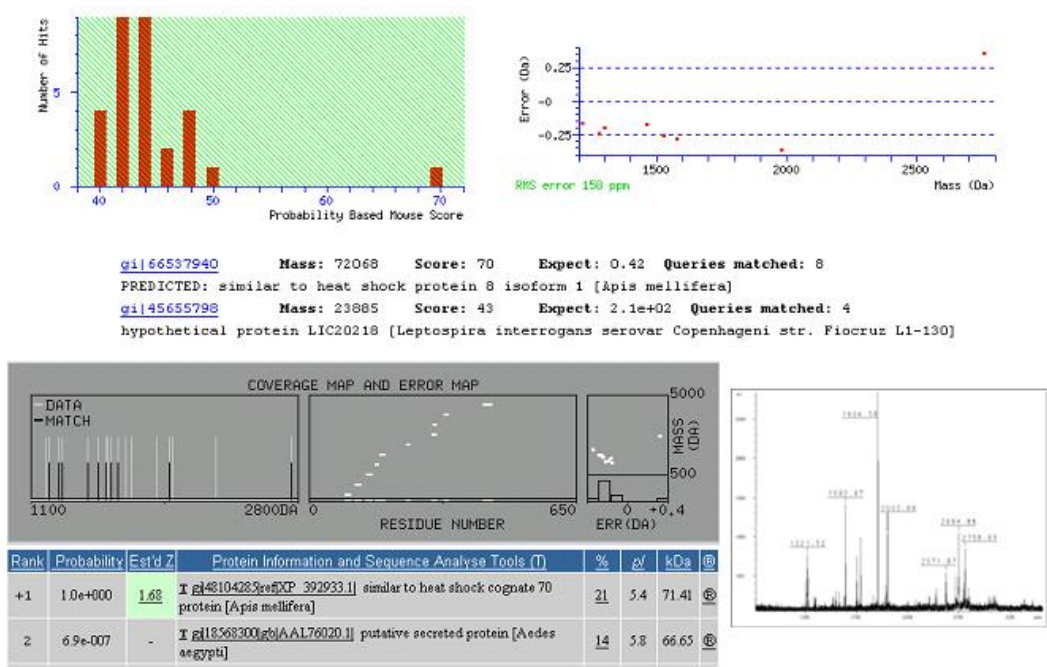
N6

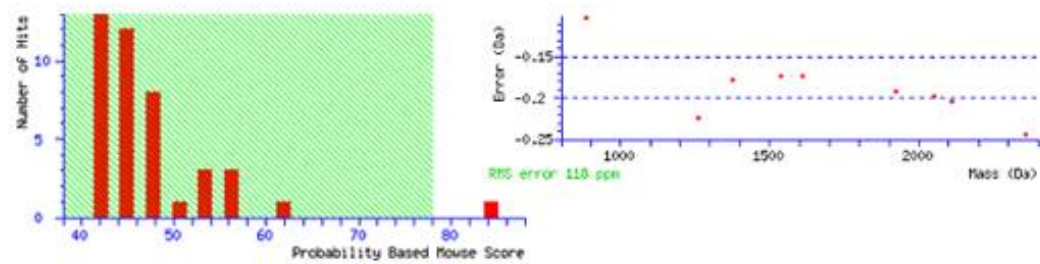


[gi166512744](#) Mass: 75351 Score: 118 Expect: 6.1e-06 Queries matched: 13
 PREDICTED: similar to Choline O-acetyltransferase (CHOACTase) (Choline acetylase) (Acetyl-CoA) (ChAT), partial [Apis mellifera]
[gi188604004](#) Mass: 28314 Score: 45 Expect: 1.2e+02 Queries matched: 5
 protein serine/threonine phosphatases [Methanospirillum hungatei JF-1]



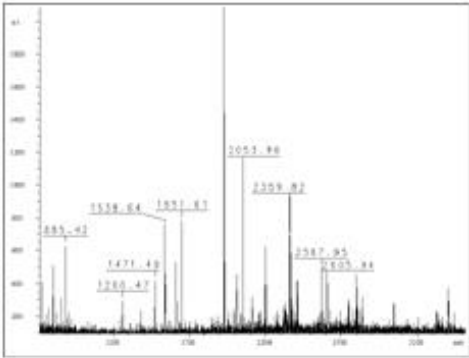
N7



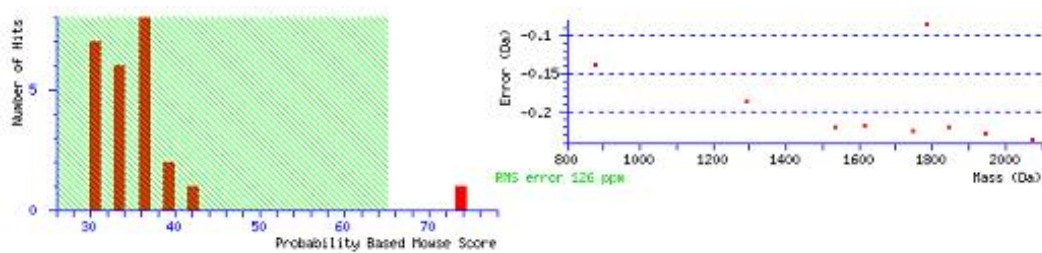


[gi|66547450](#) Mass: 60546 Score: 84 Expect: 0.014 Queries matched: 9
PREDICTED: similar to ENSANGP00000014839 [Apis mellifera]
[gi|10640762](#) Mass: 29792 Score: 46 Expect: 90 Queries matched: 5
conserved hypothetical protein [Thermoplasma acidophilum]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	gI	kDa	@
1	1.0e+000	1.19	X gi 48103847 ref XP_392899.1 similar to ENSANGP00000014839 [Apis mellifera]	22	5.2	49.61	@
+2	4.3e-005	-	X gi 2294196 db BAB02098.1 unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	14	5.7	96.97	@



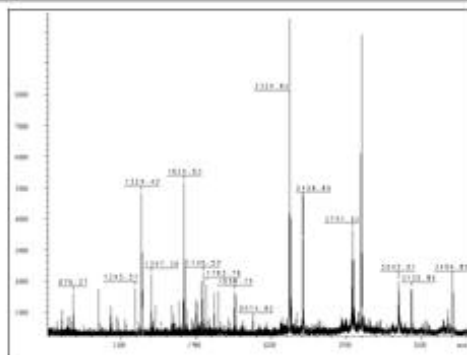
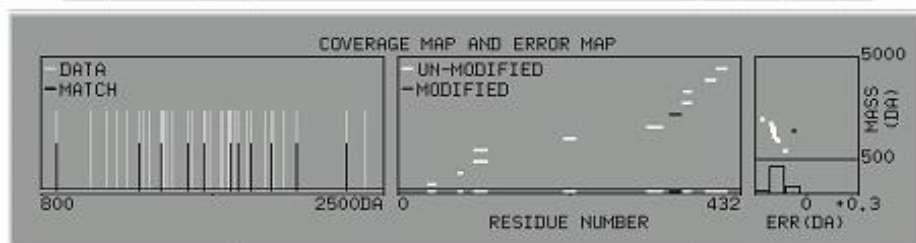
N9



[gi|58585098](#) Mass: 49319 Score: 74 Expect: 0.008 Queries matched: 9
major royal jelly protein 1 [Apis mellifera]

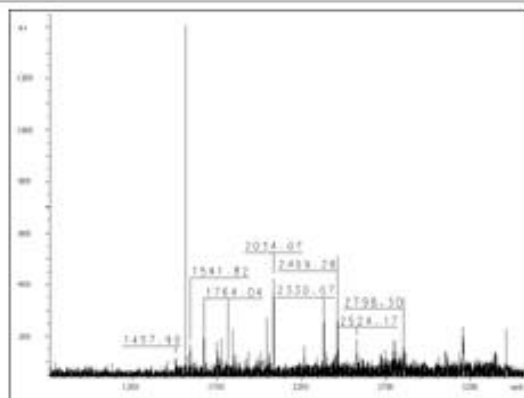
[gi|108878684](#) Mass: 27089 Score: 41 Expect: 15 Queries matched: 5
defective proboscis extension response, putative [*Aedes aegypti*]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analysis Tools (T)	%	pf	kDa	AB
1	1.0e+000	1.77	I p21666273 g4AAAMT3637.1 major royal jelly protein MRJP1 (Apis mellifera)	30	5.1	49.32	A0
2	6.6e-006	0.06	I p38107788 g4EAA53914.1 hypothetical protein MG09377.4 (Magnaporthe oryzae 70-15)	7	5.6	305.68	A0

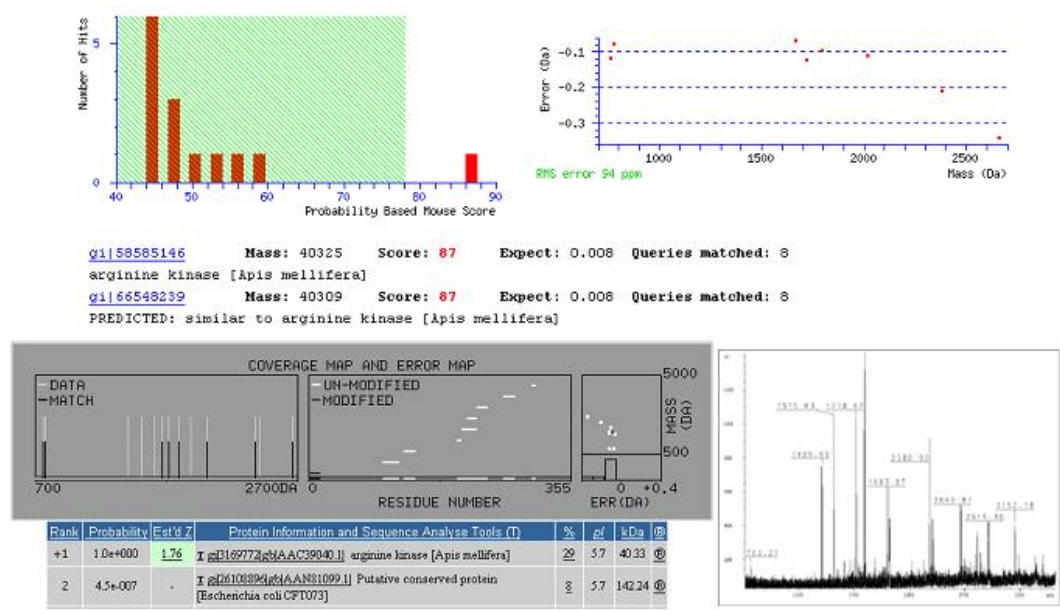


N10

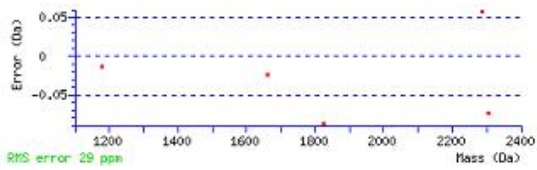
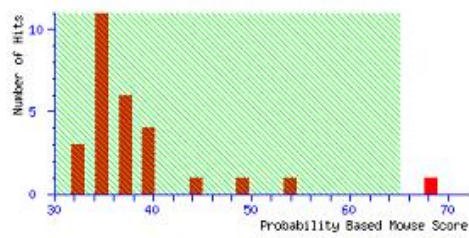
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	
+1	1.0e+000	1.68	I [31210879refXP_314406.1] ENSANGP00000015039 [Anopheles gambiae]	46	5.5	44.10	
2	4.9e-006	-	I [48142348refXP_393296.1] similar to ubiquitin specific protease 34 [Apis mellifera]	7	5.8	363.47	



N11

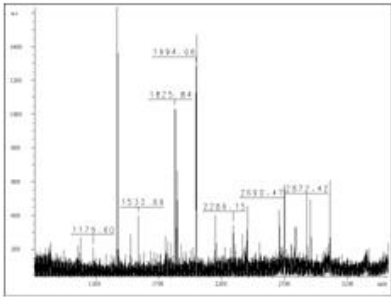


N12

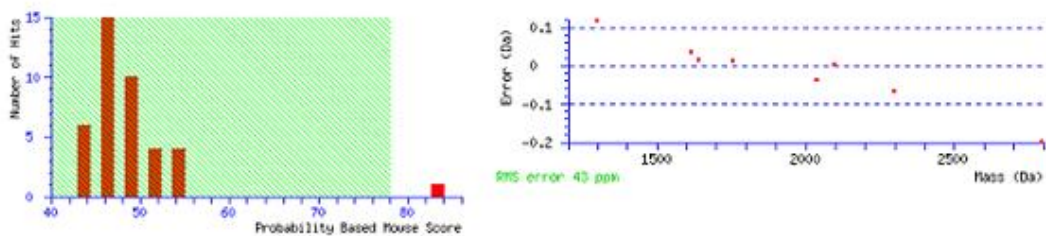


[gi|30026302](#) **Mass:** 38725 **Score:** 68 **Expect:** 0.028 **Queries matched:** 5
ODR-3 [Caenorhabditis remanei]
[gi|40887061](#) **Mass:** 35830 **Score:** 36 **Expect:** 45 **Queries matched:** 3
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cherax quadricarinatus]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (I)	%	pI	kDa	ÅB
+1	1.0e+000	1.20	gi 30026302 gb AA187175.1 ODR-3 [Caenorhabditis remanei]	24	5.1	38.73	ÅB
2	3.6e-004	0.19	gi 31217942 ref XP_316535.1 ENSANGP00000009995 [Anopheles gambiae]	16	7.0	39.41	ÅB

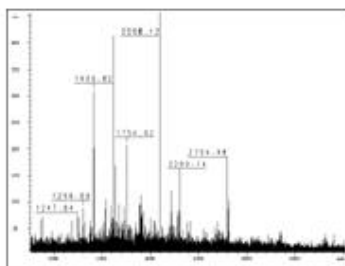


N13

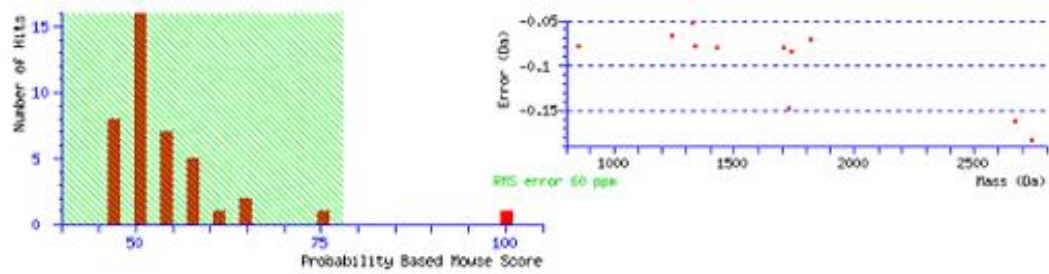


[gi|110748949](#) Mass: 39975 Score: 83 Expect: 0.018 Queries matched: 8
PREDICTED: similar to Aldolase CG6058-PF, isoform F [Apis mellifera]

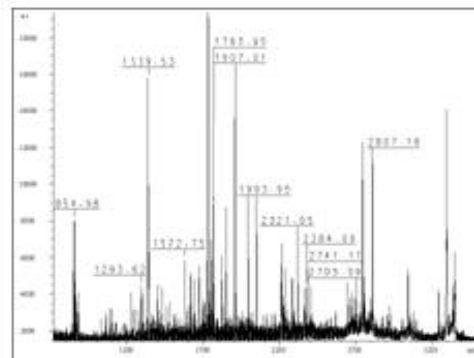
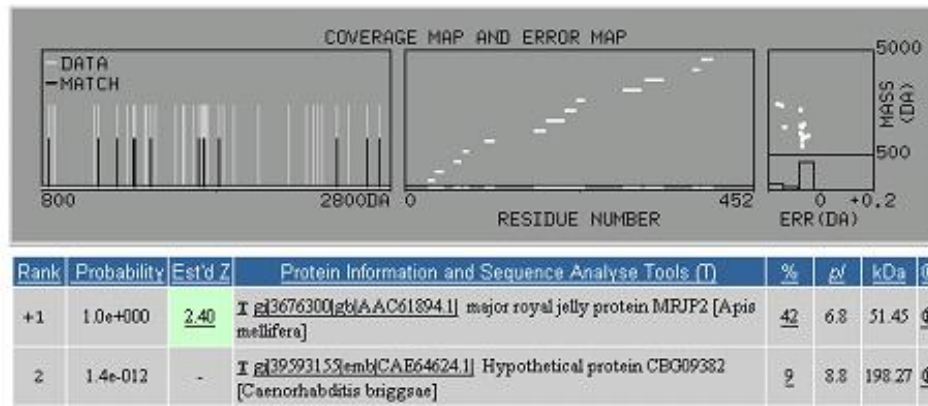
[gi|66499111](#) Mass: 40316 Score: 68 Expect: 0.59 Queries matched: 7
PREDICTED: similar to putative fructose 1,6-bisphosphate aldolase [Apis mellifera]



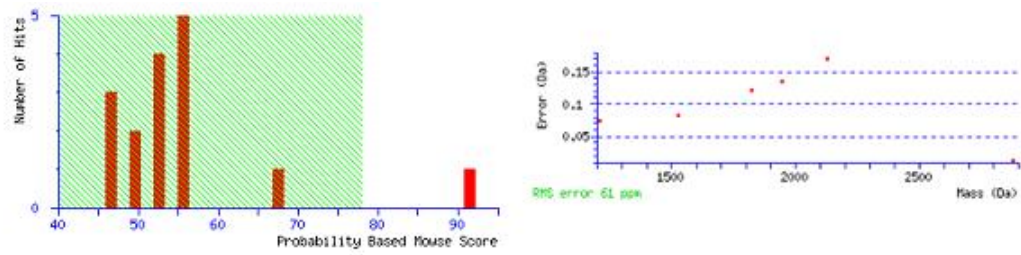
N14



[gi|3676300](#) Mass: 51441 Score: 100 Expect: 0.00038 Queries matched: 11
major royal jelly protein MRJP2 [Apis mellifera]
[gi|56532248](#) Mass: 51499 Score: 100 Expect: 0.00038 Queries matched: 11
PREDICTED: major royal jelly protein 2 [Apis mellifera]

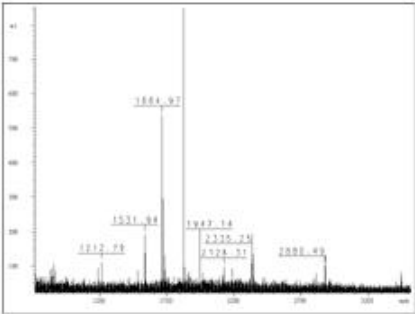


N15

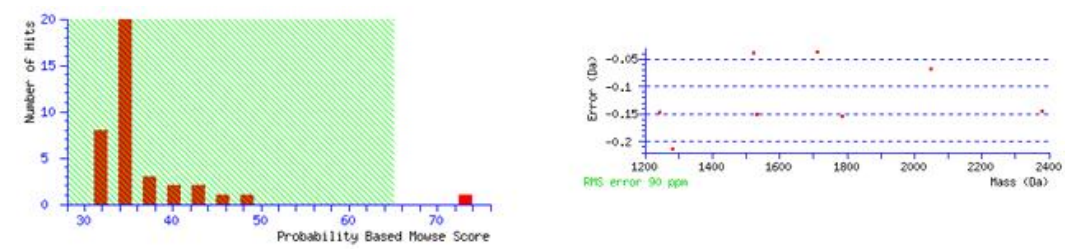


[gi|110760701](#) Mass: 27083 Score: 91 Expect: 0.0028 Queries matched: 6
PREDICTED: similar to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II)
[gi|73662578](#) Mass: 24539 Score: 54 Expect: 14 Queries matched: 4
cytidylate kinase [Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	(B)
1	1.0e+000	0.99	I [48104080ref]XP_395712.1 similar to ENSANGP00000015136 [Apis mellifera]	36	5.8	25.66	(B)
2	3.0e-003	0.16	I [48101800ref]XP_395219.1 similar to CG2999-PA [Apis mellifera]	5	5.8	328.69	(B)



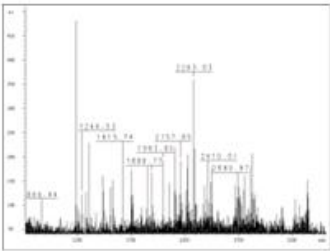
N16



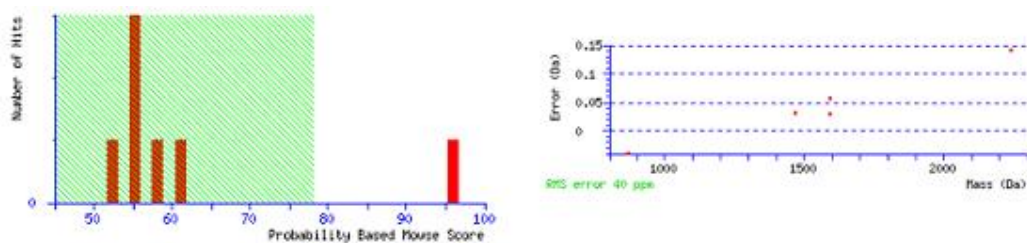
[gi|66523051](#) Mass: 56747 Score: 73 Expect: 0.0093 Queries matched: 8
PREDICTED: similar to CG17896-PB, isoform B [Apis mellifera]

[gi|20271378](#) Mass: 74486 Score: 49 Expect: 2.4 Queries matched: 7
C-type lectin domain protein [Heterodera glycines]

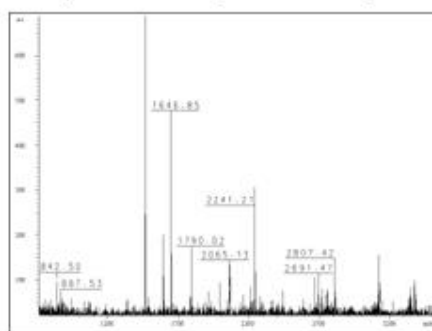
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (1)	%	gI	kDa	@
1	3.4e-001	0.38	I gi 48121292ref XP_393234.1 similar to ENSANGP00000022164 [Apis mellifera]	33	3.6	65.84	@
+2	4.9e-002	-	I gi 31209039ref XP_313486.1 ENSANGP000000021303 [Anopheles gambiae]	17	5.4	91.11	@



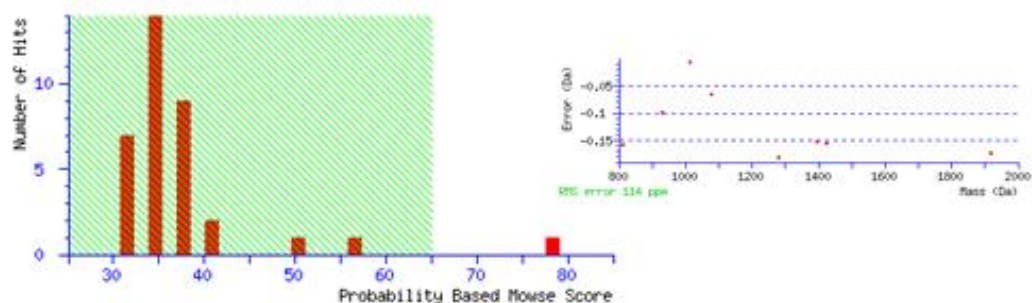
N17



[gi|66534655](#) Mass: 17689 Score: 96 Expect: 0.001 Queries matched: 5
 PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [Apis mellifera]
[gi|82500160](#) Mass: 32579 Score: 62 Expect: 2.6 Queries matched: 4
 Lipote synthase [Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903]



N18



[gi|110760150](#) Mass: 40720 Score: 78 Expect: 0.0028 Queries matched: 8
 PREDICTED: similar to Dyslexia susceptibility 1 candidate gene 1 protein [*Apis mellifera*]
[gi|72054267](#) Mass: 31165 Score: 37 Expect: 41 Queries matched: 4
 PREDICTED: similar to Ran-binding protein 3 (RanBP3) [*Strongylocentrotus purpuratus*]

