

Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M., Yonekura, M., 2001. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65, 277-284.

Kamikouchi, A., Morioka, M., Kubo, T., 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zoolog Sci.* 21, 53-62.

Kamikouchi, A., Takeuchi, H., Sawata, M., Natori, S., Kubo, T., 2000 Concentrated expression of Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in Mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Neurol.* 417, 501-510.

Kamikouchi, A., Takeuchi, H., Sawata, M., Ohashi, K., Natori, S., Kubo, T., 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Biochem Biophys Res Commun.* 242, 181-186.

Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S., Simuth, J., 1994. Molecular cloning of two cDNA from the heads of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) for coding related proteins of royal jelly. *J. Apic. Res.* 33, 105-111.

Knecht, D., Kaatz, H.H., 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honeybees. *Apidologie.* 21, 457–468.

Kloppenborg, P., 1995. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Neurol.* 363, 333-343.

Kubo, T., Sakani, M., Nakanura, J., Sasagawa, H., Ohashi, H, T., Natori, S., 1996. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J Biochem.* 119, 291-295

Kubota M., Tsuji M., Nishimoto M., Wongchawalit J., Okuyama M., Mori H., Matsui H., Surarit R., Svasti J., Kimura A., Chiba S., 2004. Localization of alpha-glucosidases I, II, and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of alpha-glucosidase in honey. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 2346-2352.

Kucharski, R., Maleszka, R., 2002. Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*). *Brain Res Mol Brain Res.* 99, 92-101.

Kucharski, R., Maleska, 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. I. DNA packaging events. *J Mol Biol.* 80, 575-599.

Lensky, Y., Rakover, Y., 1983. Separate protein body compartments of the workers honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp Biochem Physiol.* 75, 607–615.

Malecova, B., Ramser, J., O'Brien, J.K., Janitz, M., Judova, J., Lehrach, H., Simuth J., 2003. Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene.* 16, 165-175.

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

McLean, I.W., Nakane, P.K., 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2, 1077-1083.

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

Nagai, T., Inoue, R., 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. Food Sci. Agric. Chem. 84, 181-186.

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

Nässel, D.R., Helgee, A., Sivasubramanian, P., 1986. Development of axon paths of motoneurons after removal of target muscles in holometabolous insect. Brain Res. 391, 211-219.

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

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.

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, 797-802.

Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2003. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses *in vitro* and *in vivo*. J. Life Sci. 73, 2029-2045.

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

Salazar-Olivo L.A., Paz-Gonzalez V., 2005. Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Toxicol In Vitro. 19(5), 645-651.

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.

Sato, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2004. Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by Two Dimensional Gel Electrophoresis. J Agric Food Chem. 52, 15–20.

Schimitzová, J., Kloudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Shreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., Simúth, J., 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cell Mol Biol Res. 54, 1020-1030.

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

Simuth, U., 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Apidologie. 32, 69-80.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 4350-4354.

Tublitz, N., Brink, D., Broadie, K.S., Loi, P.K., Sylwester, A.W., 1991. Insect cardioactive peptides: cardioacceleratory peptide (CAP) activity is blocked *in vivo* and *in vitro* with a monoclonal antibody. Trends Neurosci. 14, 254-259.

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

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

**Identificação por *phage display* de mimetopos para MRJPs e
Imunolocalização de suas putativas proteínas alvo no cérebro da abelha
Apis mellifera L africanizada**

Capítulo 02

Resumo

As MRJPs são as principais proteínas hidrossolúveis da geléia real da abelha *Apis mellifera* L., com homologia restrita às proteínas Yellow descritas para *Drosophila melanogaster*. Os transcritos das MRJPs encontrados no cérebro da abelha operária e a localização das MRJPs em regiões específicas do cérebro da *A. mellifera* abriram perspectivas para o estudo de proteínas relacionadas às MRJPs no sistema nervoso da abelha. As regiões antigênicas da MRJP1 e a presença de proteínas sítio-ligantes com as MRJPs no cérebro da abelha foram investigadas a partir dos 21 peptídeos selecionados por *Biopanning* e gerados por phage display. O pool desses peptídeos foi usado como sonda para imunolocalizar proteínas sítio-ligantes com a MRJP1. Os sítios mapeados nessa proteína apresentaram-se repetidos em todas as outras MRJPs analisadas. Imunodetectou-se por *Western blotting*, das amostras dos fagos selecionados, os peptídeos imunoreativos que mimetizaram as regiões antigênicas da MRJP1. Imunolocalizou-se nos corpos de cogumelo, lobos ópticos e glândula hipofaríngea de todas as castas da abelha *A. mellifera* proteínas imunoreativas ao pool dos peptídeos gerados contra as MRJPs. Os resultados do presente estudo indicam a presença de proteínas sítio-ligantes com as MRJPs no sistema nervoso da abelha, sugerindo uma nova interação dessas proteínas com seus ligantes no cérebro da abelha *A. mellifera*.

Palavras-chave: geléia real, phage display, MRJPs, *Apis mellifera*

Abstract

The major royal jelly proteins (MRJPs) of *Apis mellifera* honeybee are water soluble proteins with restricted homology to Yellow proteins described for *Drosophila melanogaster*. MRJPs transcripts found in the workers honeybees brain and the MRJPs localization in specific regions of *A. mellifera* brain opened perspectives for the study about MRJPs related proteins in the honeybee nervous system. The MRJP1 antigenic regions and targets proteins to MRJPs in honeybee brain were investigated using 21 peptides selected by Biopanning and generated by phage display. The pool of these peptides was used as probe to immunolocalize MRJP1-putative binding protein. The MRJP1 identified sites had showed identicals regions in all the others MRJPs analyzed. The peptides that mimetize MRJP1 antigenic regions were immunodetected in the selected phage samples. The MRJP1 putative binding protein were immunolocalized in the mushroom bodies, optic lobes and hypopharyngeal gland of all the *A. mellifera* honeybee castes. This study appoints the presence of MRJPs binding proteins in the honeybee nervous system, suggesting a new interaction of these proteins with its ligands in *A. mellifera* honeybee brain.

Key words: royal jelly, phage display, MRJPs, honeybee

Introdução

As MRJPs são as principais proteínas hidrossolúveis da geléia real (GR) da abelha *Apis mellifera* L., com homologia restrita às proteínas Yellow descritas para *Drosophila melanogaster*, e com seqüências homólogas às encontradas no genoma da *Anopheles gambiae*. Em estudo prévio, produziu-se anticorpos contra as MRJPs que serviram como ferramentas para identificar proteínas relacionadas às MRJPs no cérebro e glândula hipofaríngea da abelha, confirmando outros estudos que mostraram a expressão de transcritos da MRJP1 no cérebro e da MRJP2 na cabeça dessa abelha (Peixoto *et al.*, 2006; Kucharski *et al.*, 1998; Kucharski e Maleszka, 2002). Para descobrir as seqüências reconhecidas por estes anticorpos empregou-se a tecnologia de phage display a fim de mapear possíveis epítomos das proteínas alvo. Os peptídeos que mimetizam as regiões antigênicas dessas proteínas serviram como sondas para imunolocalizar no cérebro da abelha, proteínas que potencialmente interagem com as MRJPs. Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos (phage display) é uma ferramenta importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas, nos quais uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior de sua parede protéica, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (Azzazy e Highsmith, 2002).

A GR é secretada a partir das glândulas cefálicas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas operárias jovens *Apis mellifera* (Nagai *et al.* 2004; Knecht e Kaatz, 1990; Lensky e Rakover, 1983; Sato *et al.*, 2004). Nesta abelha, a determinação das castas pode ser regulada pela expressão diferencial de genes, pelo nível hormonal e pelo tempo em que a larva é alimentada com GR (Evans e Wheeler, 1998). Dentre as proteínas da GR destacam-se as proteínas hidrossolúveis (WSP) (Schimitszová *et al.*, 1998). As WSP melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da GR (MRJPs).

O cDNA e o mRNA das MRJP1 e MRJP2 foram identificados, através de *microarray* e *Northern blot*, na cabeça da abelha operária campeira de *A. mellifera*, sugerindo que o transcrito da MRJP2 é diferencialmente expresso na abelha operária (Kucharski e Maleszka, 2002). Hibridização *in situ* realizada em cortes de cérebro dessa abelha mostrou que o transcrito da MRJP1 localiza-se especificamente nas células kenyon compactadas internas, uma população de

neurônios dos corpos de cogumelo, sendo essa neuropila envolvida no processo primário de informação, aprendizado e memória (Kucharski *et al.*, Evans e Wheeler, 1998).

A família de MRJPs é constituída por cinco membros principais: MRJP1 (57kDa), MRJP2 (49kDa), MRJP3 (60-70kDa), MRJP4 e MRJP5 (77-87kDa). Além dessas, relata-se mais três MRJPs (MRJP6 – MRJP8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera*. As MRJP1 à MRJP5, representam 82% do total das WSPs e cerca de 90% do total de proteínas da GR (Albert e Klaudiny 2004, Hanes e Simuth, 1992; Ohashi *et al.*, 1997; Schimitzova *et al.*, 1998; Simuth, 2001). A análise proteômica da glândula hipofaríngeal da *A. mellifera*, revelou 61 diferentes polipeptídeos, dos quais 27 eram isoformas das MRJP1 à MRJP8 (Santos *et al.*, 2005). Além de seqüências das oito MRJPs citadas, uma seqüência adicional denominada MRJP9 está depositada no NCBI.

Esforços em determinar funções de novos produtos gênicos identificados por seqüenciamento de genomas têm se tornado um importante desafio científico. Identificar proteínas que interajam com estes novos produtos gênicos pode ajudar na dedução de sua ação, regulação e função (Benhar, 2001). Dessa forma, tem se investigado por phage-display epítomos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas (Benhar, 2001); a determinação antigênica do parasita da malária, *P. falciparum* (Willis *et al.*, 1993) e a exposição de peptídeos em superfície tecido-específico (Trepel *et al.*, 2002; Pasqualini e Ruoslahti, 1996).

Neste estudo, o anticorpo anti-MRJP1 obtido do soro de coelho imunizado com a GR foi empregado na técnica de phage display para reconhecer primariamente seqüências antigênicas das MRJPs. Por *biopanning* obteve-se 21 peptídios imunoreativos possibilitando mapear, por bioinformática, prováveis regiões antigênicas da MRJP1 e sugerir um alinhamento de suas seqüências mais antigênicas dentre as MRJPs. Além disso, investigou-se com estes peptídeos, que mimetizam seqüências imunoreativas às MRJPs, a potencial imunolocalização de proteínas alvo no cérebro da *A. mellifera*.

Material e métodos

Anticorpos

Neste trabalho utilizou-se os anticorpos produzidos por Peixoto et al., (2006).

Deteção de polipeptídios por Western blotting.

Os polipetídeos separados em SDS-PAGE (Laemili *et al.*, 1973) foram eletrotransferidos em corrente constante 100mA, por 12 horas a 4°C, para membrana de nitrocelulose 0,45µm, utilizando tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 190mM glicina, 20% metanol) (Towbin *et al.*, 1979). A membrana foi corada com solução de 5% Ponceau em 0,3% ácido tricloroacético. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, a membrana foi incubada com solução bloqueio (SB) (leite desnatado 5%, TBS acrescido de 0,1% Tween 20 (TBS-T) e azida sódica 0,03%) por 4 horas a temperatura ambiente. Lavou-se a membrana de nitrocelulose com TBS-T 3 vezes 5 minutos. Em seguida, incubou-se a membrana com o anti-MRJP1 por 12 horas a 4°C e com o anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado com fosfatase alcalina por 3 horas a 4°C. O *blotting* foi revelado com NBT/BCIP.

Biopanning

Em uma placa de microtitulação (Maxisorp; Nunc) de 96 poços foi adsorvido 150µl de anti-MRJP1 (100µl/ml) em 0,1 M NaHCO₃, pH 8.6 e incubada “overnight” a 4°C. A placa foi bloqueada com 250µl de tampão 0,1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5mg/ml BSA por 2 horas a 4°C. A placa foi lavada 6 vezes com TBS-T. Então, foi acrescentada no mesmo orifício da placa uma biblioteca de 2x10¹¹ fagos (*Ph, D – 12 mer- New England Biolabs*) diluídos em 100µl de TBS-T e mantidos sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos lavando 10 vezes com TBS-T no primeiro passo e, nos subseqüentes passos do “*Biopanning*” com TBS-T (0,5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com 100µl do tampão 0,2 M glicina-HCl, pH 2.2 contendo 1 mg/ml BSA por 10 minutos a temperatura ambiente e imediatamente neutralizado com 15µl do tampão 1M Tris-HCl, pH 8.0. Pequenas alíquotas do eluído de fagos (1µl) foram utilizadas para a titulação. O eluído remanescente foi utilizado para a amplificação dos

fagos para o próximo ciclo da infecção de *E. Coli* ER 2537. Foram realizados 4 ciclos do *Biopanning*.

Inicialmente, retirou-se uma colônia (isolada) de ER2738 previamente crescida em meio sólido LB com tetraciclina. Esta colônia foi incubada em meio LB líquido sob agitação até atingir a fase de crescimento mid-log ($OD_{600} = 0,5$). A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriadas em meio LB. Para eluidos não amplificados, foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^4 , e para os eluidos amplificados foram utilizadas as diluições de 10^8 até 10^{11} . Então, em cada diluição foi acrescentado 200µl da cultura de ER2738 na fase *mid-log*. Essa mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células, assim infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3ml de Agarose top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e Tetraciclina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas. Após este período, colônias azuis foram contadas determinando o título.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Para o teste de ELISA sensibilizou-se uma placa de microtitulação NUNC com 1µg/poço do anti-MRJP1 em tampão bicarbonato 0,06M pH 9.6 (1,0M $NaHCO_3$, 1M Na_2CO_3 anidro) em um volume final de 100µl/poço. Lavou-se a placa por 3 vezes com PBS-T 0,05%. Em seguida incubou-se a placa com 250µl de solução bloqueio (PBS-T 0,05%; BSA 3%) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavou-se a placa 3 vezes com PBS-T 0,05%. Posteriormente, adicionou-se 50µl dos fagos amplificados e purificados na placa por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa por 6 vezes com PBS-T 0,05%. Sondou-se com 100µl/poço de anticorpo anti-M13 (*Monoclonal Antibody da Amersham Biosciences*) diluído 1:5000 em solução bloqueio por 1 hora à 37°C. Lavou-se por mais 6 vezes com PBS-T 0,05% para a revelação. Essa foi realizada utilizando 100 µl de tampão citrato (citrato-fosfato 0,1M; 100µl de OPD/Álcool Metílico 10mg/ml; 1µl de H_2O_2 a 30%). A reação foi neutralizada adicionando 10µl/poço de 4M H_2SO_4 .

Extração de DNA

Na extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda dos ciclos do *Biopanning* foram transferidas para microtubos de 2ml, contendo 1ml de meio LB líquido com tetraciclina. A cada tubo foi adicionada apenas uma colônia. Os tubos foram incubados a 37°C por 6 horas, sob vigorosa agitação (250 rpm) para isolar os fagos das bactérias. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm a 4°C, durante 30 segundos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e recentrifugado. Apenas 80% do sobrenadante resultante da segunda centrifugação foi transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos, com 200µl de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução autoclavada). Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µl de tampão iodeto (10mM de tris-HCl pH 8.0, 1mM de EDTA e 4M de NaCl) foi adicionado ao precipitado de fagos.

Os tubos foram agitados vigorosamente e em seguida foi acrescentado 250µl de Etanol absoluto. Após uma incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (14000 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado dos fagos foi lavado com 500µl de Etanol 70% e recentrifugado. O precipitado remanescente foi diluído em 10µl de água desionizada. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de Agarose 1%.

Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado utilizando o *Kit Big Dye Terminator* (Pharmacia) utilizando o seqüenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o primer – 96 M13 – (5'- HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG –3' - *Amersham Biosciences*) o qual flanqueia a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos, fusionado aos fagos M13 recombinantes pela hibridação na região 96 pb *downstream*.

Imunohistoquímica

Os cérebros foram dissecados e fixados em 4% paraformaldeído conforme descrito por McLean & Nakane (1974). Em seguida, os cérebros foram desidratados em bateria crescente de álcool etílico (50%, 75%, 90% e 100%, 30 minutos cada) e xilol (30 minutos), e parafinizados (30 minutos). Cortes de 5µm foram montados em lâmina previamente tratadas com 0.2% gelatina-cromo, desparafinizados e hidratados (xilol, álcool etílico 100%, 70% e 50%) 5 minutos cada. Após a hidratação, as secções foram submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena com 4.5% água oxigenada em tampão salina-fosfato por 15 minutos e à incubação com tampão 0.1M Tris-glicina, pH 7.4 por 30 minutos; tampão B (20 mM fosfato de sódio, pH 7.4; 0.4 M NaCl; 0.3% Triton X-100) acrescido de 5% leite desnatado por 4 horas. Em seguida, adicionou-se o pool de fagos seqüenciados imunoreativos com anti-MRJP1 diluído 1:50 por 18 horas em temperatura ambiente. Lavou-se as lâminas com o tampão B por 1 hora à temperatura ambiente; adicionou-se o anticorpo secundário (anti-M13) conjugado com peroxidase, diluído 1:200 por 45 minutos. Para a revelação, utilizou-se 10 mg/mL DAB (3, 3'- diaminobenzidina) e a reação foi interrompida com água. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina Harris e desidratados (álcool etílico 50%, 70%, 100% e xilol). As lâminas foram montadas com entelan e lamínula.

Análise de dados pela Bioinformática

A tradução da seqüência dos aminoácidos obtidas no seqüenciamento foi feita pelo programa DNA2PRO12 (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

Para análise da estrutura secundária e de suas propriedades bioquímicas da MRJP1, tais como: antigenicidade, probabilidade de exposição e hidrofiliidade, utilizou-se o programa DnaStar - Lasergene (subprograma Protean).

As homologias de cada peptídeo, individualmente ou não, com a MRJP1, foram testadas utilizando o programa MATCH (<http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>) e pelo programa CLUSTAL W (18.1) (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cg>).

Resultados

Análise das identidades entre as MRJPs pelo programa Clustal W

Foram encontradas 44 seqüências referentes às MRJPs usando a palavra-chave “MRJP AND “*Apis mellifera*””. Através da análise dessas seqüências (utilizando o programa Clustal W (18.1)) identificamos 9 MRJPs (MRJP1 à MRJP9) que apresentaram as maiores identidades, as quais foram agrupadas em classes a partir de combinação binária das identidades (1-2; 1-3; 1-4...; 2-3; 2-4...). Essa análise determinou que a classe MRJP5 apresentou a menor correlação entre as identidades quando comparada com as demais classes das MRJPs. A análise das identidades também revelou que as classes das MRJP1, MRJP2, MRJP6 e MRJP7 apresentaram as maiores médias de correlação das identidades (tabela 01).

Titulação, amplificação, extração e seqüenciamento do DNA dos fagos positivos

A análise da titulação dos ciclos do *Biopanning* mostrou a quebra do substrato X- Gal (coloração azul e setas), indicando a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pela bactéria ER2738 (Fig-01a, a'). A quantidade de fagos amplificados ou não, que foram utilizados nos ciclos do *Biopannings* foi plotada na figura 01b. Os títulos de início (*input*) dos ciclos comparados com os títulos finais mostraram-se menores, indicando que os fagos com maior afinidade pelo anti-MRJP1 tiveram interação paratopo/mimetopo e o restante dos fagos com baixa e/ou sem afinidade foram removidos (Fig- 01b).

Os DNAs dos fagos expressos nas bactérias foram visualizados no gel de agarose 1%. Esses fagos apresentaram em sua superfície os polipeptídeos imunoreativos com o anti-MRJP1. Aqueles DNAs com massa de aproximadamente 7250pb (M13mp18 Single strands; DNA control) foram utilizados para o seqüenciamento, tradução e posterior análise de bioinformática (Fig- 01c) gerando 21 peptídeos que foram plotados na tabela 02, juntamente com sua forma invertida.

Imunodeteccção da proteína pIII de fagomídios por *Western blotting*

Para averiguar quais fagos corresponderiam a regiões imunoreativas do antígeno, sondamos os 21 clones seqüenciados com o anti-MRJP1. A análise por

western blotting revelou que 81% dos fagos eram imunoreativos com o anti-MRJP1, sendo que os fagos (seq12- B10), (seq4- B12), (seq14- E03) e (seq5- E06) não apresentaram marcação quando sondados com esse anticorpo. Observamos também que o anti-MRJP1 foi específico para o peptídeo pIII, não reconhecendo outros peptídeos no homogeneizado de bactérias (Fig-02).

Análise da estrutura secundária e regiões antigênicas pelos softwares RELIC e Protean

A análise da estrutura secundária da MRJP1 correlacionada com o alinhamento dos 21 peptídeos imunoreativos com o anti-MRJP1 determinou 4 regiões antigênicas indicadas pelo sublinhado (Fig-03a). Essas regiões, pela análise do *predict protein serve*, mostraram-se altamente hidrofílicas. Foram encontradas na primeira região antigênica da MRJP1, três alças com índice de confiabilidade > 5, as quais o anti-MRJP1 reconheceu como possíveis sítios de detecção. Essas alças provavelmente se encontram voltadas para o lado externo da proteína, devido à alta hidrofilicidade e reação cruzada com o anticorpo. Na segunda região, as alças foram as formas mais reconhecidas pelo anti-MRJP1 e da mesma maneira, elas provavelmente se encontram voltadas para o lado externo da proteína, apresentado índice de confiabilidade > 6. Essa foi a região protéica que apresentou mais de 52% dos sítios de ligação para o anti-MRJP1. Na terceira região antigênica, os sítios imunoreativos com o anti-MRJP1 encontraram-se em uma região da proteína, na qual não houve predição da estrutura secundária pelo software utilizado. O índice de antigenicidade e hidrofilicidade nessa região apresentou-se alto. Por fim, na quarta região, observamos que os sítios de ligação do anticorpo pela proteína se subdividiram em três regiões, sendo as duas primeiras alças e a terceira uma folha estendida. As três sub-regiões apresentaram índices de confiabilidade > 6. As duas primeiras apresentaram 45% dos aminoácidos reconhecidos pelo anti-MRJP1 e a terceira apresentou 20%. Porém, a sub-região folha estendida apresentou hidrofilicidade e antigenicidade maior que as duas primeiras sub-regiões. As regiões antigênicas analisadas pelo programa *Protean* concordam com as regiões onde o anti-MRJP1 se ligou na proteína MRJP1, apresentando índice de antigenicidade maior que 1.5 (Fig-03b).

A análise dos alinhamentos determinou as regiões idênticas, mostradas pelos asteriscos, das principais MRJPs. O alinhamento das MRJPs e a análise pelo software protean identificou sete principais regiões antigênicas da MRJP1, as quais se repetiram entre as MRJPs. Essas regiões antigênicas encontram-se na figura 04 delimitadas pelos quadrados.

Imunolocalização de proteínas sítio-ligantes no cérebro da abelha *A. mellifera*

Nas figuras 05–08, cortes dos cérebros, das diferentes castas da abelha *A. mellifera*, foram imunomarcados com o pool dos fagos imunoreativos ao anti-MRJP1, os quais mimetizaram as regiões antigênicas das MRJPs. A marcação das proteínas sítio-ligantes, representada pela coloração castanho (indicada pelas setas), foi observada nos lobos ópticos e corpos de cogumelo das abelhas rainha, zangão e operária, bem como na glândula hipofaríngeal da abelha nutridora. Nas neuropilas, das células da lâmina, da medula e camada fenestrada dos lobos ópticos das abelhas rainha, zangão e operárias, a marcação referente ao pool dos fagos imunoreativos com anti-MRJP1 foi pontual, observada através da formação de agregados castanhos nessas regiões (Fig- 05-08). A análise dessas regiões, em maior aumento, evidenciou a marcação pontual dos fagos, os quais mimetizaram proteínas alvo das MRJPs. Nos neurônios, denominados de células Kenyon, dos corpos de cogumelo da abelha rainha, zangão e campeira, a marcação, referente ao pool dos fagos imunoreativos com aquele anticorpo, foi observada nas células Kenyon dessas três castas (Fig- 05-07) e nos cálices das abelhas zangão e campeira (Fig- 06-07). A análise da imunolocalização dos fagos imunoreativos nas glândulas cefálicas da abelha nutridora evidenciou distinta marcação entre as glândula hipofaríngeal e salivar. A glândula hipofaríngeal apresentou marcação pontual enquanto que nas glândulas salivares não houve detecção (Fig-08 G-I). Os controles apresentaram marcação rósea devido a coloração com hematoxilina. Porém, essa coloração não invalida as detecções específicas dos prováveis sítios de interação com a MRJP1, anteriormente analisadas, visto que há uma diferença clara entre elas.

Predição das possíveis funções da MRJP1 pelo fatigo

A análise da MRJP1 pelo programa *Fatigo* determinou possíveis funções para essa proteína na abelha. As funções foram preditas comparando a MRJP1 com proteínas parálogas (proteínas com alta identidade, similaridade e homologia com proteínas de outros organismos) da *D. melanogaster*. A primeira possível função da MRJP1 é como componente intracelular; outras funções previstas para a MRJP1 são: ligantes de ácidos nucleicos e proteínas e constituinte estrutural da cutícula. Ao analisar os possíveis processos biológicos da MRJP1, observamos que essa proteína tem funções na morfogênese, desenvolvimento embrionário, metabolismo, determinação de sexo, regulação nos processos fisiológicos dentre outros (Fig-09).

Figuras

	MRJP1	MRJP2	MRJP3	MRJP4	MRJP5	MRJP6	MRJP7	MRJP8
MRJP1								
MRJP2	0,107							
MRJP3	0,120	0,004*						
MRJP4	0,627	0,000*	0,787					
MRJP5	0,005*	0,000*	0,002*	0,001*				
MRJP6	0,286	0,819	0,002*	0,004*	0,000*			
MRJP7	0,460	0,907	0,011*	0,018*	0,002*	0,256		
MRJP9	0,286	0,13	0,703	0,727	0,157	0,032*	0,056	
MRJP9	0,056	0,040*	0,645	0,585	0,580	0,010*	0,015*	0,000*

Tabela 01: **Correlação entre as médias das identidades das MRJPs (1 – 9) pelo programa Clustal W (18.1).** Os asteriscos indicam a menor correlação entre as identidades nas classes das MRJPs pela análise do teste t-Student para amostras independentes com um $p < 0.05$.

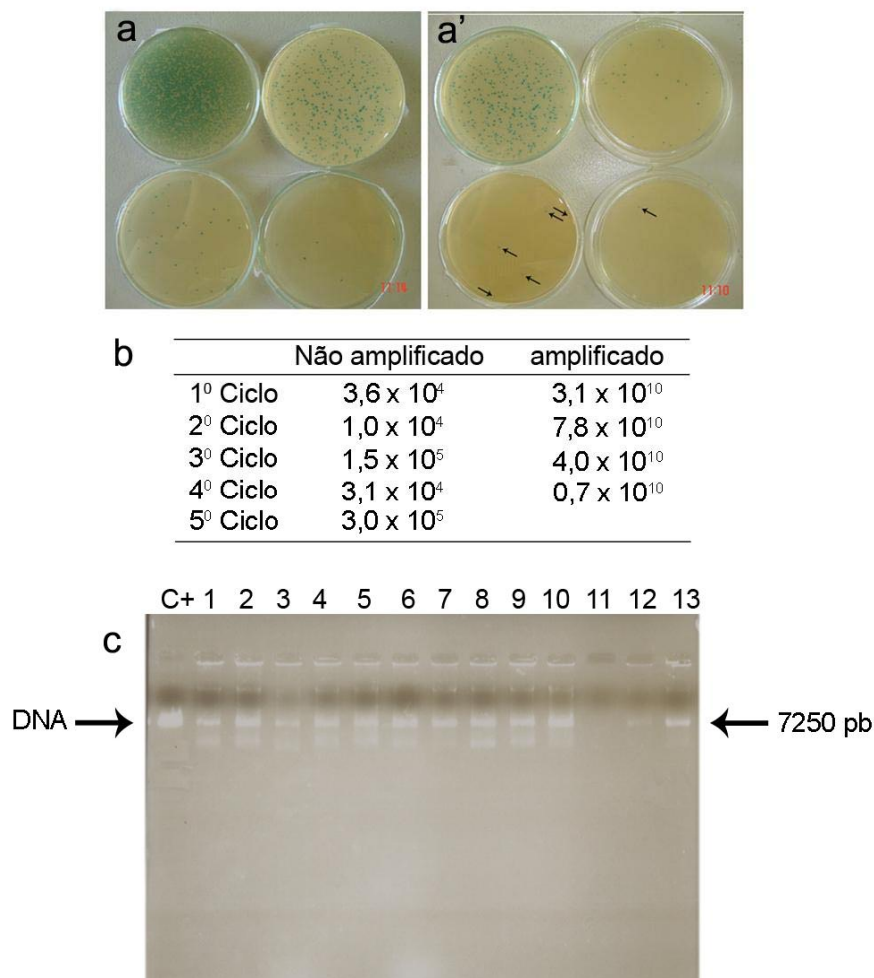


Figura 01: **Titulação, amplificação e extração do DNA plasmidial referente aos polipeptídeos imunoreativos com o anti-MRJP1.** **a; a'**- ciclos de seleção (**a**) não amplificado e (**a'**) amplificado. As setas indicam colônias positivas de bactérias contendo os fagos que interagiram com o anti-MRJP1. **b**- Titulação dos eluatos obtidos durante os 5 ciclos do *biopanning*. **c**- controle helper com 7250 pb. Os números 1 – 13 são DNAs de fagos aleatórios.

	Não invertida	Invertida		Não invertida	Invertida
seq1 (D07)	DHYHMSWHMPSTV	VSPMHWSMHYHD	Seq12(B10)	MYPKHMMVWAHS	SHAWVMHHKPYM
seq2 (F06)	HMHLSMHRMSAW	WASMRHMSLHMH	seq13(D06)	QHHHNMQSHHMR	RMHHSQMNHSHQ
seq3 (A11)	MPWHHRPLYPNL	LNPLYLPRHHWPM	seq14(C03)	MGMDMHASRSHR	RHSRSAHMDMGM
seq4 (B12)	HSINIQTMRHQM	MQHRMTQINISH	seq15(C01)	SVEHHQMMHRSR	RSRHMMQHHEVS
seq5 (E06)	MSWYSSACAYGA	AGYACASSYWSM	seq16(H06)	LMPHHMMARTP	LPTRAMMHHPML
seq6 (H05)	LQMHVTHPPWMT	TMWPPHTVHMQL	seq17(G12)	MDTMNTMKVPHH	HHPVKMTNMTDM
seq7 (A07)	HMMPLMAPVRLH	HLRVPAMLPMMH	seq18(H12)	NPPIHMMHMHTL	LTHMHHMHIPPV
seq8 (E01)	HPLRMPMHHDHP	PHDHHMPMRLPH	seq19(F10)	LPTSHTMMTSMQ	QMSTMMTHSTPI
seq9 (C06)	WGGNWMHHRAPP	PPARHHMWNGGW	seq20(D05)	MMKQPNNHSSTP	PTSSHNNPQKMM
seq10 D04)	GWRMHHPMYLTP	PTLYMPHHMRWG	seq21(E02)	SPPHSHSMRMHQ	QHMRMSHSHPPS
seq11 D11)	MMHSHNPQDLHA	AHLDQPNHSHMM			

Tabela 02: **Seqüências dos peptídeos reativos com o anti-MRJP1.** As seqüências foram plotadas em sua forma transcrita (não invertida) e em sua forma invertida.

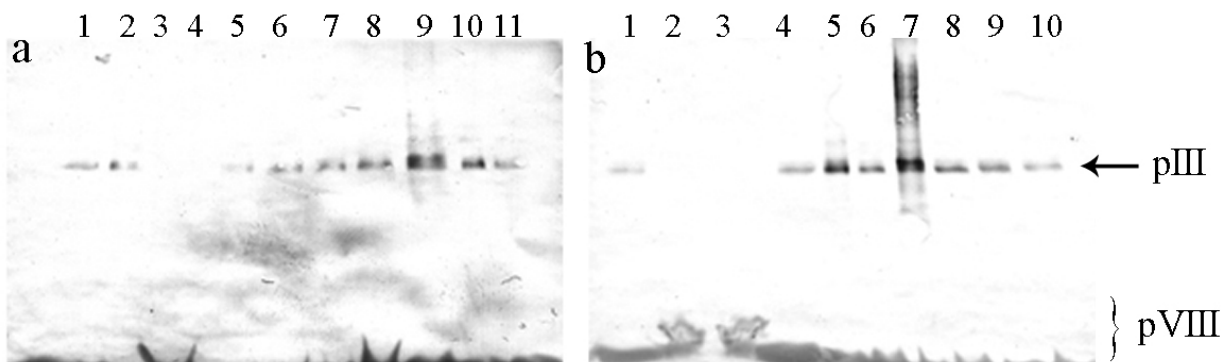


Figura02: Imunodeteção da proteína pIII de fagos expressos em bactérias ER2738. Os peptídeos dos clones dos fagos positivos foram analisados por Western blotting. **a-** 1 – 11 indicam as seqüências 1 (seq7- A07); (seq1- D07); 2 (seq13- D06); 3 (seq20- D05); 4 (seq10-D04); 5 (seq9- C06); 6 (seq15- C01); 7 (seq4- B12); 8 (seq12- B10); 9; 10 (seq3- A11); 11 (seq11- D11). **b-** 1 – 10 indicam as seqüências 1 (seq18- H12); 2 (seq16- H09); 3 (seq6- H05); 4 (seq17- G12); 5 (seq19- F10); 6 (seq2- F06); 7 (seq5- E06); 8 (seq14- E03); 9 (seq21- E02); 10 (seq8- E01).

Figura 03: Predição da estrutura secundária da MRJP1 da *Apis mellifera* e, mapeamento das regiões antigênicas desta proteína. A: seqüência de aminoácidos (AA) estrutura secundária (OBS_sec), α -hélice (H), estendido (folha β -pregueada) (E), alça (branco), previsão de estrutura secundária (PROF_sec), α -hélice (H), Estendido (folha β -pregueada) (E), alça (branco), índice de confiabilidade da previsão da estrutura secundária (Rel_sec) (0- baixo a 9- alto). subtópico da predição PROFsec, para todos os resíduos com uma media esperada de significância > 82% (SUB_sec), folha β -pregueada (E), alça (L), nenhuma previsão de estrutura secundária (ponto) (confiabilidade < 5), acessibilidade à solvente observada em três fases (O_3_acc): b = 0-9%, i = 9-36%, e = 36-100%, previsão relativa de acessibilidade a solvente em três fases (P_3_acc): b = 0-9%, i = 9-36%, e = 36-100%. índice de confiabilidade para a previsão PROFacc (Rel_acc) (0- baixo a 9- alto), da predição para todos os resíduos com uma média esperada de significância > 69% (SUB_acc). Os sublinhados indicam regiões antigênicas. B: Índices de antigenicidade preditas para as regiões selecionadas da MRJP1 com o anticorpo anti-MRJP1 de acordo com o programa Protean (Lasergene softwares).

Figura 04: **Análise das identidades das MRJP1 – MRJP5 utilizando o programa Clustal W (18.1) e determinação dos sítios antigênicos dessas proteínas.** As regiões antigênicas ao anti-MRJP1 foram colocadas em destaque delimitando-as através de quadrados.

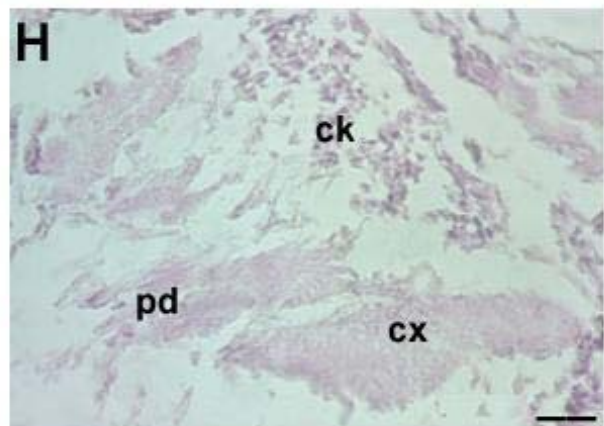
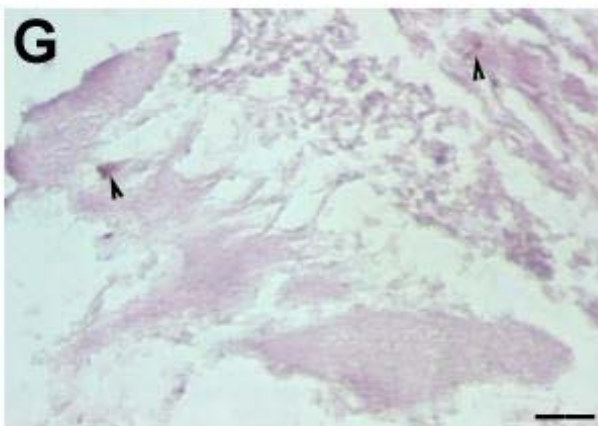
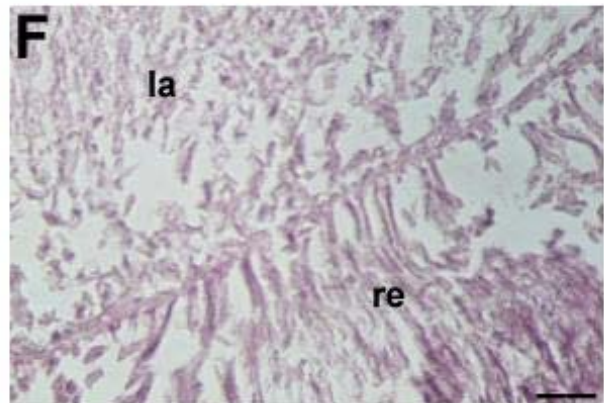
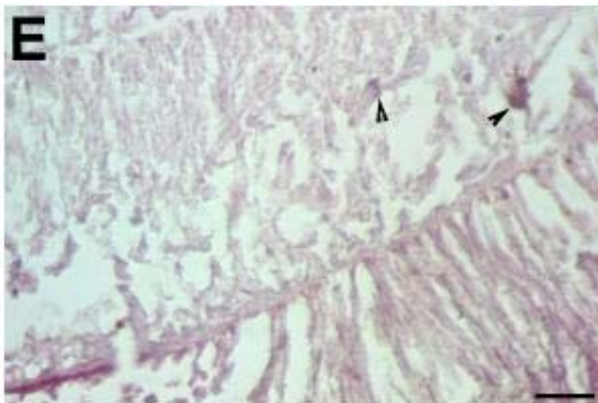
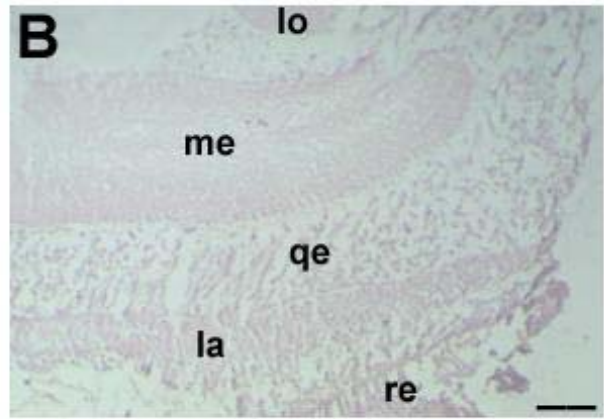
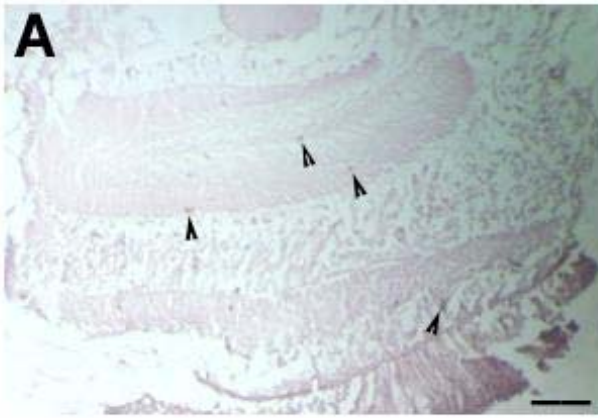


Figura 05: Imunomarcaco das possíveis proteínas que interagem com as MRJPs no cérebro da abelha rainha de *Apis mellifera*. A-H - marcação em castanho (cabeça de seta). A-F - imunolocalização intensa e pontual de possíveis proteínas-sítios ligantes com as MRJPs no lobo óptico: A-B - panorâmica das neurópilas: (A) imunodetecco na medula (me) e na lamina (la), (B) controle, bar = 400 µm. C-D - detalhe das células da medula, (C) marcação pontuada, (D) controle, bar = 40 µm. E-F - detalhe das células da lâmina (la), (E) marcação pontuada, (F) controle, bar = 40 µm. G-H - imunomarcaco pontuada do pool dos fagos seqüenciados nos corpos de cogumelo: (G) Imunodetecco nas células Kenyon (ck), (H) controle, bar = 40 µm.

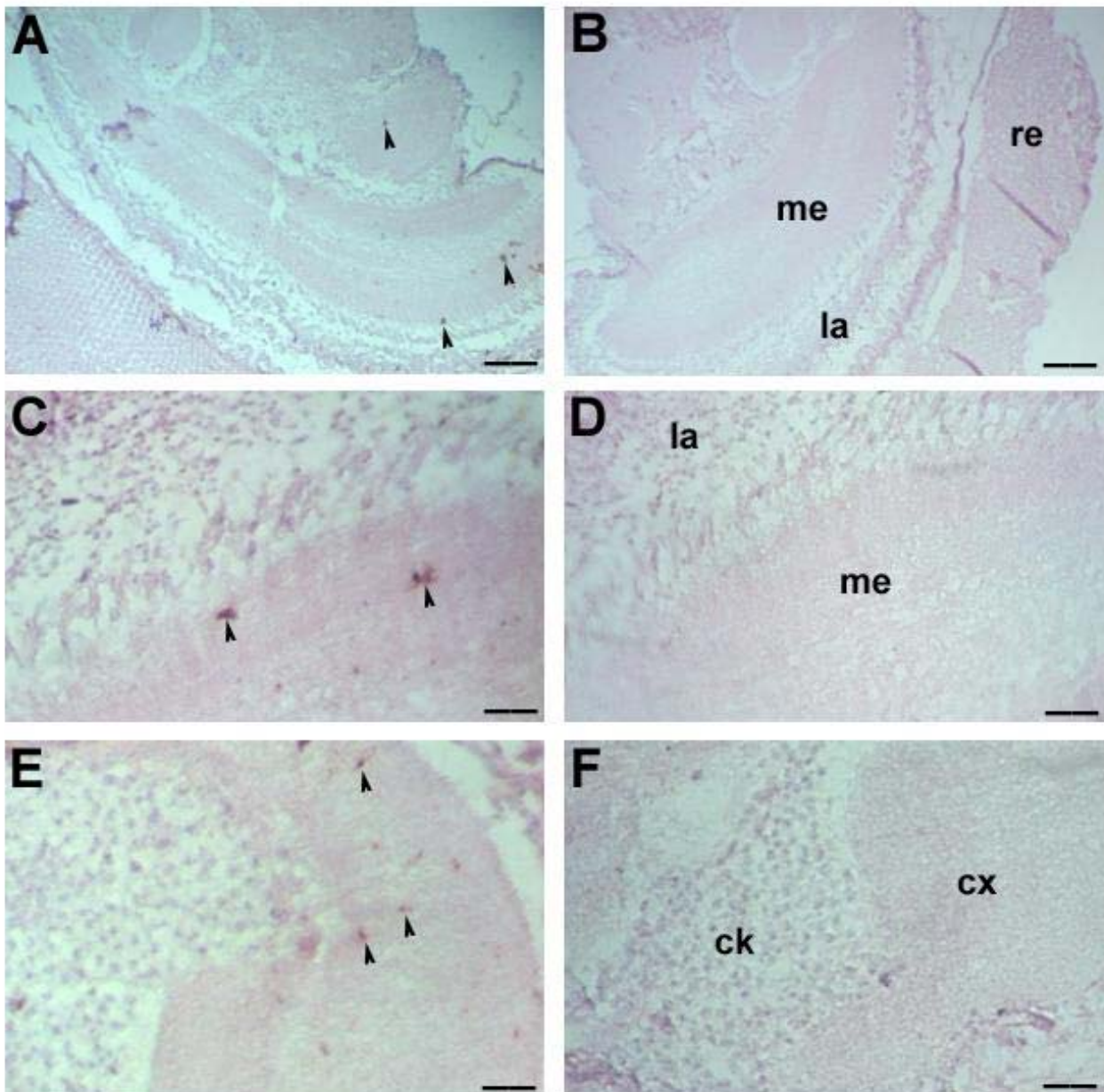


Figura 06: **Imunomarcaco das possíveis proteínas que interagem com a MRJPs no cérebro da abelha zangão de *Apis mellifera*.** A-F - marcação em castanho (cabeça de setas). A-D - Imunolocalização intensa e pontual de possíveis proteínas-sítios ligantes com as MRJPs no lobo óptico: A-B - panorâmica das neurópilas: (A) Imunodetecco na medula (me) e na lamina (la). (B) controle, bar = 400 µm. C-D - detalhe das células da neurópilas, (C) marcação pontuada, (D) controle, bar = 40 µm. E-F - imunolocalização pontuada do pool dos fagos seqüenciados nos corpos de cogumelo: (E) imunodetecco nos cálices (cx), (F) controle, bar = 40 µm.

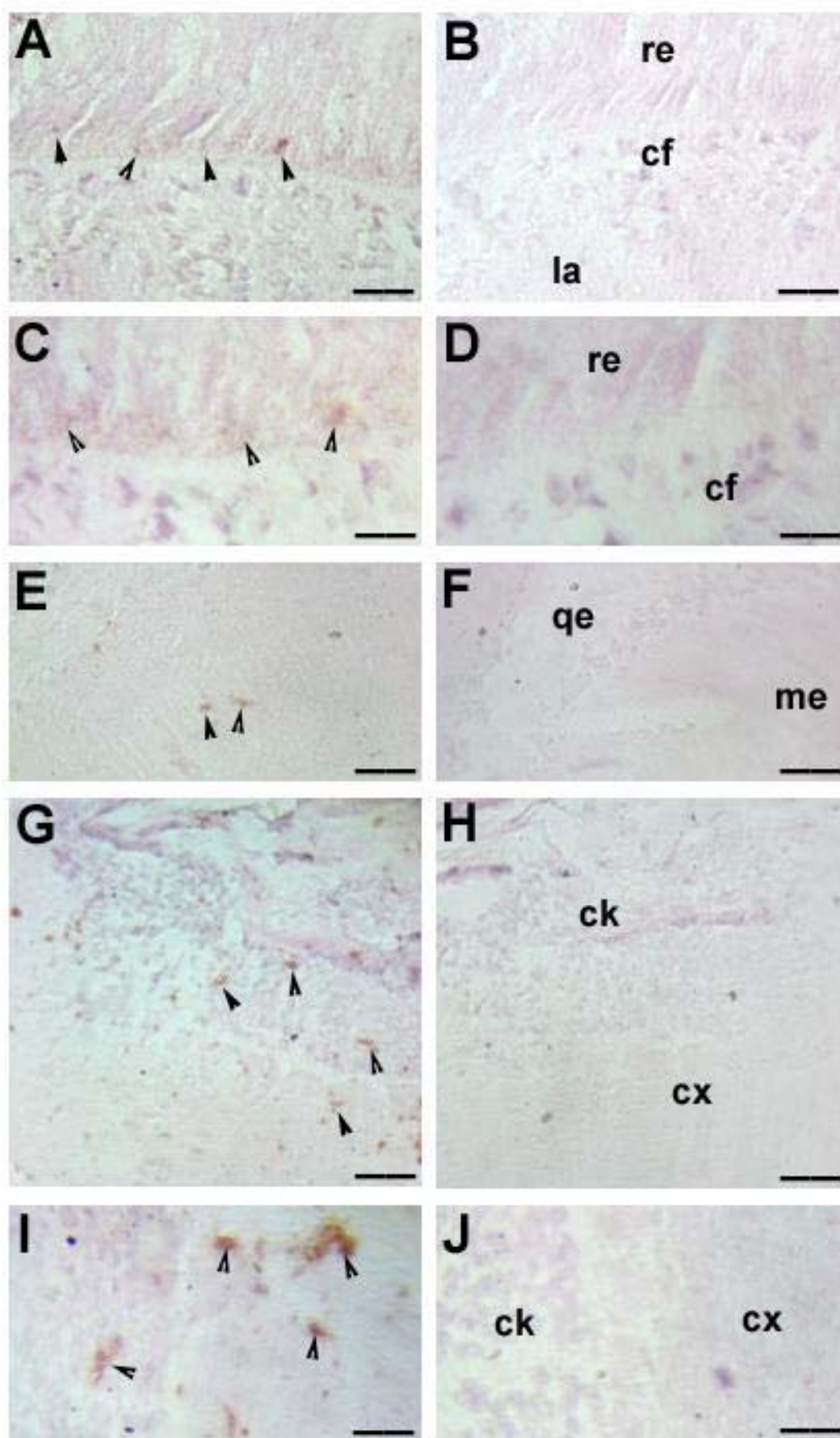


Figura 07: Imunomarcaco das possíveis proteinas que interagem com a MRJPs no cérebro da abelha operária campeira de *Apis mellifera*. A-J - marcao em castanho (cabeça de seta). A-F - imunolocalizao intensa e pontual de possíveis proteinas-sítios ligantes com as MRJPs no lobo óptico: A-B - panorâmica das neurópilas: (A) imunodetecco na medula (me) e na lamina (la), (B) controle, bar = 400 µm. C-F -detalhes das neurópilas: (C) marcao pontual na camada fenestrada (cf), (D) controle, bar = 10 µm. (E) imunomarcaco pontual das células da medula (me), (F) controle, bar = 40 µm. G-J - imunolocalizao nos corpos de cogumelo: (G) deteccão nos cálices (cx) e nas células Kenyon (ck), (H) controle, bar = 40 µm. I-J - detalhe das células Kenyons (ck) evidenciando a marcao nesse tecido, bar= 40 µm.

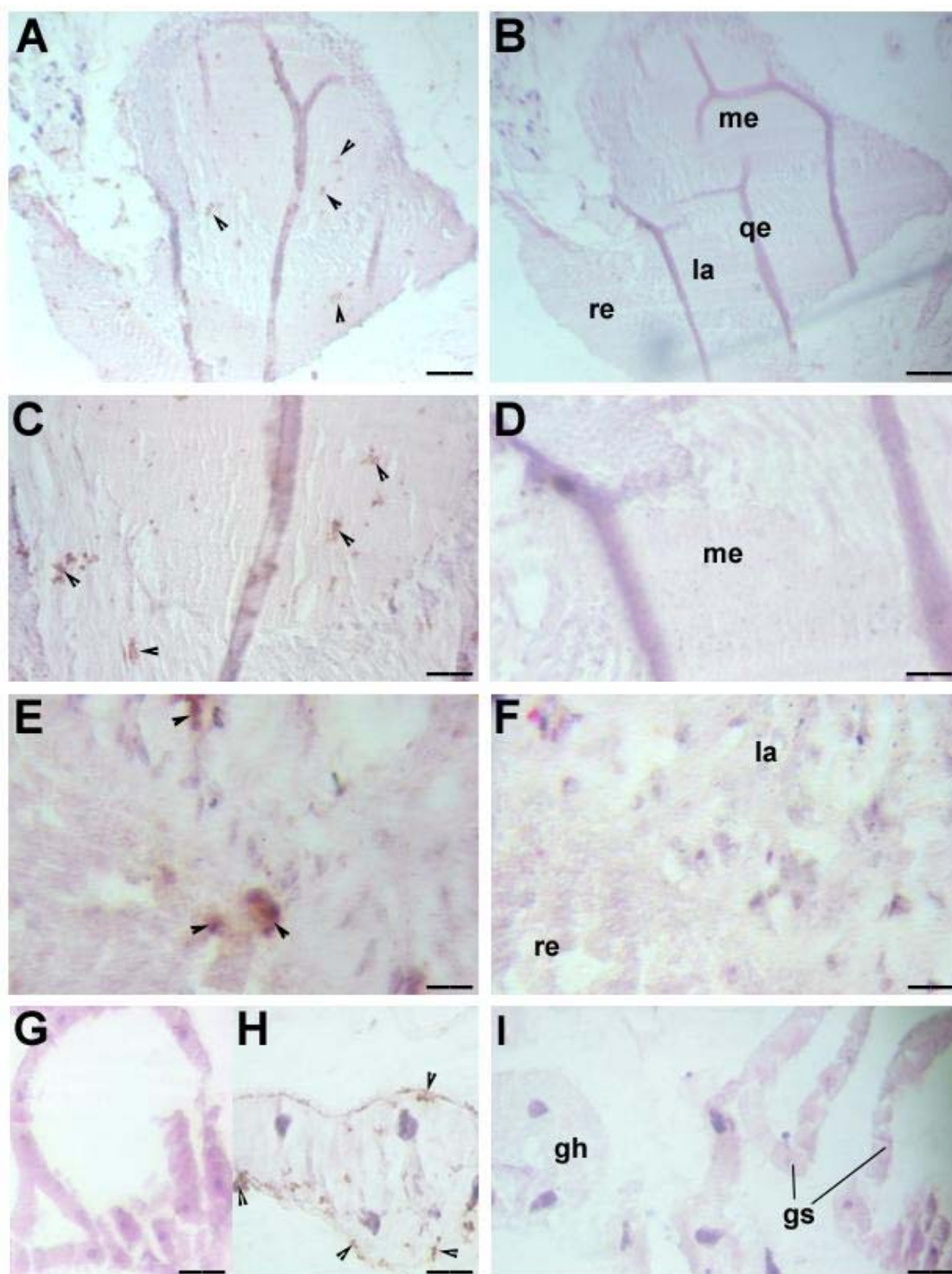


Figura 08: **Imunomarcaco das possíveis proteínas que interagem com a MRJPs no lobo óptico da abelha operária nutridora de *Apis mellifera*.** **A-I** - marcao em castanho (cabeça de seta). **A-F** - imunolocalizao intensa e pontual de possíveis proteínas-sítios ligantes com as MRJPs no lobo óptico: **A-B** - panorâmica das neurópilas: (**A**) imunodetecco na medula (**me**) na lamina (**la**) e no quiasma externo (**qe**), (**B**) controle, bar = 400 µm. **C-D** - detalhe das células das neurópilas (**C**) marcao pontuada na medula (**me**), (**D**) controle, bar = 40 µm. **E-F** - detalhe das células da lamina (**la**) e da retina (**re**): (**E**) marcao pontuada, (**F**) controle, bar = 40 µm. **G-I** - Glândulas cefálicas: (**H**) imunomarcaco nas glândulas hipofaringeais (**gh**), (**I**) controle, bar = 40 µm.

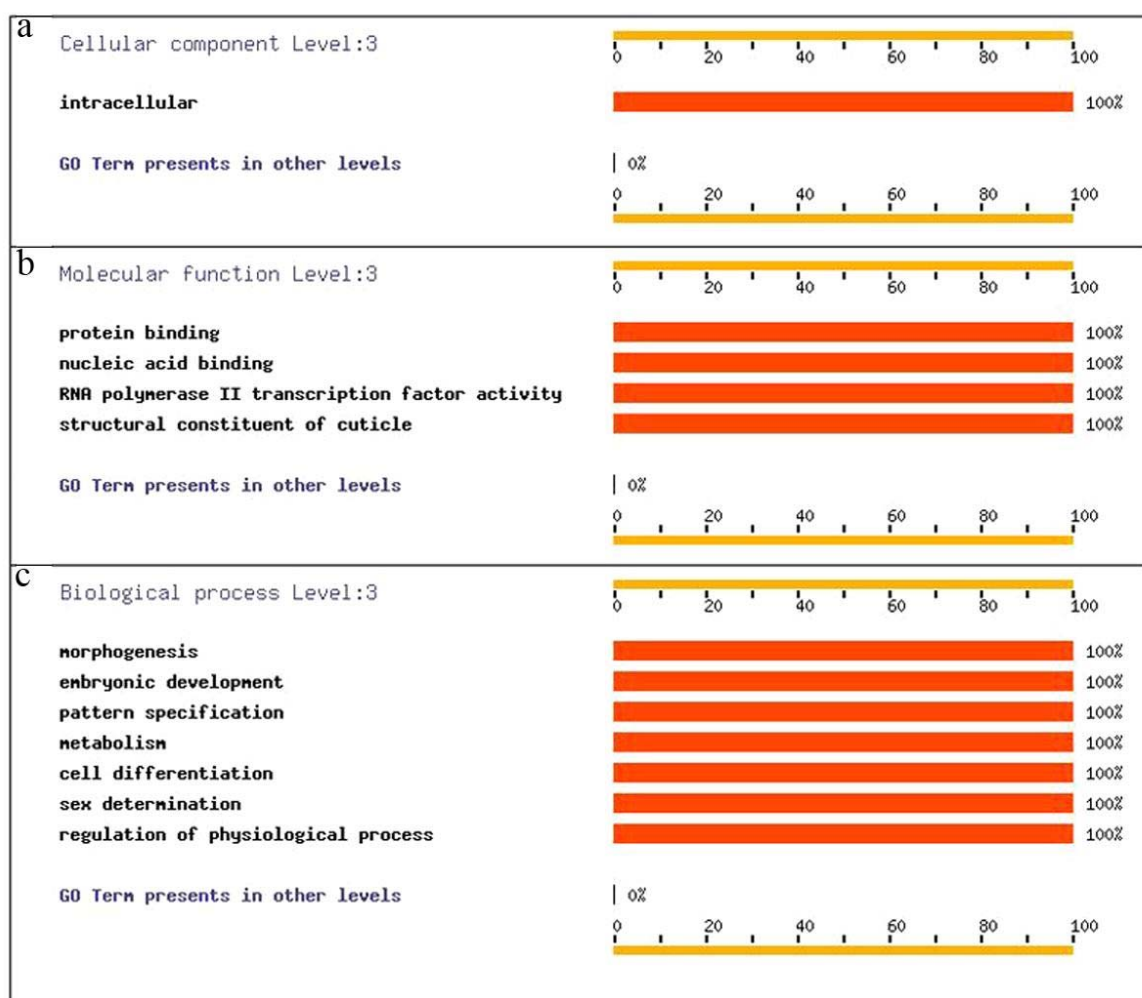


Figura 09: Previsão das possíveis funções estruturais, moleculares e biológicas da MRJP1 para a abelha *Apis mellifera*. As funções foram previstas pelo programa *Fatigo*.

Discussão

Proteínas sítio-ligantes com as MRJPs, no cérebro das diferentes castas da abelha *A. mellifera*, foram investigadas a partir do pool de polipeptídeos gerados contra o anti-MRJP1 por phage display. Essas MRJPs, cujas seqüências estão depositadas em bancos de dados, apresentaram alta identidade entre si, como foi mostrado em estudos de alinhamento de seqüências em relação ao polimorfismo da MRJP3 (Albert e Klaudiny, 2004). A análise dessa identidade determinou que as cinco principais MRJPs possuíam regiões repetidas, as quais foram alvos de interação antígeno-anticorpo. Os anticorpos utilizados nesse estudo foram capazes de reconhecer com especificidade proteínas dos tecidos da abelha *A. mellifera*, além de apresentarem capacidade de reconhecer todas as MRJPs imobilizadas em membrana de nitrocelulose (Peixoto *et al.*, 2006). Essa reação cruzada dos anticorpos com as MRJPs pode ser explicada pelos sítios antigênicos que se repetem em suas seqüências protéicas lineares. A identificação dos sítios antigênicos comuns, presentes nas MRJPs, poderia explicar a detecção de todas essas proteínas pelo anti-MRJP1. Além disso, observou-se a imunoprecipitação de um único polipeptídeo (p57) do cérebro desta abelha com o mesmo anti-MRJP1 (Peixoto *et al.*, 2006). Isto poderia ser explicado pelo fato que no Western blot as proteínas são detectadas em sua forma desnaturada, isto é, em sua forma linear. Entretanto, na imunoprecipitação, as proteínas estão na sua forma enovelada, nativa, a qual poderia esconder sítios comuns das MRJPs detectados pelo anticorpo.

A estratégia de mimetizar epítopos de interesse para reconhecimento de antígenos alvo utilizando a técnica de phage display associada ao estudo imunohistoquímico dos alvos de MRJPs no cérebro da abelha, possibilitaram localizar nas regiões do cérebro dessa abelha proteínas sítio-ligantes para as MRJPs. Técnicas de *microarray* e *Northern blotting* foram capazes de descobrir transcritos da MRJP1 e MRJP2 no cérebro da abelha *A. mellifera* (Kusharski e Maleszka *et al.*, 1998; Kusharski e Maleszka, 2000). Sabe-se que no metabolismo celular toda proteína têm a potencialidade de interação com seu ligante, sendo assim, a identificação de proteínas que interajam com produtos gênicos auxilia na compreensão da sua ação, regulação e função (Benhar, 2001). Em outro estudo utilizando biblioteca conformacional de peptídeos recombinantes em fagos para o

phage display, realizado por Cui *et al.*, 2003a epítomos conformacionais da proteína viral 2 (VP2) de IBDV (Infectious Bursal Disease Vírus) foram mapeados. Todavia, no presente estudo utilizou-se biblioteca linear, de onde selecionou-se por *biopanning* 21 peptídeos com 12 aa cada. Isto foi suficiente para mapear as sete regiões antigênicas da MRJP1 servindo como ferramenta para identificar as possíveis proteínas alvo com o anti-MRJP1 no sistema nervoso dessa abelha.

Nos ensaios de imunolocalização, observou-se intensa marcação pontual das proteínas sítio-ligantes que interagem com as MRJPs no cérebro e glândula hipofaríngeal da *A. mellifera*. Os cortes de cérebro, analisados com o pool de fagos imunoreativos ao anti-MRJP1, revelaram similar distribuição nos corpos de cogumelo e lobos ópticos dessas proteínas alvo.

Na análise do lobo óptico por imunohistoquímica, localizou-se proteínas sítio-ligantes nas células da lamina, da medula e camada fenestrada. Em outro estudo, imunodetectou-se e localizou-se polipeptídeos correspondentes às MRJP1 e MRJP3 no lobo óptico dessa mesma abelha (Peixoto *et al.*, 2006). A localização desses polipeptídeos nas neurópilas dos lobos ópticos e a localização de proteínas sítio-ligantes para esse polipeptídeo sugerem que, as MRJPs e seus ligantes, possam estar envolvidos em funções relacionadas com as informações visuais.

Nos corpos de cogumelo, localizou-se as proteínas sítio-ligantes nas células Kenyon e cálices. O *immunoblotting* e a imunolocalização de proteínas relacionadas às MRJPs revelaram a presença dessas proteínas nas células Kenyon, neurônios da base do cálice e no cálice medial e lateral (Peixoto *et al.*, 2006). Os corpos de cogumelo são centros de processamento de informação e memória, constituídos por milhares de neurônios denominados de células Kenyon. As MRJPs, imunolocalizadas nessas neurópilas, possuem, em suas seqüências, regiões de interação com proteínas quinases que também foram imunolocalizadas nos corpos de cogumelo (Klaudiny *et al.*, 1994; Grumbaum e Muller, 2000; Kamikouchi *et al.*, 2000), juntamente com as proteínas sítio-ligantes das MRJPs imunolocalizadas nesse estudo. Esses resultados sugerem uma nova interação das MRJPs no cérebro da abelha *A. mellifera* que poderia auxiliar na cascata de transdução de sinal para o processamento de informação.

Os dados de localização de MRJPs no cérebro da abelha *A. mellifera* podem ser analisados em conjunto a partir da localização de proteínas alvo reativas às MRJPs, da localização de proteínas correlacionadas às MRJPs e da localização de transcritos da MRJP1 e MRJP2 no cérebro da *A. mellifera*. No mesmo sentido, a partir das funções preditas para essa proteína pelo software *Fatigo*, o qual utiliza de comparação com proteínas parálogas de organismos modelos com funções conhecidas, inferimos possíveis funções as MRJPs. Estes dados sugerem funções para MRJP1 associadas ao processamento visual e olfatório como também funções de ligantes protéicos, participação na morfogênese e no desenvolvimento da abelha. Essa análise conjunta contribui para o conhecimento sobre a função dessas proteínas.

Esse estudo mostrou o mapeamento dos sítios de interação antígeno-anticorpo das principais regiões antigênicas das MRJPs analisadas e, imunolocalizou proteínas sítio-ligantes às MRJPs no cérebro da *A. mellifera*, evidenciando possíveis funções para as MRJPs no sistema nervoso dessa abelha. Novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão dessa interessante classe protéica na função da plasticidade fenotípica, no desenvolvimento das castas e na caracterização das MRJPs no cérebro dessas abelha.

Referências Bibliográficas

Albert, S., Klaudiny, J., 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identifications of new members in the EST library. J. Insect. Physiol. In Press, 50, 51-50.

Azzazy, H.M., Highsmith, W.E.Jr., 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovation. . Clin. Biochem. 35, 425-45.

Benhar, I., 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. Biotechnol. Adv. 19, 1-33.

Cui, X., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 2003a. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. J. Virol. Methods. 109, 75-83.

Evans, J.D., Wheeler, D.E., 1998. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 5575-5580.

Grünbaum, L., Müller, U., 1998. Induction of a specific olfactory memory leads in a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. J Neurosci 18, 4384-4392.

Hanes, J., Simuth, J., 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). J. Apic. Res. 31, 22-26.

Kamikouchi, A., Takeuchi, H., Sawata, M., Natori, S., Kubo, T., 2000 Concentrated expression of Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in Mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera*. J Comp Neurol. 417, 501-510.

Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S., Simuth, J., 1994. Molecular cloning of two cDNA from the heads of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) for coding related proteins of royal jelly. J. Apic. Res. 33, 105-111.

Knecht, D., Kaatz, H.H., 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honeybees. Apidologie. 21, 457–468.

Kucharski, R., Maleszka, R., 2002. Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*). Brain Res Mol Brain Res. 99, 92-101.

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.

Kucharski, R., Ball, E.E., Hayward, D.C., Maleszka, R., 2000. Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. Gene, 242, 399-405.

Lensky, Y., Rakover, Y., 1983. Separate protein body compartments of the workers honeybees (*Apis mellifera* L.). Comp Biochem Physiol. 75, 607–615.

Nagai, T., Inoue, R., 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. Food Sci. Agric. Chem. 84, 181-186.

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, 797-802.

Pasqualini, R., Ruoslahti, E., 1996. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. Nature 380, 364-366.

Peixoto L.G., Espindola F.S., 2006. Imunodeteção e imunohistoquímica de proteínas relacionados às MRJPs no cérebro da abelha *Apis mellifera*. In: Detecção e localização de proteínas relacionados às MRJPs e de suas possíveis proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngea da abelha *Apis mellifera*. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 28-57.

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.

Sato, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2004. Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by Two Dimensional Gel Electrophoresis. J Agric Food Chem. 52, 15–20.

Schimitzová, J., Klaudivy, J., Albert, S., Schroder, W., Shreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., Simúth, J., 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cell Mol Biol Res. 54, 1020-1030.

Simúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., Schroder, W., 2004. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey..J Agric Food Chem. 52, 2154-2158.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 4350-4354.

Trepel, M., Arap, W., Pasqualini, R., 2002. *In vivo* phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. Curr. Opin. Chem. Biol.6, 399-404.

Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128, 79-83.

Conclusão Geral

- ✓ Detecção de polipeptídeos p57 e p70 correspondentes às MRJP1 e a MRJP3 no cérebro da *Apis mellifera*
- ✓ Imunoprecipitação do p57 de cérebro da abelha *Apis mellifera*
- ✓ Detecção de um novo polipeptídeo p128 relacionado às MRJPs no cérebro da *Apis mellifera*
- ✓ Imunolocalização de proteínas relacionadas às MRJPs em regiões específicas do cérebro da *Apis mellifera*
- ✓ Mapeamento dos possíveis sítios de interação antígeno-anticorpo das principais regiões antigênicas das MRJPs analisadas
- ✓ Imunolocalização de possíveis proteínas sítio-ligantes às MRJPs no cérebro da *Apis mellifera*