



Motores Moleculares no Cérebro de abelhas

A utilização de bibliotecas de fagos

Camila Teixeira Mendes

Bióloga

Pablo Marco Veras Peixoto

Biólogo

Maria de Fátima Rodrigues da Silva

Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Rosana de Cássia Oliveira

Mestre em Genética e Bioquímica

Foued Salmen Espindola

Doutor em Ciências, Professor de Bioquímica - Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - INGEB- Universidade Federal de Uberlândia

Enilza Maria Espreafico

Doutora em Ciências - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Abelha *Apis mellifera* L. (Hymenoptera Apinae) é um organismo modelo para pesquisas comportamentais, e a biologia que se apresenta nas suas colméias fascina os cientistas, desde Aristóteles. A complexidade etológica desses insetos é acompanhada por um sistema nervoso simples quando comparado com o de vertebrados, porém com um nível relativamente alto de organização.

Recentemente, especialistas em genética, neurobiologia e comportamento de abelhas reuniram-se em Bellagio, Itália, com a finalidade de propor um comitê internacional para a integração dos estudos comportamentais e moleculares da *A. mellifera*. Nesse encontro foi apresentado o projeto que estava prestes a atingir o sequenciamento de 10.000 ESTs (Expressed Sequence Tags) não redundantes do cérebro de *A. mellifera*. Essas seqüências contribuirão para estudos de neurogenômica dos insetos e, possivelmente, revelarão novos modelos para os estudos de neurobiologia de mamíferos (www.barc.usda.gov/beenome/database). No Brasil, está sendo desenvolvido um projeto para o sequenciamento do transcriptoma da abelha a partir de bibliotecas de EST e ORESTES (Open Reading Frame Ex-

pressed Sequence Tags), numa iniciativa dos laboratórios da Universidade Federal de Uberlândia, Fundação hemocentro de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo. A home page desse projeto pode ser acessada no endereço: <http://scarecrow.fmrp.usp.br/pipeline>.

Até o momento, foram identificados e caracterizados transcritos de apenas sete genes expressos diferencialmente por larvas de operárias e rainhas (Evans & Wheeler, 2000). Muito pouco se sabe sobre as bases moleculares por trás da complexidade desses insetos, que possuem de 16 (machos) a 32 (fêmeas) cromossomos. Estão identificadas atualmente para *A. mellifera* 513 seqüências de proteínas (tabela 1) e 1200 seqüências de nucleotídeos, a maioria restrita à mitocôndria; o que é muito pouco, diante de um cariótipo desse porte.

Dentre as seqüências conhecidas, estão as de genes que codificam proteínas relacionadas à transdução de sinal dependente de cálcio, que no cérebro das abelhas, se localizam, preferencialmente, nas células Kenyon. As células Kenyon estão presentes nos corpos de cogumelo no sistema nervoso de anelídeos e artrópodes. Os corpos pareados, em forma de cogumelo, são considerados centros de processamento de informações olfatórias, integração multimodal, aprendizado

TABELA 1. Distribuição das 513 proteínas já identificadas em abelhas

Enzimas metabólicas	α -glucosidase, glicerol 3PDH, maltase, amylase
Proteínas mitocondriais	NADH DH, ATPase, citoxidase, citocromo b e ATP sintase
Proteínas do citoesqueleto	actina e anquirina
Proteínas da geléia real	Citocromo p450, Histona H4, citocromo P450, proteína da geléia real
Receptores neuronais	receptor olfatório, IP3, dopamina, GABA receptor, ASP2, receptor acoplado à proteína G, receptor GABA - Rdl
Peptídeos do veneno	melitina, PLA ₂
Proteínas transportadoras	VHDL larval
Proteínas regulatórias	CaM quinase II
Outras categorias	hialuronidase, transferase, <i>zinc finger</i> , precursores para apidaecina, abaecina, himenoptaecina, tetrapina, secaprina, preposecaprina, citocromo C, aprisina, rodopsina para longo comprimento de onda, opsina sensível à luz ultravioleta e azul

e memória. Essas estruturas recebem informações olfatórias, mecanosensoriais e visuais via interneurônios dos centros primários para cada modalidade sensorial e os neurônios, incorporados individualmente dos corpos de cogumelo, muitas vezes respondem a diferentes modalidades sensoriais. Os corpos de cogumelo das abelhas operárias são morfologicamente mais desenvolvidos do que os de moscas e gafanhotos (Kamikouchi *et al.*, 1998). Isso poderia justificar sua maior capacidade de memória olfatória associativa após uma triagem de aprendizagem (Oleskevich *et al.*, 1997).

Algumas evidências mostram que os corpos de cogumelo de invertebrados equivalem ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem espacial (Capaldi *et al.*, 1999). Abelhas e drosófilas têm sido utilizadas como modelo para elucidar o papel desenvolvido pelo hipocampo no processo de aprendizado de vertebrados (Dubnau *et al.*, 2001). Os mecanismos de associação de memória, aprendizado e tomada de decisão em abelhas certamente estão impressos em seu genoma. Portanto, conhecer os possíveis genes relacionados com esses processos no cérebro da abelha é de grande importância.

As análises das seqüências dos genomas já descritos mostram que muitos processos biológicos estão conservados. Por exemplo, os genomas de *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, apresentam vários genes também presentes em humanos. Em *Drosophila* foram encontrados genes envolvidos em processos neurológicos tais como *Notch* (síndrome de Cadasil), precursor da proteína beta amiloide e *presenilina* (doença de Alzheimer), *tau* (demência frontotemporal com parquinonismo), *parkin* (doença de Parkinson juvenil) e também foram encontrados genes relacionados a desordens renais, que estão envolvidos no transporte de fluidos e eletrólitos (Rubin *et al.*, 2000). A conservação dos processos biológicos de invertebrados a mamíferos e a facilidade na manipulação desses genes fazem desses animais importantes modelos experimentais para o estudo dos genes correspondentes em mamíferos.

Tradicionalmente, nosso laboratório investiga proteínas motoras associadas ao citoesqueleto em cérebros de galinha, rato e, recentemente, de abelhas (Espindola *et al.*, 2000; Suter *et al.*, 2001, Reis *et al.* 2001). Das seqüências de

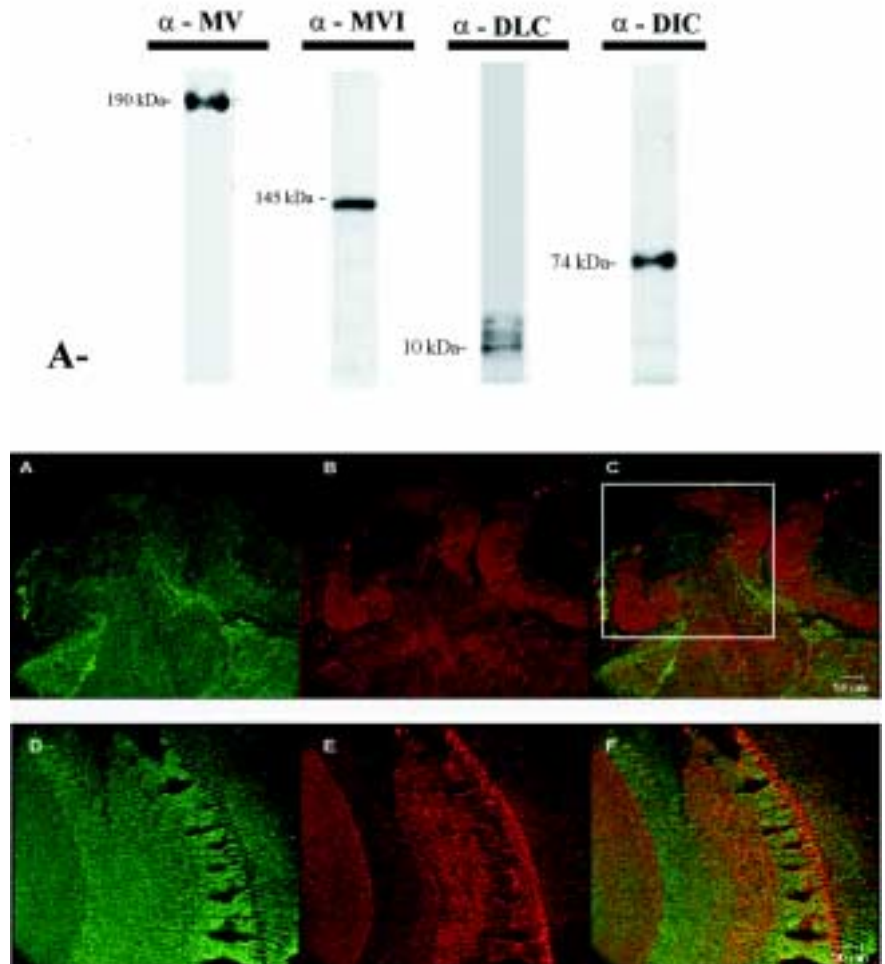


FIGURA 1: Identificação e localização de motores moleculares no cérebro das abelhas *A. mellifera*.

A- *Imunoblottings* de extratos protéicos totais de cérebro de *A. mellifera* com anticorpos contra Miosinas das classes V e VI e Dineína, cadeia intermediária (DIC) e cadeia leve (DLC). B- Microscopia de Fluorescência de cérebro de *A. mellifera* mostrando a localização preferencial de miosina-V (em verde) nos corpos de cogumelo (destacados no retângulo) e na retina, lóbulo ótico (D, E e F). Algumas proteínas envolvidas na sinalização da transdução dependente de Ca^{++} estão situadas também nas mesmas regiões do cérebro de *Apis* (Kamikouchi *et al.*, 2000) Essa localização sugere uma possível participação da miosina-V nesse processo de sinalização

DNA da abelha *A. mellifera* já disponíveis em bancos de dados *on-line* nenhuma corresponde a motores moleculares. Essas proteínas associadas ao citoesqueleto respondem pela mobilidade celular, formação de fusos mitóticos, e translocação de vesículas, quinases, RNAm, fatores de transcrição, organelas e cromossomos a partir da energia liberada pela hidrólise de ATP (Berg *et al.*, 2001; Asai e Koonce, 2001; King, 2000, Sablin, 2000). Portanto, miosinas, dineínas e cinesinas, as principais famílias de motores moleculares, são comprovadamente essenciais em uma gama de even-

tos celulares.

Estudos recentes mostram a expressão da miosina de classe VI justamente na trajetória de células migratórias do ovário de drosófilas. Observou-se também uma série de fenótipos associados à inativação dessa proteína, tais como defeitos morfológicos dos ovos e asas, semelhante ao que ocorre quando se inativa a miosina da classe II nestas moscas (Deng *et al.*, 1999). Ainda em drosófilas já se conhece a seqüência da miosina da classe V, que se conservou expressa desde leveduras até humanos (Bonafé e Sellers, 1998).

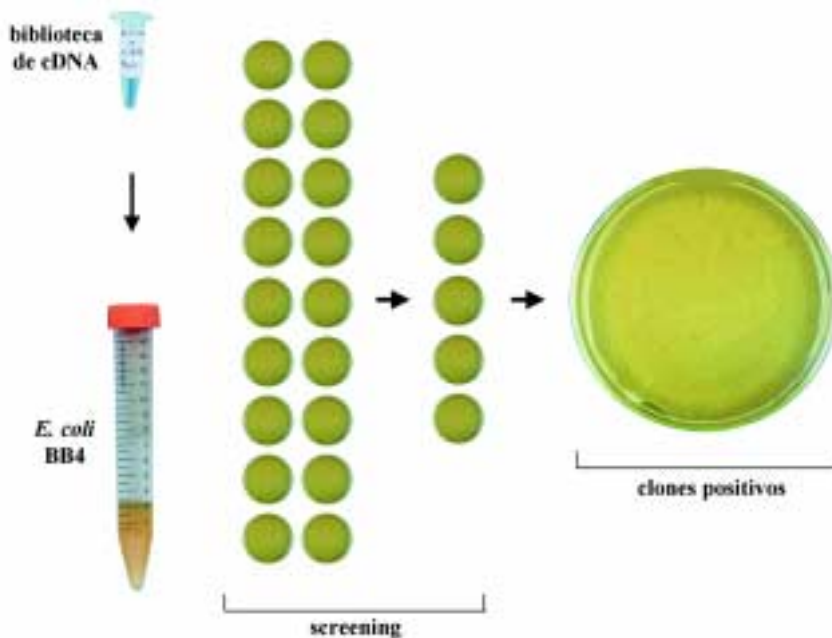


FIGURA 2: Screening da biblioteca de cDNA. A linhagem XL1-blue de *E. coli* é infectada com a biblioteca de cDNA de cérebro de *A. mellifera*. Em seguida, estas bactérias são incubadas em placas de vidro a 37°C, até o rompimento da parede celular. O rompimento se deve à multiplicação das partículas de fago lambda da biblioteca, podendo ser notado pela formação de halos translúcidos. As setas vazadas indicam o isolamento de halos (contendo fagos que expressam a proteína alvo). Para isso, utilizamos anticorpos específicos, que previamente interagiram com esta proteína em extratos de cérebro da abelha. Os fagos isolados são utilizados para infectar mais bactérias, repetindo-se este passo até que se obtenham placas de vidro contendo apenas fagos que expressem a proteína alvo

A miosina V apresenta um cadeia leve de 8 kDa, também presente em dineína citoplasmática (Espíndola, et al 2000). Foi identificada em *Drosophila* o gene *ddlc1*, que codifica essa cadeia leve. Uma mutação no gene dessa proteína causa defeitos morfológicos no desenvolvimento de pelos, asas bem como na oogênese, resultando em fêmeas estéreis. A anormalidades encontradas em ovários estão associadas com a perda da forma e estrutura celular pela desorganização do citoesqueleto de actina (Dick et al, 1996).

Nenhum estudo similar foi, até o momento, desenvolvido em abelhas, o que nos motivou a adotar esse inseto como modelo biológico. Após a identificação e a localização da miosina V no cérebro dessa abelha (Fig. 1), partimos para sua caracterização molecular. No momento, estamos aplicando essas abordagens para várias classes de miosinas, bem como para dineínas e cinesinas, além de outras proteínas associadas ao citoesqueleto.

O primeiro passo para a caracteriza-

ção molecular das proteínas associadas ao citoesqueleto é o isolamento dos genes que as codificam. Para isso, dispomos de uma biblioteca de cDNA de cérebro de *A. mellifera* construída no vetor de expressão Lambda-ZAPII (Fig. 2). Os cDNAs foram protegidos por metilação, adaptados ao adaptador EcoRI do sítio de clonagem múltipla (MCS – Multiple Cloning Site) do vetor. Essa biblioteca foi gentilmente cedida pelo Dr. Gene Robinson, Universidade de Illinois, Urbana, USA.

A biblioteca de cDNA possui, aproximadamente, 500 milhões de unidades formadoras de placas (PFU), uma boa representação do acervo gênico do cérebro de *A. mellifera*. Os clones que codificam proteínas motoras estão sendo isolados utilizando-se anticorpos que previamente detectaram essas proteínas em extratos protéicos totais de cérebro da abelha. Para inoculação das células hospedeiras *Escherichia coli* de linhagem BB4, elas são incubadas com a biblioteca titulada até a lise das bactérias e a expressão das proteínas do fago,

que são transferidas para a membrana de nitrocelulose.

A primeira etapa para o seqüenciamento é a excisão dos clones por meio da co-infecção de bactérias BB4 com o fago auxiliar e o fago lambda (Fig. 3). O vetor Lambda ZapII permite uma excisão *in vivo* simples e eficiente e a recircularização de qualquer fragmento de cDNA clonado dentro do vetor lambda para formar um fagomídeo (Ausubel *et al.*, 1990; Kretz *et al.*, 1994). Esse processo de excisão depende da localização da seqüência de DNA dentro do fago lambda e da presença de uma variedade de proteínas, por exemplo, as M13. As proteínas M13 do fago reconhecem a região do DNA, que normalmente serve como origem da replicação. Essa origem de replicação pode ser dividida em duas partes: o sítio de iniciação e o sítio de término para a síntese de DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Dentro das bactérias, as proteínas M13 reconhecem a região iniciadora do DNA dentro do vetor lambda e uma nova fita de DNA é sintetizada e duplicada. A síntese dessa nova fita continua passando pelo inserto clonado e pelo gene de resistência à ampicilina, até o sinal de término que se encontra no vetor lambda.

Essa fita simples de DNA é circularizada e empacotada pelo produto do gene II do fago auxiliar na forma de fagomídeo, que, em seguida, é secretado pelas bactérias XL1Blue. Posteriormente à secreção das partículas do fago, as bactérias usadas no processo de excisão do clone de DNA são mortas por aquecimento e o fago lambda é lisado, mas o fagomídeo não é afetado pelo aquecimento. As bactérias são infectadas com o fagomídeo e podem ser plaqueadas para a formação de colônias.

As colônias formadas a partir do pBlue-script-phagemid são, subsequentemente, amplificadas utilizando-se primers de vetores (M13F e M13R). Uma alíquota dos produtos de PCR será, então, reamplificada, adicionando-se o fluorocromo *Big dye*, para marcação dos fragmentos. A próxima etapa consiste na purificação com NaOAc e etanol absoluto e desnaturação dos fragmentos a 95°C. As amostras serão aplicadas no seqüenciador ABI-Applied Biosystems.

As seqüências obtidas serão analisadas utilizando-se o banco de dados GENBANC e o pacote de ferramentas BLAST, disponíveis no portal www.ncbi.nlm.nih.gov. Após essa análise, estaremos aptos a anexar alguns motivos moleculares às árvores filogenéti-

cas já existentes. Ao final desse projeto, teremos aberto perspectivas para estudos de localização, caracterização bioquímica, e estudos comportamentais associados à manipulação desses genes nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Apis mellifera*.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

Agradecimentos: Apíários Girassol – Uberlândia - MG

Referências Bibliográficas

ASAI, D. J.; e KOONCE, M. P. 2001. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends in Cell Biology*. v. 11, n. 5, p. 196-202.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

BERG, J. S.; BRADFORD, C. P.; CHENEY, R. E. 2001. A millennial myosin consensus. *Mol. Biol. Cell*. v. 12, p. 780-94.

BONAFÉ, N.; SELLERS, J. R. 1998. Molecular characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, London, v. 19, p. 129-141.

CAPALDI, E. A.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. 1999. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu. Rev. Psychol.*, Palo Alto, v. 50, p. 651-82.

DENG, W.-M.; LEAPER, K.; BOWNES, M. 1999. A targeted gene silencing technique shows that *Drosophila* myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v. 112, p. 3677-3690.

DICK, T., KRISHANU, R.; SALZ, H. K.; CHIA, W. 1996. Cytoplasmic Dynein (*ddlc1*) Mutations Cause Morphogenetic Defects and Apoptotic Cell Death in *Drosophila melanogaster*. *Mol. and cell. Biology*. v. 15, p. 1966-1977.

DUBNAU, J.; GRADY, L.; KITAMOTO, T.; TULLY, T. 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*. v. 24, n.411, p.476-80.

ESPINDOLA, F.S.; SUTER, D.M.; PARTATA, L.B.; CAO, T.; WOLENSKI, J.S.; CHENEY, R.E. 2000. The light chain

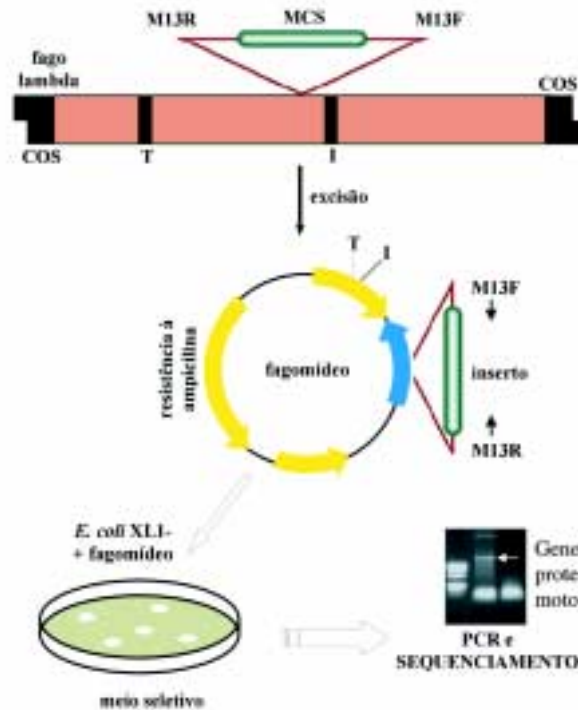


Figura 3: Excisão do fragmento de cDNA de abelha. Bactérias XL1-blue são infectadas com o fago auxiliar e o fago lambda isolado durante o *screening*. O fago auxiliar expressa proteínas que induzem a transcrição e circularização da fita de cDNA contida na região de clonagem múltipla (MCS) do fago lambda. Por aquecimento e centrifugação pode-se isolar as fitas circularizadas denominadas fagomídeos. Colônias de bactérias infectadas são, em seguida, incubadas em meio seletivo. Os fagomídeos possuem, além do gene de resistência à ampicilina, sítios de anelamento dos primers M13R e M13F, que permitem a amplificação e sequenciamento do fragmento de cDNA alvo

composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chain, and 8-Kda dynein light chain/PIN. *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 47, n. 4, p.269-81.

EVANS, J. D., WHEELER, D, E. 2000. Expression profiles during honeybee

caste determination. *Genome Biology* v. 2, p.1-6.

KAMIKOUCHI, TAKEUCHI H, SAWATA M, OHASHI K, NATORI S, KUBO TJ. 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera*. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 242 n. 1, p.181-6.

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* L. *J. Comp. Neurol.*, New York, v. 417, p. 501-510.

KING, S. M. The dynein microtubule motor [Review]. 2000. *Bioch. et Biophys. Acta (BBA)/Mol. Cell Res*. v.1496 n. 1, p. 60-75.

KRETZ, P.L.; WELLS, S.; SHORT, J.M. 1994. *Strategies Mol Biol*. v. 7(2), p. 44-5.

OLESKEVICH S, CLEMENTS J.D. Srinivasan MVJ 1997. Long-term synaptic plasticity in the honeybee. *J Neurophysiol*. Jul; v. 78, n.1, p.528-32.

RECK-PETERSON, S.L.; PROVANCE, D.W.J.; MOOSEKER, M.S.; MERCER, J.A. 2000. Class V myosins. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1496, p. 36-51.

REIS, D. S., SOUZA, M. A., MINEO, J. R., ESPINDOLA, F. S. 2001. Myosin and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . *Bras. J. of. Med and Biol Research*. v. 34, p. 221- 226.

RUBIN, G. M., et al. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, v. 287, 2204-10.

SABLIN, E. P. 2000. Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms [Review article]. *Curr. Opin.Cell Biol*. v. 12, p.35-41.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. E MANIATS. 1989. *Molecular cloning: A Laboratorial Manual*. 2 ed., v. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York.

SUTER, D.M.; ESPINDOLA, F.S.; LIN, C.H.; FORSCHER, P. MOOSEKER, M.S. 2000. Localization of unconventional myosins V and VI in neuronal growth cones. *J Neurobiol*. v. 42 p. 370- 82.