

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Filipe de Souza Mendes

Expressão heteróloga da proteína FEM de abelha *Melipona interrupta* (Hymenoptera, Apidae) em bactéria *Escherichia coli*

Manaus – AM

Novembro de 2018

Filipe de Souza Mendes

**Expressão heteróloga da proteína FEM de abelha *Melipona interrupta*
(Hymenoptera, Apidae) em bactéria *Escherichia coli***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas – UFAM como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em BIOTECNOLOGIA.

Orientadora: Gislene Almeida Carvalho-Zilse

Co-orientador: Edmar Vaz de Andrade

Universidade Federal do Amazonas

Manaus – AM

Novembro de 2018

Filipe de Souza Mendes

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M538e Mendes, Filipe de Souza
Expressão heteróloga da proteína FEM de abelha *Melipona interrupta* (Hymenoptera, Apidae) em bactéria *Escherichia coli* / Filipe de Souza Mendes . 2018
67 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Gislene Almeida Carvalho-Zilse
Coorientador: Edmar Vaz de Andrade
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Feminizer. 2. Determinação de sexo. 3. Determinação de casta. 4. *Melipona interrupta*. 5. Expressão heteróloga. I. Carvalho-Zilse, Gislene Almeida. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**Expressão heteróloga da proteína FEM de abelha *Melipona interrupta*
(Hymenoptera, Apidae) em bactéria *Escherichia coli***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas – UFAM como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em BIOTECNOLOGIA.

Aprovado em 29/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Gislene Almeida Carvalho-Zilse - Orientadora

Spartaco Astolfi Filho – Membro Avaliador

Diana Vieira Brito – Membro Avaliador

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os meus professores, amigos, familiares e outras pessoas que tenham me ajudado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos três homens que foram inspiração para minha vida. O primeiro deles é, sem dúvida, Cleuter Leão Lira, meu primeiro e meu melhor professor de química, por quem eu tinha, e tenho, grande admiração e respeito... gostaria de ter defendido uma semana antes Professor Cleuter, assim eu poderia ter agradecido pessoalmente, obrigado pelo grande homem e professor que o senhor foi. O segundo deles é o professor Spartaco que, mesmo antes de eu poder conhecê-lo pessoalmente, já me inspirava com incríveis histórias sobre engenharia genética que eu escutava dos meus professores, essas histórias foram fundamentais para eu escolher o meu caminho, por isso obrigado Professor. O terceiro e não menos importante é Masashi Kishimoto, criador de uma história incrível que me ensinou o verdadeiro significado da força de vontade e da palavra *bushido*.

Aos meus orientadores, professor Edmar e professora Gislene, muito obrigado pela paciência e pela atenção e me desculpem pelas minhas falhas. Agradeço imensamente a sorte de ter tido vocês como orientadores!

Aos meus irmãos de pai e de mãe diferentes Brendo, Gabriel e Nalbert, obrigado pela presença de vocês nesses 14 anos. Brendo em especial, obrigado por sempre me oferecer fichas de RU quando eu não tinha.

Renata, muito obrigado pelo apoio e por sempre falar que as coisas vão começar a dar certo, até que no final realmente deram rrsrs...

Sofia, obrigado pela certa competitividade que tínhamos, um dia ainda te supere em conhecimento!

Aos meus amigos do laboratório proteoma, Genilton san, Julio senpai, Jeff san e a caçula do lab Gracielle, obrigado por sempre me animarem quando nada parecia dar certo nesse trabalho. A propósito Jeff, aqui estão meus resultados agora (piada interna)! Kkk... Caras, espero nunca ficar longe de vocês!

Aos amigos do laboratório GPA, Diego, Tati, André e Diana Brito (mãe), a todos vocês muito obrigado pelos ensinamentos, pois eu não sabia nada de abelhas e me ajudaram muito, sem contar a convivência e a amizade de vocês que, com toda certeza, levarei para a vida.

Aos técnicos de laboratório, Dina sennin e Paulo sennin, muito obrigado pela ajuda de vocês no laboratório!

Aos meus familiares, mãe, tia Edilza e tio Damião, muito obrigado pelo apoio de vocês, sempre me ajudaram na minha vontade de estudar e sem vocês eu não seria ninguém, obrigado!

Por fim, eu só tenho gratidão a todos que, de alguma forma, me ajudaram e me inspiraram, aliás, até pessoas inspiradoras precisam de inspiração às vezes. Por isso agradeço da forma mais cordial e respeitosa que eu conheço:
Hontou Arigatou Gozaimasu!!

EPÍGRAFE

Enquanto um alquimista viver deve ser uma criatura que persegue a verdade. Quando um alquimista pára de pensar ele morre. E você, ainda vive?

RESUMO

Em todo planeta é notória a queda populacional das abelhas, o que tem levado cientistas do mundo inteiro a encontrar meios que auxiliem a preservação destes animais. A redução populacional tem efeito extremamente negativo para esses insetos devido à diminuição dos alelos de genes de determinação de sexo. Por isso estudos que busquem a compreensão do papel destes genes podem vir a ajudar na preservação desses insetos. O gene *fem* desempenha importante papel da determinação de sexo e castas de abelhas. A contribuição do gene *fem* para estes processos em *Melipona interrupta*, uma abelha nativa da região amazônica, tem sido investigada por métodos de transcrito. Para contribuir aos resultados e hipóteses de outros autores sobre a participação desse gene na determinação de sexo e casta de *M. interrupta*, este trabalho objetivou em expressar, purificar e renaturar a proteína rMiFEM. O gene *fem* sintético foi clonado no vetor de expressão pGS-21a e expresso em diferentes linhagens de *Escherichia coli*, sendo que os melhores resultados foram obtidos na linhagem Rosetta (DE3). Os clones expressaram uma proteína de 50 kDa (rMiFEM) na forma de corpúsculo de inclusão seguido de renaturação *in vitro* utilizando três diferentes protocolos. Destes, o que proporcionou melhores resultados foi o recomendado para renaturação de Proteínas SR. Ao se analisar a sequência peptídica da proteína MiFEM com ferramentas de bioinformática, identificou-se um domínio de ligação ao RNA que ainda não havia sido descrito para essa proteína, bem como duas regiões ricas em arginina e serina (domínios RS que já haviam sido descritos anteriormente) e vários possíveis sítios de fosforilação. Utilizando protocolo de enriquecimento de Proteínas SR revelou-se um padrão diferente nas proteínas de machos, operarias e rainhas, indicando que diferentes Proteínas SR são expressas diferencialmente entre sexos e castas. Embora não tenha sido possível verificar a proteína Fem no extrato enriquecido, hipotetiza-se que Fem de *M. interrupta* foi precipitada pois apesar de não ser uma SR-proteína ela contém os domínios necessários para a precipitação. A proteína rMiFEM será posteriormente utilizada para produção de anticorpos específicos anti-Fem, o que auxiliará na compreensão da participação da proteína Fem na determinação de sexos e castas em *M. interrupta*.

Palavras chaves: *feminizer*; Determinação de sexo; Determinação de casta; *Melipona interrupta*; Expressão heteróloga

ABSTRACT

In all planet, the bees' population has fallen, which has led scientists from all over the world to find ways to help preserve these animals. Population reduction has an extremely negative effect on these insects due to decreased alleles of sex determination genes. Therefore studies that seek to understand the role of these genes may help to preserve these insects. The *fem* gene plays an important role in determining sex and bees castes. The contribution of the *fem* gene to these processes in *Mellipona interrupta*, a bee native to the Amazon region, has been investigated by transcriptomic methods. To contribute to the results and hypotheses of other authors on the participation of this gene in sex and caste determination of *M.interrupta*. This work aimed to express, purify and renature the rMiFEM protein. The synthetic Fem gene was cloned into the expression vector pGS-21a and expressed in different strains of Escherichia coli, with the best results obtained in the Rosetta (DE3) strain. The clones expressed a 50 kDa protein (rMiFEM) in inclusion corpuscle form followed by in vitro renaturation using three different protocols. Of these, the one that provided the best results was a recommended for renaturation of SR-proteins. When analyzing the peptide sequence of the MiFEM protein with bioinformatics tools, an RNA binding domain was identified that had not yet been described for this protein, as well as two regions rich in arginine and serine (RS Domains that had already been described previously) and several possible phosphorylation sites. Using an SR-protein enrichment protocol a different pattern was obtained in the proteins of males, workers and queens, indicating that different SR-proteins are differentially expressed between sexes and castes. Although it has not been possible to detect Fem protein in the SR-protein enriched extract, it does not exclude the hypothesis that Fem of *M. interrupta* is in the precipitate, although it is not an SR-protein, but having the necessary domains for precipitation. The rMiFEM protein will subsequently be used to produce specific anti-Fem antibodies, which will help in understanding the participation of Fem protein in the determination of sexes and casts in *M. interrupta*.

Keywords: *feminizer*; Sex determination; Determination of caste; *Melipona interrupta*; Heterologous expression

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Abelhas	15
1.2 Determinação de sexo.....	17
1.3 Diferenciação de castas	18
1.6 Expressão Heteróloga.....	25
2. Objetivos	30
2.1 Objetivos gerais.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. Material e Métodos	31
3.2 Células hospedeiras utilizadas.....	31
3.2.1 <i>E. coli</i> JM110	31
3.2.2 <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLysS	31
3.2.3 <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3).....	32
3.3 Plasmídeos utilizados	32
3.3.1 Vetor pFEM.....	32
3.3.2 pGSHP	32
3.3.3 pGSFEM	33
3.4. OBTENÇÃO DO VETOR pGSFEM.....	33
3.4.1 Gene <i>fem</i> sintético	33
3.4.2 Propagação dos plasmídeos pGSHP e pFEM.....	34
3.4.3 Análise e isolamento do vetor de expressão	34
3.4.4 Seleção de clones recombinantes	35
3.5 EXPRESSÃO DE rMIFEM.....	35
3.5.1 Transformação de células quimiocompetentes com pGSFEM	35
3.5.2 Indução em placa	35
3.5.3 Indução em meio líquido– pequena escala	35
3.5.4 Indução para posterior purificação da proteína rMIFEM.....	36
3.5.5 Obtenção dos extratos protéicos	36

3.5.6 Purificação da proteína r <i>Mi</i> FEM.....	37
3.5.7 Renaturação de r <i>Mi</i> FEM.....	37
3.5.9 Interação de r <i>Mi</i> FEM com proteínas endógenas de <i>M. interrupta</i>	38
3.5.6 Purificação de SR-proteínas de <i>M. interrupta</i>	39
3.6 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA	40
4 Resultados e discussão	41
4.1 Obtenção do gene <i>fem</i> de <i>M. Interrupta</i> sintético	41
4.2 Obtenção do vetor de expressão pGSFEM.....	43
4.3 Indução da proteína r <i>Mi</i> FEM em meio líquido	45
4.4.Obtenção dos extratos proteicos	46
4.5 Purificação de r <i>Mi</i> FEM a partir do extrato proteico de Rosetta (DE3)/ pGSFEM	48
4.8 Purificação de proteínas SR de <i>M. interrupta</i>	51
4.12 Sequências ESE no éxon 5 de <i>DSX</i>	55
5. Conclusões.....	56
6. Referências.....	57
7. Anexos	64
7.6 Gel de SDS-PAGE	66
7.6.1 Coloração PlusOne Coomassie tablets PhastGel R-350	66
7.6.2 Solução descorante composição	66
7.6.3 Coloração do gel de SDS-PAGE	67
7.6.4 Tampão de amostra 2x	67
7.7 Corrida em gel de agarose da digestão de clones recombinantes	67

Lista de abreviações

Fem= Feminizer

Dsx= Doblesex

Csd= Complementar sex determination

ESE= Exonic splicing enhancer

hnRNA= RNA nuclear heterogéneo

LB= Luria-Beltran

mL= mililitro

µL= Microlitro

IPTG isopropil tiogalactosídeo

OD = Densidade ótica

SDS= sodium dodecyl sulfate

HCl = Ácido clorídrico

M = Molar

mM = Milimolar

TEMED = Tetramethylethylenediamine

RPM = Rotações por minuto

PBS = Tampão fosfato salino

PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride

CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

TCA= ácido tricloroacético

V = Volume

mA = Miliampère

rMiFEM= Proteína FEM recombinante de *Melipona interrupta*

Lista de figuras

Figura 1. Disposição das células de cria e fases do desenvolvimento de abelhas do gênero <i>Melipona</i> ..	16
Figura 2. Segregação de castas em <i>Melipona quadrifasciata</i> , conforme hipótese Kerr (1973).....	19
Figura 3. Transcritos sexo-específicos do gene <i>fem</i> em <i>Melipona interrupta</i> ..	20
Figura 4. Cascata de determinação do sexo e de castas proposta para <i>Melipona interrupta</i> por atuação do gene <i>fem</i> ..	21
Figura 5. Domínios protéicos de <i>MiFEM</i> ..	22
Figura 6. Funcionamento das SR-proteínas.....	23
Figura 7. Mecanismo de <i>splicing</i> dos transcritos de <i>dsx</i> em <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Figura 8. Transcritos de <i>Mi-dsx</i> de machos e fêmeas.....	25
Figura 9 Vetor de expressão em <i>Escherichia coli</i>	26
Figura 10. Sistemas de expressão em cepas λ DE3.....	27
Figura 11. Esquema geral do vetor pFEM.....	32
Figura 12 Plasmídeo pGSHP.....	32
Figura 13. Plasmídeo pGSFEM.....	33
Figura 14. Alinhamento da sequência do gene sintético <i>rMifem</i> com a sequência do gene selvagem <i>Mifem</i>	42
Figura 15. Alinhamento da sequência peptídica predita a partir de <i>rMiFEM</i> e de <i>MiFEM</i>	43
Figura 16. Perfil de restrição (<i>Nde</i> I e <i>Not</i> I) do plasmídeo recombinante pGSFEM em gel de agarose 1,2%.....	43
Figura 17. Perfil de restrição (<i>Nde</i> I e <i>Not</i> I) dos plasmídeos pFEM e pGSHP em gel de agarose 1,2%.....	44
Figura 18. Perfil eletroforetico em gel SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos das células recombinantes contendo o plasmídeo pGSFEM.....	45
Figura 19. Perfil de solubilidade de <i>rMiFEM</i>	46

Figura 20. Perfil da solubilidade proteica de <i>rMiFem</i> induzida em diferentes condições.	46
Figura 21. Purificação de <i>rMiFEM</i> por cromatografia de afinidade.	48
Figura 22. Perfil eletroforetico da proteína <i>rMiFEM</i> após renaturação in vitro .	49
Figura 23. Teste de interação da proteína <i>rMiFEM</i> com proteínas endógenas de <i>M. interrupta</i>	50
Figura 24. Domínios proteicos encontrados na proteína <i>MiFEM</i>	51
Figura 25. Sequência de aminoácidos de <i>MiFEM</i>	52
Figura 26. Possível papel da PKC na determinação de castas de <i>M. interrupta</i>	53
Figura 27. Perfil proteico da precipitação com cloreto de magnésio.....	54
Figura 28. Foto original correspondente a figura 17	67

1.Introdução

1.1 Abelhas

No mundo existem aproximadamente 20 mil espécies de abelhas (Ascher e Pickering 2018) que se diferenciam em forma, tamanho e até mesmo quanto ao nível de socialidade, mas compartilham a característica de coletarem néctar e pólen, com raras exceções. A maior parte das espécies de abelhas são solitárias (Michener 2007). As abelhas eussociais são aquelas onde se observa um alto grau de organização social, com sobreposição de gerações, divisão de castas e de trabalho, em que cada grupo etário é responsável por um tipo de atividade dentro da colmeia. Dentro da família Apidae, duas tribos de abelhas são consideradas altamente sociais: os Apini e Meliponini (Michener 2007).

Apini é formada apenas pelo gênero *Apis*, abelhas comumente conhecidas como abelhas “europeias”, “africanizadas” que possuem ferrão para se defender (Michener 2007) que constroem células de cria organizadas em lâminas de cera verticais (Michener 2007). Já as abelhas Meliponini apresentam células de cria dispostas horizontalmente formando discos sobrepostos dentro da colônia, fixados por pilastras de cerume (Kerr *et al.* 1996). Meliponini abrange todas as espécies de abelhas sem ferrão com mais de 70 gêneros e cerca de 400 espécies, sendo o gênero *Melipona* o mais numeroso em espécies (Pedro, 2014). Neste gênero, as abelhas constroem todas as células do disco de cria de tamanhos iguais (Figura 1), não havendo diferença entre células de machos, operárias e rainhas (Kerr *et al.* 1996). As rainhas emergem praticamente durante todo ano, sendo que dentre as fêmeas nascidas, cerca de até 25% (em condições de boa alimentação) são rainhas (Kerr *et al.* 1966; Kerr 1975). Fatores ambientais, tais como temperatura e alimento podem influenciar a proporção de produção de rainhas (Kerr *et al.* 1966; Nunes-Silva *et al.* 2006; Becker *et al.* 2018).

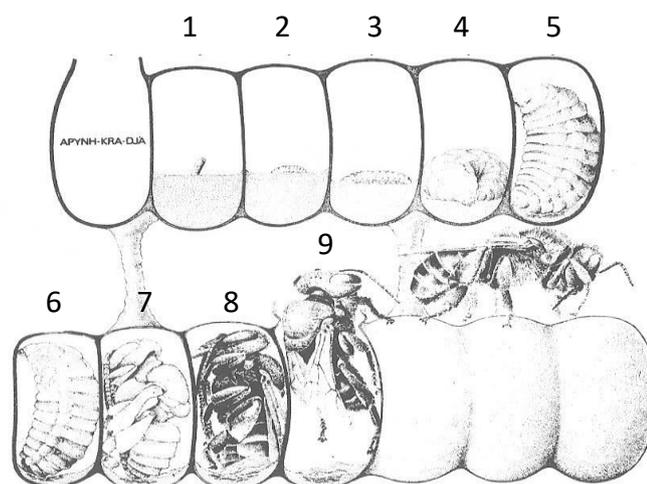


Figura 1. Disposição das células de cria e fases do desenvolvimento de abelhas do gênero *Melipona*. As células são provisionadas de alimento para posterior oviposição e operculação. A célula de cria permanece fechada até o completo desenvolvimento do indivíduo. (1) Ovo; (2) Larva de 1º estágio; (3) Larva de 2º estágio; (4) Último estágio larval; (5) Larva pré-defecante; (6) Larva defecante; (7) Pupa; (8) Pupa pigmentada; (9) Adulto recém emergido. Figura e informações de Kerr *et al.* (1996).

Ao visitarem as flores em busca de pólen e néctar, as abelhas desempenham um importante papel na polinização. Sua importância na polinização é tanta que um terço da produção mundial depende da polinização proveniente de abelhas (Kerr *et al.* 2001; Slaa 2006). Segundo a *Food and Agricultural Organization* (FAO 2016) cerca de 235 bilhões a 577 bilhões de dólares anuais são gerados pelos polinizadores através da agricultura global.

Em todo mundo é notória a queda populacional das abelhas, no ano de 2016 sete espécies de abelhas (*Hylaeus anthracinus*, *H. assmilans*, *H. facilis*, *H. hilaris*, *H. kuakea*, *H. longiceps* e *H. mana*) entraram para a lista de espécies ameaçadas de extinção segundo o American Fisheries and Wildlife Service (FWS 2016).

Segundo Kerr (2002) os meliponíneos brasileiros estão sendo destruídos muito mais rapidamente que o próprio desmatamento da floresta. Os principais fatores citados são as queimadas, desmatamentos, ação de meleiros (que inclui meleiros indígenas), o uso de inseticidas e até mesmo a fome, que segundo o autor, leva ao aumento da ação de meleiros. Inclusive as áreas que são protegidas pelo IBAMA são muito menores do que o necessário, para abrigar o número mínimo de 44 colônias em sua área de reprodução para evitar o decaimento das colônias (Kerr *et al.* 2001). A redução do número de colônias da

mesma espécie promove possíveis endocruzamentos que são prejudiciais para manutenção das colônias. Do ponto de vista de como ocorre a determinação de sexo das abelhas, os endocruzamentos podem levar a produção de machos diploides dentro da colônia em proporções de 1 macho: 1 fêmea, o que leva ao rápido decaimento da colônia (Kerr *et al.* 1996; Carvalho 2001).

O uso de pesticidas por agricultores é outro fator preocupante, pois eles apresentam efeitos tóxicos para as abelhas. No ano de 2018 quatro neonicotinóides foram proibidos na Europa, devido aos seus efeitos tóxicos para as abelhas (Nature News 2018). Além da toxicidade para as abelhas que entram em contato com os pesticidas, tais substâncias podem levadas pelas abelhas até as colônias e prejudicar o desenvolvimento das larvas. Um estudo realizado por Kessler *et al.* (2015), mostrou que as abelhas da espécie *Apis mellifera* tinham preferência em visitar flores que haviam sido pulverizadas com pesticidas. Além da influência tóxica para as abelhas, outro estudo mostrou que pesticidas tinham o efeito negativo na produção de rainhas (Santos *et al.* 2016).

1.2 Determinação de sexo

O mecanismo de determinação de sexo em abelhas é melhor compreendido na espécie *Apis mellifera*. Após acasalamento, rainhas podem botar ovos não fecundados (haploides) dando origem aos machos naturais ou ovos fecundados (diploides), que originarão fêmeas ou machos diploides (Kerr 1997).

Abelhas não possuem cromossomos sexuais. Sendo assim, a presença de machos diploides observados em vespas *Habrobacon* deu início à hipótese de determinação complementar do sexo (Whiting 1943). Hoje é bem aceitável que o mecanismo de determinação sexual se baseia no Loco SDL (*Sex Determination Locus*) sendo que ovos hemizigóticos ou fertilizados homozigóticos desenvolvem-se em machos e os heterozigóticos dão origem a fêmeas. Com base em análises por marcadores moleculares e sequenciamento, Beye *et al.* (2003) descobriram uma sequência de 13 Kb que era sempre heterozigótica em fêmeas. Essa sequência foi denominada gene *csd* (*complementary sex determiner*), a qual é traduzida em uma proteína rica em arginina e serina, cuja porção carboxiterminal tem alguma similaridade com o gene *tra* de *Drosophila*.

Estudos com RNA de interferência que tinham alvo o gene *csd*, demonstraram que fêmeas de *Apis mellifera* passavam a ter gônadas masculinizadas, permitindo inferir que o *csd* era um dos genes chaves para determinação de sexo. A proteína codificada pelo gene *csd* atua como fator de *splicing* e é responsável por transferir a informação primária de determinação de sexo para o gene seguinte (Carvalho 2001; Beye *et al.* 2003; Van *et al.* 2006). Sabe-se que o gene seguinte da cascata de regulação de sexo é o gene *feminizer (fem)*, que é uma duplicação do gene *csd*, localizado a cerca de 12 Kb *upstream* ao gene *csd*. Estudos utilizando a aplicação de RNA de interferência contra o gene *fem* em embriões de fêmeas de abelhas *Apis mellifera*, demonstraram que o gene estava correlacionado com a diferenciação sexual, uma vez que os mesmos indivíduos em estágios maduros demonstraram características morfológicas e gônadas masculinas (Gempe *et al.* 2009).

Por causa dos estudos de determinação de sexo para *Drosophila* e de análises de bioinformática, os cientistas já conheciam o gene *dsx (Double Sex)* que codifica um fator de transcrição de ação universal no desenvolvimento do sexo (Bopp *et al.*, 2014) e previam que este poderia ser o responsável por ativar os genes sexo-específicos nas abelhas. A proteína Fem que é um fator de *splicing*, atua sobre o pré-mRNA do *dsx*, dando origem a isoforma *dsx^F* em fêmeas. Por outro lado, nos machos a proteína Fem não é funcional logo o gene *dsx* segue o *splicing* padrão dando origem a isoforma o *dsx^M* (figura 4) (Gempe *et al.* 2009).

1.3 Diferenciação de castas

Em *Melipona*, rainhas emergem dos discos de cria ao longo do ano, em proporções que nunca ultrapassam 25% em relação ao número total de fêmeas (Kerr 1950). Kerr propôs que a diferenciação de casta em *Melipona* é genética-alimentar, onde existe a predisposição genética que pode ser influenciada por fatores ambientais. Foi proposto que dois genes, *Xa* e *Xb*, com dois alelos cada um, sejam responsáveis por diferenciar a casta em *Melipona* (Kerr *et al.* 1966; Kerr 1973).

Para que o indivíduo se diferencie em rainha é necessário que o mesmo seja duplamente heterozigoto para ambos os genes, Xa e Xb , além de receber uma quantidade de alimento suficiente (Figura 2). Na Figura é possível observar proles do cruzamento hipotético de uma rainha com possíveis machos. Indivíduos homozigóticos para um ou ambos os genes ou mesmo que receberam alimentação em quantidade insuficiente se desenvolverão em operarias. Somente indivíduos que são duplamente heterozigóticos para ambos os genes de determinação e tiverem uma alimentação mínima suficiente se desenvolverão em rainhas. Somente nestas condições haverá a produção suficiente de Hormônio Juvenil para que o indivíduo se diferencie em uma fêmea completa. Caso o indivíduo que seja duplamente heterozigoto para Xa e Xb , não receba a quantidade mínima de alimento para a diferenciação, gera uma fenocópia, ou seja, nasce uma fêmea com fenótipo de operária, mas com características internas de rainha (Kerr *et al.* 1966; Kerr *et al.* 1975; Kerr 1997).

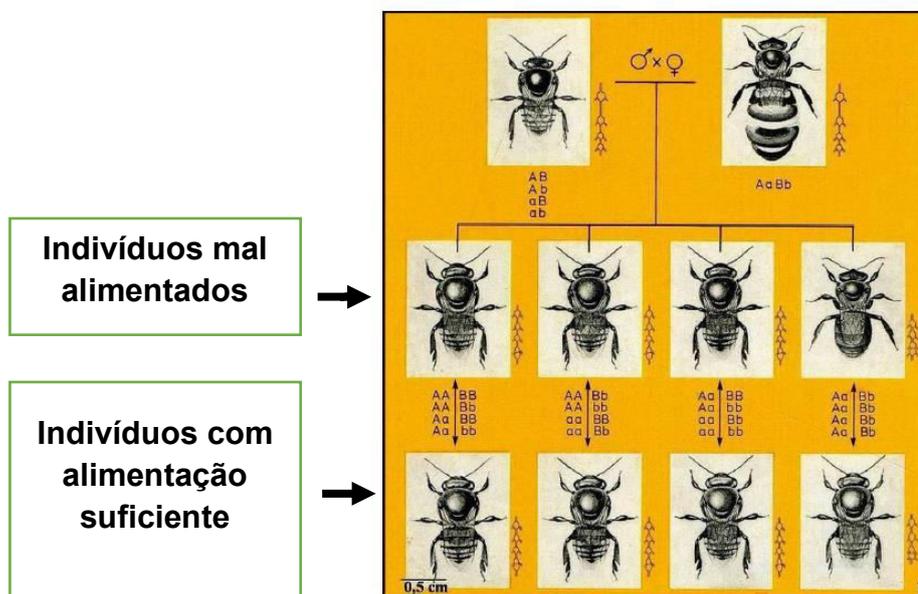


Figura 2. Segregação de castas em *Melipona quadrifasciata*, conforme hipótese Kerr (1973). Na figura está esquematizado o cruzamento entre uma rainha duplamente heterozigótica para os genes Xa e Xb e quatro possíveis machos hemizogóticos contendo apenas um alelo de ambos os genes. A prole desse cruzamento gerará operarias quando homozigótico para um ou ambos os genes. Quando duplamente heterozigótica e bem alimentada a larva se desenvolverá em uma rainha, porém mesmo em dupla heterozigose se o indivíduo for mal alimentado dará origem a uma operaria. Fonte da imagem: Ciência e Cultura 25 (10) outubro de 1973 (capa).

Outros fatores ambientais também podem agir junto com a predisposição genética para diferenciar a casta no gênero *Melipona*. Nunes-Silva *et al.* (2006) demonstraram que o choque térmico aplicado em abelhas tratadas com

hormônio juvenil (HJ) (a aplicação tópica do HJ em abelhas leva a produção de até 100% de rainhas conforme verificado por Campos *et al.* 1975) teve efeito negativo na produção de rainhas, sugerindo assim que a temperatura pode influenciar na diferenciação de castas.

1.4 *fem*: um importante gene envolvido tanto na determinação de sexo quanto na diferenciação da casta em *Melipona interrupta*

O gene inicial de determinação de sexo (*csd*) ainda não foi encontrado no gênero *Melipona*. Por outro lado, o gene *fem*, um dos genes chaves de determinação de sexo em *A. mellifera*, foi bem estudado na espécie *Melipona interrupta*. O gene *fem* foi encontrado em *M. interrupta* por Nunes (2008) e foi recentemente melhor caracterizado por Brito *et al.* (2015). Demonstrou-se que em *M. interrupta* o gene *fem* além de estar correlacionado com a determinação de sexo em fases primárias de maturação, está envolvido com a diferenciação de castas em fase mais tardia de maturação do indivíduo. Nesta espécie, *fem* tem transcritos sexos específicos sendo que os transcritos de machos e fêmeas se diferenciam por uma sequência nucleotídica de 59 pb que está presente somente nos machos. Essa sequência nos machos, contém um códon de parada, TGA (Figura 3) que faz com que tradução do mRNA do transcrito de machos seja incompleta, gerando uma proteína truncada (Brito *et al.* 2015; Nunes 2008).

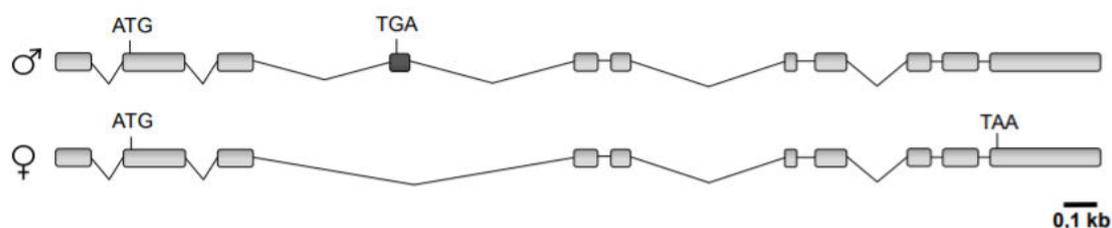


Figura 3. Transcritos sexo-específicos do gene *fem* em *Melipona interrupta*. Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. Observa-se que o transcrito de macho apresenta um éxon não presente no transcrito de fêmea, esse éxon apresenta um códon de parada que faz com que a proteína Fem^M seja menor que a Fem^F. Fonte da imagem: Brito *et al.* 2015.

Apesar de ainda não ter sido identificado o sinal primário de *start* da determinação sexual, conforme modelo em *Apis mellifera*, o gene *fem* em *M. interrupta* demonstrou ter uma participação tanto na determinação de sexo como na diferenciação de castas nessas abelhas (Figura 4). Tratando-se de determinação de sexo, acredita-se que em machos este gene segue o *splicing* padrão, enquanto nas fêmeas ele sofre *splicing* alternativo com tradução de uma proteína funcional. A proteína Fem^F deve atuar junto com a TRA-2 no *splicing* alternativo do mRNA do gene *dsx*, que quando transcrito dá origem a DSX^F . Enquanto nos machos a proteína truncada não tem efeito nos transcritos de *dsx* (Brito *et al.* 2015; Brito *et al.* 2017).

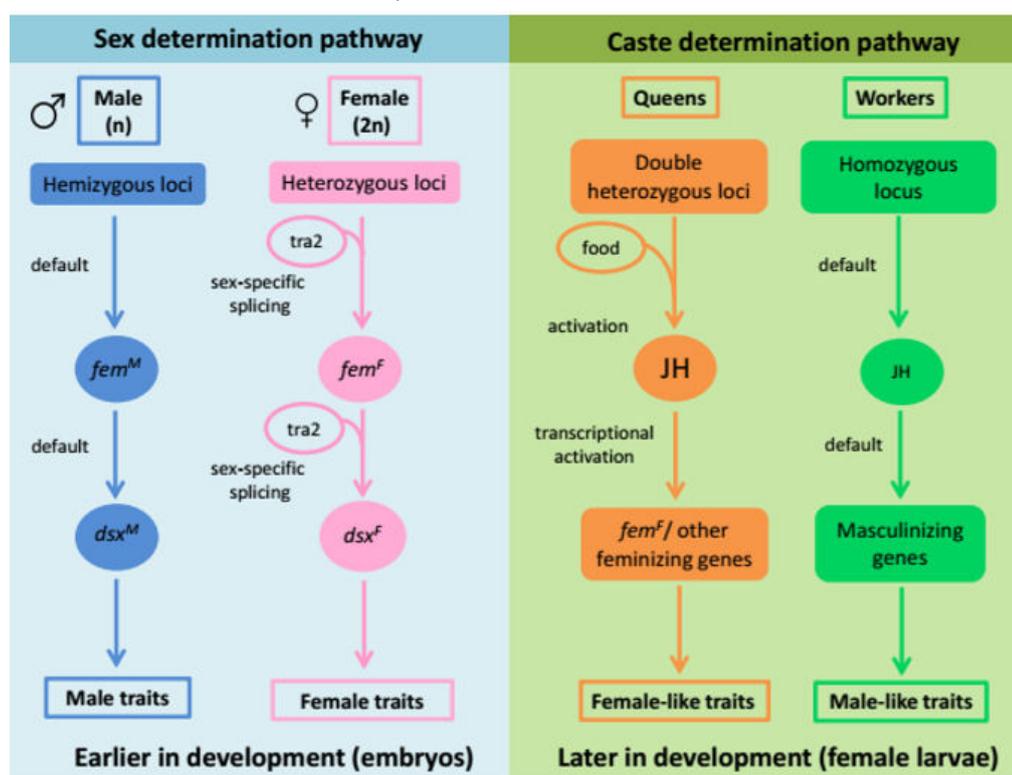


Figura 4. Cascata de determinação do sexo e de castas proposta para *Melipona interrupta* por atuação do gene *fem*. À esquerda, em azul, está representado o esquema para a determinação de sexo onde fêmeas são heterozigóticas. Neste caso uma proteína funcional é formada, essa proteína junto com Tra2 é responsável pelo *splicing* dos transcritos do gene *fem*, assim o gene traduz uma proteína também funcional (Fem^F) que atua no *splicing* alternativo do gene *dsx*, dando origem a isoforma dsx^F , a qual ativará genes sexo-específicos de fêmeas. Os machos são hemizigóticos ou homozigóticos, portanto o gene *fem* e o gene *dsx* seguem o *splicing* padrão com expressão dos genes sexo específicos de machos. Em uma fase tardia do desenvolvimento larval, a condição de dupla heterozigose dos genes *Xa* e *Xb* e boa alimentação do indivíduo, há aumento da produção de HJ (hormônio juvenil), que leva a maior expressão de *fem* e outros genes feminilizantes culminando na expressão de características secundárias femininas e a formação de rainhas. Por outro lado, a homozigose de um ou ambos os genes *Xa* e *Xb* leva a expressão padrão de HJ e do gene *fem* que por sua vez acarreta na expressão de genes masculinizantes, produzindo operárias. (Fonte da figura e dados Brito *et al.* 2015).

Brito e colaboradores (2015) apresentaram evidências de que, em uma fase larval tardia, o gene *fem* está correlacionado com a diferenciação de castas. A primeira dessas evidências descritas pelos autores foi que, ao tratar larvas pré-defecantes (fase onde ocorre a diferenciação de castas) com Hormônio Juvenil (HJ), as larvas passavam a ter uma maior expressão dos transcritos de *fem*. A segunda delas foi que em pupa de olho branco as rainhas possuem uma maior expressão dos transcritos de *fem* quando comparado com machos e operárias. Por isso os autores propõem que quando os genes de diferenciação de castas propostos por Kerr (1973) – *Xa* e *Xb* – estão em heterozigose e o indivíduo recebe uma boa alimentação, é ativada uma alta produção de HJ. A grande quantidade de HJ leva a expressão de *fem^F* o que leva a ativação de genes feminilizantes, dando origem a rainhas (Figura 4). Por outro lado, a homozigose de um ou ambos os genes ou uma alimentação larval insuficiente levam à baixa produção de HJ, favorecendo a expressão de genes masculinizantes, dando origem a operárias (Brito *et al.* 2015).



Figura 5. Domínios protéicos de *MiFem*. A proteína *MiFem* possui dois domínios ricos em arginina e serina (RS), evidenciados em vermelho. Um domínio conservado ligado a autorregulação de insetos em amarelo. Na porção carboxi-terminal existe uma região rica em prolina que assim como as regiões RS estão ligadas a interações proteína-proteína. (Fonte da figura e dados Brito *et al.* 2015)

A sequência do transcrito de *fem* ao ser traduzida *in silico* revelou dois domínios ricos em arginina e serina que podem ser observados em vermelho na figura 5, um domínio ligado a autorregulação de insetos em amarelo e um domínio rico em prolina destacado em azul (Brito *et al.* 2015). Os domínios ricos em arginina e serina são domínios típicos de uma classe de proteínas chamadas de Proteínas SR. Essa classe de proteínas está envolvida no *splicing* alternativo do RNA mensageiro, exportação do RNA mensageiro para o citoplasma e algumas até mesmo auxiliando a tradução. Como características fundamentais, as Proteínas SR possuem um ou dois domínios de ligação ao RNA mensageiro na região N-terminal e um domínio RS. No entanto a proteína *Fem* não possui qualquer domínio de ligação ao RNA mensageiro (Manley 1996; Blencowe 1998;

Nunes-Silva 2008; Brito *et al.* 2015). Porém, a proteína Fem possui dois domínios ricos em serina e arginina, o que deve-lhe conferir características químicas similares às Proteínas SR. Desta forma, Fem pode pertencer a um grupo de proteínas chamadas de proteínas correlacionadas as SRs (Blecowe 1999; Nunes-Silva 2008; Brito *et al.* 2015).

1.5 Mecanismos moleculares das Proteínas SR

Proteínas SR atuam tipicamente como componentes do spliceossomo. Os sítios no mRNA cujo os componentes do spliceossomo se ligam podem ser fracos ou fortes, o quão forte esse sítio é depende do quão conservadas são essas sequências (Hastings e Krainer 2001; Zarra *et al.* 2014; Fu e Ares 2014). Sítios fortes são geralmente de *splicing* constitutivo, enquanto a excisão de íntrons de regiões sítios fracos ocorrem dependendo de sequências reguladoras adicionais (Hastings e Krainer 2001; Zarra *et al.* 2014). Essas sequências extras podem ser encontradas tanto em regiões exônicas como em regiões intrônicas (Adams *et al.* 1996; Fu e Ares, 2014; Risso *et al.* 2012) e atuam promovendo ou inibindo a promoção do *splicing* (zarra *et al.* 2014; Watson *et al.* 2015). Uma dessas sequências é chamada de “amplificadores de processamento exônico” (ESE, do inglês *exonic splicing enhancers*) (Figura 6). Neste tipo de sequência,

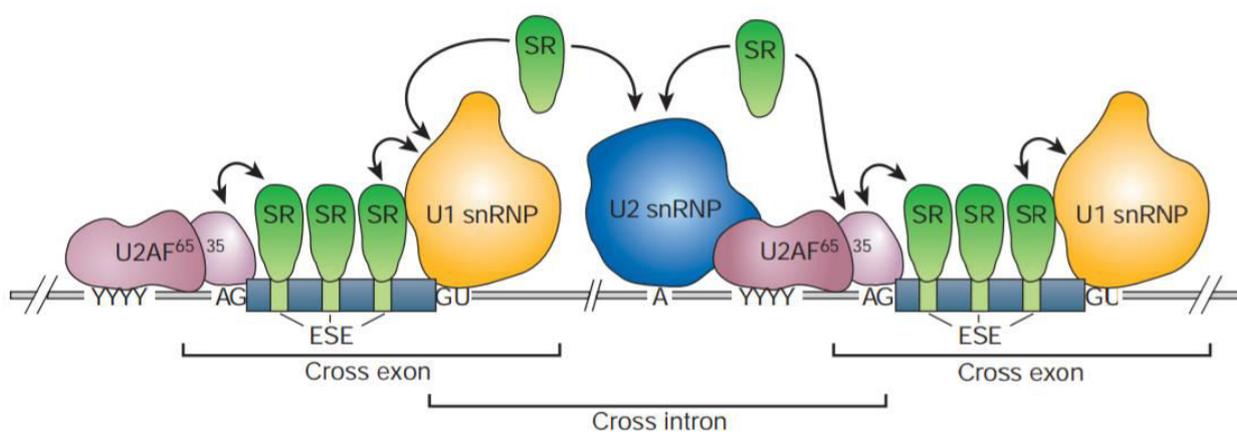


Figura 6. Funcionamento das SR-proteínas. As proteínas SR (indicadas na figura por SR) se ligam em regiões ESE (*exonic splicing enhancers*) e, então, recrutam as proteínas de *splicing* (snRNP) favorecendo que o *splicing* ocorra. Os domínios SR são responsáveis pela interação entre as proteínas, essas interações estão sendo indicadas pelas setas (Fonte da figura e dados: Maniatis *et al.* 2002).

as Proteínas SR se ligam e recrutam a maquinaria do spliceossomo promovendo o *splicing*, onde os domínios RS auxiliam na interação proteína-proteína. Essas interações, evidenciadas na Figura 6, estão representadas por setas entre as SRs e a maquinaria do spliceossomo (Lopez, 1998; Hastings 2001; Maniatis *et al.* 2002; Feng *et al.* 2008).

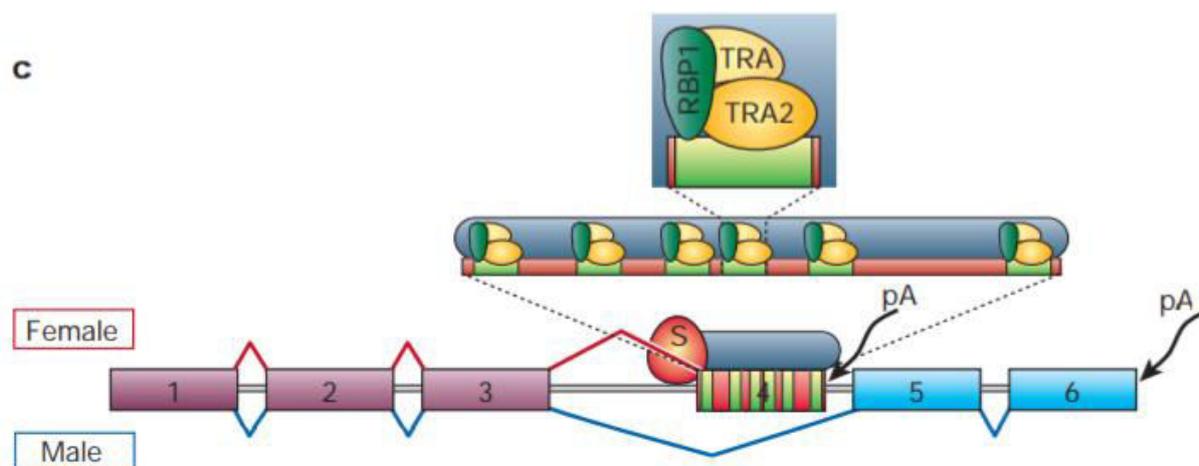


Figura 7. Mecanismo de *splicing* dos transcritos de *dsx* em *Drosophila melanogaster*. O mRNA do *dsx* das fêmeas é formado pelo éxons 1, 2, 3 e 4 (as linhas vermelhas da parte inferior da figura indicam a ligação destes éxons), este último éxon (4), contém uma sequência de poliadenilação indicada por pA. O mRNA do *dsx* dos machos é formado pelos éxons 1, 2, 3, 5 e 6 (as linhas azuis da parte inferior indicam a ligação destes éxons). O éxon 6 contém uma sequência de poliadenilação indicada por pA. Essa diferença entre os transcritos de machos e fêmeas ocorre porque TRA só é funcional nas fêmeas. Por isso, apenas nas fêmeas uma proteína heterotrimérica (TRA, TRA2 e RBP1, representadas na parte superior aumentada), que se liga em 6 sequências ESE (em vermelho) no éxon 4 no hnRNA do *dsx*. Ao se ligarem recrutam a maquinaria de *splicing* para uma região a montante logo no início do éxon 4, desta forma este éxon permanece no mRNA das fêmeas. Como nos machos essa proteína heterotrimérica não é formada, o éxon 4 não é reconhecido pela maquinaria de *splicing*, desta forma ele é retirado do mRNA nos machos. Fonte da figura e dados: Maniatis *et al.* 2002.

Esse mecanismo de regulação de *splicing* por intermédio das SRs e das regiões ESE é muito bem caracterizado no *splicing* do hnRNA do gene *dsx* em *Drosophila* (Maniatis *et al.* 2002; Singh e Valcárcel 2005). O *splicing* do *dsx* é regulado por proteínas heterotriméricas. Duas SRs auxiliam o *splicing* alternativo do hnRNA de *dsx*, sendo elas TRA2 e RBP1, uma outra proteína regulatória chamada de TRA também está envolvida no processo que, de modo muito interessante, é homóloga a Fem. Os três primeiros éxons do gene são constitutivamente expressos em ambos os sexos, a maquinaria do spliceossomo não consegue reconhecer o sítio de *splicing* no montante de início do éxon 4, o que leva a exclusão desse éxon nos machos. As proteínas heterotriméricas (TRA, TRA2 e RBP1) reconhecem seis cópias de ESEs indicadas pelo retângulo

verde (Figura 7) do éxon 4 nas fêmeas; ao se ligarem, essas proteínas recrutam a maquinaria de spliceossomo para o montante de início ao éxon 4, o que faz com que ele esteja presente nas fêmeas (Nagoshi e Baker 1990; Heinrichs e Baker 1995; Tacke e Manley 1999; Maniatis *et al.* 2002; Singh e Valcárcel 2005). Esse éxon contém um códon de parada e no final dele também é possível observar um sinal para poliadenilação, ou seja, nas fêmeas o mRNA sofre poliadenilação logo após o éxon 4 (os locais de poliadenilação são indicados na Figura 7 pela sigla PA) (Heinrichs e Baker 1995; Manley e Tacke 1996; Maniatis *et al.* 2002; Singh e Valcárcel 2005; Venables *et al.* 2012).

Ainda não se sabe exatamente como a proteína *Mi-Fem* (Fem de *M. interrupta*) desempenha seu papel durante os *splicing* do hnRNA de *Mi-dsx*. Mas como sugerido por Brito *et al.* (2015), Fem deve auxiliar *Mi-TRA2* no *splicing* do hnRNA de *Mi-dsx*. Recentemente os transcritos de *Mi-dsx* de machos e fêmeas foram sequenciados e caracterizados por Brito (2017). A diferença dos transcritos de machos e fêmeas se dá pela presença do éxon 5 exclusivo de fêmeas, o códon contém um éxon de parada logo no início do éxon 5 (Brito 2017), como pode ser observado na Figura 8.

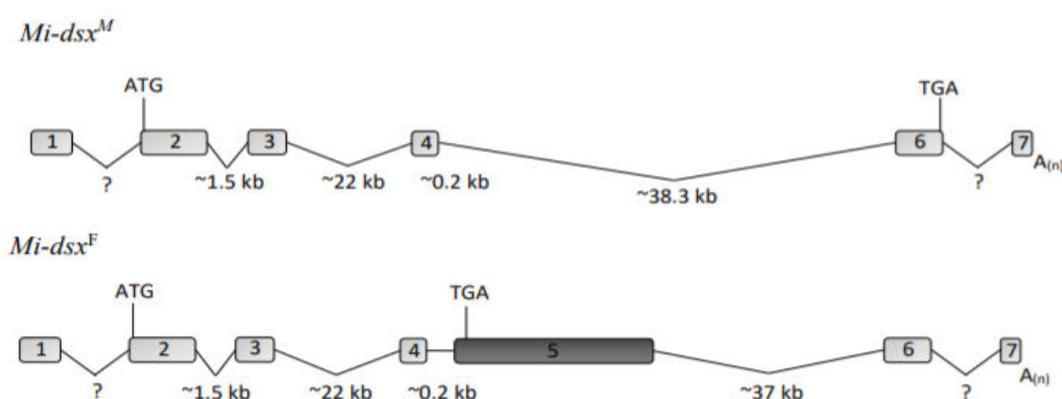


Figura 8. Transcritos de *Mi-dsx* de machos e fêmeas. Linhas representam os íntrons e os retângulos representam os éxons. *Mi-dsx^M* representa o transcrito sexo-específico de macho o qual se diferencia do transcrito das fêmeas pela ausência do quinto éxon. O transcrito sexo específico de fêmea está representado por *Mi-dsx^F*. Fonte: figura e dados Brito (2017).

1.6 Expressão Heteróloga

Proteínas são sempre requeridas para diferentes abordagens científicas seja para caracterização bioquímica, procedimentos de imunização ou outros estudos investigativos. Independente dos fins, estas abordagens requerem, em

geral, uma grande quantidade de proteína. Devido às dificuldades em se obter proteínas a partir do próprio organismo, o uso de técnicas de engenharia genética tem proporcionado grandes avanços para obtenção de polipeptídeos com estrutura e função comparáveis às proteínas nativas (Rosano e Ceccarelli 2014).

Dois classes de enzimas tiveram papel crucial para o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética: as enzimas de restrição tipo II, capazes de clivar ligações fosfodiéster em sítios específicos, e a enzima DNA-ligase, que permite o restabelecimento das ligações fosfodiéster. Juntamente com os avanços da síntese química de DNA, permitiram a criação de vetores, seja de clonagem e ou de expressão totalmente sintéticos (Mandecki *et al.* 1990) cujos principais elementos estruturais estão representados na Figura 9.

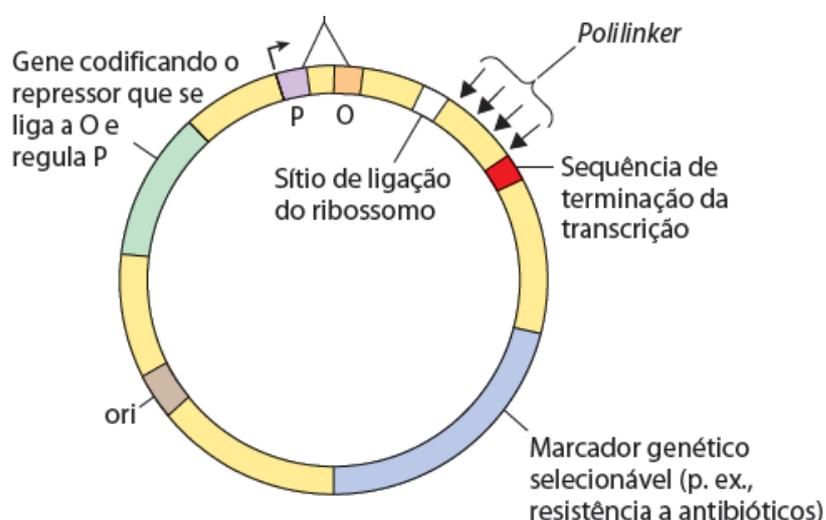


Figura 9. Vetor de expressão em *Escherichia coli*. A região *polilinker* é onde o gene de interesse deve ser clonado. As sequências denominadas P (roxo) e O (laranja) indicam respectivamente a região promotora e operadora, regiões que regulam a expressão do gene de interesse. A região Ori indica a origem de replicação em *E. coli*. Fonte da figura: Nelson e Cox (2014).

Os vetores de expressão são caracterizados por conter todas as sequências necessárias para a expressão de um gene de interesse, bem como a manutenção e propagação desses vetores. Sendo estas as principais sequências encontradas nos vetores de expressão: região promotora, seguida por uma região *polylinker* (sequência de DNA com vários sítios de enzimas de

restrição); sequências de início e término de transcrição; gene codificador para proteína repressora; marcador de seleção (geralmente um gene de resistência a antibióticos) e um sítio de origem de replicação (ORI) (Figura 9).

Há dois tipos de promotores amplamente utilizados em sistemas de expressão heteróloga: o promotor derivado do operon *lac*, com taxa de expressão mediana e, o promotor derivado do fago T7, de expressão forte. O promotor *lac* é ativado pela presença de lactose ou seu análogo sintético IPTG. Isso acontece porque, a lactose e o IPTG atuam como moduladores alostéricos negativos do repressor Lac, inibindo sua ligação ao operador (Bell e Lewis 2000) (Figura 10).

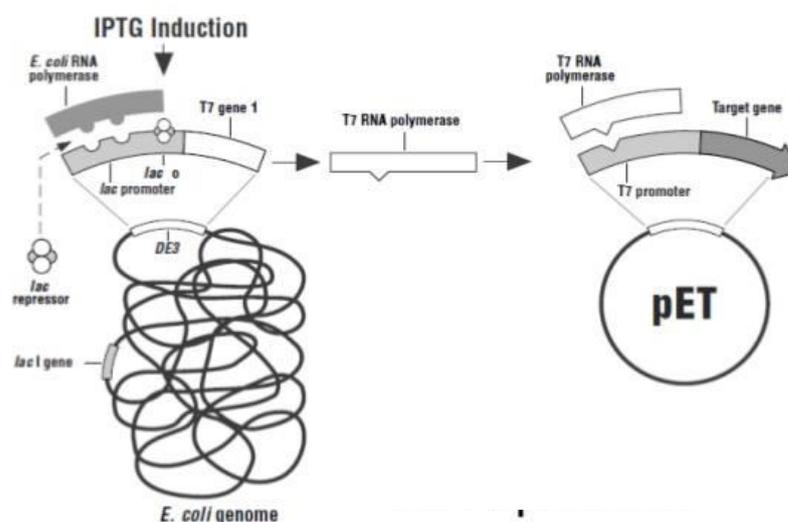


Figura 10. Sistemas de expressão em cepas λ DE3. O gene codificador para polimerase do fago T7 se encontra no genoma da célula regulada sobre o promotor LacUV5. Na presença de IPTG ou lactose a RNA polimerase do fago T7 é expressa, e então ela se liga ao promotor do vetor de expressão e transcrevendo o gene de interesse. Fonte: Salih e Mehdi (2013).

Os promotores de fago T7 dependem da presença da RNA polimerase do fago T7 para a expressão do gene de interesse. Por isso, a expressão de vetores requer cepas λ DE3, que são células que possuem em seu genoma o gene da RNA polimerase do Fago T7 regulado pelo promotor LacUV5 (Chambedin *et al.* 1990). O sistema funciona da seguinte forma: na presença de IPTG a RNA polimerase do fago T7 é expressa e, então, o gene de interesse é transcrito e posteriormente traduzido Figura 10 (Chambedin *et al.* 1990). Uma das vantagens

de se utilizar os sistemas de expressão do fago T7 é justamente a alta expressão da proteína heteróloga nesses sistemas.

Em sistemas de expressão, é possível fusionar essas proteínas com tags (sequências peptídicas), facilitam as etapas de detecção, bem como a purificação da proteína de interesse. As tags mais usadas são *poly-His* (sequências de 6 a 10 histidinas), *flag*, S-tag e GST. Uma das vantagens de se usar o *His-tag* em relação às demais citadas, é que o *His-tag* tem baixíssima imunogenicidade, não sendo realmente necessária a sua retirada para a produção de anticorpos específicos para a proteína recombinante (Lundeberg *et al.* 2000; Rosano e Ceccarelli 2014).

A expressão heteróloga não é uma ciência exata, vários problemas de expressão podem surgir, sendo os principais: baixa expressão da proteína recombinante, insolubilidade e até mesmo inatividade (Rosano e Ceccarelli 2014). Quando se trata de baixa expressão as causas geralmente são derivadas a toxicidade da proteína para a hospedeira e até mesmo do excesso de codons raros contidos no gene de interesse (Gustafsson *et al.* 2004). A insolubilidade ou formação dos corpusculos de inclusão geralmente ocorrem devido a formação incorreta de pontes disulfeto, dobramentos incorreto da proteína e até mesmo alta expressão da proteína recombinante (Tsumoto *et al.* 2003). Embora a baixa expressão seja indesejada, em alguns casos esse fator pode favorecer a obtenção de proteínas solúveis na conformação nativa. Em casos de obtenção de proteínas na forma insolúvel, se necessário, pode-se utilizar métodos laboriosos para renaturação *in vitro* (Baneyx e Mujacic 2004). Não se tem um método universal para obtenção de proteínas recombinantes solúveis. Desta forma, diferentes vetores de expressão podem ser avaliados dependendo da origem do gene a ser expresso e a finalidade de uso da proteína recombinante (Demain e vaishnav 2009).

Visto que o gene *fem* tem papel crucial na determinação de sexo e casta, e diante da atual preocupação mundial com o declínio das populações de abelhas ocasionado por diversos fatores, estudar o gene *fem* pode abrir portas para futuras intervenções biotecnológicas na meliponicultura que possam vir a ajudar na conservação destes polinizadores nativos. É mister considerar que os estudos até aqui se voltaram para a expressão do mRNA, e é sabido que por

vezes o transcriptoma não necessariamente corresponde ao proteoma nem em quantidade nem em qualidade. Diante disso, expressar heterologicamente a proteína *MiFEM* é uma maneira de investigar tal relação e, ainda, ampliar e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos genético-moleculares envolvidos na reprodução dessas abelhas. Também, tal abordagem possibilitaria a produção de anticorpos contra a proteína *MiFEM*, os quais poderiam ser utilizados para ensaios de imunoprecipitação, Elisa e *western-blot* auxiliando na busca de outros genes importantes para a determinação de sexo e casta no gênero *Melipona* e até mesmo dando robustez aos recentes achados neste campo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a participação da proteína FEM na determinação de sexo e casta de *M. interrupta*.

2.2 Objetivos específicos

Obter o gene *fem* sintético e cloná-lo em um vetor de expressão para *Escherichia coli*;

Expressar e purificar proteína FEM recombinante (rMiFEM);

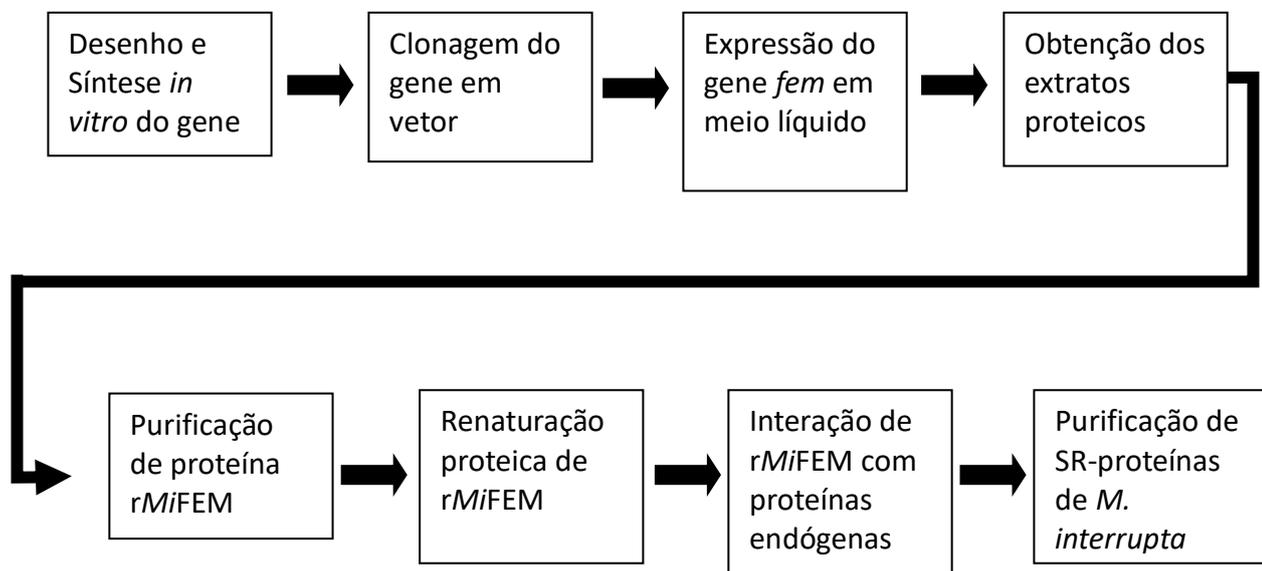
Investigar a interação *in vitro* de proteínas endógenas de abelha com rMiFEM;

Purificar Proteínas SR de *M. interrupta*

3. Material e Métodos

3.1. Estratégia experimental:

Para expressar e validar a proteína recombinante FEM de *Melipona interrupta* (rMiFEM), a partir da sequência nucleotídica do gene *fem*, foram adotadas as seguintes etapas experimentais:



3.2 Células hospedeiras utilizadas

Para fins de clonagem molecular e expressão do gene *fem*, foram utilizadas as seguintes células hospedeiras:

3.2.1 *E. coli* JM110

Utilizada para propagação dos plasmídeos e manipulação gênica descritas neste trabalho (pGSHP e o pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp). Genótipo: rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+).

3.2.2 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS

Possui o gene que codifica para a RNA polimerase do fago T7 sob controle do promotor pLac (DE3) integrado a seu genoma sendo recomendada para expressão de proteínas heterólogas. Estas células foram utilizadas para expressão da proteína rMiFEM. Genótipo: F - ompT gal dcm(DE3); hsdSB(rB-mB-); pLysS(CamR).

3.2.3 *E. coli* Rosetta 2(DE3)

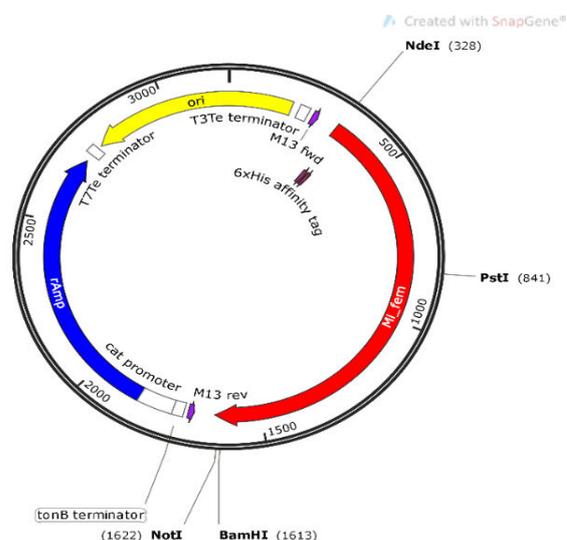
Além do fenótipo DE3, possui um plasmídeo que transcreve sete tRNAs raros em *E. coli*, sendo indicada para expressão de proteínas codificadas por genes que possuem códons raros. Foi utilizada para expressão da proteína rMiFEM. Genótipo: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R).

3.3 Plasmídeos utilizados

3.3.1 Vetor pFEM

Este vetor possui 3181 pb (Figura 11), contém gene para resistência a ampicilina e o gene *fem* sintético (Genone®).

Figura 11. Esquema geral do vetor pFEM. Criado com o programa SnapGene™. O gene *fem* pode ser observado em vermelho sendo flanqueado por sequências de sítios de restrição para enzimas *Nde* I, *Not* I e *Bam* HI



3.3.2 pGSHP

Este plasmídeo (6671 pb) contém gene para resistência a ampicilina e o gene HGPRT, que codifica para proteína hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Wöhlke, 2012). O gene HGPRT é expresso sob controle da RNA polimerase do fago T7 – pT7 e é flanqueado pelos sítios para endonucleases de restrição *Nde* I na região 5' e *Not* I na região 3' (Figura 12).

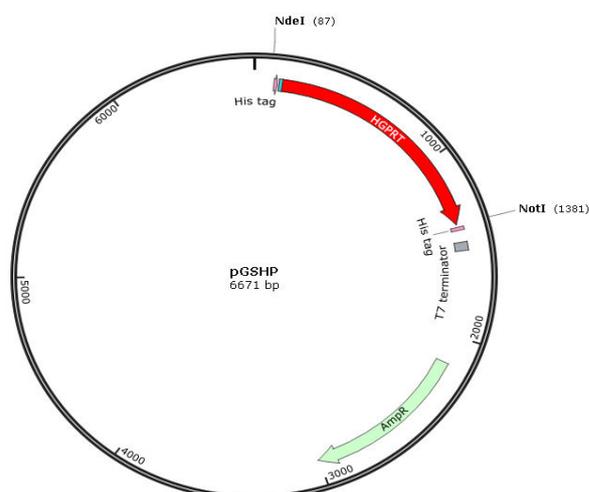


Figura 12 Plasmídeo pGSHP. Criado com o programa SnapGene™. Contém o gene HGPRT em vermelho flanqueado pelos sítios de restrição para as enzimas *Nde* I e *Not* I. Em etapa posterior, o gene HGPRT foi excisado, enzimaticamente, para inserção do gene *fem* sintético.

3.3.3 pGSFEM

Este plasmídeo foi obtido pela clonagem do gene *fem* no vetor pGSHP. As etapas de obtenção deste plasmídeo são descritas no item 3.4 deste trabalho. O gene *fem* (em verde) está representado na Figura 13, flanqueado pelas enzimas *Nde* I e *Not* I.

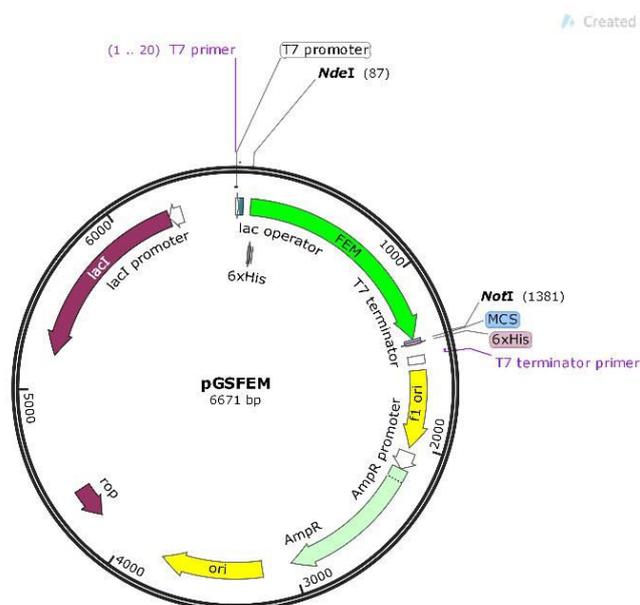


Figura 13. Plasmídeo pGSFEM. Criado com o programa SnapGene™. O plasmídeo pGSFEM foi obtido por meio da clonagem do gene *fem* no plasmídeo pGSHP. O gene *fem* está representado em verde flanqueado pelos sítios de restrição para as enzimas *Nde* I e *Not* I.

3.4. OBTENÇÃO DO VETOR pGSFEM

3.4.1 Gene *fem* sintético

A sequência nucleotídica do gene *fem* de *M. interrupta* foi cedida generosamente pela equipe do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA). Inicialmente, realizou-se a otimização dos códons considerando os códons preferenciais de *E. coli* de modo a favorecer a expressão heteróloga. Foi selecionada apenas a sequência codificante do gene, sendo que na extremidade 5' do gene foi adicionado um sítio para a enzima de restrição *Nde* I e uma sequência codificadora para 6 resíduos de histidina (*His-tag*). Na extremidade 3' do gene foram adicionados dois sítios de restrição, um de *Bam* HI e outro de *Not* I (Figura 13). Após as modificações, foi realizada a tradução da sequência *in silico* para confirmar a manutenção da fase de leitura e da sequência predita de

aminoácidos. A sequência gênica foi sintetizada e clonada no vetor pFEM pela empresa Genone®.

3.4.2 Propagação dos plasmídeos pGSHP e pFEM

Para obtenção de uma preparação dos vetores, células de *E. coli* JM110 foram inicialmente transformadas com os vetores pGSHP e pFEM utilizando células quimiocompetentes (Anexos 7.1 e 7.2). Após seleção na presença de ampicilina, três colônias foram escolhidas de cada transformação (pGSHP e pFEM) para cultivo em 3 mL caldo LB (Luria-Bertani), seguido de extração de DNA plasmidial utilizando o kit *Illustra PlasmidPrep Mini Spin* seguindo as recomendações do fabricante. O rendimento e a integridade da preparação plasmidial foi verificada por análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% na presença de brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

3.4.3 Análise e isolamento do vetor de expressão

O perfil de restrição dos vetores pGSHP e pFEM foi confirmado com clivagem dupla pelas enzimas de restrição *Not* I e *Nde* I (Biolabs®). Para cada sistema foram utilizados aproximadamente 80 ng de vetor e 10 unidades de cada enzima. Os clones foram analisados de acordo com o perfil de fragmentos liberados após a reação de digestão por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

A partir dos clones previamente selecionados realizou-se uma digestão preparativa com *Not* I e *Nde* I utilizando-se aproximadamente 300 ng de cada plasmídeo e 20 unidades de cada enzima. Ao final da reação de digestão as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%). As bandas correspondentes ao gene *fem* com aproximadamente 1300 pb e ao vetor pGS-21a (pGSHP sem o gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) com aproximadamente 5400 pb foram excisadas do gel de agarose e purificados utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit*, seguindo as recomendações do fabricante e quantificados por Qubit Fluorometric Quantitation. O sistema de ligação foi preparado utilizando 38 ng do inserto (gene *fem*) e 28 ng do vetor purificados (relação inserto:vetor igual a 3:1), na presença de 50 unidades de T4 DNA ligase Biolabs® conforme instruções do fabricante. O sistema de ligação foi incubado por 16 h a 16 °C seguido de precipitação na presença de álcool absoluto, cloreto de sódio 3 M e glicogênio. O vetor

recombinante obtido (pGSFEM) foi utilizado para transformar células *E. coli* JM110 eletrocompetentes (Anexo 7.4). Os clones recombinantes foram selecionados na presença de ampicilina (200 µg/mL).

3.4.4 Seleção de clones recombinantes

Após o crescimento das células JM110/pGSFEM em placa, foram selecionadas quatro (4) colônias para realização da extração de DNA plasmidial pelo *kit ilustra plasmidPrep Mini Spin kit* GE Healthcare, seguindo todas as recomendações do fabricante e analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%). Em seguida, o plasmídeo recombinante foi digerido com as enzimas *Nde* I e *Not* I seguido de nova análise por eletroforese em gel de agarose.

3.5 EXPRESSÃO DE rMIFEM

3.5.1 Transformação de células quimiocompetentes com pGSFEM

Células *E. coli* BL21(DE3)/pLysS e Rosetta (DE3) quimiocompetentes foram transformadas com plasmídeo pGSFEM por choque térmico (Anexo 7.2). Clones transformantes foram selecionados na presença de 100 µg/mL ampicilina (placa mãe) e utilizados, para a indução da expressão da proteína rMIFEM.

3.5.2 Indução em placa

Prepararam-se três placas (sistema de *replica plate*) contendo meio LB e antibiótico, da seguinte forma: placa 1, adição de 1 mM IPTG (isopropiltiogalactosídeo); placa 2, adição de 1 % glicose; placa 3 sem suplementações. Com auxílio de um palito estéril, 30 colônias isoladas da placa mãe foram transferidas na forma de *replica plate*. As placas foram incubadas em estufa 37 °C *overnight*.

3.5.3 Indução em meio líquido– pequena escala

As colônias selecionadas na indução em placa foram repicadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C *overnight* (pré-inóculo). Foram adicionados 100 µL do pré-inóculo em 1 mL de LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e então incubados até atingir uma densidade ótica (OD) próxima a 0,7. Ao atingir a OD de interesse foi adicionado mais 1 mL de LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e IPTG (2 mM) e, então, incubados por 2 h a

37 °C sob agitação para indução da proteína recombinante. A eficiência do sistema de indução da proteína r*Mi*FEM foi avaliada usando 2 mL do sistema, que foi centrifugado e o *pellet* homogeneizado em 200 µL de tampão de amostra (Anexo 7.6), 8 µL foram utilizados para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) (Anexo 7.1). Para a migração das proteínas foi utilizada uma tensão de 200 V, e corrente elétrica inicial de 25 mA, sendo essa aumentada para 50 mA quando as proteínas alcançaram o gel separador. Para a visualização, o gel foi corado com Coomassie *blue* R350 seguido de descoloração em solução descorante (Anexo 7.2).

3.5.4 Indução para posterior purificação da proteína r*Mi*FEM

Clones de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pGSFEM e Rosetta (DE3)/pGSFEM selecionados como descrito no item 3.5.2 foram pré-inoculados em 5 mL meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubado a 37 °C com agitação (150 rpm) durante 16 h. Um inóculo (50 mL) foi preparado a partir dos pré-inóculos e submetido a crescimento, a 37 °C sob agitação (150 rpm) até atingir DO de 0,7 a 600 nm. Em seguida foi adicionado 1 mM IPTG para a indução da proteína recombinante por 4 h. Após esse período a cultura foi centrifugada à 4.000 g/10 min e o *pellet* processado imediatamente ou estocado à – 20 °C até o momento de uso.

3.5.5 Obtenção dos extratos protéicos

O sedimento foi ressuscitado em 2 mL de tampão MCA (20mM Tris-HCl pH 7,9; 0,5 M NaCl; 10 % glicerol; 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) utilizando-se vórtex. Foram adicionados 10 µL de lisozima (20 mg/mL) e a mistura foi incubada durante 10 min a 20 °C. As amostras foram homogeneizadas com uso de disruptor ultra-sônico (3 pulsos de 30 seg e intervalos de 1 min) em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 4 µL de triton X-100 10 % (v/v) e as preparações foram centrifugadas a 12.000 g durante 10 min a 4 °C para a separação das proteínas solúveis (sobrenadante) das proteínas insolúveis (sedimento). A fração solúvel foi coletada e estocada a -20 °C e a fração insolúvel foi solubilizada 400 µL de tampão MCA (20mM Tris-HCl pH 7,9; 0,5 M NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF) e 4 µL de triton X-100. Ambas frações foram analisadas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, como o descrito anteriormente.

3.5.6 Purificação da proteína rMiFEM

Na região aminoterminal da proteína rMiFEM foi inserida uma sequência de His-Tag (item 3.3) com o intuito de facilitar a purificação. Visto que histidina tem afinidade química por íons bivalentes carregados positivamente, usa-se uma coluna contendo uma resina com níquel imobilizado. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de 5 mL de resina de níquel-NTA (Quiagen, Valencia, C.A, Pierce). Primeiramente foi feita uma lavagem da coluna com água mili-Q. Após este procedimento foi realizado o equilíbrio da coluna com tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7,9; 0,5 M NaCl; uréia 8 M). O extrato proteico contendo a proteína recombinante foi aplicada à coluna, seguido de nova lavagem com tampão A. Um gradiente (0-100 %) do tampão B (20 mM Tris-HCl pH 7,9; 0,5 M NaCl; uréia 8 M; imidazol 0,5 M) foi aplicado à coluna para a eluição das proteínas de interesse ligadas à resina. As frações de 5 mL foram coletadas e as alíquotas de 10 µL analisadas em gel SDS-PAGE, como o descrito anteriormente.

3.5.7 Renaturação de rMiFEM

Foram testados três protocolos para a renaturação rMiFEM. O protocolo 1 se baseou em diluir 2 mL da proteína purificada em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,9 e NaCl 10 mM. Inicialmente foi adicionado 1 mL de tampão de renaturação em 2 mL da proteína rMiFEM. A solução obtida foi incubada no gelo por 5 min, repetindo-se o processo até se obter um volume de 5 mL de solução, a solução foi concentrada utilizando Vivaspin™ protein concentrator spin columns - GE Healthcare, de de 3,000MWCO. Todo o processo foi repetido até se obter uma solução com aproximadamente com 0.08 M de uréia e o volume final concentrado de 2 mL de solução.

No protocolo 2, 1 mL da solução da proteína rMiFEM purificada, foi diluída em 20 mL de tampão contendo Tris-HCl 20mM pH 7,9, NaCl 10 mM, 5 % de glicerol e 0,5 mM de EDTA. A solução foi concentrada para um volume de 1 ml utilizando Vivaspin™ protein concentrator spin columns - GE Healthcare, de 3,000MWCO.

No protocolo 3, foi utilizado o protocolo de renaturação de Proteínas SR de Zahler *et al.* (1992), sendo que a concentração de EDTA e de DTT do tampão D foram modificadas do protocolo original (Dignam *et al.* 1983) (20 mM Tris-HCl

(pH 7,9), 20 % (v/v) glicerol, 0,1 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF e 0,1 mM DTT). Ao final 15 μ L da mistura de renaturação de cada protocolo (1, 2 e 3) foram misturados com tampão de amostra, fervido e analisado em gel de SDS-PAGE 10 %.

3.5.9 Interação de rMiFEM com proteínas endógenas de *M. interrupta*

Para a extração de proteínas totais de duas abelhas operárias (ambas pupas de olho preto), foram utilizados 2 mL de tampão de extração (65 mM KCl; 15 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,9; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 0,2 mM PMSF e 20 % de glicerol). As amostras (*Pool*) foram maceradas em banho de gelo com uso de disruptor ultra-sônico (4 pulsos de 30 s). Posteriormente, foram centrifugadas a 13.000 g a 4 °C por 15 min, o sobrenadante recuperado e transferido para um tubo limpo. A etapa de centrifugação e recuperação do sobrenadante foi repetida 3 vezes, com intuito de retirar qualquer proteína insolúvel. Em 200 μ L de extrato total de abelha foram adicionados 60 μ L de Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow GE Healthcare, para clarificar a amostra, ou seja, retirar as proteínas de *M. interrupta* que interagem com a Ni-Sepharose. Após uma incubação de 15 min a amostra foi centrifugada em 2.000 g por 5 min, o sobrenadante (amostra clarificada) foi recuperado e armazenado a -20 °C. O precipitado foi lavado com 500 μ L tampão de extração descrito acima e recentrifugado nas mesmas condições. Este precipitado foi guardado e utilizado como controle de proteínas endógenas que se ligam a Ni-Sepharose.

Para análise de interação de rMiFEM, 100 μ L da proteína renaturada pelo protocolo 3, da etapa 3.5.8 deste trabalho foi incubada por 20 min em 60 μ L de Ni-Sepharose, e posteriormente, centrifugado em 2.000 g por 5 min, o precipitado foi lavado 3 vezes com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 % de glicerol; 0,1 M de KCl; 0,1 mM de EDTA; 60 mM imidazol). 30 μ L foram armazenados e usados como controle e os outros 30 μ L foram utilizados para o experimento de interação com proteínas de *M. interrupta*. Em 200 μ L do extrato clarificado de abelhas foram adicionados 30 μ L de Ni-Sepharose com rMiFEM imobilizada e, então, incubada por 1 h. Após o período de incubação, a Ni-Sepharose foi recuperada por centrifugação e lavada quatro vezes com 500 μ L tampão de lavagem. Após a recuperação da Ni-Sepharose, ela foi solubilizada

em 25 µL tampão de amostra SDS-PAGE, bem como todos os controles citados anteriormente.

3.5.6 Purificação de SR-proteínas de *M. interrupta*

As proteínas SR podem ser precipitadas na presença de 20 mM de MgCl₂. Acredita-se que o magnésio interage com as fosfoserinas presentes nos domínios RS dessa classe de proteínas (SR), formando agregados que tendem a se precipitar (Zahler *et al.* 1992). Para obter um extrato enriquecido de proteínas SRs (incluindo *MiFEM*) das amostras de abelhas, foram preparados extratos protéicos a partir de 9 indivíduos em fase de pupa de olho preto de cada sexo (macho e fêmea) e de cada casta (rainha e operária). Foram utilizados 9 mL (1 mL/ indivíduo) de tampão de extração (65 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM HEPES PH 7,6, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM β-glicerofosfato, 0,2 mM PMSF) para cada tratamento (macho, operária e rainha). O β-glicerofosfato é um reagente fundamental para essa precipitação, uma vez que o mesmo é um inibidor de fosfatases que desfosforilam serinas e treoninas. As amostras foram maceradas em banho de gelo com uso de desruptor ultra-sônico (4 pulsos de 1 min com intervalos de 1 min). Os extratos foram então centrifugados por 10 min 8.000 g a 4 °C, e então transferidos para tubos limpos e novamente centrifugados por 20 min 13.000 g a 4°C. O sobrenadante foi novamente transferido para tubos limpos.

Para a purificação de proteínas SRs (adaptado de Zahler *et al.* 1992) foi adicionado MgCl₂ em aproximadamente 12 mL de extrato total, de forma que a concentração final ficasse em 20 mM. Em seguida, o extrato foi incubado no gelo por 30 min e posteriormente foi centrifugado por 30 min 13.000 g a 4 °C. O *pellet* foi lavado com 1 mL de tampão de isolamento. A fração insolúvel (correspondente as Proteínas SR) e o sobrenadante de cloreto de magnésio (fração solúvel) ambos foram recuperados. A fração insolúvel foi solubilizada em 200 µL de tampão contendo TRIS-HCl (100 mM pH 6,8) e 1 % SDS. Tanto a fração solúvel quanto a insolúvel foram quantificados com o *kit 2D Quant* e em seguida analisados em SDS-PAGE (10 %).

3.6 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA

A adição de sítios de restrição para *Nde* I, *Bam* HI e *Not* I, troca dos códons e a retirada de um sítio da enzima de restrição de *Nde* I, do gene *fem*, foram realizadas manualmente no Word Versão Trial. A busca de sítios de restrição internos foi realizada utilizando a ferramenta *NEB cutter 2.0* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>).

Foi realizada a tradução *in silico* através da ferramenta *Translate tool* do site Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>). A ferramenta *Clustal Blast* do BioEdit v7.0.5 versão *Free*, foi utilizada para confirmar que não houve alteração da sequência de aminoácidos da proteína *MiFEM*, a sequência predita da proteína *MiFEM* como controle. A massa molecular, bem como o PI da proteína *rMiFEM*, foi predita com o auxílio da ferramenta *Compute pI/Mw* disponível no Expasy (https://web.expasy.org/compute_pi/).

A busca de domínios protéicos de *MiFEM* foi realizada utilizando a ferramenta *blastx* disponível no site do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). O sistema PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>), foi utilizado para identificar possíveis locais de fosforilação da proteína *MiFEM*. Para busca de possíveis sítios de ligação de RBP1, usamos os sítios descritos por Heinrichs e Baker (1995).


```

* .***** .*. ** .** .*. ***** .*. ** .***** .***** .
GTAACGTGCCGGGCAAACACGACCGATGAACTGCAGCGCTATTGTCAATCCTGAAG
GAAATGTGCCAGGCAAAACAACACCGATGAACTTCAACGAGCTATTGTCAATCCTGAAG
* .** .***** .***** .*. ***** .** .** .***** .*****
ATGTCCAGGTCATGCGCCGTGAGGGTGAAGGCTCTAAACCTATCTTTGAACGCGAAGAAA
ATGTCCAGGTCATGAGAAGAGAGGGAGAAGGATCCAAACCTATATTTGAAAGAGAAGAAA
***** .*. .*. ***** .***** .* ***** .***** .* .*****
TTAAAAGTGCAACGGTCAAGACCAAAGAAATTGTCGAACATCGTACCGTTGTTGCTATCA
TAAAAGTGCAACAGTCAAGACAAAAGAAATTGTCGAACATCGTACAGTTGTTGCTATAA
* .***** .***** .***** .***** .***** .***** .*
ATAATGAAAATCTGGAAAATAAAAAGCGGCGTGAATAAAAAATATAACCACCAGCCGCAGTC
ATAATGAAAATTTAGAAAATAAATCGGGAGTGAATAAAAAATATACTACATCAAGAAGTC
***** .* .***** .** .***** .***** .***** .***** .* .*****
AAAGTTGCAGTCTCGTCGCTGTCTCACTATAACCCGGTATGAGGATAGCAAACGTC
AAAGTTGCAGTCTCGACGTAGATTGTCTCACTATAACCAGGTATGAGGATTCAAACGTC
***** .*** .* .***** .***** .***** .***** .* .*****
ATGGCCGAATAATTATCGGAATGATCGGGAACGTGATCGTAGTCGTGGCCGGAGTCGGC
ATGGCAGGAATAATTATAGAAATGATAGGGAAGAGATCGTAGTAGAGGAAGAAGTCGAG
**** .***** .* .***** .***** .* .***** .* .** .* .***** .*
AATATAAAGAAAAAGACCGCGTCATAGTCAGTCGATACCACCGTGAAGAACGGAAAG
AATATAAAGAAAAAGACAGACGACATAGTCAGTTGCATACCACAAGAGAAGAAAGAAAAG
***** .* .*. ***** .***** .***** .* .***** .* .*****
GTCACCGGATCATAGCCGTTCTCGGGAGCGTGAACAGCGGACCTGGAGTCGCGAATCTC
GTCACCGAGATCATTACGTTCTAGGGAGCGAGAACAGCGAACATGGAGTAGAGAATCTC
***** .***** .** .***** .***** .***** .* .***** .* .*****
ACCACAAGTCTTTTAAAGATGAACGTTCTCATCGTGAACGCAGCCGGGAACGTTCTCGG
ACCACAAGTCGTTTAAAGATGAAAGATCTCATCGAGAAAGATCAAGAGAACGATCTCGAG
***** .***** .* .***** .***** .***** .***** .***** .*
AACGCAGTGAACGGGATCGGTCCTGAGCACCAGCGTACGTTCTCATTATATTGAGC
AAAGAAGTGAAGAGATAGGTCAGAGAGCACAGGTAACGTCGTCGATTATATTGAGC
* .* .***** .* .** .***** .* .***** .* .** .***** .* .*****
AAATTCCTGTTCCATTCTACTATGGCGATTTTCTGACGCCAATCATGGTTGGCCCTC
AAATTCCTGTTCCATTCTACTATGGAGATTTTCTGCAAGACCAATAATGGTTGGACCTT
***** .***** .* .***** .***** .* .***** .* .*****
TGGTTCCAATTCGCGGCCAAGTGCCTCTGGGTCTCGGCACATGATGGGTCCACTGCGTC
TAGTTCCAATTCGAGGGCAAGTACCTTTAGGACCTAGGCATATGATGGGTCCATTAAGAC
* .***** .** .***** .** .* .** .***** .***** .***** .* .* .*
CATTTCACCACGGTTTATTCGCCAGATATGTATCGCTGCGTCCACCGCCAAACCTC
CATTTCACCACGATTTATTCGCCAGATATGTATAGATTACGTCCACCCCAAACCTA
***** .***** .***** .* .***** .***** .* .*****
GCTTTGGCCCAATGTATTAAGTGAAGTAGGATCCAAGCGGCCGAG
GATTTGGCCCAATGTATTAA-----
* .***** .*****

```

Figura 14. Alinhamento da sequência do gene sintético *rMifem* com a sequência do gene selvagem *Mifem*. Os asteriscos correspondem a nucleotídeos idênticos e, os pontos, a nucleotídeos diferentes devido à troca de códons raros. Os traços são *gaps* correspondentes as sequências adicionais que foram adicionadas no gene *rMifem*, tais como a sequência his-tag e os sítios de restrição

O perfil de restrição obtido para os plasmídeos pFEM e pGSHP confirmou o resultado esperado com as enzimas *Nde* I e *Not* I (Figura 16). O plasmídeo pFEM liberou dois fragmentos um de aproximadamente 2 kb e um de aproximadamente 1300 pb, correspondente ao gene *fem* sintético (indicado na canaleta 2 com um círculo) (figura 17). O plasmídeo pGSHP liberou dois fragmentos, um de 5671 pb, correspondente ao plasmídeo pGS-21a (indicado na canaleta 6 por um círculo) e outro de aproximadamente 700 pb, correspondente ao inserto (hipoxantina guanina fosforribosiltransferase) que se desejava retirar para clonar o gene *fem* sintético na mesma região (figura 17).

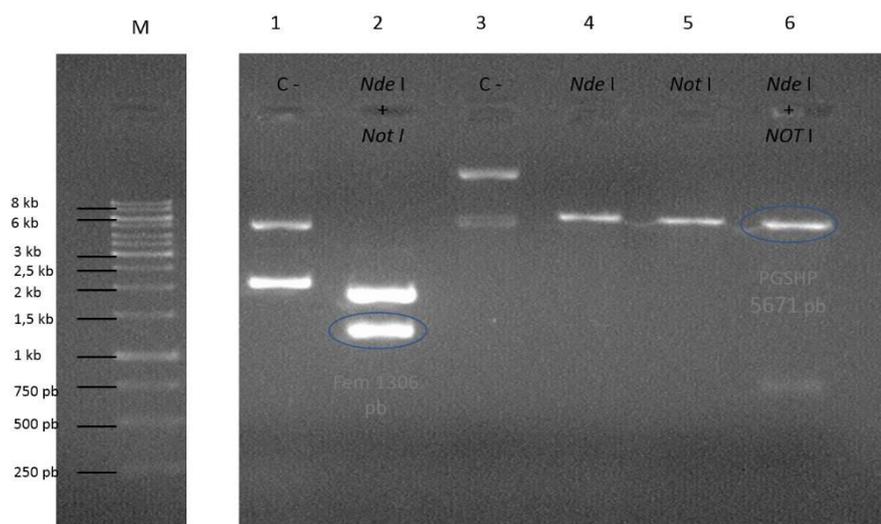


Figura 17. Perfil de restrição (*Nde* I e *Not* I) dos plasmídeos pFEM e pGSHP em gel de agarose 1,2%. 1 e 2: pFEM; 3 a 6: pGSHP. As canaletas com "C-"correspondem aos plasmídeos intactos, e as canaletas com os nomes das enzimas de restrição correspondem ao tratamento ao qual os plasmídeos foram submetidos. Os círculos indicam o fragmento do gene *fem* liberado (canaleta 1) e o vetor pGS-21a (canaleta 6). O marcador (M, mostrado à esquerda da imagem) foi recortado e colocado mais próximo das amostras (o gel de agarose original pode ser visto no Anexo 7.8).

A clonagem do gene *fem* no plasmídeo pGS-21a foi realizada e, assim, foram obtidos 3×10^5 clones transformantes. A digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Not* I foi realizada no intuito de selecionar clones recombinantes, ou seja, contendo o vetor para a expressão do gene *fem* sintético de *M. interrupta* (pGSFEM). Dos quatro clones analisados, somente a colônia 3 não apresentou um fragmento do tamanho esperado para o gene *fem* sintético (1306 pb) (Figura 17). A mesma foi excluída de análises seguintes, sendo que as demais tiveram o DNA plasmidial armazenado para sua posterior utilização.

4.3 Indução da proteína rMiFEM em meio líquido

O gene *fem* sintético com a cauda de histidina possui 1306 pb e o transcrito é traduzido em uma proteína com aproximadamente 420 resíduos de aminoácidos. Considerando que a massa molecular média dos aminoácidos é 128 Da, estima-se uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa para a proteína rMiFEM. Essa mesma massa molecular foi predita utilizando-se a ferramenta do ExPASy PI/MW. Ao observar o perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE do extrato proteico de células induzidas com IPTG para a expressão heteróloga e de células não induzidas (Figura 18A), verificou-se a presença de uma banda na altura de 50 kDa apenas nas colônias que foram induzidas. O mesmo resultado foi observado por *western-blot*, utilizando-se anticorpos anti-His tag (Figura 18B). Estes resultados confirmam a expressão da proteína rMiFEM em *E. coli*.

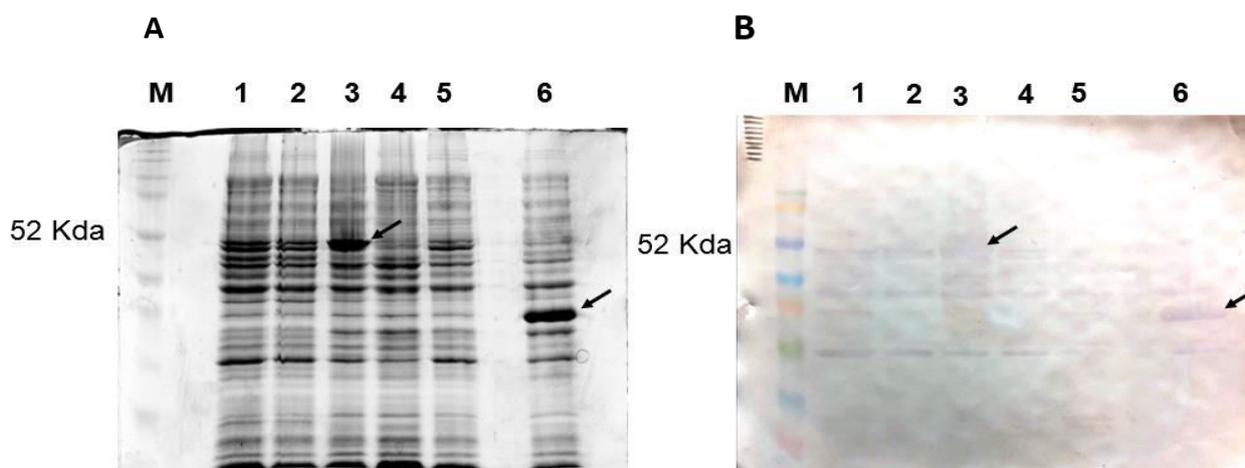


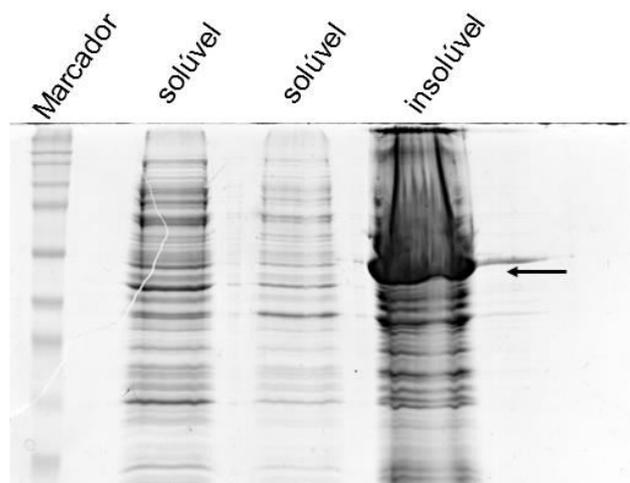
Figura 18. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos das células recombinantes contendo o plasmídeo pGSFEM. Do lado esquerdo, está o gel com coloração de comassie blue (A) e do lado direito, a revelação com *western-blotting* (B) das mesmas amostras. Legenda: canaletas 1 e 2, indução de rMiFEM em BL21 (DE3) pLysS; canaleta 3, indução de rMiFEM em Rosetta (DE3); canaleta 4, Rosetta (DE3)/pGSFEM reprimida com glicose; canaleta 5, Rosetta(DE3)/pGSHP reprimida com glicose (controle negativo); canaleta 6, proteína controle (indicada pela seta) também sendo expressa em Rosetta (DE3)/pGSFP.

O sistema de expressão com Rosetta (DE3) foi o mais eficiente para expressão da proteína rMiFEM. Provavelmente isso se deve ao fato de que esse sistema contém um plasmídeo com sete genes de tRNAs raros (se ligam aos códons AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC e CGG) (Novy *et al.* 2001), sendo que a sequência de gene *fem* sintético possui 16 códons raros de (CGG). A partir destes resultados, a linhagem Rosetta (DE3) foi selecionada para as demais etapas de expressão de proteína recombinante.

4.4. Obtenção dos extratos proteicos

Após a separação entre as proteínas solúveis e insolúveis do extrato, observou-se que a maior parte da proteína rMIFEM foi produzida na forma insolúvel (Figura 19). Isso acontece nos sistemas de produção de proteínas recombinantes que conferem uma altíssima taxa de expressão (Pandey *et al.* 2017). Quando há alta produção de uma proteína heteróloga, seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, que deveriam ficar na parte interna da proteína, protegidas das moléculas de água presentes na célula, acabam interagindo com outros aminoácidos apolares de forma intermolecular, formando o que é chamado de corpúsculo de inclusão (Alberts, 2017; Pandey *et al.* 2017). Para produção de anticorpos, a utilização de proteína recombinante na forma insolúvel não é um problema, pois é possível desnaturar a proteína dos corpúsculos de inclusão com a adição de 8M de ureia, purificar a proteína recombinante e, posteriormente, imunizar um animal utilizando a proteína desnaturada como antígeno (Pandey *et al.* 2017). No entanto, não é possível realizar testes biológicos com a proteína desnaturada, sendo necessário obter a proteína em sua conformação nativa. Uma das formas de se obter uma proteína expressa na forma solúvel é realizar a indução a 30°C, pois nessa temperatura a *E. coli* produz proteínas chaperonas que facilitam o dobramento proteico correto. Porém, essa não é uma temperatura tão favorável para o crescimento bacteriano. Outra forma que também pode ser usada para se obter a expressão de proteínas recombinantes solúveis é diminuir a quantidade do indutor que, por sua vez, acarreta na menor taxa de produção proteica, favorecendo o

Figura 19. Perfil de solubilidade de rMIFEM. Seta indica a posição da proteína rMIFEM na porção insolúvel. SDS-PAGE 12%. 52 kda



dobramento correto da proteína (Rosano e Ceccarelli 2014). Contudo, ambas opções, em geral, acarretam um menor rendimento de proteína recombinante. Caso esses métodos falhem também é possível se realizar renaturação *in vitro* (Tsumoto *et al.* 2003).

Na tentativa de se obter a proteína r*MiFEM* em sua forma nativa, as duas formas citadas acima (redução de temperatura e diminuição da quantidade de indutor) foram testadas (Figura 20). Porém, em ambos os casos, não foram obtidas quantidades satisfatórias dessa proteína na forma solúvel. Quando a expressão de r*MiFEM* foi induzida em 30°C com 1 mM de IPTG (canaletas com o número 1), houve uma maior taxa de produção de r*MiFEM* na fração insolúvel e menor na solúvel. Quando a expressão de r*MiFEM* foi induzida a 37 °C com 0,5 mM de IPTG, a proteína recombinante detectável foi expressa apenas na forma insolúvel. Estes resultados corroboram Silva (2012) que também obteve alta expressão de proteína heteróloga na forma insolúvel por um vetor com expressão (Vetor derivado do pGS-21a) com promotor forte derivado do fago T7.

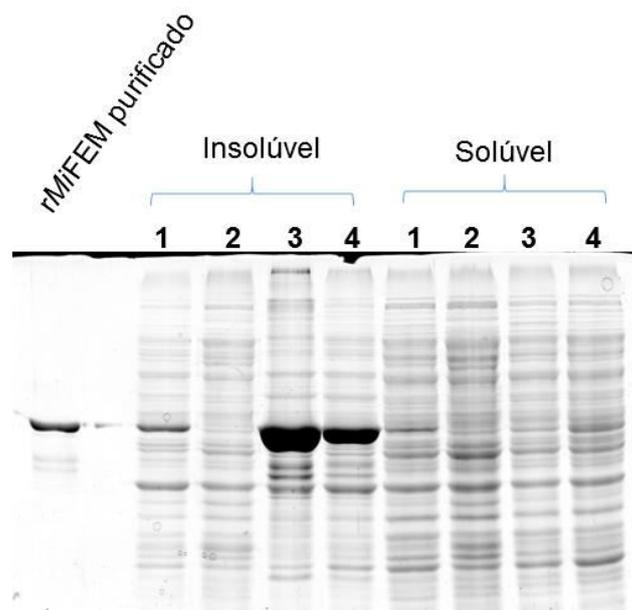


Figura 20. Perfil da solubilidade proteica de r*MiFEM* induzida em diferentes condições. Canaletas 1, correspondem a expressão de r*MiFEM* em 30°C com 1mM de IPTG; canaletas 2, ao controle negativo, onde não houve indução (glicose); canaletas 3, à indução a 37°C com 1mM de IPTG; e canaletas 4, à indução a 37°C com 0,5 mM de IPTG. Pode ser observado que a produção da proteína a 30°C na fração solúvel foi pequena. SDS-PAGE 10 % e corado com Comassie *blue* R350.

4.5 Purificação de rMiFEM a partir do extrato proteico de Rosetta (DE3)/pGSFEM

Foi possível a purificação por cromatografia de afinidade da proteína rMiFEM desnaturada em uréia (Figura 21). Ao compararmos o extrato proteico antes de passar na coluna de purificação (pré-coluna) e depois de passar na coluna (pós-coluna), pode se observar que a proteína recombinante foi ligada com sucesso à coluna. Também foi observado que a coluna não ficou saturada, pois não foi detectada a presença de rMiFEM na fração pós-coluna. A maior recuperação de proteínas ocorreu na fração 7, seguido das frações 8, 6 e 9, onde também é possível observar a maior concentração da proteína rMiFEM. A proteína rMiFEM foi obtida de forma semi-purificada, uma vez que pode se observar algumas proteínas de menor massa molecular abaixo da altura esperada. Para avaliar interação de proteínas endógenas de *M. interrupta* com rMiFem, foi adotada a estratégia de renaturação e interação *in vitro* da proteína recombinante com proteínas endógenas de *M. interrupta*.

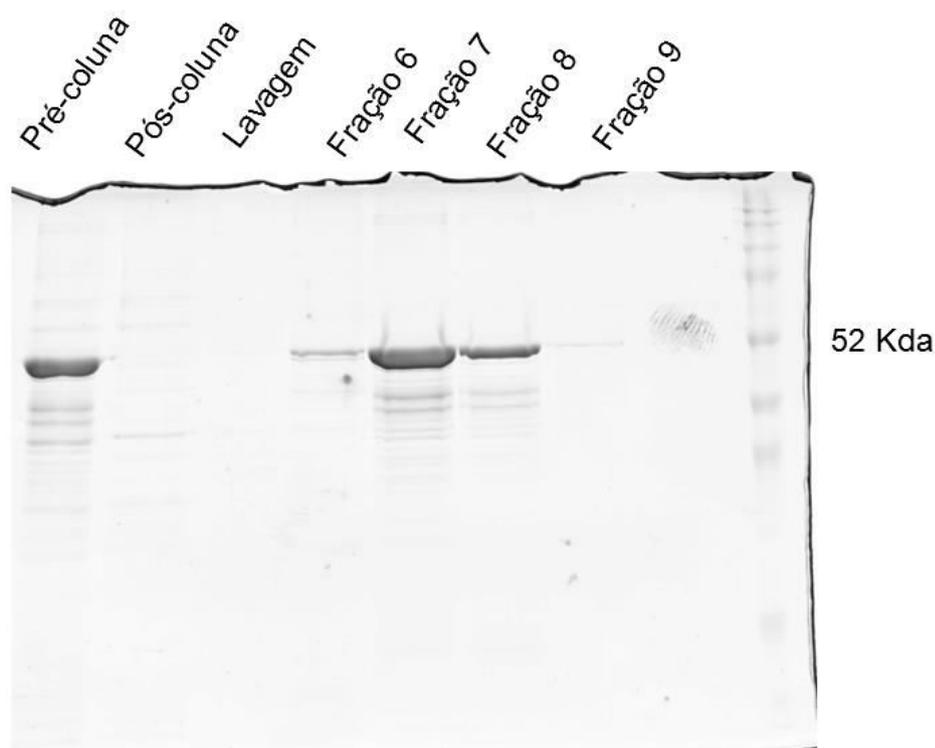


Figura 21. Purificação de rMiFEM por cromatografia de afinidade. Pré-coluna corresponde ao extrato bacteriano, sendo que somente a fração insolúvel foi utilizada para a purificação de rMiFEM. Fração 6, 7 e 8 foram as frações com maior concentração de proteína rMiFEM eluídas. Gel de SDS-PAGE 12%.

4.6 Renaturação *rMiFEM* purificada

Dos três protocolos utilizados na tentativa de renaturar a proteína *rMiFEM* (Figura 22) o procedimento que possibilitou o melhor resultado foi o protocolo 3 (Zahler *et al.* 1992), no qual foi possível observar uma maior quantidade de proteína solúvel. Esse protocolo é específico para a renaturação de proteínas SR. Contudo, uma maior quantidade de proteínas contaminantes foi observada após a renaturação, as quais parecem ter ficado na amostra após a purificação de *rMiFEM*. Também foi possível obter a renaturação da proteína recombinante com o protocolo 1, mas com concentrações insatisfatórias. Outra desvantagem do protocolo 1 é o tempo da renaturação (2 dias), o qual é bem mais prolongado quando comparado ao protocolo 3 (1 hora). Com o protocolo 2, não foi possível obter a proteína *rMiFEM* renaturada. Embora vários protocolos para renaturação *in vitro* de proteínas sejam descritos, cada proteína apresenta um conjunto de particularidades que requer um protocolo único para a renaturação (Baneyx e Mujacic 2004; Rosano e Cecarelle 2014; Yamaguchi e Miyazaki 2014). Desta forma, outras variáveis poderão ser avaliadas em estudos futuros, a fim de obter-se um melhor rendimento da proteína *rMiFEM* renaturada.

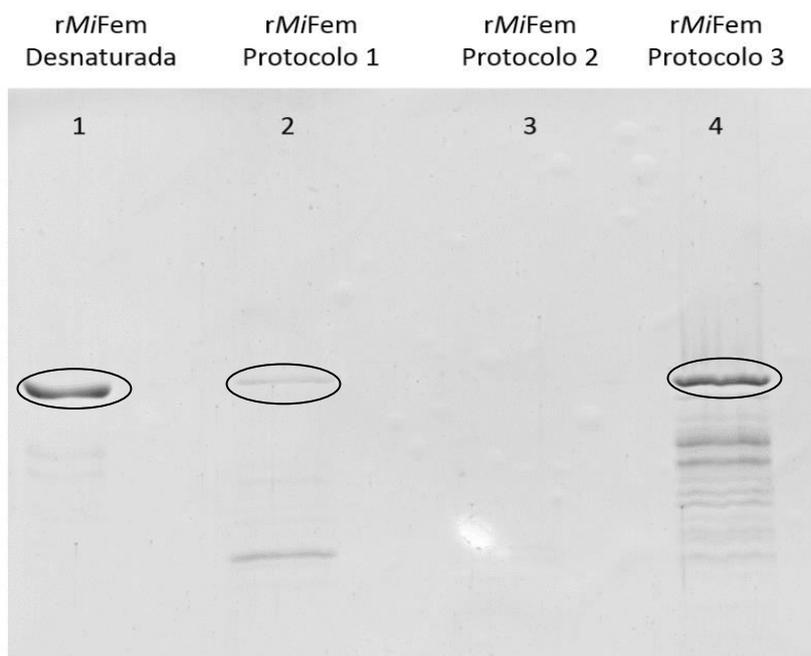
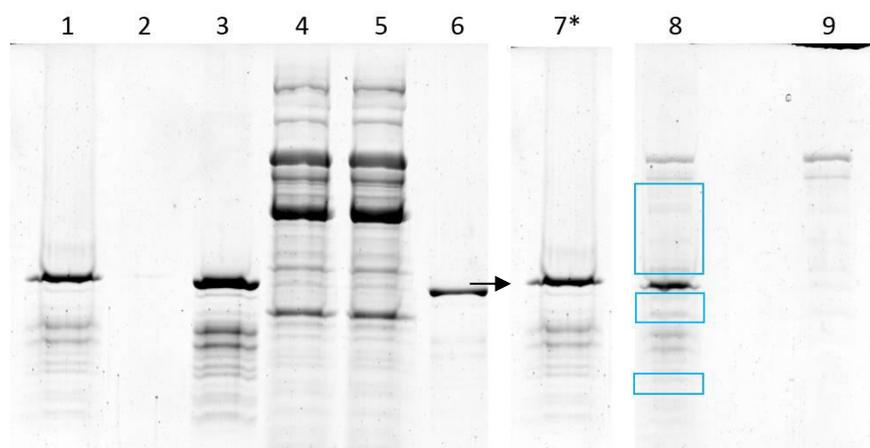


Figura 22. Perfil eletroforético da proteína *rMiFEM* após renaturação *in vitro*. A canaleta 1 contém a proteína *rMiFEM* desnaturada. Canaleta 2 corresponde ao protocolo 1, o qual não contém glicerol. Canaleta 3 corresponde ao protocolo 2, com 5% de glicerol. O protocolo 3 corresponde a renaturação de SR-proteínas. A proteína *rMiFEM* é indicada por círculos. Gel SDS-PAGE 10% corado com Comassie-Blue

4.7 Interação de rMiFEM com proteínas endógenas de *M. interrupta*

Neste estudo, foi feito ainda um ensaio piloto de avaliação da interação *in vitro* da proteína rMiFEM com as proteínas endógenas de operárias de *M. interrupta*. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 23. Algumas bandas obtidas da co-precipitação da proteína rMiFEM ligada à coluna de Ni-sepharose com o extrato proteico operárias de *M. interrupta* estão mais intensas (caneleta 8, indicadas por retângulos) que nos controles (caneletas 7* e 9).



Algumas das bandas acima da proteína rMiFEM (caneleta 8) aparecem

Figura 23. Teste de interação da proteína rMiFEM com proteínas endógenas de *M. interrupta*. (1) Proteína rMiFEM renaturada ligada em Ni-sepharose; (2) Somente sepharose; (3) Proteína rMiFEM renaturada; (4) Extrato proteico total de 2 operárias da espécie *M. interrupta*; (5) Extrato proteico clarificado de 2 operárias da espécie *M. interrupta* pela adição de Ni-sepharose; (6) Proteína rMiFEM desnaturada; (7*) Corresponde a mesma canaleta 1, onde foi copiada e colada na posição que corresponderia a canaleta 7, com intuito de facilitar a comparação com a canaleta 8; (8) co-precipitação de rMiFEM Ni-sepharose/proteínas operárias de *M. interrupta* (indicados com retângulo); (9) proteínas de operárias de *M. interrupta* que interagiram com Ni-sepharose. A proteína rMiFEM é indicado pela seta. A foto original pode ser vista no apêndice 7.9.

também no controle da co-precipitação da coluna de Ni-sepharose sem o rMiFEM com o extrato proteico de operárias (caneleta 9), mas em intensidade muito inferior. É possível notar também a existência de algumas bandas que estão abaixo da proteína rMiFEM (caneleta 8) e são bem mais intensas que no controle da proteína rMiFEM renaturada ligada em Ni-sepharose (7*). Estas proteínas que foram detectadas, possivelmente estabelecem interação com rMiFEM. Contudo, experimentos adicionais com a proteína rMiFEM renaturada em maior grau de pureza serão necessários para a obtenção de dados

conclusivos. Alternativamente, após a obtenção dos anticorpos, a imunoprecipitação de *MiFEM* poderá ser realizada também com a finalidade de investigar a interação de FEM com outras proteínas.

Além disso, é possível observar, comparando a canaleta 1 e 3, que o protocolo de interação conseguiu retirar algumas das proteínas contaminantes que ficaram mais concentradas após a renaturação. Isso deve ter ocorrido devido a adição de 60 mM de imidazol na proteína renaturada, impedindo assim que parte dessas proteínas se ligassem a Ni-sepharose. Esse dado é importante para ajudar em purificações futuras de *rMiFEM* e possibilitar resultados mais eficientes, para que este ensaio seja aplicado nas diferentes fases de desenvolvimento, castas e sexos de *M. interrupta*.

4.8 Purificação de proteínas SR de *M. interrupta*

A proteína *MiFEM* (proteína FEM nativa de *M. interrupta*) tem a massa

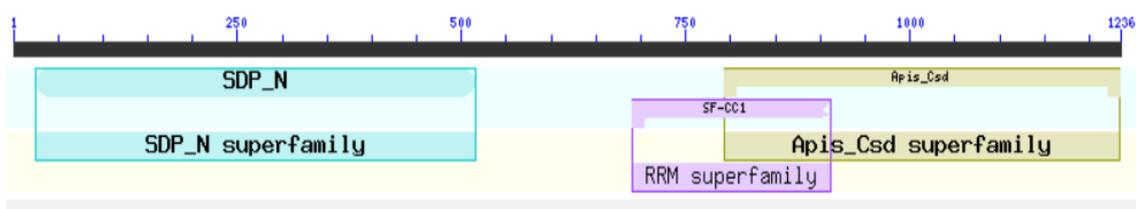


Figura 24. Domínios proteicos encontrados na proteína *MiFEM*. Possui um domínio SDP_N que está correlacionado com proteínas de determinação de sexo. Um domínio RRM na porção próxima ao carboxi-terminal e uma região similar a proteína Csd de *Apis mellifera*.

molecular de aproximadamente 50 kDA, e possui dois domínios RS. Como foi dito anteriormente, esses domínios são típicos de uma classe de proteínas SR, porém além dos domínios RS, essas proteínas possuem um domínio de ligação ao mRNA. Os domínios RS desta classe de proteínas são fosforilados em serinas e treoninas, e, graças a essas fosforilações, as proteínas SR podem ser reconhecidas por um anticorpo chamado mAB-104. Por exemplo, já foi demonstrado que a proteína Tra, uma proteína homóloga à FEM, pode ser reconhecida pelo anticorpo mAB-104 (Zahler *et al.* 1992). Essas fosforilações também conferem outra característica a essa classe de proteínas: a precipitação em cloreto de magnésio. As proteínas SR correspondem a apenas 0,05% de todas as proteínas de uma célula, o que faz com que essa purificação (enriquecimento) seja crucial para imunodeteção. Sem ela, não é possível visualizar as proteínas SR nem em gel nem em *western-blot* (Zahler *et al.* 1992).

4.9 Modificações pós-traducionais de *MIFEM*

Visto que a proteína *MIFEM* possui dois domínios RS, hipotetizou-se que essa proteína poderia ser precipitada junto com as proteínas SR de abelhas utilizando o cloreto de magnésio. Antes de iniciar-se os ensaios experimentais, a sequência de *MiFem* depositada no NCBI, foi analisada em busca de possíveis sítios de fosforilação nos domínios SR dessa proteína. Utilizando-se a ferramenta *Prosite* do *Expasy* (<https://prosite.expasy.org/>), foram encontradas 25 regiões que podem sofrer fosforilações. A maior parte delas eram de fosfoserinas e fosfotreoninas, conforme o esperado (Figura 25). De acordo com os sítios de fosforilações encontrados *in silico* na proteína *MiFEM*, duas classes de proteínas quinases parecem fosforilar *MIFEM*: quinase C e caseína quinase II. Curiosamente esse anticorpo se liga as fosfoserinas e fosfotreoninas, o mesmo alvo do magnésio durante a precipitação de SRs.

MKRIMSSHSHRDERSRISRSGDFETGLRSKTEEEERLRRRREWMIEQEKLEHEKCLKAKMILEYEIRRAREK
 GLPPKGRFESHHSRKS KSKSPESRHRITTSSTSKTAILSKKLEPSDGTTPFKGPEGTQV SIVELRSIKVDI
 HRNVP GKTTTDELQRAIVNPEDVQVMRREGE GSKPIFEREEIKSATVKTKEIVEHRTVWAINNENLENKSGV
 NKKYTTSR SQSCSPRRRLSHYTRYEDSKRDGRNNYRNDREDRSRGRSREYKEKDRRHSQLHTTREER
 KGHRDHRSREREQRTWSRESHHKSFKDERSHRERSRERSRERSERDRSREHRVTSSHYIEQIPVPFYY
 GDFPARPIMVGPLVPIRGQVPLGPRHMMGLRPFPPRFIPD MYRLRPPPNPRFGPMY

Proteína quinase C: Serina Treonina

Caseína quinase II: Serina Treonina

Figura 25. Sequência de aminoácidos de *MIFEM*. Os retângulos indicam locais de fosforilação em argininas e treoninas. Foram encontrados sítios de fosforilações para dois grupos de proteínas quinases, sendo elas proteínas quinases C e caseína quinase II.

O HJ pode ativar a proteína PKC em *Aedes aegypti* (Ojani *et al.* 2015). Uma vez que a maior expressão de HJ leva a formação de rainhas em *M. interrupta* (Brito *et al.* 2015) é possível que esses sítios de fosforilações de PKC

encontrados em *MiFEM* estejam envolvidos com a determinação de castas (Figura 26).

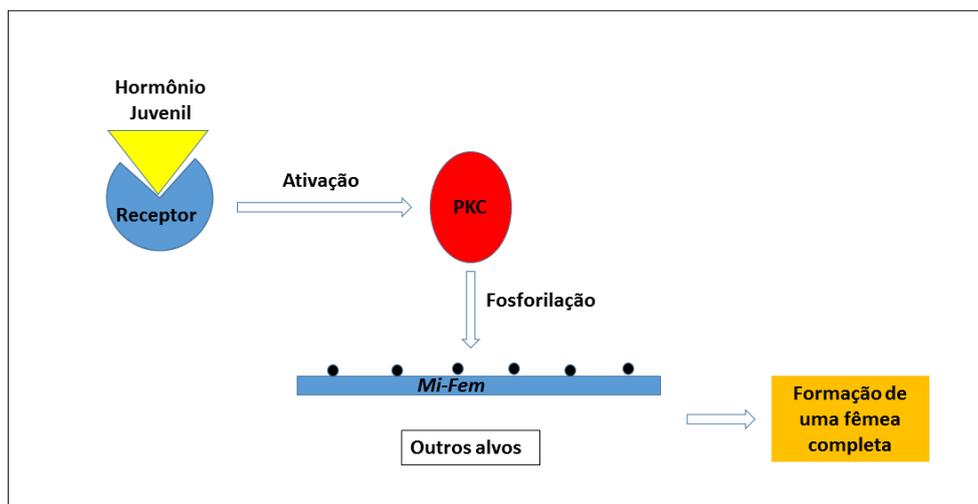


Figura 26. Possível papel da PKC na determinação de castas de *M. interrupta*. O hormônio juvenil ao se ligar ao receptor de membrana deve ativar a proteína PKC, que por sua vez deve fosforilar Fem, e, outros alvos. Essa possível fosforilação dependente do hormônio juvenil pode ser fundamental para a determinação de castas.

4.10 Perfil do enriquecimento de proteínas SR

Na tentativa de investigar as diferenças entre os perfis proteicos de machos, operarias e rainhas (visto que os extratos proteicos totais em ambos os sexos e castas são indiferenciáveis em gel de SDS-PAGE), testou-se a precipitação com cloreto de magnésio em amostras de ambos os sexos e castas.

Ao analisar o padrão de bandas entre extrato total e sobrenadante do cloreto de magnésio (Figura 27A) em todas as condições (macho, operaria e rainha), observa-se que não há qualquer diferença no perfil apresentado. Quando comparado os precipitados (P) (obtidos a partir do tratamento de cloreto de magnésio) e os controles (extrato total (T) e sobrenadante (S)), observou-se que muitas bandas desapareceram nos precipitados das três condições (macho, operaria e rainha). Porém, o perfil do precipitado não ficou conforme o esperado, uma vez que para SR proteínas puras são esperadas de 6 a 7 bandas. Então, provavelmente, esse perfil não corresponde apenas às proteínas SR. Zahler *et al.* (1992) conseguiram purificar apenas as proteínas SR de células HeLa usando esse método. Porém, no artigo original eles trabalharam com cultura de células, e o presente trabalho utilizou indivíduos inteiros, onde a complexidade proteica é bem maior, o que deve ter influenciado na obtenção de precipitados de SRs

mais puros. Esse mesmo problema foi observado por Saccone *et al.* (2014) que fizeram essa purificação em *Drosophila melanogaster*.

Ao confrontar o padrão de bandas das três condições (Figura 28 B), nota-se uma banda próxima a 55 kDa presente nas fêmeas, mas aparentemente ausente nos machos. Interessantemente, também se observou um padrão de maior variedade de proteínas entre 76 e 102 kDa presentes nas operárias, mas ausente nas rainhas e nos machos. Esses resultados podem ser um indicativo de que haja diferença na expressão de proteínas SR entre os sexos e as castas.

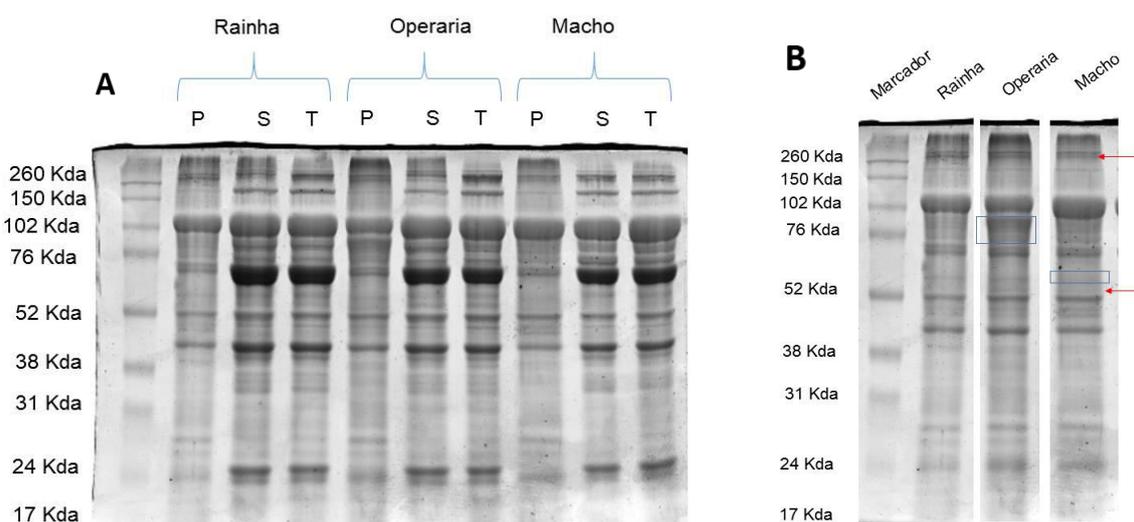


Figura 27. Perfil proteico da precipitação com cloreto de magnésio. (A) P indica o precipitado do $MgCl_2$; S indica sobrenadante do $MgCl_2$; T indica extrato total. Em cada canaleta foram aplicados 15 μg de proteínas. Para melhorar a comparação, a figura 26 A foi recortada nas regiões correspondentes ao precipitado de SR, e posicionadas uma ao lado da outra sem alterar as dimensões das canaletas, somente com o intuito de facilitar a comparação entre machos, operárias e rainhas, obtendo-se assim a 26 B. (B) Comparação dos precipitados do $MgCl_2$ de Rainha, macho e operária. O retângulo presente no macho evidencia a ausência de uma proteína presente somente nas fêmeas. O retângulo presente nas operárias evidencia uma maior predominância de proteínas na faixa de 76 até 102 Kda, que é bem diferente das outras condições. As setas indicam padrões de intensidade de bandas diferente entre as 3 condições.

4.11 Análise *in silico* da sequência de *MIFEM*

Durante a busca pelos domínios conservados da sequência de *MiFEM* com a ferramenta *Blast*, um resultado inesperado foi observado. Um domínio de ligação ao RNA mensageiro foi encontrado próximo a região carboxiterminal, o qual não havia sido descrito anteriormente para as proteínas FEM das abelhas (Figura 24) (Brito *et al.*, 2015; Kapheim *et al.*, 2015). Possivelmente, esse domínio não foi descrito anteriormente por ter sido adicionado no banco de dados posteriormente àquelas análises (Marchler-Bauer *et al.* 2017). Verificou-se,

então, se esse RRM estaria presente em outras sequências de FEM de abelhas disponíveis no banco de dados. Foi observado que o mesmo RRM está presente em FEM de *Bombus terrestris*, mas não está presente em FEM de *Apis mellifera*. Não foi possível analisar se a mesma região está presente na proteína FEM de *M. quadrifasciata*, pois na região que corresponderia ao RRM na sequência disponível no NCBI não está com boa qualidade.

4.12 Sequências ESE no éxon 5 de *DSX*

Por fim, com o intuito de obter-se mais informações sobre possíveis mecanismos de atuação do *MiFEM*, fez-se uma busca por sítios de reconhecimento do tipo ESE (Amplificador exônico de *splicing*) no éxon 5 do *Mi-dsx*, o qual está presente apenas nas fêmeas e que seria a região alvo de regulação por *splicing* alternativo sexo-específico. Foram encontrados sítios de reconhecimento de quatro proteínas SR: SF2-ASP (23 possíveis sítios); SC35 (26 possíveis sítios); SRp40 (36 possíveis sítios) e SRp55 (28 possíveis sítios). Também foi encontrado 1 sítio (ACATTTCA) de ligação de RBP1, a mesma SR-proteína que auxilia Tra de *Drosophila* a se ligar e promover o *splicing* do hnRNA de *dsx* (Maniatis 1996; Tacke e Manley 1999; Arbeitman *et al.* 2016).

No gene *dsx* de *Drosophila* são descritos seis sítios de ESE no éxon 4 que estão envolvidos com o mecanismo de *splicing* desse gene (Maniatis *et al.* 2002). As possíveis sequências ESE encontradas no éxon 5 do hnRNA de *Mi-dsx* podem ser reconhecidas por *MiFEM* (presente somente nas fêmeas) associada com *MiTRA2* e alguma SR-proteína assim como ocorre em *Drosophila*. A ligação de *MiFEM* juntamente com alguma SR-proteína devem recrutar a maquinaria de *splicing* para o montante próximo ao éxon 5, assim como acontece em *Drosophila*, permitindo assim que esse éxon permaneça no mRNA das fêmeas. Futuros estudos com dados de interactoma e de imunoprecipitação são necessários para investigar o mecanismo de atuação do *MiFEM* no *splicing* do *Mi-dsx*.

5. Conclusões

Diferentes hospedeiras foram avaliadas a fim de se obter proteína rMiFEM purificada, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando o gene foi expresso em *E. coli* Rosetta (DE3). Utilizando-se a proteína rMiFEM renaturada foi possível detectar proteínas endógenas de *M. interrupta* (operárias) que aparentemente coprecipitaram com rMiFEM, dando indícios que a ação de MiFEM depende da interação com outras proteínas. Além disso, o enriquecimento de proteínas SR revelou um padrão distinto para machos, operárias e rainhas, indicando uma expressão diferencial de proteínas SR entre sexos e castas. Por fim, um domínio RRM foi identificado por meio de análises *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática, o que sugere que a proteína FEM tenha habilidade de se ligar a RNA, que pode estar correlacionado com seu papel na determinação de casta. Como perspectivas, outros estudos que visam a identificação das proteínas associadas a rMiFem estão em andamento, de modo a possibilitar a proposição de um mecanismo molecular de determinação de sexos e casta em *M. interrupta*.

6. Referências

- Adams, M.D.; Rudner, D.Z.; Rio, D.C.. 1996. Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 331–339.
- Arbeitman, M.N.; New, F.N.; Fear, J.M.; Howard, T.S.; Dalton, J.E.; Graze, R.M.. 2016. Sex Differences in *Drosophila* Somatic Gene Expression: Variation and Regulation by *doublesex*; *Genes|Genomes|Genetics* 6: 1799–1808.
- Ascher, J.S.; Pickering, J. BugGuide: Identification, Images, & Information For Insects, Spiders & Their Kin. Disponível em: <https://bugguide.net/node/view/468583>. Acesso em 10 de junho de 2018.
- Baneyx, F.; Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22: 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Becker, T.; Pequeno, Lima, P. A. C.; Carvalho-Zilse, G. A.. 2018. Impact of environmental temperatures on mortality, sex and caste ratios in *Melipona interrupta* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Science of Nature*. 105: 55-64
- Beye, M.; Hasselmann, M.; Fondrk M. K.; Page R. E.; Omholt, S. W.. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* . 114(4): 419–429.
- Bell, C.E.; Lewis, M.. 2000. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural Biology* 7: 209–214.
- Blencowe, B.J.; Issner, R.; Nickerson, J.A.; Sharp, P.A.. 1998. A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes and Development* 12: 996–1009.
- Blencowe, B.J.; Bowman, J. AL; McCracken, S.; Rosonina, E.. 1999. SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochemistry and Cell Biology* 77: 277–291.
- Bopp, D.; Saccone, G.; Beye, M.. 2014. Sex determination in insects: Variations on a common theme. *Sexual Development* 8: 20–28.

- Brito, D.V.. 2017. Investigação das vias de determinação do sexo e da casta na abelha sem ferrão *Melipona interrupta* (Hymenoptera : Apidae). Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. 161p.
- Brito, D. V.; Nunes-Silva, C.G.; Hasselmann, M.; Viana, L. S. Astolfi-Filho, S.; Carvalho-Zilse, G.A.. 2015. Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 66, p. 24–30.
- Carvalho G.A.. 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*. 10(1): 10-15
- Chambedin, M.; Mcgrath, J.; Waskeu, L.; Studier, F.W.; Ring, J.; Chamberlin, M.; *et al.*. 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods Enzymol.* 1990;185:60-89. DOI: 10.1016/0076-6879(90)85008-c. PMID: 2199796.
- Demain, A.L.,and Vaishnav,P.. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27, 297–306
- Dzierzon J. 1845. Gutachten u"ber die von Herrn Direktor Sto"hr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. *Eichsta"dter Bienenzeitung* 109(1): 119–121.
- Feng, Y.; Chen, M.; Manley, J.L. 2008. Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator. *Nature Structural and Molecular Biology* 15: 1040–1048.
- FAO (Food and Agricultural Organization). Pollinators vital to our food supply under threat. Texto disponível em <http://www.fao.org/news/story/en/item/384726/icode>. Acesso em: 13 de Abril de 2017

- Fu, X.D.; Ares, M.. 2014. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics* 15: 689–701.
- Gempe, T.; Hasselmann, M.; Morten, S. M.; Gerd H.. 2009. Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *Plos Biology*. 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000222>
- Gustafsson, C.; Govindarajan, S.; Minshull, J.. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* 22: 346–353.
- Hastings, M.L.; Krainer, A.R.. 2001. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 302–309.
- Heinrichs, V.; Baker, B.S.. 1995. The *Drosophila* SR protein RBP1 contributes to the regulation of doublesex alternative splicing by recognizing RBP1 RNA target sequences. *The EMBO journal* 14: 3987–4000.
- Kerr, W. E.. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*. 35(1): 143-152.
- Kerr, W. E.. 1997. Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences. *Brazil Jornal Genetics*. 20(4): 601-611.
- KERR, W. 2002. Extinção de espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios. *In: Anais do 5º Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto*. 4-9
- Kerr, W. E.; Stort, A. C.; Montenegro, M. J.. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38(1): 149-168.
- Kerr, W. E; Akahira, Y; Camargo, C.A., 1975. Sex determination in bees. IV. Genetic Control of Juvenile Hormone Production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics*, 81(1): 749-756.
- Kerr, W. E; Carvalho G. A; Nascimento V. A.. 1996. *Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Minas Gerais. Ed. Acangaú, 144p.

- Kerr, W.E.; Carvalho, G. a; Silva, a C.; Assis, M.G.P.. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, Vol. 6, No 12: 20-41.
- Kessler, S.C.; Tiedeken, E.J.; Simcock, K.L.; Derveau, S.; Mitchell, J.; Softley, S.; *et al.*. 2015. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* 521: 74–76.
- Li, J.K., Li, H.W., Zhang, Z.H. and Pan, Y.H.. 2007. Identification of the proteome complement of the higher royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) during the worker larvae development. *Apidologie* 38(1): 545–557
- Lopez, A.J.. 1998. Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics* 32: 279–305.
- Lundeberg, J.; Telmer, C.A.; Hess, H.; Stunnenberg, H.G.; Bannwarth, W.; Gentz, R.; *et al.*. 2000. *Methods in Enzymology* 326: 245–254.
- Manley, J.L.; Tacke, R.. 1996. SR proteins and splicing control. *Genes and Development* 10: 1569–1579.
- Maniatis, T., K.W.. 1996. Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes & Dev.* 10: 2089–2101.
- Maniatis, T.; Tasic, B.. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236–243.
- Marchler-Bauer, A.; Bo, Y.; Han, L.; He, J.; Lanczycki, C.J.; Lu, S.; *et al.*. 2017. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* 45: D200–D203.
- Michener, C. D.. 2007. *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press. 2^a ed. Estados Unidos: Baltimore.

- Nelson, D. L.; Cox, M. Lehninger. 2014. *Princípios de Bioquímica*. 6ed. São Paulo: Sarvier.
- Novy, R.; Drott, D.; Yaeger, K.; Mierendorf, R.. 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *InNovations*: 4–6.
- Nunes-Silva, C.G.; Kerr, W.E.; Bonetti, A.M.; Carvalho-Zilse, G.A. 2006. Efeito do hormônio juvenil III e do choque de temperatura na determinação de casta em *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae). *Magistra*, Cruz das Almas-BA. 18(4): 277-280.
- Nagoshi, R.N.; Baker, B.S. 1990. Regulation of sex-specific RNA splicing at the *Drosophila* doublesex gene: Cis-acting mutations in exon sequences alter sex-specific RNA splicing patterns. *Genes and Development* 4: 89–97.
- Nunes-silva, C. G. 2008. Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em *Melipona compressipes* (Hymenoptera : Apidae). Tese de Doutorado, Universidade federal do Amazonas, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. 62p.
- Ojani, R.; Liu, P.; Fu X. Protein kinase C modulates transcriptional activation by the juvenile hormone receptor Methoprene-tolerant. *Insect Biochem Mol Biol*. 2016 March ; 70: 44–52
- Risso, G.; Pelisch, F.; Quaglino, A.; Pozzi, B.; Srebrow, A. 2012. Regulating the regulators: Serine/arginine-rich proteins under scrutiny. *IUBMB Life* 64: 809–816.
- Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Advances and challenges*. 5: 1–17.
- Pedro, S.R. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61: 348–354.
- Saccone, G.; Louis, C.; Zhang, H.; Petrella, V.; Di Natale, M.; Perri, M.; *et al.* 2014. Male-specific phosphorylated SR proteins in adult flies of the Mediterranean Fruitfly *Ceratitis capitata*. *BMC Genetics* 15: S6.

- Salih A. A., Mehdi K. H., A.-B. A. I. 2013. Cloning of Human Insulin Gene in Bacterial Expression System. LAP LAMBERT Academic Publishing, 53(9): 1689–1699.
- Santos, C. F.; Acosta, L.; Dorneles A. L.; Santos P.D.S.; Blochtein B. 2016. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. *Scientific Reports* 6(1):31605.
- Serviço Americano de Pesca e Vida Animal. Disponível em: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2016-09-30/pdf/2016-23112.pdf>. Acesso em: 10 de março de 2017.
- Silva, S.D. da. 2012. Clonagem e Expressão do Hormônio de Crescimento de *Colossoma macropomum* em *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. 32p.
- Singh, R.; Valcárcel, J. 2005. Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 12: 645–653.
- Slaa, E. J.; Chavez, L. A. S.; Malagodi-Braga, K. S. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 37(1):293–315
- Tacke, R.; Manley, J.L. 1999. Functions of SR and Tra2 proteins in pre-mRNA splicing regulation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 220: 59–63.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*. 76(9): 4350- 4354.
- Tsumoto, K.; Ejima, D.; Kumagai, I.; Arakawa, T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* Mar;28(1):1-8. doi: 10.1016/s1046-5928(02)00641-1. PMID: 12651100.

- Van, W. E.; Driessen, G.; Beukeboom, L.W. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Frontiers in Zoology*, 3(1). DOI:10.1186/1742-9994-3-1.
- Venables, J.P.; Tazi, J.; Juge, F. 2012. Regulated functional alternative splicing in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research* 40: 1–10.
- Villas-Bôas, J. Manual Tecnológico: *Mel de abelhas sem ferrão*. Instituto Sociedade, população e Natureza (ISPN). 1^a ed. Brasil: Brasília; 2012.
- Yamaguchi, H.; Miyazaki, M. 2014. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*. 2014 Feb 20;4(1):235-51. doi: 10.3390/biom4010235. PMID: 24970214; PMCID: PMC4030991.
- Wöhlke, B.L.P. 2012. Expressão heteróloga, purificação e caracterização da proteína hipoxantina guanina fosforribosiltransferase de *plasmodium falciparum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 63p.
- Zahler, A.M.; Lane, W.S.; Stolk, J.A.; Roth, M.B. 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & development* 6: 837–847.

7. Anexos

7.1 Preparação de células quimiocompetentes

Foi primeiramente realizada a inoculação das cepas de interesse em 5mL de meio LB líquido a 37 °C sob agitação por aproximadamente 16 horas. Cerca de 1 mL desta cultura foi adicionada em 250 mL de meio LB líquido então inoculada a 37 °C sob agitação até atingir uma absorção de 0,5 em um comprimento de onda de 600nm. A cultura foi dividida em tubos falcons de 50mL e então resfriada no gelo. Os tubos com a cultura foram submetidos a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado em 30 mL de CaCl₂ 100mM estéril e então incubadas no gelo por 30 minutos. Após esse período as células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi solubilizado em 1mL de solução de CaCl₂ 100mM/ glicerol 15% (v/v) estéril. As células foram alicotadas em tubos e armazenadas -70 °C.

7.2 Transformação por choque térmico

Foram utilizados 100µL das células competentes com 30ng de DNA plasmidial, em banho água-gelo por pelo menos 30 minutos. Em seguida o sistema foi submetido a um choque térmico incubando a 37 °C por 5 minutos utilizando banho maria. Foi adicionado 1mL de meio Luria-Beltran(LB) aos tubos submetidos ao choque térmico e então incubados por 60 minutos a 37 °C. Em seguida, as suspensões de células transformadas foram plaqueadas em duas placas. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*.

7.3 Extração do DNA plasmidial com o kit *Illustra PlasmidPrep Mini Spin*

A colônia isolada foi semeada em caldo LB e ampicilina, e foi incubada *overnight* a 37 °C com agitação a 150 rpm. Em seguida, foram transferidos 1,5 mL da cultura para um microtubo de 1,5 mL e esse material foi centrifugado a 12.000g por 30 segundos. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 175 µL da solução Lysis Buffer type 7. Logo após foi adicionado 350 µL da solução Lysis Buffer type 9 e gentilmente inverteu-se o tubo para assim obter o precipitado. Em seguida, esse material foi para a centrífuga a 16.000 g por 6 minutos. Após

coletar o sobrenadante e transferir para um novo tubo que contendo a coluna de afinidade, que tem como função se ligar ao DNA separando-o de impurezas esse material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 16.000 g. O material centrifugado no tubo foi descartado e foi adicionado a coluna 400 μ L da solução Wash Buffer type 1, e centrifugada novamente por 1 minuto a 16.000g. Após esta etapa, o centrifugado foi descartado, e a coluna foi transferida para um novo microtubo; Adicionou-se 30 μ L da solução Elution Buffer type 4, no centro da coluna e esse foi centrifugado novamente por 30 segundos a 16.000 g. Esse procedimento de lavagem da coluna foi repetido 3 vezes para garantir uma boa eluição

7.4 Transformação por eletroporação

Para ser realizada a transformação por eletroporação, realizou-se previamente a precipitação do DNA adicionando 2 μ L de glicogênio (2ng/ μ L) que atua como carreador, adicionou-se 5,2 μ L de NaCl, mais 143 μ L de etanol 100% gelado e incubou-se por 2 horas a -4 °C. Após realizada esta etapa, centrifugou-se por 20 minutos a 12000g/4°C, descartou-se o sobrenadante e em seguida, adicionou-se 500 μ L de etanol 70 % gelado. Em seguida incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se por 20 minutos a 12000g/4°C. Descartou-se novamente o sobrenadante, cuidadosamente, e deixou-se no fluxo laminar para secagem. Após secagem, ressuspendeu-se em H₂O ultrapura.

Depois de realizada a precipitação do DNA, procedeu-se a transformação por eletroporação, onde foram utilizadas 100 μ L de células competentes (JM110) com 2 μ L do sistema de ligação (pSGFEM). Em seguida, foi transferida a solução para a cubeta de eletroporação, gelada, preparou-se o eletroporador utilizando 1900 volts. Após o choque, cerca de 250 μ L de células foram misturadas em 1mL de caldo LB e incubou-se a 37 °C durante 1 hora. Após esse período as células transformadas foram plaqueadas em LB contendo ampicilina.

7.5 Extração de proteínas totais de abelhas

Cada indivíduo foi macerado em 500 µL de tampão fosfato salino (PBS 1 mg/10 µL; 0,15 M Na₂HPO₄, pH7,2); adicionado a 2 mM de PMSF e coquetel de inibidor de protease 1x. Homogeneizou-se o material que, posteriormente, foi colocado em gelo por 5 minutos. Em seguida a mistura foi macerada por ultrason (30% da capacidade total do aparelho), centrifugada a 12 000 g/10min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um eppendorf de 1,5 mL. O pellet foi resuspenso em 300 µL de PBS, e então centrifugado a 12 000 g/10min à 4 °C.

As proteínas insolúveis em PBS que ficaram no *pellet*, foram eluídas em 500 µL de tampão de lise (Lyse Buffer -LB, 8 M de ureia, 2 M de tiureia, 4 % de CHAPS, 20 mM Tris-base, 30 mM DTT, 2% Bio-Lyte pH3-10, 1 mg/10mL) com o auxílio do ultrassom por 2 minutos. Após, foram centrifugadas em 12 000 g/10min à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e misturado com o extrato de proteínas solúveis em PBS, adicionando-se TCA (Ácido tricloracético) nos extratos, com uma concentração final a 10 % do volume do sobrenadante. A mistura ficou 10 minutos no gelo para acontecer a precipitação e desalinação. Após esse período a amostra foi centrifugada a 12 000 g/10min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e *pellet* homogenizado em 1 mL de acetona gelada. A mistura ficou no gelo por 10 min e então foi centrifugada à 12 000 g/10min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente e, posteriormente, guardado a -20 °C.

7.6 Gel de SDS-PAGE

7.6.1 Coloração PlusOne Coomassie tablets PhastGel R-350

Uma pastilha de phastGel Blue R foi dissolvido em 80 ml de água destilada por 10 minutos. Após a completa diluição foi adicionado 120 ml de metanol e posteriormente foi realizada a filtração de possíveis restos de pastilha que não foram completamente eluídas. A solução anterior foi eluída na proporção de 1 parte para 1 parte de ácido acético a 20 % em água destilada

7.6.2 Solução descorante composição

A solução descorante é composta por metanol 40% e ácido acético a 10%.

7.6.3 Coloração do gel de SDS-PAGE

Foi utilizada uma quantidade suficiente de coloração de Coomassie R350 apenas para cobrir o gel de acrilamida, a solução ficou em contato com o gel por 12 horas. Após esse período o gel foi lavado com água destilada para tirar o excesso de corante e posteriormente adicionado à solução descorante, a solução descorante ficou em contato com o gel até poder se observar as bandas, posteriormente o gel foi digitalizado com scanner.

7.6.4 Tampão de amostra 2x

O tampão de amostra é composto por Tris-HCl 200mM pH 6,8, SDS 4%, β -Mercaptoetanol 4%, Glicerol 20% e Azul de bromofenol 0,1%.

7.7 Corrida em gel de agarose da digestão de clones recombinantes

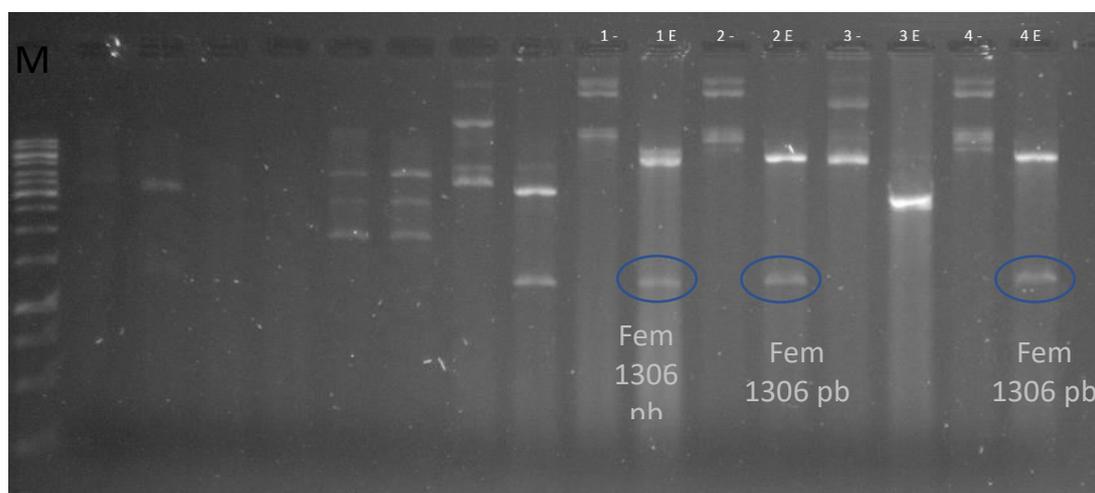


Figura 28. Foto original correspondente a figura 17 com o título: Análise de perfil de restrição (*Nde* I e *Not* I) do plasmídeo recombinante pGSFEM em gel de agarose 1,2%. Na parte superior da imagem são indicados os clones analisados (1 a 4), presença (E) ou ausência de enzimas de restrição (-) e Marcador(M). O marcador (M, mostrado à esquerda da imagem) foi recortado e colocado mais próximo das amostras, pois o gel continha amostras que não estavam correlacionadas com esse trabalho. Os círculos indicam o fragmento do gene *fem* que foi liberado (clones 1, 2 e 4) com 1306 pb. O gel de agarose original pode ser visto no Anexo 7.7)