UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Área de Bromatologia

Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular

Adair Vieira Júnior

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

Co-Orientador: Prof. Dr. João Roberto O. do Nascimento

São Paulo 2006

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e

Documentação do Conjunto das Químicas da USP.



Adair Vieira Júnior

Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular

> Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

> > Prof. Dr. Franco Maria Lajolo orientador/presidente

> > > Carlos Alberto Labate 1º. examinador

Antônio Vargas de Oliveira Figueira 2º. examinador

> Gláucia Mendes Souza 3º. examinador

João Roberto Oliveira do Nascimento 4º. examinador

São Paulo, 24 de março de 2006.

Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular.

RESUMO

А conversão do amido. armazenado nas frutas durante seu desenvolvimento, em açúcares, é desempenhada por várias enzimas, constituindose em um dos principais processos do amadurecimento. A função das enzimas hidrolíticas, alfa-amilase e beta-amilase, no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento de bananas, foi avaliada através da determinação dos perfis de transcrição e tradução dos seus genes. Utilizando-se da expressão heteróloga de clones de cDNA das amilases, foi possível obter as proteínas recombinantes, inclusive na sua forma enzimaticamente ativa, bem como induzir a produção de anticorpos policionais em coelhos, com os quais pode-se acompanhar a variação nos níveis de expressão de cada uma das duas enzimas. O tratamento de bananas com o hormônio etileno induziu a antecipação dos processos de degradação do amido e síntese de açúcares em relação ao grupo de frutas controle. Enquanto no grupo controle, as variações nos níveis de proteína e transcrição relativos à alfaamilase sugerem que há redução na expressão do gene, no grupo tratado com etileno não foi possível detectar a expressão da proteína, apesar dos incrementos na transcrição e atividade. Tal fato pode ser associado à degradação do grânulo de amido e consequente solubilização de proteínas ligadas à sua superfície e ao provável aumento no turnover de proteínas promovidos pelo etileno. Em resposta ao tratamento com etileno, houve antecipação dos picos de atividade relacionados especificamente com a beta-amilase, o mesmo ocorreu na detecção do transcrito e sua proteína. Tais resultados sugerem que em bananas, os padrões de expressão e atividade da beta-amilase estão diretamente relacionados à degradação do amido, respondendo também às variações hormonais na fruta, não sendo possível afirmar o mesmo para alfa-amilase.

Alpha and beta-amylase in the starch metabolism during banana ripening: cloning, expression and molecular characterization.

SUMMARY

The starch breakdown in plants is accomplished by several enzymes and pathways and it is the main feature of the ripening in climacteric fruits, such as banana. The function of the hydrolytic enzymes, alpha-amylase and beta-amylase, in the starch-to-sugar metabolism during banana ripening, was evaluated through the determination of the profiles of transcription and translation of its genes. Using the heterologous expression of amylases cDNA clones, was possible to get recombinant proteins in its enzymatically active form, as well as inducing the production of the polyclonal antibodies in rabbits, and use this to evaluate the expression profile of each one enzyme. The treatment of bananas with the hormone ethylene induced the anticipation of the processes of degradation of starch and synthesis of sugars in relation to the control group. While in the control group the variations of protein and transcription levels for alpha-amylase suggests a reduction in the gene expression, in the ethylene group was not possible to detect the expression of the protein, despite the increments in the transcription and activity. Such fact can be associated with the degradation of the starch granules and the resultant surface protein solubilization, and the probable increase in the protein turnover promoted by ethylene treatment. In response to the ethylene, the peak related to beta-amylase activity has been anticipated and the same was occurred with the transcription and translation of this enzyme. These results suggest that the profile of expression and activity of beta-amylase are directly related to the degradation of starch and do respond to hormonal treatment of banana fruits, which could not be affirmed for the enzyme alpha-amylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de interconversão da sacarose em amido15
Figura 2: Modelos de degradação de amido17
Figura 3: Perfis metabólicos para frutas utilizadas
Figura 4: Representação esquemática dos sítios de anelamento dos primers
Figura 5: SDS-PAGE, após coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>
Figura 6: SDS-PAGE do precipitado de bactérias da expressão piloto de MAmyS1 46
Figura 7: SDS-PAGE a 12% de acrilamida do precipitado de bactérias
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para amilases
Figura 9: Western blotting contra clones de amilases de banana em Pichia pastoris 51
Figura 10: Ensaio da atividade enzimática de clones de α e β -amilase de banana 52
Figura 11: SDS-PAGE a 8,0% de acrilamida dos extratos totais de proteínas54
Figura 12: SDS-PAGE a 7,5% de acrilamida do precipitado de bactérias
Figura 13: Western blotting com soros anti-MAmyS1 e anti-MBmyS157
Figura 14: Western blotting com soros anti-amilase contra proteínas de bananas 59
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose com amostras de RNA total
Figura 16: Curvas padrão para determinação do limite de detecção e da eficiência 67
Figura 17: Curvas típicas obtidas em <i>realt-time</i> RT-PCR
Figura 18: Quantificação da expressão relativa de genes por RT-PCR em tempo real de
acordo com o modelo proposto por Livak e Schmittgen (2001)
Figura 19: Quantificação da expressão relativa de genes por RT-PCR em tempo real de
acordo com o modelo proposto por Pfaffl (2001)72
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose com produtos da qRT-PCR relativa
Figura 21: Comparação da quantificação da expressão relativa de genes de α -amilase . 76
Figura 22: Perfis metabólicos e de expressão da α -amilase
Figura 23: Perfis metabólicos e de expressão da β -amilase

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
BPNPG7	p-nitrofenil maltoeptaosídeo bloqueado na extremidade não redutora
BMGY	buffered glycerol-complex medium
BMMY	buffered methanol-complex medium
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
ddNTP	5'-trifosfato de 2',3'-didesoxirribonucleosídeo
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	5'-trifostato de 2'-desoxirribonucleosídeo
dpc	dias pós-colheita
DTT	tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IPTG	isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo
kb	quilobases ou quilopar de bases
kDa	quilodalton
LB	meio de cultura Luria-Bertani
mRNA	RNA mensageiro
ORF	open reading frame
pb	par de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
PNPG5	p -nitrofenil α -D-maltopentaosídeo
PVP 40.000	polivilpirrolidona de peso molecular médio 40.000 g/mol
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	transcrição reversa seguida da PCR
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UDG	uracila-DNA glicosilase
YPDS	yeast extract peptone dextrose medium

1	Introdução.	10
1.1	Descrição e caracterização do amido.	11
1.2	Atividade enzimática relacionada ao metabolismo amido-sacarose.	12
1.2.1	Biossíntese do amido.	13
1.2.2	Degradação do amido e amilases.	16
1.2.2.	1 Alfa-amilases.	18
1.2.2.	2 Beta-amilases.	20
1.2.2.	3 Enzimas desramificadoras, glicosidases e enzimas fosforolíticas.	22
1.3	Amadurecimento de frutas.	23
2	Justificativa.	25
3	Objetivos.	26
4	Material.	27
4.1	Frutas.	27
4.2	Vetores, células hospedeiras e animais de experimentação.	27
5	Métodos.	28
5.1	Determinação dos teores de açúcares, CO ₂ , etileno e amido.	28
5.2	Extração de proteínas de banana.	28
5.3	Extração de DNA genômico e RNA total.	29
5.4	Síntese de cDNA.	29
5.5	Planejamento dos <i>primers</i> .	29
5.6	Amplificação, clonagem e seqüênciamento.	30
5.7	Expressão da α -amilase em sistema heterólogo.	30
5.8	Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida.	31
5.9	Atividade de α -amilase e β -amilase.	31
5.10	Preparo de soro antiamilase.	32
5.11	Western blot.	32
5.12	Análise da expressão de genes por qRT-PCR e <i>real-time</i> RT-PCR.	33
6	Resultados e Discussão.	35
6.1	Perfil de respiração, etileno, carboidratos e atividade enzimática.	35
6.2	Expressão heteróloga das amilases em modelo procarioto.	41
6.2.1	Expressão das ORFs de α -amilase e β -amilase.	41
6.2.2	Expressão de clones parciais de α -amilase e β -amilase.	44
6.3	Expressão heteróloga das amilases em modelo eucarioto.	47
6.3.1	Clonagem das ORFs de $lpha$ e eta -amilase para expressão heteróloga.	48
6.3.2	Expressão da proteína recombinante e ensaio enzimático.	50
6.4	Western blot com soros anti-amilases de banana.	54
6.4.1	Extração de proteínas totais da polpa de banana.	54
6.4.2	Western blot com soro anti-MAmyS1 e anti-MBmyS1.	55

6.5	Expressão relativa dos genes da α e β -amilase.	60
6.5.1	Clonagem de um gene da GAPDH de banana.	61
6.5.2	Eficiência da amplificação e quantificação por RT-PCR em tempo real.	63
6.5.2.1	Quantificação da expressão relativa: modelo AACt.	69
6.5.2.2	Quantificação da expressão relativa: modelo Pfaffl.	71
6.5.3	Quantificação da expressão por qRT-PCR relativa.	73
6.6	Alfa e beta-amilase no metabolismo de carboidratos em bananas.	77
7	Conclusão.	82
Referências Bibliográficas.		83
Anexo	DS.	91

1 Introdução.

As frutas climatéricas, ao serem colhidas, evoluem naturalmente para o amadurecimento, período no qual ocorrem várias reações químicas e transformações bioquímicas associadas a um metabolismo complexo que se processa de maneira altamente coordenada e estão relacionadas à atividade de enzimas e a expressão ou supressão de genes específicos, resultando em modificações em sua composição e estrutura. O amadurecimento requer síntese de novas proteínas e mRNA, assim como de pigmentos e componentes do aroma e sabor (DILLEY, 1972; SPEIRS e BRADY, 1991; LAJOLO e CORDENUNSI, 1997).

As cultivares de banana (*Musa spp*.), economicamente importantes, são principalmente triplóides e derivados de duas espécies selvagens diplóides, *Musa acuminata* (genoma A) e *Musa balbisiana* (genoma B). Devido à impossibilidade de nomear qual a espécie da banana cultivada, desenvolveu-se um sistema de nomenclatura chamado de grupamento genômico, caracterizado pelas letras A e B. As frutas consumidas *in natura* são cultivares do grupo AAA e subgrupo Cavendish, derivados exclusivamente da *M. Acuminata*, como as bananas nanica, nanicão e grande naine, constituindo a base do comércio mundial da fruta. Outras cultivares de bananas, também importantes comercialmente, porém consumidas após serem cozidas ou assadas, incluem os plátanos, como a banana da terra, do grupo AAB, ou a banana figo, do grupo ABB (ISRAELI e LAHAV, 1986; SEYMOUR, 1993; EMBRAPA, 2005).

Os carboidratos, armazenados em muitas frutas principalmente na forma de amido, estão entre as moléculas que mais sofrem alterações ao longo do amadurecimento, as quais são promovidas por reações enzimáticas de síntese e degradação. Isto implica em importantes mudanças na fruta, como por exemplo, o amolecimento e adoçamento, relevantes para o seu consumo como alimento ou produto de comercialização (MACRAE *et al.*, 1992). Em bananas, o amido corresponde a aproximadamente 20-25% do peso da polpa fresca da fruta na fase pré-climatérica e é rapidamente degradado durante o amadurecimento para menos de 1% no pósclimatério. Os açúcares, que representam 1-2% na fruta verde, são acumulados, chegando a 15-20% do peso fresco na fruta madura. A sacarose, predominante na fruta madura, aumenta de 0,2% para um máximo de 15%, precedendo o acumulo de glicose e frutose (AREAS e LAJOLO, 1981; MAO E KINSELLA, 1981; MARRIOTT *et al.*, 1981; MOTA *et al.*, 2000).

1.1 Descrição e caracterização do amido.

O amido pode ser armazenado em diferentes órgãos e tecidos vegetais, como em plastídeos de folhas, frutos e no endosperma de cereais em uma estrutura bastante complexa, formando grânulos com diâmetro que pode variar de 0,1 a 50 μm. Duas diferentes macromoléculas podem compor o amido, amilose e amilopectina, sendo que ambas são polímeros da glicose (BALL e MORREL, 2003). Os grânulos formados pelo amido são estruturas semicristalinas com diversos tipos polimórficos, o grau e o tipo da cristalinidade presentes são dependentes, principalmente, das características estruturais da amilopectina, sendo esta, o principal componente de amido, embora a retrogradação da amilose, possa produzir um tipo específico de estrutura cristalina (ZHANG *et al.*, 2005). Amilose e amilopectina podem assumir diferentes conformações, as quais podem ser encontradas em estado cristalino ou amorfo (BULÉON *et al.*, 1998).

A amilopectina é composta por α -1,4-glicanos, arranjados em grupos e entremeados por α -1,6-glicanos, sendo portanto, uma macromolécula ramificada de alto peso molecular, com grau de polimerização de 10⁵ a 10⁶ unidades de glicose (BALL e MORREL, 2003). A estrutura da amilose é compostas por unidades de glicose em arranjo essencialmente linear, com grau de polimerização de 1000 a 5000 unidades, onde os monômeros de glicose são ligados através de ligações α -1,4-glicosídicas, podendo conter ainda, 0,1% de ligações α -1,6-glicosídicas. As longas cadeias da amilose são estruturas espirais, flexíveis em meio aquoso e têm alta afinidade por iodo; cadeias de 200 unidades de glicose podem ligar, à temperatura ambiente, até 20% do seu peso em iodo, o complexo resultante tem coloração azul escuro com máximo de absorção a 620 nm. A amilopectina, por sua vez, tem baixa capacidade de ligação ao iodo, 0,2% (p/p) e o complexo formado tem máximo de absorção a 550 nm (KOSSMANN e LLOYD, 2000). Esta capacidade de ligação de iodo, diminui proporcionalmente com a diminuição do tamanho da cadeia do polissacarídeo. A natureza química da amilose, permite ainda, a formação de complexos com pequenas moléculas de natureza hidrofóbica, como no amido de cereais, onde está complexada com lipídios; já a amilopectina, pode ligar-se covalentemente com grupos fosfato, os quais não estão ausentes na amilose (KOSSMANN e LLOYD, 2000; BALL e MORREL, 2003).

Existem três tipos distintos de estruturas cristalinas para os grânulos de amido, A, B e C, os quais, diferem quanto à forma dos cristais e ao conteúdo de água e geram diferentes padrões de difração em raios-X. O amido tipo A pode ser encontrado principalmente em cereais, enquanto o amido presente em tubérculos de batatas apresenta o padrão tipo B. O amido tipo C é encontrado em amidos de legumes e em alguns tubérculos de espécies tropicais, o padrão tipo C resulta da combinação dos amidos tipo A e B (BULÉON *et al.*, 1998; KOSSMANN e LLOYD, 2000). O padrão de difração do tipo B é mais comumente relacionado ao amido de banana, todavia, podendo ocorrer também os tipos A e C, tal observação pode resultar da análise de amidos de diferentes cultivares ou mesmo das condições de cultivo e da técnica utilizada para obtenção dos grânulos isolados (ZHANG *et al.*, 2005).

1.2 Atividade enzimática relacionada ao metabolismo amido-sacarose.

Plantas, algas verdes e cianobactérias sintetizam polissacarídeos de reserva por vias similares, utilizando ADPglicose. O amido é sintetizado exclusivamente por eucariotos fotossintetizantes ou em organismos derivados, existindo assim, dois tipos de amido. O primeiro, encontrado no citoplasma de algas vermelhas e o outro, em plastídeos de algas verdes e plantas superiores (BALL e MORREL, 2003).

Várias são as vias metabólicas e enzimas nos tecidos vegetais capazes de metabolizar o amido. Durante sua síntese, ocorre a participação de diversas isoformas da amido sintase, havendo ainda, a participação de enzimas ramificadoras е desramificadoras em etapas subseqüentes (MUKERJEA et al., 2002). O conjunto destas enzimas é uma função da origem botânica de cada amido, assim, a mesma planta pode sintetizar diferentes tipos de amido, como o amido transitório, sintetizado em folhas, ou aquele encontrado em órgãos vegetativos ou ainda sintetizado em amiloplastos de órgãos e estruturas de armazenamento ou frutos (KOSSMANN e LLOYD, 2000). A conversão do amido a açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) envolve várias enzimas em mais de uma via metabólica, representando um exemplo clássico de heterogeneidade da atividade enzimática (AREAS e LAJOLO, 1981). Enzimas das vias de degradação hidrolítica e fosforolítica, além da sacarose sintase (SuSy, EC 2.4.1.13) e sacarose fosfato sintase (SPS, EC 2.4.1.14), vêm sendo identificadas e estudadas em frutas como a banana, contudo a exata contribuição de cada uma no processo da degradação do amido durante o amadurecimento ainda permanece como uma questão a ser resolvida (MEDINA-SUAREZ et al., 1997; ZHANG et al., 2005).

1.2.1 Biossíntese do amido.

O amido é a principal molécula de armazenamento de carbono em plantas e é a fonte principal da energia para animais, incluindo seres humanos. O amido é produzido nas folhas durante o dia a partir dos produtos da fotossíntese, sendo acumulado de maneira transiente nos cloroplastos, sob a forma de grânulos insolúveis. Ao cair da noite, as vias de acúmulo dão lugar a degradação do amido, e os carboidratos são exportados a partir do plastídeo, predominantemente como maltose e em menor proporção como glicose (NIITTYLA *et al.*, 2004).

Dentro da célula vegetal, no citosol, a maltose é convertida a hexose-fosfato, podendo ser consumida pela via glicolítica ou utilizada para síntese de sacarose, a qual é exportada para outras células. A sacarose é transportada a partir dos tecidos fotossintetizantes (tecidos fonte), através do floema, até outros tecidos da planta (tecidos consumidores). Os tecidos consumidores podem ser tecidos em crescimento, tais como meristemas e as folhas novas, que catabolisam a sacarose para produzir energia, ou órgãos do armazenamento, tais como raízes, tubérculos, cascas de árvores e frutas, os quais ressintetizam amido nos plastídeos. Este amido armazenado é muito importante para as plantas e é degradado em seqüência a variações sazonais ou estágios de desenvolvimento específicos, tais como o começo da primavera para raízes e cascas de árvores e o início de amadurecimento em muitos frutos (SMITH *et al.*, 1997; BALL e MORELL, 2003).

Em plantas superiores, a biossíntese do amido nos plastídeos envolve a participação de uma séria de enzimas (figura 1), incluindo ADPglicose pirofosforilase (AGPase), amido sintase (SS), enzima ramificadora do amido (SBE) e enzima desramificadora do amido (SDBE). As cadeias de α -glicanos de ambos os tipos de polímeros, amilose e amilopectina, são elongadas pela amido sintase (ADP-glucose: 1,4- α -D-glicano 4- α -D-glicosiltransferase; EC 2.4.1.21). A amido sintase catalisa a transferência de resíduos de D-glicose oriundos de unidades de difosfato de glicosil-nucleotídeos (ADPglicose) à extremidade não redutora de uma molécula precursora ou um aceptor protéico (amilogenina), produzindo ligações do tipo α -1,4. Cinco subfamílias da amido sintase já foram identificadas em plantas superiores, amido sintase ligada ao grânulo (GBSS) e outras quatro isoformas solúveis de amido sintase (SSI, SSII, SSIII e SSIV). A GBSS é essencial para a síntese de amilose e é exclusivamente ligada ao grânulo de amido. As isoformas SSI, SSII, SSIII e SSIV, esta última chamada SSV em dicotiledôneas, são responsáveis pela síntese e elongação das cadeias de amilopectina (SMITH *et al.*, 1997; MYERS *et al.*, 2000; BALL e MORELL, 2003; JAMES *et al.*, 2003).

14



Figura 1: Modelo de interconversão da sacarose em amido para células de tecidos de reserva e endosperma em desenvolvimento. A sacarose captada pela célula é hidrolisada no citosol, convertida em ADPglicose, a qual, é transportada para o interior do amiloplasto e utilizada na síntese da amilose e amilopectina pelas diferentes isoformas da amido sintase. Adaptado de Kossmann e Lloyd (2000) e Emes *et al.* (2003).

1.2.2 Degradação do amido e amilases.

Acredita-se que somente com a ação conjunta da α-amilase (EC 3.2.1.1), βamilase (EC 3.2.1.2), enzima desramificadora (EC 3.2.1.41) e α-glicosidase (EC 3.2.1.20), pode-se obter *in vivo*, a completa hidrólise do amido. Entretanto, o processo de degradação do amido vem sendo estudo, sob aspectos mais amplos, ao longo da germinação de sementes de cereais, enquanto as vias de degradação em células de tecidos vegetais vivos e a participação de cada uma destas enzimas na hidrólise do amido, permanecem indefinidas (BECK e ZIEGLER, 1989; SARIKAYA *et al.*, 2000). Diferenças marcantes são encontradas quando comparados os modelos de degradação de amido encontrado em órgãos de armazenamento de cereais como sementes de cevada e arroz, de leguminosas como o feijão e a ervilha e em tubérculos de batatas, ou ainda aquele acumulado de forma transiente em cloroplastos de células de folhas durante o dia, o qual é conhecido como amido transitório (KOSSMANN e LLOYD, 2000; LLOYD *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2005). Na figura 2, estão representados alguns modelos propostos para a degradação do amido de diferentes origens vegetais.

Em sementes de cereais, o estabelecimento da degradação do amido acontece durante a germinação, mediado pela intensa síntese "de novo" da α -amilase, a aqual é sinalizada pelas giberelinas (figura 2A), acompanhado pela ação da β -amilase e α -glicosidase nas dextrinas liberadas. O amido armazenado em cotilédones de leguminosas ou em tubérculos parece ser degradado principalmente por vias fosforolíticas. Em batatas, um fenômeno conhecido como adoçamento pelo frio é acompanhado pelo aumento da expressão de enzimas fosforolíticas, glicano água-diquinase e fosforilase (figura 2B). Foi proposto que, o amido acumulado em cloroplastos de folhas de *Arabidopsis* e espinafre, está sujeito a ações da β -amilase e da glicano água-diquinase, enquanto a α -amilase não é determinante no processo (figura 2C), este conceito parece ser aplicável à degradação do amido em folhas de outras espécies vegetais (KOSSMANN e LLOYD, 2000; LLOYD *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2005).



Figura 2: Modelos de degradação de amido em cotilédones de cereais e leguminosas e em folhas. (**A**) Via pela qual o amido é convertido em maltose e glicose no endosperma de cereais. A membrana plasmática e o envelope do amiloplasto são degradados no início da germinação. (**B**) Conversão do amido em açúcar nos cotilédones de leguminosas. A membrana do amiloplasto é desintegrada e a degradação do amido é catalisada por enzimas citosólicas. (**C**) Principal via pela qual o amido é convertido em maltose e exportado para o citosol em folhas. GWD, glicano água-diquinase; MEX1, transportador de maltose. Adaptado de Smith *et al.* (2005).

1.2.2.1 Alfa-amilases.

A α -amilase (1,4- α -D-glicano glicanoidrolase, EC 3.2.1.1), possui atividade endohidrolítica e atua aleatoriamente sobre ligações glicosídicas α -1,4, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas, podendo ser encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias. α-Amilases são membros da família das amilases ou família 13 das glicosídeo hidrolases (GH-13), classificação esta, baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos (HENRISSAT e BAIROCH, 1996) e cuja relação estrutural e evolucionária com outros membros da família das glicosídeo hidrolases vem sendo amplamente investigada (JANEČEK, 1997; PUJADAS e PALAU, 2001). As α -amilases compartilham a estrutura barril $(\beta/\alpha)_8$, similar a encontrada para a triose fosfato isomerase (TIM, E.C. 5.3.1.1) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19), apresentando no entanto, características distintas em sua estrutura primária que as diferem da TIM e CGTase (JANEČEK et al., 1995; VIEIRA-JUNIOR, 2001). O tipo de arranjo estrutural encontrado nas α -amilases pode ser evidenciado também nas famílias GH-70 e GH-77 das glicosídeo hidrolases, desta forma, as famílias GH-13, GH-70 e GH-77 foram organizadas em um novo grupo, GH-H, que reflete aspectos evolutivos mais próximos entre seus membros, como por exemplo, os resíduos catalíticos e a disposição espacial dos mesmos.

Embora diferentes tipos de enzimas sejam capazes de liberar, *in vitro*, glicanos solúveis a partir de grânulos de amido purificados, acredita-se que a única enzima capaz fazê-lo *in planta*, seja a α -amilase. Ela parece apresentar papel central no processo de hidrólise do amido e por possuir atividade endo-amilolítica, a α -amilase promove alterações marcantes no grão de amido, fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos nos cereais, capaz ainda de degradá-los inteiramente (PREISS, 1982; BECK e ZIEGLER, 1989; IRVING, 1999).

Em cereais, a expressão da α -amilase e a sua regulação são temas bastante estudados. A degradação do amido tem papel central entre os eventos bioquímicos na germinação de sementes, fornecendo a energia necessária ao embrião. Esta degradação é iniciada pela indução da α -amilase, responsável pela clivagem das ligações α -1,4endoglicolíticas da amilose e amilopectina. No entanto, a completa degradação do amido requer ainda a ação de outras enzimas glicolíticas (HUANG *et al.*, 1990; SUTLIFF *et al.*, 1991; SUBBARAO *et al.*, 1998).

Estudos sobre o desenvolvimento e regulação hormonal da expressão de genes em plantas revelam que a indução da α -amilase resulta na sua síntese "de novo", sendo acompanhada por um aumento pronunciado no mRNA para a proteína. Nos cereais esta indução responde positivamente às giberelinas (GA) e negativamente ao ácido abscísico (O'NEILL *et al.*, 1990; HAMABATA *et al.*, 1994), tendo sido verificado um aumento da transcrição do gene da α -amilase em protoplastos da camada de aleurona de cereais tratados com GA (SKADSEN, 1993; YAMAMOTO, 1995). Em bananas, o ácido abscísico pode induzir a iniciação do amadurecimento (SEYMOUR *et al.*, 1993), enquanto o GA parece causar um atraso significativo no estabelecimento do climatério (ROSSETTO *et al.*, 2003), contrastando assim com o padrão dos cereais.

Os genes de α -amilase de arroz, cevada e trigo, apresentam um motivo chamado "BOX pirimidínico", encontrado em genes que sofrem indução por GA (SUTLIFF *et al.*, 1991), não existindo informações a esse respeito para genes de frutas. Investigações sobre o mecanismo de indução do ácido giberélico avançaram no sentido de analisar as regiões promotoras em camadas de aleurona de arroz. Contudo detalhes no processo de transferência do sinal para a expressão dos genes permanecem incertos (YAMAMOTO, 1995). O GA é secretado pelo embrião para as camadas do aleurona e escutelo, induzindo a síntese de mRNA da α -amilase que aumenta em paralelo com a atividade de síntese da enzima no cotilédone (BECK e ZIEGLER, 1989).

Quando a degradação do amido supera a capacidade de utilização de açúcares pela semente em desenvolvimento, o aumento na concentração dos açúcares solúveis reprime a expressão de genes da α -amilase, atuando como mecanismo de *feedback*

negativo, que pode ser encontrado regulando outros genes responsivos à concentração de açúcar ou de outros produtos do metabolismo de carbono (TERASHIMA *et al.*, 1996).

Em kiwis, a atividade α -amilásica aumenta paralelamente ao conteúdo de amido durante o desenvolvimento da fruta, tendo seus valores máximos entre 134 dias pósantese (momento em que o conteúdo de amido é máximo), havendo um aumento de 2 vezes na atividade α -amilásica associada ao sistema de degradação do amido. Ao longo do amadurecimento os valores da atividade da α -amilase permanecem constantes até a quase totalidade da conversão do amido em açúcares, decrescendo 4 a 5 vezes neste ponto (WEGRZYN e MACRAE, 1995).

Wegrzyn *et al.* (2000), demonstraram que em maçãs amadurecidas sob baixa temperatura (0,5 °C), o transcrito da α -amilase se acumulou temporariamente até os primeiros dias do amadurecimento, com altos níveis de mRNA sendo observados do dia 3 ao 9 e não sendo detectado posteriormente. A associação da mobilização do amido com o incremento do mRNA, não pode, no entanto, ser evidenciada, concluindo que a expressão da α -amilase foi uma resposta ao frio.

1.2.2.2 Beta-amilases.

A β -amilase (1,4- α -D-glicano maltoidrolase, EC 3.2.1.2) pode ser encontrada em vegetais superiores e em algumas bactérias gram-positivas (PUJADAS *et al.*, 1996), é classificada na família 14 das glicosídeo hidrolases (GH-14) e atua como exo-hidrolase na penúltima ligação α -1,4-glicosídica do amido, glicogênio e oligossacarídeos relacionados, removendo a partir da extremidade não redutora da cadeia, sucessivas unidades de β -maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico inicial do açúcar liberado. As β -amilases apresentam no seu arranjo tridimensional a estrutura barril (β/α)₈, descrita também nas α -amilase, todavia, os aminoácidos catalíticos e a disposição espacial destes, difere daqueles encontrados na família 13, revelando a divergência evolutiva entre as duas famílias de enzimas.

A β-amilase participa do processo de mobilização do amido durante a germinação das sementes de cereais. Esta é acumulada durante o processo de desenvolvimento das sementes de cevada e permanece ligada aos grânulos de amido, sendo considerada a isoforma específica do endosperma, havendo também uma isoforma ubíqua, presente em órgãos vegetativos como folhas e raízes (ZIEGLER, 1999). Em sementes de arroz, a forma específica do endosperma é ausente, ocorrendo a sua síntese na camada de aleurona durante a germinação e ao contrário do que se observa para a α-amilase, a indução da expressão e síntese "de novo" da β-amilase não estão sob controle de giberelinas (YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

Em batata doce, acreditava-se que a β -amilase desempenhava uma função de proteína de reserva nas raízes, conceito este, estendido por muito tempo a outros tecidos vivos (KOCH, 1996). A expressão desta enzima em órgãos vegetativos, como folhas e talos, é induzida por altas concentrações de sacarose e outros açúcares metabolizáveis, esta regulação acontece por uma complexa rede de transdução de sinal (MAEO, *et al.*, 2001), podendo responder ainda, em tubérculos de batata, ao frio (VIKSONIELSEN *et al.*, 1997; NIELSEN *et al.*, 1997; GANA *et al.*, 1998) e estresse hídrico em cotilédones de *Cucumis sativus* (TODAKA *et al.*, 2000). Em folhas de batata, espinafre e *Arabidopsis*, foram identificadas isoformas de β -amilase com peptídeos de endereçamento específico para plastídeos, às quais é atribuída a degradação do amido transitório, acumulado nos cloroplastos, até maltose, principal fonte de carbono exportada através da membrana do plastídeo para o citosol, sendo este aporte de maltose, utilizado como fonte de carbono durante o período noturno (SMITH *et al.* 2003; WEISE *et al.*, 2005).

Purgatto *et al.* (2001) investigaram o efeito do tratamento de bananas com o ácido indol-3-acético (AIA) durante a pós-colheita, demonstrando que o AIA pode atrasar a degradação do amido em bananas e que, da mesma forma, o incremento na atividade e transcrição da β -amilase também foi atrasado, sugerindo estreita correlação entre expressão da enzima e o metabolismo amido-sacarose ao longo do amadurecimento das frutas.

1.2.2.3 Enzimas desramificadoras, glicosidases e enzimas fosforolíticas.

Enzimas desramificadoras do amido (DBE), como a pululanase (α -dextrina-endo-1,6- α -glicosidase, EC 3.2.1.41), hidrolisam ligações α -1,6-glicosídicas no pululano e amido formando maltotriose. A isoamilase, (EC 3.2.1.68), outra enzima desramificadora, hidrolisa ligações α -1,6-D-glicosídicas em cadeias ramificadas da amilopectina e suas β dextrinas limites. Esta distingui-se da pululanase, por sua incapacidade de atacar o pululano e por sua ação limitada em α -dextrinas limite (HENKER *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1996). A atividade de isoamilase em bananas mantém-se praticamente estável durante o amadurecimento, não sendo observadas mudanças significativas na expressão do seu gene (BIERHALS *et al.*, 2004).

A hidrólise do terminal não redutor dos polissacarídeos pode ser feita por duas enzimas: as β -amilases, descritas anteriormente, e as α -glicosidases (EC 3.2.1.20). As α glicosidases liberam α -D-glicose a partir do terminal α -1,4 da cadeia glicosídica, acreditase que sua função primária seja de degradar os produtos de outras enzimas que agem diretamente sobre o amido, podendo atuar sobre glicanos de cadeia curta como a maltose ou maltotriose e ainda diretamente sobre a amilopectina (BAIROCH, 2000a, 2000b). Apesar de serem descritas principalmente em endosperma de cereais, estão amplamente distribuídas em plantas, apresentando-se múltiplas isoformas. Konishi *et al.* (2001) sugerem que as α -glicosidases, na sua isoforma ácida, são enzimas chaves no processo de degradação do amido em bananas.

A 4- α -glicanotransferase (EC 2.4.1.25), também conhecida com enzima-D ou enzima desproporcionadora (DPE), catalisa a transferência de, principalmente, grupos maltosil a partir de um α -1,4-D-glicosídeo doador para uma nova posição em outro glicosídeo aceptor ou para a glicose. As moléculas aceptora e doadora podem ser glicanos de mesmo tamanho de cadeia, causando a desproporção na serie de glicanos que têm seu tamanho aumentado. Acredita-se que a conversão de oligossacarídeos de cadeia curta em glicosídeos de cadeia longo provê mais substrato para enzimas como β amilase e amido fosforilase. Enzimas da via fosforolítica, podem ter função determinante na degradação do amido, dependo da sua natureza química e origem biológica. A amido fosforilase (EC 2.4.1.1) atua na ligação α-1,4 das extremidades não redutoras de oligossacarídeos, liberando glicose-1-fosfato, podendo degradar toda a amilose. Em bananas, a atividade das fosforilases aumenta antes do início da degradação do amido e decresce durante o período climatérico (AREAS e LAJOLO, 1981; MOTA *et al.*, 2002), este comportamento pode significar uma acentuada participação da fosforilase durante etapas iniciais da degradação dos grânulos de amido.

Estudos recentes mostram que uma enzima até então desconhecida, a glicanoágua-diquinase ou GWD (EC 2.7.9.4), atuaria na síntese e degradação do amido, como demonstrado em tubérculos de batatas e em folhas de *Arabidopsis*, onde a GWD transfere o grupo β -fosfato do ATP para a posição 3 ou 6 dos resíduos glicosídicos da amilopectina, influenciando na susceptibilidade da ação de outras enzimas na superfície do grânulo (SMITH *et al.*, 2005).

1.3 Amadurecimento de frutas.

A biologia molecular trouxe importante contribuição ao estudo do metabolismo de carboidratos em das frutas, fornecendo as ferramentas necessárias para o acompanhamento da química e bioquímica pós-colheita. Novas técnicas para manipulação e acompanhamento de processos e reações envolvendo enzimas e ácidos nucléicos, permitem avaliar com maior grau de confiança qual o comportamento destas moléculas, definindo as bases genéticas do controle do metabolismo de carboidratos, podendo assim, contribuir de forma significativa para o entendimento das bases moleculares do amadurecimento e adoçamento e como estes processos podem influenciar na conservação e valor nutricional das frutas.

Informações a respeito destes processos podem ser obtidas pelo estudo e investigação do *turnover* de proteínas e ácidos nucléicos, sendo verificada a continuidade

de sua síntese em muitos frutos. Além da continuidade da síntese protéica, estas também passam a ser redirecionadas. Assim, as análises de mRNA e espécies protéicas, síntese de proteínas mostraram haver relacionadas distintamente com 0 amadurecimento. Isto mostra serem estes eventos controlados primariamente pela expressão de genes (SEYMOUR et al., 1993). A partir de células do tecido vegetal, é possível a extração de proteínas, RNA total e DNA genômico. Partindo deste material isolado pode-se realizar o acompanhamento da transcrição e tradução, manipulação e modificação de genes para a produção de plantas transgênicas e análise de seqüências que poderão alimentar bancos de dados ou servir para a construção de modelos moleculares para futuras investigações (BECK e ZIEGLER, 1989; KOCH, 1996; BIRCH, 1997).

Trabalhos recentes procuraram descrever a participação dos eventos que envolvem a transcrição e a tradução de genes diretamente relacionados ao processo de síntese e degradação do amido em bananas. Foi demonstrando que a ativação da transcrição e tradução dos genes da SPS e SuSy de banana são eventos importantes durante o desenvolvimento e amadurecimento da fruta, havendo relação direta entre os níveis de mRNA, proteína e atividade enzimática (NASCIMENTO *et al.*, 1997 e 2000). Enquanto os níveis de expressão da DBE em bananas amadurecidas sob controle e tratadas com etileno mostraram-se constantes (BIERHALS *et al.*, 2004), a infiltração de ácido indol-3-acético em fatias verdes de banana, atrasou a degradação do amido e conseqüente formação de sacarose, atrasando também o incremento nos níveis de atividade e transcrição da β-amilase (PURGATO *et al.*, 2001)

2 Justificativa.

Apesar da importância atribuída à α -amilase e β -amilase são poucas as informações a respeito dessas enzimas em frutos, principalmente com relação à função desempenhada, propriedades moleculares e cinéticas e regulação gênica. No que se refere ao padrão de expressão no tecido pouco se conhece sobre os agentes envolvidos nessa regulação e variação temporal. Deste modo, um aprofundamento dos estudos genéticos, utilizando técnicas de biologia molecular, procurou contribuir para uma melhor compreensão da função das amilases em frutas, particularmente em bananas, bem como dos fatores determinantes para a regulação das suas atividades.

A obtenção da seqüência dos mRNA dos genes das amilases e a sua expressão heteróloga, procuraram fornecer substrato para etapas importantes de muitos estudos cinéticos e moleculares. Estes por sua vez, tiveram o intuito de contribuir para tornar mais claros os mecanismos de atuação destas enzimas na banana, possibilitando o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias envolvendo a manipulação e conservação pós-colheita de frutas.

3 Objetivos.

Clonar, seqüênciar e induzir a expressão da α -amilase e β -amilase de banana em sistema heterólogo procarioto e eucarioto.

Acompanhar a atividade e a expressão da α -amilase e β -amilase durante o amadurecimento da banana através da determinação dos perfis de expressão de proteína e mRNA e sua relação com os padrões de respiração (liberação de CO₂), produção de etileno, degradação de amido e síntese de açúcares solúveis, de modo a contribuir para o entendimento da função destas enzimas no metabolismo do amido na fruta.

4 Material.

4.1 Frutas.

Bananas pré-climatéricas (*Musa sp.*, grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish, cultivar Nanicão) colhidas com maturidade comercial, aproximadamente 110-120 dias pós-antese, adquiridas na CEAGESP, foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio 5% e separadas em dois grupos. Um grupo foi deixado amadurecer naturalmente, constituindo-se no grupo controle. Outro grupo foi submetido a tratamento com etileno a 100 ppm por 12h.

As frutas foram armazenadas em câmara com temperatura de 20 \pm 2 °C e umidade de 80 \pm 5 %. Foram tomadas amostras diariamente para medida da produção de etileno e CO₂. Amostras dos dois grupos foram coletas periodicamente, fatiadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a –80 °C.

4.2 Vetores, células hospedeiras e animais de experimentação.

Utilizaram-se os vetores pCRT7/NT-TOPO, pCR4-TOPO, pPICZB, pPICZαB, pPICZαC (Invitrogen) e pGEM-T (Promega) para transformação de bactérias *E.coli* TOP10, TOP10F' ou BL21(DE3)pLysS (Invitrogen).

Foram utilizadas leveduras *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) e coelhos machos da raça Nova Zelândia, brancos, com peso aproximado de 2,8 a 3,0 kg.

5 Métodos.

5.1 Determinação dos teores de açúcares, CO₂, etileno e amido.

Os teores de sacarose, glicose, frutose foram determinados por cromatografia a líquido segundo Purgatto *et al.* (2002) e Rossetto *et al.* (2003), utilizando-se coluna de troca iônica e detector amperométrico pulsado (HPAEC-PAD). O teor de amido foi determinado enzimaticamente como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995).

Para análise dos níveis de CO_2 e etileno produzidos, amostras compostas por três grupos de três frutas cada, foram acondicionadas e mantidas em frascos fechados. Decorrido o período de 1h, os gases foram determinados por cromatografia a gás em coluna HP-Plot Q, utilizando-se os detectores de condutividade térmica (TCD) para CO_2 e de ionização em chamas (FID) para etileno (PURGATTO *et al.*, 2002; ROSSETTO *et al.*, 2003).

As determinações dos teores de carboidratos foram feitas em triplicata. Todos os resultados foram expressos como média mais o erro padrão da média.

5.2 Extração de proteínas de banana.

Cerca de 500 mg de polpa de banana foram homogeneizadas em 2 mL de tampão de extração (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 2 % de SDS e 2-mercaptoetanol a 5 %). A mistura foi aquecida em banho fervente por 10min e então centrifugada por 60min a 3000 x g. O sobrenadante constituiu o extrato total de proteínas.

Para determinação das atividades enzimáticas, cerca de 500 mg de amostra foram homogeneizadas em 2 mL de tampão de extração composto por fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), cisteína 20 mM neutralizada, polivinilpirrolidona (PVP 40.000) a 1 % e benzamidina 1 mM. O homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 40min e o sobrenadante considerado o extrato enzimático bruto.

Os teores de proteína dos extratos foram determinados pelos métodos de Lowry (1951) modificado por Peterson (1977), Bradford (1976) e Henkel e Bieger (1994), tendo BSA como padrão.

5.3 Extração de DNA genômico e RNA total.

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de bananeira pelos métodos descritos por Ausubel *et al.* (1997), Clark (1997) e Dellaporta *et al.* (1983) com modificações (VIEIRA-JUNIOR, 2001).

O RNA total foi extraído da polpa de frutas congeladas através de metodologia descrita por López-Gómes e Gómez-Lim (1992) com modificações (NASCIMENTO, 1997; VIEIRA-JUNIOR, 2001).

5.4 Síntese de cDNA.

A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 10 μ g de RNA total (First-Strand cDNA synthesis Kit, Amersham Biosciences) ou a partir de 5 μ g de RNA total em um volume final de 21 μ L (SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen) utilizando *primers* oligo(dT)₁₂₋₁₈ ou específicos para genes de banana.

5.5 Planejamento dos *primers*.

Foram utilizados *primers* delineados a partir das regiões de consenso dos alinhamentos definidos através do programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997), entre seqüências de DNA dos genes de interesse disponíveis na base dados do GenBank (BENSON *et al.*, 2005) ou a partir do seqüenciamento de clones de genes de banana.

Todos os *primers* foram avaliados quanto ao autopareamento, temperatura de hibridização e formação de dímeros com uso dos programas OLIGO (RYCHLIK *et al.*, 1990), NetPrimer (PREMIER Biosoft International, 2005) e FastPCR (KALENDAR, 2005).

5.6 Amplificação, clonagem e seqüênciamento.

As amplificações do cDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TPE (SAMBROOK *et al.*, 1989), purificados a partir do gel utilizando resina de afinidade (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences), ligados a vetores de clonagem e utilizados para transformação de bactérias quimicamente competentes (CLARK, 1997). A identificação dos clones positivos foi por PCR e seqüênciamento do inserto.

As amostras de DNA clonadas foram seqüenciadas de acordo com o método de Sanger (1977) utilizando didesoxinucleotídeos (ddNTP) marcados com corante fluorescente Cy5. Foram utilizados o seqüenciador automático ALF ExpressII e o kit para seqüênciamento "Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator" (Amersham Biosciences).

5.7 Expressão da α -amilase em sistema heterólogo.

Clones contendo as seqüências completas das ORFs (*open reading frame*) da αamilase (MAmy) e β-amilase (MBmy), foram obtidos utilizando-se PCR com combinações de *primers* delineados a partir das regiões amino-terminal (Nt) e carboxi-terminal (Ct) das seqüências dos seus cDNAs. Clones de ambas enzimas foram utilizados para expressão da proteína recombinante em sistema de expressão procarioto (pCR T7 TOPO TA Expression Kit, Invitrogen) e eucarioto (EasySelect Pichia Expressão e as construções de DNA plasmidial resultantes foram utilizadas para transformação e propagação em bactérias *E. coli* TOP10F'. A correta orientação e seqüência das construções foi verificada por seqüênciamento automático de DNA.

O preparado dos meios de cultura, a manipulação e armazenamento das cepas utilizadas, seguiram as recomendações do fabricante.

5.8 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida.

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida, em sistema de tampão descontínuo, sob condições dissociantes (SDS-PAGE), com base no método de Laemmli (1970), utilizando géis de poliacrilamida a 8% em tampão contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) e SDS 0,1%. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,1%) em solução aquosa de metanol e ácido acético na proporção 5:5:2 e descoradas em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5% (HAMES e RICKWOOD, 1990).

Extratos enzimáticos foram submetidos à eletroforese sob condições nativas (PAGE), como descrito acima, excluindo-se o SDS do preparo dos géis e tampões.

5.9 Atividade de α -amilase e β -amilase.

As atividades α -amilolítica e β -amilolítica foram determinadas utilizado-se, respectivamente, os métodos CERALPHA e BETAMYL (Megazyme) conforme proposto por Bassinello *et al.* (2002). Foram incubados 50 µL de extrato enzimático bruto com 50 µL de substrato específico a 37 °C por 60min ou 30min, para α -amilase e β -amilase respectivamente. Decorrido o tempo de reação, foram adicionados ao meio 750 µL de uma solução de Tris-base a 1 %, procedendo-se à medida da absorbância a 410 nm. A atividade específica foi expressa em função da quantidade de p-nitrofenol liberada pela massa de proteína contida no extrato bruto ao longo do tempo de reação. As

determinações de atividade foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média mais o erro padrão da média.

A atividade hidrolítica em gel foi avaliada em PAGE-substrato (Zeeman *et al.*, 1998) e SDS-PAGE-substrato (Martinéz et al., 2000) utilizando-se amilopectina a 0,1% ou amido a 0,2%, previamente solubilizados por fervura e incorporados ao gel de poliacrilamida como descrito por Vieira-Junior *et al.* (2006). Os géis foram lavados duas vezes por períodos de 15min em 50 mL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), contendo MgCl₂ 1mM, DTT 1mM e CaCl₂ 1mM e deixados incubando no mesmo tampão a 37°C por 6 a 12h sob agitação constante. Após incubação a atividade amilásica foi revelada com solução de iodo (I₂ 10 mM e KI 14 mM) e visualizada como faixas claras no gel corado em azul.

5.10 Preparo de soro antiamilase.

Cerca de 100 µg de proteína recombinante foram homogeneizados em adjuvante completo de *Freund* e a emulsão foi administrada por injeção subcutânea no dorso de coelhos. Esse procedimento foi repetido por duas ou mais vezes utilizando-se adjuvante incompleto, a intervalos de 3 semanas. Uma semana após cada injeção de reforço, foram coletadas amostras de sangue. O soro foi separado por centrifugação a 1000 x g por 2min e testado em ensaios de *Western blot*. O controle negativo das análises consistiu nas amostras de soro obtidas antes da imunização (NASCIMENTO *et al.*, 1997).

5.11 Western blot.

Amostras de proteína total, separadas em PAGE ou SDS-PAGE, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979) em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3). As membranas foram incubadas por 2 horas em tampão TBS (Tris-HCI 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM) contendo 0,02 % de Tween 20 (TTBS) e leite desnatado a 5 % ou caseína a 0,5%, procedendo-se à incubação por 2 horas no mesmo tampão adicionado do antisoro na diluição 1:100. Em seguida foram feitas três lavagens com tampão TTBS, por 10min cada, e a membrana foi incubada por 1h com anticorpo de cabra anti-coelho (Sigma), conjugado com peroxidase (HRP) ou fosfatase alcalina (AP). Após novas lavagens as bandas foram reveladas por incubação em substrato de reação cromogênico (SAMBROOK *et al.*, 1989, AUSUBEL *et al.*, 1997) ou quimioluminescente para a enzima conjugada (ECL, Amersham Biosciences; Lumi-Phos e SuperSignal, Pierce).

5.12 Análise da expressão relativa de genes por qRT-PCR e *real-time* RT-PCR.

Para a análise quantitativa da expressão relativa dos genes da α e β -amilase utilizaram-se dois métodos que empregam a reação em cadeia da polimerase combinada à transcrição reversa ou RT-PCR. A detecção do produto de reação se deu por análise em gel de agarose, para o método conhecido como RT-PCR quantitativa relativa ou qRT-PCR relativa (BURLEIGH, 2001) e por detecção de fluorescência em tempo real produzida a partir do produto da RT-PCR, ou *real-time* RT-PCR (HIGUCHI *et al.*, 1992, 1993; HEID *et al.*, 1996), na qual, há a incorporação do corante fluorescente *SYBR Green I* nas duplas fitas de DNA recém sintetizadas com a concomitante medida da fluorescência emitida pelas mesmas (MORRISON *et al.*, 1998).

As reações de qRT-PCR relativa foram realizadas em um volume final de 20 μL contendo 0,6 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTP 200 μM cada, 240 ng de cDNA, 300 nM do *primer* sentido e 300 nM do *primer* reverso. As condições de amplificação foram: 94°C por 2min seguidos de ciclos de 94°C por 10s, 62°C por 20s e 72°C por 30s, repetidos tantas vezes quanto necessário para cada seqüência da DNA analisada.

Foi utilizado o sistema de *real-time* RT-PCR em dois passos, com duas enzimas em dois diferentes tubos de reação (BUSTIN, 2000, 2002), no qual alíquotas de 0,5 μ L das

amostras de cDNA, equivalentes a transcrição reversa de aproximadamente 120 ng de RNA total, foram amplificadas por PCR utilizando-se "Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG" (Invitrogen) no termociclador "Rotor-Gene 3000 four channel Multiplexing System" (Corbett Research). A quantidade de produto da PCR presente nas amostras a cada ciclo foi medida pela incorporação do fluoróforo *SYBR Green I* durante a etapa de extensão da cadeia de DNA. Foram realizadas três determinações com reações em duplicata, cada reação continha: 0,6 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dGTP 200 µM, dATP 200 µM, dCTP 200 µM, dUTP 200 µM, 0,4 U de UDG, 120 ng de cDNA, 300 nM do *primer* sentido e 300 nM do *primer* reverso em um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: 50°C por 2min, 95°C por 2min seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15s, 63°C por 30s e 72°C por 30s.

6 Resultados e Discussão.

6.1 Perfil de respiração, etileno, carboidratos e atividade enzimática das amostras.

Convencionalmente, as frutas podem ser classificadas em climatéricas e nãoclimatéricas, de acordo com os padrões de respiração e produção de etileno durante o seu amadurecimento. Nos frutos climatéricos, a atividade metabólica intensificada ao longo do processo do amadurecimento, pode ser representada pela intensa respiração das frutas, avaliada pela produção de CO₂ e a presença de um pico na sua liberação, o que geralmente, é acompanhado pelo incremento na produção endógena de etileno, sendo esta uma característica do climatério (BIALE e YOUNG, 1981). Nos frutos climatéricos, pode-se identificar diferentes fases do amadurecimento, antes do seu início, os frutos pré-climatéricos produzem baixos níveis de etileno (sistema 1), evoluindo para o climatério, no qual há aumento nos níveis de produção de etileno (sistema 2) e a regulação da sua produção se torna autocatalítica. Nestes frutos, o etileno está relacionado com importantes mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem ao longo do amadurecimento. Após o estabelecimento do climatério, a produção de etileno diminui significativamente e o fruto evolui para a fase pós-climatérica (GIOVANNONI, 2001). Os frutos não climatéricos, por sua vez, não exibem aumentos significativos nos padrões respiratório e de síntese de etileno, apresentando declínio gradual na respiração ao longo do amadurecimento.

Em frutas climatéricas, como a banana, o etileno desempenha importante função no amadurecimento, período no qual ocorre intensa produção deste hormônio concomitantemente com o climatério respiratório (PURGATTO *et al.*, 2001; PURGATTO *et al.*, 2002; ROSSETTO *et al.*, 2003), podendo a aplicação exógena de etileno, induzir o amadurecimento (CORDENUNSI, 2004). Paralelamente, observa-se a produção de etileno endógeno, que tende a acompanhar o perfil descrito pela respiração (PURGATTO *et al.*, 2001; PURGATTO *et al.*, 2002; ROSSETTO *et al.*, 2003), enquanto o amido acumulado nas bananas ao longo do seu desenvolvimento, que pode chegar a 20% do peso fresco da fruta, é quase totalmente degradado durante o amadurecimento, com subseqüente conversão em açúcares solúveis, principalmente sacarose (AREAS e LAJOLO, 1981; GARCIA e LAJOLO, 1988).

A figura 3 apresenta os resultados obtidos na determinação da liberação de gases CO_2 e etileno, na determinação dos teores de amido e açúcares solúveis e atividade α e β -amilolítica para amostras dos grupos controle e tratadas com 100 ppm de etileno.

Com base nos resultados da figura 3, foram escolhidos cinco pontos representativos de cada grupo, com os quais procedeu-se às determinações dos perfis de expressão da α -amilase e β -amilase, através das análises por *Western blot*, qRT-PCR relativa e *real-time* RT-PCR. Os pontos escolhidos, os quais estão indicados na figura 3C e têm estreita relação com os valores dos teores de amido, foram: 1, 2, 4, 5 e 7 DPC para amostras do grupo tratado e 3, 9, 14, 16 e 18 DPC para o grupo controle, mais o ponto 0 DPC para ambos os grupos.


Figura 3: Perfis metabólicos para frutas utilizadas nos três grupos experimentais. (**A**) Produção de etileno, (**B**) respiração (liberação de CO_2), (**C**) degradação de amido, (**D**) síntese de açúcares (sacarose, glicose e frutose), (**E**) atividade α -amilásica e (**F**) atividade β -amilásica total de bananas dos grupos (**D**) controle e (**•**) tratado com 100 ppm de etileno, ao longo do amadurecimento em dias pós-colheita (DPC). Resultados expressos como média da triplicata de análise mais o erro padrão da média. As setas em **C**, indicam os pontos escolhidos, de cada grupo, para as análises por *Western blot*, qRT-PCR relativa e *real-time* RT-PCR. Os resultados das determinações de gases (**A** e **B**) e carboidratos (**C** e **D**), foram gentilmente cedidos pela professora Beatriz Rosana Cordenunsi e fazem parte da sua tese de Livre-Docência (CORDENUNSI, 2004). Os resultados das determinações das atividades $\alpha \in \beta$ -amilásica total em **E** e **F**, foram gentilmente cedidos pela doutoranda Janaína A. Mainardi.

A ação do etileno e sua correlação com o início do amadurecimento de frutas, descrita na década de 60 por Burg e Burg (1962, 1965, 1967), é hoje um fenômeno bem estabelecido. Em plantas superiores, o etileno é biossintetizado a partir da metionina, em uma via metabólica na qual a ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintase e a ACC oxidase, catalisam as reações da S-adenosilmetionina para ACC e do ACC para etileno (CHANG e BLEECKER, 2004). Contudo, enquanto os mecanismos de ação sobre os diversos processos relacionados ao amadurecimento, ainda não são bem entendidos, a percepção do etileno durante processos de desenvolvimento, germinação de sementes e elongação celular, são objeto de pesquisas correntes em espécies vegetais modelo como *Arabidopsis thaliana*, na qual se descreve uma família de receptores de membrana (CHEN *et al.*, 2005).

A aplicação de etileno exógeno, em bananas pré-climatéricas, induz a biossíntese autocatalítica deste hormônio e acentua o perfil dos eventos relacionados ao amadurecimento (CORDENUNSI, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2006). O pico na liberação CO₂ (figura 3B) foi antecipado do dia 15 DPC, nas frutas do grupo controle, para o dia 4 DPC, nas frutas do grupo tratado e a produção de etileno endógeno (figura 3A), teve seu pico adiantado do dia 14 DPC para o segundo dia pós-colheita, mantendo-se em níveis elevados ao longo de todo o tempo necessário para a degradação do amido. A degradação do amido (figura 3C), em frutas que receberam etileno exógeno, teve início já nas primeiras horas que se sucederam ao tratamento, enquanto no grupo controle, o fenômeno acentuou-se somente após o ponto 14 DPC, o mesmo comportamento pôde ser observado na produção e acúmulo de açúcares (figura 3D). O teor de amido residual nas frutas controle (4,1%), também foi maior que aquele encontrado para frutas tratadas com etileno (1,3%).

A rápida degradação do amido e acúmulo de açúcares nas frutas do grupo tratado, apontam para a diminuição do tempo de vida das mesmas, assim, a senescência ocorre em menos da metade do tempo se comparada a bananas que não receberam o tratamento, de 21 para 9 dias pós-colheita, demonstrando, os efeitos da exposição à sobrecarga do hormônio. Este intenso fluxo de carbono, do amido para açúcares, é uma das mudanças mais significativas ocorridas em bananas ao longo do seu amadurecimento, o qual é depende de um eficiente sistema catalítico, justificando o uso da banana como modelo para estudos de enzimas e fatores de regulação do processo de degradação do amido.

A escolha da metodologia para ensaiar as atividades de α -amilase e β -amilase levou em consideração o fato de que os métodos que empregam substratos cromogênicos, como BPNPG7 e PNPG5, para determinação das atividades α e β amilolíticas, constituem boa alternativa quando se tem extratos protéicos complexos, como os extratos de bananas, tendo boa especificidade de reação (BASSINELLO *et al.*, 2002).

Os ensaios de atividade envolvem a determinação do melhor tempo de incubação, através da construção de uma curva de atividade em função do tempo. Procurando-se acompanhar a cinética de reação ao longo do tempo e sem a necessidade de interrupção pela adição da solução de Tris-base, foi testado um procedimento no qual os ensaios eram feitos em microplacas de 96 celas e o progresso da reação acompanhado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro do tipo multicanal. No entanto, alguns problemas ocorridos ao longo do experimento levaram a descartar este procedimento. O desenvolvimento de cor pelo p-nitrofenol liberado ao longo da degradação do substrato é acentuado em pH alcalino, desta forma, além de interromper a reação, o Tris-base intensifica a coloração do produto da reação de hidrólise do substrato pelas amilases e no caso da cinética em microplacas, este não poderia ser adicionado, já que a reação seria interrompida. É necessária ainda, a determinação da absorbância de um branco de reação, com adição da solução de Tris-base antes da adição do substrato ao meio de reação, para eliminar o efeito da presença de p-nitrofenol livre no substrato, assim, uma vez que a leitura das amostras seria feita sem alteração do pH do meio, poder-se-ia obter valores subestimados para as atividades.

Como demonstrado pelos resultados da figura 3, as atividades α -amilolítica (figura 3E) e β -amilolítica (figura 3F) descrevem um perfil inversamente proporcional ao conteúdo de amido (figura 3C) e diretamente relacionado ao incremento nos teores de

açúcares (figura 3D), como descrito por Nascimento *et al.* (2006), sugerindo relação direta entre o aumento das atividades amilolíticas e a degradação do amido armazenado em bananas.

6.2 Expressão heteróloga das amilases em modelo procarioto.

Para expressão heteróloga foi utilizado o vetor pCR-T7/NT-TOPO, cuja expressão por bactérias *E.coli* BL21(DE3)pLysS resulta em uma proteína que carrega um peptídeo de fusão na porção amino-terminal, o qual, contém uma seqüência de 6 histidinas (6xHis) que possibilita a detecção da proteína recombinante com anticorpo monoclonal antipoli-histidina por *Western blot* ou a sua purificação por cromatografia de afinidade em resina do tipo metal-quelante.

6.2.1 Expressão das ORFs de α -amilase e β -amilase.

A clonagem, transformação e indução da expressão em sistema piloto com o inserto completo da região codificadora ou ORF de clones das enzimas α-amilase (MAmy; Vieira-Junior *et al.*, 2006; número de acesso AF533648) e β-amilase (MBmy; Nascimento *et al.*, 2006; número de acesso DQ166026), obtidas por PCR do cDNA com pares de *primers* específicos para extremidades carboxi-terminal e amino-terminal das proteínas (figura 4, tabela 1), não resultou na produção das proteínas recombinantes (rMAmy e rMBmy) a partir do protocolo padrão para expressão. A eficácia do sistema foi testada utilizando uma construção controle (pCRT7/NT-E3), cujo inserto de quinase humana produziu uma proteína de aproximadamente 58 kDa (figura 5).

Resultado semelhante foi obtido quando se realizou a indução à temperatura de 30 °C. Como demonstrado na figura 5, a presença da proteína recombinante não foi detectada no lisado celular, obtido em condições desnaturantes, ou na fração do meio de cultura (sobrenadante), para bactérias incubadas a 30 °C ou 37 °C. Da mesma forma, Juge *et al.* (1996) relatam o insucesso nas tentativas de obtenção de expressão da α -amilase de cevada em *E. Coli*.

Tabela 1: *Primers* específicos usados nas amplificações das seqüências de cDNAs das amilases de banana para obtenção dos insertos utilizados na expressão heteróloga em bactérias.

<i>Primers</i> α-amilase				
Nome	Seqüência			
alfa-S1	5'-gcc gac atY gtS atY aac ca-3'			
alfa-R9	5'-gtc tgc gca acg atg gtt gat-3'			
alfa-Nt	5'-atg ttt ctg ctt ctg ttt ctt gtc att-3'			
alfa-Ct	5'-tta tct ctt ctc cca cac gca gta gtc-3'			

Primers β-amilase

Nome	Seqüência
beta-S1	5'-gcc ggc ctt cgc ctc cgc gtc tcc c-3'
beta-R2	5'-agg gta acg gag ctc gcc att tgg-3'
beta-R4	5'-gag acg cgg agg cga agg c-3'
beta-Nt2	5'-atg gag gaa gcg gtc gat tca-3'
beta-Ct	5'-tta tgc tga ctg cag ctc tcg gtc att-3'

Códigos ambíguos IUPAC:

Ν	=	qualquer	base	B = C ou G ou $T;$
М	=	A ou C;	S = C ou G;	D = A ou G ou T;
R	=	A ou G;	Y = C ou T;	H = A ou C ou T;
W	=	A ou T;	K = G ou T;	V = A ou C ou G;



Figura 4: Representação esquemática dos sítios de anelamento dos *primers* conforme descrito na tabela 1. Tamanhos em pares de bases para produtos de PCR esperados nas amplificações a partir do cDNA de (**A**) α -amilase (AF533648) e (**B**) β -amilase (DQ166026).



Figura 5: SDS-PAGE, após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, das frações lisado celular ou meio de cultura das expressões piloto das ORFs. (**A**) lisado celular da cultura para expressão da rMAmy induzida a 37 °C, (**B**) lisado celular do controle positivo de expressão quinase humana (E3) induzida a 37 °C, (**C**) lisado celular da expressão da rMAmy a 30 °C e (**D**) meio de cultura da expressão da rMAmy a 30 °C. O padrão de pesos moleculares em kDa esta na linha P, os tempos de indução são indicados pelo número de horas, a letra I indica que foi adicionado o indutor IPTG, o asterisco denota as amostras no tempo 4h da expressão piloto a 37 °C. A região onde se localiza a proteína recombinante esta indicada por uma seta.

6.2.2 Expressão de clones parciais de α -amilase e β -amilase.

Clones parciais da ORF da α-amilase foram obtidos utilizando-se as combinações de *primers* alfa-Ct com alfa-S1 (*MAmyS1*) e alfa-Nt com alfa-R9 (*MamyR9*), segundo a figura 4A. Ambas construções resultaram na expressão da proteína recombinante. A primeira, MAmyS1 (Ala101-Arg416), com 316 aa e peso molecular de ~35 kDa (figura 6A) e a segunda, MAmyR9 (Met1-Asp111), com 111 aa e ~12 kDa (figura 6B).

Utilizando-se as combinações de *primers* de acordo com a figura 4B, foram obtidas as seguintes construções parciais da ORF da β -amilase: *MBmyR4* (beta-Nt2 com beta-R4), *MBmyR2* (beta-Nt2 com beta-R2), *MBmyS1R2* (beta-S1 com beta-R2) e

MBmyS1 (beta-S1 com beta-Ct). Apenas a última construção resultou na expressão de uma proteína recombinante, MBmyS1 (Ala101-Ala484), com 384 aa e peso molecular de ~42 kDa (figura 7).

Após eletroforese e confirmação da expressão das proteínas recombinantes em sistema piloto, as mesmas foram purificadas a partir de um volume de cultura de 50 mL utilizando-se cromatografia com resina de afinidade para poli-histidina (ProBond Resin, Invitrogen). Entretanto, não foi possível a obtenção da proteína MAmyR9 purificada e após sucessivas tentativas de purificação. Foi evidenciado que a cultura de bactérias transformadas com a construção plasmidial aparentemente não estava expressando a proteína recombinante ou estão passou a expressá-la em quantidades muito baixas, mantendo ainda a sua viabilidade em meio de cultura contendo antibiótico. Uma nova transformação com a construção plasmidial *MAmyR9* foi realizada e obteve-se resultado idêntico ao primeiro, não sendo obtida proteína purificada.

Com o objetivo de certificar a presença das proteínas MAmyS1 e MBmyS1 e a ausência de produto de expressão dos clones das ORFs completas de ambas amilases, foi realizado um *Western blot* com anticorpo monoclonal antipoli-histidina conjugado com fosfatase alcalina (Invitrogen), no qual estes resultados se confirmaram.

As soluções de MAmyS1 e MBmyS1 foram dialisadas contra tampão PBS para eliminar a uréia e corrigir o pH do tampão usado na eluição da proteína durante o processo de purificação. Estas proteínas recombinantes foram utilizadas para imunização de coelhos e produção de anti-soro contra α e β -amilase de banana, conforme discutido no item 6.4.2.



Figura 6: **(A)** SDS-PAGE do precipitado de bactérias da expressão piloto de MAmyS1 a 9,0% de acrilamida e **(B)** MAmyR9 a 12,0% de acrilamida após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O padrão de pesos moleculares em kDa esta na linha P, os tempos de indução são indicados pelo número de horas, a letra I indica que foi adicionado o indutor IPTG. A região onde se localiza a proteína recombinante esta indicada por uma seta.



Figura 7: SDS-PAGE a 12% de acrilamida do precipitado de bactérias. Expressão de (**A**) MBmyR2 e MBmyR4 e (**B**) MBmyS1 e MBmyS1R2 após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O padrão de pesos moleculares em kDa esta na linha P, os tempos de indução são indicados pelo número de horas, a letra I indica que foi adicionado o indutor IPTG. A região onde se localiza a proteína recombinante esta indicada por uma seta.

6.3 Expressão heteróloga das amilases em modelo eucarioto.

Os produtos obtidos por amplificação em PCR a partir do cDNA de banana e dos *primers* listados na tabela 2 foram clonados nos vetores pPICZB, pPICZαB e pPICZαC para transformação de leveduras *Pichia pastoris* (EasySelect Pichia Expression kit, Invitrogen) a fim de se obter clones capazes de expressar a proteína recombinante com atividade enzimática. Os *primers* foram delineados de forma a introduzir nas extremidades 5' e 3' das ORFs das amilases, sítios únicos para enzimas de restrição, tornando possível a ligação do inserto ao vetor de expressão de forma direcional, adequada para manutenção do sentido da tradução nas construções de DNA plasmidial. Durante as amplificações por PCR, foi utilizada uma mistura de duas enzimas, *Taq* polimerase e GB-D polimerase (Platinum *Taq* DNA Polymerase HiFi, Invitrogen), cuja atividade conjunta resulta em produto amplificado com maior fidelidade ao DNA molde.

Tabela 2:	<i>Primers</i> específicos usados nas amplificações das seqüências de α e β -amilase
de banana	para clonagem e expressão em leveduras. As regiões em negrito ressaltam os
sítios para	enzimas de restrição, necessários para clonagem nos vetores de expressão e
os segmen	tos sublinhados são as regiões homólogas às ORFs, necessárias para o correto
pareament	o com os cDNAs das enzimas.

Primer	seqüência	Enzima de restrição
ZBalfa-NT-Sfu	gagaga ttcgaa acg <u>atgtttctgcttctgtttct</u>	Sful
$Z\alpha$ Balfa-NT-Pst	gagagag ctgcag ga <u>cagatactcttccagggctt</u>	PstI
Alfa-CT-taa-Xba	ctctctc tctaga aa <u>ttatctcttctcccacacgc</u>	XbaI
Alfa-CT-Xba-6xHis	ctctctc tctaga aa <u>tctcttctcccacacgcagt</u>	Xbal
ZBbeta-NT-Sfu	gagaga ttcgaa acg <u>atggaggaagcggtcgattc</u>	Sful
ZαCbeta-NT-Cla	gagagagc atcg<u>at</u>ggaggaagcggtcgattc	ClaI
Beta-CT-taa-Xba	ctctctc tctaga aa <u>ttatgctgactgcagctctc</u>	XbaI
Beta-CT-Xba-6xHis	ctctctc tctaga aa <u>tgctgactgcagctctcggt</u>	Xbal

6.3.1 Clonagem das ORFs de α e β -amilase para expressão heteróloga.

Com os *primers* listados na tabela 2, foram desenhadas as construções de DNA plasmidial montadas de acordo com as combinações da tabela 3. Pretendeu-se assim, obter clones que expressassem a proteína recombinante na forma intracelular ou secretória, existindo ainda a possibilidade de haver na porção carboxi-terminal, um peptídeo de fusão contendo 6 resíduos de histidina seqüenciais (6xHis), modificação útil para posterior purificação por cromatografia em resina de afinidade do tipo metalquelante.

O sistema de expressão escolhido faz uso de uma levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, capaz de utilizar metanol como fonte de carbono. O primeiro passo na metabolização do metanol é a sua oxidação a formaldeído, usando oxigênio pela enzima álcool oxidase, a qual, por ter baixa afinidade por O₂, é produzida em grandes quantidades pela levedura. O promotor que regula a produção da enzima álcool oxidase (AOX1) e que responde de maneira altamente eficiente à natureza da fonte de carbono, é utilizado para promover a expressão heteróloga na levedura (CREGG *et al.*, 1985; ELLIS *et al.*, 1985; CEREGHINO e CREGG, 2000).

Os produtos de PCR a partir do cDNA de banana com as combinações *primers* listados na tabela 3, foram purificados a partir do gel de agarose (figura 8), submetidos à digestão por um período de 6h com cada uma das enzimas de restrição conforme a tabela 2 e então, clonados em três diferentes vetores, previamente linearizados por dupla digestão com o mesmo conjunto de enzimas de restrição do inserto e com suas extremidades 5' desfosforiladas, procurando desta forma, manter a coesividade das extremidades e a orientação das seqüências de DNA clonadas.

Obtiveram-se 8 construções de DNA plasmidial, sendo 4 plasmídios para α amilase e 4 para β -amilase, os quais, foram linearizados com a enzima de restrição *Pme*I (digestão por 8h) para subseqüente transformação de leveduras *Pichia pastoris* GS115 tornadas quimicamente competentes pelo método *Pichia* EasyComp (Invitrogen).

Tabela 3: Construções de DNA plasmidial para α -amilase e para β -amilase.

Enzima: α-amilase					
Construção	Primer sentido	Primer reverso	vetor	Tipo de expressão	Modificação carboxi-terminal
MAmy1	ZBalfa-NT-Sfu	alfa-CT-taa-Xba	pPICZB	intracelular	Códon terminal
MAmy2	ZBalfa-NT-Sfu	alfa-CT-Xba-6xHis	pPICZB	intracelular	Poli-histidina
MAmy3	$Z\alpha$ Balfa-NT-Pst	alfa-CT-taa-Xba	pPICZαB	extracelular	Códon terminal
MAmy4	$Z\alpha$ Balfa-NT-Pst	alfa-CT-Xba-6xHis	pPICZαB	extracelular	Poli-histidina
Enzima: β-a	amilase				
Construção	Primer sentido	Primer reverso	vetor	Tipo de expressão	Modificação carboxi-terminal
MBmy1	ZBbeta-NT-Sfu	beta-CT-taa-Xba	pPICZB	intracelular	Códon terminal
MBmy2	ZBbeta-NT-Sfu	beta-CT-Xba-6xHis	pPICZB	intracelular	Poli-histidina
MBmy3	$Z\alpha Cbeta-NT-Cla$	beta-CT-taa-Xba	pPICZαC	extracelular	Códon terminal
MBmy4	ZαCbeta-NT-Cla	beta-CT-Xba-6xHis	pPICZαC	extracelular	Poli-histidina



Figura 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para amilases. $\alpha 1$ a $\alpha 4$ se referem aos insertos das construções *MAmy1* a *MAmy4* para α -amilase e $\beta 1$ a $\beta 4$ se referem aos insertos das construções *MBmy1* a *MBmy4* para β -amilase, listadas na tabela 3. P indica padrão de pesos moleculares "PCR marker" (Sigma).

Foram utilizados 3 µg de cada construção linearizada para transformação de alíquotas de 50 µL de leveduras quimicamente competentes. Como controle positivo de transformação e negativo de expressão foram utilizados os três vetores (pPICZB, pPICZ α B e pPICZ α C) linearizados e sob as mesmas condições de manipulação que as construções obtidas. A utilização da construção de DNA plasmidial na forma linear procurou estimular a integração por recombinação homóloga entre as regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene *AOX1* do genoma da levedura e de cada construção utilizada (CREGG *et al.*, 1985; ELLIS *et al.*, 1985; CEREGHINO e CREGG, 2000).

Após a transformação, as culturas de leveduras foram plaqueadas em meio YPDS contendo 100 μg/mL de zeocina e incubadas em estufa a 28-30 °C por 3 a 4 dias. Obteve-se um número variado de colônias para cada transformação, exceto para as construções *MAmy2* e *MBmy2*, que não apresentaram colônias. A integração das construções e dos vetores foi testada por PCR das colônias utilizando *primers* flanqueadores das regiões 5' e 3' do gene *AOX1* (BURDYCHOVA *et al.*, 2002; ASCACIO-MARTINEZ e BARRERA-SALDANA, 2004).

6.3.2 Expressão da proteína recombinante e ensaio enzimático.

Duas colônias de leveduras transformantes, selecionadas de placas YPDS/Zeocina e cuja presença do inserto pôde ser confirmada por PCR, foram utilizadas para proceder à indução da expressão da proteína recombinante e seleção de clones transformantes para ensaio funcional da atividade enzimática. Estas foram inoculadas em meio BMGY e incubadas em banho a 30 °C por 18h sob agitação constante.

A biomassa de leveduras foi coletada por centrifugação a 2000 x g por 5min e ressuspendida em um volume de 25 mL do meio de indução da expressão BMMY. As culturas foram incubadas em banho a 30 °C sob agitação constante e amostras foram coletadas periodicamente durante 4 dias a intervalos de 6-12h a fim de avaliar o nível de expressão e o tempo necessário para obtenção de quantidade satisfatória de proteína. De

posse das alíquotas coletadas em cada ponto, procedeu-se ao seu fracionamento, por centrifugação, nas porções precipitado celular e meio de cultura, para posterior identificação da expressão intracelular ou secretória por SDS-PAGE e *Western blot* com soros anti-amilase de banana.

Foram identificados dois clones com reatividade aos soros anti-amilase, MAmy1-2, transformado com a construção *MAmy1* e MBmy4-2, transformado com *MBmy4* (figura 9). Estes clones foram reinoculados em meio BMGY a fim de produzir a biomassa de leveduras necessária para o ensaio funcional da atividade amilásica. Foram utilizados 60 mL de meio BMMY, aos quais foram adicionados a cada 24h, 250 μL de metanol, durante três dias. Foram utilizados como controle negativo de expressão os clones transformados com os respectivos vetores de cada construção, pPICZB para MAmy1-2 e pPICZαC para MBmy4-2.



Figura 9: *Western blotting* contra clones de amilases de banana em *Pichia pastoris* com soros (**A**) anti-MAmyS1 e (**B**) anti-MBmyS1. Os números 1, 3, 5 e 7 indicam os pontos de amostragem em 6, 25, 52 e 91h de indução; P corresponde à fração do precipitado celular, M ao meio de cultura e RW ao padrão de pesos moleculares em kDa, a seta indica a posição esperada para a banda de proteína reativa ao antisoro.

Cada cultura foi fracionada, por centrifugação, nas porções precipitado celular e meio de cultura. A partir do precipitado foi preparado um lisado celular, segundo recomendações do fabricante, que deveria conter a proteína expressa na forma intracelular enquanto que a expressão secretória deveria ser identificada no meio de cultura. No caso específico da construção MAmy1-2, o inserto clonado corresponde à ORF completa da enzima α -amilase descrita por Vieira-Junior (2001), sendo assim, ele carrega um provável peptídeo de trânsito, que, se processado eficientemente pela levedura, deveria promover a exportação da proteína recombinante para fora da célula. A porção do meio de cultura foi submetida à precipitação fracionada com sulfato de amônio (DAWSON, 1995) em três faixas de concentração do sal, 1: 0 a 30%, 2: 30 a 70% e 3: 70 a 100%. Cada um dos três precipitados foi retomado em tampão Hepes-NaOH (20 mM, pH 7,0) contendo 10 mM de cisteína, 1mM de CaCl₂ e 1mM de benzamidina e colocados para dialisar contra o mesmo tampão. As frações do lisado celular e precipitados do meio de cultura foram utilizadas para ensaiar a atividade em gel por PAGE-substrato (figura 10).



Figura 10: Ensaio da atividade enzimática de clones de α e β -amilase de banana em *Pichia pastoris*. Atividade amilolítica em gel (indicada pelas setas) dos clones (**A**) MAmy1-2 e (**B**) MBmy4-2. LC corresponde ao lisado celular, 30, 70 e 100 são as faixas de concentração de sulfato de amônio e Z indica o controle negativo de expressão.

O clone MAmy1-2 apresentou boa atividade amilolítica, quando comparada àquela verificada para o clone MBmy4-2, a qual foi bastante superior a atividade amilolítica endógena da levedura, conforme a figura 10. Nota-se ainda que, houve atividade também nas frações do precipitado do meio de cultura, principalmente na faixa de 30 a 70% de saturação em sulfato de amônio. Tal atividade pode ser atribuída à enzima presente no meio extracelular devido ao processamento pós-tradução das amilases. Este resultado, confirma a hipótese da presença de um peptídeo de trânsito no clone de α -amilase de banana descrito por Vieira-Junior (2001), verificada apenas através de ferramentas e modelos de bioinformática. Como exposto anteriormente, o clone MBmy4-

2 apresentou maior atividade amilolítica, que se deveu principalmente à proteína recombinante expressa de forma intracelular. A inserção da ORF da β -amilase em tandem com a seqüência sinal fator- α , um eficiente peptídeo de transito nativo do *Saccharomyces cerevisiae*, levou o produto da expressão da construção a ser exportado em boa quantidade, o que, concorda com o perfil de expressão esperado para o clone MAmy1-2 e portanto, pode ser atribuído às condições de cultivo da levedura e indução da expressão.

O conjunto dos resultados de expressão dos clones MAmy1-2 e MBmy4-2, confirma a identidade das seqüências clonadas como enzimas amilolíticas, uma vez que a intensa hidrólise da amilopectina é vista nas culturas transformadas com as construções *MAmy1* e *MBmy4*, mas não nas culturas transformadas com os respectivos vectores, pPICZB e pPICZ α C. O correto processamento da rMAmy pela *P. pastoris* indica que esta pode ser direcionada para o meio extracelular ou para plastídeos em células da polpa de banana. Como observado por Chen *et al.* (2004), a α -amilase do arroz pode ser direcionada para o meio extracelular ou para plastídeos, dependendo da situação fisiológica, pela presença de um peptídeo sinal bi-funcional; o mesmo poderia ocorrer na banana. Conforme discutido por Vieira-Junior *et al.* (2006), uma α -amilase extracelular indicaria que a enzima e o substrato estão em células diferentes, assim, o acesso ao substrato dependeria da descompartimentalização do amido, como não existem evidências a respeito da perda de integridade pelas células da polpa de banana ao longo do amadurecimento, é provável que, o peptídeo sinal direcione a α -amilase para o amiloplasto.

6.4 *Western blot* com soros anti-amilases de banana.

6.4.1 Extração de proteínas totais da polpa de banana.

Foram feitas diversas tentativas de extração das proteínas totais de bananas na proporção de 0,5 g de polpa para 1,0 mL de tampão de extração (1:2), sempre com geleificação nas amostras verdes devido ao seu alto conteúdo de amido e presença de pectina. Tentou-se variar a proporção para 1:4, no entanto, o mesmo comportamento ainda foi observado. Um procedimento alternativo, invertendo-se a ordem das etapas de aquecimento e centrifugação, resultou na alteração do perfil de proteínas quando separadas por SDS-PAGE, fato que se deve à não extração de proteínas aderidas aos grânulos de amido bem como daquelas constituintes de membranas (figura 11), denotando as dificuldades relativas à extração de proteínas de polpas de frutas, comentadas recentemente por Carpentier *et al.* (2005), que descreve a extração de proteínas a partir de tecidos recalcitrantes, como a banana. Assim sendo, optou-se pela utilização da proporção entre polpa e tampão na razão de 1:4.



Figura 11: SDS-PAGE a 8,0% de acrilamida dos extratos totais de proteínas de bananas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Extrato de amostras fervidas após centrifugação a 3000 x g (**A**). Extrato de amostras fervidas antes da centrifugação a 3000 x g (**B**). O padrão de pesos moleculares em kDa está na linha P. Os números de 3 a 18, no lado esquerdo de cada figura, se referem aos dias pós-colheita das amostras controle e os números de 0 a 7, no lado direito, das amostras tratadas com etileno.

6.4.2 *Western blot* com soro anti-MAmyS1 e anti-MBmyS1.

A fim de descrever o comportamento da α e β -amilase, ao longo do amadurecimento da banana, foram produzidos e ensaiados os soros obtidos pela imunização de coelhos com as proteínas recombinantes MAmyS1 e MBmyS1, obtidas pela expressão de clones parciais de α -amilase e β -amilase de banana, descrita no item 6.2.2., contra extratos de proteínas de polpa de bananas dos grupos controle e submetido a tratamento com etileno, em vários estágios de amadurecimento, de acordo com os perfis de atividade enzimática, carboidratos, liberação de CO₂ e etileno relacionados na figura 3.

A reatividade do antisoro às proteínas recombinantes foi boa, diluições da ordem de 1:2000 produziram bandas intensas contra quantidades reduzidas proteína, cerca de 10 ng. Por outro lado, houve divergência entre os resultados nos ensaios com as proteínas recombinantes ou com o extrato total de proteínas de banana, não sendo verificada, neste último caso, a mesma reatividade para aos antisoros. Pode-se supor, que tal fato deveu-se ao antígeno utilizado nas imunizações dos coelhos. Durante a purificação da proteína recombinante utilizando-se cromatografia de afinidade para polihistidina (ProBond Resin; Invitrogen), foram empregadas soluções contendo altas concentrações de cloreto de guanidina (6 M) e uréia (8 M). Neste meio, as proteínas podem vir a sofrer modificações químicas, resultando em alterações na conformação ou características moleculares dos resíduos de aminoácidos. Desta forma, os anticorpos reconhecem bem as proteínas recombinantes, já que são os antígenos que lhes deram origem, enquanto as proteínas da banana teriam baixa antigenicidade. Trabalhos anteriores, que obtiveram bons resultados no título dos soros contra proteínas de banana, utilizaram como antígenos para imunização de coelhos amostras obtidas a partir de géis nativos com extratos purificados de proteínas da própria banana (NASCIMENTO et al., 1997; MOTA et al., 2002).

Tentou-se ainda, fracionar o antisoro com base no método descrito por Mckinney e Parkinson (1987), no qual a porção IgG das proteínas do soro sangüíneo é precipitada e ressuspendida em tampão para minimizar a interferência de outras proteínas constituintes do sangue dos coelhos, porém isto não resultou em melhora nos ensaios de *Western blot*.

Visando contornar os problemas descritos, foram feitas novas imunizações, utilizando-se para tal, outros animais e proteínas recombinantes separadas por SDS-PAGE unicamente, tentando assim, minimizar as etapas de manipulação do antígeno. Conforme apresentado na figura 12, os extratos totais de *E. coli* foram separados por eletroforese e corados. A região correspondente às proteínas recombinantes MAmyS1 e MBmyS1 foi recortada, homogeneizada com adjuvante de *Freund* e utilizada para imunização de coelhos.

A partir da primeira dose de reforço com os antígenos, foram coletadas amostras do soro dos coelhos, estes foram utilizados em *Western blot* para avaliar sua reatividade.

A reatividade do soro anti-MAmyS1, obtido com a imunização de coelhos utilizadose a proteína MAmyS1 purificada a partir do SDS-PAGE, não permitiu identificar a presença da proteína em qualquer um dos extratos. Neste caso, os resultados foram de qualidade inferior se comparados aos obtidos com o soro do coelho imunizado com a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade (figura 13A). Este resultado sugere a hipótese de que os fragmentos da proteína não foram suficientemente antigênicos para a produção do antisoro.

O soro anti-MBmyS1 apresentou boa reatividade (figura 13B), reconhecendo bandas distintas atribuídas à reação específica com a enzima β -amilase, a reação foi mais intensa nas proteínas da banana comercial, que pode ser atribuída às diferenças no manuseio da cultura e pós-colheita. Houve reação também nas proteínas do amido de banana, indicando a presença da β -amilase no grânulo, este foi extraído da polpa de frutas verdes e se comparada com a reação das amostras 0 e 1, pode-se supor que, pelo menos na fruta verde, ela se deve às proteínas aderidas ao grânulo.



Figura 12: SDS-PAGE a 7,5% de acrilamida do precipitado de bactérias. (**A**) Indução da expressão da MBmyS1 com IPTG 0,8 mM e incubação a 37°C por 5h, após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. (**B**) Gel após excisão da faixa correspondente à proteína super-expressa. A mesma abordagem foi usada para obtenção da proteína MAmyS1.



Figura 13: *Western blotting* com soros (**A**) anti-MAmyS1 e (**B**) anti-MBmyS1. Foram utilizados ~50 μ g de proteínas totais de polpa de bananas e do amido isolado da polpa de banana verde e diluições do antisoro a 1:100. 1 a 7: bananas tratadas com 100ppm de etileno; AM: amido de banana; BN: banana madura obtida em mercado; RW: padrão de pesos moleculares *RAINBOW* em kDa.

Como o sistema de expressão utilizado não permitiu a obtenção de produtos a partir dos clones completos das amilases, poder-se-iam utilizar outros vetores e outras cepas de bactérias ou ainda o produto da expressão em leveduras. Neste último caso, vale ressaltar que a quantidade de proteína que se obtém é várias vezes menor quando comparada com a expressão em bactérias e que leveduras produzem proteínas recombinantes altamente glicosiladas, de forma que, o uso da expressão em levedura poderia acrescentar novas dificuldades para a produção dos antisoros.

Houve também diferenças nos resultados obtidos com membranas de nitrocelulose de diferentes fornecedores (Hybond-C extra e Hybond ECL, Amersham Biosciences; Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad) e quando submetidas à etetrotransferência por 15h a 30 V ou 1h a 100 V, sendo que estas diferenças estavam relacionadas à intensidade das bandas e à presença de manchas na superfície da membrana após revelação com substrato cromogênico ou quimioluminescente, porém não foi possível estabelecer quais as melhores condições de ensaio para maximizar a intensidade da detecção das proteínas.

O soro anti-MAmyS1 foi ensaiado contra cerca de 100 μg de extrato protéico total de polpa de bananas, amostradas em vários estágios do amadurecimento sob condições controle e no tratamento com etileno. Foi utilizado o anticorpo secundário conjugado com HRP na diluição 1:8.000. Os resultados obtidos após incubação com substrato quimioluminescente ECL (Amersham) podem ser vistos na figura 14, demonstrando a reação do antisoro com uma única faixa de proteínas de aproximadamente 45 kDa. Nas amostras controle (figura 14A), a quantidade de proteína reativa ao antisoro decresceu após o ponto 9 DPC, sendo este, o ponto com maior intensidade na reação ao longo do amadurecimento da banana. Os resultados obtidos com 100 μg de proteínas das amostras do grupo tratado com etileno (figura 14B) reproduzem o observado na figura 13A, não sendo observada a reação com qualquer proteína.

Os ensaios com o soro anti-MBmyS1 foram realizados contra cerca de 50 μ g de extrato protéico, sendo utilizadas amostras de polpa de frutas tratadas e controle. Para o *Western blot* com amostras tratadas com etileno (figura 14E) foi utilizado anticorpo secundário conjugado com AP na diluição 1:30.000, este foi revelado por incubação com substrato cromogênico Lumi-Phos (Pierce); para as amostras controle (figura 14D) as condições de incubação e revelação foram iguais às descritas para a α -amilase. A reação do soro anti-MBmyS1, à semelhança do soro anti-MAmyS1, foi com uma única faixa de proteínas, com peso molecular de aproximadamente 52 kDa, concordante com o valor estimado a partir da tradução do clone de cDNA. A expressão da β -amilase foi induzida pelo tratamento com etileno, sendo a proteína detectada a partir do primeiro dia pós-colheita, enquanto que sob condições controle a indução da expressão da proteína pode ser notada após o ponto 14 DPC.



Figura 14: *Western blotting* com soros anti-amilase contra proteínas de bananas. (**A**) Anti-MAmyS1 contra 100 μ g de proteínas totais de polpa da fruta controle e (**B**) tratadas com etileno. (**C**) Anti-MBmyS1 contra 50 μ g de proteínas de frutas controle e (**D**) tratadas com etileno. Os números das amostras se referem aos dias pós-colheita. RW: padrão de pesos moleculares *RAINBOW* em kDa. A seta indica a posição esperada para a banda de proteína reativa ao antisoro.

6.5 Expressão relativa dos genes da α e β -amilase.

A identificação de transcritos relacionados ao amadurecimento, a obtenção de informações sobre a abundância e o padrão de expressão temporal e espacial de genes na polpa da fruta se faz necessária para promover uma abordagem molecular sobre os processos relacionados ao aumento na degradação do amido e síntese de açúcares dentre outros envolvidos no início do climatério e fisiologia pós-colheita da banana (MEDINA-SUAREZ *et al.* 1997).

O estudo da expressão de genes em frutas através da análise *northern blot*, pode ser problemático se o gene em estudo tiver baixo nível de expressão nos tecidos, como a α-amilase de banana, por exemplo, que não apresentou níveis de transcrito detectáveis em *northern blotting* (VIEIRA-JUNIOR, 2001). A técnica da reação em cadeia da polimerase combinada à transcrição reversa (RT-PCR), torna-se nestes casos, um caminho para contornar o problema, uma vez que a molécula de RNA alvo, após ser reversamente transcrita em DNA complementar, pode passar pelo número de ciclos de amplificação necessários para a sua detecção. A RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), é um procedimento no qual o número absoluto de cópias da molécula do RNA alvo é determinado, requerendo medidas precisas de uma curva de calibração externa para o gene. Em contraste, a qRT-PCR relativa, determina a expressão de um gene alvo em relação a um gene expresso de maneira constitutiva, em reações realizadas em condições não limitantes (BURLEIGH, 2001).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real ou *real-time* RT-PCR, consiste em uma técnica de alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e ampla faixa de detecção e quantificação de mRNA derivada das técnicas de qRT-PCR e qRT-PCR relativa. Higuchi *et al.* (1992, 1993) propuseram a quantificação do DNA amplificado durante o curso da reação monitorando com uma câmera de vídeo o aumento na fluorescência obtida pela adição de brometo de etídio ao tubo de reação e sua ligação à dupla fita de DNA, sendo a cinética do aumento da fluorescência diretamente relacionada ao número de cópias de DNA inicial. Heid *et al.* (1996) modificaram o método utilizando não o brometo de etídio, mas sim, um sonda duplamente marcada com fluoróforos capaz de se ligar especificamente ao DNA recém sintetizado, método conhecido com *TaqMan*. Posteriormente, introduziu-se a utilização do *SYBR Green I*, um novo corante com maior seletividade pela ligação a duplas fitas de DNA (MORRISON *et al.*, 1998), constituindo-se numa alternativa ao *TaqMan*, mais simples e genérica.

Em ambas as técnicas utilizadas, qRT-PCR relativa e real-time RT-PCR, a quantificação da expressão do gene alvo é medida tomando-se como referência, um gene endógeno, o qual deve ser expresso em quantidades equivalentes ao longo de todo o período de amostragem experimental. O uso de um gene, conhecido como constitutivo, procura minimizar as diferenças nas quantidades de RNA utilizadas na transcrição reversa, as quais podem variar por influência do tratamento experimental ou por diferentes eficiências de extração, bem como as variações que possam ocorrer durante cada reação e em cada tudo de reação (SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000). Um grupo restrito de genes constitutivos vem sendo utilizado para normalização da expressão de outros genes, este grupo inclui os genes da β -actina, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tubulina, ciclofilina, ubiquitina e o RNA ribossomal 18S. Todavia, nada garante que o tratamento experimental não vá afetar a expressão de um potencial gene constitutivo, sendo necessário que se faça um estudo individual para cada candidato a controle interno ao longo do modelo experimental (BUSTIN, 2000; 2002). Para estudo da expressão relativa dos genes da α e β -amilase, foram escolhidos para normalização, os genes da β -actina de banana (números de acesso AF246288 e AB022041) e GAPDH.

6.5.1 Clonagem de um gene da GAPDH de banana.

Para utilizar o transcrito do gene da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) como padrão interno para normalização da expressão dos genes alvo, foi feita a clonagem do seu cDNA, utilizando-se um par de *primers* desenhado a partir do consenso entre seqüências de arroz, cevada, milho e trigo (tabela 4).

O produto amplificado por PCR a partir do par de *primers* proposto e do cDNA da banana foi clonado e seqüenciado, revelando um clone de 993 pares de bases, semelhante em pelo menos 80% com as seqüências listadas na tabela 4, mostrando ser um transcrito bastante conservado. A seqüência de GAPDH de banana foi submetida ao GenBank, recebendo o número de acesso AY821550. Esta foi então utilizada para delineamento de novos *primers* a serem utilizados nas reações de RT-PCR.

Tabela 4: Alinhamento e consenso entre seqüências de arroz (AK071097, AK103777, U31676), cevada (X60343), milho (U45856, U45855, X07156) e trigo (AF273738). A numeração se refere à posição das bases na seqüência consenso. Em negrito a região delimitada para os *primers*

Número de acesso	Região do alinhamento utilizada para desenho dos primers		
	80 132	3	
AK071097	TCCACTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
AK103777	TCCACTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
U31676	TCCACTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
X60343	TCCTTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
U45856	TC-ACCCTCATGGC CAAGATCAAGATCGGGATCAA TGGGTTTGGCAGGATCG		
U45855	TCGCCAGCCATGGG CAAGATCAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
X07156	TCGCCAGTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGCTTCGGAAGGATCG		
AF273738	TCC-CTCGCCATGGG CAAGATTAAGATCGGAATCAA CGGTTTCGGAAGGATCG		
Consenso	TCcaCabtCGCCATGGg CAAGATtAAGATCGGaATCAA cGGtTTcGGaAGGATCG		
Primer musa-gap	Primer musa-gapdh-sense 5'-caagattaagatcggaatcaa-3'		
	1055 1104		
AK071097	ACAGCAACCGTGTCA TCGACCTGATCCGCCACATG GCCAAGACCCAGTAG		
AK103777	ACAGCAACCGTGTCA TCGACCTGATCCGCCACATG GCCAAGACCCAGTAG		
U31676	ACAGCAACCGTGTCA TCGACCTGATCCGCCACATG GCCAAGACCCAGTAG		
X60343	ACAGCAACCGTGTTG TCGACCTGATCCGCCACATG GCCAAGACCCAGTAG		
U45856	ACAGCACCCGAGTGG TCGACCTGATCCGCCACATG AACAGCACCAAGTAA		
U45855	ACAGCAACCGCGTCG TCGACCTGATCCGCCACATG TTCAAGACCCAGTAG		
X07156	ACAGCAACCGCGTCG TCGACCTGATCCGCCACATG TTCAAGTCCCAGTAG		
AF273738			
Consenso	ACAGCAaCCGtGTcg TCGACCTGATCCGCCACATG gcCAagaCCcAGTAg		
Primer musa-gap	odh-reverso 5'-catgtggcggatcaggtcga-3'		

6.5.2 Eficiência da amplificação e quantificação por RT-PCR em tempo real.

Para evitar que uma provável contaminação das amostras de cDNA com DNA genômico resulte em interferência nos resultados de quantificação, oriunda esta, da coamplificação do contaminante, pares de *primers* específicos para amplificação e quantificação por RT-PCR foram desenhados a partir de regiões de exons que intercalados por um ou mais introns, de forma a previr a amplificação de DNA genômico, que geraria um produto mais extenso. Durante a etapa de extensão no programa de PCR utilizado, procurou-se também, restringir o tamanho do *amplicon*, uma vez que, a reação de amplificação de seqüências acima de 400 pares de bases, nestas condições, deve ser desfavorável (KARSAI *et al.*, 2002). Na hipótese de haver co-amplificação de DNA genômico, ou *Tm*, do DNA amplificado, que para um produto mais extenso, deve ser superior àquela para o produto esperado.

Os *primers* da tabela 5, foram delineados com base em seqüências de cDNA e DNA genômico para os genes das enzimas analisadas, observando-se as junções exonintron. Apesar de não haver informação sobre qualquer clone de DNA genômico de GAPDH de banana, a seqüência do cDNA foi comparada com genes de outras monocotiledôneas, para que se pudesse avaliar a disposição dos *primers* descritos.

Foram feitas extrações de RNA total e a qualidade e quantificação dos RNA foi verificada por eletroforese das amostras em gel de agarose, observando-se a presença e a intensidade de bandas correspondentes às frações 28S e 18S dos RNA ribossomais (figura 15). Para a subseqüente síntese da primeira fita de cDNA a partir das amostras de RNA total, utilizaram-se dois lotes distintos de reagentes, dando origem a dois lotes de cDNA, os quais, foram unidos posteriormente aos pares com o objetivo de minimizar as variações individuais das reações de transcrição reversa.

Gene	primer	seqüência	Produto (pb)	
β -actina	rt-sentido	caggetgteeteteetttat	209	
	rt-reverso	gctcagcactggttgtgaagg	205	
САРДН	rt-sentido	caaccaactgtcttgctcctc	209	
	rt-reverso	ggaaggacctttccaacagcc		
	rt-sentido	cagatactcttccagggcttc	225	
a	rt-reverso	ccgatcagcgccttcaactca		
α-amilase	rt-sentido2	ctgatatagccaacgctggag		
	rt-reverso2	gcttgtctgcgcaacgatggt	213	
β-amilase	rt-sentido	atggagtcgaactccccatct	216	
	rt-reverso	gccggcgcggtcagtgaatag		
	rt-sentido2	gatggaagcctacgaggagtt 215		
	rt-reverso2	ctccgcgtgtcgtttgagatc		

Tabela 5: *Primers* específicos usados nas amplificações das seqüências de β -actina, GAPDH e de α e β -amilase de banana nas reações de PCR em tempo real.



Figura 15: Eletroforese em gel de agarose com amostras de RNA total de polpa de banana. CT3 a CT18, amostras do grupo controle; ET1 a ET7, grupo tratado com etileno. Foram aplicadas amostras com 1 μ g de RNA total.

Duas estratégias que podem ser utilizadas na detecção e quantificação dos níveis de expressão de um gene por real-time RT-PCR. A primeira, consiste na quantificação absoluta do número de cópias de DNA, contido em cada tubo de reação, por comparação com os dados de uma curva padrão. Em uma outra abordagem, a quantificação é baseada na razão da expressão de um gene alvo por um gene de referência, conhecida como quantificação ou expressão relativa, na qual, o resultado é dado por um valor arbitrário e não pelo número exato de cópias inicias. A expressão relativa é adequada para a maioria dos casos nos quais se deseja apenas verificar mudanças biológicas nos níveis de expressão de certos genes, todavia, os resultados são inteiramente dependentes do método de normalização e do gene de referência escolhido; um gene de referência deve ser expresso em níveis constantes em diferentes tecidos e órgãos, em todos os estágios de desenvolvimento e mostrar-se estável ao tratamento experimental. Ambas estratégias pressupõem a determinação de um valor para o limiar da detecção ou threshold cycle (Ct), cujo conceito representa a base da exatidão e reprodutibilidade da quantificação por real-time RT-PCR. O valor da fluorescência em Ct é definido como o ponto em que o sinal de detecção assume valores superiores ao ruído de fundo da reação, o que ocorre durante a fase de amplificação exponencial (FREEMAN et al., 1999; BUSTIN, 2000; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

Alguns modelos matemáticos para quantificação relativa da expressão já foram propostos, os quais podem utilizar ou não da correção da eficiência para a PCR. A medida da eficiência da PCR é dada pela equação: $E = 10^{(-1/a)}$; na qual "a" representa a inclinação de uma curva padrão, construída a partir de diluições de uma amostra com concentração conhecida, em número de cópias ou em massa de DNA, e os valores de Ct para cada ponto. A eficiência "E", pode assumir valores de 1, para amplificação nula, à 2, para amplificação máxima (BUSTIN, 2000; RASMUSSEN, 2005).

No presente trabalho optou-se pela quantificação relativa da expressão e para tanto, foram utilizados dois modelos matemáticos. O primeiro, proposto por Livak e Schmittgen (2001), assume a eficiência da reação igual a 2 (máxima amplificação), enquanto o segundo, proposto por Pfaffl (2001), utiliza da correção da amplificação pela eficiência calculada para cada produto da PCR. Quando possível, procurou-se comparar os resultados obtidos em ambos os modelos matemáticos, com resultados de *northern blotting*, com o intuído de verificar a qualidade dos resultados.

Utilizando-se o termociclador com programação a seguir, foram obtidas as curvas para determinação do limite de detecção dos transcritos e da eficiência das amplificações, para cada um dos genes analisados utilizaram-se quatro quantidades de cDNA: 120, 12, 1,2 e 0,12 ng, exceto para α -amilase, cujas quantidades foram: 240, 120, 60 e 12 ng. Para cada conjunto de reações foi montado um controle negativo, o qual continha todos os reagentes exceto o cDNA (NTC). Para a análise da expressão da α -amilase, foi utilizada a combinação de primers rt-sentido com rt-reverso, com melhor resultado de amplificação, para a β -amilase, a combinação escolhida foi rt-sentido2 com rt-reverso2. Nas figuras 16 e 17, estão representados os resultados das etapas de determinação da eficiência e do limite de detecção dos transcritos e especificidade da reação.

1 ciclo	Ativação da enzima UDG	50 °C	2min
1 ciclo	Ativação da Taq e inativação da UDG	95 °C	2min
45 ciclos	Desnaturação das duplas fitas	95 °C	15s
	Pareamento dos primers	63 °C	30s
	Extensão das fitas	72 °C	30s
1 ciclo	Curva de fusão dos produtos amplificados	72 a 99 °C	



Figura 16: Curvas padrão para determinação do limite de detecção e da eficiência das amplificações. Cada ponto representa a média de 6 valores de Ct mais seu desvio padrão. A equação da linha de tendência foi calculada para obtenção do valor da inclinação da reta e cálculo da respectiva eficiência.



Figura 17: Curvas típicas obtidas em *realt-time* RT-PCR para determinação da eficiência das amplificações e ponto de fusão (Tm) do *amplicon*. O controle negativo corresponde à curva NTC (*no template control*). Curvas de quantificação para (**A**) actina, (**C**) GAPDH, (**E**) α -amilase e (**G**) β -amilase. Curvas de fusão do *amplicon* para (**B**) β -actina, (**D**) GAPDH, (**F**) α -amilase e (**H**) β -amilase.

6.5.2.1 Quantificação da expressão relativa: modelo AACt.

Livak e Schmittgen (2001), analisam o modelo matemático descrito pela "Applied Biosystems" (User Bulletin #2, P/N 4303859B, 2001). Neste modelo, representado como 2^{-ΔΔCt}, os dados informam o incremento na expressão de um gene, normalizado por um gene de referência endógena e relativos a um controle sem tratamento experimental, podendo ser utilizado também, para avaliar o curso da expressão de um gene, no qual o calibrador é representado pelas amostras do transcrito expressas no ponto zero, cuja grandeza média da variação na expressão é próxima a 1.

Neste modelo, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo}-Ct_{ref.})_{tempo X} - (Ct_{alvo}-Ct_{ref.})_{tempo 0}$, o tempo "X" é qualquer ponto ao longo da amostragem e o tempo 0, representa a expressão no início do experimento. A eficiência da amplificação neste caso, é admitida como sendo igual a 2, ou seja, pressupõe-se que as condições de reação foram adequadamente otimizadas. De fato, para as condições experimentais utilizadas, a eficiência de amplificação dos genes GAPDH, α e β -amilase satisfaz este requisito.

Para determinar o efeito do tratamento experimental na expressão de genes, utiliza-se o $\Delta C't=(Ct_{tempo X} - Ct_{tempo 0.})$, que mede o quanto um gene variou, em relação a ele mesmo, ao longo da amostragem.

Na figura 18 são apresentados os resultados obtidos por $2^{-\Delta C't}$ e $2^{-\Delta \Delta Ct}$ para os genes da α e β -amilase, juntamente com os valores de $2^{-\Delta C't}$ para os genes de referência GAPDH e β -actina.



Figura 18: Quantificação da expressão relativa de genes por RT-PCR em tempo real de acordo com o modelo proposto por Livak e Schmittgen (2001). O incremento na transcrição foi calculado tendo como referência o ponto zero DPC, assumindo para este, valor igual a 1. Efeito do tratamento experimental na expressão ($2^{-\Delta C't}$) da (**A**) β -actina, (**B**) GAPDH, (**C**) α -amilase e (**D**) β -amilase. Expressão relativa ($2^{-\Delta C't}$), normalizada pelo gene de referência β -actina para (**E**) α -amilase e (**F**) β -amilase e normalizada pelo gene de referência GAPDH para (**G**) α -amilase e (**H**) β -amilase. Grupos (**D**) controle e (**●**) tratado com 100 ppm de etileno, ao longo do amadurecimento medido em dias póscolheita (DPC).

6.5.2.2 Quantificação da expressão relativa: modelo Pfaffl.

No modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), os resultados obtidos refletem a variação na expressão de um gene de um grupo submetido a algum tratamento experimental ou estado patológico, tendo como controle amostral, um grupo que não recebeu o tratamento ou encontra-se sadio. Foi proposta então, uma modificação para este modelo. O controle amostral refere-se ao dia zero, ou seja, ao início da amostragem. Este ponto é igual para todos os grupos, pois corresponde à amostra que não recebeu tratamento algum. Os demais pontos amostrais, têm assim, a variação da expressão gênica determinada em relação ao estado inicial da fruta.

Para o modelo matemático original, proposto por Pfaffl (2001), temos a razão da expressão relativa (R), que é dada pela equação: $R = [(E_{alvo})^{ACP}/(E_{ref.})^{ACP}]$, na qual $\Delta CP = Ct_{controle} - Ct_{amostra}$, ou seja, a variação da expressão de um gene do grupo amostra, em relação ao grupo controle. Com os valores de ΔCP , calculados tanto para o gene alvo como para o gene de referência (ref.), e das eficiências de amplificação dos genes (E), obtém-se a expressão relativa (R'), dada pela equação: $R' = E^{ACP}$, que mede o efeito do tratamento experimental sobre a expressão de cada um dos genes. A razão entre os valores de R', do gene alvo e do gene de referência tiver um comportamento estável, $R'_{ref.}$ será igual a 1, e pode-se utilizar apenas o valor de R'_{alvo} , como índice da expressão de um dado gene.

Os resultados obtidos de R e R' para os genes da α e β -amilase estão representados na figura 19, juntamente com os valores de R' para os genes de referência GAPDH e β -actina.



Figura 19: Quantificação da expressão relativa de genes por RT-PCR em tempo real de acordo com o modelo proposto por Pfaffl (2001). O incremento na transcrição foi calculado tendo como referência o ponto zero DPC, assumindo para este, valor igual a 1. Efeito do tratamento experimental na expressão ($E^{ACPgene}$) da (**A**) β-actina, (**B**) GAPDH, (**C**) α-amilase e (**D**) β-amilase. Expressão relativa R=[$(E_{alvo})^{ACP}/(E_{ref})^{ACP}$], normalizada pelo gene de referência β-actina para (**E**) α-amilase e (**F**) β-amilase e normalizada pelo gene de referência GAPDH para (**G**) α-amilase e (**H**) β-amilase. Grupos (**D**) controle e (**●**) tratado com 100 ppm de etileno, ao longo do amadurecimento medido em dias póscolheita (DPC).
Ambos os modelos matemáticos demonstraram que os níveis de transcrição da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma importante enzima da via glicolítica e da β -actina, essencial para a estrutura e cinética do citoesqueleto, são de alguma maneira, suscetíveis ao tratamento, apresentado variação na sua expressão, eventos que podem ser relacionados à intensa atividade na respiração celular e desestruturação dos tecidos da polpa da fruta. Tal fato compromete a aplicação destes genes como referência endógena para a normalização dos resultados de quantificação da expressão. A normalização neste caso, foi feita exclusivamente pela quantidade de RNA total, obtida por método espectrofotométrico e cuja exatidão pode ser diretamente relacionada ao conteúdo das frações 28S e 18S do rRNA, de acordo com o proposto por Bustin (2000, 2002). Desta forma, a expressão relativa dos genes foi calculada pelos valores de 2^{- ΔCt} e R' (E^{ACP}), como a eficiência da amplificação para os genes de α e β -amilase foram ideais (2,00 e 1,99 respectivamente), ambos os modelos convergiram para o mesmo valor.

6.5.3 Quantificação da expressão por qRT-PCR relativa.

Para confirmação dos resultados obtidos nos ensaios de *real-time* PCR, foi utilizada como técnica alternativa a qRT-PCR relativa. Tal abordagem se fez necessária diante dos resultados com os genes candidatos a constitutivos, β -actina e GAPDH, que demonstraram alguma variação na sua expressão, quando esta foi determinada por RT-PCR em tempo real. As reações de qRT-PCR relativa foram realizadas para os genes da α e β -amilase, tendo como referência à β -actina. Foram utilizados para amplificação da α -amilase os *primers* rt-sentido e rt-reverso2, produzindo um *amplicon* de 292 pb, para a β -amilase, foram utilizados os primers rt-sentido2 e rt-reverso2 e para β -actina, rt-sentido e rt-reverso, de acordo com a tabela 5. Os experimentos foram realizados em triplicata, com os resultados expressos pela média dos valores das densidades óticas (OD) das bandas em relação à sua área medida em mm², mais o desvio padrão da média.



Figura 20: Eletroforese em gel de agarose com produtos da qRT-PCR relativa. CT3 a CT18, amostras do grupo controle e ET1 a ET7, grupo tratado com etileno. Produtos das reações para β -actina, com 209 pb (*primers* rt-sentido e rt-reverso), para α -amilase, com 292 pb (*primers* rt-sentido e rt-reverso2) e para β -amilase, com 215 pb (*primers* rt-sentido2 e rt-reverso2); ao lado direito, pesos moleculares indicativos do padrão de bandas de DNA.

A figura 20, apresenta os resultados de um dos conjuntos de reações ensaiados. Para cada gene, foi utilizado um número de ciclos adequado à necessidade de se obter um sinal mensurável e que melhor representasse os eventos relacionados à sua transcrição, demonstrando ainda, a dependência da quantidade inicial de cada transcrito. Para o gene da β -actina, foram realizados 30 ciclos, para a α -amilase, 28 ciclos e para a β -amilase, 16 ciclos. Pôde-se confirmar com os ensaios de qRT-PCR, o baixo nível de expressão da α -amilase nos tecidos da polpa de bananas observados por Vieira-Junior (2001), tendo em vista que, para a α -amilase, a obtenção de quantidades de produto da PCR na mesma intensidade que para a β -amilase, exigiu 12 ciclos de PCR adicionais, representando cerca de 4.000 vezes menos cDNA inicial.

A análise comparativa dos resultados das técnicas de qRT-PCR relativa e *real-time* PCR, para α -amilase e β -amilase, está demonstrada na figura 21. Pode-se observar que houve convergência dos resultados de qRT-PCR relativa para α -amilase, os quais foram normalizados pela expressão da β -actina (figura 21A), com a determinação da expressão por *real-time* PCR considerando o efeito do tratamento experimental na expressão (2^{- $\Delta C't$}) e a normalização pela quantidade de RNA total utilizada em cada reação (figura 21C). Da

mesma forma, quando comparados os resultados da qRT-PCR relativa para β-amilase (figura 21B) com aqueles obtidos por *real-time* PCR (figura 21D), há coincidência dos resultados. As quantificações por *real-time* PCR, normalizadas pela β-actina e GAPDH, tanto para α-amilase quanto para β-amilase, mostram resultados divergentes em relação a qRT-PCR relativa e a expressão calculada por $2^{-\Delta C't}$, o que se deveu, provavelmente, pela influência das variações na expressão dos gene de referência utilizados.

Os resultados da figura 21, podem ser comparados àqueles obtidos através da técnica de *northern blot* para a β -amilase, cuja abundância do transcrito foi demonstrada por Purgatto *et al.* (2001) e Nascimento *et al.* (2006), havendo grande semelhança entre os resultados da qRT-PCR e do *northern blotting*. Por outro lado, já se demonstrou que a utilização de *northern blot* para detecção do transcrito da α -amilase de banana é ineficaz (VIEIRA-JUNIOR, 2001), pois a abundância do transcrito foi incompatível com os limites de detecção desta técnica. Neste caso, a amplificação do cDNA na PCR, produz o número de cópias do transcrito necessário para a sua detecção, aumentando a sensibilidade da qRT-PCR em relação ao *northern blot*.



Figura 21: Comparação da quantificação da expressão relativa de genes de α-amilase e β-amilase por qRT-PCR relativa e por PCR em tempo real (modelo de LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O incremento na transcrição foi calculado tendo como referência o ponto zero DPC. Expressão da (**A**) α-amilase e da (**B**) β-amilase em relação à β-actina por qRT-PCR relativa. Efeito do tratamento experimental na expressão ($2^{-\Delta C't}$) da (**C**) αamilase e (**D**) β-amilase. Expressão relativa ($2^{-\Delta ACt}$), normalizada pelo gene de referência β-actina para (**E**) α-amilase e (**F**) β-amilase e normalizada pelo gene de referência GAPDH para (**G**) α-amilase e (**H**) β-amilase. Grupos (**D**) controle e (**●**) tratado com 100 ppm de etileno, ao longo do amadurecimento medido em dias pós-colheita (DPC).

6.6 Alfa e beta-amilase no metabolismo de carboidratos em bananas.

O conjunto de dados contendo os perfis de atividade, transcrição e tradução da α e β-amilase e sua relação com a respiração, produção de etileno, degradação de amido e síntese de açúcares em bananas, estão relacionados na figuras 22 e 23. Pode-se observar que, a intensidade da reação do soro anti- α -amilase decresceu ao longo do amadurecimento da banana sob condições controle, o que, de acordo com a figura 22, ocorreu concomitante com o decréscimo do teor de amido e a redução sutil nos níveis de expressão relativa do gene da α -amilase. Por outro lado, a atividade α -amilásica, medida no extrato de proteínas solúveis, aumentou sutilmente, assumindo valores mais altos, em torno de 50%, e mantendo-se estável a partir do ponto 9 DPC no grupo de frutas controle. Este fato pode ser associado à degradação do grânulo de amido e conseqüente solubilização de proteínas ligadas à sua superfície ou que tenham se ligado durante a manipulação das amostras, ou ainda, encontravam-se armazenadas internamente na sua estrutura. A provável solubilização da α -amilase ligada ao grânulo não alterou o perfil do western blotting, porque neste caso, foram analisados extratos totais, obtidos sob condições desnaturantes e que devem conter as proteínas solúveis, ligadas a membranas ou organelas da polpa. No entanto, o mesmo não aconteceu para amostras do grupo tratado com etileno, neste caso, não foi possível estabelecer o perfil de variação de proteína. Houve aumento na atividade do extrato enzimático bruto, não se podendo fazer a mesma afirmativa sobre a transcrição do gene, que descreve um perfil com mínimas variações ao longo do amadurecimento da banana, parecendo que os eventos degradação do amido e síntese de proteína sofrem modulações diversas. Os efeitos do tratamento com etileno podem ter resultado em uma intensa modificação na regulação da expressão da α -amilase, embora exista relação entre a transcrição e o perfil de atividade para o grupo tratado, este incremento na transcrição poderia representar uma tentativa de compensação da brusca redução nos níveis de proteína.

As pequenas variações percebidas na transcrição da α -amilase e nas determinações de sua atividade, bem como trabalhos anteriores que descrevem o

insucesso no acompanhamento da sua expressão ou na sua purificação (VIEIRA-JUNIOR, 2001; BASSINELLO, 2002), podem indicar que esta enzima talvez não tenha função determinante na degradação do amido, ou que ao contrário, por ser fundamental, pequenas variações percebidas em sua transcrição, tradução ou atividade ao longo do amadurecimento, são suficientes para modificar o metabolismo do amido na polpa de bananas.

A concentração final de amido e açúcares em frutas expostas a 100 ppm de etileno foi acentuada em relação ao grupo controle, o comportamento da atividade da β amilase descreveu perfil similar, podendo ser observada a antecipação nos picos de atividade. As mudanças nos perfis de atividade mantiveram correlação direta com a variação nos níveis da enzima determinados por western blotting e como pode ser visto na figura 23, estes eventos estão relacionados ao incremento na transcrição do gene da proteína, cujo pico, precedeu ao aumento na atividade enzimática. Os resultados sugerem, portanto, que a atividade e expressão da β -amilase em bananas, estão diretamente relacionadas aos eventos de degradação do amido, respondendo também, de maneira direta, ao tratamento com o hormônio etileno, comportamento também descrito por do Nascimento et al. (2006), que observou ainda a resposta à ausência do estímulo do etileno, a qual foi bloqueada pelo uso do 1-metilciclopropeno (1-MCP). O uso do 1-MCP, antagonista do etileno que se liga de maneira irreversível a seu receptor, impede que a cascata de eventos desencadeada pelo etileno se processe de maneira ordenada, e como descrito por Nascimento et al. (2006), levou a um acentuado atraso no estabelecimento dos processos de degradação do amido e pareceu neutralizar os eventos relacionados à tradução e transcrição da β-amilase, reforçando a idéia da sua dependência em relação ao etileno e correlação direta com a degradação do amido em bananas.



Figura 22: Perfis metabólicos e de expressão da α -amilase para frutas utilizadas nos grupos controle e tratado com 100 ppm de etileno. Os gráficos apresentam valores de respiração (produção de CO₂), produção de etileno, teor de amido, síntese de açúcares (sacarose, glicose e frutose), atividade α -amilásica e expressão relativa do gene da α -amilase ao longo dos dias pós-colheita. As fotos na parte inferior da figura, representam os géis de agarose com produtos da qRT-PCR relativa para α -amilase e β -actina, o perfil do 28S e 18S rRNA das amostras de RNA total utilizadas e o *Western blotting* com soro anti-MAmyS1 contra proteínas totais de bananas dos grupos experimentais.



Figura 23: Perfis metabólicos e de expressão da β -amilase para frutas utilizadas nos grupos controle e tratado com 100 ppm de etileno. Os gráficos apresentam valores de respiração (produção de CO₂), produção de etileno, teor de amido, síntese de açúcares (sacarose, glicose e frutose), atividade β -amilásica e expressão relativa do gene da β -amilase ao longo dos dias pós-colheita. As imagens na parte inferior da figura, ilustram os géis de agarose com produtos da qRT-PCR relativa para α -amilase e β -actina, o perfil do 28S e 18S rRNA das amostras de RNA total utilizadas e o *Western blotting* com soro anti-MBmyS1 contra proteínas totais de bananas dos grupos experimentais.

Nos processos envolvidos na degradação do amido, sempre foram enfatizadas as funções da α -amilase e amido-fosforilase (Preiss, 1982; Beck & Ziegler, 1989). Todavia, novas evidências sinalizam para a importância da β -amilase, como já descrito por Kohno e Nanmori (1991), que observam durante a germinação de sementes de alfafa, o declínio na atividade da α -amilase enquanto a atividade da β -amilase aumentava. Ziegler (1999) descreve a importante função na hidrólise do amido de reserva do endosperma de cereais durante a germinação.

Foi proposto que a β -amilase atue durante a degradação do amido transitório armazenando em folhas de *Arabidopsis* (ZEEMAN *et al.*, 2004), enquanto a α -amilase seria desnecessária (YU *et al.*, 2005), paralelamente, observou-se que a principal via de exportação de carboidratos a partir do cloroplasto, envolve a participação de transportadores de maltose (NIITTYLÄ *et al.*, 2004), e mais especificamente β -maltose (WEISE *et al.*, 2005), enfatizando a atividade β -amilolítica plastidial, porém a atividade extraplastidial ainda permanece pouco conhecida (LLOYD *et al.*, 2005).

A degradação do amido armazenado em bananas, talvez envolva os componentes descritos para germinação de cereais e leguminosas descritos na figura 2, com participação de enzimas hidrolíticas e fosforolíticas, que devem atuar sobre o grânulo de amido produzindo glicanos lineares, os quais são substrato para a β -amilase; porém, como esta é uma enzima citosólica, o envelope do amiloplasto deve ser continuamente degradado para que haja interação com o meio extraplastidial. Neste contexto, as prováveis rotas metabólicas envolvendo α -amilase e β -amilase na degradação do amido e síntese de sacarose, não parecem evidentes. Alguns mecanismos de ação, descritos para frutas, folhas ou sementes de cereais podem ser evidenciados na banana, assim como semelhanças entre genes, o padrão de sua expressão e a resposta a hormônios ou seus antagonistas, contrariando por outro lado, modelos anteriormente propostos para a degradação de amido e atividade α e β -amilolítica em bananas, que atribuíam a função de degradação do amido como sendo quase que exclusiva da α -amilase.

7 Conclusão.

A β -amilase parece desempenhar uma importante função no metabolismo amidosacarose em polpa de bananas. Pôde-se demonstrar que a sua expressão está diretamente relacionada à degradação do amido, havendo aumento da atividade concomitantemente com o início da degradação do amido e com a instalação do climatério respiratório. O incremento na atividade β -amilásica resultou da sua síntese *de novo*, evidenciada pelo aumento na transcrição e conseqüente aumento na tradução da enzima.

É possível propor que a participação da α -amilase ocorre no início da degradação do amido, havendo redução na sua expressão ao longo do processo, podendo este fato, ser uma resposta ao incremento na expressão de outras enzimas, como a β -amilase. Os baixos níveis de transcrito encontrados para a α -amilase, bem como o sutil aumento na sua atividade, demonstram que esta deve estar sob mecanismos de regulação complexos e distintos daqueles para a β -amilase.

Referências Bibliográficas.

ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I - the phosphorylase and phosphatase behavior in Musa acuminata. *J. Food Biochem.* v.5, p.19-37, 1981.

ASCACIO-MARTINEZ, J.A., BARRERA-SALDANA, H.A. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by Pichia pastoris. *Gene* v. 340, n.2, p.261-266, 2004.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SMITH, J.A., SEIDMAN, J.G., STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley, 1987-1997. v.1-3, suppl.1-35.

BAIROCH, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids. Res.* v.28, n.1, p.304-305, 2000a.

BAIROCH, A., APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids. Res.* v.28, n.1, p.45-48, 2000b.

BALL, S.G., MORELL, M.K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* v.54, p.207-233, 2003.

BASSINELLO, P.Z., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. *J. Agric. Food Chem.* v.9, n.50, p.5781-6, 2002.

BASSINELLO, P.Z. Estudo e caracterização parcial de amilases de banana (Musa acuminata cv. Nanicao). São Paulo, 2002. 174p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. v.40, p.95-117, 1989.

BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., WHEELER, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* v.33, p.D34-D38, 2005.

BIALE, J.B., YOUNG, R.E. Respiration and ripening in fruits: retrospect and prospect. In: FRIEND, J., RHODES, M.J.C., eds. *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. London: Academic Press, 1981. p. 1–39.

BIERHALS J.D., LAJOLO F.M., CORDENUNSI B.R., NASCIMENTO, J.R.O, et al. Activity, cloning, and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. *J. Agric. Food Chem.* v.52, n.24, p.7412-7418, 2004.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for pratical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.48, p.297-326, 1997.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* v.23, n.2, p.85-112, 1998.

BURDYCHOVA, R., RUZICKA, V., BARTOS, M. PCR-based method for identification of integration events in the Pichia pastoris genome. *Biotechniques*, v.33, n.6, p.1214, 2002.

BURG, S.P., BURG, E.A. Role of Ethylene in Fruit Ripening. *Plant Physiol.* v.37, n.2, p.179-189, 1962.

BURG, S.P., BURG, E.A. Relationship Between Ethylene Production and Ripening in Bananas. *Bot. Gaz.* v.126, n.3, p.200-204, 1965.

BURG, S.P, BURG, E.A. Molecular requirements for biological activity of ethylene. *Plant Physiol*. v.42, n.1, p.144-145, 1967.

BURLEIGH, S.H. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Sci.* v.160, n.5, p.899-904, 2001.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* v.25, n.2, p.169-193, 2000.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* v.29, n.1, p.23-39, 2002.

CARPENTIER, S.C., WITTERS, E., LAUKENS, K., DECKERS, P., SWENNEN, R., PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, v.5, n.10, p.2497-2507, 2005.

CHANG, C.R., BLEECKER, A.B. Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiol*. v.136, n.2, p.2895-2899, 2004.

CHEN, M.H., HUANG, L.F., LI, H.M., CHEN, Y.R., YU, S.M. Signal peptide-dependent targeting of a rice alpha-amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. *Plant Physiol*. v.135, p.1367-1377, 2004.

CHEN, Y.F., ETHERIDGE, N., SCHALLER, G.E. Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* v.95, n.6, p.901-915, 2005.

CLARK, M.S., ed. *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 529p.

CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agric. Food Chem.* v.43, p.347-351, 1995.

CORDENUNSI, B.R. *Aspectos químicos, bioquímicos e ultraestruturais do grânulo de amido durante o amadurecimento da banana*. São Paulo, 2004. 130p. (Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

CREGG, J.M., BARRINGER, K. J., HESSLER, A. Y., MADDEN, K. R. Pichia-Pastoris As A Host System for Transformations. *Mol. Cell. Biol.* v.5, n.12, p.3376-3385, 1985.

CREGG, J.M., CEREGHINO, J. L., SHI, J. Y., HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. *Mol. Biotechnol.* v.16, n.1, p.23-52, 2000.

DAWSON, R.M.C. *Data for biochemical research*. 3 ed. New York: Oxford Uni Press, 1990. 580p.

DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* v.1, n.4, p.19-21, 1983.

DILLEY, D.R. Symposium: biochemical control systems – Postharvest fruit preservation: protein synthesis, ripening and senescence. *J. Food Sci.* v.37, n.4, p.518-520, 1972.

ELLIS, S.B., BRUST, P. F., KOUTZ, P. J., WATERS, A. F., HARPOLD, M. M., GINGERAS, T. R. Isolation of Alcohol Oxidase and 2 Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast Pichia-Pastoris. *Mol. Cell. Biol.* v.5, n.5, p.1111-1121, 1985.

EMBRAPA. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Mandioca e Fruticultura. Produtos Pesquisados pela Unidade. *Banana*. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/banana.htm. Acesso em: 12 de março de 2005.

EMES, M.J., BOWSHER, C.G., HEDLEY, C., BURRELL, M.M., SCRASE-Field, E.S.F., TETLOW, I.J. Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. *J. Exp. Bot.* v.54, n.382, p.569-575, 2003.

FREEMAN, W.M., WALKER, S. J., VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* v.26, n.1, p.112, 1999.

GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidade behaviour. *J. Food Sci.* v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.

GANA, J.A., KALENGAMALIRO, N.E., CUNNINGHAM, S.M., VOLENEC, J.J. Expression of beta-amylase from alfalfa taproots. *Plant Physiol*. v.118, n.4, p.1495-506, 1998.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.52, p.725-749, 2001.

HAMABATA, A., RODRIGUEZ, E., GARCIA-MAYA, M., BERNAL-LUGO, I. Effect of pH on the GA₃ induced α -amilase syntesis. *J. Plant Physiol.* v.143, p.349-352, 1994.

HAMES, B.D., RICKWOOD D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach / edited by*. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press, 1990.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* v.6, n.10, p.986-994, 1996.

HENKEL, A.W., BIEGER, S.C. Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. *Anal. Biochem.* v.223, p.329-331, 1994.

HENKER, A., SCHINDLER, I., RENZ, A., BECK, E. Protein heterogeneity of spinach pullulanase results from the coexistence of interconvertible isomeric forms of the monomeric enzyme. *Biochem J.* v.331, n.3, p.929-935, 1998.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* v.316, n.2, p.695-696, 1996.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S., GRIFFITH, R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific Dna-Sequences. *Bio-Technology*, v.10, n.4, p.413-417, 1992.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic Pcr Analysis - Real-Time Monitoring of Dna Amplification Reactions. *Bio-Technology*, v.11, n.9, p.1026-1030, 1993.

HUANG. N., SUTLIFF, T.D., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol. Biol.* v.14, n.5, p.655-668, 1990.

IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). J. Amer. Soc. Hort. Sci. v.124, n.6, p.587–590, 1999.

INMETRO. Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. INMETRO. *Unidades Legais de Medida*. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidlegaismed.asp. Acesso em: 12 de fevereiro de 2005.

ISRAELI, Y., LAHAV, E. Banana. In: *CRC handbook of fruit set and development*. Boca Raton: CRC Press, 1986, p.45-73

JAMES, M.G., DENYER, K., MYERS, A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* v.6, p.215–222, 2003.

JANEČEK, Š. α-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* v.67, n.1, p.67-97, 1997.

JANEČEK, Š., MACGREGOR, E.A., SVENSSON, B. Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from α -amylases. *Biochem. J.* v.305, n.2, p.685-686, 1995.

JUGE, N., ANDERSEN, J.S., TULL, D., ROEPSTORFF, P., SVENSSON, B. Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION v.8, n.2, p.204-214, 1996.

KALENDAR, R. *FastPCR, PCR primer design, DNA and protein tools, repeats and own database searches program.* Disponível em: http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm. Acesso em: 25 de março de 2005.

KARSAI, A., MULLER, S., PLATZ, S., HAUSER, M.T. Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, v.32, n.4, p.790-796, 2002.

KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.47, p.509-540, 1996.

KOHNO, A., NANMORI, T. Changes in α - and β -amylase activities during germination of seeds of alfafa (*Medicago sativa*). *Plant Cell Physiol*. v.32, n.4, p.459-466, 1991.

KONISHI, Y., HARADA, M., D'INNOCENZO, M., LAJOLO, F.M. Purification and characterization of soluble and cell wall-bound acid α -glucosidases of ripe yellow banana pulp. *J. Appl. Glycosci.* v.48, n.1, p.19-25, 2001.

KOSSMANN, J., LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* v.19, n.3, p.171–226, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R., eds. Bioquímica e biologia molecular na pós-colheita. In: RODRIGUES-AMAYA, D.B., PASTORE, G.M. *Ciência de alimentos: avanços e perspectivas na America Latina*. Campinas, SP: UNICAMP/FEA, 1997. cap.18, p.151-155.

LIVAK, K.J. SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LLOYD, J.R., KOSSMANN, J., RITTE, G. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* v.10, n.3, p.130-137, 2005.

LÓPEZ-GÓMES, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, v.27, n.5, p.440-442, 1992.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-275, 1951.

MACRAE, E., QUICK, W.P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. *Planta*, v.188, p. 314-323, 1992.

MARTÍNEZ, T.F., ALARCÓN, F.J., DÍAZ-LÓPEZ, M., MOYANO, F.J. Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis*. v.21, n.14, p.2940-2943, 2000.

MCKINNEY, M.M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods.* v.96, p.271-278, 1987.

MAO, W.W., KINSELLA, J.E. Amylase activity in banana fruit: properties and changes in activity with ripening. *J. Food Sci.* v.46, p.1400-1403, 1981.

MAEO, K., TOMIYA, T., HAYASHI, K., AKAIKE, M., MORIKAMI, A., ISHIGURO, S., NAKAMURA, K. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. *Plant Mol. Biol.* v.46, n.5, p.627-37, 2001.

MARRIOTT, J., ROBINSON, M., KARIKARI, S.K. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. *J. Sci. Food Agric.* v.32, p.1021-1026, 1981.

MEDINA-SUAREZ, R., MANNING, K., FLETCHER, J., AKED, J., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* v.115, n.2, p.453-461, 1997.

MORRISON, T.B., WEIS, J.J., WITTWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR (R) green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, v.24, n.6, p. 954-962, 1998.

MOTA, R.V., LAJOLO, F.M, CIACCO, C., CORDENUNSI, B.R. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. *Starch/Stärke*, v.52, n.2-3, p.63-68, 2000.

MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M.R.M.; LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta*, v.216, n.2, p.325-333, 2002.

MUKERJEA, R., YU, L.L., ROBYT, J.F. Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. *Carbohydr. Res.* v.337, n.11, p.1015-1022, 2002.

MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G., BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol*. v.122, p.989–997, 2000.

NAKAMURA, Y. Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci.* v.121, n.1, p.1-18, 1996.

NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M., ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta*, v.203, n.3, p.283-288, 1997.

NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. *J. Plant Physiol.* v.156, p.605-611, 2000.

NASCIMENTO, J.R.O., VIEIRA-JUNIOR, A., BASSINELLO, P.Z., CORDENUNSI, B.R., MAINARDI, J.A., PURGATTO, E. LAJOLO, F.M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Technol. In press*, 2006.

NetPrimer. PREMIER Biosoft International. Disponível em: http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html. Acesso em: 15 de fevereiro de 2005.

NIELSEN, T.H., DEITING, U., STITT, M. A beta-Amylase in Potato Tubers Is Induced by Storage at Low Temperature. *Plant Physiol*. v.113, n.2, p.503-510, 1997.

NIITTYLÄ, T., MESSERLI, G., TREVISAN, M., CHEN, J., SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, v.303, n.5654, p.87-89, 2004.

O'NEILL, S.D., KUMAGAI, M.H., MAJUMDAR, A., HUANG, N., SUTLIFF, T.D., RODRIGUEZ, R.L. The α -amylase genes in Oryza sativa: characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Mol. Gen. Genet.* v.221, n.2, p.235-244, 1990.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* v.83, n.2, p.346-356, 1977.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* v.29, n.9, 2001.

PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann. Rev. Plant Physiol.* v.33, p.431-454, 1982.

PUJADAS, G., PALAU, J. Evolution of α -amylases: Architectural features and key residues in the stabilization of the (β/α)(8) scaffold. *Mol. Biol. Evol.* v.18, n.1, p.38-54, 2001.

PUJADAS, G., RAMIREZ, F.M., VALERO, R., PALAU, J. Evolution of β -amylase: Patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. *Proteins*, v.25, n.4, p.456-472, 1996.

PURGATTO, E., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, v.212, n.5-6, p.823-828, 2001.

PURGATTO, E., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *J. Plant Physiol.* v.159, n.10, p.1105-1111, 2002.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler Instrument. Disponível em: http://www.idahotec.com/lightcycler_u/lectures/quantification_on_lc.htm. Acesso em: 27 de fevereiro de 2005.

ROSSETTO, M.R.M., PURGATTO, E., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. Effects of gibberellic acid on sucrose accumulation and sucrose biosynthesizing enzymes activity during banana ripening. *Plant Growth Regul.* v.41, n.3, p.207-214, 2003.

RYCHLIK, W., SPENCER, W. J., RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, v.18, n.21, p.6409-6412, 1990.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.74, p.5463-5467, 1977.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochem.* v.35, n.7, p.711-715, 2000.

SCHMITTGEN, T.D., ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.46, n.1, p.69-81, 2000.

SEYMOUR, G., TAYLOR, J., TUCKER, G. *Biochemistry of Fruit Ripening*. London: Chapman & Hall, 1993. 454p.

SKADSEN, R.W. Aleurones from a barley with low α -amylase activity become highly responsive to gibberellin when deteched from the starchy endosperm. *Plant Physiol*. v.102, p. 195-203, 1993.

SMITH, A.M., DENYER, K., MARTIN, C. The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.48, p.67–87, 1997.

SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C., THORNEYCROFT, D., SMITH, S.M. Starch mobilization in leaves. *J. Exp. Bot.* v.54, n.382, p.577-583, 2003.

SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C., SMITH, S.M. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* v.56, p.73-98, 2005.

SPEIRS, J., BRADY, C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. *Aust. J. Plant Physiol.* v.18, p.519-532, 1991.

SUBBARAO, K.V., DATTA, R., SHARMA, R. Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. *Phytochemistry*, v.49, n.3, p.657-666, 1998.

SUTLIFF, T.D., HUANG, N., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an α -amylase multigene cluster in rice. *Plant Mol. Biol.* v.16, n.4, p.579-591, 1991.

TERASHIMA, M., HAYASHI, N., THOMAS, B.R, RODRIGUEZ, R.L., KATOH, S. Kinetic parameters of two rice α -amilase isozymes for oligosaccharide degradation. *Plant Sci.* v.116, p.9-14, 1996.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* v.24, p.4876-4882, 1997.

TODAKA, D., MATSUSHIMA, H., MOROHASHI, Y. Water stress enhances beta-amylase activity in cucumber cotyledons. *J. Exp. Bot.* v.51, n.345, p.739-45, 2000.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Serviço de Biblioteca e Documentação do Conjunto das
Químicas.Normalização
técnica.Disponível
em:http://www.bcq.usp.br/menunorma_tecnica.htm.Acesso em: 3 de abril de 2005.

VIEIRA-JUNIOR, A. Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma α -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (Musa spp.). São Paulo, 2001. 87p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

VIEIRA-JUNIOR, A., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M. Molecular cloning and characterization of an α -amylase occuring in the pulp of ripening bananas and its expression in Pichia pastoris. *J. Agric. Food Chem.* 2006. *Submitted.*

VIKSONIELSEN A, CHRISTENSEN TMIE, BOJKO M, MARCUSSEN J. Purification and characterization of beta-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* v.99, n.1, p.190-196, 1997.

WEGRZYN, T., MACRAE, E. Alpha-amylase and starch degradation in kiwifruit. *J. Plant Physiol.* v.147, p.19-28, 1995.

WEGRZYN, T., REILLY, K., CIPRIANI, G., MURPHY, P., NEWCOMB, R., GARDNER, R., MACRAE, E. A novel α -amylase gene is transiently upregulated during low temperature exposure in apple fruit. *Eur. J. Biochem.* v.267, n.5, p.1313-1322, 2000.

WEISE S.E., KIM K.S., STEWART R.P., SHARKEY, T.D. Beta-maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* v.137, n.2, p.756-761, 2005.

YAMAGUCHI, J., ITOH, S., SAITOH, T., IKEDA, A., TASHIRO, T., NAGATO, Y. Characterization of beta-amylase and its deficiency in various rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* v.98, n.1, p.32-38, 1999.

YAMAMOTO, T., ed. Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. Boca Raton: CRC Press, 1995. 206p.

YU, T.S., ZEEMAN, S.C., THORNEYCROFT, D., FULTON, D.C., DUNSTAN, H., LUE, W.L., HEGEMANN, B., TUNG, S.Y., UMEMOTO, T., CHAPPLE, A., TSAI, D.L., WANG, S.M., SMITH, A.M., CHEN, J., SMITH, S.M. α -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* v.280, n.11, p.9773-9, 2005.

ZEEMAN, S.C., NORTHROP, F., SMITH, A.M., ap REES, T. A starch-accumulating mutant of Arabidopsis thaliana deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* v.15, n.3, p.357-365, 1998.

ZEEMAN, S.C., SMITH, S.M., SMITH, A.M. The breakdown of starch in leaves. *New Phytol.* v.163, n.2, p.247–261, 2004.

ZIEGLER, P. Cereal beta-amylases. J. Cereal Sci. v.29, p.195-2004, 1999.

ZHANG P.Y., WHISTLER R.L., BEMILLER J.N., HAMAKER B.R. *Banana starch: production, physicochernical properties, and digestibility - a review.* Carbohydr. Polym. v.59, n.4, p.443-458, 2005.

Anexos.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco Presidente da CPG/FCF/USP