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

Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma β -amilase endereçada a plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana

Renato Astorino Filho

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013887

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Astorino Filho, Renato

A858c Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para
uma β -amilase endereçada aos plastídeos e expressa durante o
amadurecimento da banana / Renato Astorino Filho. -- São
Paulo, 2008.
95p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Metabolismo : Fisiologia vegetal 2. Carboidrato : Bioquímica
vegetal 3. Carboidrato : Ciência dos alimentos I. T. II.
Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.

581.133 CDD

Renato Astorino Filho

Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma β -amilase endereçada a plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Dr. João Roberto ~~Olivera~~ do Nascimento
orientador/presidente

Prof. Dr. Marcelo Ehlers Laureiro
1º. examinador

Profa. Dra. Beatriz Rosana Corduwasi
2º. examinador

Profa. Dra. Marie Anne van Sluys
3º. examinador

Prof. Dr. Carlos Albano Labate
4º. examinador

São Paulo, 22 de agosto de 2008

À minha mãe,

DEDICO

AGRADEÇO

A Deus, por minha vida e a vida de meus entes queridos.

À minha mãe, Cintia Perelmutter, a quem devo minhas melhores qualidades, por toda ajuda e apoio.

À minha avó, Maria de Lurdes Gazze Perelmutter, por toda a ajuda cedida a mim e a minha família.

Aos meus grandes amigos, Adriana de Godoy, Alexandre Rodrigues Lobo, Francisco Leonardo Torres Leal, Gleuber Mariano Teixeira, Joaquim Maurício Duarte Almeida, Luiz Marcelo Eugênio, Renato Ribeiro Ferreira, Roberta Ghedini Der Agopian, Silvia Beserra Nogueira, pela grande amizade e por todo apoio dentro e fora do mundo da ciência.

Ao Prof. João Roberto Oliveira do Nascimento, pela orientação, pelos ensinamentos e pela total liberdade para conduzir o trabalho de pesquisa.

À Profa. Beatriz Rosana Cordenunsi, pelo incentivo constante, pelo respeito, por sua atenção e preocupação com o trabalho, pelos ensinamentos e por sempre acreditar no potencial do meu trabalho.

Ao Prof. Eduardo Purgatto, por sua disposição inabalável em ajudar, e pelos dados de auxina e etileno apresentados nesse trabalho.

Ao Prof. Franco Maria Lajolo, por permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À Profa. Marie-Anne Van Sluys, pelos ensinamentos em biologia molecular e por disponibilizar todos os recursos do seu laboratório para a execução do trabalho.

Ao Prof. Carlos Alberto Labate, por sua indicação para esse grupo de pesquisa, por disponibilizar os recursos do seu laboratório e pelas análises de sequenciamento de peptídeos.

Ao Prof. Fernando Salvador Moreno, por disponibilizar a infra-estrutura do seu laboratório.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo incentivo financeiro dado ao laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (projeto temático nº 02/12452-9).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), pela bolsa de doutorado.

Às técnicas do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, Lucia Helena Justino da Silva e Tânia Misuzu Shiga, pelo excelente serviço prestado além da agradável companhia.

Ao pesquisador do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Alexander de Andrade, pelas análises de espectrometria de massa.

Às alunas do laboratório GaTE-LBMP, Juliane Karine Ishida, Daniela Kajihara e Myna Nakabashi, por sempre estarem dispostas em ajudar no trabalho.

Aos demais colegas, alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela agradável companhia e que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

RESUMO

O amadurecimento dos frutos é um processo caracterizado pela ocorrência de diversas alterações bioquímicas que ocorrem em um curto intervalo de tempo e que são importantes para a qualidade desses alimentos. Na banana uma das características mais importantes é o adoçamento do fruto, que ocorre como resultado da degradação do amido e acúmulo de sacarose.

Resultados do nosso grupo apontam a β -amilase como uma enzima importante no processo de mobilização do amido, o que também é visto em estudos recentes utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo, os quais mostram que a principal via de degradação do amido transitório presente nas folhas ocorre pela ação da β -amilase. Entretanto, em bananas, faltam evidências quanto à funcionalidade de um gene de β -amilase, parcialmente isolado da polpa do fruto, e que é expresso durante o amadurecimento e que parece ser modulado por hormônios vegetais. Em vista disso, esse trabalho objetivou realizar a caracterização funcional desse gene, a qual permitiu constatar que esse gene codifica, de fato, para uma proteína capaz de ser endereçada aos cloroplastos. Também foi observado que o promotor desse gene contém motivos regulatórios para os mesmos hormônios previamente relacionados com a modulação da expressão desse gene em bananas. Essas novas evidências reforçam a idéia de que o produto desse gene de β -amilase tem um importante papel no processo de degradação do amido durante o amadurecimento da banana.

Palavras-chaves: Amido. Expressão gênica. Auxina. Etileno. Promotor.

Functional characterization of maBMY gene that encodes a β -amylase targeted to plastids and expressed during banana ripening

ABSTRACT

Fruit ripening is characterized by several biochemical changes that occur in a short time. These changes account for the color, taste and texture of the edible fruits, which are important postharvest characteristics for the fruit commercialization. In bananas, one of the most important features is the fruit sweetness which is the result of the starch degradation and sucrose accumulation.

Results of our research group point β -amylase as an important enzyme in starch degradation process in bananas which is in agreement to recent studies using *Arabidopsis thaliana* as plant model. These studies show that the main degradation pathway of the transitory starch present in leaves on *Arabidopsis* plants occurs due β -amylase action. However, in bananas there are no evidences about the functionality of the expression product of a β -amylase gene, which was demonstrated to be modulated by plant hormones and expressed during ripening. In view of this, the aim of this work was to proceed the functional characterization of this gene which was showed to encode for an protein targeted to chloroplasts. It was also observed that its promoter region contains regulatory motifs related to the same plant hormones previously reported to modulate β -amylase expression. These new evidences support the idea that expression of β -amylase gene has an important role in starch degradation during banana ripening.

Keywords: Starch. Gene expression. Auxin. Ethylene. Promoter.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

Introdução	1
------------	---

CAPÍTULO 2

Clonagem e expressão em <i>Escherichia coli</i> do gene maBMY que codifica para uma β -amilase endereçada aos plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana	25
--	----

CAPÍTULO 3

isolamento e caracterização funcional da região promotora do gene maBMY	61
---	----

CAPÍTULO 4

Considerações finais	92
----------------------	----

CAPÍTULO 1

Introdução

A banana é o segundo fruto mais consumido no mundo, sendo que 98% da sua produção mundial se encontra em países subdesenvolvidos (FAO 2005), o que torna essa fruta uma importante fonte de carboidratos na dieta das populações desses países. O adoçamento é uma importante característica pós-colheita dessa fruta e se deve principalmente ao acúmulo de sacarose na polpa. Como visto para a banana Nanicão, mutação da cultivar Nanica identificada no Estado de São Paulo (Alves, 1999) e cultura de grande importância econômica no Brasil, a síntese dessa sacarose pela ação da enzima sacarose-fosfato sintase apenas ocorre quando há degradação do amido acumulado durante o desenvolvimento do fruto (Nascimento et al., 1997). Desse modo, o processo de degradação do amido durante o amadurecimento da banana é determinante para a qualidade pós-colheita desse fruto.

Degradação do amido

O amido é uma reserva de carbono das plantas e é constituído de moléculas de amilose e amilopectina que formam uma estrutura compacta no formato de grânulos, os quais são encontrados no interior dos cloroplastos nos tecidos fotossintetizantes e dos amiloplastos nos tecidos de reserva. A amilose é uma cadeia de moléculas de D-glicose unidas por ligações α -1,4 e a amilopectina é uma cadeia de D-glicose, também constituída por ligações desse tipo como a amilose, mas que apresenta ramificações em intervalos de 20-30 subunidades de glicose. Estas ramificações são formadas por ligações α -1,6, as quais unem uma cadeia de glicose à outra.

Em linhas gerais, a degradação do amido tanto nos tecidos de reserva como nos tecidos fotossintetizantes parece resultar da ação de enzimas hidrolíticas e fosforolíticas, que atuam sobre as ligações glicosídicas presentes no amido

resultando na formação de açúcares solúveis, os quais são utilizados em outras vias do metabolismo da planta. Entretanto, o processo de degradação do amido apresenta particularidades quanto às enzimas envolvidas em cada tipo de tecido. A degradação do amido nos tecidos de reserva, como tubérculos e sementes, apresenta diferenças quanto às principais enzimas atuantes, ou quanto à relevância de cada uma delas neste processo.

A degradação do amido em sementes constitui o primeiro e mais conhecido modelo de estudo se comparado aos de tubérculos e frutos. No caso dos tecidos fotossintetizantes, nos quais ocorre acúmulo de amido transitório (sintetizado durante o dia e degradado durante a noite) no interior dos cloroplastos, há diferenças significativas quando comparado com os modelos anteriores. Atualmente este é o modelo de estudo que tem recebido mais atenção e possui mais dados relacionados aos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na mobilização do amido. Parte desse interesse se justifica pelo fato dos tecidos fotossintetizantes constituírem um modelo de degradação do amido mais dinâmico e complexo, se comparado ao de sementes.

Degradação do amido em sementes

Nas sementes o amido se encontra no interior dos amiloplastos localizados no endosperma. Durante a germinação das sementes o amido é degradado resultando na formação dos açúcares solúveis glicose e maltose (figura 1), os quais são fontes de energia para o desenvolvimento do embrião. Nesses tecidos as enzimas envolvidas e já identificadas são α -amilase (Beck e Ziegler, 1989; Fincher, 1989; Ritchie et al., 2000), α -glicosidase (Sun et al., 1991), dextrinase-limite (Dinges

Figura 1. Modelo de degradação do amido em sementes, no qual os grânulos são atacados pela α -amilase e dextrinase limite e as cadeias liberadas são despolimerizadas por ação combinada da β -amilase e α -glicosidase, resultando na produção de glicose. Fonte: Smith et al. (2005).

et al., 2003), amido-fosforilase (Matheson e Richardson, 1976; Van-Berkel et al., 1991) e β -amilase (Daussant et al., 1981). Nesse modelo a principal enzima envolvida no processo de mobilização do amido é a enzima α -amilase (E.C. 3.2.1.1), uma endo-hidrolase que catalisa a quebra aleatória das ligações α -1,4-D-glicosídicas internas da cadeia de amido. Para desempenhar seu papel, essa α -amilase deve ser exportada das células de aleurona para o endosperma, tecido no qual o amido se encontra compartimentalizado nos amiloplastos, e que fica susceptível a ação da α -amilase devido à degradação da membrana do amiloplasto. Uma característica importante dessa enzima é a sua capacidade de atuar diretamente sobre o grânulo de amido, fornecendo substrato para as demais enzimas envolvidas na degradação das cadeias de glicose liberadas. Além das cadeias lineares de glicose, um produto remanescente da ação da α -amilase é a dextrina-limite (glicanos de pequeno peso molecular altamente ramificados por ligações α -1,6), que serve de substrato para a dextrinase-limite (E.C. 3.2.1.142), uma enzima desramificadora de amido capaz de hidrolisar as ligações α -1,6, liberando cadeias lineares de glicose. Essas cadeias, por sua vez, servirão de substrato tanto para a β -amilase (E.C. 3.2.1.2), enzima que catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-D-glicosídicas, removendo subunidades de maltose das extremidades não-redutoras das cadeias de amilose e amilopectina, como para a α -glicosidase (E.C. 3.2.1.3), enzima responsável pela hidrólise das ligações α -1,4-D-glicosídicas das extremidades não-redutoras das cadeias de glicano, e liberação de subunidades de glicose.

Além das enzimas mencionadas acima, outra enzima que pode ter um papel no processo de degradação do amido é a amido-fosforilase. A enzima amido-fosforilase (E.C. 2.4.1.1) promove a remoção de uma molécula de glicose de uma

cadeia linear de glicose e converte essa glicose em glicose-1-fosfato. Contudo, diferentemente do que ocorre no metabolismo do amido de sementes de monocotiledôneas essa enzima parece ser relevante na degradação do amido de sementes de dicotiledôneas, como a ervilha, vegetal no qual essa enzima tem sido mais estudada em sementes (Matheson e Richardson, 1976; Van-Berkel et al., 1991).

Degradação do amido em folha

Estudos recentes utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo mostraram a ocorrência de outras enzimas que participam desse processo de degradação do amido em folhas e que ainda não foram identificadas em sementes. Dentre essas enzimas estão a água-glicano diquinase (GWD) (Ritte et al., 2002), a fosfoglicano-água diquinase (PWD) (Kötting et al., 2005) e a enzima desproporcionadora 1 (DPE1) (Critchley et al., 2001). Além disso, trabalho realizado por Niittyylä e colaboradores (2004) identificou o primeiro transportador de maltose funcional em plantas, localizado na membrana dos cloroplastos. A grande importância desse trabalho se deve a elucidação da questão relativa aos tipos de carboidratos exportados dos cloroplastos. O conhecimento a cerca das formas de carbono exportado pode dar pistas importantes a respeito das rotas metabólicas envolvidas na mobilização do amido. Assim, a identificação destas novas proteínas resultaram num novo modelo de degradação do amido (figura 2), o qual apresenta diferenças significativas em relação ao modelo de degradação de sementes (figura 1).

Em folhas, uma etapa chave para o início da degradação do amido envolve a ação da enzima água-glicano diquinase (E.C. 2.7.9.4) que é responsável pela fosforilação de resíduos de D-glicose presentes nas cadeias de amilopectina (Ritte

Figura 2. Modelo de degradação do amido transitório em folhas, em que a despolimerização das cadeias pela enzima desramificadora e β -amilase depende da ação inicial da GWD e PWD, e resulta na produção predominante de maltose. Fonte: Smith et al. (2005).

et al., 2002), a qual ocorre através da formação de uma ligação ester entre o átomo C6 da molécula de D-glicose com o grupo fosfato obtido a partir do ATP (Ritte et al., 2006). Essa fosforilação alteraria a estrutura da molécula de amilopectina permitindo que essa sofra a ação de outras enzimas que atuam na degradação do amido.

A enzima fosfoglicano-água diquinase (E.C. 2.7.9.5) foi recentemente identificada em *Arabidopsis* (Kötting et al., 2005) e também realiza a fosforilação de resíduos de D-glicose presente nas cadeias de amilopectina. No entanto, essa enzima fosforila a D-glicose numa posição diferente da enzima água-glicano diquinase, envolvendo a formação de uma ligação ester entre o átomo C3 da molécula com o grupo fosfato obtido a partir do ATP (Ritte et al., 2006). De forma análoga ao que foi comentado para a GWD, essa fosforilação também contribuiria para a alteração da estrutura da molécula de amilopectina permitindo a ação de outras enzimas atuantes na degradação do amido.

Ainda dentre as enzimas atuantes no processo em folhas e que não ocorrem em sementes merece destaque a enzima desproporcionadora (E.C. 2.4.1.25), uma 4- α -D-glicosiltransferase que cataliza a transferência inter-molecular de um 1,4- α -glicano para outro, ou para a glicose. A forma plastidial dessa enzima estaria envolvida no metabolismo do amido transitório de folhas pela conversão de oligossacarídeos de cadeia mais longa, os quais serviriam de substrato para as enzimas amido-fosforilase e β -amilase. Plantas de *Arabidopsis* mutantes para a forma plastidial da enzima desproporcionadora apresentaram fenótipo de acúmulo de malto-oligossacarídeos (maltotriose e maltoheptaose), mas não de maltose (Critchley et al., 2001). Assim essa enzima proveria substratos com cadeias de tamanho mais propícios à ação das enzimas amido-fosforilase e β -amilase, aumentando a eficiência do processo de degradação.

Como comentado acima, a forma de carbono exportada da organela indica a provável rota metabólica operante na mobilização do amido. Estudo com plantas mutantes de *Arabidopsis* com fenótipo de acúmulo de amido permitiu a seleção de mutantes com elevados níveis de maltose. A partir da caracterização dessas plantas e com o auxílio de mapas genéticos foi possível a clonagem de um gene que codifica para um transportador funcional de maltose (Niittyylä et al., 2004). Trabalhos subsequentes mostraram que a maltose é a principal forma de carbono exportada dos cloroplastos durante a noite (Weise et al., 2004) na forma de β -maltose (Weise et al., 2005), a qual apenas pode ser obtida pela ação de uma β -amilase. Além disso, estudos envolvendo a deleção de genes de β -amilase em folhas de plantas de *Arabidopsis* (Smith et al., 2004; Kaplan e Guy, 2005) e de batata (Scheidig et al., 2002) resultaram em plantas com fenótipo de acúmulo de amido nas folhas. Essas evidências confirmam que a principal via de mobilização do amido em folhas passa pela ação da β -amilase, a qual pode exercer significativo controle sobre o processo. Isso difere significativamente do que se conhece sobre o sistema de degradação de amido em sementes, modelo no qual a α -amilase é a principal enzima responsável pela mobilização do amido. Outro aspecto que reforça a diferença entre os processos degradativos em folhas e sementes está no fato de que a enzima α -amilase não é necessária para que o processo de degradação do amido transitório ocorra nas folhas. Isso foi observado em estudo realizado com plantas silenciadas para os três genes conhecidos de α -amilase de *Arabidopsis* (AtAMY1, AtAMY2 e AtAMY3), as quais não apresentaram diferenças em relação a degradação do amido transitório (Yu et al., 2005).

Em *Arabidopsis*, além da enzima β -amilase, a enzima desramificadora do tipo isoamilase (E.C. 3.2.1.68) também apresenta um papel importante na degradação do

amido transitório. Isto pode ser observado em plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene ISA3, as quais apresentaram fenótipo de acúmulo de amido nas folhas (Zeeman et al., 1998). Outra enzima também atuante sobre o amido transitório e presente no sistema de degradação de amido em sementes é a enzima amido-fosforilase. À primeira vista, plantas de *Arabidopsis* transgênicas contendo inserções de T-DNA na região do gene que codifica para uma amido-fosforilase plastidial não apresentaram diferenças quanto a degradação do amido transitório. Entretanto, essas plantas apresentaram fenótipo de acúmulo de amido em condições de estresse abiótico, o que indica que essa enzima, nesse modelo, estaria envolvida na mobilização do amido quando a planta está sob condições de estresse (Zeeman et al., 2004).

Degradação do amido em banana

Na banana o conteúdo de amido pode alcançar até 25% do peso fresco na fase pré-climatérica, sendo reduzido a menos de 1% após o amadurecimento (Cordenunsi e Lajolo 1995). Essa redução é caracterizada pela conversão do amido em açúcares solúveis através da degradação enzimática do amido acumulado durante o desenvolvimento do fruto (Garcia e Lajolo 1988).

Algumas enzimas supostamente envolvidas neste processo, e já identificadas em banana, são a α -amilase (Vieira et al., 2006), β -amilase (Medina-Suárez et al., 1997; Purgatto et al., 2001 e Nascimento et al., 2006), amido-fosforilase (Mota et al., 2002; Mainardi et al., 2006) e a enzima desramificadora (Bierhals et al., 2004).

A enzima α -amilase, à semelhança do que ocorre em sementes, atuaria na iniciação da degradação do amido, formando dextrina-limite, a qual serviria de substrato para outras enzimas. Em bananas, trabalho do nosso grupo (Vieira et al.,

2006) identificou um gene de α -amilase que codifica para uma proteína que possui alta identidade com α -amilases de sementes (GenBank nºs de acesso [AAA33886](#), [AAA98615](#), [CAA09323](#), [BAA33879](#)) e extratos de *Pichia pastoris* expressando esse gene de α -amilase de banana apresentaram atividade amilolítica específica. É possível que, à semelhança do que foi visto anteriormente em sementes, o início da degradação dos grânulos de amido na polpa de banana ocorra pela ação de uma α -amilase. Entretanto, como nesse tecido o amido se encontra compartimentalizado em amiloplastos, uma estimativa mais apurada da efetiva contribuição da α -amilase na degradação do amido em bananas dependeria da capacidade dessa enzima ser direcionada aos amiloplastos. No trabalho realizado por Vieira e colaboradores (2006) também foi observado que o gene de α -amilase de banana contém um peptídeo sinal funcional, o qual permitiu que o produto de expressão fosse exportado para o meio extracelular na levedura. A presença de um peptídeo sinal também foi observada em duas α -amilases de arroz (α Amy3 e α Amy8). Plantas transgênicas contendo construções quiméricas dos genes repórteres GUS e GFP com o peptídeo sinal desses genes de α -amilases de arroz resultaram na expressão de GUS e GFP tanto no espaço intercelular como nos cloroplastos e amiloplastos (Chen et al., 2004). Esses dados obtidos em levedura para o gene da banana sugerem que essa α -amilase também apresenta um peptídeo sinal com função de endereçamento aos plastídeos, o que reforçaria a ideia de participação dessa enzima no metabolismo do amido em banana.

Em relação à β -amilase em bananas, os primeiros resultados do nosso grupo, obtidos por Garcia e Lajolo (1988), mostraram que o aumento da atividade dessa enzima foi concomitante à degradação do amido durante o amadurecimento do fruto. Posteriormente, Medina-Suárez e colaboradores (1997) identificaram o clone de

cDNA pBAN UU32 (GenBank nº de acesso **Z93112**), similar a uma sequência de β -amilase de batata-doce (GenBank nº de acesso **D01022**), como sendo representativo de um gene fortemente estimulado durante o amadurecimento. Trabalhos posteriores mostraram que tanto a degradação de amido como a expressão da β -amilase são fortemente afetados por hormônios vegetais. Em estudo realizado por Purgatto e colaboradores (2001) foi observada uma diminuição da transcrição e da atividade de β -amilase em amostras de fatias de bananas tratadas com auxina, sendo que essa diminuição apresentou correlação direta com a redução na taxa da degradação do amido nas amostras tratadas. Esse comportamento também foi observado por Nascimento et al. (2006) quando o fruto foi exposto ao antagonista do etileno (1-metilciclopropeno). Bananas expostas ao etileno exógeno apresentaram um aumento da expressão do gene da β -amilase, o qual foi concomitante ao aumento da degradação do amido nos frutos tratados (Nascimento et al., 2006).

Em banana, já foram isoladas duas formas de amido-fosforilase, as quais diferem em tamanho e especificidade pelo substrato (Mota et al., 2002). No entanto, o conteúdo dessas proteínas não apresentou correlação clara com a atividade fosforolítica durante o amadurecimento do fruto. Posteriormente, Mainardi et al. (2006) avaliaram a atividade das duas formas da amido-fosforilase e constataram que a atividade da forma plastidial da enzima apresentou correlação com a transcrição do provável gene da forma plastidial parcialmente isolado (GenBank nº de acesso **AY463025**), sendo verificado que a expressão desse gene foi modulada pela ação do etileno.

Outra enzima potencialmente envolvida na degradação do amido e que já foi identificada em banana é a enzima desramificadora de amido, a qual atuaria sobre

as ligações α -1,6 presentes nas moléculas de amilopectina. Em bananas, a enzima desramificadora parece ser do tipo isoamilase e existem indícios de que sua atividade e expressão sejam constantes durante o amadurecimento do fruto (Bierhals et al., 2004). Nesse trabalho foi obtida uma sequência parcial do gene da isoamilase de banana, a qual apresenta alta identidade com o gene ISA3 de *Arabidopsis* (Zeeman et al., 1998).

O papel da β -amilase na degradação do amido

A β -amilase (EC 3.2.1.2) é um membro da família 14 das glicosil hidrolases (Henrissat, 1991) e catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-D-glicosídicas, removendo subunidades de maltose das extremidades não-redutoras das cadeias de amilose e amilopectina (Beck e Ziegler, 1989). Além da atividade *in vitro* da β -amilase, o papel fisiológico desta enzima está diretamente relacionado com a localização subcelular da mesma, visto que seu substrato, o amido, encontra-se compartimentalizado em plastídeos na maioria dos tecidos vegetais.

Estudos com β -amilases presentes nas folhas de *Arabidopsis* (Lao et al., 1999; Sparla et al., 2006 e Fulton et al., 2008) e em folhas de batata (Scheidig et al., 2002) demonstraram que estas enzimas são capazes de ser endereçadas para o interior dos cloroplastos. Outros estudos utilizando imuno-localização mostraram que a enzima β -amilase localiza-se predominantemente ao redor dos grânulos de amido presentes no interior dos amiloplastos em tubérculos de batata em desenvolvimento (Ying et al. 2003) e um padrão similar de localização também foi observado durante o desenvolvimento de maçãs (Dapeng e Yongzhang, 2002). Contudo, há relatos (Chapman et al. 1972, Okita et al. 1979, Echeverria e Boyer 1986, Kakefuda et al. 1986, Lin et al. 1988, Beck e Ziegler 1989, Fincher 1989, Caspar et al. 1989, Lizzotte

et al. 1990, Monroe e Preiss 1990 e Silva et al. 1997) que apontam para uma atividade citoplasmática da β -amilase, o que traz incertezas quanto ao seu papel no processo de degradação do amido, pois a enzima estaria compartimentalizada em local distinto de seu substrato.

Apesar dessas incertezas quanto à localização subcelular de algumas β -amilases, recentes estudos têm demonstrado que a β -amilase é uma enzima importante para a degradação do amido transitório presente nas folhas. Niittyylä et al. (2004) identificaram um transportador de maltose em plantas de *Arabidopsis* que apresentavam fenótipo de acúmulo de amido e maltose nas folhas devido a mutação desse gene. Esse fenótipo de acúmulo de amido também foi encontrado após a deleção de genes de β -amilases em plantas de *Arabidopsis* (Smith et al., 2004; Kaplan and Guy, 2005; Fulton et al., 2008) e batata (Scheidig et al., 2002).

Com o sequenciamento do genoma da planta *Arabidopsis thaliana* foi possível identificar nove genes que codificam para proteínas com sequências similares a de outras β -amilases de plantas. Estudos funcionais com os genes de β -amilase de *Arabidopsis* ct-BMY8 e tr-BMY7 mostraram que estes genes, de fato, codificam para proteínas com atividade hidrolítica (Lao et al., 1999; Sparla et al., 2006). Entretanto, recentemente, Fulton e colaboradores (2008) mostraram a β -amilase BMY6 de *Arabidopsis* (também conhecida como BAM4) como uma enzima importante no metabolismo do amido transitório mas que não apresenta atividade catalítica sobre substrato sintético PNPG5 (p -nitrophenylmaltopentaoside) específico para β -amilase. Este trabalho propõe um novo papel para a atuação dessa β -amilase no processo de degradação do amido, no qual essa proteína seria responsável por interações com outras enzimas também atuantes na degradação do amido como a alfa-glicano água diquinase (GWD) e isoamilase (ISO) e essa

interação facilitaria a atividade das demais β -amilases (com atividade hidrolítica) para atuar sobre o amido. Dados recentes mostraram que a GWD recombinante proveniente de *Arabidopsis* estimula a atividade hidrolítica *in vitro* das formas recombinantes de β -amilase ct-BMY8 e tr-BMY7 de *Arabidopsis* sobre grânulos isolados dessa planta e esse incremento de atividade foi intensificado com a presença da isoamilase recombinante de batata (Edner et al., 2007).

Essas evidências apontam para uma especialização da atuação das diferentes β -amilases na regulação do metabolismo do amido transitório em *Arabidopsis* e, como este modelo de degradação apresenta diversas semelhanças com os resultados obtidos até o momento para a banana, é de interesse verificar se existe tal nível de especialização para essa enzima no processo de degradação do amido desse fruto. Somado a isso, a banana, por ser um fruto que acumula uma quantidade alta de amido durante o desenvolvimento e por sua rápida degradação durante o climatério, constitui um interessante modelo de estudo de mobilização de carboidratos. Deste modo, torna-se extremamente interessante aprofundar os conhecimentos a respeito do papel da enzima β -amilase nesse processo.

Escopo da tese

Os dados relativos à enzima β -amilase de banana ainda não são suficientes para comprovar o papel fisiológico dessa enzima no processo de degradação do amido que ocorre durante o amadurecimento do fruto. Em vista disso, um dos objetivos do projeto de tese foi obter mais informações a respeito da funcionalidade desse gene através do isolamento da região codificadora completa e verificar se esta codifica de fato para uma enzima com atividade de β -amilase.

O trabalho apresentado a seguir (Capítulo 2) reporta alguns esforços feitos na tentativa de cumprir esse objetivo do projeto. Neste trabalho, o início correto de transcrição do gene maBMY foi determinado por reação de extensão de um iniciador específico (primer extension). Deste modo, foi obtida a sequência completa do cDNA desse gene, sendo que a região codificadora completa foi clonada em vetor de expressão para *E. coli*, e o produto de expressão desse gene foi avaliado quanto à sua identidade por sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas e por ensaio imunológico com soro anti- β -amilase de banana. Além disso, ensaios de atividade *in vitro* foram realizados para comprovar a funcionalidade da proteína heteróloga. Adicionalmente, o correspondente genômico da porção transcrita do gene maBMY foi isolado para determinar a estrutura de exons-introns do gene, bem como o número de cópias presentes no genoma da banana, determinado por análise de Southern blotting. Além disso, como a localização subcelular é um importante parâmetro para definir o papel fisiológico dessa enzima, a destinação subcelular do produto do gene maBMY também foi avaliada nesse trabalho.

O segundo objetivo da tese foi obter mais informações a respeito da regulação da transcrição do gene da β -amilase, uma vez que resultados anteriores mostraram que sua transcrição parece ser modulada por fatores hormonais. Para isso, foi realizada a caracterização da região promotora do gene maBMY, como apresentado no Capítulo 3. Inicialmente, a região 5' acima do início da transcrição do gene maBMY foi obtida por técnica de iPCR, e com base na sua sequência de nucleotídeos foram realizadas análises *in silico* para identificar possíveis elementos regulatórios para este gene. Em seguida, com o objetivo de avaliar quais motivos identificados *in silico* seriam funcionais foram feitas construções contendo o gene repórter GUS sob controle de porções da região promotora do gene maBMY em

ensaio transiente em plantas de tabaco. Além disso, foram obtidas plantas de tabaco contendo o promotor mais a porção 5'UTR do gene maBMY para verificar a distribuição espacial da transcrição mediada por este promotor em sistema heterólogo de expressão. Ainda nesse trabalho a transcrição do gene maBMY foi verificada em amostras submetidas à baixa temperatura e os dados obtidos foram comparados com os teores de etileno e de auxina encontrados.

A última parte da tese (Capítulo 4) apresenta as considerações finais baseadas no conjunto de resultados e discussões apresentados nos capítulos precedentes.

Referências

- Alves, E.J. 1999. A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2 edição. Embrapa-SPI, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. 585p.
- Beck, E., Ziegler, P., 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 40, 95-117.
- Bierhals, J. D., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R, Nascimento, J. R. O., 2004. Activity, Cloning, and Expression of an Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzyme from Banana Fruit. *J. Agr. Food Chem.* 52, 7412-7418.
- Caspar, T., Lin, T.P., Moroe, J., Bernhard, W., Spilatro, S., Preiss, J., Somerville, C., 1989. Altered regulation of β -amylase activity in mutants of *Arabidopsis* with lesions in starch metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 5830-5833.
- Chapman, G.W., Pallas, J.E., Mendicino, D., 1972. The hydrolysis of maltodextrin by a β -amylase isolated from leaves of *Vicia faba*. *Biochem. Biophys. Acta.* 276, 491-507.
- Chen, M.H., Huang, L.F., Li, H., Chen, Y.R., Yu, S.M., 2004. Signal peptide-dependent targeting of a rice α -Amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. *Plant Physiol.* 135, 1367-1377.
- Cordenunsi, B.R, Lajolo, F.M., 1995. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agr. Food Chem.* 43, 347-351.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., SM Smith, S.M., 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 26, 89-100.

- Daussant, J., Zbaszyniak, B., Sadowski, J., Wiatroszak, I. 1981. Cereal β -amylase: immunochemical study on two enzyme-deficient inbred lines of rye. *Planta*. 151, 176-179.
- Dapeng, Z., Yongzhang, W., 2002. β -Amylase in development apple fruits: activities, amounts and subcellular location. *Sci. China Ser. C* 45, 429–440.
- Dinges, J.R., Colleoni, C., James, M.G., Myers, A. 2003. Mutational analysis of the pullulanase type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell*. 15, 666-680.
- Echeverria, E., Boyer, C.D., 1986. Localization of starch biosynthesis and degradative enzymes in maize leaves. *Am. J. Bot.* 73, 167-171.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M., and Ritte, G., 2007. Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidic β -amylases. *Plant Physiol.* 145, 17-28.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Heijne, G.V., 1999. ChloroP: a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.
- FAO., 2005. World Agricultural Information Centre. Statistics. <http://www.fao.org>.
- Fincher, G.B., 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germination cereal grains. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 40, 305-346.
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M., Zeeman, S.C., 2008. β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -Amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*. 20, 1040-1058.

- Garcia, E., Lajolo, F.M., 1988. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *J. Food Sci.* 53, 1181-1186.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Kakefuda, G., Duke, S.H., Hostak, M.S., 1986. Chloroplast and extrachloroplastic starch-degrading enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta.* 168, 175-182.
- Kapila, J., De-Rycke, R., Van-Montagu, M., Angenon, G., 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122, 101-108.
- Kaplan, F., Guy, C.L., 2005. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44, 730-743.
- Kotting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., Ritte, G., 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase. *Plant Physiol.* 137, 242-252.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., Kavanagh, T.A., 1999. An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J.* 20, 519-527.
- Lin, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., Kavanagh, T.A., 1988. Subcellular localization and characterization of pea epicotyl β -amylase in *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiol.* 88, 251-267.
- Lizzotte, P.A., Henson, C.A., Duke, S.H., 1990. Purification and characterization of pea epicotyl β -amylase. *Plant Physiol.* 92, 615-621.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J., Ritte, G., 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* 10, 130-137.

- Mainardi, JA, Purgatto, E., Vieira, A., Bastos, WA, Cordenunsi, B.R, Nascimento, J.RO., Lajolo, F.M., 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agr. Food Chem.* 54, 7294-7299.
- Matheson, NK, Richardson, RH. 1976. Starch phosphorylase enzymes in developing and germinating pea seeds. *Phytochem.* 15, 887-892.
- Medina-Suárez, R, Manning, K., Fletcher, J., Aled, J., Bird, C.R, Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 differing ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453-461.
- Monroe, J.D., Preiss, J. 1990. Purification of a β -amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. *Plant Physiol.* 94, 1033-1039.
- Mota, RV., Cordenunsi, B.R, Nascimento, J.RO., Purgatto, E, Rosseto, M.RM., Lajolo, F.M., 2002. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* 216, 325-333.
- Nascimento, J.RO., Junior, A.V., Bassinello, P.Z., Cordenunsi, B.R, Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Tec.* 40, 41-47.
- Niittyylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., Zeeman, S.C., 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science.* 303, 87-89.

- Okita, T.W., Greenberg, E., Kuhn, D.N., Preiss, J. 1979. Subcellular localization of starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* 64, 187-192.
- Purgatto, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., 2001. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta* 212, 823-828.
- Ritchie, S., Swanson, S.J., Gilroy, S., 2000. Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Sci. Res.* 10, 193-212.
- Ritte, G., Lloyd, J.R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., Steup, M., 2002. The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7166-7171.
- Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kotting, O., Steup, M., 2006. Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Letters*. 580, 4872-4876.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, A., Lloyd, J.R., Kossmann, J., 2002. Downregulation of a chloroplast-target β -amylase leads to a starch excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30, 581-591.
- Silva, P.M.F.R., Estmond, P.J., Hill, L.M., Smith, A.M. 1997. Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta*. 203, 480-487.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M., 2005. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 73-98.

- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., Smith, A.M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 136, 2687-2699.
- Sparla, F., Costa, A., Schiavo, F.L., Pupillo, P., Trost, P., 2006. Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 840–850.
- Sun, Z., Henson, C.A., 1991. A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 298-305.
- Van-Berkel, J., Conrads-Struch, J., Steup, M., 1991. Glucan-phosphorylase forms in cotyledons of *Pisum sativum* L.: localization, development change, in-vitro translation, and processing. *Planta.* 185, 432-439.
- Vieira A., Nascimento J.R.O., Lajolo F.M., 2006. Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurin in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Agr. Food Chem.* 54, 8222-8228.
- Weise, S.E., Weber, A.P.M., Sharkey, T.D., 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta.* 21, 474-482.
- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P., Sharkey, T.D., 2005. β -Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* 137, 756-761.
- 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., 2005. α -Amylase is not required for

breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. J. Biol. Chem. 280, 9773-9779.

Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Week, M., Dunstan, H., Haldimann, P, Bechtold, N., Smith, A.M., Smith, S.M., 2004. Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress, Plant Physiol. 135, 849-858.

Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M., Chen, J., 1998. Amutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. Plant Cell. 10, 1699-1712.

CAPÍTULO 2

Clonagem e expressão em *Escherichia coli* do gene maBMY que codifica para uma β -amilase endereçada aos plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana

RESUMO

Os frutos de banana possuem alto teor de amido, o qual é convertido em açúcares solúveis durante o amadurecimento. Dados anteriores mostraram que a expressão da enzima β -amilase é concomitante a degradação do amido durante o amadurecimento, entretanto, não há evidências funcionais de que esse gene codifica, de fato, para uma enzima com atividade hidrolítica. Para avaliar a funcionalidade dessa enzima a região codificadora do gene maBMY foi isolado de polpa de banana e expressa em *E. coli* para uma posterior caracterização da proteína recombinante. A região transcrita do gene maBMY apresentou 1.977 pb e um quadro de leitura de 1.599 pb correspondente a uma proteína com 532 aminoácidos. Adicionalmente, uma análise com um programa de predição de endereçamento subcelular identificou a presença de um peptídeo de trânsito cloroplastidial na sequência da proteína precursora codificada pelo gene maBMY. Baseado nestes dados, o provável precursor e a forma madura dessa β -amilase de banana foram clonados em um vetor de expressão e proteínas de tamanho próximo a 60 e 50 kDa foram obtidas. Para confirmar o endereçamento plastidial, construções contendo a região codificadora completa do gene BMY, com e sem o provável peptídeo de trânsito, foram clonadas no mesmo quadro de leitura do gene repórter eGFP e estas construções foram avaliadas em ensaios de transformação transiente.

As imagens de microscopia confocal confirmaram que o gene maBMY codifica de fato para uma proteína endereçada aos cloroplastos devido a presença de um peptídeo de trânsito na região amino terminal da proteína. Uma análise de Southern blotting indicou que o gene maBMY ocorre como cópia única no genoma

da bananeira. Apesar de não ter sido detectada atividade hidrolítica para os produtos de expressão em *E. coli* das construções contendo o gene maBMY, os dados anteriormente mencionados reforçam a ideia de que o gene maBMY pode ter um papel importante no processo de degradação do amido durante o amadurecimento banana.

INTRODUÇÃO

O adoçamento é uma das características mais importantes do amadurecimento da banana e essa característica se deve ao teor de açúcares solúveis, principalmente sacarose (Garcia and Lajolo, 1988). Nascimento e colaboradores (1997) mostraram que a síntese de sacarose em frutos de banana é limitada pela degradação do amido acumulado durante o desenvolvimento do fruto uma vez que a enzima sacarose-fosfato sintase apresenta altos níveis de atividade e a formação de sacarose apenas ocorre após o início do processo de degradação do amido.

Diversas enzimas envolvidas no metabolismo do amido como a α -amilase (Vieira et al., 2006), enzima desramificadora de amido tipo isoamilase (Bierhals et al., 2004), amido fosforilase (Mota et al., 2002; Mainardi et al., 2006) e β -amilase (Medina-Suarez et al., 1997; Purgatto et al., 2001; Nascimento et al., 2006) foram identificadas em frutos de banana durante o amadurecimento. Os padrões de atividade e expressão observados para estas enzimas sugerem um mecanismo de degradação do amido em banana semelhante ao que ocorre na folhas, sendo distinto do modelo de metabolismo de amido dos cereais. Nas folhas, as β -amilases tem sido apontadas como importante enzimas responsáveis pela degradação do amido sob condições fisiológicas normais (Smith et al., 2005).

A β -amilase (EC 3.2.1.2) é uma α -1,4-glicano maltohidrolase que cataliza a remoção de uma maltose β -anomérica das extremidades não-redutoras das cadeias de amido e glicogênio. Em plantas, o papel fisiológico dessa enzima nas folhas é reforçada pela existência de um transportador de maltose nos cloroplastos (Niittyylä et al., 2004). Uma vez que a maltose na forma de seu β -anômero (Weise et al.,

2005) é a forma de carbono mais exportada dos cloroplastos durante a noite (Weise et al., 2004), fica claro que esse importante metabólito pode ser apenas produzido pela ação de uma enzima β -amilase cloroplastidial.

Evidências do papel da β -amilase no metabolismo do amido transitório foram obtidas utilizando plantas transgênicas. Uma β -amilase cloroplastidial identificada em folhas de batata teve sua expressão suprimida por RNA antisentido e resultou em plantas com fenótipo de acúmulo de amido quando comparadas com as plantas selvagens (Scheidig et al., 2002). De modo similar, plantas de *Arabidopsis* foram silenciadas para os genes *BMY6* (Smith et al., 2004; Fulton et al., 2008) e *BMY8* (Kaplan and Guy, 2005; Fulton et al., 2008) os quais codificam para β -amilases cloroplastidiais e as plantas silenciadas para ambos os genes também apresentaram fenótipo de acúmulo de amido.

A atividade enzimática *in vitro* já foi avaliada para β -amilases de cevada, batata doce, soja, folha de batata e *Arabidopsis* através de ensaios enzimáticos com proteínas heterólogas de β -amilase expressas em *E. coli* (Yoshigi et al., 1994; Yoshigi et al., 1995; Yoshida and Nakamura 1991; Totsuka et al., 1993; Adachi et al., 1998; Scheidig et al., 2002; Lao et al., 1999; Sparla et al., 2006; Edner et al., 2007; Fulton et al., 2008). Uma vez que o papel fisiológico da enzima β -amilase também é dependente do seu local de ação, devido ao fato de seu substrato (amido) ser compartimentalizado em plastídeos, diversos esforços já foram feitos na tentativa de confirmar sua sublocalização celular. Em *Arabidopsis*, dos nove genes de β -amilase identificados (Laby et al., 2001), quatro deles (*BMY6*, *BMY7*, *BMY8* e *BMY9*) foram experimentalmente confirmados codificadores de β -amilases endereçadas aos cloroplastos (Sparla et al., 2006; Lao et al., 1999, Fulton et al., 2008). Scheidig et al. (2002) demonstraram que uma β -amilase de folha de batata-doce foi capaz de ser

importada para o interior de cloroplastos isolados de ervilha. Ying et al. (2003) mostraram por imunolocalização que uma β -amilase de tubérculo de batata-doce foi predominantemente localizada no interior dos plastídeos. Até o momento, a única descrição da localização subcellular de uma β -amilase de tecidos de frutos foi reportada por Dapeng and Yongzhang (2002), os quais demonstraram a presença de uma β -amilase por imunolocalização na periferia dos grânulos de amido de amiloplastos de células de polpa de maçãs.

Em bananas, existem diversos resultados que sugerem que a atividade de β -amilase contribui para a diminuição do conteúdo de amido durante o amadurecimento. Garcia and Lajolo (1988) reportaram aumento da atividade de β -amilase no climatério e Purgatto et al. (2001) mostraram que a transcrição e atividade enzimática da β -amilase de banana parecem ser afetadas por níveis de AIA durante o amadurecimento. Nascimento et al. (2006) demonstraram que a atividade e expressão da β -amilase de banana esta correlacionada com a degradação do amido e que esse gene pode ser responsivo a aplicação de etileno exógeno e suprimida pela presença de 1-MCP.

Apesar dos relatos sugerirem que a β -amilase de banana pode ter um papel importante no metabolismo do amido ainda não há evidências suficientes de que esse gene codifica de fato para uma enzima funcional com atividade amilolítica. Este trabalho apresenta a clonagem de um cDNA completo de um gene de β -amilase expresso nas polpas do fruto da banana e também da clonagem do seu respectivo clone genômico. O sítio de início de transcrição desse gene foi determinado pela técnica de extensão de iniciador e o número de cópias desse gene no genoma da bananeira foi estimado por Southern blotting. Para avaliar a funcionalidade da proteína codificada pelo gene da β -amilase, fragmentos de cDNA contendo a região

codificadora desse gene foram expressas em *E. coli* e caracterizadas por ensaios imunológicos e de atividade. Além disso, a localização subcelular dos produtos quiméricos (maBMY e eGFP) foi avaliada através de ensaios transientes de expressão em plantas de tabaco e epiderme de células de cebola.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Bananas verdes e maduras e folhas de bananeira (*Musa acuminata* AAA, cv. Nanicão) foram obtidas de um produtor local com um dia pós-colheita. Os frutos foram armazenados em câmaras a 20°C para amadurecer naturalmente. Amostras representativas de frutos maduros foram descascadas, cortadas e congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para análises posteriores. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. XHFD8) foram utilizadas nos procedimentos de agroinfiltração.

Extração de ácidos nucleicos

Folhas novas de bananeira foram utilizadas para extração de DNA genômico de acordo com o método CTAB (Doyle and Doyle, 1987). O RNA total foi extraído de polpa de frutos de banana como descrito por López-Gómez and Gómez-Lim (1992).

Ensaio de extensão de iniciador específico

Cinco microlitros de uma solução contendo 10 pmoles do iniciador reverso BMY PR2 (5' -ATTTCAGAAGGGAGGAGG-3') e 2 µg do RNA total foram aquecidos a 70°C por 5 min, resfriados em gelo, incubados a 50°C por 20 minutos e depois a 45°C por 5 min. Após o anelamento do iniciador, uma reação de extensão foi feita com a adição de 4 µL do tampão ImProm-II reverse transcriptase buffer 5X (Promega), 50 U da enzima ImProm-II reverse transcriptase (Promega), 4 µL de 25mM MgCl₂, 2 µL 5mM dDTP, 3.3 pmoles [α -P³²]dCTP (GE Healthcare, 3000Ci/mmol), seguido por incubação a 45°C por 20 min. Um microlitro de 10 mM

dCTP foi adicionado a reação de extensão e esta foi mantida na mesma temperatura por mais 20 minutos, sendo finalizada por aquecimento a 70°C por 3 min. Para determinar o sítio de início de transcrição um padrão de sequenciamento foi feito utilizando o mesmo iniciador reverso empregado na reação de extensão do iniciador. As reações com incorporações de didesoxinucleotídeos foram feitas com o Kit T7 sequenase (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante, usando também [α -P³²]dCTP (GE Healthcare, 3000Ci/mmol) e uma cópia genômica do gene da β -amilase como molde. Os produtos de reação foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante (6% acrilamida e 7M uréia) e revelados por autoradiografia.

Clonagem do cDNA completo da β -amilase e de seu respectivo clone genômico

Para isolar o clone completo do cDNA da β -amilase o iniciador sentido BMYS1 (5'-GAGAGAAGATCTCAAACCATCCCCAAATCCCAGC-3'), o qual foi desenhado com base nos resultados do ensaio de extensão do iniciador, foi empregado numa reação de RT-PCR com o iniciador reverso BMYS3UTR (5'-TGAACGAGAATATTAATATG-3'). O cDNA empregado na reação da PCR foi obtido a partir do RNA total utilizando o Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Cada reação de PCR (volume final de 20 μ L) continha 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 0.1 μ L da enzima High Fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen, 5 U/ μ L), 200 μ M de cada dNTP, 1.5 mM MgSO₄, tampão 1 X PCR (Invitrogen), e 0.5 μ L da reação de síntese de cDNA. As reações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-200 (MJ Research) por 35 ciclos, com cada ciclo consistindo de 94°C por 30 segundos para denaturação do DNA molde, 60°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores, e 68°C por 2 minutos para a

polimerização. Ao final dos ciclos, as amostras foram incubadas por 3 minutos a 68°C, e deixadas a 4°C até a análise em gel. Para isolar o gene da β -amilase uma reação de PCR foi feita utilizando o DNA genômico como molde nas mesmas condições descritas acima. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de 1 % agarose/TPE e visualizados com brometo de etídeo. Bandas de tamanho esperado foram cortadas do gel, purificadas com o Kit Wizard SV Gel and PCR Purification System (Promega) e clonadas com o Kit pGEM-T Easy Vector System (Promega).

Sequenciamento e análise do DNA

O Sequenciamento foi realizado automaticamente (ALF Express DNA Sequence Analyser, GE Healthcare) utilizando o Kit Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequence (GE Healthcare). O sequenciamento dos plasmídeos contendo o gene de β -amilase e seu cDNA foram feitos com os iniciadores M13 e por “primer walking”, enquanto o sequenciamento dos vetores de expressão contendo a região codificadora da β -amilase foram feitos com os iniciadores T7 promoter e T7 terminator. As sequências obtidas foram analisadas com o programa AFLwin Sequence Analyser v. 2.11.01 (GE Healthcare).

Montagem das construções para localização subcelular

O plasmídeo p35S/eGFP, que foi utilizado como controle positivo para os ensaios de expressão transiente, foi montado a partir da subclonagem do promotor duplicado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), do terminador do gene da nopalina sintase (NOS), ambos do vetor pCAMBIA1391Z (Hajdukiewicz et al., 1994), e com o gene que codifica para a uma proteína fluorescente (enhanced green

fluorescent protein - eGFP) do vetor pHGWFS7 (Karimi et al., 2002) para dentro do vetor pTZ57R (Fermentas). Para avaliação da localização subcellular do gene da β -amilase cinco construções foram feitas: 1- p35S/5UTR/CDS/eGFP: contendo a região 5'UTR e a região codificadora completa do gene da β -amilase; 2- p35S/CDS/eGFP: com a sequência precursora do gene da β -amilase; e 3- p35S/CDS-TP/eGFP: contendo a sequência correspondente a proteína madura da β -amilase (sem o peptídeo de trânsito predito *in silico*). As construções 1, 2 e 3 contêm diferentes regiões do gene da β -amilase, as quais foram obtidas por amplificação por reação de PCR utilizando os iniciadores BMY S1 (5'-GAGAGAAGATCTCAAACCATCCCCAAATCCCAGC-3'), BMY N-TERM1 (5'-GAGAGAAGATCTGATGGAGGCAGGATTGATGG-3') ou BMY N-TERM2 (5'-ATGGTGGGAAGAGAAAGCATCGCCG-3') com o iniciador reverso BMY C-TERM1 (5'-GAGAGAAGATCTTGCTGACTGCAGCTCTCG-3') e utilizando a enzima High Fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen), como descrito anteriormente. Os produtos de amplificação para as construções 1 e 2 foram tratados com a enzima de restrição *Bgl* II e clonados dentro do plasmídeo p35S/eGFP no seu sítio *Bam* HI. Para a terceira construção, o seu respectivo produto da PCR foi clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas) em seu sítio de clonagem T/A, e após uma seleção por PCR, colônias contendo a construção na orientação correta foram selecionadas. O plasmídeo foi tratado com as enzimas *Bam* HI e *Bgl* II e o produto da restrição foi subclonado dentro do plasmídeo p35SeGFP no sítio *Bam* HI.

As construções 4 e 5 foram feitas através da subclonagem das sequências dos plasmídeos p35S/eGFP (controle) e p35S/5UTR/CDS/eGFP (construção 1) dentro do vetor pCAMBIA1300 (Hajdukiewicz et al., 1994) nos sítios *Kpn* I e *Hind* III para obter os plasmídeos para os procedimentos de agroinfiltração.

Ensaio de transformação transiente

As construções p35S/eGFP, p35S/5UTR/CDS/eGFP, p35S/CDS/eGFP e p35S/CDS-TP/eGFP foram introgridas em células de epiderme de cebolas através de microbombardeamento de microprojéteis. Partículas de tungstênio M-10 (BioRad) foram recobertas com 2 µg de DNA plasmidial por precipitação com 0.1 M de espermidina e 2.5 M de CaCl₂ e ressuspensas em etanol absoluto. Fatias de cebola foram bombardeadas em um dispositivo de microbombardeamento utilizando uma pressão de 1100 psi em um ambiente de vácuo parcial de 25 mmHg. Cada construção foi bombardeada três vezes.

As construções dos plasmídeos binários contendo o gene repórter eGFP foram introgridas em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 [pMP90] pelo método de congelamento-descongelamento com nitrogênio líquido e os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB-agar contendo antibióticos apropriados (50 µg/mL de canamicina, gentamicina e rifampicina). Uma colônia para cada construção foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibióticos e incubada por 16 horas a 28°C. Três mililitros deste pre-inóculo foram aplicados em 30 mL de meio LB contendo 10mM MES pH 5.7, 20 µM acetoseringona e 50 µg/mL dos antibióticos canamicina, gentamicina e rifampicina. Após o período de incubação a 28°C, as culturas de *Agrobacterium* foram recolhidas por centrifugação e resuspensas em meio de infiltração (10mM MES pH 5.7, 10 mM CaCl₂ and 150 µM acetoseringona) para uma O.D_{600nm} de 0.5, e incubadas por 16 horas a temperatura ambiente antes da infiltração das folhas. Plantas de tabaco foram agroinfiltradas para cada construção avaliada e após 48 horas pós-indução, algumas folhas infiltradas foram removidas e visualizadas em um microscópio

confocal e o material restante foi congelado em N₂ líquido e armazenado a 80°C para análises posteriores.

Imagem confocal

A fluorescência foi observada com um microscópio confocal a laser Carl Zeiss LSM 510 operando com laser de argônio para monitorar a fluorescência. As células de tabaco e epiderme de cebola foram observadas em aumentos de x100 e x40, respectivamente. Os fluoróforos foram excitados utilizando um comprimento de onda de 488 nm e o sinal de emissão para o eGFP foi coletado entre 505 e 530 nm. A autofluorescência da clorofila foi coletada entre 617 e 630 nm.

Expressão e purificação de β -amilases recombinantes

O vetor de expressão pCRT7/NT-E3 (Invitrogen) foi restringido com *Pst* I e *Hind* III para remover o gene de quinase humana presente nesse vetor e um adaptador formado pelo anelamento dos iniciadores AD S (5'-AGCTTGTTTAAACAGGCCTCTGCA-3') e AD R (5'-GAGGCCTGTTTAAACA-3') foram ligados ao vetor aberto. Esse novo vetor de expressão foi nomeado pCRT7/NT-AD e passou a conter dois novos sítios de restrição abruptos *Stu* I e *Pme* I. Fragmentos contendo as regiões que codificam para as formas precursora e madura do gene da β -amilase foram amplificadas com os iniciadores específicos BMY N-TERM1 (5'-GAGAGAAAGATCTGATGGAGGCAGGATTGATGG-3'), ou BMY N-TERM2 (5'-GAGAGAAAGATCTGGTGGGAAGAGAAAGCATCGCCG-3') e BMY C-TERM1 (5'-TCTCTCTCTAGAAATTATGCTGACTGCAGCTCTCG-3') usando a enzima KOD DNA polymerase (Novagen). Os fragmentos obtidos foram subclonados no vetor pCRT7/NT-AD aberto com as enzimas *Bam* HI e *Pme* I

utilizando os sítios *Bgl* II presentes nos iniciadores BMY N-TERM1 e BMY N-TERM2 para gerar as construções pHis-maBMY PRE (precursor) e pHis-maBMY MAT (maduro), os quais contém um motivo de seis histidinas (6xHis-Tag) na porção amino terminal. A expressão das construções pHis-maBMY foram realizadas em *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS (Novagen) a 37°C por 4 h ou a 20°C por 16 horas e a indução da expressão recombinante foi feita com a adição de 1 mM de IPTG. As frações totais e solúveis dos extratos protéicos foram obtidas a partir de células induzidas contendo tanto o vetor pCRT7/NT-AD vazio (sem inserto) como o vetor com as construções pHis-maBMY. Células de *Escherichia coli* obtidas a partir de um volume de cultura de 500 mL foram coletadas por centrifugação, resuspendidas e lisadas com 2 mL de BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) de acordo com as especificações do fabricante. Após uma centrifugação de 20.000g por 15 min a 4°C, os lisados de *E. coli* contendo a fração das proteínas solúveis foram avaliados.

As proteínas solúveis His-maBMY foram purificadas dos extratos de *E. coli* através de cromatografia de afinidade utilizando 1 mL da resina Ni²⁺ sepharose 6 fast flow (GE Healthcare) equilibrada com o tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7.4, 0.5 M NaCl e 20 mM de imidazol. As etapas de lavagem e eluição foram realizadas com o mesmo tampão descrito acima, mas acrescidos de 60 e 500 mM de imidazol, respectivamente. As proteínas eluídas foram dializadas em tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT e 1 mM benzamidina) antes de serem empregadas nos ensaios de atividade enzimática.

Redobramento das proteínas maBMY insolúveis

O precipitado obtido após centrifugação dos lisados de *E. coli* (induzidos a 37°C) foram lavados duas vezes com 5 mL da solução diluída (10x) de BugBuster Protein Extraction Reagent (Merck) e os corpos de inclusão remanescentes foram solubilizados em 20 mM de fosfato de sódio pH 7.4, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM e uréia 8M a 37°C em agitação por 16 horas. O redobramento das proteínas denaturadas foi feito utilizando a metodologia de diluição rápida, em que 1 mg de proteína foi diluída em 100 mL do mesmo tampão, sem uréia, sob agitação constante por 30 minutos. O redobramento também foi conduzido sob diversas condições redox empregando o mesmo tampão descrito acima, mas agora adicionado 3 mM de cisteína e 0.3 mM de cistina. A solução de proteína diluída foi aplicada em uma coluna de Ni⁺ pre-equilibrada, e as etapas de lavagem e eluição foram realizadas como descrito anteriormente.

Determinação da atividade hidrolítica

A atividade da β -amilase recombinante foi realizada de acordo com o descrito por McCleary e Codd (1989) em um volume final de 100 μ L contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, 2U de α -glicosidase (Sigma), 0.1 μ mol de p-nitrofenilmaltopentaosídeo PNPG5 (Sigma) e 40 μ L de extrato de bactéria. Após incubação a 37°C por um período adequado, as reações foram interrompidas com Trizma-base 1% (p/v) e o p-nitrofenol liberado foi mensurado a 410 nm. A concentração de proteína presente nos extratos de bactéria foi determinado pela metodologia de Bradford (1976). Como reportado por Sparla et al. (2006) uma β -amilase de *Arabidopsis* (tr-BMY7) apenas apresentou atividade em um ambiente reacional redutor. Baseado nesta informação, a atividade dos produtos

do gene maBMY também foram avaliadas em meio reacional contendo 1, 5 e 10 mM de DDT.

Zimogramas de atividade hidrolítica

Dez microgramas de extrato de proteína obtidos a partir dos extratos de bactéria foram aplicados em gel PAGE nativo (10% acrilamida) e separados a 100V por 3 h a 4°C. As proteínas foram resolvidas em PAGE nativo e transferidas para outro gel de PAGE nativo contendo amilopectina (Sigma) numa concentração final de 0.1% por 1h a 4°C e 100V. Os géis foram incubados por 16 horas a temperatura ambiente no tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1mM e DTT 1 mM. A atividade hidrolítica foi identificada através da coloração do gel com solução de iodo (I₂ 13 mM e KI 40 mM).

Western blotting

Os extratos de proteínas totais obtidos de células de *E. coli* induzidas e não-induzidas carregando os vetores pHIS-maBMY PRE e MA foram separadas em gel SDS-PAGE 10% por 1.5 h a 150 V, e transferidas para a membrana Hybond-C Extra (GE Healthcare) a 100V por 1 h. O processo de western blotting foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989) utilizando uma diluição 1:1.000 do soro anti-β-amilase (Nascimento et al., 2006). Um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Sigma) foi utilizado na diluição de 1:30.000 e o complexo antígeno-anticorpo foi detectado pela incubação da membrana em 10 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM adicionado de 66 µL de NBT (75 mg/mL) e 33 µL BCIP (50

mg/ml). A reação de marcação foi interrompida com a adição de 200 μ L de EDTA 500 mM pH 8.0.

Identificação de proteínas por LC-MS/MS

As bandas de 60 e 50 kDa (figura 6) foram removidas dos géis de SDS-PAGE e digeridas *in gel* com tripsina. As misturas dos peptídeos obtidos foram submetidas a um cromatógrafo líquido Cap-LC acoplado a um espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API (Waters). Cinco microlitros de amostra foram aplicados numa coluna nanoease trapping 0.18 x 23.5mm (Waters) para pre-concentração da amostra, seguida da separação dos peptídeos em uma coluna Symmetry 300 C18 3.5 μ m, 75x100mm (Waters). Os peptídeos foram eluídos em um gradiente linear de 60 minutos com o solvente B [ACN 95 % (v/v), ácido fórmico em água 0.1% (v/v)] a um fluxo de 250nL.min⁻¹. O solvente A consistiam de ACN 5% (v/v), ácido fórmico em água 0.1% (v/v). Todas as análises foram realizadas utilizando o modo íon positivo com uma voltagem na agulha de 3 kV. A amplitude de massa foi ajustada para o intervalo de 300 a 2000 m/z, e apenas os espectros de massa mais intensos (15 counts) foram registrados. Os íons precursores com cargas múltiplas foram selecionados para fragmentação e o sequenciamento dos peptídeos foi feito com o programa de MassLynx (Waters), alterando do modo MS para MS/MS e depois retornando para o modo MS. O espectro de fragmentação foi processado utilizando o programa ProteinLynx v4.0 (Waters) e o programa MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) foi utilizado para comparar as sequências obtidas com os dados depositados nos bancos de dados do SwissProt e NCBI. As comparações MS-MS/MS foram conduzidas com uma tolerância parental de massa de íons de 50 ppm, e a tolerância de massa MS/MS foi de 0.1 Da. Apenas os valores

estatisticamente significantes ($P < 0.05$) foram aceitos para os dados retornados do programa MASCOT.

Southern blotting

Para a análise de Southern blotting, 10 µg de DNA genômico foram tratadas por 16 horas com 40 U das enzimas *Bam* HI, *Xho* I, *Hinc* II, *Xba* I, *Spe* I, *Hind* III, *Eco* RV e *Sac* I a 37°C (a 30°C para *Bam* HI) e fracionadas em gel de agarose 0.8%. O DNA fracionado foi transferido para uma membrana Hybond N⁺ (Amersham) com o aparato VacuGeneXL Vacuum Blotting System (Pharmacia Biotech), seguindo as recomendações do fabricante. A sonda empregada no processo de hibridização foi marcada radioativamente com [α -P³²]dCTP utilizando iniciadores randômicos (Ready-to-Go DNA Labelling Beads Kit, Amersham Pharmacia) de modo a ser específica para a região codificadora do gene da β -amilase. A hibridização foi feita com a solução de hibridização Perfect Hyb Solution (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante. A membrana foi lavada por duas vezes em solução de 2× SSC e SDS 0.1% à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de uma lavagem em 1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos, e finalmente em 0.1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos. A membrana lavada foi exposta ao filme de raio-X Hyperfilm MP (Amersham Bioscience) por 16 horas a -70°C em cassetes apropriados.

Análises *In silico*

A análise para a presença de um provável peptídeo de trânsito foi realizada com o programa de predição de endereçamento CHLOROP v.1.1 (Emanuelsson et al., 1999). Os alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos das β -

amilases foram feitos com o programa Clustal W v.1.83 utilizando o algoritmo da série BLOSUM (Thompson et al., 1994). A procura por motivos nas sequências de proteína foram realizadas com o banco de dados PROSITE (Hulo et al., 2006) e a predição de peso molecular (Mw) e do ponto isoelétrico (pI) foram feitas com o programa Compute pI/Mw tool (Gasteiger et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene maBMY possui uma estrutura exon-intron similar ao do gene BMY3 de Arabidopsis

A sequência de nucleotídeos do cDNA do gene maBMY foi determinada e comparada com seu correspondente genômico. O cDNA do gene maBMY apresentou 133 nucleotídeos na porção 5' não traduzida (5'UTR), um quadro de leitura de 1599 nucleotídeos e 221 nucleotídeos não traduzidos na porção 3'UTR. Um NUE (near upstream element) AUUAAA foi identificado 22 nucleotídeos acima do sítio poliA, e a sequência desse elemento e sua localização estão de acordo com o consenso para os sinais de poliadenilação observados em Arabidopsis (Loke et al., 2005). A estrutura exon-intron do gene maBMY é similar ao gene BMY3 de Arabidopsis (Figura 1), a qual difere em número de introns de todas as outras β -amilases de Arabidopsis. O gene maBMY contém 3 exons que se estendem sobre os 2588 pb da sequência genômica e dois introns de 549 pb e 83 pb, respectivamente. Ambos os introns apresentam alto conteúdo dos nucleotídeos A e T e seguem as regra GU-AG para os sítios de "splicing".

O gene maBMY codifica para uma β -amilase com provável endereçamento aos plastídeos

Trabalho realizado por Nascimento et al., (2006) reportou a clonagem de um cDNA completo para um gene de β -amilase (GenBank no. de acesso [DQ166026](#)) isolado de uma biblioteca de cDNA feita a partir de polpa de banana. Entretanto, um novo início de transcrição para esse gene foi determinado por reação de extensão de um iniciador específico (figura 2) e esse novo início de transcrição está localizado

Figura 1. Comparação da estrutura exon–intron do gene *maBMY* e os genes de β -amilase de *Arabidopsis*. Os exons estão indicados por caixas e as regiões não traduzidas estão indicadas por linhas.

a 146 pb acima do início de transcrição da sequência de cDNA anteriormente determinada. Essa diferença quanto ao início da sequência pode ser atribuída a estratégia empregada na construção da biblioteca, a qual não evita a terminação prematura da transcrição reversa durante a etapa de síntese do cDNA (Maruyama and Sugano, 1994) e o fato de que o processo de metilação do cDNA as vezes é incompleto e não consegue proteger os sítios de restrição internos presentes na sequência do cDNA que se deseja isolar (McClelland et al., 1994). Em meio a estes novos 146 pb existe um início de tradução (ATG) no mesmo quadro de leitura de um segundo ATG, o qual já havia sido identificado na sequência parcial anteriormente isolada do cDNA da β -amilase. Entretanto, no trabalho anterior esse segundo ATG não foi considerado como um sítio de início de tradução funcional devido a sua proximidade do início da sequência de cDNA. Neste trabalho, o primeiro ATG, a 134 pb do início da sequência de cDNA foi identificado como o início de tradução do cDNA da β -amilase, entretanto esse novo sítio de início de tradução não se encontra no mesmo quadro de leitura do ATG de início adotado anteriormente (Nascimento et al., 2006). Esta nova β -amilase apresenta 48 resíduos adicionais se comparada com a sequência anterior e apresenta algumas diferenças quanto a constituição destes resíduos, devido provavelmente a erros de sequenciamento.

A estrutura primária da proteína maBMY apresenta alta similaridade com as sequências de aminoácidos de β -amilases cloroplastidiais e extra-cloroplastidiais (Figura 3). Em relação as β -amilases de *Arabidopsis*, a proteína codificada pelo gene BMY3 apresenta o maior grau de identidade (49%) com a sequência da proteína maBMY. A sequência da proteína maBMY também possui um típico motivo hidrolítico (PROSITE no. de acesso **PS00679**) e dois domínios catalíticos Glu¹⁸⁶ e Glu³⁸⁰ comuns a outras β -amilases, os quais se mostraram ser essenciais para a

Figura 2. Extensão de um iniciador específico para a sequência do cDNA da β -amilase de banana e padrão de sequência de bases. As bases correspondentes das linhas estão indicadas acima da figura e a primeira base transcrita está indicada por uma flecha.


```

ct-BMY      1  -MTTLTQSSASFINFRETGKGVKAPDEELGMVSTFAQAKP-SCRLVAKSMQEAQLSHER--IMEVKKIEKR
ct-BMY8     1  -MELTINSSSSSLIKRDAKSSRNQSSSSNMTFAKMPPTTYQFAKNSVKEMKFTHEKTTTPEGETLEKW
tr-BMY7     1  -MALNLSHQLGLVLAGTPIKSGEMTDSLLSTSPPSARMMPKAMNRYKAHGTDPSPPMSPILGATRADL
BMY9        1  -MATRLNHSVIPVSVGLGAPTRVSARSSLPFSVGDWRGVSTFGARFLVLAKVKLRAESTEEDRVPIDDD
BMY6        1  --MTETGVIGCGCRGVTGGNFFHPGCGSLKSCFLEQSTKRNRRFFRSVSMIPPFKGRFITKLRSVAGNS
BMY3        1  MEVSVIGNPQARICRAELAYRELGRFGSDVISGESNRNRVFCNQSSKWKIEIARCSSRSVKCEAIVSD
maBMY       1  -MEAGDMAKQAAVAEPNAPFARSLCGSSSVRGSGTSRIGFEAPAS---VANKRSIQVARQGAIRSEV

ct-BMY      67  EKLHELPAHNS-----NRSTRVPVFVMLPLDTMTMGG---NLNRPRAMNASTMA
ct-BMY8     70  EKLHVLSPHNS-----KNDASVPVFVMLPLDTVMMSG---HLNKPRAAMNASTMA
tr-BMY7     70  SVACKAFAVENGIGTIEEQRTYREGGIGGKKEGGGVVPVFVMMPLDSVVMGN---TVNRRFAAMKASLOA
BMY9        70  DDSTDQLVDEEIVHFEERD-----FAGTACVPVVMPLPLGVEDMNS---EVVEPEELLDQLRT
BMY6        69  RIFSMADAREKSRSFVLVSS-----RHKRVVPVFVMMPLDTFTGIDASGCPKKIKLKAITVSLKA
BMY3        71  ASPFLKSTPKS-----KSLESVKLFVGLPLDTVSDCN---NVNELKAITAGLKA
maBMY       67  VVEEKASPPRK-----DKAGPGRLYVGLPLDVVSDGN---VYNEHGKATAAGLRA

ct-BMY      113 LKSSGAGVEGMVDAWNGLVEKDGPLKYNWEGYAEIVKMCQEHGLKLOVVMFSFHCCGGNVGDCSCSIPLPFNV
ct-BMY8     116 LKSGAGVEGMVDAWNGLVEKDGPMNYNWEGYAEIICNVQKHGLKLOVVMFSFHCCGGNVGDCSCSIPLPFNV
tr-BMY7     136 LKSACVEGMVDAWNGLVEKDSFGTYNNGGYNELLELAKKLGLKLOVVMFSFHCCGGNVGDCSITLPLQNV
BMY9        125 LKSVNVVGMVDCWNGIVESHTEQVYNWSYKKLQVIRLGLKLOVVMFSFHCCGGNVGDCDVHQTPEFV
BMY6        126 LKLACVHGCHAVEVWNGIVERFSPLEFKKSWHEELFRLISEAGLKLHVALCFSSNMHLFGCKGGGSLFLK
BMY3        117 LKLLGVEGHEPPIWNGVVERLAAGKVEWSCYLAVAEIVKKVGLKLHSLSPFGSK---QTEGLPLDQV
maBMY       113 LALLGVDEVELPIWNGVAMDSGD---WSYLAVAAAMARDAGLRLRVSLHLCHHR---RPRDLPLKSV

ct-BMY      183 LSEISKNPDLVYTDNSGRNPEYLSLGCMLPVLRGRTPIQVYTDNMRSEFREREENEYLCN-VVEVIOVGM
ct-BMY8     186 LSEISKNPDLVYTDNSGRNPEYLSLGCDSVPLRGRTPIQVYSDNMRSEFREREENEYLCN-VVEVIOVGM
tr-BMY7     206 VDEVDKPDLAYTDQWGRNPEYLSLCAQDEVLVLRGRTPIQVYADFMRAFRDNEKHLGE-TVEVIOVGM
BMY9        195 REYQGSNPDIYFDDACRRNTECLWGLQKQVLRGRTALEVYFDNMRSEFREREENEYLCN-VVEVIOVGM
BMY6        196 REIGDQVNDIYRDKSFSNDYLLGLGQDLEFEGRTAVQYEDFMISFSTKFEPLLCN-VVEVIOVGM
BMY3        182 AKIGDAEGGIYFDRIYQQYKDCLSFAVDVDFVLDGRTPIQVYRGEFCEFSKASADYMCN-TTGITLGL
maBMY       174 DSAATDPIILFDTRAGRRADCLSFAYDDLPVLDGRTPIQVYRGEFCEFSKASADYMCN-TTGITLGL

ct-BMY      252 GPCGELRYPAEPESNGTNRFFPGICEFQCYDKYMGASIAAVAKAAGKDDWQCCEHDSCKYNQFPEDTGEF
ct-BMY8     255 GPCGELRYPSYEPESNGTNRFFPGICEFQCYDKYMKSSLOAVAESIGCTNNCTSGPHDAGCKYKLPEDTGEF
tr-BMY7     275 GPCGELRYPSYEPESNGTNRFFPGICEFQCYDKYSLSLKAAAEITYCKEENGCTSTPTDACHYNNPDDTQFE
BMY9        265 GPCGELRYPSYPAQFG-NNFFPGICEFQCYDKYLMNSLKEAAEVRGHSFWR-CPDNTETYNSTEHGTFGEF
BMY6        265 GPCGELRYPAEPESGDRNRFFPGICEFQCYDKYMDLMAVASQEGKEQWGRDPPNTECYNSTPSGVPFEF
BMY3        251 GEDGELRYPSYSHQNN---AKLSGAGEFQCYDNDHMSALKGYAESTGNEGLWGLGCPHDAPAYDQDQNSSESEF
maBMY       243 GPCGELRYPSYPTGS-NEFFPGICEFQCYDKYMBADLKRHAETGSGELWGLGCPHDAPAYDQDQNSSESEF

ct-BMY      322 QRDG-TNNSEYGOFFELNYSKLLSHGDEHLLAAGESLYOCT-----GAKLSQKYGAGIHWYNTSRSHAE
ct-BMY8     325 QRDG-TNNSEYCKFFENYSGKLLSHGDOQLSSAKGFEQCS-----GAKLSQKYGAGIHWYNTSRSHAE
tr-BMY7     345 KKEGGGNSEYGOFFELNYSQMLLHGHGDEHLLSASKSIFENM-----GVKNSVKYAGIHWYNTSRSHAE
BMY9        333 RDGG-DNDSYGRFFLNYSRVLLDHGDRVLLAMANLAFEG-----TCFAKKSGIHWYNTSRSHAE
BMY6        335 KGGNDEHLSYGRFFELNYSKLLSHGDEHLLAKRADVLRHQEEKSSVMVAKICGIYHWYNTSRSHAE
BMY3        318 SGGG-SNESYGOFFELNYSLLTSHADNLLSVASSAESSIG-----VPLCKKPELHGHGKILSRHPSE
maBMY       312 KKHGGNDEHLYGOFFELNYSKLLSHGDEHLLSVASEVSGDLP-----VALSKVPLHGHGKILSRHPSE

ct-BMY      385 LTAGYYNTRNRHDGYLPIARMLAKHCEVLNFTCMEM---DGEQEQSANCSPGLVRQVKTARTATVLA
ct-BMY8     388 LTAGYYNTRNRHDGYLPIARMLAKHCEVLNFTCMEM---DGEQEQHANCSPGLVRQVQONATQAGTILA
tr-BMY7     409 LTAGYYNTRFRDGYLPIAQMRLREMAIINFCTMEM---DGEQEQDALCAPGLVNOVALATLAAEVPVA
BMY9        394 LTAGYYNNSNRDGYGPIAAMFKKEDALNFTCQEDATLDQHDHDFPEALADPEGLVNOVLNADWDSIPA
BMY6        405 LTAGYYNNSLRDGYDPAASLSRGGALNFTPCQNA---DSEIEKYLCSPEGLRRQEHQDVSKKNTNMT
BMY3        381 LTAGYYNSNGDRWEATAEHFAKNSCRMNIPGMDIS---DEHOSPELSLSPESLGHGKTSKKQGVVVS
maBMY       376 LTAGYYNTDGRDGYEDVAKFAKHSCTNIIPGMDIT---DGEQEQGVRSCEQSLSSQVMGTCKRHGVVA

ct-BMY      452 SENALERYDGGFSSQVATSMDSGNG-----LSAFTFLRMNKRLEFEPNARNLVQEVKSMSEGGRNA
ct-BMY8     455 SENALERYDSSAFGQVATNRSDSGNG-----LTAFTFLRMNKRLEFGONNQQLVEFVRNMKEGGHGR
tr-BMY7     476 SENALPRYDDYHEHQLKASALNLDQNNGEPEPMCAFTFLRMNPELEQADNWGKVEAFVRNMKEGGRDSH
BMY9        464 SENALPYDREGYNKLENAKPLTDPDG---RHSCFTYLRNPLTLMESONKEFERELRMHGEAVPD
BMY6        472 GRNTSEHDEMGLRQRENCYQPNQDGT-----LRSEFTCRMNEKIERVNNNNEVPEIRQMSADM---
BMY3        448 QNSSTFPVPG--GFERVENLKDEVNG-----IDLEFTYRMGALFESPMHEHASTVEVRLNSQFELSS
maBMY       443 GENSSLVRVGTGFTFKIKENVLAEKST-----LDSEFTYRMGAEFFSPHEMPLSTFEELRMAQPEMEK

ct-BMY      515 SLPECDSSTRTDLYVRFIKESHSHKATEVAVV
ct-BMY8     518 RLKEDTTGSDLYVGFVKGKIAENVVEEALV
tr-BMY7     546 RCREEVEREAHFVHVTPQLVQEAVALTH-
BMY9        530 LGLAPGTQETNPE-----
BMY6        -----
BMY3        509 DDQASEAEVEAETASIGSGTGAPSLQTA---
maBMY       506 DDIPSNLRLSLISINSVPGNDRELQSA---

```

Figura 3. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas maBMY, BMY3 e de β -amilases experimentalmente determinadas como cloroplastidiais. Ct-BMY - β -amilase de folhas de batata (GenBank no. de acesso [AKK84008](#)), BMY3, BMY9, BMY6, tr-BMY7 e ct-BMY8 - β -amilases de folhas de Arabidopsis (GenBank nos. de acessos [NP197368](#), [NP191958](#), [NP568829](#), [NP189034](#) e [NP567523](#)). Resíduos similares e idênticos estão indicados por caixas cinzas e pretas, respectivamente. Os dois motivos proteicos relativos a atividade de β -amilase identificados pelo PROSITE estão sublinhados. Os domínios catalíticos determinados para a atividade de uma β -amilase de soja (Totsuka et al., 1994; Kang et al., 2004) estão indicados por setas.

atividade de uma β -amilase de soja (Totsuka et al., 1994; Kang et al., 2004). Entretanto, similar às sequências BMY3 e BMY6, a sequência da proteína maBMY também não possui um motivo (PROSITE no. de acesso [PS00506](#)) e um domínio catalítico Asp¹⁰¹, os quais foram determinados como importantes para a atividade de uma β -amilase de soja (Totsuka et al., 1994). A comparação da proteína maBMY (figura 3) com as β -amilases experimentalmente confirmadas como cloroplastidiais, como a de folhas de batata (ct-BMY) e de Arabidopsis (BMY6, tr-BMY7, ct-BMY8 and BMY9) (Scheidig et al., 2002; Fulton et al., 2008; Sparla et al., 2006; Lao et al., 1999) mostraram que essa β -amilase de banana também apresenta uma extensão amino-terminal. A análise da proteína maBMY para a presença de um provável peptídeo de trânsito pelo programa de predição de sequência CHLOROP v. 1.1 mostrou uma pontuação de 0.560, o que indica que essa proteína pode ser endereçada aos cloroplastos. Este programa também identificou a presença de um provável peptídeo de trânsito de 67 resíduos na porção amino terminal da proteína.

A proteína maBMY apresenta um peptídeo de trânsito funcional

Os produtos de expressão quiméricos das construções contendo a região codificadora do gene da β -amilase, com e sem a região 5'UTR e com o gene repórter eGFP, mostraram um padrão de compartimentalização nas imagens de fluorescência (Figuras 4 e 5). A região 5'UTR mostrou não ser necessária sob o controle do promotor duplicado CaMV35S para a expressão das proteínas fusionadas com o gene maBMY. O resultado obtido com a construção p35S/CDS-TP/eGFP (sem o peptídeo de trânsito predito *in silico*) (figura 4.C) foi similar ao obtido com o controle positivo (figura 4.D), em que não foi observada compartimentalização da fluorescência dos produtos de expressão. Estes dados

confirmam que o peptídeo de trânsito está localizado na porção amino-terminal da proteína maBMY. Uma demonstração mais apurada do endereçamento da proteína maBMY para os cloroplastos foi obtido com a construção 5 - p35S/5UTR/CDS/eGFP (com as bordas do T-DNA do plasmídeo binário pCAMBIA1300) em ensaio de transformação realizado por agroinfiltração de folhas de tabaco. A fluorescência do eGFP das proteínas quiméricas mostraram o mesmo padrão de compartimentalização da autofluorescência da clorofila (figura 5) o que confirma os resultados anteriores obtidos em células de epiderme de cebola. A presença de um peptídeo de trânsito reforça a idéia de que a proteína maBMY pode ser endereçada também aos amiloplastos presentes nas células da polpa de banana.

As proteínas recombinants His-maBMY não apresentaram atividade amilolítica

O gene maBMY apresenta um quadro de leitura de 1599 nucleotídeos, que codifica para uma proteína de 532 aminoácidos, e com valores teóricos de peso molecular (Mw) de 57.76 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6.41. A proteína madura predita *in silico* apresenta 465 aa, um valor de Mw de 50.87 kDa e pI de 5.71. Sparla e colaboradores (2006) mostraram que a forma precursora da proteína tr-BMY7 de *Arabidopsis* não apresentou atividade hidrolítica quando submetida a ensaios de atividade nas mesmas condições de reação que sua forma madura, a qual apresentou atividade hidrolítica. Os autores atribuíram esse efeito a um provável mecanismo de proteção do fluxo de carbono, o qual permitiria uma fina regulação fora dos amiloplastos por outras enzimas ou pela presença do peptídeo de trânsito, o qual poderia evitar que essa β -amilase tivesse atividade em local não desejado do interior das células.

Figura 4. Localização subcelular da proteína quimérica β -amilase/eGFP em células de epiderme de cebola. Um esquema com as construções empregadas no ensaio transiente está indicado acima das imagens de fluorescência. 35S – promotor CaMV35S, 5'UTR – região 5' não-traduzida do gene da β -amilase, TP – peptídeo de trânsito, maBMY CDS – forma madura da β -amilase, eGFP – gene repórter (enhanced green fluorescent protein), e NOS – terminador da nopalina sintase. As letras relacionam as construções às suas respectivas imagens de fluorescência. Barras = 10 μ m.

Figura 5. Localização subcelular das proteínas quiméricas β -amilase/eGFP em células de tabaco. **A.** Imagem de fluorescência da expressão da proteína eGFP da construção p35S/5UTR/CDS/eGFP. **B.** Autofluorescência da clorofila. **C.** Sobreposição das imagens A e B. Barras = 10 μ m.

A expressão das proteínas His-maBMY precursora e madura resultaram em produtos recombinantes de 60 e 50 kDa, respectivamente (Figuras 6.A e 6.C). Considerando que o motivo de histidina (His-tag) tem aproximadamente 2-3 kDa, os pesos moleculares das proteínas maBMY estão de acordo com os valores teóricos e experimentais observados para outras β -amilases cloroplastidiais. A identidade dos produtos His-maBMY foram confirmadas por sequenciamento de peptídeos com um LC-MS/MS (figura 7) e por western blotting, uma vez que o produto de expressão de *E. coli* reagiu com um soro anti- β -amilase (Figuras 6.B e 6.D).

Quando a indução por IPTG foi realizada a 20°C, as proteínas His-maBMY foram obtidas na fração solúvel. Entretanto, nem a forma precursora quanto a forma processada (madura) da proteína maBMY apresentaram atividade hidrolítica nos ensaios *in vitro* e *in gel* (dados não apresentados). Quando a indução foi realizada a 37°C as proteínas His-BMY foram expressas como corpos de inclusão, resultando em proteínas insolúveis. Como a ausência do peptídeo de trânsito na forma madura da proteína maBMY não apresentou efeito para promoção da atividade hidrolítica, um explicação que poderia ser atribuída seria a ocorrência de um dobramento incorreto dessas proteínas em *E. coli*. Este sistema procarioto apresenta limitações quanto à formação de pontes de dissulfetos e quanto à presença de proteínas auxiliaadoras de dobramento (chaperonas), e estas características podem ser essenciais para a promoção de um dobramento correto, permitindo assim, que essa β -amilase de banana tenha atividade hidrolítica. Na tentativa de responder a essa pergunta, ambas as formas das proteínas maBMY foram submetidas a processos de redobramento com e sem um ambiente redox. Entretanto, nenhuma das condições

Figura 6. Expressão das proteínas His-maBMY. **A.** Coloração com coomassie de gel SDS-PAGE dos extratos de *E. coli* não-induzidos (**N**) e induzidos (**I**) contendo o plasmídeo pHis-maBMY PRE. **B.** Western blotting de um réplica do gel anterior (item A) utilizando o soro anti- β -amilase. **C** e **D.** SDS-PAGE e western blot da proteína His-maBMY madura, respectivamente.

```

1  MEAGLMAKQA AAVAKPNAFP ARSLGFGSSV RGGSGTSRIG FEAPASVAWR
51  KRSIQVARQG AIRSEVVVEE KASPPRKDKA GPGRLYVGLP LDVWSDGNVV
101 NHGKAIAAGL RALALLGVDG VELPISWGVA MDSGDWSSYL AVAAMARDAG
151 LRLRVSLHLH CHRRPRLPLP KSVDSAAATD PDILFTDRAG RRRADCLSFA
201 VDDLPLVDGR TPMEAYEEFF RSFRLAFADF FGSVITDITI GLGPNGELRY
251 PSFPPTGSNR FTGVGEFQCY DKYMLADLKR HAEETGSPLW GLSGPHDAPG
301 YNQSPDFGNF FKDHGGSWET PYGQFFLSWY TGKLLSHGDG LLSVASEVFG
351 DLPVALSAKV PLLHCWHDTR SRPSQLTAGF YNTDGRDGYE DVAKIFAKHS
401 CTMIIPGMDL TDGEQPQGV RSCPQSLLSQV MGTCKRHGVK VAGENSSLVR
451 VGTAGFTKIK ENVLAEKSTL DSFTYHRMGA EFFSPDHWPL FTEFIRSMQAQ
501 PEMEKDDIPS NLERLSLSIN SVPGNDRELQ SA

```

Figura 7. Sequência da proteína maBMY traduzida *in silico*. A sequência correspondente a forma precursora da proteína maBMY é apresentada. O sítio de clivagem *in-silico* é indicado por uma seta. Os peptídeos identificados por espectrometria de massa estão indicados por sequências em vermelho ao longo de toda a sequência e as barras verticais (do mesmo lado) indicam os limites dos peptídeos identificados.

testadas resultou em uma proteína com atividade hidrolítica. Outra explicação para a ausência dessa atividade poderia ser a determinação incorreta do tamanho do peptídeo de trânsito, em que a forma madura da proteína maBMY (baseada nas análises *in silico*) não apresentaria alguns resíduos importantes para promoção da atividade hidrolítica, ou alguns resíduos responsáveis pelo bloqueio da atividade hidrolítica ainda estariam presentes nessa proteína madura.

Os resultados obtidos em *E. coli* estão de acordo com os dados apresentados por Fulton e colaboradores (2008) para uma β -amilase recombinante (*E. coli*) do gene BMY6 (BAM4) de *Arabidopsis*, que também não apresentou atividade hidrolítica sobre um substrato específico (PNPG5). Os autores propuseram que essa β -amilase que não apresentou atividade catalítica estaria envolvida em interações proteína-proteína com outras enzimas, como a glicano-água diquinase (GWD) e isoamilase (ISA), e tais interações poderiam regular a ação destas enzimas sobre o amido. Como mencionado anteriormente, a sequência de aminoácidos da proteína BMY6 compartilha algumas similaridades com a β -amilase de *Arabidopsis* BMY3 e com a β -amilase de banana (maBMY) quanto à sequência de aminoácidos, em que um motivo protéico e um domínio catalítico não estariam presentes nestas sequências o que reforça a idéia de um comportamento não-catalítico para estas β -amilases.

O gene maBMY é cópia única no genoma da bananeira

O gene da β -amilase ocorre como membro de uma família multigênica em cevada, arroz e *Arabidopsis* (Kreis et al., 1987, Rorat et al., 1991 e Laby et al., 2001). Para analisar se o gene maBMY de banana também representa um membro de uma família multigênica, uma análise de Southern blotting foi realizada (Figura 5).

O DNA genômico da bananeira foi tratado com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Xho* I, *Hinc* II, *Xba* I, *Spe* I, *Hind* III e *Eco* RV e hibridizado com uma sonda marcada específica ao gene maBMY. Os produtos de restrição das enzimas *Bam* HI, *Xho* I, *Xba* I, *Spe* I e *Hind* III apresentaram uma banda única no Southern blotting, enquanto duas bandas foram observadas para as enzimas *Hinc* II e *Eco* RV. Os produtos de restrição das enzimas *Xba* I e *Xho* I apresentaram bandas muito intensas quando comparadas com outras enzimas que também não clivam a região compreendida pela sonda. Isto pode ser explicado pelo polimorfismo entre os alelos do gene maBMY. O tamanho dos fragmentos obtidos na análise de Southern blotting coincidem com a localização dos sítios de restrição determinados pela análise da sequência do gene maBMY (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que o gene maBMY está presente como cópia única no genoma da bananeira. Resultados similares foram obtidos para um gene de β -amilase de milho expresso durante o processo de germinação das sementes, no qual análises de Southern blotting e RAPD mostraram que este gene também se encontra como cópia única no genoma da planta (Wang et al. 1997).

Figura 8. Análise de Southern blotting para o gene da β -amilase da banana. **A.** Hibridização utilizando a região transcrita do gene maBMY como sonda. Os tamanhos das bandas do padrão λ DNA *Hind* III estão indicados à esquerda e as enzimas de restrição estão indicadas acima da figura. **B.** Mapa de restrição da sequência da sonda. A régua indica o comprimento da sequência em nucleotídeos e os sítios de restrição estão indicados acima da sequência.

CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que o gene maBMY, um gene que ocorre como cópia única no genoma da bananeira, contém um quadro de leitura que codifica para uma proteína endereçada aos cloroplastos. Os resultados obtidos até o momento sugerem que a proteína maBMY é endereçada aos amiloplastos, local onde essa proteína poderia ter um papel importante na mobilização do amido compartimentalizado durante o amadurecimento da banana.

REFERÊNCIAS

- Adachi, M., Mikami, B., Katsube, T., Utsumi, S., 1998. Crystal Structure of Recombinant Soybean β -Amylase Complexed with β -Cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* 273, 19859-19865.
- Bierhals, J. D., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O., 2004. Activity, Cloning, and Expression of an Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzyme from Banana Fruit. *J. Agr. Food Chem.* 52, 7412–7418.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M., 1995. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agr. Food Chem.* 43, 347–351.
- Dapeng, Z., Yongzhang, W., 2002. β -Amylase in development apple fruits: activities, amounts and subcellular location. *Sci. China Ser. C* 45, 429–440.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M., and Ritte, G. (2007). Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidic β -amylases. *Plant Physiol.* 145, 17–28.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Heijne, G.V., 1999. ChloroP: a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.

- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M., Zeeman, S.C., 2008. β -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -Amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*. 20, 1040-1058.
- Garcia, E., Lajolo, F.M., 1988. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *J. Food Sci.* 53, 1181–1186.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. John M. Walker, Humana Press, New Jersey, USA.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De-Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Pagni, M., Sigrist, C.J.A., 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34, 227-230.
- Kang, Y.N., Adachi, M., Utsumi, S., and Mikami, B., 2004. The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean α -amylase. *J. Mol. Biol.* 339, 1129-1140.
- Kaplan, F., Guy, C.L., 2005. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44, 730–743.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A., 2002. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193-195.

- Laby, R.J., Kim, D., Gibson, S.I., 2001. The *ram1* mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased β -Amylase activity. *Plant Physiol.* 127, 1798-1807.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., Kavanagh, T.A., 1999. An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J.* 20, 519–527.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J., Ritte, G., 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* 10, 130–137.
- Loke, J.C., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C., Li, Q.Q., 2005. Compilation of mRNA Polyadenylation Signals in *Arabidopsis* Revealed a New Signal Element and Potential Secondary Structures. *Plant Physiol.* 138, 1457-1468.
- López-Gómez, R., Gómez-Lim, M.A., 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27, 440-442.
- Mainardi, J.A., Purgatto, E., Vieira, A., Bastos, W.A., Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Lajolo, F.M., 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agr. Food Chem.* 54, 7294-7299.
- Maruyama, K., Sugano, S., 1994. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene.* 138, 171-174.
- McCleary, B.V., Codd, R., 1989. Measurement of beta-amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. *J. Cereal Sci.* 9, 17–33.
- McClelland, M., Nelson, M., Raschke, E., 1994. Effect of site-specific modification on endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22, 3640-3659.

- Medina-Suarez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 differing ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.
- Mota, R.V., Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Purgatto, E., Rosseto, M.R.M., Lajolo, F.M., 2002. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* 216, 325–333.
- Nascimento, J.R.O., Junior, A.V., Bassinello, P.Z., Cordenunsi, B.R., Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Tec.* 40, 41–47.
- Niittyyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., Zeeman, S.C., 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*. 303, 87–89.
- Purgatto, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., 2001. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta* 212, 823–828.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, A., Lloyd, J.R., Kossmann, J., 2002. Downregulation of a chloroplast-target β -amylase leads to a starch excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30, 581–591.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M., 2005. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 73–98.

- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., Smith, A.M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 136, 2687–2699.
- Sparla, F., Costa, A., Schiavo, F.L., Pupillo, P., Trost, P., 2006. Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted β -Amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 840–850.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Totsuka, A., Fukazawa, C., 1993. Expression and mutation of soybean beta-amylase in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.* 214, 787–794.
- Totsuka A., Nong, V.H., Kadokawa, H., Kim, C.S., Itoh, Y., Fukazawa, C., 1994 Residues essential for catalytic activity of soybean beta-amylase. *Eur. J. Biochem.* 221, 649-654.
- Vieira A., Nascimento J.R.O., Lajolo F.M., 2006. Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Agr. Food Chem.* 54, 8222-8228.
- Zehr, B.D., Savin, T.J., Hall, R.E., 1989. A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 182, 157-159.
- Ying, Q., Yi, W., Chang-Qing, D., Dapeng, Z., 2003. β -Amylase is predominantly localized to plastids in the developing tuberous root of sweet potato. *Acta Bot. Sin.* 45, 581–588.

- Yoshida, N., Nakamura, K., 1991. Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of cDNA Encoding the Subunit of Sweet Potato β -Amylase. *J. Biochem.* 110, 196–201.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Sahara, H., Koshino, S., 1994. Expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding barley beta-amylase and properties of recombinant beta-amylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1080–1086.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Maeda, H., Sahara, H., Tamaki, T., 1995. Construction of a plasmid used for the expression of a sevenfold-mutant barley β -amylase with increased thermostability in *Escherichia coli* and properties of the sevenfold-mutant β -amylase. *J. Biochem.* 118, 562–567.
- Wang, S.M., Lue, W.L., Wu, S.Y., Huang, H.W., Chen, J., 1997. Characterization of a maize β -Amylase cDNA clone and its expression during seed germination. *Plant Physiol.* 113, 403–409.
- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P., Sharkey, T.D., 2005. β -Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* 137, 756–761.
- Weise, S.E., Weber, A.P.M., Sharkey, T.D., 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta.* 21, 474–482.

CAPÍTULO 3

Isolamento e caracterização da região promotora do gene maBMY

RESUMO

O adoçamento é uma das características pós-colheita mais importantes para o consumo *in natura* da banana. Resultados anteriores mostraram que o acúmulo de sacarose é resultado da degradação do amido e conversão das cadeias de glicano em glicose. A enzima β -amilase é uma exo-hidrolase que tem sido apontada como uma enzima importante no processo de degradação do amido em bananas e *Arabidopsis*. Entretanto, ao contrário de *Arabidopsis*, a expressão da enzima de β -amilase de banana é modulada por hormônios vegetais como auxinas e etileno. Na tentativa de alcançar um maior entendimento a respeito de como estes fatores modulam a expressão do gene β -amilase, a região promotora do gene de β -amilase de banana (maBMY) foi isolada e caracterizada funcionalmente. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a expressão do gene da β -amilase pode ser diretamente responsivo ao etileno, mas este hormônio pode também estar envolvido na indução do processo de conjugação de auxinas, o qual também poderia, pela alteração do conteúdo de auxina livre, modular diretamente a expressão do gene da β -amilase no nível transcricional.

INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do fruto, a banana acumula grandes quantidades de amido o qual é rapidamente degradado durante o amadurecimento (Cordenunsi e Lajolo, 1995). O processo de degradação ocorre pela ação de enzimas hidrolíticas e fosforolíticas e existem novas evidências que sugerem que, em bananas, esse processo se assemelha com o processo de degradação do amido nas folhas, em que a principal rota de degradação do amido transitório ocorre pela ação da enzima β -amilase (EC 3.2.1.2) (Smith et al., 2005). Essa enzima é uma α -1,4-glicano maltohidrolase que cataliza a remoção de moléculas de β -maltose das extremidades não-redutoras das cadeias de amilopectina.

Alguns trabalhos mostraram que a expressão e atividade da enzima β -amilase foi concomitante a degradação do amido durante o amadurecimento da banana (Garcia and Lajolo, 1988; Purgatto et al., 2001; Nascimento et al., 2006), e que o gene que codifica para essa enzima é transcricionalmente modulado por hormônios vegetais como etileno e auxinas, os quais poderiam modular o processo de degradação do amido (Purgatto et al., 2001; Nascimento et al., 2006). Estas evidências em conjunto com os dados recentes (Astorino-Filho et al. – capítulo 2), que mostraram que o gene maBMY de banana codifica para uma enzima endereçada aos cloroplastos, reforçam a idéia de que essa β -amilase tem um importante papel no processo de mobilização do amido.

O primeiro relato sobre a regulação transcricional desse gene em banana foi feito por Medina-Suárez et al. (1997), onde um clone de cDNA pBAN UU32 (GenBank no. de acesso [Z93112](#)) foi isolado de uma biblioteca de cDNA através de um processo de seleção diferencial e a sequência deste clone mostrou alta

identidade com um gene de β -amilase de batata-doce (GenBank no. de acesso **D01022**). Utilizando esse mesmo clone em ensaios de Northern blotting, Purgatto e colaboradores (2001) mostraram que fatias de banana infiltradas com auxina apresentaram um atraso tanto na transcrição do gene da β -amilase como na sua atividade, e também foi verificado um atraso do processo de degradação do amido.

Dados recentes obtidos por Nascimento et al. (2006) indicaram que amostras de banana tratadas com etileno exógeno anteciparam a transcrição do gene da β -amilase durante o amadurecimento. Em contrapartida, frutos de banana tratados com 1-MCP (1-metilciclopropeno), um antagonista do etileno, apresentaram atraso na transcrição desse gene. De maneira similar, a atividade e conteúdo de β -amilase seguiu o mesmo padrão observado para a transcrição em ambos os grupos tratados. Estas evidências confirmam os resultados anteriormente obtidos por Garcia e Lajolo (1988), os quais mostram uma antecipação do climatério pelo etileno e um aumento da atividade da β -amilase, sendo ambos eventos concomitantes com o início da degradação do amido na polpa do fruto.

Apesar dos relatos a respeito do efeito do etileno e da auxina na transcrição do gene da β -amilase nos frutos de banana, pouco se conhece sobre como estes hormônios vegetais atuam sobre a expressão da β -amilase em outros modelos vegetais de metabolismo de amido. Existem dados sobre a modulação da transcrição do gene da β -amilase pela ação de ácido abscísico e giberélico (Ohto et al., 1992; Wang et al., 1996), açúcares (Nakamura et al., 1991; Mita et al., 1995; Maeo et al., 2001), luz (Harmer et al., 2000; Chandler et al., 2001; Smith et al., 2004) e estresse abiótico (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999; Nielsen et al., 1997; Seki et al., 2001; Kaplan and Guy, 2004), mas não há dados envolvendo etileno e auxinas.

Deste modo, para alcançar um melhor entendimento sobre como o etileno, auxina e outros fatores podem modular a expressão do gene da β -amilase, foi realizado o isolamento e caracterização da região promotora desse gene. Motivos regulatórios foram identificados por análises *in silico* da sequência do promotor da β -amilase e, baseado nesses dados, foram feitas construções contendo o gene repórter GUS sob o controle de diferentes porções desse promotor. Os níveis de expressão obtidos por qRT-PCR de plantas agroinfiltradas com essas construções foram comparadas para obter valores de expressão relativa para cada porção do promotor. Para avaliar se o promotor do gene maBMY poderia apresentar um padrão de expressão tecido-específico, plantas de tabaco transgênicas foram obtidas contendo o gene repórter GUS sob controle da região promotora do gene maBMY isolado e estas plantas foram submetidas à análise histoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas novas de bananeira (*Musa acuminata* AAA, cv. Nanicão) utilizadas para extração de DNA foram obtidas de um produtor local. Os frutos empregados na extração de RNA e na determinação de auxinas foram separados em grupos de acordo com o tratamento empregado: 1) Controle – bananas colocadas em câmaras a 20°C para amadurecer normalmente; 2) 13°C – frutos que foram incubados em câmaras a 13°C por 15 dias e depois colocados em câmaras a 20°C; 3) 13°C+etileno – frutos expostos a 100 mg.Kg⁻¹ de etileno e postos em câmaras a 13°C por 15 dias e depois desse período foram transferidos para câmaras a 20°C. Amostras representativas dos frutos foram descascadas, cortadas, e congeladas em N₂ líquido

e armazenadas a 80°C para análises posteriores. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. XHFD8) foram utilizadas nos ensaios de transformação estável e transiente.

Extração de ácidos nucleicos

Para os procedimentos de Northern blotting o RNA total foi extraído de polpa de frutos de banana em diferentes estágios de amadurecimento com metodologia descrita por López-Gómez e Gómez-Lim (1992). O DNA genômico (gDNA) foi extraído de folhas novas de bananeira utilizando o protocolo CTAB (Doyle and Doyle, 1987).

Isolamento e clonagem das regiões 5' montante e 3' juzante do gene maBMY

Para isolar as regiões 5' montante e 3' juzante do gene da β -amilase foi empregada uma estratégia conhecida como PCR inverso (iPCR) (Ochman et al., 1988). Alíquotas de 1 μ g de gDNA foram tratadas com 10 U das enzimas *Bgl* II e *Pst* I a 37°C durante 16 horas e após esse período o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio seguida de precipitação (Sambrook et al., 1989). O gDNA digerido foi recircularizado utilizando 5 U de T4 DNA ligase (Promega) numa reação de ligação com volume final de 50 μ L. Um microlitro da reação de ligação foi empregado numa reação de PCR com os iniciadores BMY S8 (5'-TACAACCAGTCTCCGGACTT-3') ou BMY IS1 (5'-TTCCTATTTATCGCTTGGTGT-3') para os produtos *Pst* I e *Bgl* II, respectivamente, e com o iniciador reverso BMY R1 (5'-TCCCGGTACCGCCCCTGA-3'). A amplificação da região 3' juzante foi feita com os iniciadores sentido BMY CTF1 (5'-GAGAACTCTTCCCTCGTCC-3') e reverso BMY R9 (5'-GATCATGGTGCAGGAATGCT-3') utilizando o produto de

restrição *Bgl* II como molde. Cada reação de PCR (volume final de 20 μ L) continha 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 0.1 μ L de High Fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen, 5 U/ μ L), 200 μ M de dNTP, MgSO_4 1.5 mM, tampão 1 X PCR (Invitrogen), e 1 μ L do DNA recircularizado. As reações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-200 (MJ Research) por 35 ciclos, com temperatura de denaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e polimerização a 68°C por 3 minutos. Ao final dos ciclos, as reações foram incubadas por 5 minutos a 68°C, e deixadas a 4°C até a análise no gel. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%/TPE e visualizados com brometo de etídeo. As bandas que apresentaram tamanho esperado foram removidas do gel, purificadas com o kit Wizard SV Gel and PCR Purification System (Promega) e clonadas com o kit pGEM-T Easy Vector System (Promega).

Sequenciamento de DNA e análise das sequências obtidas

O sequenciamento de DNA foi realizado automaticamente (ALF Express DNA Sequence Analyzer, GE Healthcare) utilizando o kit Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequence (GE Healthcare). O sequenciamento dos plasmídeos contendo a região 5' montante e 3' juzante do gene da β -amilase foram feitos com os iniciadores M13 e por "primer walking". O sequenciamento das construções promotor/GUS foi feito com os iniciadores sentido pCAMBIA S (5'-GGCTTTACACTTTATGCTTCC-3') e reverso pCAMBIA R (5'-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3'). As sequências foram obtidas com o programa AFLwin Sequence Analyzer v. 2.11.01 (GE Healthcare).

Análises *in silico*

A identificação dos elementos presentes em cis na região promotora do gene da β -amilase foi realizada com o programa SIGNAL SCAN (Prestridge et al., 1991) e com o banco de dado PLACE (Higo et al., 1999) localizados no endereço <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>.

Construções promotor/GUS

As regiões do promotor do gene da β -amilase foram amplificadas por PCR utilizando a enzima Taq High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen) como descrito anteriormente, com o iniciador sentido BMY PS1 (5'-GAGAGAAGATCTAGAATGGTCCGCTG-3') combinado com os iniciadores reversos BMY PR1 (5'-GAGAGAAGATCTCCTCTCAAATTATAGAAGATG-3'), BMY PR2 (5'-GAGAGAAGATCTATTTTCAGAAGGGAGGAGG-3') e BMY PR3 (5'-GAGAGAAGATCTGGAGGCGAAGATTAGAATGC-3'), os quais foram desenhados com base nos dados de uma reação de extensão de iniciador específico (Astorino-Filho et al., capítulo 2). Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T EASY (Promega) e resultou nas seguintes construções: (1) pGEM-T/BMYPR1 contendo a região promotora completa mais a região 5'UTR; (2) pGEM-T/BMYPR2 contendo a região promotora completa sem a região 5'UTR e (3) pGEM-T/BMYPR3 contendo a região promotora sem a região 5'UTR e sem um motivo TATA-box identificado *in silico*. Estas construções foram tratadas com a enzima *Bgl* II e subclonadas no vetor pCAMBIA1391Z no sítio *Bam*H I, resultando em quatro novas construções: pBMYPR1/GUS, pBMYPR2/GUS, BMYPR2ANTI/GUS utilizado como controle negativo (o promotor maBMY disposto em orientação reversa em relação ao gene GUS) e pBMYPR3/GUS. Utilizando o vetor pCAMBIA1391Z como molde, o promotor

duplicado CaMV 35S foi amplificado com uma enzima Pfu DNA polymerase (Fermentas) usando os iniciadores sentido CaMV 35S S (5'-GAGAGAAGATCTCAGCTTGCCAACATGGTGG-3') e reverso CaMV 35S R (5'-GAGAGAAGATCTGCGAAAGCTCGAGAG-3') e este produto de PCR foi restringido com a enzima *Bgl* II e subclonado no vetor pCAMBIA1391Z no sítio *Bam*H I. As colônias transformadas obtidas foram utilizadas em reações de PCR para seleção das construções contendo os insertos na orientação correta em relação ao gene GUS, resultando na construção p35S2X/GUS, a qual foi utilizada como controle positivo. Quatro outras construções foram feitas com o vetor pCAMBIA1391Z para avaliação dos prováveis elementos regulatórios em cis identificados *in silico* na região 5' acima do início de transcrição do gene da β -amilase. Os iniciadores sentido BMY D4 (5'-GCGTTGGAGAAATGGATTGG-3'), BMY D3 (5'-TCTTGGTCTGAACAATCTTTCG-3'), BMY D2 (5'-AAGCAACCCTAATACGGACG-3') ou BMY D1 (5'-AATTTGGAACATTGAGCACC-3') foram combinados com o iniciador reverso BMY PR2 em reações de PCR utilizando a enzima Pfu DNA polymerase (Fermentas) e DNA genômico como molde. Os produtos de PCR foram tratados com a enzima *Bgl* II e clonados diretamente no vetor pCAMBIA1391Z AD (vetor pCAMBIA 1391Z com os sítios *Pme* I e *Stu* I adicionados na região de clonagem do vetor como descrito por Astorino-Filho et al. - capítulo 2) nos sítios *Pme* I e *Bam* HI. Todas as construções foram sequenciadas antes de serem conduzidos os ensaios de transformação transiente.

Construções promotor/eGFP

O gene eGFP seguido do terminador NOS foi clonado no vetor pTZ57R (Fermentas), como descrito por Astorino-Filho e colaboradores (capítulo 2),

resultando no vetor p35S/eGFP, o qual foi utilizado como controle positivo. A região 5' acima do início de transcrição do gene maBMY sem a região 5'UTR foi subclonada do vetor pGEM-T/BMYPR2 para o vetor pTZ57R/eGFP no sítio *Bam* HI, resultando no vetor pPR2/eGFP. A construção pTZ57R/eGFP foi tratada com a enzima *Bam* HI, desfosforilada e a região codificadora completa do gene maBMY sem o codon de terminação foi clonada nesta construção, resultando no plasmídeo pTZ57R/BMYCDS-eGFP. Utilizando esse plasmídeo como molde numa reação de PCR com a enzima KOD DNA polymerase (Novagen) a região completa do gene maBMY fusionada com o gene eGFP foi amplificada e clonada no vetor pTZ57R/T (Fermentas) no sítio de clonagem T/A. Um plasmídeo com a orientação correta do inserto (determinada por PCR) foi tratada com a enzima *Bgl* II, desfosforilada e a região do promotor do gene maBMY (com a região 5'UTR) foi subclonada do plasmídeo pGEM-T/BMYPR1 no plasmídeo aberto. O plasmídeo resultante foi tratado com as enzimas *Kpn* I e *Hind* III e o produto da restrição foi subclonado no vetor pCAMBIA1300 nestes mesmos sítios para posterior transformação na células de *Agrobacterium*.

Ensaio de transformação transiente

Todas as construções foram inicialmente testadas em um ensaio qualitativo através de microbombardeamento de microprojéteis contendo as construções em células de epiderme de cebola. Partículas de tungstênio M-10 (BioRad) foram recobertas com 2 µg de DNA plasmidial com 0.1 M de espermidina e 2.5 M de CaCl₂ e ressuspensas em etanol absoluto. As fatias de cebola foram bombardeadas em um sistema de bombardeamento utilizando 1100 psi de pressão e vácuo parcial de 25 mmHg. Foram realizados três bombardeamentos por amostra.

Células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 [pMP90] foram transformadas pelo método do congelamento-descongelamento utilizando nitrogênio líquido, sendo em seguida plaqueadas em meio LB-agar contendo os antibióticos apropriados (50 µg/mL de canamicina, gentamicina e rifampicina) e incubadas por 16 horas a 28°C. Para cada construção uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibióticos e foi incubada por 16 horas a 28°C. Três mililitros deste pré-inóculo foram aplicados a 30 mL de meio LB contendo MES 10mM pH 5.7, acetoseringona 20 µM e 50 µg/mL dos antibióticos canamicina, gentamicina e rifampicina. Após a incubação a 28°C, as culturas de *Agrobacterium* foram concentradas por centrifugação e resuspendidas em meio de infiltração (MES 10mM pH 5.7, CaCl₂ 10 mM e acetoseringona 150 µM) para uma O.D_{600nm} de 0.5, e incubadas por 16 horas a temperatura ambiente antes da infiltração das folhas. Para as análises de expressão dos genes gus e hptII três plantas de tabaco foram agroinfiltradas para cada construção avaliada e, após o período de 24 horas, discos de 1 cm de diâmetro foram recortados e postos em meio MS para execução dos tratamentos. Quarenta e oito horas após as infiltrações, as folhas infiltradas foram removidas e congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para análises posteriores.

Ensaio de transformação estável

Plantas transgênicas foram obtidas através de co-cultivo de células de *Agrobacterium* contendo a construção pBMYPR1/GUS com segmentos foliares de tabaco seguida da regeneração dos transformantes em meio seletivo de acordo com metodologia descrita por Svab et al. (1975). As plantas transgênicas foram

identificadas pela amplificação do gene GUS por PCR e submetidas a análise histoquímica.

Southern blotting

Para a análise de Southern blotting, 10 µg de DNA genômico foram tratados com 40 U das enzimas *Bgl* II e *Pst* I durante 16 horas a 37°C e fracionados em gel de agarose 0,8%. O DNA fracionado foi transferido para membranas Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia) (Sambrook et al., 1989) e estas membranas foram hibridizadas em uma solução Perfect Hyb Solution (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando uma sonda radioativa [α -P³²]dCTP (Amersham Pharmacia) para o gene da β -amilase feita com iniciadores randômicos (Ready-to-Go DNA Labeling Beads Kit, Amersham Pharmacia). As membranas foram lavadas duas vezes em 2× SSC e SDS 0.1% à temperatura ambiente por 15 minutos, depois em 1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos e, finalmente, em 0.1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos. As membranas lavadas foram expostas a filmes Hyperfilm MP (Amersham Bioscience) a -70°C por 16 horas em cassetes apropriados.

Extração e determinação de AIA livre

A extração e determinação de ácido indol-acético livre (AIA livre) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Purgatto et al. (2002). Uma micrograma de tecido de banana foi misturado com 4 mL de tampão 0.2 M de imidazol pH 7.0 em isopropanol (65:35). Um micrograma do padrão interno [$^{13}\text{C}^6$]-IAA (Cambridge Isotopes) foi adicionado a mistura e homogenizado. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante (isopropanol) foi

evaporado em ambiente de vácuo. A fase aquosa foi aplicada numa coluna de extração em fase solida Supelclean LC-NH₂ (Supelco) pre-equilibrada (lavada com hexano, acetonitrila, água, tampão de imidazol 200 mM pH 7.0). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 2 mL de hexano, acetato de etila, acetonitrila e methanol. A fração contendo AIA foi eluída com 3 mL de metanol acidificado (2 % de ácido acético v/v), secado em vácuo e resuspendido em 50 µL de metanol. Os extratos foram purificados utilizando uma coluna Partisil ODS-3 250 × 4.6 mm, 5 µm (Whatman) em um cromatógrafo líquido Agilent-1100 (Agilent) com detector de fluorescência (comprimentos de onda de excitação e emissão de 280 e 360 nm, respectivamente). A fase móvel utilizada foi ACN/H₂O (80:20 v/v) adicionada de 1 % de ácido acético. A fração contendo AIA foi seca, metilada com diazometano e analisada em um cromatógrafo gasoso HP-6890 (Agilent) equipado com um detector de massa HP-5973 (Agilent) e com uma coluna HP-1701 30 m, 0.25 mm I.D., 0.5 µm (Agilent). Os íons foram monitorados a m/z 130 e 189, correspondente ao anel quinolínico e ao íon molecular do AIA, respectivamente, e 136 e 195, para os íons equivalentes ao padrão interno marcado. A razão de 130/136 foi utilizada para calcular os níveis endógenos de AIA e a razão de 189/195 foi utilizada para confirmação.

Northern blotting

Amostras de RNA total (10 µg) foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 1X MOPS/Formaldeído e transferido para membrana Hybond-N⁺ (GE Healthcare) como descrito por Sambrook et al. (1989). A hibridização foi feita com a solução Perfect Hyb (Sigma) a 65°C por 16 hours. A sonda utilizada na hibridização foi feita a partir da região codificadora do gene da β-amilase utilizando

[α -P³²]dCTP (Amersham Pharmacia) e iniciadores aleatórios (Ready-to-Go DNA Labeling Beads Kit, Amersham Pharmacia). As membranas foram lavadas por duas vezes em 2× SSC e SDS 0.1% à temperatura ambiente por 15 minutos, depois em 1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos e, finalmente, em 0.1× SSC e SDS 0.1% a 65°C por 15 minutos. Os resultados foram obtidos por autoradiografia, como descrito anteriormente.

Análise de qRT-PCR em tempo real

O RNA total foi purificado das folhas agroinfiltradas utilizando o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA genômico foi eliminado com o tratamento das amostras com RNase-free DNase I (GE Healthcare) durante o processo de isolamento do RNA. A determinação da concentração total de RNA foi feita através da medição da densidade óptica a 260 nm. A transcrição reversa foi feita a 42°C por 60 min em um volume de reação de 20 µL contendo tampão ImProm-II 1X (Promega), MgCl₂ 5 mM, dNTP 0.5 mM, 20 U de inibidor RNasin (Promega), 0.5 µg do iniciador oligo(dT)₁₈VN, 50 U da enzima ImProm-II reverse transcriptase (Promega) e 2 µg de RNA total.

A amplificação por qPCR em tempo real e a aquisição dos dados foram feitas com o termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbette Life Science). As reações foram feitas em volume de 20 µL utilizando a solução Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 5 µL de cDNA como template e 10 pmoles de cada iniciador específico. Para a amplificação do gene *gusA* o iniciador específico GUS S1 (5'-GATGTGCTGTGCCTGAACCGTT-3') e o reverso GUS R1 (5'-ACGTATCCACGCCGTATTTCGGT-3') foram utilizados e para a amplificação do gene *hptII* foram empregados os iniciadores sense HPT S1 (5'-

ATTCGGACCGCAAGGAATCGGT-3') e reverso HPT R1 (5'-TCGGCCCAAAGCATCAGCTCAT-3'). Os iniciadores foram desenhados com auxílio do programa DS Gene v.1.1 (Accelrys). Os níveis de expressão relativa foram obtidos com a comparação dos valores de expressão do *gusA* em relação ao do gene *hptII* utilizando o método ΔCt . Os dados de expressão foram adquiridos em triplicata para cada extração de RNA e a média destes valores foram utilizadas nos cálculos para determinação da expressão relativa.

Análise histoquímica

Plantas transgênicas maduras (T_0) foram imersas em solução de X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronídeo) 1 mM em tampão de fosfato de sódio 100 mM pH 7.0, EDTA 10 mM, ferrocianeto de potássio 0.5 mM e Triton X-100 0.1%. Esse material vegetal foi incubado por 24 horas a 37°C e a clorofila foi removida dos tecidos por imersão em álcool 95%. As amostras foram observadas e fotografadas com auxílio de uma câmara digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As regiões flanqueadoras do gene *maBMY* confirmaram que o gene β -amilase é cópia única

Baseado nos dados de Southern blotting e no mapa de restrição da sequência do gene *maBMY*, as enzimas de restrição *Bgl* II e *Pst* I foram escolhidas para execução da iPCR. A enzima *Bgl* II apresentou duas bandas no Southern (figura 1.A), como o predito pelo mapa de restrição teórico para essa enzima na sonda (figura 1.B), e como a maior porção da sonda se encontra na porção 3'

juzante do sítio de restrição *Bgl*II, a banda de pouca intensidade se refere a região 5' montante do gene maBMY. O produto de iPCR para a enzima *Bgl* II resultou em um fragmento de aproximadamente 2,5 Kb (figura 1.D) o que coincide com o tamanho da banda pouco intensa do Southern, uma vez que uma pequena porção da região conhecida do gene maBYM foi amplificado na reação de iPCR com os iniciadores R1 e IS1. O produto de iPCR para o produto da enzima *Pst* I resultou em um fragmento de aproximadamente 3 Kb (figura 1.D) sendo 0,8 Kb pertencentes à região conhecida da sequência do gene maBMY, restando 2,5 Kb correspondente à região 5' montante do gene maBMY. Considerando o comprimento da sonda e o fato de que o sítio da enzima *Pst* I está localizado na extremidade 3' da sonda, uma banda de tamanho similar é observada para a enzima *Pst* I no Southern blot. A região 3' abaixo do gene maBMY também foi obtida por iPCR, agora utilizando apenas o produto de restrição da enzima *Bgl* II (figura 1.E), mas os iniciadores R9 e CTF1 resultaram em um produto de PCR de 2 Kb, do quais 1,3 Kb pertencem a região conhecida do gene maBMY. Deste modo, existem apenas 0,7 Kb da região 3' juzante do gene maBMY que correspondem à sequência desconhecida do gene. A montagem das sequências obtidas com os dados de sequenciamento mostraram que as regiões 5' montante e 3' juzante do gene maBMY foram de 2527 e 585 pb, respectivamente, confirmando os resultados obtidos com o Southern blot (para os produtos de restrição das enzimas *Bgl* II e *Pst* I). Adicionalmente, estas sequências permitiram a identificação dos novos sítios de restrição *Hinc* II e *Eco* RV (figura 1.C), os quais confirmaram os resultados do Southern blotting obtidos para estas enzimas (Astorino-Filho et al. - capítulo 2).

Figura 1. Caracterização estrutural da região promotora do gene *maBMY*. **A.** Análise de Southern blotting utilizando a região do gene *maBMY* como sonda. O tamanho do padrão λ DNA *Hind* III está indicado na esquerda e os sítios de restrição estão indicados acima da imagem. **B.** Mapa de restrição da sequência da sonda incluindo a localização dos introns (não presentes na sonda). As setas indicam as posições dos iniciadores utilizados nas reações de iPCR. **C.** Mapa de restrição do gene completo *maBMY* contendo as regiões genômicas 5' montante e 3' juzante do gene. A posição da sonda utilizada está indicada pelas caixas com linhas diagonais. **D e E.** Géis de agarose corados com brometo de etídeo dos produtos de iPCR para as regiões 5' acima e 3' abaixo do genen *maBMY*, respectivamente. Os tamanhos das bandas do padrão λ DNA *Hind* III estão indicados à esquerda da imagem e as enzimas de restrição utilizadas na recircularização do gDNA (molde para as reações de iPCR) estão indicadas acima das imagens.

A sequência 5' montante do gene maBMY apresenta prováveis motivos regulatórios relacionados com açúcar, auxina e baixa temperatura

As análises *in silico* revelaram a presença de diversos elementos cis presentes na região 5' montante do gene maBMY (figura 2). Os motivos que foram anotados com cinco ou mais bases foram considerados como motivos válidos para as próximas análises. Seguindo essa regra, apenas onze elementos em cis foram identificados na sequência da região promotora do gene maBMY e estes motivos parecem estar relacionados com resposta à açúcar, auxina e baixa temperatura. Três dos quatro motivos preditos *in silico* relacionados com açúcares são elementos de resposta negativa: pyrimidine-box (CCTTTT), também encontrado em promotores de genes de α -amilase de arroz e cevada (Morita et al., 1998; Mena et al., 2002); SRE, um elemento repressivo a açúcar (TTATCC) encontrado em *Arabidopsis* (Tatematsu et al., 2005), e o elemento AMY SRE (TATCCA), que modula um gene de α -amilase de arroz (Lu et al., 1998; Toyofuku et al., 1998; Lu et al., 2002; Chen et al., 2006). O único elemento cis de resposta positiva foi o WB-box (TTTGACY) também encontrado no promotor de um gene de β -amilase de batata-doce (Eulgem et al., 2000). A sequência TGGACGA localizada na posição -851 no promotor do gene maBMY apresenta apenas uma única base de diferença em relação ao motivo CMSRE-1 (TGGACGC), outro elemento cis de resposta positiva encontrado na posição -820 no promotor do gene de β -amilase de batata-doce (Maeo et al., 2001). Até o momento não há dados na literatura à respeito de um gene de β -amilase com expressão inibida por açúcares em plantas. Entretanto, o gene de β -amilase BMY1 de *Arabidopsis* (AT β -AMY) e o gene β -AMY de batata-doce são os únicos genes de

Figura 2. Elementos em cis das regiões do promotor e 5'UTR do gene *maBMY* preditos *in silico*. Um esquema das deleções do promotor é mostrado e o nome das construções contendo essas porções do promotor estão indicados. Acima das sequências são apresentados os elementos identificados na fita sentido e abaixo delas estão indicados os elementos identificados na fita reversa. A posição em relação ao TSS (sítio de início de transcrição) dos elementos em cis está indicada ao lado do nome do elemento.

β -amilase conhecidos por serem modulados por açúcares, com padrão de resposta positiva a esse fator (Mita et al., 1995; Nakamura et al., 1991; Takeda et al., 1995).

Na sequência da região 5' montante do gene maBMY foram identificados dois motivos de resposta a auxina (AuxRE). O primeiro está localizado a -197 pb na sequência do promotor maBMY (CATATG) e esse motivo também é encontrado na região NUE (*Nde*I Upstream Element – elemento acima do sítio *Nde* I) do promotor do gene 15A de soja e apresenta comportamento de resposta negativa ao fator auxina (Xu et al., 1997). Outro motivo (TGTCTC) foi identificado na posição -1165 do promotor maBMY que também foi encontrado na região NUE do promotor do gene 15A e nos elementos D1 e D4 do promotor do gene GH3, ambos de soja (Ulmasov et al., 1995), e na região promotora de diversos genes de *Arabidopsis* estimulados por auxina (Goda et al., 2004). Os resultados obtidos por Purgatto e colaboradores (2001) apontam para um efeito inibitório da auxina sobre a transcrição do gene maBMY. Baseado nestes dados, ambos os motivos identificados *in silico* poderiam fazer parte de um ou mais AuxREs (elementos de resposta à auxinas) presentes no promotor do gene maBMY, e estes elementos poderiam interagir com fatores de transcrição ARFs e Aux/IAAs, resultando na inibição da expressão desse gene, uma vez que os elementos Aux/IAAs são necessários para uma resposta negativa à auxina (Paciorek and Friml, 2006).

Dois elementos de resposta à baixa temperatura (LTRE) foram identificados na sequência do promotor do gene maBMY. Ambos os motivos foram identificados em genes de cevada positivamente responsivos à condição de baixa temperatura (White et al., 1993; Dunn et al., 1998) e um deles (ACCGACA) foi identificado em *Arabidopsis* (Nordin et al., 1993). Não há dados a respeito de elementos de resposta

identificados em promotores de genes que respondem negativamente à condição de baixa temperatura.

O programa de predição *in silico* também identificou diversos motivos TATA-box e CAAT-box ao longo da região 5' acima do início de transcrição do gene maBMY. Entretanto, os motivos encontrados a -28 e -128 pb a partir do início de transcrição (figura 2) foram adotados como os motivos TATA-box e CAAT-box corretos, respectivamente.

O promotor maBMY possui um elemento regulatório funcional

De todas as construções contendo porções do promotor do gene maBMY e com o gene repórter GUS, apenas as construções pBMYPR3/GUS e pBMYPR2ANTI/GUS (controle negativo) não apresentaram atividade GUS. Estes resultados sugerem que o motivo TATA-box determinado *in silico* é um elemento funcional do promotor do gene maBMY. A atividade GUS obtida com a construção pBMYD1/GUS mostrou que a região de 141 pb foi suficiente para promover a transcrição do gene repórter GUS em plantas de tabaco. Os resultados preliminares das análises de qRT-PCR em tempo real apresentaram valores de expressão não reprodutíveis, o que não permitiu a determinação dos valores de expressão relativa para o gene gus.

O gene maBMY é diretamente induzido por etileno, mas o decréscimo do teor do AIA livre é necessário para a expressão do gene maBMY e pode ocorrer pelo processo de conjugação de AIA, o qual pode ser disparado pelo etileno endógeno

O padrão de transcritos do gene maBMY de todos os tratamentos coincidem com as curvas de etileno (figura 4.B e 4.C). Entretanto, não foi identificado, *in silico*, elemento de resposta à etileno na região promotora do gene maBMY.

Os resultados do conteúdo de auxina e da transcrição do gene maBMY nos frutos de banana mostraram que o conteúdo de AIA livre foi reduzido, enquanto o nível de transcrição do gene maBMY aumentou (figura 4). Estes resultados corroboram os dados anteriores obtidos por Purgatto et al. (2001), uma vez que foi mostrado neste trabalho que a auxina inibe a transcrição do gene maBMY. Os tratamentos com aplicação de etileno exógeno mostraram uma pronunciada queda do conteúdo de AIA livre (Figura 4.A). Uma conexão entre as vias do etileno e auxina foi demonstrada com trabalho realizado por De Paepe et al. (2004), no qual o tratamento com etileno exógeno aumentou a expressão do gene UDP-glicose-indol-3-acetato- β -D-glicosiltransferase (iaglu) de *Arabidopsis*. Essa enzima é um membro de uma família multigênica e formas recombinantes dessa enzima foram capazes de produzir éster de 1-O-indol-acetil-glicose (IAGlc) (Jackson et al., 2001). Os AIA conjugados podem ser formados com outros tipos de açúcares, aminoácidos, e peptídeos, e estas formas conjugadas do AIA estão envolvidas no transporte, armazenamento e controle do nível de AIA livre. Dados mostrados por Purgatto et al. (2002) mostraram que o conteúdo de AIA livre diminuiu, enquanto as formas conjugadas (principalmente éster) do AIA aumentaram de forma concomitante à degradação do amido durante o amadurecimento de fatias de banana. Entretanto, a diminuição do AIA livre não foi correlacionada com a produção de etileno nos grupos controle e “13°C” (Figura 4.A e 4.C). Isto pode ser atribuído ao fato de que níveis endógenos de etileno são suficientes para induzir o gene iaglu. É interessante notar que níveis detectáveis de etileno são identificados próximo ao dia 8 (após colheita) e

Figura 3. O efeito do armazenamento sob baixa temperatura e tratamento com etileno exógeno no conteúdo do AIA livre, produção de etileno e expressão do gene da β -amilase durante o amadurecimento da banana. **A.** Conteúdo de AIA livre. **B.** Produção de etileno. **C.** Northern blot do gene maBMY. Dph – Dias pós-colheita, maBMY – mRNA do gene da β -amilase gene, e 18S – rRNA da fração 18S usado para normalização.

isso está correlacionado com um rápido decréscimo do conteúdo do AIA livre. Baseado nestas observações, é provável que a diminuição do AIA livre possa ser mediada pela ação de um gene iaglu de banana responsivo positivamente ao etileno endógeno.

A expressão do gene maBMY também é inibida por baixas temperaturas

O perfil de expressão do gene maBMY foi muito similar entre os grupos controle e o de frutos armazenados à baixa temperatura (figura 4.C). Esse padrão similar pode ser explicado pelo fato do grupo “13°C” ter sido coincidentemente retirado do tratamento ao mesmo tempo em que o grupo controle (15 Dph) mostrou aumento da transcrição do gene maBMY. Entretanto, um efeito mais evidente da baixa temperatura na inibição da transcrição do gene maBMY pode ser visualizado na comparação do perfil obtido com o grupo “etileno+13°C” com os dados apresentados por Nascimento et al. (2006), em que bananas tratadas com a mesma quantidade de etileno exógeno, mas armazenadas a 20°C, mostraram um rápido aumento do conteúdo de transcritos (conteúdo máximo obtido com 2 Dph). Outras β -amilases também são inibidas por baixas temperaturas. O gene BMY1 foi reprimido por tratamento à baixa temperatura (Kaplan and Guy, 2004) e o BMY3, o gene ortólogo ao gene maBMY em *Arabidopsis*, mostrou baixo nível de transcritos em condições de baixa temperatura (Kaplan and Guy, 2005).

O promotor do gene maBMY não apresentou expressão nas raízes

A construção pBMYPR1/GUS contém o gene reporter GUS sob controle do promotor do gene maBMY com a região 5'UTR deste mesmo gene. Esta construção apresentou atividade GUS em ensaio histoquímico nas folhas, gemas e caules, mas

Figura 4. Expressão do gene GUS sob controle do promotor do gene maBMY em plantas de tabaco transgênicas (T_0). **A.** Folha; **B.** Caule (corte transversal); **C.** Caule (corte longitudinal); e **D.** Raízes.

não apresentou nenhum sinal de atividade nas raízes (figura 4). Em *Arabidopsis*, o gene da β -amilase BMY3 mostrou um padrão diferente de expressão tecido-específico. O gene BMY3 apresentou altos níveis de expressão nas raízes, gemas e flores quando comparados aos tecidos dos caule e folhas, sendo neste último tecido verificado um padrão circadiano de expressão desse gene (Chandler et al., 2001).

CONCLUSÕES

A sequência 5' acima do início de transcrição do gene maBMY demonstrou ser um promotor funcional em um sistema heterólogo. Baseado nesses resultados, o gene maBMY parece ser um gene regulado positivamente pelo etileno, como já fora anteriormente proposto. Entretanto, este gene pode também ser inibido por baixa temperatura e auxina, provavelmente devido à interações de fatores de transcrição específicos com os prováveis elementos regulatórios relacionados com auxina e baixa temperatura, identificados na sequência desse promotor. Somado à isso, é possível que o decréscimo do AIA livre, necessário para a expressão do gene maBMY durante o amadurecimento da banana, resulte da conjugação do AIA livre, processo disparado por incremento nos níveis endógenos de etileno.

REFERÊNCIAS

- Adachi, M., Mikami, B., Katsube, T., Utsumi, S., 1998. Crystal Structure of Recombinant Soybean α -Amylase Complexed with β -Cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* 273, 19859-19865.
- Bierhals, J. D., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O., 2004. Activity, Cloning, and Expression of an Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzyme from Banana Fruit. *J. Agr. Food Chem.* 52, 7412–7418.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M., 1995. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agr. Food Chem.* 43, 347–351.
- Chandler, J.W., Apel, K., Melzer, S., 2001. A novel putative beta-amylase gene and At β -Amy from *Arabidopsis thaliana* are circadian regulated. *Plant Sci.* 161, 1019–1024.
- Chen, P.W., Chiang, C.M., Tseng, T.H., Yu, S.M., 2006. Interaction between rice MYBGA and the gibberellin response element controls tissue-specific sugar sensitivity of α -amylase genes. *Plant Cell.* 18, 2326-2340.
- Dapeng, Z., Yongzhang, W., 2002. β -Amylase in development apple fruits: activities, amounts and subcellular location. *Sci. China Ser. C.* 45, 429–440.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van, Hummelen, P., Zabeau, M., Van Der Straeten, D., 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals

- novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. *Plant J.* 39, 537–559.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Dunn, M.A., White, A.J., Vural, S., Hughes, M.A., 1998. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* 38, 551-564.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Heijne, G.V., 1999. ChloroP: a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E., 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5, 199-206.
- Garcia, E., Lajolo, F.M., 1988. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *J. Food Sci.* 53, 1181–1186.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. John M. Walker, Humana Press, New Jersey, USA.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., Yoshida, S., 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134, 1555-1573.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De-Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Pagni, M., Sigrist, C.J.A., 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34, 227-230.

- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A. and Bowles, D.J., 2001. Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276, 4350–4356.
- Kaplan, F., Guy, C.L., 2004. β -Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock. *Plant Physiol.* 135, 1674-1684.
- Kaplan, F., Guy, C.L., 2005. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44, 730–743.
- Laby, R.J., Kim, D., Gibson, S.I., 2001. The *ram1* mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased β -Amylase activity. *Plant Physiol.* 127, 1798-1807.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., Kavanagh, T.A., 1999. An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J.* 20, 519–527.
- Lloyd, J.R., Kossmann, J., Ritte, G., 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* 10, 130–137.
- Loke, J.C., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C., Li, Q.Q., 2005. Compilation of mRNA Polyadenylation Signals in *Arabidopsis* Revealed a New Signal Element and Potential Secondary Structures. *Plant Physiol.* 138, 1457-1468.
- López-Gómez, R., Gómez-Lim, M.A., 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27, 440-442.

- Lu, C.A., Lim, E.K., Yu, S.M., 1998. Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J. Biol. Chem.* 273, 10120-10131.
- Lu, C.A., Ho, T.H.D., Ho, S.L., Yu, S.M., 2002. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. *Plant Cell.* 14, 1963-1980.
- Maeo, K., Tomiya, T., Hayashi, K., Akaike, M., Morikami, A., Ishiguro, S., Nakamura, K., 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato. *Plant Mol. Biol.* 46, 627–637.
- Mainardi, J.A., Purgatto, E., Vieira, A., Bastos, W.A., Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Lajolo, F.M., 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J. Agr. Food Chem.* 54, 7294-7299.
- Maruyama, K., Sugano, S., 1994. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene.* 138, 171-174.
- McCleary, B.V., Codd, R., 1989. Measurement of beta-amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. *J. Cereal Sci.* 9, 17–33.
- McClelland, M., Nelson, M., Raschke, E., 1994. Effect of site-specific modification on endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22, 3640-3659.
- Medina-Suarez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aled, J., Bird, C.R., Seymour, G.B., 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 differing ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115, 453–461.

- Morita, A., Umemura, T., Kuroyanagi, M., Futsuhara, Y., Perata, P., Yamaguchi, J., 1998. Functional dissection of a sugar-repressed alpha-amylase gene (Ramy1A) promoter in rice embryos. *FEBS Lett.* 423,81-85.
- Mota, R.V., Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Purgatto, E., Rosseto, M.R.M., Lajolo, F.M., 2002. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* 216, 325–333.
- Nascimento, J.R.O., Junior, A.V., Bassinello, P.Z., Cordenunsi, B.R., Mainardi, J.A., Purgatto, E., Lajolo, F.M., 2006. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Tec.* 40, 41-47.
- Niittyyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., Zeeman, S.C., 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*. 303, 87–89.
- Nordin, K., Vahala, T., Palva, E.T., 1993. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 21, 641-653.
- Ochman, H., Gerber, A.S., Hartl, D.L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621–625.
- Paciorek, T., Friml, J., 2006. Auxin signaling. *J. Cell Sci.* 119, 1199-1202.
- Purgatto, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., 2001. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta* 212, 823–828.
- Purgatto, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Cordenunsi, B.R., 2002. 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.* 159, 1105-1111.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, A., Lloyd, J.R., Kossmann, J., 2002. Downregulation of a chloroplast-target β -amylase leads to a starch excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30, 581–591.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M., 2005. Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 73–98.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., Smith, A.M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 136, 2687–2699.
- Sparla, F., Costa, A., Schiavo, F.L., Pupillo, P., Trost, P., 2006. Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted β -Amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 840–850.
- Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., Nambara, E., 2005. Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 757–766.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Totsuka, A., Fukazawa, C., 1993. Expression and mutation of soybean beta-amylase in *Escherichia coli* Eur. J. Biochem. 214, 787–794.

- Totsuka A., Nong, V.H., Kadokawa, H., Kim, C.S., Itoh, Y., Fukazawa, C., 1994. Residues essential for catalytic activity of soybean beta-amylase. *Eur. J. Biochem.* 221, 649-654.
- Toyofuku, K., Umemura, T., Yamaguchi, J., 1998. Promoter elements required for sugar-repression of the RAm3D gene for alpha-amylase in rice. *FEBS Lett.* 428, 275-280.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1995. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell.* 7, 1611-1623.
- Vieira A., Nascimento J.R.O., Lajolo F.M., 2006. Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Agr. Food Chem.* 54, 8222-8228.
- Zehr, B.D., Savin, T.J., Hall, R.E., 1989. A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 182, 157-159.
- Ying, Q., Yi, W., Chang-Qing, D., Dapeng, Z., 2003. β -Amylase is predominantly localized to plastids in the developing tuberous root of sweet potato. *Acta Bot. Sin.* 45, 581–588.
- Yoshida, N., Nakamura, K., 1991. Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of cDNA Encoding the Subunit of Sweet Potato β -Amylase. *J. Biochem.* 110, 196–201.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Sahara, H., Koshino, S., 1994. Expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding barley beta-amylase and properties of recombinant beta-amylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1080–1086.
- Yoshigi, N., Okada, Y., Maeda, H., Sahara, H., Tamaki, T., 1995. Construction of a plasmid used for the expression of a sevenfold-mutant barley β -amylase with

- increased thermostability in *Escherichia coli* and properties of the sevenfold-mutant β -amylase. *J. Biochem.* 118, 562–567.
- Wang, S.M., Lue, W.L., Wu, S.Y., Huang, H.W., Chen, J., 1997. Characterization of a maize β -Amylase cDNA clone and its expression during seed germination. *Plant Physiol.* 113, 403-409.
- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P., Sharkey, T.D., 2005. β -Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* 137, 756–761.
- Weise, S.E., Weber, A.P.M., Sharkey, T.D., 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta.* 21, 474–482.
- White, A.J., Dunn, M.A., Brown, K., Hughes, M.A., 1994. Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *J. Exp. Bot.* 45, 1885-1892.
- Xu, N., Hagen, G., Guilfoyle, T., 1997. Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci.* 126, 193-201.

CAPÍTULO 4

Considerações finais

Com base na sequência completa da região transcrita do gene maBMY foi possível determinar *in silico* um quadro de leitura correspondente à uma proteína maior que uma sequência parcial anteriormente anotada para esse gene na banana.

Outro aspecto importante revelado pelos resultados obtidos nesse trabalho foi quanto à provável localização subcelular desse gene. A partir dessa sequência completa foi possível identificar, *in silico*, tanto uma extensão amino-terminal quanto um peptídeo de trânsito, potencialmente responsável pelo endereçamento dessa proteína para os plastídeos. Para confirmar essa hipótese foram feitas construções quiméricas contendo os genes maBMY e eGFP, as quais foram introgrididas em células de epiderme de cebola e tabaco, seguido por análise de microscopia confocal de fluorescência. Resultados preliminares com o gene maBMY fusionado com o gene eGFP mostraram um padrão de compartimentalização, enquanto que o controle positivo (apenas eGFP) apresentou sinal de fluorescência por toda a célula. Esses resultados permitem supor o endereçamento dessa β -amilase para os amiloplastos, o que reforça a hipótese dessa enzima ter um papel fisiológico importante no metabolismo de amido durante o amadurecimento da banana. Somado a isso, para verificar a funcionalidade do produto de expressão do gene, foram obtidas enzimas recombinantes para o gene maBMY em sistema heterólogo (*E. coli*). Embora tenham sido obtidos produtos de tamanho adequados quando comparados com a sequência de nucleotídeos, e com ao tamanho de outras β -amilases, nenhuma destas formas apresentou atividade hidrolítica tanto sobre o amido solubilizado quanto contra substrato sintético específico.

Os resultados apresentados até o momento mostram que o gene maBMY apresenta uma região codificadora funcional. No entanto, seu produto obtido em *E. coli* não apresenta atividade provavelmente devido ao sistema de expressão

utilizado não permitir que pontes dissulfetos sejam formadas no espaço citoplasmático das bactérias e, também, que não há nesse modelo enzimas auxliadoras de dobramento, conhecidas como chaperonas, as quais podem ser essenciais para que a proteína tenha o correto dobramento final que permita a atividade catalítica da enzima. Além disso, é possível que o sítio de clivagem determinado *in silico* não esteja correto, o que poderia acarretar numa proteína madura, mas que não contém resíduos importantes para atividade da enzima, ou que contém resíduos do peptídeo de trânsito responsáveis pela inibição da atividade, atuando como um mecanismo de proteção da célula para que esta atividade específica da enzima não ocorra fora do local para o qual a enzima será destinada.

Somado ao fato de que relatos anteriores apontaram para uma regulação transcricional desse gene, tornou-se interessante a obtenção e caracterização funcional do promotor do gene *maBMY*. Com o conhecimento da sequência completa da região transcrita do gene *maBMY* e com os resultados de Southern blotting para este gene foi possível obter por iPCR uma sequência de 2527 pb da região 5' montante do início de transcrição do gene *maBMY*. Essa região foi caracterizada como promotora da transcrição desse gene e funcional através de ensaios de expressão transiente e estável utilizando os genes repórteres GUS e eGFP. Análises *in silico* dessa sequência promotora apontam para a existência de motivos regulatórios relacionados com auxina, baixa temperatura e açúcares. Os resultados da expressão do gene *maBYM* durante o amadurecimento mostraram que, quando armazenados sob condições de frio, o efeito da aplicação exógena de etileno é inibido, o que pode sugerir a existência de um controle transcricional por baixa temperatura, provavelmente nos motivos determinados *in silico*. Outro aspecto

claro, quando comparadas as curvas de produção de etileno e níveis de auxina dos te2Xds, é que o etileno é um indutor da transcrição desse gene em banana. Entretanto, sob condições normais ou de apenas frio, os níveis de auxina no tecido têm que se encontrarem baixos para permitir a transcrição do gene maBMY, o que concorda com os resultados anteriormente reportados por trabalho do nosso grupo.

Essa redução no nível de auxina do tecido pode ocorrer devido a conjugação da auxina livre com açúcares na forma de éster, o tipo de auxina conjugada mais abundante durante o amadurecimento da banana. O aumento dessa forma de auxina foi concomitante ao aumento da degradação do amido durante o processo de amadurecimento. Outra evidência dessa possível rota para a auxina livre veio com trabalhos em *Arabidopsis* que mostraram que o gene *iaglu*, o qual codifica para uma enzima capaz de realizar a conjugação da auxina livre na forma de auxina conjugada com açúcares, é positivamente regulado por etileno. No caso dos resultados em banana, isso poderia ocorrer se a indução desse gene ocorresse através de níveis endógenos de etileno, uma vez que não há clara correlação com os picos de produção de etileno e queda dos níveis de auxina.

Ambos os trabalhos apresentados nessa tese mostraram que o gene maBMY codifica para uma proteína que muito provavelmente apresenta papel importante no processo de mobilização do amido durante o amadurecimento da banana.