UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E EXPRESSÃO
DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE DURANTE O
AMADURECIMENTO DA BANANA.

JOÃO ROBERTO OLIVEIRA DO NASCIMENTO

Tese apresentada para obtenção do
grau de DOUTOR

ORIENTADOR:
Prof. Tit. Franco M. Lajolo

SÃO PAULO
1997

15327

JOÃO ROBERTO OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E EXPRESSÃO DA
SACAROSE-FOSFATO SINTASE DURANTE O
AMADURECIMENTO DA BANANA.**

**COMISSÃO JULGADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR**

Prof. Tit. ***Franco Maria Lajolo***
Presidente e Orientador

Prof. Dr. ***Fernando Finger***
1º. Examinador

Prof. Dr. ***Marcos Buckeridge***
2º. Examinador

Profa. Dra. ***Beatriz Rosana Cordenunsi***
3º. Examinador

Profa. Tit. ***Marilene De Vuono Camargo Penteado***
4º. Examinador

São Paulo, 26 de março de 1997.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Franco Lajolo, pela orientação nesse trabalho e acima de tudo pela confiança, a qual servirá de permanente incentivo.

À professora Beatriz Cordenunsi, pela valiosa ajuda nesse trabalho e principalmente pela iniciação à pesquisa. Sua dedicação e incentivo foram determinantes para essa escolha.

Ao professor Marcos Alcocer, pela atenção e introdução à biologia molecular.

Ao professor Gerival Vieira da Universidade Federal de Viçosa pela gentileza no fornecimento das bananas.

Ao professor Fernando Moreno pela disponibilidade no uso de seu laboratório e do material radioativo.

Ao William, pela ajuda nas inúmeras purificações e pela boa companhia.

Ao Paulo, pelas proveitosas discussões e disponibilidade no auxílio com técnicas e equipamentos.

Ao Ton, pela amizade e colaboração.

À Lúcia e Márcia pelo suporte técnico.

Ao professor Alejandro Katzin do Instituto de Ciências Biomédicas pelo auxílio técnico relativo aos Western blots.

À professora Aline da Silva e ao pós-graduando José Antônio do Instituto de Química pelo fornecimento de material radioativo.

À bibliotecária Moema pelo auxílio bibliográfico.

Aos professores e colegas do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pela bolsa e suporte financeiro concedidos.

Aos meus pais, Renato e Marli.

Ao meu avô Isidoro, *in memoriam*.

ABREVIATURAS

AMV-RT	transcriptase reversa do vírus da mieloblastose avícola
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	albumina sérica bovina
³² P-CTP	citidina 5'-trifosfato [α - ³² P]
cDNA	DNA complementar
ddATP	2', 3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP	2', 3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
ddGTP	2', 3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
ddNTP	2', 3'-didesoxinucleotídeo 5'-trifosfato
ddTTP	2', 3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	2'-desoxinucleotídeo 5'-fosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
frutose-6P	frutose-6-fosfato
glicose-6P	glicose-6-fosfato
hexose-P	hexose-fosfato
IPTG	isopropil tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase
KD	quilodalton
K _R	coeficiente de retardamento
LB	Luria-Bertani
Mops	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
NBT	azul de p-nitro tetrazólio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase

Pi	fosfato inorgânico
PM	peso molecular
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
poli-dT	ácido oligotimidílico
PVP	polivinilpirrolidona
<i>R_f</i>	mobilidade relativa
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
sacarose-6P	sacarose-6-fosfato
SDS	lauril sulfato de sódio
Ser 158	serina 158
SPP	sacarose-fosfato fosfatase
SPS	sacarose-fosfato sintase
SS	sacarose sintase
TBE	tris-borato-EDTA
triose-P	triose-fosfato
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UDP-glicose/UDPG	uridina 5'-difosfoglicose
³² P-UTP	uridina 5'-trifosfato [α - ³² P]
<i>V_{max}</i>	velocidade máxima
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil galactopiranosidio

ÍNDICE

1- Introdução	1
1.1- Regulação da atividade da SPS	3
1.2- Propriedades moleculares da SPS	7
1.3- Expressão da SPS	9
1.4- Sacarose-fosfato sintase em frutos	10
2- Objetivos	14
3- Materiais	15
3.1- Frutos	15
3.2- Vetor de clonagem e células	15
4- Métodos	16
4.1- Extração da SPS	16
4.2- Atividade enzimática	16
4.3- Determinação de amido	17
4.4- Determinação de proteína	17
4.5- Purificação parcial da SPS	18
4.6- Extração de proteína total para eletroforese em condições dissociantes	18
4.7- Eletroforese em gel de poliacrilamida	19
4.8- Identificação da SPS em gel de poliacrilamida	19
4.9- Peso molecular da subunidade	20
4.10- Peso molecular da SPS em gel de poliacrilamida não-dissociante	20
4.11- Preparo de antisoro anti-SPS	21
4.12- Western blot	22
4.13- Peso molecular da SPS por cromatografia de filtração em gel	22
4.14- Efeito de inibidores de proteases	23

4.15- Extração de RNA total e síntese de primeira fita de DNA complementar	23
4.16- Primers e amplificação por PCR	24
4.17- Purificação e clonagem do produto de amplificação	25
4.18- Subclonagem	26
4.19- Sequenciamento	27
4.20- Eletroforese de DNA em gel de agarose	27
4.21- Northern blot	28
5- Resultados e discussão	29
5.1- Purificação	29
5.2- Caracterização física	37
5.2.1- Identificação da SPS no gel de poliacrilamida	37
5.2.2- Peso molecular da subunidade	41
5.2.3- Incubação com inibidores de proteases	44
5.2.4- Peso molecular da SPS em gel de poliacrilamida não-dissociante	46
5.2.5- Peso molecular da SPS por cromatografia de filtração em gel	50
5.3- Clonagem e sequenciamento	55
5.3.1- Extração de RNA total do fruto	55
5.3.2- Amplificação através de PCR e clonagem	58
5.4- Expressão da SPS	67
6- Conclusões	75
7- Referências bibliográficas	76
8- Resumo	90
9- Abstract	91

1- INTRODUÇÃO

Durante o amadurecimento de frutos ocorrem mudanças de cor, odor, sabor e maciez decorrentes de alterações envolvendo diversas etapas bioquímicas. Essas alterações se processam de maneira altamente coordenada e estão relacionadas à atividade de enzimas, contando com a participação de hormônios, na iniciação e desenvolvimento desses processos e também de regulação gênica, uma vez que a expressão de genes específicos parece ser necessária durante esse período (Tucker e Grierson 1987, Speirs e Brady 1991).

Dentre as principais alterações bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento, podem ser destacadas aquelas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. A mobilização de carboidratos de reserva na forma de amido, ou de sacarose proveniente da planta, levando ao acúmulo de açúcares, contribui para obtenção de um importante atributo de qualidade dos frutos.

A banana constitui um bom modelo para estudo do metabolismo de carboidratos devido às marcantes alterações que ocorrem durante o amadurecimento. O amido armazenado é reduzido durante o climatério, de teores próximos de 23% a menos de 1%, enquanto o teor de sacarose aumenta aproximadamente 12 vezes, podendo chegar a 15% e precedendo o aparecimento de hexoses (Arêas e Lajolo 1981).

Durante o amadurecimento, Garcia e Lajolo (1988) detectaram a presença de 3 α - e 4 β -amilases e α -1,4- e α -1,6-glicosidades e um significativo aumento de suas atividades durante o pico climatérico, quando grande parte do amido já havia sido hidrolisado. Apenas a atividade de β -amilases aumentou antes do pico respiratório e correlacionou-se com o decréscimo no teor de amido. A atividade de fosforilases também parece importante durante o amadurecimento, uma vez

que Chitarra e Lajolo (1983) observaram um pequeno aumento na atividade dessas enzimas antes do início da degradação do amido, seguido por uma redução durante o climatério. Na banana marmelo essa diminuição na atividade foi acentuada e concomitante ao desaparecimento do amido (Chitarra e Lajolo 1983).

De acordo com Beaudry e col. (1989) o fluxo de carbono durante o climatério sofre profundas alterações sendo que em frutos pré-climatéricos o fluxo pela via glicolítica predomina sobre o fluxo pela gliconeogênese, enquanto no pico respiratório ocorre uma inversão. O fluxo de carbono pela glicólise, representado pelo consumo respiratório, aumenta entre 4-5 vezes, ao passo que a gliconeogênese, representada pelo acúmulo de açúcar, aumenta de 50-100 vezes. Em 2 dias, o teor de açúcares aumenta para 75% do total de carboidratos, sendo apenas 1,5% convertidos em CO₂ pela respiração. Os níveis de glicose-6-fosfato (glicose-6P) e frutose-6-fosfato (frutose-6P), metabólitos importantes entre o amido e triose-fosfato (triose-P) na degradação do amido e entre triose-P e sacarose na síntese de açúcares, sofrem um aumento de apenas duas vezes durante o amadurecimento, sugerindo uma ativação das etapas enzimáticas que limitam a degradação do amido e/ou a síntese de sacarose.

A biossíntese de sacarose nos tecidos vegetais pode ocorrer por duas vias, como demonstrado por Leloir e col. (1955) e Leloir e Cardini (1955). A primeira, mediada pela sacarose sintase (SS) (UDP-glicose: D-frutose 2-glicosiltransferase) (EC 2.4.1.13), utilizando UDP-glicose (UDPG) como doador de glicose e frutose e a segunda, mediada pela sacarose-fosfato sintase (SPS) (UDP-glicose: D-frutose-6-fosfato 2-glicosiltransferase) (EC 2.4.1.14), utilizando frutose-6P em lugar de frutose. A sacarose-6-fosfato (sacarose-6P) seria prontamente convertida a sacarose por ação de uma fosfatase específica, a sacarose-6P fosfatase (SPP). A reação catalisada

pela SS apresentaria constante de equilíbrio entre 1 e 8, indicando sua natureza reversível (Pontis 1977), porém a distribuição da sua atividade, predominantemente em tecidos não-fotossintetizantes, sugere um papel relevante na hidrólise da sacarose (Delmer e Albersheim 1970). A ação da SPS estaria diretamente relacionada à síntese da sacarose, a partir do carbono fixado pela fotossíntese, sendo que o equilíbrio da reação é fortemente deslocado no sentido de síntese (Mendicino 1960). A reação se mostra praticamente irreversível, uma vez que a sacarose-6P produzida é prontamente convertida em sacarose por ação da SPP. A SPS seria importante não apenas pela síntese de sacarose mas também por controlar a partição do carbono entre amido e sacarose (Stitt e col. 1987).

Reações de síntese de sacarose:

1.1- Regulação da atividade da SPS.

A atividade da SPS parece ser regulada por dois mecanismos distintos. O primeiro é denominado “controle fino”, e consiste na regulação alostérica por ativadores/inibidores. Doehlert e Huber (1983a, b) observaram que a SPS de folha de espinafre é ativada por glicose-6P, aumentando a V_{max} e a afinidade por frutose-6-fosfato. Essa ativação por glicose-6P é

antagonizada por fosfato inorgânico (Pi) que atuaria como inibidor parcial competitivo, sendo a inibição dependente do pH como função da concentração de íon fosfato dibásico. Estes autores sugerem que a regulação da atividade se dá pela razão glicose-6P/Pi e que o acúmulo de Pi sinaliza uma redução no suprimento de hexoses-fosfato (hexose-P).

O outro mecanismo de regulação consiste em mudanças na atividade decorrentes de alteração das propriedades cinéticas através de modificação covalente por fosforilação reversível ou alteração nos níveis de proteína SPS. O controle por fosforilação atuaria principalmente para ajuste da atividade às variações metabólicas impostas pelo ciclo claro-escuro em tecidos fotossintetizantes.

De acordo com Stitt e col. (1988) foram observadas modificações nas propriedades cinéticas para a SPS obtida de folha de espinafre. A variação na sensibilidade ao Pi durante o ciclo claro-escuro, sem variação na V_{max} e a manutenção dessas diferenças cinéticas após purificação parcial, foram consideradas evidências de modificação da proteína SPS. Essa dependência com o ciclo claro-escuro seguiu o acúmulo e declínio de sacarose e não decorreu de uma ação direta da luz, como constatado pela obtenção de enzima altamente ativa a partir de folhas mantidas no escuro infiltradas com manose (sequestrador de Pi). A presença de altos níveis de sacarose, endógena ou exógena, também reduziu a ativação da enzima, em maior grau para a SPS obtida de folhas mantidas no escuro.

Walker e Huber (1989) constataram, utilizando anticorpos monoclonais, que as mudanças na atividade com o ciclo claro-escuro não estavam associadas a variações nos níveis de proteína SPS. Mudanças relacionadas à quantidade de proteína foram observadas apenas durante o período

de desenvolvimento da folha, sendo os maiores níveis alcançados quando esse órgão passou de importador de carbono fotoassimilado a exportador.

Em espinafre, Siegl e Stitt (1990) observaram que o tratamento com manose induziu ao aumento no estado de ativação enquanto a sacarose teve efeito oposto. Considera-se como estado de ativação a porcentagem da atividade obtida em condições limitantes de substrato em presença de Pi em relação a atividade sob condições de V_{max} (substrato saturante).

$$\text{estado de ativação (\%)} = \frac{\text{ativ. substrato limitante (+Pi)}}{\text{ativ. substrato saturante}} \times 100$$

Huber e col. (1989) demonstraram *in vitro* e *in vivo* a incorporação de ^{32}P à subunidade da SPS de espinafre paralelamente a redução no estado de ativação da enzima. Esta inativação mostrou-se dependente do tempo e da concentração de Mg^{2+} , sugerindo a ação de uma proteína quinase, sendo esta a primeira evidência de fosforilação como mecanismo de controle da SPS. Posteriormente, Huber e Huber (1990) isolaram, a partir da digestão triptica da subunidade fosforilada, diversos peptídeos fosforilados exclusivamente em resíduos de serina, cujo sequenciamento (McMichael e col. 1993) indicou a serina 158 (Ser 158) como o principal sítio de fosforilação.

De acordo com Huber e Huber (1990) a enzima de folha de espinafre obtida com baixo estado de ativação foi reativada *in vitro* por incubação à temperatura ambiente. Essa ativação foi revertida *in vivo* por ATP e bloqueada pelo uso de ácido okadaico e vanadato, sugerindo a ação de uma proteína fosfatase específica, inibida por Pi, levando a reativação da SPS. Resultados semelhantes foram obtidos por Siegl e col. (1990), que trabalhando com os inibidores ácido

okadáico e microcistina, observaram o bloqueio da reativação da SPS de espinafre fosforilada, redução na incorporação de ^{14}C na sacarose e estímulo da síntese de amido.

O estudo dos fatores que regulam a fosforilação da SPS *in vivo* (Weiner e col. 1992) confirmou o papel de uma proteína fosfatase, inibida por Pi e insensível a glicose-6P, cuja atividade é modulada durante o dia em consequência de variação na síntese protéica. A proteína quinase apresenta comportamento distinto, sendo que a inibição por glicose-6P não é antagonizada por Pi e sua atividade não varia durante o dia. De acordo com McMichael e col. (1995) a ação dessa quinase depende do reconhecimento de resíduos de aminoácidos vizinhos a Ser 158 e sua ação é bastante específica, uma vez que a conversão do resíduo da Ser 158 em alanina não permite a fosforilação do resíduo imediatamente anterior, a serina 157.

Regulação da SPS por fosforilação:

A caracterização dos mecanismos de controle da atividade da SPS permite estabelecer três classes da enzima. Segundo Huber e col (1989-b) a primeira classe corresponde à enzima de folha de milho, que é regulada alostericamente e cuja fosforilação afetaria tanto a V_{max} quanto a sensibilidade aos efetores. O segundo tipo é representado pela enzima de espinafre, mais amplamente estudada, em que há regulação alostérica e a V_{max} não é afetada pela fosforilação,

apenas a afinidade para os substratos e efetores. A enzima obtida de folha de soja constitui a terceira classe, sendo fracamente afetada por metabólitos e sem evidência de regulação por fosforilação. Nielsen e Huber (1989) sugerem que o sítio alostérico não existe ou não é funcional e que a atividade dessa enzima depende apenas da quantidade de proteína ativa e dos níveis de substrato, uma vez que na soja foi observada variação de hexoses-P durante o ciclo claro-escuro.

Apesar da maior parte dos estudos se concentrarem na compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da atividade da enzima relacionados ao ciclo claro-escuro, o mesmo mecanismo de controle, através de modificação covalente por fosforilação é proposto para regulação da atividade em tecidos não-fotossintetizantes. O estado de ativação da SPS de tubérculos de batata pode ser reduzido com o aumento na concentração de sacarose (Reimholz e col. 1994) e a ativação pode ser inibida por microcistina e ácido okadaico, sugerindo que o controle negativo pelo produto possa ser feito via fosforilação.

1.2- Propriedades moleculares da SPS.

Também a caracterização molecular da enzima de folhas tem recebido maior atenção. As SPS de espinafre (Doehlert e Huber 1983, Salvucci e col. 1990, Sonnewald e col. 1993), milho (Kalt-Torres e col. 1987, Bruneau e col. 1991) e soja (Nielsen e Huber 1989), germe de trigo (Salerno e Pontis 1978) e tubérculo de batata (Reimholz e col. 1994), foram purificadas e os valores dos pesos moleculares indicaram que a enzima nativa é composta por associações de subunidades idênticas. Os valores do peso molecular da subunidade situam-se entre 117-120 kD para a enzima de folha de espinafre (Walker e Huber 1989, Klein e col. 1993, Sonnewald e col.

1993) e raiz de beterraba (Hesse e col. 1995), entre 125-138 kD para a enzima de folha de milho (Bruneau e col. 1991) e tubérculo de batata (Reimholz e col. 1994) e 90 kD para a enzima de germe de trigo (Salerno e col. 1991). A forma nativa da enzima parece ser constituída de arranjos diméricos ou tetraméricos das subunidades, apresentando portanto, pesos moleculares de aproximadamente 240-270 kD (Reimholz e col. 1994, Bruneau e col. 1991, Salvucci e col. 1990) a 440-557 kD (Bruneau e col. 1991, Doehlert e Huber 1983, Salvucci e col. 1990, Sonnewald e col. 1993, Kalt-Torres e col. 1987, Salerno e Pontis 1978). Kalt-Torres e col. (1987) obtiveram dois pesos moleculares para a enzima de folha de milho. Esses autores consideraram que isso poderia explicar as diferenças cinéticas observadas, um vez que as diferenças de pesos moleculares foram estáveis durante a purificação.

As informações disponíveis não permitem saber qual a forma preferencial de associação *in vivo*, nem se existe interconversão entre diferentes formas de associação, ou se esse pode ser um mecanismo modulador da atividade. O que se sabe é que a enzima nativa é constituída de associações de subunidades idênticas.

As SPS de batata (Slabnik e col. 1968), germe de trigo (Salerno e Pontis 1978) e folha de espinafre (Doehlert e Huber 1985) apresentam grupo sulfidríla, sendo que no germe de trigo ele parece ser essencial para a catálise, enquanto nos demais parece estar relacionado ao sítio alostérico. Porém, de acordo com Stitt e col. (1987), a SPS de espinafre não seria modulada pela luz por um mecanismo de óxido-redução semelhante ao que ocorre para enzimas do estroma, que são ativadas via redução do grupo sulfidríla.

As sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências clonadas do DNA complementar (cDNA) de espinafre, milho, beterraba, batata e fava, confirmam os valores de peso

molecular da subunidade entre 116-138 kD obtidos a partir da proteína e mostram que essa enzima é bastante conservada, apresentando homologia ao redor de 70%.

1.3- Expressão da SPS.

A clonagem de sequências de cDNA (Klein e col. 1993, Sonnewald e col. 1993, Worrell e col. 1991, Hesse e col. 1995) tornou possível o estudo e manipulação da expressão gênica da SPS. Plantas transgênicas de tomate expressando altos níveis de proteína SPS de milho mostraram que a partição do carbono fotoassimilado favoreceu a formação da sacarose, diminuindo o teor de amido das folhas. Foi observado ainda, que a expressão de altos níveis de SPS de milho não suprimiu a expressão da enzima de tomate e que o mecanismo de regulação por modificação covalente da planta não foi capaz de regular a atividade da SPS de milho introduzida (Worrell e col. 1991, Galtier e col. 1993). Resultados semelhantes, quanto ao favorecimento da síntese de sacarose em plantas transgênicas de tomate, também foram obtidos por Micallef e col. (1995). Nesse caso o aumento na capacidade de biossíntese de sacarose eliminou a limitação da fotossíntese imposta pela acúmulo do produto final.

Klein e col. (1993) estudando a expressão da enzima de espinafre constataram que a proteína e o RNA mensageiro (mRNA) da SPS se acumularam durante o período de rápida expansão foliar, até aproximadamente 50% do tamanho final do órgão. Em folhas desenvolvidas, a expressão do gene não se altera durante o fotoperíodo, apenas o estado de ativação, confirmando os estudos anteriores de Walker e Huber (1989). O aumento na expressão coincide com a aparente transição de tecido “consumidor” de carbono fotoassimilado para tecido “exportador”.

Em beterraba, Hesse e col. (1995) detectaram altos níveis de mRNA da SPS na raiz principal e aparentemente a glicose e sacarose apresentaram efeitos antagônicos. A glicose favoreceu a expressão da enzima enquanto a sacarose teve efeito contrário. A análise da expressão da SPS em cotilédones de fava (Werner e col. 1996) revelou que essa enzima, juntamente com a SS, desempenha papel importante nas fases de armazenamento e germinação. Durante essas fases os níveis de hexoses induzem a atividade da SPS provavelmente por transcrição e modificação covalente, uma vez que foram observados acúmulo na expressão do gene e aumento no estado de ativação.

1.4- Sacarose-fosfato sintase em frutos.

Apesar da importância da SPS para o metabolismo da sacarose, pouca atenção tem sido dada ao estudo dessa enzima em frutos. Em melões foi observado que o acúmulo de sacarose está provavelmente associado ao aumento da atividade da SPS e declínio da atividade da invertase (Lingle e Dunlap 1987; Hubbard e col. 1990). Esta correlação também foi observada em algumas variedades de tomate por Miron e Schaffer (1990), Dali e col. (1992) e em pêssegos e morangos por Hubbard e col. (1991). Em frutos que acumulam sacarose a partir do amido armazenado, a relação entre acúmulo de sacarose e atividade da SPS foi observada em bananas (Cordenunsi 1989, Hubbard e col. 1990), mangas (Hubbard e col. 1991) e kiwis (MacRae e col. 1992).

Durante o amadurecimento da banana, Terra e col. (1983) verificaram que a atividade da UDPG pirofosforilase manteve-se constante, enquanto a atividade da SS sofreu pequeno aumento. Uma vez que esses autores não detectaram atividade da sacarose-fosfato sintase durante o

climatério, concluíram que a SS estaria envolvida na síntese de sacarose. Também foi observado que a infiltração de fatias de banana com [^{14}C -U]glicose-1-fosfato levou a obtenção de sacarose marcada com ^{14}C . Posteriormente, Cordenunsi (1989) sugeriu que a SPS e não a SS seria a enzima importante nesse processo, uma vez que foi observada uma diminuição na atividade da SS após a colheita e significativo aumento na atividade da SPS, coincidente com o acúmulo de sacarose. Resultado semelhante foi obtido posteriormente por Hubbard e col. (1990), que relacionaram a síntese de sacarose à SPS e sugeriram que durante o amadurecimento ocorre uma alteração nas propriedades cinéticas da enzima. Em kiwis essa alteração também foi considerada determinante para o acúmulo de sacarose (MacRae e col. 1992), e apesar de não terem sido feitas caracterizações que comprovem essa alteração nas propriedades cinéticas, essas tem sido as únicas referências a mecanismos de regulação da atividade da SPS em frutos.

Resultados do estudo do amadurecimento de bananas colhidas ou ligadas à planta confirmaram o aumento de atividade da SPS (Cordenunsi e Lajolo 1995), relacionando-a ao acúmulo de sacarose e indicaram que a modulação das atividades da SS e SPS durante o amadurecimento, pode estar relacionada à veiculação de hormônios ou metabólitos pela planta. A redução na atividade da SS não parece estar ligada à degradação do amido, mas ao tempo decorrido após a colheita. Isto poderia explicar os diferentes valores de atividade obtidos anteriormente, como descrito por Terra e col. (1983), uma vez que a colheita interromperia a veiculação de hormônios ou metabólitos importantes para a manutenção da atividade da SS. Foi observado que em bananas que amadureceram ligadas à planta, a relação entre as atividades (SS/SPS) diminui a uma velocidade menor, sendo que a atividade da SPS alcançou apenas 50% do valor obtido para frutos colhidos e depois amadurecidos.

Também pouco se conhece a respeito de sua expressão gênica, apesar da importância desse mecanismo para a regulação da atividade de algumas enzimas. Alterações de mRNA e síntese de proteínas foram observadas durante o amadurecimento de manga (Lopez-Gomez e Gomez-Lim 1992), tomate (Rattanapanone e col. 1978; Biggs e col. 1986), abacate (McGarvey e col. 1992) e maçã (Lay-Yee e col. 1990).

Em bananas também foi observado um aumento na síntese de proteínas durante o amadurecimento (Brady e col. 1970). Arêas e Lajolo (1981) trabalhando com fatias de banana infiltradas com inibidores de síntese proteica constataram que a produção de sacarose foi reduzida em 30% apesar da total hidrólise do amido. Esses autores sugerem a existência de um controle de síntese de sacarose em nível de mRNA. Dominguez-Puijaner e col. (1992), comparando os perfis eletroforéticos de extratos de bananas durante o amadurecimento, observaram variação na presença de alguns peptídeos, porém apenas a poligalacturonase foi identificada entre os que se acumularam.

Os conhecimentos a respeito da SPS vem aumentando nos últimos anos e permitem estabelecer que se trata de uma enzima importante para a síntese de sacarose em tecidos fotossintetizantes e não-fotossintetizantes, sujeita a regulação por metabólitos e modificação covalente por fosforilação reversível. A clonagem de genes da SPS mostrou que essa enzima tem sua sequência de aminoácidos bastante conservada e que a serina 158 em espinafre e serina 162 em milho parecem ser os principais sítios de fosforilação. A enzima nativa provavelmente existe como dímero ou tetrâmero, de subunidade entre 116-138 kD.

Em folhas a regulação da atividade ligada ao ciclo de luz se faz principalmente por fosforilação, enquanto o aumento na expressão é restrito a fase de desenvolvimento do órgão. Em

tecidos não fotossintetizantes como batata, o mesmo mecanismo de regulação foi proposto. Em kiwi (MacRae e col. 1993) e banana (Hubbard e col. 1990) foram observados aumentos no estado de ativação sugerindo que o mecanismo de regulação seja o mesmo. Em cotilédones de fava (Werner e col. 1996) o aumento no estado de ativação foi acompanhado de aumento na expressão gênica, indicando que esses mecanismos podem atuar simultaneamente.

Apesar das evidências da importância da SPS para a síntese de sacarose durante o amadurecimento de frutos, são poucos os estudos a esse respeito. Não foram feitas ainda, tentativas de purificação e caracterização cinética e molecular, nem clonagem e estudo da expressão da enzima de frutos durante o desenvolvimento e amadurecimento. Apesar dessa enzima ser bastante conservada entre diferentes fontes vegetais, parecem haver diferenças significativas quanto aos mecanismos de regulação da atividade atuantes nos diversos sistemas em que ocorre síntese de sacarose.

2- OBJETIVOS.

De modo a contribuir para a compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos na conversão amido-sacarose durante o amadurecimento de frutos, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da sacarose-fosfato sintase (SPS), enzima fundamental no processo de biossíntese da sacarose.

A SPS de bananas foi parcialmente purificada e algumas características moleculares, variação da atividade enzimática e expressão do gene da SPS, acompanhadas durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto.

3- MATERIAIS.

3.1- Frutos.

Os frutos (*Musa acuminata* cv. nanicão) foram fornecidos pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Frutos fisiologicamente imaturos foram colhidos entre o 50º e o 90º dia após a antese. Os pré-climatéricos (33-34 mm de diâmetro, “cheio três-quartos”) foram colhidos entre o 110º e 130º dia após a antese e os frutos climatéricos foram obtidos pelo amadurecimento em câmara com temperatura controlada (18-20°C). Para os experimentos de acompanhamento da atividade enzimática e mRNA os frutos foram amostrados também em estágios intermediários das fases de desenvolvimento e amadurecimento.

3.2- Vetor de clonagem e células.

Os vetores utilizados para a clonagem do cDNA foram pBluescript II SK(+) (Stratagene, Califórnia EUA) e pGEM (Promega, Madison EUA). Para a transformação com DNA plasmidial foram utilizadas células de *Escherichia coli* XL1-Blue cultivadas e tornadas competentes com CaCl_2 de acordo com Sambrook (1989).

4- MÉTODOS.

4.1- Extração da SPS.

A extração da enzima foi feita com base nas condições descritas por Cordenunsi (1989). As amostras de banana foram congeladas em nitrogênio líquido, trituradas em gral de porcelana e homogeneizadas em tampão de extração: Tris-HCl 100mM pH 8,0; EDTA 10 mM; cisteína 20 mM; PVP 1%), na proporção de 1g de banana para 7 ml de solução extratora, com homogeneizador POLYTRON por 1 minuto à metade da velocidade máxima. O homogenato foi centrifugado a 8000 x g por 10 minutos e o sobrenadante, após diálise contra tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7); EDTA 4 mM; cisteína 5 mM (tampão de trabalho), considerado o extrato-bruto da SPS.

4.2- Atividade enzimática.

A atividade da SPS foi determinada através da formação de sacarose-P a partir de UDP-glicose e frutose-6P. A mistura de reação em 100 µl em tampão Hepes 50 mM (pH 7,5) constituiu-se de 40 µl de extrato enzimático, frutose-6 fosfato 5 mM; glicose-6 fosfato 15 mM; UDP-glicose 10 mM e $MgCl_2$ 15 mM para ensaio em condições saturantes de substrato. Para ensaio em condições limitantes de substrato, em presença de fosfato, foram utilizados: frutose-6 fosfato 3 mM, glicose-6 fosfato 9 mM, UDP-glicose 10 mM, $MgCl_2$ 15 mM e Na_2HPO_4 10 mM. Após incubação a 37°C a reação foi interrompida e a frutose remanescente destruída por adição de

200 µl de NaOH 0,1 N e incubação em banho fervente por 10 minutos. A sacarose-P produzida foi determinada por meio da reação da frutose liberada em meio ácido com o ácido tiobarbitúrico (Percheron 1962), após adição de 1 ml de uma mistura recentemente preparada de ácido tiobarbitúrico 24 mM em HCl 10 mM e HCl concentrado, na proporção 1:1. Após incubação em banho fervente por 8 minutos a absorbância foi lida a 432 nm e a concentração do produto formado foi determinada com base em curva-padrão de frutose.

A atividade da SS foi determinada utilizando 100 µl de mistura de reação contendo tampão tris-HCl 100 mM (pH 7,6), 50 µl de extrato enzimático, frutose 10 mM; UDP-glicose 5 mM e $MgCl_2$ 15 mM.

4.3- Determinação de amido.

A extração e determinação do teor de amido dos frutos foi feita de acordo com o método modificado descrito por Arêas e Lajolo (1981). O amido foi hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada enzimaticamente utilizando sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS de acordo com Bergmeyer e Bernt (1974).

4.4- Determinação de proteína.

O teor de proteína dos extratos foi determinados pelo método de Lowry (1951) modificado por Peterson (1977), tendo BSA como padrão.

4.5- Purificação parcial da SPS.

Para purificação parcial da SPS, amostras de banana foram submetidas a extração conforme descrito e o extrato-bruto adicionado de solução saturada de sulfato de amônio até 30% de saturação. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 8.000xg por 10 minutos e levado até 60% de saturação por adição de sulfato de amônio sólido. O precipitado, constituindo a fração 30-60% de sulfato de amônio, foi recuperado por centrifugação e retomado em tampão de trabalho. Após diálise essa fração foi aplicada à resina de troca iônica DEAE-celulose em suspensão, equilibrada em tampão de trabalho pH 7. A suspensão foi deixada sob agitação suave por 20 minutos a 4° C e a resina recuperada por centrifugação a 3000xg por 10 minutos ou filtração em funil de Buchner. Após duas lavagens com tampão de trabalho a resina foi montada em coluna de cromatografia. As proteínas foram eluídas com gradiente linear de NaCl, de 0 a 0,6 M, sob um fluxo de 30 ml/h e as frações (2 ml) testadas para atividade enzimática.

4.6- Extração de proteína total para eletroforese em condições dissociantes.

O extrato de proteína total para eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE) foi preparado de acordo com Dominguez-Puijner e col. (1992).

4.7- Eletroforese em gel de poliacrilamida.

As amostras foram submetidas a eletroforeses em géis de poliacrilamida, em sistema de tampão descontinuo, sob condições não-dissociantes e dissociantes. As eletroforeses em condições dissociantes foram feitas com base no método de Laemmli (1970), utilizando géis com 7,5% de acrilamida em tampão Tris 25 mM; glicina 192 mM (pH 8,3) contendo SDS 0,1%. As separações sob condições não-dissociantes foram feitas em géis contendo 6% de acrilamida em tampão Tris 25 mM; glicina 192 mM (pH 8,3) sem adição de SDS (Hames, 1990). Os géis foram corados para proteína com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1%) em solução aquosa de ácido acético 7 % e etanol 40% e descoradas em solução aquosa ácido acético 7,5% e etanol 5%.

4.8- Identificação da SPS em gel de poliacrilamida.

Para identificação das bandas da SPS em gel não-dissociante as amostras foram aplicadas em duplicata e separadas por eletroforese de acordo como descrito anteriormente. A metade do gel correspondente a uma das aplicações foi revelada para proteínas com coomassie e a outra, cortada transversalmente a cada 2 mm. Cada fatia do gel foi incubada por 16 horas em 100 µl de tampão Hepes 50 mM (pH 7,5) contendo frutose-6 fosfato 5 mM; glicose-6 fosfato 15 mM; UDP-glicose 10 mM e $MgCl_2$ 15 mM. Após incubação foram retirados 70 µl para determinação da sacarose formada. As bandas correspondentes a SPS foram identificadas pela comparação entre as frações exibindo atividade enzimática e a metade do gel corado para proteína.

4.9- Peso molecular da subunidade.

Amostras da enzima foram submetidas a eletroforese em condições não-dissociantes e o peso molecular (PM) da subunidade calculado com base numa curva-padrão relacionando o logaritmo do peso molecular ($\log PM$) e a mobilidade relativa (R_f) de padrões de peso molecular. Foi utilizada uma mistura (Sigma MW-SDS-200 Kit) contendo os seguintes padrões: anidrase carbônica (29 kD), ovalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (66 kD), fosforilase B (97,4 kD), β -galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD).

4.10- Peso molecular da SPS em gel de poliacrilamida não-dissociante.

A determinação do peso molecular em gel não-dissociante foi feita de acordo com o método descrito no boletim Sigma MKR-137 (1986). Para isso, amostras da enzima e padrões de peso molecular (Sigma MW-ND-500 Kit) foram submetidos a eletroforese em géis não-dissociantes de diferentes concentrações de acrilamida (4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 7%, 8%, 9% e 10%). Pela mobilidade relativa (R_f) foi estabelecida a relação entre $100 \cdot \log (R_f \cdot 100)$ e concentração de acrilamida do gel (%) para determinação do coeficiente de retardamento (K_R) de cada proteína. O peso molecular foi calculado a partir da curva-padrão obtida pela relação entre $\log (K_R)$ e $\log (PM)$ dos padrões. Os seguintes polipeptídeos foram utilizados como padrões: lactalbumina (14,2 kD), anidrase carbônica (29 kD), ovalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (monômero 66 kD; dímero 132 kD) e urease (trímero 272 kD; hexâmero 545 kD).

4.11- Preparo de antisoro anti-SPS.

Amostras da enzima parcialmente purificada foram separadas por eletroforese em gel não-dissociante de poliacrilamida. A banda correspondente a atividade da SPS₃ (aproximadamente 150 µg de proteína) foi cortada, adicionados 2 ml de solução NaCl 0,9% e homogeneizada em adjuvante completo de Freund através da passagem sucessiva da amostra entre duas seringas cujas agulhas foram conectadas por um pequeno tubo de silicone. A emulsão foi aplicada em coelhos machos, por injeções subcutâneas e esse procedimento foi repetido por mais duas vezes a intervalos de 20 dias.

Uma semana após a última injeção, foram coletadas amostras de aproximadamente 5 a 10 ml de sangue através da veia principal da orelha. O sangue foi incubado por 1 h a 37°C e o coágulo removido com auxílio de um bastão de vidro. O soro foi centrifugado por 5 minutos a 3.000xg e congelado a -20°C. O controle negativo das análises consistiu nas amostras de soro pré-imune.

Devido a alta reatividade do soro obtido não foi necessário concentrar as proteínas por adição de sulfato de amônio. Além disso, a purificação adicional não apresentou diferenças quanto a especificidade da reação. Apesar de poderem ser utilizadas diluições maiores, optou-se pelo uso de uma diluição de 1.000 vezes do soro imune em todos os western blots.

4.12- Western blot.

As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida dissociantes e não-dissociantes e transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose em tampão 25 mM tris; 192 mM glicina (pH 8,3). A voltagem foi fixada em 30 volts e a corrida conduzida por 16 horas a 4°C. Após bloqueio por incubação por 1 hora em tampão Tris-HCl 50 mM (pH7,5) contendo NaCl 150 mM e leite desnatado a 5%, a membrana foi incubada no mesmo tampão, adicionado de antisoro contra SPS na diluição de 1:1000, por 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens por 20 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM a membrana foi incubada por 2 horas com anticorpo de cabra anti-coelho, conjugado com fosfatase alcalina, em tampão contendo leite desnatado 5%. Após nova série de lavagens as bandas foram reveladas por incubação em tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM) contendo NBT (azul de p-nitro-tetrazolio) (150 µg/ml) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (75 µg/ml). A reação foi interrompida por adição de 20 µl/ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e a membrana foi seca à temperatura ambiente.

4.13- Peso molecular da SPS por cromatografia de filtração em gel.

O peso molecular da enzima foi determinado por cromatografia em coluna de Sepharose CL-6B (1,6cm x 60 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo KCl 100 mM e calibrada com os seguintes padrões (Sigma): anidrase carbônica (29 kD), soroalbumina bovina (66 kD), álcool desidrogenase (150 kD), β-amilase (200 kD), Apoferritina (443 kD) e

tireoglobulina bovina (669 kD). A amostra foi aplicada em um volume de 2 ml e a corrida conduzida a um fluxo de 0,2 ml/minuto. O volume de exclusão foi determinado com azul de dextrana e foram coletadas frações de 1,5 ml.

4.14- Efeito de inibidores de proteases.

Para avaliar o efeito protetor de inibidores de proteases extratos da enzima parcialmente purificada foram incubados com essas substâncias a 30°C. Foram utilizados os seguintes inibidores: fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) (1 mM), benzamidina (1 mM), antipaina (10 µg/ml) e uma mistura dos três contendo metade das concentrações utilizadas individualmente. As incubações foram conduzidas por 6, 12 e 24 horas à 30°C, interrompidas por incubação em banho fervente por 10 minutos e separadas em gel dissociante de poliacrilamida 7,5%.

4.15- Extração de RNA total e síntese de primeira fita de DNA complementar.

O RNA total dos frutos de diferentes estágios fisiológicos foi extraído de acordo com o método proposto por Lopez-Gomez e Gomez-Lim (1992). A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi obtida utilizando 8 unidades de transcriptase reversa de vírus da mieloblastose avícola (AMV-RT), em 20 µl de reação em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 contendo: 1-5 µg de RNA total; KCl 40 mM; 2,5 mM MgCl₂, BSA 0,1 mg/ml, DTT 10mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 unidades de inibidor de RNase (RNAguard Pharmacia); e 1µM de poli-dT (12-18 nucleotídeos)

como primer. Após tratamento com 1 U de RNase H a 42°C por 10 minutos a reação foi utilizada como substrato para as reações de amplificação.

4.16- Primers e amplificação por PCR.

Com base nas sequências de cDNA da SPS de espinafre, milho e batata disponíveis no banco de dados (Genbank), foram sintetizados os seguintes oligonucleotídeos para serem utilizados como “primers”: SPS1 5'-TGG GCC CAT GGC GGG AAA CGA CTG GAT T-3' (sentido), SPS2 5'-CGC GAT TCT GAT ACA GGT -GGT3' (sentido), SPS 5'-TGG CCT AGC AAG GGC AAG T-3' (antisentido), SPS4 5'-CCC CA(T/A) CGC A(T/C)A GAT AGG TAC CTG AGT GC-3'(antisentido), SPS5 5'-CCA TAC AGA TCA TAC TTG TCA ATC A-3' (antisentido).

Após análise quanto à formação de dímeros e auto-hibridização, foram testadas várias combinações para amplificação do cDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de amplificação foram realizadas em 50 µl de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 contendo KCl 50 mM, 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 uM de cada oligonucleotídeo primer, 1U de *Taq* polimerase e 2 µl da reação de síntese de primeira fita de cDNA. Cada reação foi testada sob três temperaturas de hibridização (40°C, 50°C 60°C) e diferentes concentrações de magnésio (0 a 10 mM).

4.17- Purificação e clonagem do produto de amplificação.

O fragmento de cDNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose, eletroeluído e purificado segundo Sambrook (1989). O DNA foi tratado simultaneamente por 30 minutos a 37°C com 5 U de fragmento de Klenow da DNA polimerase I e 30 U de quinase T4 em 100 µl de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo: MgCl₂ 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; ATP 0,1 mM e 0,2 mM de cada dNTP. Após uma extração com igual volume de mistura fenol/cloroformio (1:1) e com clorofórmio, o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M recuperado em 20 µl de água e submetido a digestão com enzima Sac I após nova purificação, aproximadamente 100 ng desse DNA foram digeridos com Sac I e Sma I e incubados com 50 a 500 ng de DNA de vetor por 16 horas a 16°C, com DNA ligase T4 em 10 µl de tampão Tris-HCl 66 mM (pH 7,6); MgCl₂ 6,6 mM; DTT 10 mM; ATP 6,6 uM. Uma aliquota do produto de cada reação de ligação foi utilizada para a transformação de células competentes e a seleção dos clones, feita através do crescimento a 37°C por 16 horas em placas de cultura (em meio LB sólido) contendo 50 µg/ml de ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil galactopiranosídeo) 0,008% e IPTG (isopropil tiogalactopiranosídeo) 0,35 mM. Algumas colônias brancas foram isoladas em 50 µl de meio LB líquido contendo 50 µg/ml ampicilina e deixadas crescer (Sambrook e col. 1989). Quatro microlitros de cada suspensão foram testados para amplificação em PCR utilizando primers flanqueadores do sítio de clonagem, primers T7 e reverso, em um volume de 20 µl de reação contendo tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); KCl 50 mM; 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo fosfato (dNTP) e 1U de *Taq* polimerase. O DNA

plasmidial dos clones, cuja amplificação gerou um fragmento do tamanho esperado, foi extraído e purificado em gradiente de césio de acordo com Sambrook (1989).

4.18- Subclonagem.

Para completo sequenciamento do fragmento clonado, foram produzidos subclones a partir da digestão com nucleases Exo III e S1 (Current... 1987-1995). Cerca de 2 µg de DNA foram linearizados com as enzimas Eco RV e Kpn I, purificados conforme descrito anteriormente e submetidos a digestão com 120 U da enzima nuclease Exo III em tampão Tris-HCl 7,5 mM (pH 7,5) contendo DTT 30 mM; e MgCl₂ 20 mM. Aliquotas de 250 ng foram removidas a cada 10 segundos e a reação interrompida por incubação a 70°C por 10 minutos. Após tratamento com 4 U de nuclease S1, em tampão acetato de sódio 16 mM (pH 4,6) contendo NaCl 400 mM, ZnSO₄ 1,6 mM e glicerol 8% à 30°C por 20 minutos, as amostras de DNA foram purificadas e a ligação reestabelecida conforme descrito anteriormente. Uma alíquota do produto de cada reação de ligação foi utilizada para transformação de células competentes e as colônias positivas testadas, por amplificação através de PCR, utilizando primers flanqueadores do sitio de clonagem T7 e reverso. Os DNAs dos clones cujos fragmentos amplificados apresentavam entre 200 e 800 pares de bases (pb), diferindo em aproximadamente 100 pb, foram preparados e purificados em gradiente de CsCl₂ de acordo com Sambrook (1989).

4.19- Sequenciamento.

As amostras de DNA purificado foram sequenciadas em ambas as fitas de acordo com o método de Sanger (1977) utilizando didesoxinucleotídeos (ddNTP). Aproximadamente 100 µg de DNA foram marcados através da incorporação de ^{32}P -CTP (Cicle Sequencing kit, Pharmacia), utilizando 0,2 U de *Tth* polimerase em tampão Tris-HCl 35 mM (pH9,0) contendo MgCl_2 0,75 mM; DMSO 5,2%; 1,2 µM de cada dNTP; 0,2 µl de ^{32}P -CTP, 0,4 µM de primer (T7 ou reverso) e um dos didesoxinucleotídeos (ddATP 390 µM; ddCTP; ddGTP 12 µM; ddTTP 425 µM). Após 25 ciclos de incubação a 95°C/30 segundos, 55°C/36 segundos, 72°C/84 segundos, as reações foram interrompidas pela adição de igual volume de solução contendo formamida 97,5%; EDTA 10 mM; xileno cianol 0,3% e azul de bromofenol 0,3%. O DNA foi separado por eletroforese conduzida a 50°C com potência constante (80W), em gel de poliacrilamida 6% contendo uréia 7,67 M em sistema de gradiente de tampão TBE (Tris-borato 89 mM; EDTA 2,5 mM pH 8,3) de acordo com o protocolo de Biggin e col. (1983). Os géis foram transferidos para papel 3MM e revelados por autoradiografia.

4.20- Eletroforese de DNA em gel de agarose.

As amostras de DNA foram separadas em géis com 0,5% a 1% de agarose em tampão TBE (Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) contendo de 0,4 mg/ml de brometo de etídio. As corridas foram conduzidas a voltagem constante (2-5 volt/cm).

4.21- Northern blot.

As amostras de RNA (30 µg) foram separadas em gel de agarose 0,8% em tampão Mops 20 mM (pH7,0) contendo acetato de sódio 8 mM; EDTA 1 mM e formaldeído 2,2 M e transferidas por capilaridade para membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham), de acordo com Sambrook (1989). O RNA foi fixado por incubação da membrana em estufa a 80°C por 2 horas e o RNA total corado com azul de metileno 0,04% em tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 5,2) (Sambrook 1989). Uma sonda de RNA antisentido da SPS, marcada com ³²P UTP, foi sintetizada a partir da região promotora T7 do vetor (Promega 1991) e usada sob condições convencionais de hibridização a 42°C (Sambrook 1989). As membranas foram reveladas após, aproximadamente, duas horas de exposição.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Purificação.

As tabelas I, II e III apresentam resultados típicos da purificação da SPS de bananas. Com a metodologia descrita foi possível purificar, parcialmente, a enzima de frutos com 70, 110 e 130 dias pós-antese com rendimentos de 60, 17 e 22% e fatores de purificação de 12, 3 e 4 vezes, respectivamente. Apesar dos baixos valores de purificação foram obtidas preparações da enzima com razoável manutenção da atividade em um reduzido número de etapas.

A cromatografia em DEAE-celulose constituiu a etapa crítica da purificação e permitiu separar a SPS da SS (figura 1) nos três estágios estudados. Como pode ser observado na figura, grande parte da atividade da SPS foi eluída com 0,15-0,35 M de NaCl. A demora na aplicação de grandes volumes do pool 30-60% e consequentemente da eluição das frações, foi frequentemente acompanhada de perda da atividade enzimática. Além disso, o acúmulo de material no topo da coluna, devido à presença de pectinas não totalmente removidas pelo fracionamento com sulfato de amônio, causou acentuada redução de fluxo.

Essas dificuldades foram contornadas pela adição do pool 30-60% à resina DEAE-celulose, previamente equilibrada em tampão de trabalho, antes da montagem na coluna. Esse procedimento permitiu a redução de um dia no processo de purificação, uma vez que as etapas de aplicação da amostra e lavagem da resina foram realizadas rapidamente. Além disso, não houve alteração de fluxo ou redução do volume de resina, uma vez que o material que antes se acumulava na coluna foi totalmente removido.

TABELA.I - Purificação parcial da SPS de bananas com 70 dias pós-antese.

Etapa de purificação	Volume (ml)	Atividade total ($\mu\text{mol/h}$)	Proteína (mg)	Atividade específica ($\mu\text{mol/mg/h}$)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto	1.760	6.880	1.378	5,0	100	----
(1) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	370	13.800	735	18,7	200	3,7
DEAE-cellulose	265	5.308	128	41,4	77	8,3
(2) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	4.128	70	58,4	60	11,7

TABELA.II - Purificação parcial da SPS de bananas com 110 dias pós-antese.

Etapa de purificação	Volume (ml)	Atividade total ($\mu\text{mol/h}$)	Proteína (mg)	Atividade específica ($\mu\text{mol/mg/h}$)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto	1.930	32.000	3.036	10,6	100	----
(1) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400	12.300	1.854	6,6	38,4	0,6
DEAE-cellulose	207	9.560	273	35,0	29,9	3,3
(2) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25	5.510	182	30,4	17,2	2,9

TABELA.III - Purificação parcial da SPS de bananas com 130 dias pós-antese.

Etapa de purificação	Volume (ml)	Atividade total ($\mu\text{mol/h}$)	Proteína (mg)	Atividade específica ($\mu\text{mol/mg/h}$)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto	1.960	45.050	3.720	12,0	100	----
(1) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	480	10.150	1.930	5,3	22,5	0,4
DEAE-cellulose	248	2.710	240	11,3	6,0	0,9
(2) 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35	9,950	191	52,1	22,1	4,3

Figura 1. Cromatografia em coluna DEAE-celulose. Perfis de eluição de proteína (---), atividade da SS (Δ) e SPS (●) e gradiente linear de NaCl 0-0,6 M (—).

O segundo fracionamento com sulfato de amônio teve o objetivo de concentrar as frações eluídas da coluna de DEAE-celulose. A concentração através de ultrafiltração foi demorada e acompanhada de redução da atividade da SPS. Apesar da necessidade de posterior diálise contra tampão de trabalho, o uso de sulfato de amônio permitiu a redução do volume para armazenamento, com manutenção da atividade. As alterações descritas foram aplicáveis aos extratos de bananas nos três estágios estudados.

O perfil eletroforético das etapas de purificação em SDS-PAGE 7,5%, apresentado na figura 2, mostra o enriquecimento de uma banda de 116 kD. Essa banda, como discutido adiante, corresponde à subunidade da SPS. Também podem ser observados o aparecimento de bandas entre 50 e 60 kD e a co-purificação de um polipeptídeo de aproximadamente 70 kD.

Tentativas de melhorar a purificação foram feitas por cromatografia da fração 30-60% do DEAE em coluna Mono-Q, fenil-sepharose, Sepharose-CL6B, heparina Sepharose e Concanavalina A sepharose. Nenhuma dessas resinas permitiu a separação entre as formas da enzima, mas causaram grande perda de atividade. No caso de Mono-Q, heparina sepharose e fenil-sepharose, houve alteração no perfil eletroforético, com aumento do R_f de uma das formas da SPS, em gel não-dissociante e redução da banda de 116 kD em gel dissociante. A ação de proteases co-purificadas podem ser consideradas como causa dessa redução na atividade.

Os valores de rendimento e purificação devem ser considerados com cautela devido ao efeito da diluição observado por Cordenunsi (1989). Algumas vezes foram obtidos valores de rendimento excedendo 100%, o que pode ser devido à remoção de um inibidor ou à re-associação das moléculas em solução, uma vez que a enzima parece constituir-se de múltiplas associações da subunidade de 116 kD. As diferenças de rendimento observadas entre a purificação da SPS de ba-

Figura 2. Etapas de purificação da SPS de bananas com 110 dias pós-antese separadas em gel dissociante. (A) Coloração para proteína com coomassie blue: linha 1, extrato-bruto; linha 2, fração 30-60% sulfato de amônio (I); linha 3, "pool" DEAE; linha 4, fração 30-60% sulfato de amônio (II). (B) Western blot revelado com antisoro anti-SPS₃. Padrões de PM: anidrase carbônica (29 kD), ovoalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (66 kD), fosforilase (97,4 kD), β -galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD). A seta indica a posição da subunidade da SPS.

nanas com 70 dias após a antese (60%) e a de bananas com 110 e 130 dias (ao redor de 20%), foram provavelmente causadas pelas mudanças na composição do tecido durante o desenvolvimento, principalmente quanto a composição de carboidratos, a qual afeta a extração (Cordenunsi 1989). A ação de proteases também não pode ser descartada uma vez que essas enzimas tem sua atividade aumentada (Dilley 1970), principalmente em tecido maduro, e como discutido adiante, foi observada sua ação sobre a SPS parcialmente purificada.

5.2- Caracterização física.

5.2.1- Identificação da SPS no gel de poliacrilamida.

A distribuição da atividade por uma ampla região do gel e a imprecisão decorrente do fracionamento do gel, foram as principais dificuldades para a identificação de bandas com atividade da SPS. Frequentemente, toda a metade inicial do gel apresentou atividade (figura 3) sendo que em algumas incubações de uma mesma preparação, diferiram quanto ao local exato com atividade mais elevada, dependendo do tempo de incubação. Para facilitar a localização foram utilizados géis a 6% de acrilamida, de modo a melhorar a separação entre as bandas e optou-se pela aplicação de pequenas quantidades de proteína (aproximadamente 10 µg).

Por ser relativamente abundante e se localizar no limite da região com atividade, uma das bandas (posteriormente denominada SPS₃) foi eluída, e após confirmação da atividade, utilizada para preparo dos anticorpos.

A identificação de outras bandas protéicas relativas à SPS foi feita através de Western blots revelados com o soro imune preparado. De acordo a figura 4, são três as bandas com atividade no gel nativo de poliacrilamida, denominadas SPS₁, SPS₂ e SPS₃. A denominação dessas bandas foi feita a partir da origem do gel, sendo SPS₁ aquela com menor mobilidade relativa. O perfil eletroforético e a atividade não diferiram entre as amostras parcialmente purificadas de bananas com 70, 110 e 130 dias pós-antese, sugerindo a existência das mesmas formas ao longo do período de desenvolvimento e maturação.

Figura 3. A) Representação do perfil eletroforético da SPS parcialmente purificada de bananas com 70 dias pós-antese em gel de poliacrilamida não-dissociante. B) Atividades nas frações do gel.

Figura 4. SPS parcialmente purificada de bananas em diferentes estágios fisiológicos, separadas em gel de poliacrilamida não-dissociante: linha 1, 70 dias pós-antese; linha 2, 110 dias pós-antese; linha 3, 130 dias pós-antese. (A) Coloração para proteínas com coomassie blue. (B) Western blot revelado com antisoro anti-SPS₃.

A presença de três bandas com atividade da SPS também foi observada em preparações obtidas de germe de trigo (Salerno e Pontis 1978a). Com base em resultados anteriores (Salerno e Pontis 1978b) esses autores sugeriram que essas bandas poderiam representar formas da enzima afetadas distintamente pela sacarose. Também em preparações da enzima de tubérculos de batatas (Reimholz e col. 1994) foram detectadas duas bandas em gel não dissociante.

A existência de diferentes formas da enzima pode corresponder a diferentes associações da subunidade, como discutido adiante.

5.2.2- Peso molecular da subunidade.

Para determinar o peso molecular da subunidade da SPS as bandas separadas em gel não-dissociante foram eletroeluídas e submetidas a eletroforese em gel dissociante. De acordo com o Western blot utilizando antisoro anti SPS₃, as três bandas apresentaram um polipeptídeo de 116 kD (Figura 5). Esse valor foi o mesmo para bananas nos três estágios fisiológicos estudados e coincide com o observado por Sonnewald e col. (1993) que testando extratos de alguns tecidos vegetais com anticorpos contra SPS de batatas, observaram reação contra um polipeptídeo de 116 kD em extrato de banana. É possível que na banana as bandas com atividade de SPS correspondam a associações de diferentes números da subunidade de 116 kD.

O peso molecular da subunidade da SPS de banana obtido por eletroforese em condições dissociantes, se aproxima daquele descrito para a enzima de folha de espinafre (120 kD) (Walker e Huber 1989), tubérculo de batata (125 kD e 134 kD) (Reimholz e col. 1994), folha de milho (138 kD) (Bruneau e col. 1991), folha de trigo (90 kD) (Salerno e col. 1991) e praticamente coincide com o valor deduzido a partir da sequência de cDNA de espinafre (117 kD) (Sonnewald e col. 1993, Klein e col. 1993), milho (118,5 kD) (Worrell e col. 1991) e beterraba (118 kD) (Hesse e col. 1995).

Apesar da reação positiva para polipeptídeos entre 50 e 70 kD, estes não foram considerados subunidades, mas sim produtos de degradação, como será discutido adiante. A presença de bandas de menor peso molecular relacionadas à SPS também foi observada em preparações de folha de milho (Bruneau e col. 1991, Worrell e col. 1991), folha de espinafre (Walker e Huber 1989, Salvucci e col. 1990), germe de trigo (Salerno e col. 1991) e tubérculo de

Figura 5. Eletroforese das bandas da SPS eletroeluídas, em gel dissociante: linha 1, SPS₁; linha 2, SPS₂, linha 3, SPS₃; linha 4, banda sem atividade SPS. (A) coloração para proteínas com coomassie blue. (B) Western blot revelado com antisoro anti-SPS₃. Padrões de peso molecular: anidrase carbônica (29 kD), ovoalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (66 kD), fosforilase (97,4 kD), β -galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD).

batata (Reimholz e col. 1994). Essas bandas se tornaram mais evidentes com a purificação, reforçando a hipótese de degradação por ação de proteases (Bruneau e col. 1991, Walker e Huber 1989, Reimholz e col. 1994). Para a enzima de folha de trigo (Salerno e col. 1991), com subunidade de 90 kD, bandas de 35 e 55 kD apareceram durante o armazenamento da amostra purificada, porém em germe de trigo essas foram as únicas bandas visíveis em extratos com atividade da SPS.

Pela figura 5 podemos observar que as três bandas com atividade da SPS apresentam o polipeptídeo de 116 kD, correspondente a subunidade da enzima. Quanto à detecção da banda de 116 kD na linha correspondente a banda sem atividade da SPS, uma explicação seria a localização difusa no gel, tanto da SPS₃ quanto da banda sem atividade, e também o excesso de proteína aplicada ao gel preparativo, utilizado para eluição das bandas.

A localização difusa da enzima, como é o caso da SPS₃, foi observada também por Sonnewald e col. (1993) através da detecção da atividade no gel da enzima de espinafre altamente purificada. Porém, diferente da enzima de banana, apenas uma banda foi detectada no gel.

5.2.3- Incubação com inibidores de proteases.

No perfil das etapas de purificação (Fig. 2) e no das formas da SPS separadas em gel dissociante (Fig. 5), podem ser vistas bandas entre 50 e 70 kD reagindo positivamente com antisoro anti-SPS₃. A observação de ausência dessas bandas nos perfis eletroforéticos dos extratos-brutos, e seu gradual aparecimento com o avanço da purificação ou incubações prolongadas, sugeriram a degradação da subunidade de 116 kD por ação de proteases como causa do seu aparecimento. Outros autores (Bruneau e col. 1991, Walker e Huber 1989, Reimholz e col. 1994) já observaram a presença de bandas menores apresentando reação cruzada com anticorpos anti SPS e sua ocorrência foi justificada pela possível ação de proteases.

A origem dessas bandas foi confirmada pela incubação da enzima parcialmente purificada com inibidores de proteases. A figura 6 apresenta o perfil eletroforético da preparação incubada com inibidores por 0, 6 e 24 horas. Significativo efeito protetor foi conferido pela antipaina e benzamidina, mas não pelo PMSF. Isso pode ser constatado pela manutenção do polipeptídeo de 116 kD, que na ausência dos inibidores teve sua presença reduzida concomitantemente ao acúmulo de bandas menores, com pesos entre 50 e 70 kD. Considerando os perfis eletroforéticos das etapas de purificação (fig. 2), podemos observar que a presença dessas bandas reativas é mínima no extrato-bruto, aumentando com o progresso da purificação.

Resultados preliminares indicam que a atividade da SPS pode ser reduzida em 20% na presença de PMSF, mostrando que essa substância, além de ineficiente contra a ação de proteases é capaz de interferir no ensaio enzimático.

Figura 6. Eletroforese em gel dissociante da SPS incubada em presença e ausência de inibidores de proteases. Controles (tempo 0) das incubações em ausência de inibidores (linha 1) e presença de PMSF (linha 3), benzamidina (linha 5), antipaina (linha 7) e mistura dos três com metade das concentrações utilizadas individualmente (linha 9). Incubações por 24 horas à temperatura ambiente em ausência de inibidores (linha 2) e presença de PMSF (linha 4), benzamidina (linha 6), antipaina (linha 8) e mistura dos três com metade das concentrações utilizadas individualmente (linha 10). A seta indica a posição da subunidade da SPS.

5.2.4- Peso molecular da SPS em gel de poliacrilamida não-dissociante.

O cálculo do peso molecular nativo das bandas da SPS em gel de poliacrilamida não-dissociante apontou valores de 686 kD para a SPS₁, 254 kD para SPS₂ e 180 kD para a SPS₃. Estes valores foram os mesmos para a enzima obtida de bananas nos três estágios estudados. Considerando o peso molecular da subunidade como 116 kD, teríamos as bandas da SPS₁, SPS₂ e SPS₃ como arranjos de aproximadamente 6, 2 e 1,5 polipeptídeos, respectivamente. O peso molecular obtido para a SPS₂ se aproxima do valor de 240 kD obtido por Sonnewald (1993) utilizando gel não-dissociante com gradiente de poliacrilamida.

Estimativas de peso molecular através de cromatografia de filtração em gel (Bruneau e col. 1991) ou de centrifugação em gradiente de sacarose (Salvucci e col. 1990), sugerem a existência da enzima como dímero ou tetrâmero, mas não de hexâmero, como seria o caso da SPS₁. Além de não haver estimativa de peso molecular semelhante ao encontrado para a SPS₃, este valor corresponderia a associação de uma subunidade e meia. Essa hipótese não é de todo improvável considerando que esse valor poderia ser consequência da associação da subunidade íntegra com um produto de degradação por proteases ou da ação parcial dessas enzimas sobre a forma dimérica da SPS. Salvucci e col. (1990) trabalhando com a incorporação por fotoafinidade de um análogo da UDPG à enzima de folha de espinafre observou que a presença da subunidade e o aparecimento de bandas menores aumentou com a purificação e que preparações contendo formas proteolizadas da SPS foram ainda ativas e capazes de ligar o análogo do substrato. É possível que o mesmo ocorra com a SPS de banana.

Contudo, esses valores de peso molecular devem ser considerados com cautela, pois segundo Hedrick e Smith (1968) a interpretação dos resultados obtidos pode ser complicada para proteínas sujeitas a processo de associação-dissociação, o que pode ser o caso da SPS. Além disso, muitas proteínas podem ter comportamento anômalo durante a eletroforese devido a associação com lípidos ou carboidratos, tornando difícil a análise por essa técnica.

Ainda de acordo com esses autores, a análise do comportamento das proteínas separadas nas várias concentrações de poliacrilamida pode indicar a existência de "isômeros de PM" ou "isômeros de carga". Isômeros de PM seriam proteínas de carga elétrica idêntica em determinado pH mas com diferentes pesos moleculares. Para essas proteínas a correlação entre concentração de acrilamida e $100 \cdot \log(R_f/100)$ apresentaria linhas não paralelas, com intersecção num ponto correspondente a concentração de acrilamida em que não seria possível a separação em função do tamanho. Uma vez que as proteínas apresentariam a mesma carga, o padrão de migração seria o mesmo (Hedrick e Smith 1968). De acordo com a figura 7, isto ocorre em aproximadamente 2,5 % de acrilamida para o trímero e hexâmero da urease. De forma semelhante, as retas correspondentes às três bandas da SPS se interceptaram num ponto correspondente à concentração de aproximadamente 2,5 % de acrilamida. Esse comportamento diferiu do esperado para isômeros de carga, como é o caso da anidrase carbônica (Fig. 7), em que as retas dos isômeros foram paralelas, sugerindo que as formas da SPS observadas sejam isômeros de PM.

A presença de formas da enzima com pesos distintos daquele de 240 kD pode ser causada pelas condições de extração e purificação empregadas, de comportamento anômalo durante a eletroforese, bem como pela ação de proteases, principalmente se considerarmos a banda com peso aparente de 180 kD, tornando difícil afirmar a existência dessas formas *in vivo* ou seu signifi-

Figura 7. Determinação do peso molecular em gel de poliacrilamida não-dissociante. A) Curva de calibração obtida com os padrões. B) Curvas para obtenção do coeficiente de retardamento (K_R) da SPS₁ (■), SPS₂ (●) e SPS₃ (Δ). C) Curvas para obtenção do K_R de isômeros da anidrase, (●, ○) e trîmero (□) e hexâmero (■) da urease.

cado fisiológico. Porém, apesar dos problemas técnicos, se considerarmos a constância do perfil eletroforético, nos diferentes estágios fisiológicos e em várias purificações, não podemos excluir a possibilidade de que se tratem de formas específicas do fruto.

5.2.5- Peso molecular da SPS por cromatografia de filtração em gel.

Quando as preparações da enzima foram aplicadas a coluna de Sepharose CL-6B foi eluído apenas um pico de atividade, coincidente com o pico de proteína, em um volume correspondente ao peso molecular de 440 kD (figura 8). O perfil eletroforético das frações eluídas em gel não-dissociante apresentou igual distribuição das formas da enzima, não sendo possível sua separação. Esse valor corresponderia a uma forma tetramérica da enzima nativa, diferindo das associações dimérica e hexamérica obtidas pela determinação feita por eletroforese não dissociante.

O valor descrito para o peso molecular da SPS nativa tem variado conforme a fonte vegetal e a técnica empregada na determinação. Para enzima de folha de milho, Bruneau e col. (1991) obtiveram por cromatografia de filtração em gel valores de 270 kD após passagem da amostra por coluna Mono Q e 480 kD após ultrafiltração. Em espinafre, valores de 460 kD (Doehlert e Huber 1983), 340 kD (Salvucci e col. 1990), 400 kD (Sonnewald e col. 1993), 457 kD e 547 kD (Kalt-Torres e col. 1987) foram obtidos por cromatografia e 253 kD por velocidade de sedimentação. A enzima de germe de trigo (Salerno e Pontis 1978) apresentou valores aproximados, tanto por cromatografia (380-390 kD) quanto por velocidade de sedimentação (396 kD). Para a enzima de tubérculo de batata (Reimholz e col. 1994) foram identificadas bandas com 120 kD e 240 kD por eletroforese em gel não-dissociante com gradiente de sacarose.

Salvucci e col. (1990), discutindo as discrepâncias de peso molecular da SPS de espinafre determinado por diferentes técnicas (340 kD por cromatografia e 253 kD por velocidade de sedimentação), sugerem que a SPS tenha um comportamento anômalo durante a cromatografia líquida de filtração em gel. Segundo esses autores haveria a ligação da SPS com outras proteínas

Figura 8. Cromatografia de filtração em gel (Sephacrose CL-6B) da SPS parcialmente purificada de bananas com 110 dias pós-antese. Perfil de proteína (—) estimado a 280 nm e perfil de atividade (Δ) representado pela absorbância a 432 nm.

da preparação formando um complexo eluído em volume correspondente a um peso molecular maior. Os diferentes graus de purificação da enzima utilizada nas determinações, justificariam as diferenças de peso molecular encontradas para a mesma fonte vegetal. Ao contrário da cromatografia de filtração em gel, o peso molecular estimado por velocidade de sedimentação foi de 253 kD tanto para a SPS de extrato bruto quanto para a enzima altamente purificada, sugerindo essa técnica como a mais apropriada. Esses autores consideram que a forma preferencial de associação da SPS seja dimérica.

Essa explicação não se aplica totalmente ao resultado obtido por Sonnewald e col. (1993), que obteve um valor de 400 kD por cromatografia em Superose 12 para a enzima de espinafre purificada à homogeneidade. Apesar de ressaltarem que a enzima altamente purificada adere facilmente à superfícies, o que poderia prejudicar a determinação através de filtração em gel, esses autores sugerem que a SPS possa adotar formas diméricas ou tetraméricas dependendo das condições de trabalho, pois quando a estimativa foi feita por eletroforese em gradiente de acrilamida obtiveram um valor de 240 kD. Em germe de trigo (Salerno e Pontis 1978) mesmo a estimativa de peso molecular por velocidade de sedimentação apontou um valor correspondente a 396 kD, indicando um arranjo tetramérico da enzima.

Bruneau e col. (1991), observaram que diferenças de peso molecular poderiam decorrer do tratamento anterior a cromatografia, uma vez que o peso molecular da enzima concentrada por ultrafiltração foi o dobro daquela eluída de coluna Mono Q. Também em milho (Kalt-Torres e col. 1987) dois valores de peso molecular foram obtidos, correspondendo a formas eluídas de coluna Superose-6 que diferiam quanto às propriedades cinéticas. Porém não foi possível concluir à respeito da existência *in vivo* e do papel fisiológico dessas diferentes formas.

Diferenças de peso molecular decorrentes das condições utilizadas em cada técnica podem ter ocorrido com a SPS de banana, uma vez que também foram observadas diferenças entre os valores obtidos por eletroforese e filtração em gel. Isto sugere que a enzima pode se associar de forma distinta nas condições da eletroforese e da cromatografia, do contrário as formas de 180 kD e 686 kD observadas no gel de acrilamida seriam facilmente separadas pela cromatografia em Sepharose-CL-6B. Os perfis eletroforéticos das frações correspondentes ao pico de atividade, em condições não-dissociantes, mostraram a presença das três bandas da SPS aparentemente em iguais proporções.

Resultados preliminares, utilizando coluna Sephacryl S-300, mostraram que o grau de purificação pode ser aumentado com baixa perda de atividade da SPS. Apesar disso, não foi possível a separação entre as formas observadas por eletroforese em gel não-dissociante.

Apesar dos dados obtidos não permitirem uma conclusão a respeito da forma preferencial da SPS de banana, fica claro o caráter polimérico dessa enzima e a possibilidade de arranjos de sua subunidade, em pelo menos duas formas.

A tabela IV apresenta alguns valores de PM da SPS de diferentes tecidos, obtidos por cromatografia de filtração em gel, eletroforese em gel não-dissociante e velocidade de sedimentação. De acordo com a tabela as variações de PM podem ser decorrentes não apenas da técnica empregada, mas também das condições utilizadas nas diferentes preparações, como é o caso da enzima de espinafre, tornando difícil a estimativa da forma da SPS existente *in vivo*.

Tabela IV. Peso molecular da SPS de diversas fontes, segundo diferentes técnicas.

fonte	órgão	P.M. (kD)	técnica utilizada	referência
<i>banana</i>	fruto	180, 254 e 686	eletroforese	
<i>banana</i>	fruto	440	filtração em gel	
espinafre	folha	460	filtração em gel	Doehlert e Huber 1983
espinafre	folha	340	filtração em gel	Salvucci e col. 1990
espinafre	folha	400	filtração em gel	Sonnewald e col. 1993
espinafre	folha	457 e 547	filtração em gel	Kalt-Torres e col. 1987
espinafre	folha	253	sedimentação	Salvucci e col. 1990
milho	folha	270 e 480	filtração em gel	Bruneau e col. 1991
trigo	semente	380-390	filtração em gel	Salerno e Pontis 1978
trigo	semente	396	sedimentação	Salerno e Pontis 1978
batata	tubérculo	120 e 240	eletroforese	Raimholz e col. 1994

5.3- Clonagem e sequenciamento.

5.3.1- Extração de RNA total do fruto.

Dos vários métodos de extração testados, apenas o descrito por Lopez-Gomez e Gomez-Lim (1992) mostrou-se adequado para obtenção do RNA total do fruto em todos os estágios estudados (figura 9). Para garantir a proteção contra compostos fenólicos, além da presença de borato (Su e Gibor 1988) foi adicionado PVP 40.000 até concentração final de 1%.

Foram testados os métodos de extração com tiocianato de guanidínio seguido de centrifugação em cloreto de cério (Sambrook 1989), fenol/SDS (Current... 1987-95) e uma combinação utilizando extração com tiocianato de guanidínio seguida de extração com fenol/clorofórmio (Logemann 1987). Estes dois últimos consistem em métodos específicos para a obtenção de RNA de tecidos vegetais, sendo o descrito por Logemann (1987) especialmente desenvolvido para tubérculo de batata. Apesar da semelhança quanto ao elevado teor de carboidratos, existentes no tubérculo da batata e na banana, esse método não se mostrou adequado para obtenção de RNA total do fruto. A principal limitação desses métodos consistiu na dificuldade em separar outros polissacarídeos, principalmente pectinas, que ao serem co-purificadas dificultam a recuperação do RNA.

Com o método descrito por Lopez-Gomez e Gomez-Lim (1992), o RNA total do fruto foi eficientemente isolado pela precipitação seletiva de carboidratos com etanol 20% e KCl 0,5 M (Su e Gibor, 1988). Após extrações com mistura fenol/clorofórmio e clorofórmio, o RNA em solução foi precipitado com cloreto de lítio. Esse método mostrou-se aplicável também para obtenção de

Figura 9. Amostras de RNA total separadas em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio: linhas 1-4, polpa de banana com 50, 70, 90 e 120 dias pós-antese, respectivamente; linhas 5-12, polpa de banana com 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21 dias pós-colheita, respectivamente; linha 13, casca do fruto; linha 14, folha de bananeira; linha 15, raiz de bananeira.

RNA total da casca do fruto, da folha e da raiz da bananeira, tecidos ricos em compostos fenólicos.

A qualidade do RNA obtido foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25 S e 18 S. A presença de bandas menores pode estar relacionada ao RNA de cloroplasto, como observado por Logemann (1987).

Com o RNA total, isolado por essa metodologia, foi sintetizada a primeira fita de DNA complementar (cDNA) utilizada para os procedimentos de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.3.2- Amplificação através de PCR e clonagem.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados como primers foram determinadas a partir das regiões de elevada homologia entre as sequências de cDNA de espinafre, milho e batata. A posição das regiões escolhidas, com base na sequência de espinafre (Salvucci e col. 1993), podem ser vistas na figura 10.

Os primers foram combinados aos pares, sentido e antisentido (tabela V), de modo a amplificar através de PCR uma sequência do cDNA de não mais do que 1.500 pb. Com os pares de primers 1 e 5, 1e 7 e 2 e 5, foi possível a amplificação de fragmentos dos tamanhos esperados. O tamanho dos produtos da amplificação foi previsto com base na distância existente entre as regiões de hibridização do par de primers utilizado (figura 10). Essas amplificações foram conduzidas a 50°C, sendo que temperaturas 10°C acima ou abaixo desse valor provocaram significativa diminuição na intensidade das bandas. A presença de magnésio também foi importante, pois como pode ser visto na figura 11 as amplificações com os primers 2 e 5 foram favorecidas 1 mM de MgCl₂.

Tentativas de clonagem do fragmento amplificado a partir do par de primers 2 e 5, após purificação e tratamento com quinase e fragmento de Klenow da DNA polimerase I, não foram bem-sucedidas, provavelmente pela não ligação entre extremidades obtusas. As transformações de células competentes com o produto da reação de ligação do fragmento amplificado ao vetor renderam um baixo número de possíveis clones positivos. A pesquisa através de PCR revelou que nenhuma dessas colônias continha o DNA clonado. A não ligação do DNA amplificado ao vetor seria a causa provável do não aparecimento de colônias brancas (indicativas da presença de DNA

TABELA V. Primers utilizados na amplificação da SPS.

Primer	Sequência	Orientação	Posição (pb)*
1	5' - tgggcccacatggcgggaaacgactggatt - 3'	sentido	80
2	5' - cgcgattctgatacaggtg - 3'	sentido	666
3	5' - tggcctagcaagggcaagt - 3'	anti-sentido	1544
4 (t31)**	5' - gaagaagttatctctggttt (t/c) ga (t/c) gaga - 3'	sentido	240
5	5'- ccatacagatcatacttgtcaatca - 3'	anti-sentido	1718
6	5'- cccca (t/a) cgca (t/c) agataggtacctgagtgc - 3'	anti-sentido	2965
7 (t28)**	5'- catctcagtaggttcaccata (a/g) ctcca - 3'	anti-sentido	789

* Relativa à sequência do cDNA da SPS de espinafre.

** Baseados nos primers descritos por Salvucci et al (1993).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 11. Efeito da concentração de magnésio na reação de amplificação (PCR) do cDNA da SPS da banana com os primers 2 (sentido) e 5 (antisentido). Temperatura de hibridização de 50°C. Os números sobre as linhas representam as concentrações de magnésio utilizadas (mM).

plasmidial), uma vez que o estabelecimento de ligação entre fragmentos com extremidades obtusas é mais difícil, necessitando de 10 a 100 vezes mais enzima que a ligação entre extremidades coesivas (Current... 1987-95).

Em geral, a clonagem é bastante facilitada caso as extremidades do DNA sejam coesivas às do vetor. Para isso, tentamos identificar no DNA amplificado, sítios de restrição comuns a região de clonagem do vetor de modo a permitir o estabelecimento desse tipo de ligação. O tratamento com as enzimas Apa I, Ava II, Bam HI, Bgl II, Cla I, Eco RI, Eco RV, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Sma I, Xba I e Xho I indicou a existência de sítios de restrição para Ava II, Cla I e Sac I (figura 12, linha 10), sendo esse último próximo a uma das extremidades do fragmento, como indicado pela pequena alteração na mobilidade da banda de 1 kb. A ligação foi feita entre o cDNA contendo uma extremidade gerada pelo tratamento com Klenow (obtusa) e uma extremidade Sac I e o DNA do plasmídeo, contendo uma extremidade Bam HI (obtusa) e uma extremidade Sac I.

A transformação de células de *E. coli* com uma alíquota do resultado da reação de ligação entre o fragmento amplificado e o vetor forneceu um grande número de colônias brancas, indicando possíveis clones positivos. A amplificação do DNA plasmidial dessas colônias utilizando os primers T7 e reverso, flanqueadores do sítio de clonagem, revelou que a maioria continha um fragmento clonado de tamanho próximo de 1 kb.

O sequenciamento de um desses clones apresentou um total de 952 pares de bases (Figura 13), sendo que essa sequência foi incluída no banco de dados de ácidos nucleicos GENBANK, com o número de acesso U59489. A região amplificada correspondeu ao trecho compreendido entre os pares de bases 667 e 1618 da sequência do cDNA da SPS de espinafre. A sequência dedu

Figura 12. Digestão do produto de amplificação do cDNA da SPS da banana com os primers 2 (sentido) e 5 (antisentido) com enzimas de restrição. 1) *Apa I*; 2) *Ava II*; 3) *Bam HI*; 4) *Bgl II*; 5) *Cla I*; 6) *Eco RI*; 7) *Eco RV*; 8) *Kpn I*; 9) *Pst I*; 10) *Sac I*; 11) *Sal I*; 12) *Sma I*; 13) *Xba I*; 14) *Xho I*; λ padrão de peso molecular (λ DNA digerido com *Hind III*); C, DNA controle (produto de PCR sem adição de enzima de restrição). Foram utilizados 100 μ g de DNA e 5 U de enzima em cada digestão (1 hora).

```

1  gcgattctga tacaggtggt caggtcaagt atgttggtga acttgcaagg gcattggggt
61  caatgcctgg agtatacagg gttgatttgc tgaccagaca gatatacagca ccagatgttg
121 attggagcta tggagaacca acagagatgt taactcccag aagttcggac agctttatgc
181 atcagatggg agagagcagt ggagcttata tcatccgtat tccatttgga ccaagagata
241 aatatattcc taatcagcat ctttgccac acattcaaga atttggtgat ggtgcactcg
301 gccatgtttt gcagatgtca aaagttctag gcgagcaaat tggtagtggg cagccaatat
361 ggcctgatgc tattcatggg cattatgctg atgcaggtga ttctgctgct ttgagttgtc
421 tggcactaaa tggtcctatg ctattcacgg gccattctct tggcagagat aaattagaac
481 aacttttgaa acaaggaggg caaacaaggg aagaaattaa tgcaacatac aaaataatgc
541 gtaggattga gtcagagaca ttagctcttg atgcctctga tatcgttgtc acaagcacta
601 gcagagaaat agaagagcaa tgggcgttat atgatggttt tgatgcggta ttggagcgaa
661 agttgcgagc tagaataaag cgtggcgtaa gctgttatgg ccgttatatg cctcgatagg
721 ttattatccc gcctgggatg gagttcaatc atattactat acacgatggt gatgtggatg
781 gtgaatcaga aggaactgat gaaaattcag cagtgcctga tccaccatt tggctcgaga
841 taatgcgatt ctttaciaaac cctcgcaagc ctatgattct tgcactctca agaccagacc
901 ctaaaaagaa catcacacac ttagtgaaag cttttggtga atgccgccca ct

```

Figura 13. Sequência parcial do cDNA da SPS de banana amplificado com os primers 2 (sentido) e 5 (antisentido) e clonado no vetor BlueScript SK.

zida de 316 aminoácidos indicou homologia ao redor de 70% com as demais sequências. Pela alinhamento entre elas (Fig. 14), foram observadas duas regiões polimórficas, uma ao redor do aminoácido 60 e a outra próxima ao 260 em relação à sequência parcial da SPS de banana. Em ambos os casos estas regiões foram seguidas de adição de aminoácidos, para as sequências de beterraba e milho respectivamente. O sítio Sac I, utilizado para facilitar a clonagem, localizou-se a menos de 100 pares de bases da extremidade 3' amplificada, razão pela qual o primer 5 não pode ser identificado na sequência apresentada (Fig. 13).

Considerando a elevada homologia observada, principalmente no trecho inicial da sequência apresentada (figura 14), podemos supor que estas regiões correspondam a domínios relacionados aos sítos de ligação de substratos e efetores alostéricos da SPS.

1
1-M.a. DSDTGGQVKY VVELARALGS MPGVYRVDLL TRQ1SaPDVD WSYGEPTTEML tPRSSDSF-- -MhQMGESSG
2-B.v. n..d.n..dd dd.....
3-S.t.i.t.-- -t.....
4-V.f.nt.e-- -g.....
5-S.o.a.g. ss.n..n-- st.q.....
6-Z.m.sm cag.n.--- --.g....g.
Cons: DSDTGGQVKY VVELARALGS MPGVYRVDLL TRQVSSPDVD WSYGEPTTEML -PRSSDGF-- -M-EMGESSG

68
1-M.a. AYIIRIPFGP RDKYIPnqHL WPhIqEFVDG ALgHvIQMSK VLGEQIGSGq PiWPDAlHGH YADAGDSaAL
2-B.v. a... ..n.....e t.....
3-S.t. q. n.....y ..nt.....
4-V.f. n.....g.....a.....h a.....
5-S.o. k...a..l. s..k... ..g..l... ..as....
6-Z.m. c... ..lk..a. lq.... ..a..ln... a.....n.r... ..l.yv.... ..v....
Cons: AYIIRIPFGP RDKYIPKEEL WPIYIEFVDG AL-HIIQMSK VLGEQIGSG- FVWPFVAlHGH YADAGDSaAL

138
1-M.a. sclALNVPMI FTGHSIGRDK LEQLLKQGRq treEINATYK IMRRIEsetL ALDASdIVvT STsrEIEEQW
2-B.v. ...g....ln.....s.....
3-S.t.la...kt.....
4-V.f.it.....gt.....
5-S.o.vr...da... ..c.....
6-Z.m.vn.....d.....g.....l.....
cons: LSGALNVPMI FTGHSIGRDK LEQLLKQGR- SK-EINSTYK IMRRIEaEL ALDASEIVIT STRQEIEEQW

208
1-M.a. rLYDGFDaVL ERKLARIkR GVSCYGRyMP RMVlPPGME FNHitIH--- --DGDvDGes EGtdEnsavl
2-B.v.mk.n.....m...t ..et...pts.
3-S.t.k. n.....a.....h.....m...t ..s...gkt..
4-V.f.i...r. n.....s.....h..a.l--- --i..t.p ..il..p..q
5-S.o. q..h...l..mr.h.....ak.....a.e--- --a.m.t.i ..hk.sn.n.
6-Z.m. g....vk. .kv...ar.h.....sn..v.edi dg...vkD.i v.l.gaspks
cons: RLYDGFDpVL ERKLARI-R GVSCYGR-MP RMVVIPPME FNHIVPH--- --DGD-DGE- EG-EEH-APP

273
1-M.a. DPPIWseIMR FFFNFRKPMI LALsRPDPKK NITHLVKAfG ECRP
2-B.v.a....k.....
3-S.t.a....l.....
4-V.f.s....v.....
5-S.o. ..V..s....g.....l.....
6-Z.m. m....a....t..h....s.....
cons: DPPIW-EIMR FFSNFRKPMI LALARDPKK NITTLVKAfG ECRP

316
1-Musa acuminata
2-Beta vulgaris
3-Solanum tuberosum
4-Vicia faba
5-Spinacea oleracea
6-Zea mays

Figura 14. Comparação entre a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência parcial do cDNA da SPS da banana (*Musa acuminata*) e as sequências deduzidas da SPS de beterraba (*Beta vulgaris*), batata (*Solanum tuberosum*), fava (*Vicia faba*), espinafre (*Spinacea oleracea*) e milho (*Zea mays*). A sequência apresentada se inicia aproximadamente no resíduo 195 da sequência completa da SPS de espinafre.

5.4- Expressão da SPS.

A figura 15 representa a variação da atividade enzimática, conteúdo de RNA e proteína SPS do fruto. O período do experimento compreendeu as fases de desenvolvimento e amadurecimento pós-colheita, terminando com o fruto pós-climatérico. Os dias negativos correspondem ao período de acúmulo de amido e o ponto zero representa o ponto de colheita comercial, frequentemente realizada entre 110 e 120 dias após a antese, ocasião em que o fruto se encontra completamente desenvolvido. As partes *a* e *b* mostram que o perfil da atividade enzimática, medida sob condições saturantes de substrato, se correlaciona com a presença do mRNA entre os dias -70 e 16. Tanto a atividade quanto o mRNA alcançam níveis máximos aproximadamente entre os dias 11 e 16 após a colheita, como pode ser visto pelo northern blot obtido (figura 15c). Na figura 15d podemos observar, pela coloração com azul de metileno, que foram aplicadas quantidades praticamente iguais de RNA e apesar das limitações da estimativa da concentração de mRNA da SPS por densitometria, podemos observar um aumento de aproximadamente 17 vezes durante o período do experimento, enquanto a atividade enzimática aumentou apenas 3,6 vezes. A figura 15e mostra o perfil de proteína SPS, representado pela subunidade de 116 KD revelada com anti-soro anti-SPS. Apesar de menos pronunciado, pode ser notado um padrão de aumento de proteína semelhante ao observado para a atividade enzimática. A comparação entre os dias 18 e 21 mostra que a taxa de degradação do mRNA pode ser mais rápida que a de proteína SPS.

Os perfis de carboidratos, atividade e teor de mRNA representados na figura 16 indicam que durante a fase de desenvolvimento, entre os dias -70 e -30, o acúmulo de amido foi acompa-

Figura 15. Variação da atividade, mRNA e proteína SPS durante o desenvolvimento e amadurecimento da banana. Os números sob as linhas representam os dias do estágio de desenvolvimento (de -70 até 0), o ponto de colheita (dia 0) e o amadurecimento pós-colheita (até o dia 21). (a) Atividade ensaiada sob condições saturantes de substrato, (b) níveis de mRNA (estimado por densitometria), (c) northern blot obtido com sonda de RNA específica, (d) northern blot corado para RNA total, (e) western blot obtido com antisoro anti-SPS₃.

Figura 16. Variação da atividade da SPS, mRNA e teor de carboidratos. A) Atividade da SPS ensaiada sob condições saturantes (●), limitantes + Pi (○) e estado de ativação (Δ). B) Teores de amido (■), sacarose (□) e mRNA (Δ) estimado por densitometria.

nhado por baixa atividade enzimática e aumentada síntese de mRNA. Após a colheita, com o teor de amido em seu valor máximo, ocorre um significativo aumento na atividade, diretamente relacionado ao acúmulo de mRNA no período, chegando ao máximo por volta do 14º dia.

O aparecimento de sacarose por volta do dia 16 foi concomitante à degradação de amido, e ocorreu 2 a 4 dias após serem observados os níveis máximos de atividade e de mRNA da SPS. É importante ressaltar que o conteúdo de sacarose variou de menos de 1% (dia 16), a mais de 15% em menos de 4 dias. Uma vez que a sacarose se acumulou, o conteúdo de mRNA detectado foi drasticamente reduzido, enquanto a redução da atividade enzimática foi menos pronunciada.

A partir desses resultados, foi possível dividir a expressão da SPS em pelo menos três fases distintas. A primeira (dias -70 a 0) relacionada ao desenvolvimento do fruto, durante o qual ocorre principalmente acúmulo de amido. Durante essa fase a atividade da SPS começa a aumentar como resultado da síntese protéica à semelhança do que ocorre durante a fase de desenvolvimento em folhas. Na segunda fase (dia 0 a 16), quando o fruto alcançou a maturidade fisiológica e costuma ser colhido, os teores de amido e sacarose se mantêm constantes mas a atividade da SPS continua aumentando. Enquanto na fase do desenvolvimento a atividade aumenta de ~ 20 a ~ 45 $\mu\text{mol/h/g}$ em 70 dias, após a colheita esse aumento é mais pronunciado, chegando a ~ 65 $\mu\text{mol/g/h}$ em apenas 9 dias. O teor de mRNA se correlaciona diretamente com a atividade, de acordo com a estimativa densitométrica. Apesar de menos pronunciado, também pode ser observado um aumento com relação à subunidade da SPS (Fig. 15e).

Na terceira fase, a partir do dia 16, o amido é degradado provavelmente pela ação inicial da fosforilase (Arêas e Lajolo 1981, Terra e col. 1983) e o conteúdo de sacarose aumenta rapidamente. A degradação do mRNA parece ser bastante acelerada mas o teor de proteína man-

tem-se elevado apesar da pequena redução na atividade da SPS. Semelhante ao que ocorre para SPS de batata (Reinholz e col. 1994), pode ser que haja retro-inibição da atividade pela sacarose.

Durante o amadurecimento de frutos, como tomate (Dali e col. 1992), melão (Hubbard e col. 1989), Kiwi (MacRae e col. 1992) e banana (Cordenunsi 1989, Hubbard e col. 1990), é observada uma correlação direta entre o acúmulo de sacarose e atividade enzimática da SPS, mas o mecanismo de sua regulação é desconhecido. Poderia envolver síntese de proteína, como ocorre para outras enzimas (Grey e col., 1994), regulação alostérica ou modificação covalente (Dohelert e Huber 1983, Stitt e col. 1988, Walker e Huber 1989).

O acúmulo de mRNA durante o amadurecimento pode estar relacionado ao esperado aumento do etileno endógeno (Arêas e col., 1988). Em experimentos de amadurecimento induzido com etileno, Hubbard e col. (1990) mostraram que a atividade da SPS aumenta dramaticamente após a exposição ao etileno exógeno, contudo esse aumento não foi atribuído à síntese proteica, mas a alterações nas propriedades cinéticas da enzima. Essas alterações seriam causadas por um mecanismo de controle via fosforilação/desfosforilação reversível, semelhante a aquele existente em espinafre, e se traduziriam em mudança no estado de ativação.

A comparação entre os perfis de atividade da SPS de banana ensaiada sob condições de substrato saturante e limitante, em presença de P_i , mostra que essas variações seguem paralelamente durante praticamente todo o período estudado, e se refletem num estado de ativação elevado, que não varia significativamente durante o amadurecimento (Fig. 16a). Pode-se observar uma pequena variação, sugerindo uma tendência de aumento no período após a colheita entre 70% a 80%, porém em menor grau do que o descrito por Hubbard e col. (1990). Os valores de atividade sob condições saturantes obtidos por esses autores são próximos daqueles

apresentados na figura 16, porém o ensaio sob condições limitantes apresenta diferenças significativas. De acordo com os resultados desses autores, ocorre uma variação dramática no estado de ativação, de aproximadamente 40% a quase 100% em apenas 4 dias, sendo que o valor máximo coincidiu com o acúmulo de sacarose e após 2 dias voltou a valores próximos do inicial. Quanto a atividade sob condições saturantes de substrato, esta se manteve em patamares elevados até o fim do experimento, 8 dias após a sacarose se acumular. Essa variação no estado de ativação, concomitante ao acúmulo de sacarose, foi tomado como evidência do controle da atividade da SPS através de modificação covalente durante o amadurecimento da banana.

Os resultados apresentados aqui não excluem a existência desse mecanismo de controle sobre a atividade da SPS, porém considerando o aumento de mRNA e proteína SPS e a pequena variação no estado de ativação, podemos supor que o aumento na expressão gênica da SPS contribui de forma mais significativa para o aumento da atividade enzimática observado durante o amadurecimento da banana.

Apesar da modificação covalente ser observada no controle da atividade associada às variações do ciclo claro-escuro em tecidos fotossintetizantes (Stitt e col. 1988, Huber e Nielsen 1989), foi sugerido que a enzima de tecidos não-fotossintetizantes possa ser regulada de forma análoga (Reimholz e col. 1994). Porém, foi também observado que a enzima de folha de soja (Nielsen e Huber 1989), não está sujeita a esse mecanismo de controle e que sua atividade depende da quantidade de proteína ativa e é regulada por um ritmo endógeno, determinado pelos níveis de hexose-P do tecido durante o dia. Isso mostra que mesmo em sistemas em que a síntese de sacarose está diretamente ligada ao ciclo de luz, o mecanismo de regulação pode ser diferente.

o papel da SPS pode estar ligado a iniciação, provavelmente reduzindo os níveis de hexoses e/ou aumentando a sacarose, favorecendo as atividades das enzimas envolvidas na síntese de amido, dentre as quais a SS.

Apesar dos altos níveis de mRNA e atividade enzimática obtidos, não houve concomitante aumento no teor de sacarose, de acordo com a figura 16b. Durante o amadurecimento de kiwis (MacRae e col. 1992), alta atividade da SPS sob condições saturantes de substrato foram observadas muito antes do acúmulo de sacarose. Um discreto aumento no estado de ativação por ocasião do aparecimento da sacarose levou esses autores a relacionar a formação de açúcar à modificação covalente. Como discutido anteriormente, não observamos alteração significativa no estado de ativação por ocasião do acúmulo de sacarose. No caso da banana os perfis de amido e sacarose obtidos sugerem que a compartimentalização e a limitação de substrato sejam importantes nessa fase, uma vez que o aparecimento da sacarose parece depender mais da degradação do amido do que de altos níveis de atividade da SPS.

A redução nos níveis de mRNA após o aparecimento da sacarose pode ser devida à intensa atividade de nucleases durante as fases mais avançadas do amadurecimento, ou à repressão da expressão do gene da SPS por esse açúcar, pois Hesse e col. (1995) observaram que em raiz de beterraba a infiltração de glicose aumenta a presença de mRNA da SPS, enquanto a sacarose tem efeito contrário.

6- CONCLUSÕES

A SPS de bananas, em distintas etapas fisiológicas, desde o desenvolvimento até o amadurecimento, pode ser eficientemente purificada através da metodologia descrita, e com o grau de purificação alcançado algumas de suas propriedades podem ser estudadas.

A SPS da banana apresenta subunidade de 116 kD, sendo que a enzima nativa pode assumir diferentes arranjos moleculares. Por eletroforese em gel não-dissociante são obtidas formas com pesos moleculares de 240 e 686 kD, que não são separadas por filtração em gel, na qual se obtém um único peso molecular de 440 kD, sugerindo um arranjo tetramérico.

O estado de ativação não se altera significativamente durante o amadurecimento, o que não coincide com resultados de outros autores e não corrobora a hipótese de modificação covalente como mecanismo determinante para o aumento de atividade associado com o acúmulo de sacarose.

O sequenciamento parcial do gene da SPS de banana indica que essa enzima apresenta elevada homologia com a de outras fontes vegetais. O acompanhamento dos níveis mRNA e da atividade enzimática da SPS, durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto, permite concluir que o aumento da expressão gênica contribui de forma significativa para o aumento de atividade durante o amadurecimento.

7-. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARÊAS, J.A.G., GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Effect of protein synthesis inhibitor on the climacteric of banana (*Musa acuminata*). **J. Food Biochem.**, Westport, v. 12, p. 51-60, 1988.

ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch Trasformation During Banana Ripening: I - The Phosphorylase and Phosphatase Behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Westport, v. 5, p. 19-37, 1981.

BEAUDRY, R.M., SEVERSON, R.F., BLACK, C.C., KAYS, S.J. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 91, p. 1436-1444, 1989.

BERGMEYER, H.U., BERNT, E. D-glucose. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., eds, **Methods of enzymatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1974. v. 2, p. 1212-5.

BIGGIN, M.D., GIBSON, T.J., HONG, G.F. Buffer gradient gels and 35S label as an aid to rapid DNA sequence determination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 80, p. 3963-3965, 1983.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1995.

BIGGS, M.S., HARRIMAN, R.W., HANDA, A.K. Changes in gene expression during tomato fruit ripening. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 81, p. 395-403, 1986.

BRADY, C.J., PALMER, J.K., O'CONNELL, P.B.H., SMILLIE, R.M. An increase in protein synthesis during ripening of the banana fruit. **Phytochemistry**, Oxford , v. 9, p. 1037-1047, 1970

BRUNEAU, J.M., WORRELL, A.C., CAMBON, B., LANDO, D., VOELKER, T.A. Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 96, p. 473-478, 1991.

CHITARRA, A.B., LAJOLO, F.M. Phosphorylase, phosphatase, alpha-amylase activity and starch breakdown during ripening of 'marmelo' banana [*(Musa acuminata* colla) x (*Musa balbisiana* colla) ABB group] whole fruit and thin slices. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, St. Joseph, v. 106, n. 5, p. 579-84, 1981.

CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 43, n. 2, p. 347-351, 1995.

CORDENUNSI, BR. **Síntese da sacarose no amadurecimento da banana. Envolvimento da sacarose sintetase e sacarose fosfato sintetase.** São Paulo, 1989. 87 p. (Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, New York, v. 1-3, 1987-1995.

DALI, N., MICHAUD, D., YELLE, S. Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 99, p. 434-438, 1992.

DAVIS, B.J. Disk electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 121, p. 401-427, 1964.

DELMER, D.P., ALBERSHEIM, P. The biosynthesis of sucrose and nucleoside diphosphate glucoses in *Phaseolus aureus*. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 45, p. 782-86, 1970.

DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. A comprehensive set of analysis programs for the wax. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 12, p. 387-395, 1984.

DILLEY, D.R. Enzymes. In: Hulme, A.C., ed., **The biochemistry of fruits and their products**, London: Academic Press, 1970. v.1, p. 179-207.

- a DOEHLERT, D.C., HUBER, S.C. Spinach leaf sucrose phosphate synthase. Activation by glucose 6-phosphate and interaction with inorganic phosphate. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 153, n. 2, p. 293-297, 1983.
- b DOEHLERT, D.C., HUBER, S.C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6 phosphate, inorganic phosphate and pH. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 73, p. 989-994, 1983.
- DOMINGUEZ-PUIGJANER, E., VENDRELL, M., LUDEVIG, M.D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 98, p. 157-162, 1992.
- GALTIER, N., FOYER, C.H., HUBER, J., VOLKER T.A., HUBER, S.C. Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicum esculentum* var. UC82B). **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 101, p. 535-543, 1993.
- GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidade behaviour. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 53, n.4, p. 1181-1186, 1988.

- GRAY, J.E., PICTON, S., GIOVANNONI, J.J., GRIERSON, D. The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. **Plant, Cell Environ.**, Oxford, v. 17, p. 557-571, 1994.
- HAMES, B.D. One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B.D, Rickwood, D., eds. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2. ed. Oxford:, Oxford University Press, 1990. p. 1-147.
- HEDRICK, J.L., SMITH, A.J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 126, p. 155-164, 1968
- HESSE, H., SONNEWALD, U., WILLMITZER, L. Cloning and expression analysis of sucrose phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 247, p. 515-520, 1995.
- HUBBARD, N.L., HUBER, S.C., PHARR, D.M. Sucrose-phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Plant. Physiol.**, Bethesda, v. 91, p. 1527-1534, 1989.

- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 94, p. 201-208, 1990.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Sucrose phosphate synthase and other metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 82, p. 191-196, 1991.
- HUBER, J.L.A., HUBER, S.C., NIELSEN, T.H. Protein phosphorylation as a mechanism for the regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 270, n. 2, p. 681-690, 1989.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. Activation of sucrose-phosphate synthase from darkened spinach leaves by an endogenous protein phosphatase. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 282, n. 2, p. 421-426, 1990.
- HUBER, S.C., NIELSEN, T.H., HUBER, J.L.A., PHARR, D.M. Variation among species in light activation of sucrose-phosphate synthase. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 30, p. 277-285, 1989.
- KALT-TORRES, W. Isolation and characterization of multiple forms of maize leaf sucrose-phosphate synthase. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 70, p. 653-658, 1987.

- KLEIN, R.R., CRAFTS-BRANDER, S.J., SALVUCCI, M.E. Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate synthase gene from spinach. **Planta**, Berlin, v. 190, p. 498-510, 1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAY-YEE, M., DELLAPENNA, D., ROSS, G.S. Changes in mRNA and protein during ripening in apple fruit (*Malus domestica* Borkh. cv Golden Delicious). **Plant Physiol.** (1990) 94, 850-853.
- LELOIR, L.F., CARDINI, C.E. The biosynthesis of sucrose phosphate. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 214, p. 157-165, 1955.
- LINGLE, S.E., DUNLAP, J.R. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 84, p. 386-389, 1987.
- LOGEMANN, J., SCHELL, J., WILLMTZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissues. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v. 163, p. 16-20, 1987.

- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **HortScience**, St. Joseph, v. 27, n. 5, p. 440-442, 1992.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. Changes in mRNA and protein synthesis during ripening in mango fruit. **J. Plant Physiol.**, Stuttgart, v. 141, p. 82-87, 1992.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACRAE, E., QUICK, W.P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 314-323, 1992.
- MAGARVEY, D.J., SIREVAG, R., CHRISTOFFERSEN, R.E. Ripening-related gene from avocado fruit. Ethylene inducible expression of the mRNA and polypeptide. **Plant Physiol.** Bethesda, v. 98, p. 554-559, 1992.
- MCMICHAEL Jr, R.W., KLEIN, R.R., SALVUCCI, M.E., HUBER, S.C. Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 307, n. 2, p. 248-252, 1993.

MCMICHAEL Jr, R.W., KOSHANSKY, J., KLEIN, R.R., SALVUCCI, M.E., HUBER, S.C.

Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase.

Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 321, n. 1, p. 71-75, 1995.

MENDICINO, J. Sucrose-phosphate synthesis in wheat germ and green leaves. **J. Biol. Chem.**,

Baltimore, v. 235, n. 12, p. 3347-3352, 1960.

MICALLEF, B.J., HASKINS, K.A., VANDERVEER, P.J., ROH, K.S., SHEWMAKER, C.K.,

SHARKEY, T.D. Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 327-334, 1995.

MIRON, D., SHAFFER, A.A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase

activities in developing fruits of *Lycopersicum esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Lycopersicum hirsutum* Hum. and Bonpl. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 95, p. 623-627, 1991.

NIELSEN, T.H., HUBER, S.C. Unusual regulatory properties of sucrose phosphate synthase

purified from soybean (*Glycine max*) leaves. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 76, p. 309-314, 1989.

PERCHERON, F. Dosage colorimétric des fructose et des fructofuranosides par l'acide

thiobarbiturique. **C. R. Hebd.Seances Acad. Sci.**, Paris, v. 255, p. 2521-2522, 1962.

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

PONTIS, H.G. Riddle of sucrose. In: Northcote, D.H., ed., **Plant Biochemistry II**. Baltimore, Univ. Park Press, 1979. p. 79-117. [International Review of Biochemistry, v. 13]

PROMEGA CORPORATION. Promega protocols and applications guide. 2.ed. Madison, 1991. p. 45-74.

REINHOLZ, R., GEIGENBERGER, P., STITT, M. Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potatoes tubers in a manner analogous to the enzyme in leaves. **Planta**, Berlin, v. 192, p. 480-488, 1994.

SALERNO, G.L., PONTIS, H.G. Studies on sucrose-phosphate synthase: The inhibitory action of sucrose. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 86, p. 263-267, 1978.

SALERNO, G.L., PONTIS, H.G. Sucrose-phosphate synthase. Separation from sucrose synthase and a study of its properties. **Planta**, Berlin, v. 142, p. 41-8, 1978.

- SALERNO, G.S., CRESPI, M.D., ZABALETA, E.J., PONTIS, H.G. Sucrose-phosphate synthase from wheat. characterization of peptides by imunoblotting analysis. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 81, n. 4, p. 541-47, 1991,
- SALVUCCI, M.E., DRAKE, R.R., HALEY, B.E. Purification and photoaffinity labeling of sucrose-phosphate synthase from spinach leaves. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 281, n. 2, p. 212-218, 1990.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3 v.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SIEGL, G., MACKINTOSH, C., STITT, M. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. Evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 270, n. 1,2, p. 198-202, 1990.
- SIGMA CHEMICAL COMPANY. Nondenatured protein molecular weight marker kit. St Louis,. 8 p., Oct. 1986. (Boletim técnico MKR-137)

- SLABNIK, E., FRYDMAN, R.B., CARDINI, C.E. Some properties of potato tuber UDPG:D-fructose-2-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.14) and UDPG:D-fructose-6-phosphate-2-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.13). **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 43, p. 1063-1068, 1968.
- SONNEWALD, V.; QUICK, W.P., MACRAE, E., KRAUSE, K.P, STITT, M. Purification, cloning and expression of sucrose phosphate synthase in *E.coli*. **Planta**, Berlin, v. 189, p. 174-181, 1983.
- SPEIRS, J., BRADY, C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Aust. J. Plant Physiol.**, Melbourne, v. 18, p. 519-32, 1991.
- STITT, M., WILKE, I., FEIL, R., HELDT, H.W. Coarse control of sucrose phosphate synthase in leaves: alteration of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. **Planta**, Berlin, v. 174, p. 217-230, 1988.
- STITT, M., HUBER, S., KERR, P. Control of photosynthetic sucrose formation .In: Hatch, M.D., Beardman, N.K., eds. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. San Diego, Academic Press, 1987. v.10, p. 327-409.
- SU, X., GIBOR, A. A method for RNA isolation from marine macro-algae. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v. 174, p. 650-657, 1988.

- TERRA, N.N., GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Starch sugar transformation during banana ripening: the behaviour of UDP-glucose pyrophosphorylase, sucrose synthase and invertase. **J.Food Sci.** Chicago, v. 48, p. 1097-1100, 1983.
- TUCKER, G.A., GRIERSON, D. Fruit ripening. In: Davies, D.D., ed. **The biochemistry of plants: A comprehensive treatise.** San Diego, Academic Press, 1984. v.12, p.265-318.
- WALKER, J.L., HUBER, S.C. Purification and preliminary characterization of sucrose phosphate synthase using monoclonal antibodies. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 89, p. 518-524, 1989.
- WALKER, J.L., HUBER, S.C. Regulation of sucrose phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. **Planta**, Berlin, v. 177, p. 166-120, 1989.
- WEBER, H., BUCHNER, P., BORISJUK, L., WOBUS, U. Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controled by the concerted action of both sucrose phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. **Plant J.**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 841-850, 1996.
- WEINER, H., MCMICHAEL, R. W. JR, HUBER, S.C. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose phosphate synthase *in vivo*. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 99, p. 1442-1453, 1992.

WORRELL, A.C., BRUNEAU, J.M., SUMMERFELT, K., BOERSIG, M., VOELKER, T.A.

Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomatoes alters leaf carbohydrate partitioning. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 1121-1130, 1991.

8-. RESUMO

A enzima sacarose-fosfato sintase foi parcialmente purificada de bananas fisiologicamente imaturas (70 dias após a antese), fisiologicamente maduras pré-climatéricas (110 dias após a antese) e climatéricas (130 dias após a antese). De acordo com os resultados apresentados a SPS de banana é uma enzima constituída de subunidade de 116 kD, apresentando peso molecular nativo de 440 kD por filtração em gel e bandas de 180, 240 e 686 kD por eletroforese em gel de poliacrilamida, nos três estágios estudados. Uma sequência parcial do gene da SPS foi amplificado através de PCR, clonado e seu sequenciamento indicou que a enzima de banana apresenta elevada homologia com as de outras fontes vegetais. A análise dos níveis de proteína e mRNA durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto permitem correlacionar o aumento de atividade com o aumento na expressão do gene da SPS. Não foram observadas alterações significativas no estado de ativação, sugestivas de modificação covalente como mecanismo de ativação durante o amadurecimento.

9- ABSTRACT

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

Sucrose-phosphate synthase (SPS) was purified from bananas at different developmental stages (70, 110 and 130 days after anthesis), corresponding to tissue with different composition. Banana SPS have a subunit of 116 kD and the native enzyme have a molecular weight around 440 kD by gel filtration and bands of 180, 240 and 686 kD by electrophoresis in all stages studied. A 952 base pair polymerase chain reaction product of SPS was cloned and showed that banana SPS has a high homology with the enzyme from other species. Enzyme activity, Protein and mRNA level point to an increase in SPS expression during ripening. The increase in SPS activity was not correlated to changes in the activation state. The results indicate that the increase in SPS expression is an important regulatory event during banana fruit ripening.