

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

Seqüência e caracterização molecular do cDNA de
uma α -amilase expressa durante o amadurecimento
da banana (*Musa spp.*)

Adair Vieira Júnior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2001

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

Seqüência e caracterização molecular do cDNA de
uma α -amilase expressa durante o amadurecimento
da banana (*Musa spp.*)

Adair Vieira Júnior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto da Químicas da USP

V657s Vieira Júnior, Adair
Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma α -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*) / Adair Vieira Júnior. -- São Paulo, 2001.
88p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador : Lajolo, Franco Maria

1. Amilase : Ciência dos alimentos 2. Banana : Bioquímica dos alimentos I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.

641.12 CDD

Adair Vieira Júnior

Seqüência e caracterização molecular do cDNA de
uma α -amilase expressa durante o amadurecimento
da banana (*Musa spp.*)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo
orientador / presidente

João Roberto Oliveira do Nascimento
1^o examinador

Manuel Troyano Pueyo
2^o examinador

São Paulo, 20 de novembro de 2001

Agradeço aos meus pais, Adair e Ana, por terem sempre confiado em mim, desde o momento em que lhes disse que iria fazer o vestibular e viria para a USP, sei que ficaram inquietos com a minha saída de casa, mas hoje já podem ver que consegui aquilo que vim buscar.

Obrigado às minhas irmãs, Fabiana e Luciane, que também estiveram sempre por perto, apesar da distancia que separa cada um de nós.

Agradeço à Cintia, minha companheira neste caminho que escolhi, obrigado por andar ao meu lado.

Sou muito grato ao professor Franco, que aceitou ser meu orientador e dividiu comigo a sua larga experiência.

Ao professor João Roberto, agradeço seu apoio e a oportunidade de dividirmos a bancada, durante meu estágio curricular e ao longo de todo o mestrado.

Obrigado às professoras Beatriz e Inês, pela presença e apoio constantes.

Não poderiam faltar os agradecimentos a todos os colegas do laboratório, Ana Cristina, Ana Paula, Eliana, Jaqueline, Maria Luiza, Márcia S., Neuza, Paola, Priscila, Renata, Rosecler, Stella, Tania, Anderson, Eduardo, Guillermo, Renato e Ricardo, que juntamente com a Lúcia, a Márcia e o Alberto, estiveram sempre dispostos a ajudar e a criar um ambiente descontraído, facilitando o trabalho diário.

Obrigado também à CAPES, pela bolsa de estudos e à FAPESP, pelo suporte financeiro dado ao laboratório.

Muito obrigado à todos.

Ao meu pai, Adair e à minha mãe, Ana.

Às minhas irmãs, Fabiana e Luciane.

À Cintia.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Metabolismo amido-sacarose	3
1.2. Expressão da α -amilase	7
2. Objetivos	10
3. Materiais	11
3.1. Frutas e folhas de bananeira	11
3.2. Vetores, células e biblioteca de cDNA da banana	11
3.3. Enzimas de restrição e modificação de ácidos nucleicos	12
4. Métodos	13
4.1. Extração de DNA genômico	13
4.2. Extração de RNA total e obtenção de cDNA	13
4.3. Purificação de RNA mensageiro (mRNA)	14
4.4. Planejamento dos iniciadores (<i>primers</i>)	15
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
4.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose	18
4.7. Preparação de vetores e clonagem de DNA	19
4.8. Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	20
4.9. Seleção de transformantes, mini e maxipreparações de DNA plasmidial ..	20
4.10. Varredura da biblioteca de cDNA (<i>Screening</i>)	20
4.10.1. Varredura da biblioteca em meio líquido	21
4.10.2. Varredura da biblioteca em meio sólido	22
4.11. Mapa de restrição e subclonagens	23
4.12. Seqüenciamento	24
4.13. Eletroforese de RNA e <i>northern blot</i>	24
4.14. <i>Southern blot</i>	25
4.15. Análise computacional	26
5. Resultados e Discussão	27
5.1. Clonagem e seqüenciamento a partir do DNA genômico e cDNA	27
5.2. Isolamento e caracterização de um clone da biblioteca de cDNA	33
5.3. Caracterização da α -amilase de banana	43
5.4. Estudo da expressão do gene da α -amilase em banana	62
5.4.1. Análise por hibridização <i>northern blot</i>	62
5.4.1.1. <i>Northern blot</i> com RNA total	63
5.4.1.2. <i>Northern blot</i> com mRNA e <i>riboprobe</i>	67
5.4.2. Análise por hibridização <i>Southern blot</i>	70
6. Conclusão	74
7. Resumo	75
8. Referências Bibliográficas	76

Lista de figuras:

Figura 01: Planejamento dos iniciadores para α -amilase.....	17
Figura 02: Placa de microtitulação com <i>pools</i> de linhas e de colunas.	21
Figura 03: Eletroforese de DNA genômico de banana em gel de agarose.....	28
Figura 04: Eletroforese dos produtos de PCR com DNA genômico de banana.....	28
Figura 05: Seqüência de bases e aminoácidos deduzidos para o clone genômico 0499-1.....	30
Figura 06: Seqüência de bases e aminoácidos deduzidos para o clone de cDNA 0899-1.....	32
Figura 07: Alinhamento entre as seqüências de bases dos clones 0499-1 e 0899-1.....	32
Figura 08: Eletroforese dos produtos de PCR para <i>pools</i> de linhas e colunas usado iniciadores S6 e R5.....	34
Figura 09: Representação esquemática dos produtos de PCR esperados nas ampliações a partir da biblioteca para um de cDNA completo de α -amilase.....	34
Figura 10: Eletroforese dos produtos de PCR para teste de interferência do DNA genômico de <i>E. coli</i>	35
Figura 11: PCR da biblioteca de cDNA, <i>pools</i> de linhas: A a H e <i>pools</i> de colunas: 1 a 8.....	36
Figura 12: Teste para detecção da maior diluição para lacunas B1, B2, B8, C1, C2 e C8 com resultado positivo.....	36
Figura 13: Teste com PFU das diluições 10^{-3} para lacunas C8, C2, C1, B8 e B2.....	37
Figura 14: Teste com PFU da segunda fase da varredura em meio sólido.....	37
Figura 15: Eletroforese das digestões do clone 1099-1.....	38
Figura 16: Representação esquemática do clone 1099-1.....	39
Figura 17: Representação do clone 1099-1 e seus subclones.....	40
Figura 18: Seqüência completa de nucleotídeos do clone de cDNA da α -amilase de banana.....	42
Figura 19: Alinhamento das seqüências de aminoácidos.....	44
Figura 20: Taxonomia obtida a partir do programa Tax BLAST Report.....	45
Figura 21: Região da assinatura I das α -amilases.....	46
Figura 22: Região da assinatura II das α -amilases, em destaque as seqüência de polimorfismo ..	48
Figura 23: Cladograma das α -amilases descritas na figura 20 e 21 gerado com o programa ClustalX e visualizado com TreeView.....	50
Figura 24: Classificação das isoformas da α -amilase expressas em células de arroz cultivadas em suspensão.....	51
Figura 25: Resultados da predição de sítio de clivagem para o peptídeo sinal.....	53
Figura 26: As regiões conservadas entre as α -amilase e sua relação com os elementos da estrutura terciária.....	55
Figura 27: Representação dos domínios e dos elementos da estrutura secundária característicos da α -amilase de banana.....	56
Figura 28: Modelo da coordenação entre aminoácidos da α -amilase e íons Ca^{2+}	59
Figura 29: Modelo estrutural da α -amilase banana.....	61
Figura 30: Eletroforese de RNA total em gel de agarose.....	63
Figura 31: <i>Northern blot</i> com a membrana nº 2.....	66
Figura 32: <i>Northern blot</i> com <i>riboprobe</i> e membrana nº 3.....	68
Figura 33: <i>Southern blot</i> com DNA genômico de banana.....	71

Lista de abreviaturas:

2-ME	2-mercaptoetanol
ATP	5'-trifostato de adenosina
BSA	albumina de soro bovino
DEPC	dietil-pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
dNTP	5'-trifostato de 2'-desoxirribonucleosídeo
ddNTP	5'-trifostato de 2',3'-didesoxirribonucleosídeo
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	[$\alpha^{32}\text{P}$]-5'-trifostato de 2'-desoxicitidina
[$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP	[$\alpha^{32}\text{P}$]-5'-trifostato de uridina
dpa	dias pós-antese
dpc	dias pós-colheita
DTT	tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético dissódico
EtBr	brometo de etídio
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
KAc	acetato de potássio
kb	quilobases ou quilopar de bases
LB	Luria-Bertani
NaAc	acetato de sódio
pb	par de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	unidade formadora de placa de lise
PVP 40.000	polivilpirrolidona de peso molecular médio 40.000 g/mol
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
hnRNA	RNA nuclear heterogêneo
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TE	tris EDTA
TBE	tris borato EDTA
TPE	tris fosfato EDTA
UFC	unidade formadora de colônia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosídeo
20X SSPE	NaCl 3 M, NaH ₂ PO ₄ 0,2 M, EDTA 0,02 M, pH 7,4
20X SSC	NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0

1. Introdução

No passado, muitos processos anabólicos que ocorrem durante o amadurecimento de frutos foram estudados e elucidados. A síntese de pigmentos, lipídios, ácidos nucleicos e outras inúmer,s reações de síntese que despendiam energia, estavam associadas a um período da vida dos frutos caracterizado como uma deterioração celular generalizada. Posteriormente, novas investigações na fisiologia pós-colheita redefiniram o amadurecimento como um processo dinâmico e ordenado (DILLEY, 1972).

Os processos anabólicos e catabólicos requerem energia e suprimento de carbono, fornecidos às frutas pela respiração, cujo aumento está relacionado ao incremento no etileno endógeno. Com base no padrão respiratório durante o amadurecimento, as frutas podem ser classificados em climatéricas, com um pico de atividade respiratória ao logo do amadurecimento, ou não-climatéricas, exibindo um declínio gradual em sua respiração (BRADY, 1987). As frutas climatéricas, a exemplo da banana, manga, tomate e maçã, caracterizam-se ainda por apresentar acentuado aumento na produção de etileno, de forma autocatalítica, o mesmo não sendo verificado nas frutas não-climatéricas como o morango, a uva, a cereja e o abacaxi (MCMURCHIE e col., 1972). Este hormônio desempenha funções importantes na iniciação e coordenação de eventos bioquímicos que dirigem o amadurecimento, entre outros eventos.

As frutas climatéricas, ao serem colhidas, evoluem naturalmente para o amadurecimento. Durante este período ocorrem várias reações químicas e transformações bioquímicas associadas a um metabolismo complexo que se processa de maneira altamente coordenada e estão relacionadas à atividade de enzimas e expressão ou supressão de genes específicos, resultando em modificações em sua composição e estrutura. O amadurecimento requer síntese de novas proteínas e mRNA, assim como de pigmentos e componentes do aroma e sabor (DILLEY, 1972; SPEIRS e BRADY, 1991).

Os carboidratos, armazenados nas frutas principalmente na forma de amido, estão entre as substâncias que mais sofrem alterações, promovidas por reações enzimáticas de síntese e degradação. Isto implica em importantes mudanças na fruta, como por exemplo o amolecimento e adoçamento, relevantes para o seu consumo como alimento e produto de comercialização (MACRAE e col., 1992).

Em muitas frutas, a degradação do amido e síntese de açúcares, é uma característica do amadurecimento. Vários são os caminhos e enzimas nos tecidos vegetais capazes de metabolizar o amido. Informações à respeito deste processo podem vir do estudo e investigação do *turnover* de proteínas e ácidos nucléicos, sendo verificada a continuidade de sua síntese em muitos frutos como bananas (BRADY e O'CONNELL, 1976) e tomates (TUCKER e GRIERSON, 1982). Além da continuidade da síntese de proteínas, estas também passam a ser redirecionadas. Análises de mRNA e espécies protéicas, mostraram haver síntese de proteínas relacionadas distintamente com o amadurecimento. Isto demonstra que estes eventos são controlados primariamente pela expressão de genes (DILLEY, 1972; SPEIRS e BRADY, 1992).

Considerando a natureza complexa do amadurecimento e como as plantas conseguem o seu controle genético, há basicamente três questões relacionadas ao seu entendimento: como o amadurecimento é iniciado, como, uma vez iniciado, ele é regulado e como as várias e diversas mudanças bioquímicas são coordenadas (SEYMOUR e col., 1993).

A biologia molecular trouxe importante contribuição ao estudo do metabolismo de carboidratos em frutas, fornecendo as ferramentas necessárias para o acompanhamento da química e bioquímica pós-colheita. Novas técnicas para manipulação e acompanhamento de processos e reações envolvendo enzimas e ácidos nucléicos permitem avaliar com maior grau de confiança qual o comportamento destas moléculas, como elas podem influenciar o amadurecimento das frutas e como conseqüência, a sua conservação e valor nutricional.

O estudo das bases genômicas do controle do metabolismo de carboidratos pode contribuir de forma significativa para o entendimento das bases moleculares do adoçamento de frutas. A partir de células do tecido vegetal, é possível a extração de proteínas, RNA total e DNA genômico. Partindo deste material isolado pode-se realizar o acompanhamento da transcrição e tradução, manipulação e modificação de genes para a produção de plantas transgênicas e análise de seqüências que poderão alimentar bancos de dados para futuras investigações (BECK e ZIEGLER, 1989; KOCH, 1996; BIRCH, 1997).

1.1. Metabolismo amido-sacarose.

A conversão do amido em açúcares (sacarose, glicose e frutose) é uma das principais características do amadurecimento em frutas climatéricas, esta transformação envolve várias enzimas em mais de uma via metabólica (AREAS e LAJOLO, 1981).

Normalmente, a colheita da banana (*Musa spp.*) acontece quando os frutos ainda não estão maduros, no estágio pré-climatérico, podendo-se induzir o amadurecimento por exposição ao gás etileno. A produção de etileno ocorre de forma constante e em baixos níveis em bananas até o início do amadurecimento, momento a partir do qual a produção aumenta seguida por um incremento na respiração. A taxa respiratória aumenta de 4 a 10 vezes da fase pré-climatérica para a climatérica. A transformação amido-sacarose inicia-se pouco antes do incremento respiratório e é concomitante com a produção autocatalítica de etileno (AREAS e LAJOLO, 1981; SEYMOUR e col., 1993).

O amido é composto de duas frações: amilose e amilopectina. O peso molecular destas frações é variável, o número de glicoses oscila entre 300 e 400 unidades. A amilose, um polímero linear, contém predominantemente ligações glicosídicas α -1,4 e corresponde em média, a 20% do amido. A amilopectina, um polímero ramificado, representa aproximadamente 80% do amido, é formada por ligações α -1,4 e α -1,6 glicosídicas, constituindo uma rede paracristalina no interior do grânulo

de amido (WHITAKER, 1994). Em bananas, o conteúdo de amilose é de aproximadamente 16% do total de amido, o maior componente no entanto, é a amilopectina, compondo a estrutura básica do grânulo (Lii e col., 1982). A presença de diversas estruturas, incluindo grânulos, polímeros solúveis e oligossacarídeos, tornam o amido um substrato bastante complexo (TERASHIMA e col., 1996).

MOTA (1997) observou que grãos de amido extraídos de bananas verdes, com no máximo 2 dias pós-colheita, apresentavam estriações paralelas, o que poderia ser atribuído à ação das amilases. GARCIA e LAJOLO (1988) observaram em seu trabalho que o tamanho dos grãos de amido variava entre 20 e 60 μm na polpa da fruta verde, com o amadurecimento houve uma redução generalizada no tamanho dos grânulos e predominância de grânulos com menos de 10 μm no amido de frutas maduras. Observaram também que grânulos obtidos de frutas verdes apresentavam superfície lisa e aqueles obtidos de frutas maduras, mostravam estriações, indicando a hipótese de exo-corrosão dos grânulos por enzimas amilolíticas.

Em bananas o amido corresponde a aproximadamente 20-25% do peso da polpa fresca do fruto na fase pré-climatérica e é rapidamente degradado durante o amadurecimento para menos de 1% no pico climatérico. Os açúcares, que representam 1-2% no fruto verde, são acumulados, chegando a 15-20% no fruto maduro. A sacarose, predominante na fruta madura, aumenta de 0,2% para um máximo de 16%, precedendo o acúmulo de glicose e frutose (AREAS e LAJOLO, 1981; MAO e KINSELLA, 1981; MARRIOTT e col., 1981).

O acúmulo de sacarose em vegetais superiores pode ocorrer pela ação das enzimas sacarose sintase (SuSy; E.C. 2.4.1.13) e sacarose fosfato sintase (SPS; E.C. 2.4.1.14). A SuSy catalisa a reação reversível de síntese de sacarose, a partir de UDP-glicose e frutose, enquanto a SPS apenas a reação de síntese, a partir de UDP-glicose e frutose-6-fosfato. Há evidências de que a SPS está relacionada com o processo de síntese de sacarose durante o amadurecimento de banana e que o aumento da expressão gênica contribui significativamente para o aumento da

atividade desta enzima (NASCIMENTO e col., 1997). A SuSy contudo, estaria relacionada apenas com a formação de amido, sua atividade é alta durante o período de síntese, mas após a colheita e durante o amadurecimento esta atividade cai para níveis muito baixos (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; NASCIMENTO e col., 1997; NASCIMENTO e col., 2000).

Várias enzimas são capazes de degradar o amido, representando um exemplo clássico de heterogeneidade da atividade enzimática. Enzimas de ambas as vias de degradação, hidrolítica e fosforolítica, vêm sendo identificadas e estudadas em bananas, contudo a exata contribuição de cada processo na degradação do amido durante o amadurecimento ainda permanece como uma questão a ser resolvida (MEDINA-SUAREZ e col., 1997).

As amido fosforilases (E.C. 2.4.1.1) atacam o terminal α -1,4 nas extremidades não redutoras de oligossacarídeos, liberando α -D-glicose-1-fosfato, podendo degradar toda a amilose. Em bananas, a atividade das fosforilases aumenta antes do início da degradação do amido e decresce durante o período climatérico, não havendo no entanto, uma variação pronunciada (AREAS e LAJOLO, 1981). MOTA (2001) detectou altos níveis de atividade das fosforilases, o que indica a relevância destas enzimas para o metabolismo do amido.

Enzimas desramificadoras, como as pululanases (α -dextrina-endo-1,6- α -glicosidase, E.C. 3.2.1.41), hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas no pululano e amido formando maltotriose. As isoamilases, (E.C. 3.2.1.68), também enzimas desramificadoras, hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas em cadeias ramificadas da amilopectina e suas β -dextrinas limites. Estas distinguem-se das pululanases por sua incapacidade de atacar o pululano e por sua ação limitada em α -dextrinas limite (HENKER e col., 1998; NAKAMURA e col., 1996). Devido ao alto conteúdo de amilopectina no amido de bananas, é possível supor que a atividade das α -1,6-glicosidas desempenhe uma importante função na degradação do amido. GARCIA e LAJOLO (1988) identificaram a presença destas enzimas na polpa de bananas pela atividade hidrolítica sobre isomaltose,

uma vez que as demais enzimas amilolíticas são incapazes de atuar sobre ligações α -1,6-glicosídicas.

A hidrólise do terminal não redutor da amilose pode ser feita por duas enzimas: α -glicosidases (E.C. 3.2.1.3) e β -amilases (E.C. 3.2.1.2). As α -glicosidases liberam β -D-glicose a partir do terminal α -1,4-D-glicose da cadeia da amilose. Apesar de serem descritas principalmente em endosperma de cereais, KONISHI e col. (2001) sugerem que as α -glicosidases, na sua isoforma ácida, são de grande importância no processo de degradação do amido em bananas.

A β -amilase hidrolisa a penúltima ligação α -1,4-D-glicosídica em polissacarídeos, removendo sucessivas unidades de β -maltose, por inversão da configuração, a partir da extremidade não redutora da cadeia (BAIROCH, 2000). Foi observado grande aumento na atividade desta enzima durante o amadurecimento de bananas (GARCIA e LAJOLO, 1988) e notado atraso na degradação do amido concomitante ao atraso no incremento dos níveis de atividade e transcrito da β -amilase em fatias de banana infiltradas com ácido indol-3-acético, (PURGATO e col., 2001).

A α -amilase (EC 3.2.1.1), atua aleatoriamente sobre ligações α -1,4-glicosídicas, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas, ela parece apresentar papel central no processo de hidrólise do amido, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos nos cereais (PREISS, 1982; BECK e ZIEGLER, 1989; IRVING, 1999). As α -amilases de plantas demonstram capacidade de atacar grãos de amido intactos, porém, a degradação do amido parece depender do sinergismo entre as α -1,4-glicosidases e α -amilases. HALLET e col. (1995), observaram que ao submeter grãos de amido isolados de kiwi à hidrólise por diferentes misturas de enzimas, os melhores resultados eram obtidos quando a α -1,4-glicosidade era incubada em conjunto com a α -amilase, comparativamente à hidrólise proporcionada pela α -amilase unicamente.

1.2. Expressão da α -amilase

Em cereais, a expressão da α -amilase e a sua regulação são temas bastante estudados. A degradação do amido tem papel central entre os eventos bioquímicos na germinação de sementes, fornecendo a energia necessária ao embrião. Esta degradação é iniciada pela indução da α -amilase, responsável pela clivagem α -1,4-endoglicolítica da amilose e amilopectina. Contudo, a completa degradação do amido requer ainda a ação de outras enzimas glicolíticas (HUANG e col., 1990; STULIFF e col., 1991; SUBBARAO e col., 1998).

Estudos sobre o desenvolvimento e regulação hormonal da expressão de genes em plantas revelam que a indução da α -amilase resulta da síntese "de novo" da enzima, a qual é acompanhada por um aumento pronunciado no mRNA da proteína.

Estudos recentes demonstram que os genes da α -amilase que compõem as subfamílias Amy1 e Amy2 são primariamente regulados por fitormônios, como as giberelinas e o ácido abscísico, enquanto os genes da subfamília Amy3 são regulados em resposta à concentração de açúcar (HWANG e col., 1999).

Essa indução responde positivamente às giberelinas (GA) e negativamente ao ácido abscísico (O'NEILL e col., 1990; HAMABATA e col., 1994). O GA é secretado pelo embrião para as camadas do aleurona e escutelo, induzindo a síntese de mRNA da α -amilase que aumenta em paralelo com a atividade de síntese da enzima no cotilédone (BECK e ZIEGLER, 1989). Em cereais, o tratamento de células de protoplastos da camada de aleurona com giberelinas, resultou no aumento da transcrição do gene da α -amilase (SKADSEN, 1993; YAMAMOTO, 1995). Em bananas, o ácido abscísico pode induzir a iniciação do amadurecimento (SEYMOUR e col., 1993) enquanto o GA parece causar um atraso significativo no climatério (ROSSETTO, 2001), contrastando assim com o padrão dos cereais.

Os genes de α -amilase de arroz, cevada e trigo, apresentam um motivo chamado "BOX pirimidínico", encontrado em genes que sofrem

indução por GA (SUTLIFF e col., 1991). Investigações sobre o mecanismo de indução do ácido giberélico avançaram do sentido de analisar as regiões promotoras em camadas de aleurona de arroz, contudo, detalhes no processo de transferência do sinal para a expressão dos genes permanecem incertos (YAMAMOTO, 1995).

Quando a degradação do amido supera a capacidade de utilização pela semente em desenvolvimento, o aumento na concentração de açúcares reprime a expressão de genes da α -amilase, atuando como mecanismo de *feedback*, que pode ser encontrado regulando a atividade enzimática e outros genes responsivos à concentração de açúcar ou de outros produtos do metabolismo de carbono (TERASHIMA e col., 1996). Segundo SUN e HENSON (1991), em determinadas concentrações a maltose pode inibir a α -amilase, a remoção de unidades do açúcar pelas α -1,4-glicosidades mantém o sistema ativo, o que explica também o sinergismo existente entre glicosidades e amilases.

Apesar da importância atribuída à α -amilase são poucas as informações a respeito dessa enzima em frutos, principalmente com relação à sua função, propriedades moleculares e cinéticas e regulação gênica. Enquanto nos cereais os estudos sobre o padrão de expressão e organização dos genes das α -amilases avançaram bastante nos últimos anos, o mesmo não foi verificado para as frutas. No que se refere ao padrão de expressão no tecido, pouco se conhece sobre a sua variação temporal e sobre os agentes envolvidos nessa regulação.

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

Em kiwis, a atividade α -amilásica aumenta paralelamente ao conteúdo de amido durante o desenvolvimento da fruta, tendo seus valores máximos entre 134 dias pós-antese (momento em que o

conteúdo de amido é máximo) e a colheita, havendo um aumento de 2 vezes na atividade α -amilásica associada ao sistema de degradação do amido. Ao longo do amadurecimento os valores da atividade da α -amilase permanecem constantes até a quase totalidade da conversão do amido em açúcares, decrescendo 4 a 5 vezes neste ponto (WEGRZYN e MACRAE, 1995).

GARCIA e LAJOLO (1988) demonstraram, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida com extratos protéicos de bananas, sete bandas com atividade hidrolítica sobre o amido, sendo provavelmente 3 α - e 4 β -amilases com atividades aumentadas durante o climatério. No entanto, apenas a atividade de β -amilase aumentou antes do início do pico climatérico. Perfil de atividades semelhante ao da banana foi verificado durante a germinação de sementes de alfafa, onde a atividade da α -amilase declinou enquanto a atividade da β -amilase aumentou durante os 4-5 dias iniciais (KOHNO e NANMORI, 1991).

Deste modo um aprofundamento dos estudos genômicos, utilizando técnicas de biologia molecular, poderia contribuir para uma melhor compreensão do papel da α -amilase em frutos, particularmente em bananas, e dos fatores determinantes para regulação de sua atividade.

2. Objetivos

Com o objetivo de contribuir para a melhor compreensão do papel da α -amilase no metabolismo amido/sacarose em bananas e dos fatores determinantes da sua atividade durante o amadurecimento da fruta, o presente trabalho procurou:

- obter e caracterizar um clone contendo a seqüência completa do produto da transcrição do gene da α -amilase de banana e a partir do clone isolado, obter a correspondente seqüência de aminoácidos, determinar e caracterizar sua estrutura secundária e terciária usando recursos de biocomputação.
- acompanhar a expressão da α -amilase da banana durante o amadurecimento da fruta.

3. Materiais

3.1. Frutas e folhas de bananeira.

Frutas pré-climatéricas de bananeiras (*Musa spp.*, grupo AAA, subgrupo Cavendish, cultivar nanicão) cultivadas no viveiro do Instituto de Biociências da USP - São Paulo, foram colhidas e lavadas em solução de hipoclorito de sódio 5% e armazenadas em câmara com temperatura (18 ± 3 °C) e umidade (75 ± 5 %) controladas. Três a quatro frutas de pencas variadas, sem a casca, foram fatiadas na porção equatorial, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80 °C. A amostragem das frutas foi periódica ocorrendo por um período de 28 dias ao longo do amadurecimento (BASSINELLO e col., 2001). Outras partes da bananeira, raízes, folhas e frutas imaturas, também foram amostradas e guardadas nas mesmas condições.

3.2. Vetores, células e biblioteca de cDNA da banana.

Foram usados vetores de DNA plasmidial disponíveis comercialmente, pUC18 (Ready-To-Go pUC18 *Sma*I/BAP + Ligase; Pharmacia, Uppsala), pGEM-T (pGEM-T Vector System I; Promega, Madison), pBlueScript II SK (Stratagene, La Jolla). Foram utilizadas bactérias hospedeiras, *Escherichia coli*, cepas XL1-Blue, XL1-Blue MRF' e XL1-Blue XL0LR (Stratagene), cultivadas observando-se técnicas padronizadas descritas nos manuais ou em Sambrook e col. (1989). Foi utilizada uma biblioteca de cDNA produzida a partir do mRNA extraído de bananas 3 dias após tratamento com 1000 ppm de etileno por 24h; os protocolos para amplificação, titulação, preparação de vetores, bactérias e meios de cultura foram conforme recomendado pelo fabricante (ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit; Stratagene).

3.3. Enzimas de restrição e modificação de ácidos nucléicos.

Foram usadas as seguintes endonucleases de restrição: *Apal*, *Aval*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI* (Pharmacia/Promega). Também foram usadas as seguintes enzimas de modificação: fosfatase alcalina ou CIAP (*Calf intestine alkaline phosphatase*; USB, Cleveland), T4 DNA ligase (Promega), ribonuclease A (RNase A; Pharmacia), desoxirribonuclease I (DNase I; Pharmacia), polinucleotídeo quinase (T4 PNK; Pharmacia), proteinase K (Sigma, St. Louis), *Taq* DNA polimerase, fragmento Klenow da DNA polimerase I (Klenow; Pharmacia). Todas as enzimas foram utilizadas segundo as condições descritas pelos fabricantes, observando-se concentração da enzima, temperatura de incubação e tampões de reação.

4. Métodos

4.1. Extração de DNA genômico.

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de bananeira pelos métodos descritos por AUSUBEL e col. (1997), CLARK (1997) e DELLAPORTA e col. (1983). Utilizaram-se também modificações dos métodos sendo incorporados aos respectivos tampões de extração 1% de PVP 40.000 e 2-mercaptoetanol (2-ME), adicionando-se proteinase K (100 µg/mL) antes do uso. O DNA extraído foi tratado com 0,01 volume de RNase A (10 mg/mL), quantificado espectrofotometricamente pela determinação da absorbância a 260 nm e avaliado quanto à sua pureza pela razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. A integridade do DNA obtido e a presença de RNA foram testadas por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

4.2. Extração de RNA total e obtenção de cDNA.

O RNA total foi extraído de fatias de banana congeladas através de metodologia descrita por LÓPEZ-GÓMES e GÓMEZ-LIM (1992) com modificações. Amostras com 3 g de tecido foram trituradas em gral de porcelana sendo mantidas congeladas pela adição nitrogênio líquido. Foram adicionados à amostra ainda congelada, 10mL de tampão de lise (SDS 2%, 2-ME 1%, EDTA 50 mM e Tris-HCl 150 mM pH 7,5), sendo esta lentamente descongelada sob agitação constante com pistilo. Após descongelada, a mistura foi transferida para um tubo de 50 mL e centrifugada por 10min a 12.000 x g. O sobrenadante foi recolhido, adicionado de 0,25 volumes de etanol e 0,11 volumes de KAc 5 M e agitado por um minuto, seguiram-se a adição 1 volume de clorofórmio, agitação por um minuto e centrifugação por 10min a 12.000 x g. A fase aquosa foi recolhida em tubo limpo, adicionada de 1 volume de fenol/clorofórmio, centrifugada por 10min a 12.000 x g e novamente separada e extraída com 1 volume de clorofórmio.

Após centrifugação a 12.000 x g por 10min, a fase aquosa foi cuidadosamente removida para um tubo de vidro COREX® e o RNA foi precipitado por adição de 0,43 volumes de LiCl 10 M, mantendo-se o tubo a -20 °C por 12h. O tubo contendo o RNA precipitado foi centrifugado por 1h a 12.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado retomado em 2 mL de tampão TE. Ao RNA solubilizado foram adicionados 3 volumes de etanol e 0,1 volume de KAc 5 M. O tubo foi mantido por 2h a -20 °C, centrifugado por 1h a 12.000 x g e o precipitado foi retomado em 200 µL de TE. Após quantificação por espectrofotometria, o RNA foi dividido em alíquotas e estocado em freezer a -80 °C.

A primeira fita do DNA complementar foi sintetizada a partir de 10 µg de RNA total utilizando transcriptase reversa M-MuLV (First-Strand cDNA synthesis Kit, Pharmacia) e iniciadores oligo(dT)₁₂₋₁₈ ou iniciadores específicos para α-amilase de banana.

4.3. Purificação de RNA mensageiro (mRNA).

Amostras de RNA total foram utilizadas para isolar mRNA poli(A+) por cromatografia de afinidade em colunas contendo resina oligo(dT) celulose (Oligo(dT) Cellulose Type 7, Pharmacia), segundo o protocolo descrito em AUSUBEL e col., 1997. Foram usados na purificação 0,1 g de resina por coluna e 700 mg de RNA total para cada amostra. O mRNA foi eluído em dois volumes de 400 µL e concentrado à vácuo em concentrador Speed Vac (Savant, Holbrook) por 2h. As duas frações de cada amostra foram reunidas após concentradas, precipitadas com etanol/NaAc e deixadas em freezer a -80 °C por 12h. As amostras foram centrifugadas a 14.500 x g por 30min e o mRNA poli(A+) precipitado foi retomado em 150 µL de água tratada com DEPC.

4.4. Planejamento dos iniciadores (*primers*).

Foram utilizados iniciadores construídos com base nas regiões de consenso dos alinhamentos, definidos através dos programas PILEUP e PRETTY (WISCONSIN-PACKAGE, 1997), entre seqüências de DNA ou aminoácidos de α -amilases disponíveis no GenBank (BENSON e col., 2000) e SWISS-PROT (BAIROCH e APWEILER, 2000).

Estes iniciadores, descritos na tabela 1, foram construídos observando-se o fato de que as regiões relacionadas com a codificação dos aminoácidos que integram os sítios ativo e de ligação de cálcio das α -amilase são bastante conservadas. Para tanto, foram empregadas as seqüências de ácidos nucléicos de α -amilases de batata (*Solanum tuberosum*, números de depósito no GenBank: M81682 e M79328), feijão mungo (*Vigna mungo*: X53049), milho (*Zea mays*: L25805), arroz (*Oryza sativa*: M24287, X64619 e M24286) e cevada (*Hordeum vulgare*: M17128, M17126). A figura 1 mostra o alinhamento das seqüências de DNA (figura 01-A), as posições dos iniciadores relativas às seqüências usadas no planejamento e os tamanhos esperados para os fragmentos a serem amplificados a partir das possíveis combinações de pares sentido (S) e reverso (R) (figura 01-B).

Posteriormente, novos iniciadores foram construídos com base nas leituras dos clones seqüenciados. Todos os iniciadores foram avaliados quanto ao auto-pareamento, temperatura de hibridização e formação de dímeros com uso do programa OLIGO (RYCHLIK, 1990).

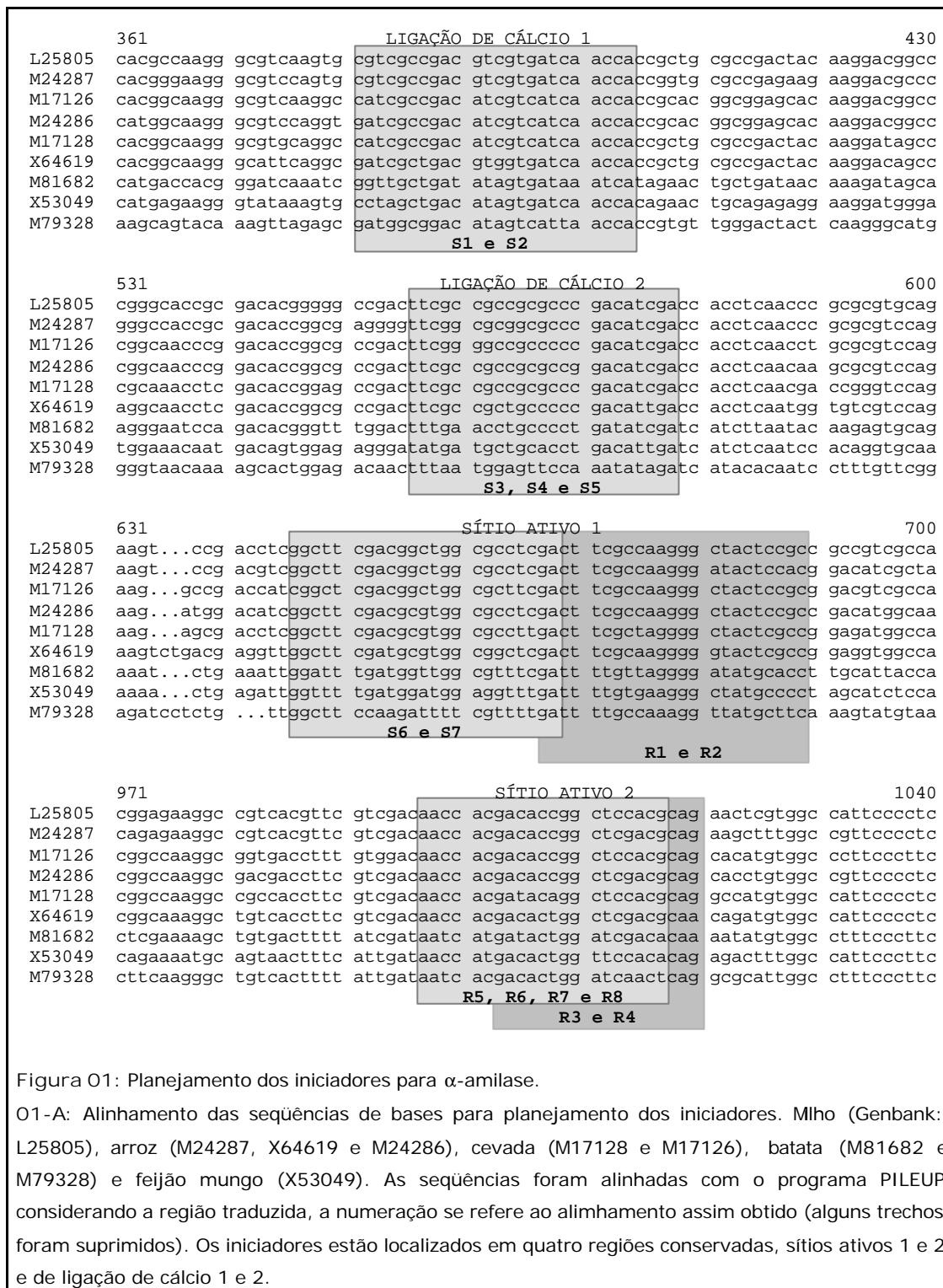
Adicionalmente, foram usados os iniciadores T7, T3, M13 e M13R, flanqueadores dos sítios de clonagem dos vetores.

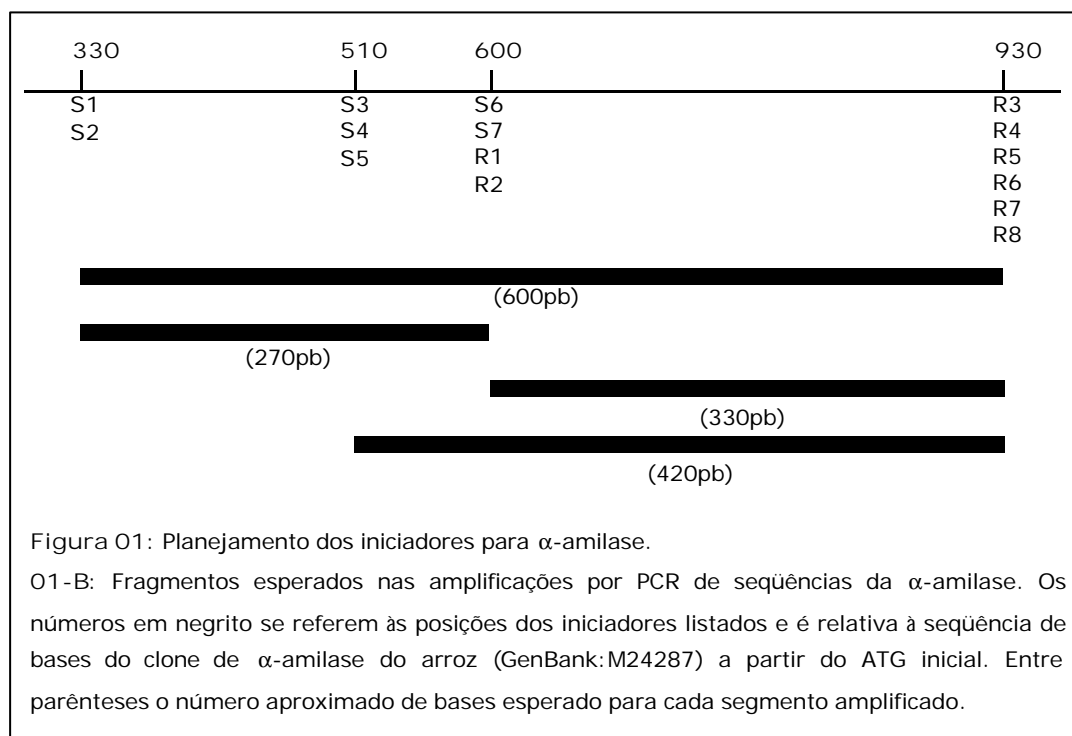
Tabela 1: Iniciadores específicos usados nas amplificações das seqüências de α -amilase de banana. S8, RS1, RS2, ESP-S, R9, R10 e ESP-R foram construídos a partir do seqüenciamento dos clones obtidos.

Iniciadores α -amilase, orientação sentido	
Nome	Seqüência
S1	5'-gcc gac atY gtS atY aac ca-3'
S2	5'-gcc gac atY gtS atY aat ca-3'
S3	5'-ttc gcc gcc gcY ccM gaY ata ga-3'
S4	5'-ttc gcc gcc gcY ccM gaY atc ga-3'
S5	5'-ttc gcc gcc gcY ccM gaY att ga-3'
S6	5'-ggc ttY gaY ggc tgg cgS ctc ga-3'
S7	5'-ggc ttY gaY ggc tgg cgS ctg ga-3'
S8	5'-gga cgg cca cca gcg tcg gag-3'
RS1	5'-ggg gaa ctg tgg agg atg cg-3'
RS2	5'-gtg gcc aga gaa ggc tgt cac-3'
ESP-S	5'-atg ttt ctg ctt ctg ttt ctt gtc att-3'
Iniciadores α -amilase, orientação anti-sentido (reverso)	
Nome	Seqüência
R1	5'-gcc gag tag ccc YtD gcR aag tc-3'
R2	5'-gcc gag tag ccc YtD gcR aaa tc-3'
R3	5'-ctg cgt Rga ScC Rgt gtc-3'
R4	5'-ctg cgt Rga ScC Rgt atc-3'
R5	5'-ggg gga ScC Rgt Rtc gtg att-3'
R6	5'-ggg gga ScC Rgt Rtc gtg gtt-3'
R7	5'-ggg gga ScC Rgt Rtc atg att-3'
R8	5'-ggg gga ScC Rgt Rtc atg gtt-3'
R9	5'-gtc tgc gca acg atg gtt gat-3'
R10	5'-agg gac tcc cgg atg cgt gag-3'
ESP-R	5'-tct ctt ctc cca cac gca gta gtc att-3'
Iniciadores flanqueadores	
Nome	Seqüência
T7	5'-cgg gat atc act cag cat aat g-3'
T3	5'-aat taa ccc tca cta aag gg-3'
M13	5'-gta aaa cga cgg cca gt-3'
M13R	5'-cag gaa aca gct atg ac-3'

Códigos ambíguos IUPAC:

N = qualquer base	B = C ou G ou T;	
M = A ou C;	S = C ou G;	D = A ou G ou T;
R = A ou G;	Y = C ou T;	H = A ou C ou T;
W = A ou T;	K = G ou T;	V = A ou C ou G;





4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

As condições do PCR foram: pré-aquecimento à 94 °C por 5min; 35 ciclos à 94 °C por 30s, 50 °C por 30s e 72 °C por 90s, e após o último ciclo 72 °C por mais 7min, finalizando com resfriamento à 4 °C; o volume de reação foi de 25 μ L contendo 2,5 U de *Taq*, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM dos iniciadores e o DNA molde. As reações foram otimizadas com relação à temperatura de hibridização, que variou de 50 °C a 64 °C conforme os iniciadores usados, concentração de magnésio e concentração de DNA molde.

4.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose.

O perfil de amostras de DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8-1,5% contendo EtBr a 0,5 μ g/mL, corrida em tampão TPE ou TBE e tensão constante de 80 volts por 15-30min. Foram usados os padrões de peso molecular PTXS (fragmentos de DNA com 4930, 4170,

2313, 1729, 655 e 233 pb), λ -*Hind*III (23.130, 9.416, 6.557, 9.341, 2.322, 2.027, 564 e 125 pb; Lambda DNA *Hind*III digest; Pharmacia/Sigma) e "PCR Marker" (2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 300, 150 e 50 pb; Sigma).

As bandas de interesse, após recortadas, foram purificadas a partir do gel usando "Prep-A-Gene DNA Purification Systems" (Bio-Rad, Hercules).

4.7. Preparação de vetores e clonagem de DNA.

Para a clonagem no vetor pUC18, fragmentos de DNA resultantes de digestão com endonucleases de restrição foram purificados de gel de agarose e incubados com 1 U de Klenow a 37 °C por 5min, seguida de adição de 0,2 mM de dNTP e 1 U de T4 PNK e incubação por mais 15min. Este tratamento teve por objetivo reparar as extremidades protuberantes e promover a fosforilação de extremidades 5'. Após o tratamento, o DNA foi extraído com 1 volume de fenol/clorofórmio, 1 volume de clorofórmio e precipitado com 3 volumes de etanol e 0,1 volume de NaAc 3M sendo então retomado em 5 μ L de H₂O, a ligação com o vetor pUC18 foi feita com incubação a 16 °C durante 12h.

A clonagem no vetor pBlueScript II SK foi feita utilizando-se fragmentos de DNA obtidos como descrito anteriormente porém, sem reparo e fosforilação das extremidades. O vetor foi previamente linearizado com a(s) mesma(s) endonuclease(s) do correspondente inserto e suas extremidades foram desfosforiladas com CIAP (1 U/100 pmoles de extremidades 5') para evitar sua recircularização. As ligações foram realizadas por incubação a 16 °C durante 12h com 1 U de T4 DNA ligase.

Para a clonagem no vetor pGEM-T, fragmentos provenientes de PCR foram submetidos a eletroforese, purificados do gel de agarose e ligados diretamente com o vetor por incubação durante 12h a 16 °C com 1 U de T4 DNA ligase.

4.8. Transformação de bactérias *E. coli*.

Cento e cinquenta microlitros de uma suspensão de células de *E. coli*, tornadas competentes pelo método do CaCl_2 (SAMBROOK e col., 1989), foram transformadas pela adição da reação de ligação e incubação a 4 °C por 10min e a 42 °C por 50s. A suspensão foi adicionada de 200 μL de meio LB e incubada a 37 °C por 1 hora, após o que, foi plaqueada em meio LB-ágar contendo antibiótico (ampicilina ou canamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-Gal (40 μL a 2% por placa) e IPTG (4 μL a 1 M por placa). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C.

4.9. Seleção de transformantes, mini e maxipreparações de DNA plasmidial.

Unidades formadoras colônias de *E. coli* (UFC branca) crescidas em placas de LB-ágar após a transformação, foram usadas como inóculo de 20 μL de LB (contendo ampicilina ou canamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubadas a 37 °C por 1 hora. As suspensões de células foram testadas por PCR com iniciadores específicos para os insertos clonados. A partir de colônias com as quais se obteve amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho esperado, foi feito inóculo em meio LB para mini ou maxipreparação (*miniprep* e *maxiprep*) de DNA plasmidial (Nucleon MiP/MaP; Amersham, Little Chalfont).

4.10. Varredura da biblioteca de cDNA (*Screening*).

Com base na metodologia descrita por ISRAEL (1993), foi feita a varredura da biblioteca de cDNA baseada na reação em cadeia da polimerase em duas etapas consecutivas: varredura em meio líquido e em meio sólido. Foram feitos sucessivos enriquecimentos da biblioteca em meio líquido e sólido até a obtenção de um clone positivo por excisão do fagemídeo denominado pBK-CMV, conforme descrito a seguir.

4.10.1. Varredura da biblioteca em meio líquido.

Uma suspensão de *E. coli* infectada com a biblioteca de cDNA foi distribuída em 64 lacunas de uma placa de microtitulação, sendo 100 μ L em cada lacuna. A partir de uma alíquota de cada lacuna foram montados 8 *pools* de linhas e 8 de colunas (figura 2). Uma primeira amplificação foi realizada utilizando um iniciador específico para a seqüência procurada (R5) e um iniciador flanqueador (M13R) com uma alíquota de cada um dos 16 *pools*. Estes PCR's foram usados como substrato para uma segunda amplificação com dois iniciadores específicos (S1 e R1) cujas regiões de hibridização eram contíguas às dos iniciadores da primeira amplificação. Foi considerada positiva a lacuna cuja PCR, após eletroforese em gel de agarose, originou a banda característica para o par de iniciadores testado. Havendo mais de uma reação com este resultado, foi escolhida aquela onde a banda mostrava-se mais intensa. Diluições da lacuna positiva (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) foram testadas para identificar a maior diluição com resultado positivo e em seguida uma alíquota desta diluição foi usada para preparação de nova placa de microtitulação. A varredura em meio líquido foi repetida até que todos os *pools* mostrassem resultado positivo por PCR, passando-se então para o meio sólido.

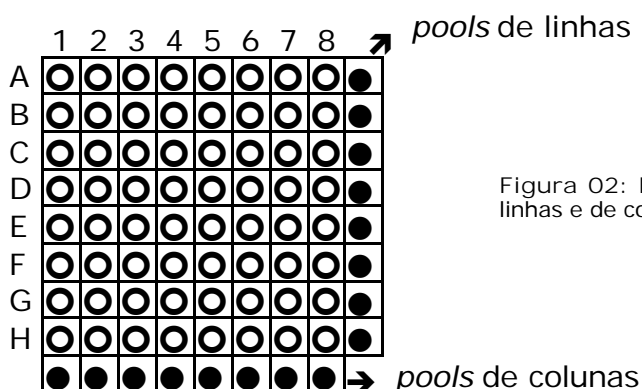


Figura 02: Placa de microtitulação com *pools* de linhas e de colunas.

4.10.2. Varredura da biblioteca em meio sólido.

Tendo todos os *pools* em meio líquido mostrado resultado positivo, foi feita PCR com diluições das lacunas onde a banda amplificada apresentou-se mais intensa. Uma alíquota (0,5 μ L) da maior diluição com resultado positivo foi incubada por 15min com 200 μ L de *E. coli* XL1-Blue MRF' e após incubação a suspensão de células foi misturada com 3 mL de meio NZY top-ágar, plaqueada em meio NZY-ágar e incubada a 37 °C por 12h. Algumas das unidades formadoras de placas de lise (PFU) obtidas após incubação foram dispersadas em 20 μ L de tampão SM (NaCl 0,1 M, MgSO₄.7H₂O 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e gelatina 0,01%). Alíquotas destas suspensões foram testadas por PCR com iniciadores específicos (S1 e R1) e identificada aquela PFU positiva. Uma alíquota de 0,5 μ L da dispersão da PFU positiva foi adicionada a 200 μ L de células *E. coli* MRF' e após incubação por 15min a 37 °C, a suspensão de células foi misturada com 3 mL de meio NZY top-ágar, plaqueada em NZY-ágar e incubada a 37 °C por 12h. Das PFU originadas, 10 foram testadas por PCR como descrito acima e este procedimento foi repetido até que se obtivesse resultado positivo para todas as PFU selecionadas de uma placa.

Uma alíquota da dispersão da PFU selecionada em tampão SM foi adicionada a 200 μ L de *E. coli* MRF', plaqueada e incubada por 24 horas a 37 °C. A esta placa, foram adicionados 2 mL de tampão SM e deixados sob leve agitação para dispersão dos fagos no meio líquido. O tampão SM foi recolhido constituindo o estoque de fagos, que após titulação, foi utilizado para a excisão *in vivo* usando o fago "ExAssist Helper", conforme descrito no manual da biblioteca de cDNA.

Uma descrição esquemática das etapas de varredura da biblioteca para o seu enriquecimento até a obtenção do estoque de fagos é dada a seguir:

Varredura em meio líquido.

Fase 1:

- ✓ amplificação de cada *pool* por PCR;
- ✓ eletroforese dos produtos de PCR;
- ✓ seleção de um *pool*, infecção de bactérias e crescimento dos fagos.

Fase 2:

- ✓ construção de novos *pools* e amplificação por PCR;
- ✓ eletroforese dos produtos de PCR;
- ✓ seleção de um *pool*, infecção de bactérias e crescimento dos fagos.

Fase 3:

- ✓ construção de novos *pools* e amplificação por PCR;
- ✓ eletroforese dos produtos de PCR;
- ✓ seleção de um *pool*, infecção de bactérias.

Varredura em meio sólido.

Fase 1:

- ✓ incubação e plaqueamento de suspensão de células;
- ✓ amplificação por PCR a partir das placas de lise (PFU);
- ✓ eletroforese dos produtos de PCR;
- ✓ seleção de uma PFU e infecção de bactérias.

Fase 2:

- ✓ incubação e plaqueamento de suspensão de células;
- ✓ dispersão dos fagos em tampão SM;
- ✓ estoque de fagos para excisão.

4.11. Mapa de restrição e subclonagens.

Baseado no tamanho dos fragmentos produzidos por endonucleases, foram identificadas as posições de seus sítios de ação e construído um mapa de restrição para o clone de α -amilase obtido pela varredura da biblioteca de cDNA. Estes fragmentos foram então subclonados no vetor pUC18 ou recircularizados e uma alíquota do produto de cada reação de ligação foi usada para transformação de

bactérias *E. coli* competentes e posteriores minipreparações de DNA plasmidial.

4.12. Seqüenciamento.

O seqüenciamento dos fragmentos de DNA clonados foi feito de acordo com o método proposto por SANGER (1977) utilizando ddNTP e marcação das amostras através da incorporação de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP utilizando kit de seqüenciamento (Cycle Sequencing kit; Pharmacia). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% contendo 7M de uréia (BIGGIN e col., 1983), sob potência de 120W e temperatura constante de 50 °C (Sequi-Gen II; Bio-Rad) e reveladas por autorradiografia.

4.13. Eletroforese de RNA e *northern blot*.

Amostras de RNA, 11-25 μg para RNA total e 8,6 μg para mRNA, foram submetidas a eletroforese sob condições dissociante em gel de agarose à 1,5% contendo 2,2 M de formaldeído, segundo SAMBROOK e col. (1989). Foi aplicado também o padrão de pesos moleculares de RNA com fragmentos de 10.000, 6.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500 e 200 bases (RNA marker; Sigma)

Após eletroforese o RNA desnaturado foi transferido para uma membrana de nylon positivamente carregada (HybondN⁺; Amersham) após despurinação do gel com NaOH 50 mM e tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4). A transferência, forçada por vácuo (VacuGeneXL; Pharmacia), foi feita durante 1h 30min com tampão 20X SSC. A fixação permanente do RNA às membranas foi realizada por exposição à 120.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação ultravioleta. As membranas foram coradas com solução de azul de metileno 0,04% em NaAc 0,5M pH5,2 para visualização do rRNA e dos padrões.

Para hibridização com as membranas foram usadas sondas de DNA ou RNA radioativamente marcadas. Para síntese da sonda de DNA foram utilizados oligonucleotídeos degenerados pareados aleatoriamente (*random primers*) com incorporação de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP por extensão das cadeias de DNA (Ready-To-Go DNA Labelling Beads –dCTP; Pharmacia e MegaPrime DNA labelling systems; Amersham). A sonda de RNA complementar foi sintetizada utilizando-se T7 RNA polimerase (Promega) e o promotor T7 localizado na região abaixo (extremidade 3') do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor pBK-CMV, como descrito em SAMBROOK e col. (1989), tendo como agente de marcação [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP. As hibridizações foram realizadas sob três diferentes condições: na presença de formamida (50%) (AUSUBEL e col., 1987), sem formamida (HybondN⁺ positively charged nylon membrane manual; Amersham) e utilizando-se a solução de hibridização "Rapid-hyb buffer" (Amersham), cada qual com as condições de hibridização recomendadas. A marcação foi revelada por autorradiografia com filme previamente sensibilizado (Sensitize Pre-flash unit; Amersham).

4.14. *Southern blot.*

Amostras de 11 μg de DNA genômico extraído de folhas jovens de bananeira (Nucleon PhytoPure; Amersham) foram digeridas com enzimas de restrição como descrito em CLARK (1997). Para testar a eficiência das digestões após 24 horas de incubação, uma alíquota de cada digestão, correspondente à 1 μg de DNA, foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8% à 1 V/cm em tampão TBE. Após 48 ou 72h de incubação, o DNA foi precipitado por adição de 3 volumes de etanol e 0,1 volume de NaAc 3M pH 5,2 e mantido em freezer a -20 °C por 24 horas. As amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 15min, retomadas em 20 μL de TE e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%. A transferência para membrana de nylon (HybondN⁺; Amersham) foi feita por vácuo (VacuGeneXL; Pharmacia) com NaOH 1 M após despurinação com HCl 0,2 M. Após a transferência, a membrana foi lavada em 2X SSC

para neutralizar o NaOH. Sondas de DNA marcadas por incorporação de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (MegaPrime; Amersham), foram incubadas com a membrana em tampão contendo formamida a 50% (AUSUBEL e col., 1997) ou em "Rapid-hyb buffer" (Amersham) sob temperatura e tempo de hibridização adequados. Após a lavagem da membrana com diferentes concentrações de SSC e 0,1% de SDS a marcação foi revelada por autorradiografia.

4.15. Análise computacional.

Através de um conjunto de *softwares* e aplicativos disponíveis na rede *INTERNET* foram realizadas a caracterização e análise filogenética do clone da α -amilase de banana e o estudo das estruturas primária, secundária e terciária da seqüência de aminoácidos deduzida. O conjunto destas ferramentas permitiu avaliar e inferir importantes propriedades da do DNA e da cadeia polipeptídica em estudo.

Os aplicativos FASTA, PILEUP, PRETTY, DISTANCES, GROWTREE, MAP e TRANSLATE integrantes do WISCONSIN-PACKAGE (1997), foram utilizados remotamente através da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia – BioInformática (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br> e <telnet://asparagin.cenargen.embrapa.br>).

5. Resultados e Discussão.

5.1. Clonagem e seqüenciamento a partir do DNA genômico e cDNA.

As folhas jovens da bananeira foram utilizadas para obtenção do DNA genômico por se tratar de um tecido de fácil manuseio e que possibilitou melhores rendimentos nas extrações. Durante os testes com os vários protocolos para extração de DNA genômico das folhas, as dificuldades apareceram principalmente no que diz respeito ao alto conteúdo de compostos polifenólicos e polissacarídicos, contaminantes comuns em extratos de DNA de planta e que podem interferir na análise posterior e na manipulação enzimática do DNA.

Com o objetivo de evitar a oxidação dos fenólicos, 2-ME foi incorporado aos tampões de extração, mantendo o meio no estado reduzido; também foi feito uso de PVP 40.000 para auxiliar a separação dos compostos polifenólicos. Detergentes como SDS e CTAB, na presença de altas concentrações de íons potássio (acima de 1 M) formam sal de potássio que, junto com proteínas e polissacarídeos precipitam em um complexo insolúvel, facilitando a remoção destes contaminantes do meio extrator (AUSUBEL e col., 1997; CLARK, 1997).

O resultado típico para uma boa extração de DNA genômico mostra, em uma eletroforese, banda única com alto peso molecular no topo do gel (figura 3). A presença de bandas com baixo peso ou "rastros" indica contaminação por RNA ou degradação da amostra.

O DNA genômico obtido foi usado como molde em PCR com iniciadores específicos. Foi possível a amplificação de todos os fragmentos esperados para o gene da α -amilase, porém, não com todas as combinações de iniciadores. Os melhores resultados foram obtidos com os pares mostrados na tabela 2, sendo a eletroforese dos produtos de PCR mostrada na figura 4.

Tabela 2: Pares de iniciadores e produtos esperados em PCR a partir do DNA genômico (1) e cDNA (2).

sentido	reverso	pares de bases	clone originado
S1	R5	600	0499-1(1)
S4	R5	420	0499-2(1)
S7	R5	330	0499-3(1) e 0899-1 (2)
S1	R1	270	

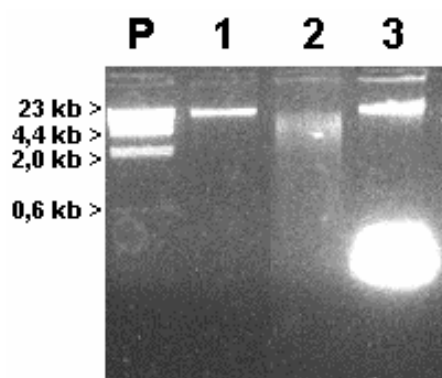
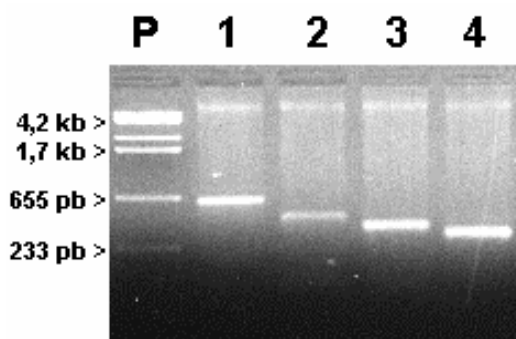
Figura 03: Eletroforese de DNA genômico de banana em gel de agarose. Linha 1: DNA genômico integro, linha 2: DNA genômico degradado, linha 3: DNA genômico contaminado com RNA, P: padrão de pesos λ -HindIII.

Figura 04: Eletroforese dos produtos de PCR com DNA genômico de banana. P: padrão de bandas PTXS, linha 1: S1 x R5, linha 2: S4 x R5, linha 3: S7 x R5, linha 4: S1 x R1.

Tendo obtido resultado positivo nos testes de amplificação, foram feitas reações de PCR preparativas para clonagem. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose e após eletroforese, a banda correspondente ao produto de cada reação foi recortada do gel e o DNA foi eluído, sendo retomado em de 10 μ L de água. Os fragmentos de DNA purificados foram ligados ao vetor pGEM-T em proporção molar de 1:1. Dois microlitros de cada reação de ligação foram usados para transformar bactérias *E. coli* XL1-Blue competentes e após incubação a 37 °C por 1h, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina,

IPTG e X-Gal. Paralelamente foram feitos controles positivo (vetor íntegro) e negativo (sem o vetor) da transformação.

Alternativamente, foram feitas novas reações de amplificação usando como DNA molde os produtos de PCR anteriormente purificados. As reações foram transferidas para colunas S-400 (MicroSpin S-400 HR Columns; Pharmacia) e o DNA foi eluído, sendo este submetido ao reparo das extremidades protuberantes. Os insertos, após precipitação por adição de 3 volumes de etanol e 0,1 volume de NaAc às reações de reparo, foram recuperados em água, estes foram usados em reações de ligação com o vetor pUC18 para subsequente transformação de bactérias *E. coli*.

Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, foram obtidas entre 10 e 20 UFC brancas por placa. A amplificação do DNA plasmidial com iniciadores flanqueadores dos sítios de clonagem mostrou que a maioria dos clones continha um inserto do tamanho esperado para cada transformação, sendo as colônias positivas usadas em minipreparações de DNA plasmidial.

Os clones de 600 pb (clone 0499-1), 420 pb (0499-2) e 330 pb (0499-3) foram seqüenciados usando os iniciadores flanqueadores dos plasmídios (M13 e M13R ou T7 e T3) e também os específicos (S1, S4, S7, R1 e R5). A leitura dos clones resultou em um total de 621 pares de bases (figura 5), correspondente ao maior clone, 0499-1. Alinhamentos feitos através do programa FASTA (WISCONSIN-PACKAGE, 1997) indicaram similaridade de 60-75% entre o clone 0499-1 e as seqüências de ácidos nucléicos usadas no planejamento dos iniciadores, já a seqüência deduzida de 207 aminoácidos mostrou similaridade acima de 70% quando comparada com as demais. Considerando a alta similaridade encontrada, foi possível confirmar a identidade do fragmento clonado como pertencente a um possível exon do gene da α -amilase de banana.

Paralelamente à amplificação e clonagem a partir do DNA genômico foi testado o cDNA com iniciadores oligo(dT)₁₈ ou R5. Em ambos os casos obtiveram-se produtos de PCR para os pares S7 x R5 (330 pb) e S4 x R5 (420 pb).

1 **GCC GAC ATC GTC ATT AAC CAC** CGC TGC GCC GAG CGC AAG GAT GCG AGA GGA ATA TAC TGC
 A D I V I N H → R C A E R K D A R G I Y C

61 ATC TTC GAA GGC GGG ACG AGC GAC AGC CGC CTC GAC TGG GGG CCG CAC ATG ATC TGC AGC
 I F E G G T S D S R L D W G P H M I C S

121 GAC GAC ACG CAG TAC TCC GAT GGA ACC GGA AAC CGC GAC ACC GGC GGT GAC **TTC GGC GCC**
 D D T Q Y S D G T G N R D T G G D F G A

181 **GCG CCC GAC ATC GAC** CAC CTG AAC CAA CAG GTC CAG CAG GAG CTC ACG GAC TGG CTG AAT
 A P D I D H L N Q Q V Q Q E L T D W L N

241 TGG CTC AGG ACT GAT ATC **GGC TTC GAC GGC TGG AGG CTC GAT** ← **TTC GCC AGG GGA TAC TCC**
 W L R T D I G F D G W R L D → F A R G Y S

301 CCG AGC ATC GCG AAA ATC TAC GTG CAA GAC CAT ACC AGC CCC GGC TTC GTG GTT GCA GAG
 P S I A K I Y V Q D H T S P G F V V A E

361 CTG TGG AGC TCT CTG ACT TAT GGC GGC GAC GGG AAG CCC GCC TAC GAC CAA GAT GGT AGC
 L W S S L T Y G G D G K P A Y D Q D G S

421 CGC CAA GAG CTG GTC AAC TGG GTT CAC GAC GTG GGC GGT CCG GCA GCA GCG TTC GAC TTC
 R Q E L V N W V H D V G G P A A A F D F

481 ACC ACC AAG GGT GTA CTG CAA GCT GCG GTG CAA GGT GAG CTG TGG AGG CTG CGG GAT CCC
 T T K G V L Q A A V Q G E L W R L R D P

541 CAA GGC AAG GCG TCG GGG ATG ATA GGG TGG TGG CCG GAA AAG GCG GTC ACA TTC GTC GAC
 Q G K A S G M I G W W P E K A V T F V D

601 ← **AAT CAC GAT ACC GGC TCC ACC**
 N H D T G S T

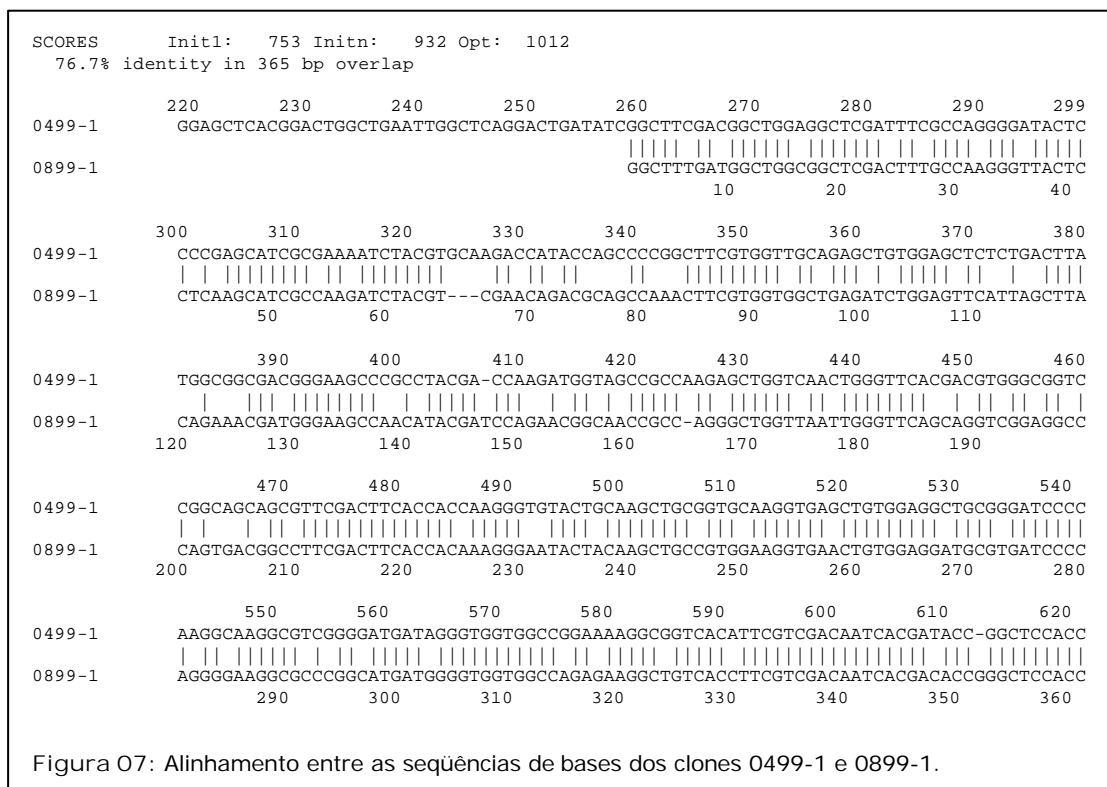
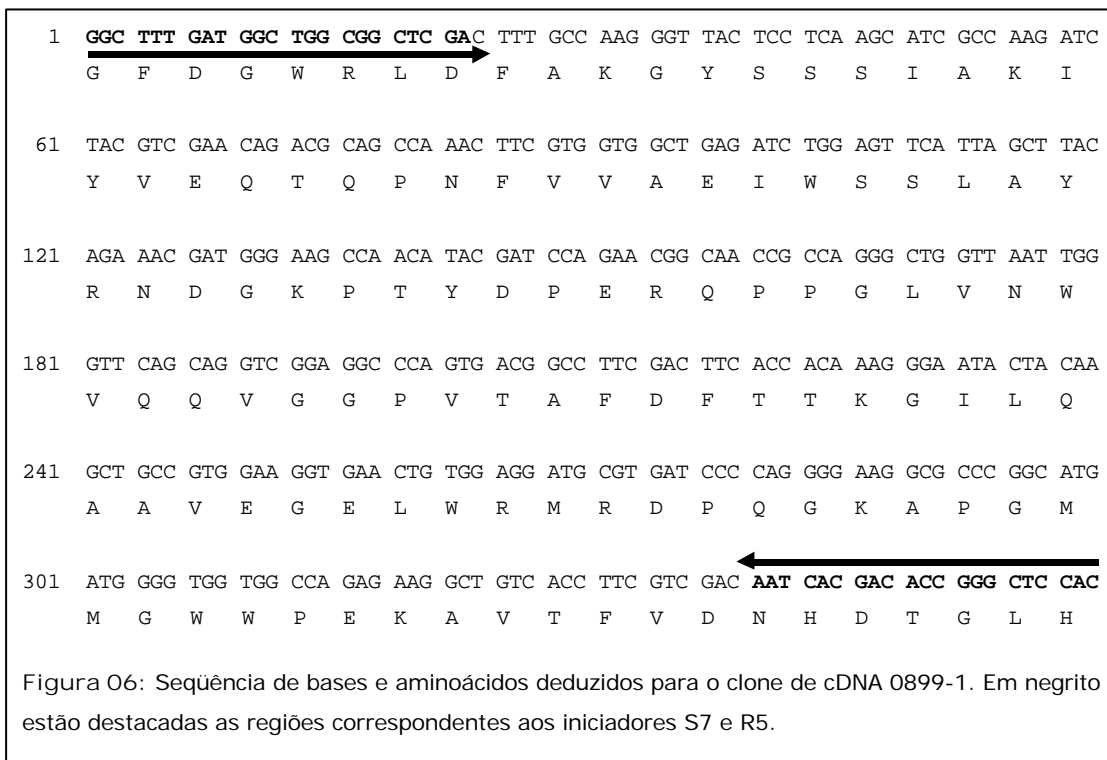
Figura O5: Sequência de bases e aminoácidos deduzidos para o clone genômico 0499-1. Em negrito estão destacadas as regiões correspondentes aos iniciadores S1, S4 e S7 e sublinhadas, R1 e R5 respectivamente.

Os fragmentos amplificados a partir do cDNA com iniciador R5, após purificados do gel de agarose, foram clonados no vetor pGEM-T. A transformação de células de *E. coli* com a reação de ligação forneceu um pequeno número de UFC após 24h de incubação (2 para 420 pb e 8 para 330 pb). Todas as colônias foram testadas por PCR, obtendo-se clones positivos apenas para as ligações com o fragmento de 330 pb. Foi escolhida uma UFC positiva com a qual fez-se "miniprep" dando origem ao clone 0899-1 (330 pb). Este clone foi seqüenciado com os iniciadores T7, T3, S6 e R5, obtendo-se uma leitura final de 360 pares de bases, mostrada na figura 6 juntamente com a dedução dos aminoácidos.

Quando as seqüências dos clones 0499-1 e 0899-1 foram comparadas, estas demonstraram uma similaridade de aproximadamente 75% (figura 7), ressaltando as diferenças entre seqüências obtidas de diferentes materiais. Enquanto o clone genômico não reflete o nível de expressão dos diferentes genes, um clone obtido a partir do cDNA deve estar diretamente relacionado ao gene, ou genes, expresso em um determinado momento da vida da fruta. A semelhança entre os clones 0499-1 e 0899-1 mostra que apesar de as regiões identificadas possuírem uma boa identidade entre si, elas podem corresponder a diferentes genes, a pseudogenes ou a uma família multigênica.

Estudos com cereais durante a germinação de sementes, demonstram o caracter multigênico da α -amilase. SUTLIFF e col. (1991) trabalhando com arroz, propuseram uma família composta por 10 genes que codificam para as várias isoenzimas da α -amilase detectadas em sementes germinadas. Foi observado ainda que, a comparação entre três genes de uma mesma subfamília, não excedia o grau de identidade existente entre cada um dos três genes e os de outros cereais. Comportamento similar foi observado na cevada, que tem ao todo 11 genes descritos (KHURSHEED e ROGERS, 1988) e em células do aleurona de grãos de trigo, com uma família de 5 clones genômicos (HUTTLY e col., 1988). Em bananas, relatos anteriores apontam a existência de três α -amilases expressas nos frutos (GARCIA e LAJOLO, 1988) que podem

ser codificadas por um agrupamento de genes, o que poderia justificar as diferenças entre um clone genômico e outro de cDNA.



5.2. Isolamento e caracterização de um clone da biblioteca de cDNA.

A biblioteca de cDNA contém as informações codificadas no mRNA dos frutos, estas informações, estabilizadas na forma de uma dupla fita de DNA equivalem a segmentos processados do código genético original, podendo ser isoladas e examinadas. O método convencional para examinar uma biblioteca de cDNA utiliza sondas marcadas radioativamente, as quais hibridizam com um fragmento específico, indicando a porção da biblioteca que contém a informação procurada. O método utilizado, modificado de ISRAEL (1993), faz uso de PCR a partir de *pools* de lacunas em uma placa de microtitulação a fim de favorecer o enriquecimento da biblioteca naquele inserto de interesse, não fazendo uso de marcação radioativa.

Os primeiros testes para amplificação por PCR a partir da biblioteca foram realizados com um par de iniciadores específicos. Reações feitas a partir de uma alíquota de cada *pool* de linhas e colunas diretamente com os iniciadores S6 e R5 (330 pb), foram todas positivas (figura 8). Este resultado mostrou-se inespecífico, uma vez que se tratava de uma amplificação a partir da biblioteca ainda não enriquecida, levando a crer que provavelmente havia interferência do DNA genômico da bactéria hospedeira. O esquema de reações mostrado na tabela 3, foi montado com o objetivo de elucidar as dúvidas sobre as reações cruzadas com DNA da bactéria hospedeira. A figura 9 apresenta esquematicamente os produtos de PCR esperados para as combinações de iniciadores descritas na tabela 3.

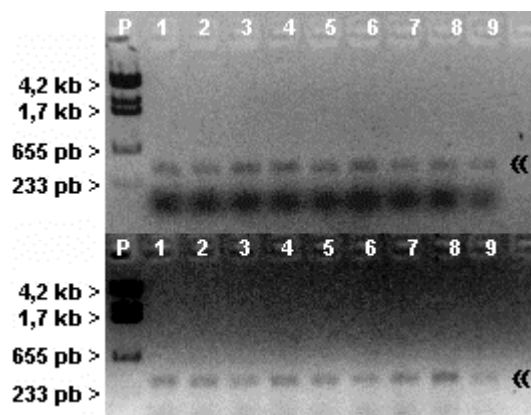
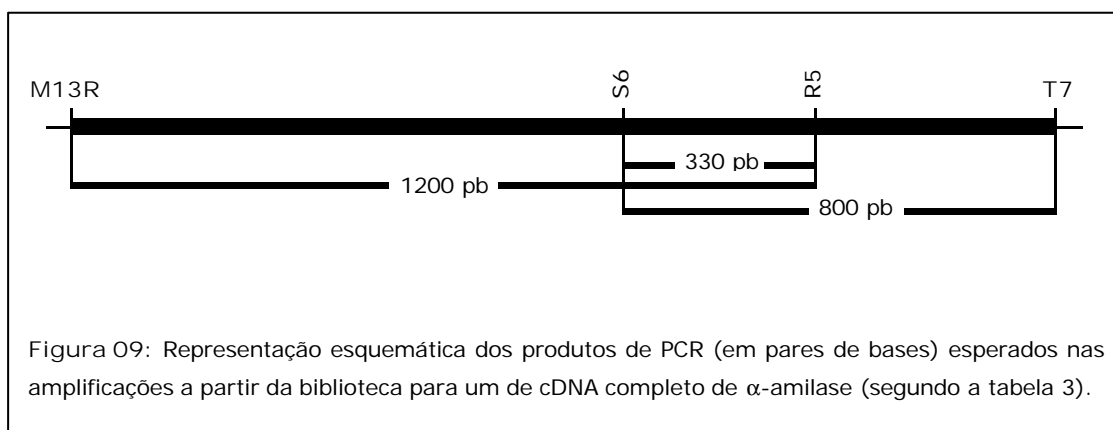


Figura 08: Eletroforese dos produtos de PCR para *pools* de linhas e colunas usado iniciadores S6 e R5. Linhas 1 a 8: *pools* de linhas (metade superior) e de colunas (metade inferior), linha 9: biblioteca, P indica padrão de bandas PTXS. É possível ver em todas as linhas da eletroforese a banda de 330 pb indicada pelas setas.

Tabela 3: Teste de detecção de reação cruzada entre iniciadores para α -amilase e *E. coli*.

Reação	Iniciadores	DNA molde (grupo A)	DNA molde (grupo B)
1	S6 x R5	biblioteca	<i>E. coli</i>
2	M13R x R5	biblioteca	<i>E. coli</i>
3	S6 x T7	biblioteca	<i>E. coli</i>
4	S6 x 0	biblioteca	<i>E. coli</i>
5	0 x R5	biblioteca	<i>E. coli</i>



As reações de PCR com iniciadores S6 x R5 e S6 x T7 produziram amplificação para a células de *E. coli*, mas foram negativas para a biblioteca. Situação contrária ocorreu para o par M13R x R5, cuja PCR foi positiva apenas com a biblioteca, levando a descartar o uso do iniciador S6 (figura 10), pois com este, havia amplificação partindo-se de células de *E. coli* apenas. O uso de iniciadores flanqueadores do sítio de clonagem concomitante com iniciadores específicos teve o objetivo de garantir que apenas seqüência de α -amilases clonadas no vetor fossem amplificadas.

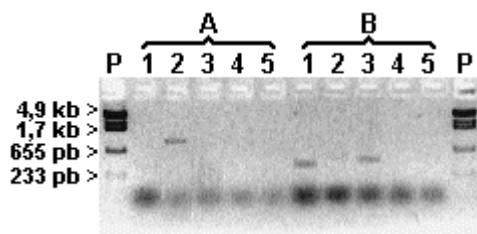


Figura 10: Eletroforese dos produtos de PCR para teste de interferência do DNA genômico de *E. coli*. Grupo A: biblioteca de cDNA, grupo B: *E. coli*. P: padrão λ HindIII. Pares de iniciadores testados: 1: S6 x R5; 2: M13R x R5; 3: S6 x T7; 4: S6 x 0 e 5: 0 x R5.

Durante a varredura em meio líquido optou-se pelo uso de duas etapas subsequentes de PCR, a primeira empregando M13R x R5 contra a biblioteca e a segunda usando uma alíquota da primeira reação de PCR com os iniciadores S1 x R1, aumentando assim, a estringência da varredura. A biblioteca passou por três fases de enriquecimento, como descrito no item 4.10, a primeira e a última são apresentadas na figura 11.

Após a terceira fase, foram selecionadas os *pools* de linhas B e C e de colunas 1, 2 e 8. Diluições das lacunas correspondentes ao cruzamento entre os *pools* (B1, B2, B8, C1, C2 e C8), foram testadas por PCR para identificar a maior diluição com resultado positivo afim de continuar a varredura em meio sólido, todas com resultado positivo na amplificação por PCR (figura 12). Uma alíquota (0,5 μ L) da diluição 10^{-3} de cada lacuna, foi incubada com 200 μ L de células *E. coli* XL1 MFR', misturada a NZY top-ágar e plaqueada em meio NZY-ágar.

Após incubação, as unidades formadoras de placas de lise (PFU) puderam ser identificadas e contadas nas placas montadas a partir das diluições de cada lacuna:

Lacuna de origem	B8	B2	B1	C8	C2	C1
PFU	>100	14	0	8	9	50

A partir de 2 ou 3 PFU de cada placa, foram feitas suspensões dos fagos, dispersando-os em meio SM. Com estas suspensões foi feita PCR utilizando os iniciadores S1 x R1. A partir do resultado deste PCR (figura 13), foi escolhida a PFU 1 da lacuna C8 para dar prosseguimento à varredura.

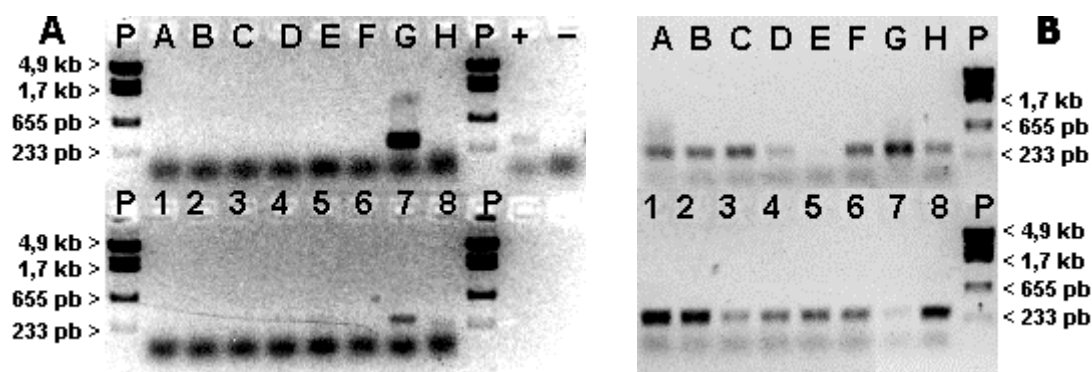


Figura 11: PCR da biblioteca de cDNA, *pools* de linhas: A a H e *pools* de colunas: 1 a 8. P indica o padrão PTXS.

A: Primeira fase do enriquecimento, "+" indica a biblioteca e "-" suspensão de células de *E. coli*. Positivos: *pools* G e 7.

B: Terceira e última fase do enriquecimento, todas as reações foram positivas com diferença na intensidade da banda de 270 pb. Foram selecionados os *pools* B, C, 1, 2 e 8.

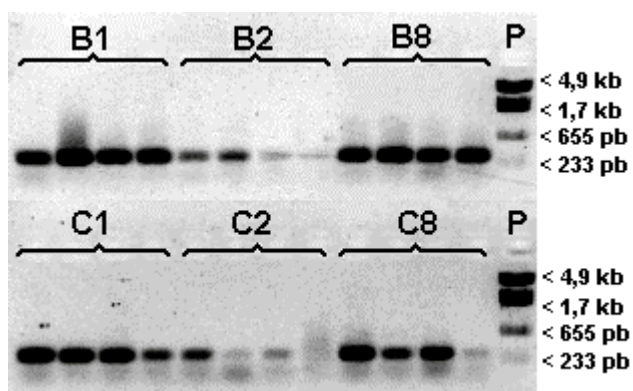


Figura 12: Teste para detecção da maior diluição para lacunas B1, B2, B8, C1, C2 e C8 com resultado positivo. Diluições: 10^0 a 10^{-3} . P indica padrão de pesos moleculares PTXS.

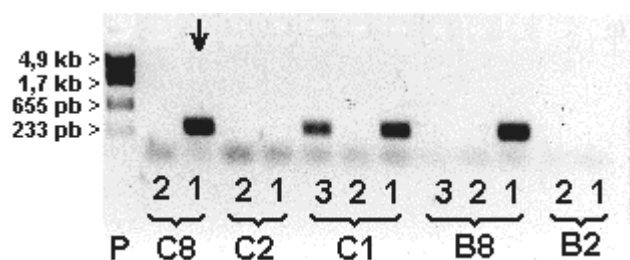


Figura 13: Teste com PFU das diluições 10^{-3} para lacunas C8, C2, C1, B8 e B2. P indica padrão de pesos moleculares PTXS. As corridas positivas apresentam uma banda de 270 pb. A seta indica a PFU escolhida.

Na segunda fase da varredura em meio sólido, foi obtida uma placa com grande número de PFU, destas, 10 foram selecionadas e dispersas em meio SM para teste por PCR, onde todas as 10 PFU testadas deram resultado positivo com praticamente a mesma intensidade (figura 14). Foi selecionada a PFU de número 6 e a partir desta foi feito o estoque de fagos para a excisão *in vivo*.

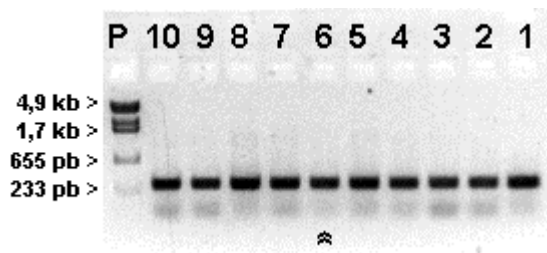


Figura 14: Teste com PFU da segunda fase da varredura em meio sólido. P indica padrão de pesos moleculares PTXS. Todas as corridas positivas. A seta indica a PFU escolhida.

Após a excisão, foram escolhidas 6 colônias de bactérias com as quais inoculou-se 20 μ L de meio LB-canamicina. Após incubação por 1 h estas foram testadas por PCR quanto a presença do inserto da α -amilase. Foi escolhida uma colônia com resultado positivo sendo esta usada para minipreparação de DNA plasmidial.

O clone obtido através da varredura, chamado 1099-1 e que continha o cDNA da α -amilase inserido no vetor pBK-CMV, foi submetido à digestão por endonucleases de restrição a fim de se obterem informações sobre o tamanho do inserto e possíveis sítios internos úteis na produção de subclones. Estas endonucleases foram usadas aos pares ou individualmente e os perfis obtidos em eletroforese após digestão do DNA por 2 horas pode ser visto na figura 15. O tamanho estimado para o inserto foi de aproximadamente 2000 pb (figura 15, linha 1). Este valor sugeriu que a seqüência completa do cDNA da α -amilase deveria estar

contida no inserto clonado, isto porque, na maioria dos clones descritos para plantas, a região que codifica a proteína está entre 1240 e 1340 pb (BENSON e col., 2000; WHEELER e col., 2000).

A confirmação da identidade do inserto no clone 1099-1, foi conseguida após o seqüenciamento parcial e posterior comparação com outras α -amilases através dos programas BLASTN e BLASTP (ALTSCHUL e col., 1997). Para este seqüenciamento inicial, foram usados iniciadores flanqueadores (T7 e M13R) e os específicos S1, S4, S6, R1 e RS2. Para a continuidade do seqüenciamento tornou-se necessária a obtenção de subclones a partir do clone da biblioteca (1099-1). Pois com a metodologia empregada foi possível a leitura de no máximo 300 bases com um único iniciador.

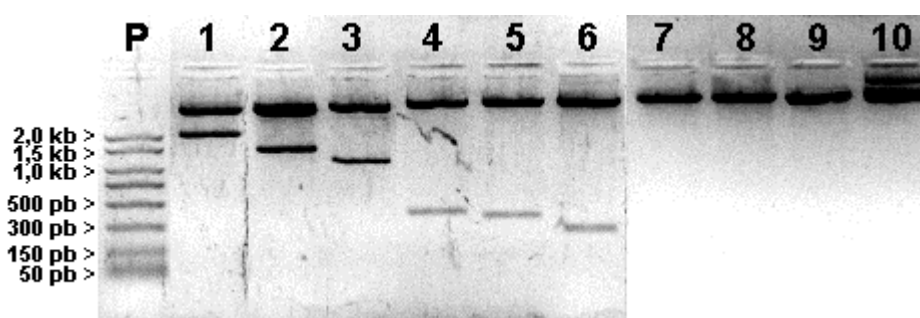


Figura 15: Eletroforese das digestões do clone 1099-1. Linha 1: *SpeI* e *XbaI*; 2: *Sall*; 3: *SacI*; 4: *BamHI*; 5: *PstI*; 6: *XhoI*; 7: *ApaI*; 8: *KpnI*; 9: *XbaI*; 10: clone 1099-1 inteiro. P: padrão de pesos "PCR marker".

Para as subclonagens, foram escolhidas as enzimas *PstI*, *SacI*, *Sall* e *XhoI*, as quais apresentaram sítios de restrição internos ao inserto clonado, de acordo com o perfil das digestões na figura 15 (linhas 2, 3, 5 e 6). As bandas correspondentes aos vetores e aos fragmentos liberados com as digestões foram purificadas do gel de agarose após eletroforese, estes foram ligados ao vetor pUC18 e os vetores linearizados foram recircularizados. O clone 1099-1 e os sete subclones obtidos estão representados nas figuras 16 e 17.

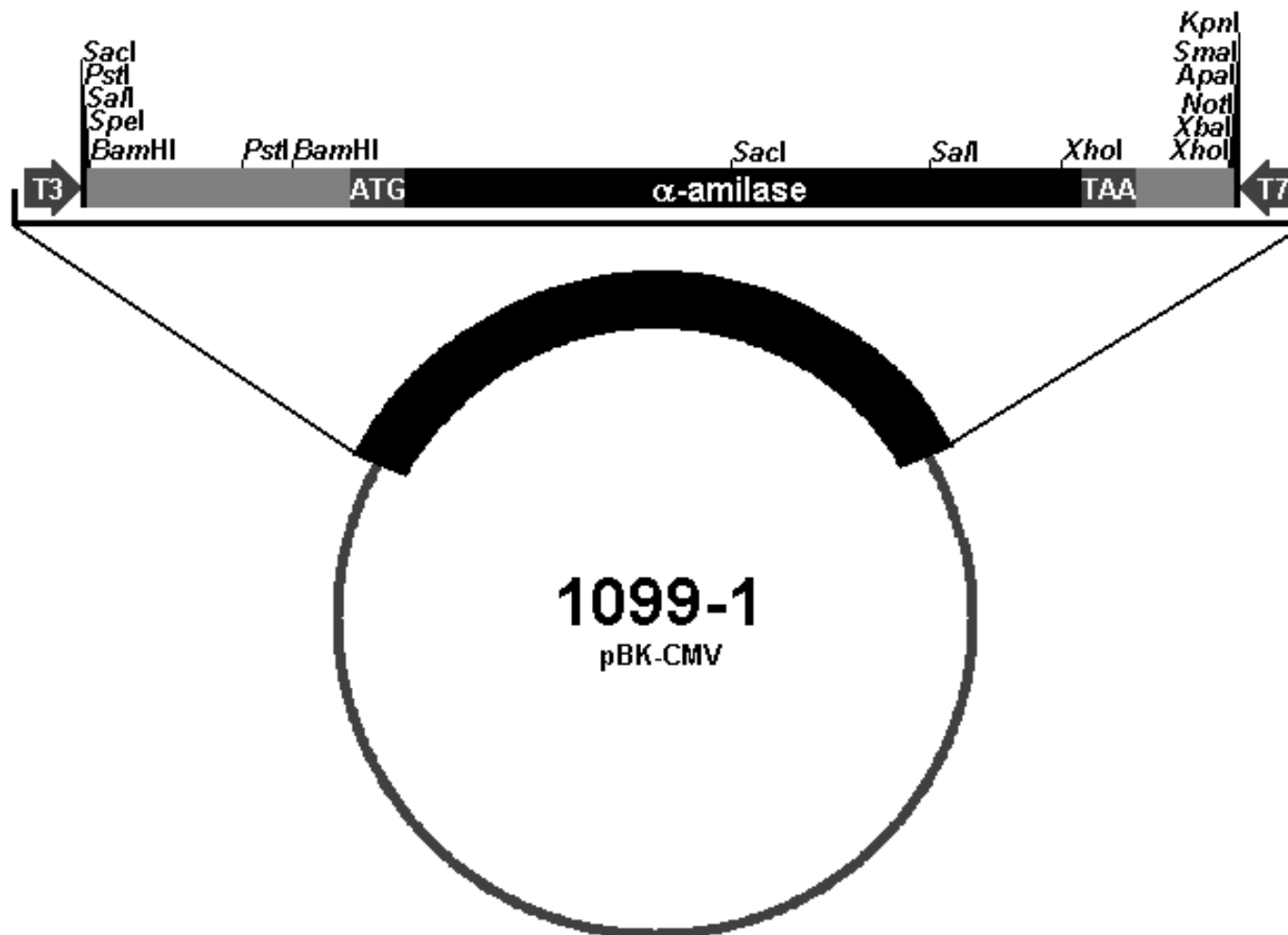


Figura 16: Representação esquemática do clone 1099-1. São mostrados os sítios de restrição do plasmídeo e aqueles identificados no inserto de cDNA. A região que codifica a α -amilase esta delimitada pelos codons inicial (ATG) e terminal (TAA). As regiões de hibridização dos iniciadores flanqueadores T7 e T3 também são mostradas.

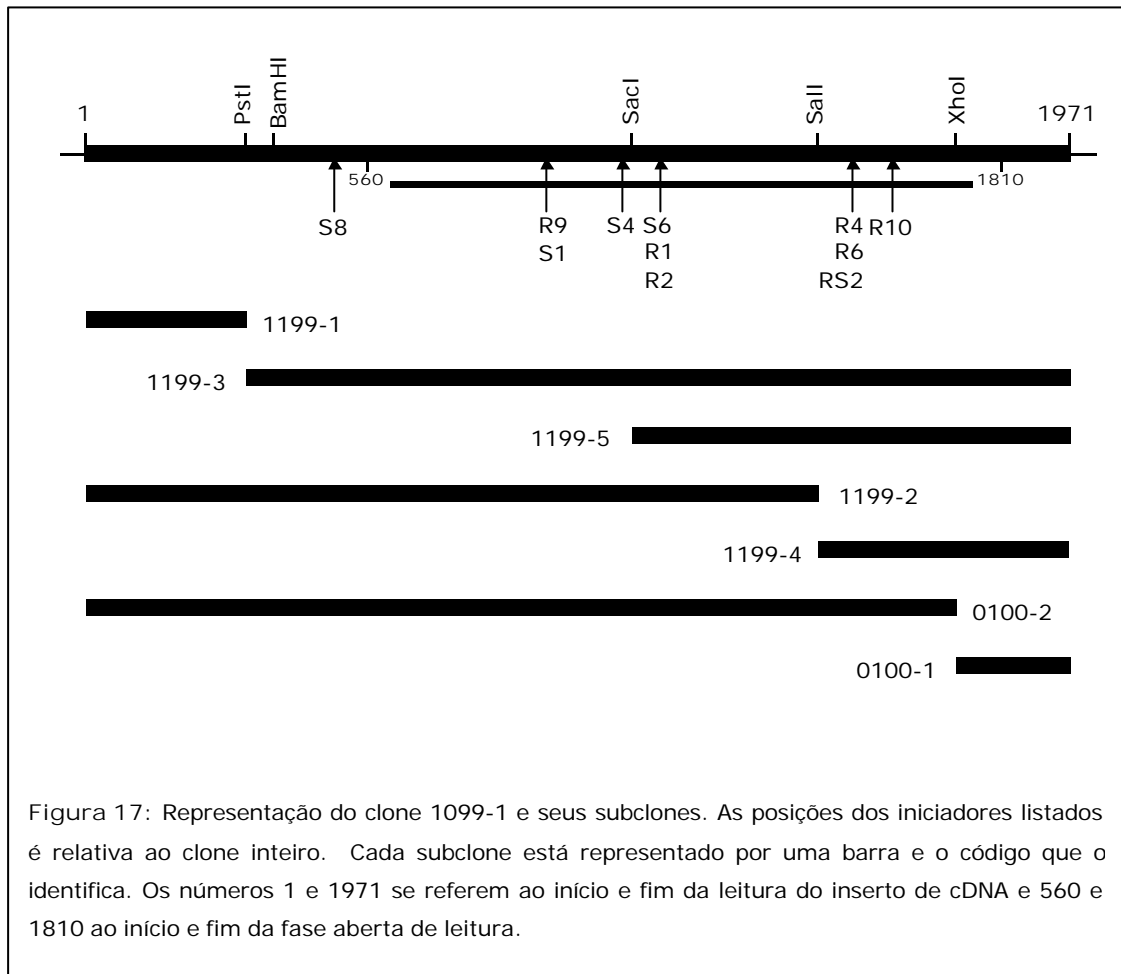


Figura 17: Representação do clone 1099-1 e seus subclones. As posições dos iniciadores listados é relativa ao clone inteiro. Cada subclone está representado por uma barra e o código que o identifica. Os números 1 e 1971 se referem ao início e fim da leitura do inserto de cDNA e 560 e 1810 ao início e fim da fase aberta de leitura.

Todos os subclones foram seqüenciados nas extremidades dos insertos usando iniciadores flanqueadores. O clone 1099-1 foi seqüenciado também com os iniciadores S8, R2, R4, R6, R9 e R10. O diagrama da figura 17 mostra a posição aproximada de hibridização dos iniciadores utilizados no seqüenciamento e compara o clone 1099-1 com seus subclones.

Seguiram-se tentativas de resolução de algumas regiões com leitura confusa, onde as bases apareciam empilhadas devido à compressão em trechos com alto conteúdo C e G. Após várias repetições, algumas regiões permaneceram ainda incertas, mesmo com alterações nos protocolos, substituição dos iniciadores usados no seqüenciamento e leituras da fita complementar. Estas leituras foram resolvidas com base nos resultados experimentais e comparação com seqüências de outras α -amilases, levando-se em consideração a tradução e manutenção da continuidade da fase de leitura. Completado o seqüenciamento, foi obtida uma leitura de 1971 pb para o cDNA da α -amilase de banana.

A figura 18 mostra a seqüência completa de bases do clone obtido a partir da biblioteca de cDNA com a correspondente tradução em aminoácidos.

```

1  tccgacgccgcggcctacgatgcctccgttgccgccatctctcgcgacatcgcaggaaaaagagggccaacaggt
76  ccgaaaaattgaagcagtgcaagctcgatgcaaggcgcgagcagtggtctctcccaagtgaggaacaaggattgcat
151 ggtgacgagcaggggagcgctgccgcctcttctccccctcatggttctcttctaagaagttggatcgcacatc
226 gaaggaggaggaggaggagaagcatcggggttgaggtggagccggatggggttgagttcccacgaaagtgatgaagg
301 ttccccgactcactgcagccacatgaatggatgtgtaacaatagcatcagcagcgaagcagcttcggatcctc
376 ttccagaagcttagcagtgccgaagtggaggaagatatttgcgaggagagaggggaaatatagcgagatccggcg
451 acgacacggacggccaccagcgtcggagaagagaaccgagctagaagttgaggctgcggcgaggagctcttctcct
526 tggggatctgaaagtgaaatcacttggctccttcg   ATG TTT CTG CTT CTG TTT CTT GTC ATT CTG
                                           M   F   L   L   L   F   L   V   I   L
590 AAC TTG GCT CAG TCC CAG ATA CTC TTC CAG GGC TTC AAC TGG GAG TCG TGG AGG CAG
    N   L   A   Q   S   Q   I   L   F   Q   G   F   N   W   E   S   W   R   Q
647 CAA GGC GGC TGG TAT AAC TTC TTG AAA GAC AAA GTC TCT GAT ATA GCC AAC GCT GGA
    Q   G   G   W   Y   N   F   L   K   D   K   V   S   D   I   A   N   A   G
704 GTC ACC CAC GTC TGG CTA CCT CCG CCC TCG CAC TCT GTC GGC GTT CAA GGT TAC ATG
    V   T   H   V   W   L   P   P   P   S   H   S   V   G   V   Q   G   Y   M
761 CCG GGG CGG CTC TAC GAC TTG GGT GCT TCC AAG TAT GGG AAT CAG GAT GAG TTG AAG
    P   G   R   L   Y   D   L   G   A   S   K   Y   G   N   Q   D   E   L   K
818 GCG CTG ATC GGC GCT TTC CAC GAC AAG GGA GTC AAA TGC GTG GCC GAC ATC GTC ATC
    A   L   I   G   A   F   H   D   K   G   V   K   C   V   A   D   I   V   I
875 AAC CAT CGT TGC GCA GAC AAG CAA GAC GGG AGA GGC ATA TGG TGC ATC TTT GAA GGC
    N   H   R   C   A   D   K   Q   D   G   R   G   I   W   C   I   F   E   G
932 GGA ACC GAT GAT GCC CGC CTC GAC TTG GGT CCA CAC ATG ATC TGT AGG GAT GAC ACA
    G   T   D   D   A   R   L   D   W   G   P   H   M   I   C   R   D   D   T
989 CAG TAC TCC GAC GGC ACC GGC AAC CTC GAC ACC GGC GAG GGC TTC GCG GCG GCT CCC
    Q   Y   S   D   G   T   G   N   L   D   T   G   E   G   F   A   A   A   P
1046 GAC ATC GAC CAC CTC AAC ACG CAG GTC CAG CAT GAG CTC ACG GAC TGG TTG AAC TGG
    D   I   D   H   L   N   T   Q   V   Q   H   E   L   T   D   W   L   N   W
1103 CTT AAG ACT GAC ATC GGC TTC GAC GGG TGG AGG CTC GAC TTT GCC AAG GGT TAC TCC
    L   K   T   D   I   G   F   D   G   W   R   L   D   F   A   K   G   Y   S
1160 TCA AGC ATC GCC AAG ATC TAC GTC GAA CAG ACG CAG CCA AAC TTC GTG GTG GCT GAG
    S   S   I   A   K   I   Y   V   E   Q   T   Q   P   N   F   V   V   A   E
1217 ATC TGG AGT TCA TTA GCT TAC AGA AAC GAT GGG AAG CCA ACA TAC GAT CAG AAC GGC
    I   W   S   S   L   A   Y   R   N   D   G   K   P   T   Y   D   Q   N   G
1274 AAC CGC CAG GGG CTG GTT AAT TGG GTT CAG CAG GTC GGA GGC CCA GTG ACG GCC TTC
    N   R   Q   G   L   V   N   W   V   Q   Q   V   G   G   P   V   T   A   F
1331 GAT TTC ACC ACA AAG GGA ATA CTA CAA GCT GCC GTG GAA GGT GAA CTG TGG AGG ATG
    D   F   T   T   K   G   I   L   Q   A   A   V   E   G   E   L   W   R   M
1388 CGT GAT CCC CAG GGG AAG GCG CCC GGC ATG ATG GGG TGG TGG CCA GAG AAG GCT GTC
    R   D   P   Q   G   K   A   P   G   M   M   G   W   W   P   E   K   A   V
1445 ACC TTC GTC GAC AAC CAC GAT ACC GGT TCA ACG CAA AAG TTG TGG CCT TTT CCT TCT
    T   F   V   D   N   H   D   T   G   S   T   Q   K   L   W   P   F   P   S
1502 GAT AAG GTC ATG CAA GGC TAT GCT TAT ATA CTC ACG CAT CCG GGA GTC CCT TCC ATC
    D   K   V   M   Q   G   Y   A   Y   I   L   T   H   P   G   V   P   S   I
1559 TTC TAC GAC CAC ATG TTC GAC TGG GGA TTG AAG GAG AAG ATA ACT CGG TTG GCT AAA
    F   Y   D   H   M   F   D   W   G   L   K   E   K   I   T   R   L   A   K
1616 ACC AGA ACA CGA AAT AGA ATT CAT TCG GGT AGC TCT CTC AAC ATT CTG GCC TCT GAT
    T   R   T   R   N   R   I   H   S   G   S   S   L   N   I   L   A   S   D
1673 GCT GAC CTC TAC ATG GCA ATG ATC GAT GGG AAG ATA TTG ACA AAG CTA GGC TCG AGA
    A   D   L   Y   M   A   M   I   D   G   K   I   L   T   K   L   G   S   R
1730 TAC GAC GTG GGG AAT CTC GTT CCT TCC AAC TTC CAC GTC GTT GCC TCT GGC AAT GAC
    Y   D   V   G   N   L   V   P   S   N   F   H   V   V   A   S   G   N   D
1787 TAC TGC GTG TGG GAG AAG AGA TAA agacgatgatgatgaatcatggaagagacttttcgcttctctt
    Y   C   V   W   E   K   R   *
1854 tcgttaacggtttctcatgtgttgtaagaaaaaatatcgatttcccacatgtacatttattcgtcctgcttgagaa
1929 aagttatagaaatgctattttatat(a)18

```

Figura 18: Sequência completa de nucleotídeos do clone de cDNA da α -amilase de banana. A sequência de aminoácidos predita para a proteína é mostrada abaixo dos códons, o asterisco representa o códon terminador.

5.3. Caracterização da α -amilase de banana.

Comparando-se a tradução obtida para as três fases de leitura possíveis para o cDNA, foi identificada uma fase aberta de leitura (ORF) de 1251 pb, cuja tradução a partir do codon inicial (ATG) codificaria uma proteína de 416 resíduos de aminoácidos. Esta proteína apresentaria peso molecular calculado de 45.080 Da e pI 5,84 (WILKINS e col., 1999).

A seqüência do clone 1099-1 foi comparada com outros clones de várias espécies vegetais (arroz, trigo, cevada, milho, centeio, batata, feijão e maçã) com os programas FASTA, PILEUP e PRETTY (WISCONSIN-PACKAGE, 1997), a similaridade para as seqüências alcançou valores entre 56 e 76%, para nucleotídeos e entre 45 e 80% para aminoácidos. Em um alinhamento comparativo entre a α -amilase de banana e aquelas com as quais se planejaram os iniciadores específicos, é possível notar mais facilmente o nível de similaridade entre as várias seqüências (figura 19).

Uma análise filogenética inicial dos genes da α -amilase nos cereais, família *Poaceae*, indica que eles podem ser separados em duas divisões principais: AmyA e AmyB. A divisão AmyA consiste de duas subfamílias: Amy1 e Amy2, A divisão AmyB contém a subfamília Amy3. Esta classificação é baseada na similaridade de determinadas regiões das seqüências de DNA. Outras abordagens, com base em dados experimentais sugerem diferentes classificações e nomenclaturas. No entanto, estas classificações geraram confusão à medida que novas seqüências de proteínas e genes eram determinadas. Foram propostas, por exemplo, duas classificações baseadas no ponto isoelétrico, nas quais a designação Amy1 e Amy2 eram invertidas (SUTLIFF e col., 1991; HUANG e col., 1992; TERASHIMA e col., 1996). As monocotiledôneas compartilham um ancestral comum com as dicotiledôneas (figura 20), indicando que ambas α -amilases derivam de um único gene progenitor. Após esta divergência, a linhagem das monocotiledôneas sofreu uma expansão, constituindo uma família multigênica com suas três subfamílias: 1, 2 e 3 (HUANG e col., 1992; WEGRZYN e col., 2000).

1	80
M81682	~~~~~md sfsr.sifcl fis.lplfss pal..... .s.k..... .s.knsip.l .n.i..... .q.s.e
X53049	~~~~~a.hlaa mcrcsl.v.v .c.g.q.q s..... .k..... .y.l.r.... .t.a.....
L25805	~~~~~.k.t ss.c.l.v.v .cs.tc.sgg a..... .m.k.q.....
M24287	~~~~~.k.t ss.c.l.v.v .cs.tc.sgg a..... .m.k.q.....
musaamy	~~~~~.mflL LflvilnLAq sQiLFQGFNW ESWrQGGWY NFLkdKvSDI AnAGVTHVWL PPPSHSVgvQ
M17126	~~~~~.a. h....s.f.vsas.s g.....shn.....
M24286	mqvInt.v.. hf...sv.ivs...ta g.....en.....
M17128	~~~.g.ngsl ccf...l...l .a.a.--g h.....
X64619	~~~~~rtg rr..mi...la.--g dki.....r.s.....l.....v.....
M79328	~~~~~.ma.desqq sdp.vvirng keiil.a.d..h.hd--w ln.dt.p..ks.f.ta..vcq.l.e
Consenso	---M-KM-NK --LSL-LLL- LLGL-SNLA- -QVLFQGFNW ESWKQGGWY NFLMGKVDDI AAAGVTHVWL PPPSHSVAPQ
81	160
M81682	~~~~~svfssr nd..f..qqq .t.k.l.d h.i.sv.... .t.n.. s...s.... .s.d.... .sf.kn...
X53049	.l..... .skn.a..e .i.cl..... .t.er..q... .sf.....a
L25805th.. .ta...a ...cv.v.v.....
M24287ta...a ...cv.v.ek. a.v.v... .r.....g.s...
musaamy	GYMPGRLYDL gASKYGNqDE LKaLigAFHD KGVKcVADIV INHRCADkqD GRGIwCIFEG GTdDaRLDWG PHMICRDtDQ
M17126k.qg.l.ai..... .t.eh.....
M24286e.qe..... .qvi..... .t.eh.....
M17128i..... .a..... .g.l.gai.....
X64619r.tsm.s.l.iqai.v.s.....
M79328	.l.qn.s. n....sedl .a.lnkmkq yk.ram.... .vgttqg hg.m.nryd. ---ipms.d e.a.---s
Consenso	GYMPGRLYDL DASKYGN-AE LKSLI-APHG KGVK--ADIV INHRCADYKD GRGIYCIFEG GTPDSRLDWG PHMICRDtDQ
161	240
M81682p.. .l.ep.... .t...k. .s.m.... e-.....f .vr.a.c. t...mrn.s. -d...g.f.n
X53049n.s .egyD.... .q.... .se.m...t e-.....f .v...a.s. s...m.q.k. -d...g.k.s
L25805r.hr... .eg.g..... .t..... .v..... .aav .v.vds.a. -t.v...s
M24287hr... .eg.g..... .t..... .v..... .aav .v.vds.a. -t.v...s
musaamy	YSDGTGNlDT GegFAAAPDI DHLntqVQhE LtDwLNwLkt D-IGFDGWRL DfAKGYSSsI AKIYvEqTqP -nFVVAEiWIs
M17126	.a....p... .g..... .l...k. .ve.....a .-hrl...fa.vdrs.. -.....t
M24286	.g....p... .k.... .ig...d...m .-...a... .a...a.mda... -.....t
M17128a.l... .d....s. .ke.l... .l...a... .r...em .v.d.s. -l...v..
X64619	f.....l... .gv.... .t...l... .ev...a... .r...ev .v....t. vgl...l..
M79328	ctg.r.ks. .dn.ngv.n. .tqsf.rkd .i.m.r.r. -sv..qdf.fasky v.e...a. i-...g.y..
Consenso	YSDGTGN-DT GADFAAAPDI DHLNPRVQRE L-DwLNwLKS D-IGFDGWRL DfAKGYSPDI AKIYIEGTPEP -SFVAEiWD
241	320
M81682q... e....n.n. .g.kna.r .v---.... .q....k. ...p....v l.r....i.
X53049	.is.q... .s.g.aesa.. .i---.... .q....i.. .p....v k.en...i.
L25805	.h.d.n.e. ss....d... .aga... ---aa... .v.... q....mk.gl.e.....
M24287	.s.n.... .aa...gg... .na... ---amt... .l...g. q....g.....l.e.....
musaamy	SLAYrNdGKp tYdQngnRQg LVNwVqVGG ---PvTAFDf TTKGILQAAV EGELWRmRDP qGKAPGMwG WPeKAVTFVD
M17126l...q... .k... -kg.a.t... .nv.....gt d.....a.....
M24286	.m.n.... .d.n.... .r.... .n.ng.... .nv... ..ge d.....a.t...
M17128	nm.t.... .d.....nk... .agmv... .n.....i. q...vm... .a.a....
X64619	.m.....e... .a... .d...r... .t...agmv... .mnt... ..i q...v... .a.....
M79328	tcn.k.sn1- d...s.r. i...i--- .gqls.... .av.e. k.f....s k.p.vl.l .sr...i.
Consenso	SLAYGGDGKp NYNQDAHRQE LVNwVD-VGG AASP-TAFDf TTKGILQAAV EGELwRLRDP NGKAPGMiGW WP-KAVTFVD
321	400
M81682nm i.sv.... .--fmdg. s.is.k. r.c.t.nvq. m.s.s...i.
X53049rl t.s..... .--n.g. k.ss.l. .nek.tvk. m.seg....
L25805ns t.....v. .--n.ge. s.s.v.s. .pg.e.n. l...g....
M24287kl v.....m. .--n.ge. t.a.e.e. .n.g.k.r. vv...a...
musaamy	NHDTGSTQkl WPFPSDKVMQ GyAYILTHPG vPsIFyDHmF Dw--GLKEKi trLaktRtrn rIHsgSSLnI lAsDADLYmA
M17126hmt.....e. dr..sv.t.hne.k.q. ie.....l.
M24286hl n..... .--e. er.s.n.qpa.e.r. me.s...l.
M17128am i..... n.--f.dq.k. .t.t.a.k. lmheg.a...
X64619qm n..... .--n.g.v.q. .vt.t...k. mlh...a...
M79328ah i.sv.f...y e.dnsmhdq. vk.i...rnqsr..ir. le.qpn..a.
Consenso	NHDTGSTQ-- WPFPSDKVMQ GyAYILTHPG -PCIFyDHf Dw--GLKE-I AALVAIR-RN GIHA-SSL-I -AADADLYVA
401	459
M81682	m.hh.i.... .pkl.l.... .pnye.ts. q.....qka *~~~~~
X53049	k.n.im... .pkm.l.... .nl...ts. q.....*~ ~~~~~
L25805	k.d.... .s..... .d.av... .n.c...h.h* ~~~~~
M24287	vv.e.m... .t....av .d.qtv... k.s....gsl* ~~~~~
musaamy	mIDGkiltKl GsRYDVGNLlv PsnFHVvAsG NDYcVWEKr* ~~~~~
M17126l .p..... .g.k.... .q...* ~~~~~
M24286t... .p....eh... .e...q.v... dg..i...* ~~~~~
M17128v... .s....av. .a.vts...n. aaatlq.s*~ ~~~~~
X64619vm... .s....ss.. .p.--hlp wp.....tp ppp.pppia plpahrsd* ~~~~~
M79328	t.e.s... .d--gswspa gkewtl.ts. hr....q.*~ ~~~~~
Consenso	EIDGKIVIKI G-RYDVGNLI PSGFHVAAG NDYAVWEKIG LRPVAGRH-- ~~~~~

Figura 19: Alinhamento das seqüências de aminoácidos. Banana (musaamy), milho (Genbank: L25805), cevada (M17128 e M17126), arroz (M24287, X64619 e M24286), feijão mungo (X53049) e batata (M81682 e M79328). Os pontos e as letras maiúsculas representam resíduos idênticos em relação ao consenso enquanto letras minúsculas as substituições relativas ao consenso.

```

Cellular organisms [root]: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta;
Charophyta/Embryophyta group; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta;
Spermatophyta

[root] .....
. Magnoliophyta .....
. . Liliopsida .....
. . . Commelinidae .....
. . . . Musa spp ..... [Zingiberales; Musaceae; Musa]
. . . . Poaceae ..... [Poales]
. . . . . Oryza sativa ..... [Ehrhartoideae; Oryzeae; Oryza]
. . . . . Andropogoneae ..... [PACC clade; Panicoideae]
. . . . . Zea mays ..... [Zea]
. . . . . Triticeae ..... [Pooideae]
. . . . . Triticum aestivum ..... [Triticum]
. . . . . Hordeum vulgare ..... [Hordeum]
. . core eudicots ..... [eudicotyledons]
. . . Rosidae .....
. . . . eurosids I .....
. . . . . Papilionoideae ..... [Fabales; Fabaceae]
. . . . . Vigna .....
. . . . . Vigna mungo .....
. . . . . Malus x domestica ..... [Rosales; Rosaceae; Malus]
. . . Solanales ..... [Asteridae; euasterids I]
. . . . Solanum tuberosum ..... [Solanaceae; Solanum]

```

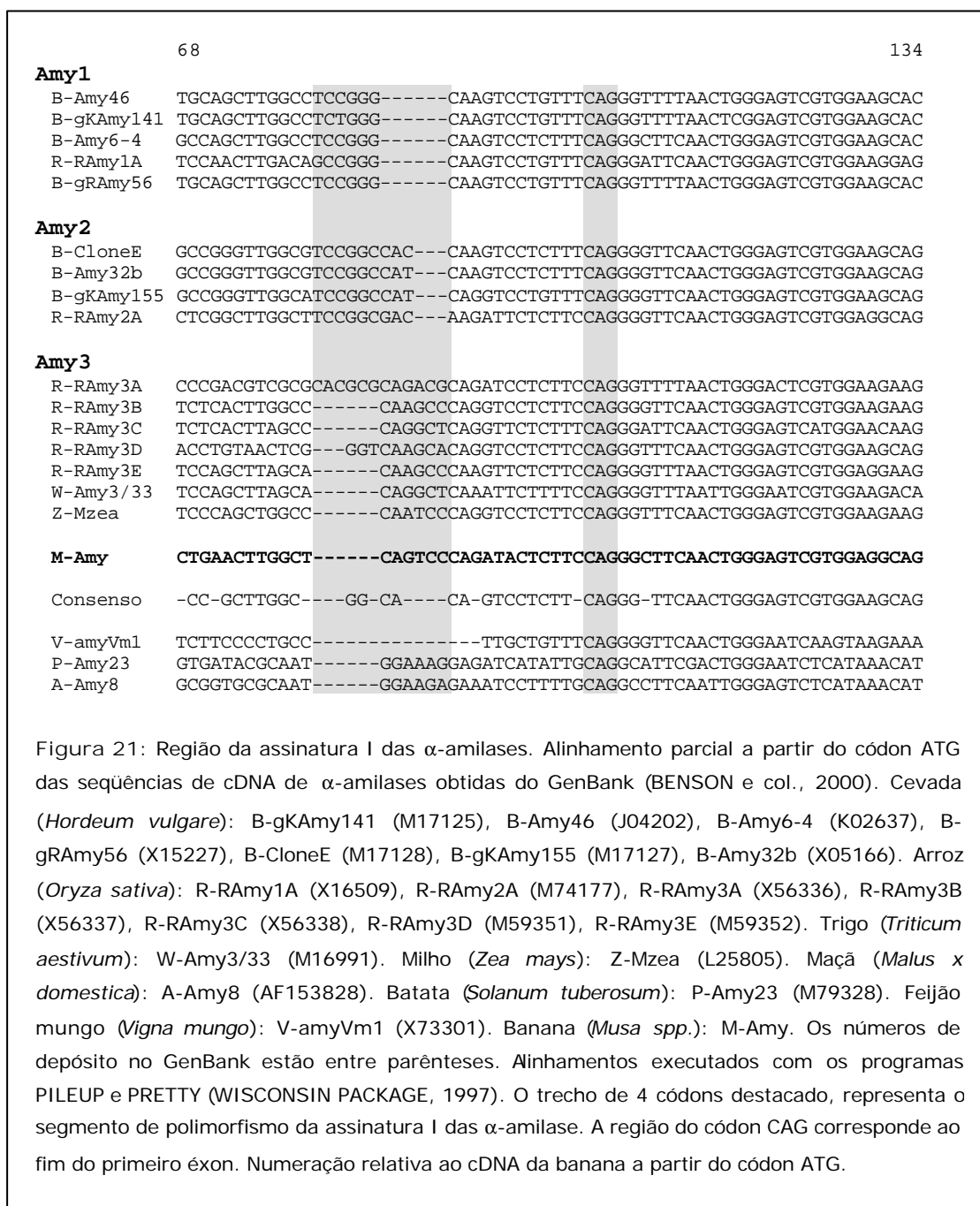
Figura 20: Taxonomia obtida a partir do programa Tax BLAST Report (WHEELER e col., 2000). Estão descritas as espécies analisadas nas figuras 20, 21 e 22.

A determinação da estrutura filogenética entre cereais foi realizada utilizando-se as assinaturas do DNA, que são regiões de polimorfismo caracterizadas por pequenas e localizadas inserções no alinhamento entre vários genes. Uma vez que a banana está inserida na mesma subclasse onde se encontram os cereais (Commelinidae) este padrão de classificação pode ser utilizado, uma vez que inserções no DNA são consideradas eventos raros, genes que compartilham o mesmo padrão de inserção podem ser classificados no mesmo grupo (SMITH e col., 1981).

Foram identificadas duas assinaturas para as α -amilases. A primeira delas, assinatura I (figura 21), está localizada em torno da junção entre o peptídeo sinal e a proteína madura, onde também estão localizadas as regiões antes e depois do sítio de *splicing* do primeiro íntron (HUANG e col., 1990 e 1992; YAMAUCHI e col., 1994). Com base nas diferenças nesta primeira região, as α -amilases foram organizadas em três grupos, consistentes com as três subfamílias: Amy1, Amy2 e Amy3.

As assinaturas têm as seguintes características:

subfamília	Amy1	Amy2	Amy3
assinatura I	TCC GGG --- ---	TCC GGC CAT ---	--- --- CAR GCN



A assinatura II (figura 22), está em uma região altamente conservada. Baseado no polimorfismo encontrado nas seqüências, pode-se distinguir duas divisões: uma sem inserções (AmyB) e outra com 6 pb ou 9 pb inseridos (AmyA). A divisão AmyA agrega duas subfamílias separadas de acordo com o polimorfismo da assinatura I: Amy1 e Amy2. A subfamília Amy1 contém os genes com 6pb inseridos, exceto por um deles, RAm1A, com inserção de 9pb, enquanto na subfamília Amy2 estão distribuídos genes com 9pb inseridos na região considerada polimórfica (figuras 21 e 22) (HUANG e col., 1992).

Como pode ser visto nas duas assinaturas foram incluídas algumas dicotiledôneas, as quais, apesar de manterem algum padrão com os agrupamentos, contém seqüências diversas do consenso entre as monocotiledôneas. Assim, pode-se afirmar que esta sistemática de classificação não encontra boa adesão para as dicotiledôneas.

HUANG e col. (1990) e YAMAUCHI e col. (1994) observaram que enquanto o comprimento dos íntrons varia entre os genes das α -amilases de plantas, as seqüências de DNA que os flanqueiam são altamente conservadas e os três resíduos de aminoácidos, antes e depois dos sítios de *splicing* codificados por estes trechos flanqueadores, são praticamente idênticos (tabela 4), mostrando-se conservados também na banana.

Tabela 4: Comparação dos sítios de *splicing* dos íntrons entre α -amilases de cereais e banana. A ausência do correspondente íntron 2 é representada por "---". O resíduos para a banana fornecem apenas uma comparação, já que ainda não existem informações sobre o seu gene.

Gene	Subfamília	Aminoácidos antes e depois do sítio de <i>splicing</i> do íntron					
		Fim do exon 1	Início do exon 2	Fim do exon 2	Início do exon 3	Fim do exon 3	Início do exon 4
B-gRAmy56	1	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
B-gKAmy141	1	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
B-Amy46	1	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
B-Amy6-4	1	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
R-RAmy1A	1	LFQ	GFN	EQG	YMP	PCI	FYD
B-Amy32b	2	LFQ	GFN	NEG	YMP	PCI	FYD
B-gKAmy155	2	LFQ	GFN	GEG	YMP	PCI	FYD
R-RAmy2A	2	LFQ	GFN	TQG	YMP	PCI	FYD
R-RAmy3A	3	LFQ	GFN	PQG	YMP	PCI	FYD
R-RAmy3D	3	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
R-RAmy3B	3	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
R-RAmy3C	3	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
R-RAmy3E	3	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
W-Amy3/33	3	LFQ	GFN	---	---	PCI	FYD
M-Amy	banana	LFQ	GFN	VOG	YMP	PSI	FYD

775

879

AmyA			
Amy1	B-Amy46	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGAACAAGGTGGGCGGCTCCGGC	---CCCGCCACCACGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCAACGTGGCCGTGGAGGGC
	B-gKAmy141	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGAACAAGGTGGGCGGCTCCGGC	---CCCGCCACCACGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCAACGTGGCCGTGGAGGGC
	B-Amy6-4	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGGACAAGGTGGGCGCAAAGGG	---CCCCTACCACGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCAACGTGGCCGTGGAGGGC
	B-gRAmy56	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGAACAAGGTGGGCGGCTCCGGC	---CCCGCCACCACGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCAACGTGGCCGTGGAGGGC
	R-RAmy1A	CGGCAGGAGCTGGTCAAC TGGGTTCGATCGTGTCCGGCGGCCAACAGCAACGGCACGGCGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCAACGTGCGCCGTGGAGGGC	
Amy2	B-CloneE	CGGCAGAATCTGGTGAAC TGGGTGGACAAGGTGGGCGGCGCGGCCCTCGGCAGGCATGGTGTTCGACTTCACGACCAAGGGATTCTGAACGCTGCCGTGGAGGGC	
	B-Amy32b	CGGCAGAATCTGGTGAAC TGGGTGGACAAGGTTCGGCGGCGCGGCATCGGCTGGCATGGTGTTCGACTTCACGACCAAGGGGATATTGAACGCGCCGTGGAGGGC	
	B-gKAmy155	CGGCAGAATCTGGTGAAC TGGGTGGACAAGGTGGGCGGCGCGGCCCTCGGCTGGCATGGTGTTCGACTTCACGACCAAGGGGATTCTGAACGCTGCCGTGGAGGGC	
	R-RAmy2A	CGGCAGGCGTTGGTGGAC TGGGTGGACAGGGTGGGTGGGACGGCGTCGGCGGGGATGGTGTTCGACTTCACGACCAAGGGGATCATGAACACGGCCGTGGAGGGC	
AmyB			
Amy3	R-RAmy3A	CGGCAGGAGCTCGTGAAC TGGGTGAAGCAGGTTGGCGGC	-----CCGGCGACGGCGTTTCGACTTCACGACCAAGGGCATCCTGCAGTCGGCCGTGCAGGGC
	R-RAmy3B	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGCGCAGGCCCTCGGTGGC	-----CCTGCGTCAGCGTTTCGACTTCACGACCAAGGGCGAGCTGCAGGCGGCCGTGCAGGGT
	R-RAmy3C	CGGCAGGAGTTGGTGAAC TGGGCGCAGGCCCTCGGTGGC	-----CCTGCATCGGCGTTTCGACTTCACGACCAAGGGCGAGCTGCAGGCAGCCGTGCAGGGT
	R-RAmy3D	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGAACGCCCTCGGCGGG	-----CCGGCGATGACGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCCTCCTGCAGGCGGGCGTCCAGGGC
	R-RAmy3E	AGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTGGAGGGCGTCGGCAAG	-----CCGGCGACGGCGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCATCCTCCAGGCCGCGTGCAGGGC
	W-Amy3/33	CGACAGCTGCTCGCGAAC TGGGTGCGGGGCGTCGGCGGG	-----CCGGCCACGGCGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCGTTCCTCCAGGAGGCCGTCCAGGGC
	Z-Mzea	AGGCAGGAGCTGGTCAAC TGGGCGCAGGCCGTGGGCGGC	-----CCCGCCGCGCGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCGTGCTGCAGGCGGCCGTCCAGGGC
M-Amy	CGCCAGGGGCTGGTTAATTGGTTTCAGCAGGTCGGAGGC	-----CCAGTGACGGCCTTCGATTTACCACAAAGGGAATACTACAAGCTGCGGTGGAAGGT	
Consenso	CGGCAGGAGCTGGTGAAC TGGGTG-A---GGT-GGCGGC	-----CC-GC-ACGGCGTTTCGACTTCACCACCAAGGGCAT-CT--A-GCGGCCGTGGAGGGC	
V-amyVm1	CGTGGGGCACTGGTGAAT TGGGTGAATCTGCAGGTGGA	-----GCTATTACTGCATTTGATTTTACAACAAAAGGAATTCTTCAGGCTGCTGTGCAAGGA	
A-Amy8	AGACAGCCGATAGTAAAT TGGATCAATGGCACAGGACAG	-----CTATCAACTGCGTTTGACTTTTACAACCAAGGGAATTCTTCAGGAAGCCGTAAAGGA	
P-Amy23	AGGCAAGAATCATCAAT TGGATTGATGGCGCGGGACAA	-----CTTTCAACTGCATTCGATTTTACAACAAAAGCAGTCCTTCAGGAAGCAGTCAAAGGA	

Figura 22: Região da assinatura II das α -amilases, em destaque as seqüência de polimorfismo. Alinhamento parcial a partir do códon ATG das seqüências de cDNA de α -amilases. Os alinhamentos foram obtidos com os programas PILEUP e PRETTY (WISCONSIN PACKAGE, 1997). Cevada (*Hordeum vulgare*): B-gKAmy141 (M17125), B-Amy46 (J04202), B-Amy6-4 (K02637), B-gRAmy56 (X15227), B-CloneE (M17128), B-gKAmy155 (M17127), B-Amy32b (X05166). Arroz (*Oryza sativa*): R-RAmy1A (X16509), R-RAmy2A (M74177), R-RAmy3A (X56336), R-RAmy3B (X56337), R-RAmy3C (X56338), R-RAmy3D (M59351), R-RAmy3E (M59352). Trigo (*Triticum aestivum*): W-Amy3/33 (M16991). Milho (*Zea mays*): Z-Mzea (L25805). Maçã (*Malus x domestica*): A-Amy8 (AF153828). Batata (*Solanum tuberosum*): P-Amy23 (M79328). Feijão mungo (*Vigna mungo*): V-amyVm1 (X73301). Banana (*Musa spp.*): M-Amy. Numeração relativa ao cDNA da banana a partir do códon ATG.

A árvore filogenética (figura 23), relacionando as proteínas codificadas pelas seqüências de DNA utilizadas na distinção das assinaturas, aponta as interações e divergências entre os membros da família das α -amilases. Ela confirma a distribuição de divisões e subfamílias apresentadas nas figuras 21 e 22 e a relação entre genes e proteínas de dicotiledôneas e monocotiledôneas.

Os genes da subfamília Amy2 têm todos 3 íntrons, enquanto nas duas outras subfamílias, Amy1 e Amy3, há predominância de genes com dois íntrons apenas. HUANG e col. (1990) e SUTLIFF e col. (1991) propuseram separadamente uma mesma teoria que explica a evolução dos genes da α -amilase e a separação em subfamílias. Assumindo um gene ancestral com três íntrons e quatro éxons, uma duplicação teria produzido as divisões AmyA e AmyB e durante a evolução multigênica uma linhagem (predominantemente AmyB) teria perdido o íntron do meio, teoria suportada também por BAULCOMBE e col. (1987).

Comparando-se os resultados das figuras 21, 22 e 23, pode-se dizer que o clone de α -amilase de banana isolado, pertence à divisão AmyB e à subfamília Amy3. Estas informações podem auxiliar na comparação entre as seqüências de bases e comportamento do gene dentro da sua subfamília, como por exemplo a presença de dois ou tres íntrons ou mesmo o seu padrão de expressão na fruta de acordo com a linha evolutiva do gene.

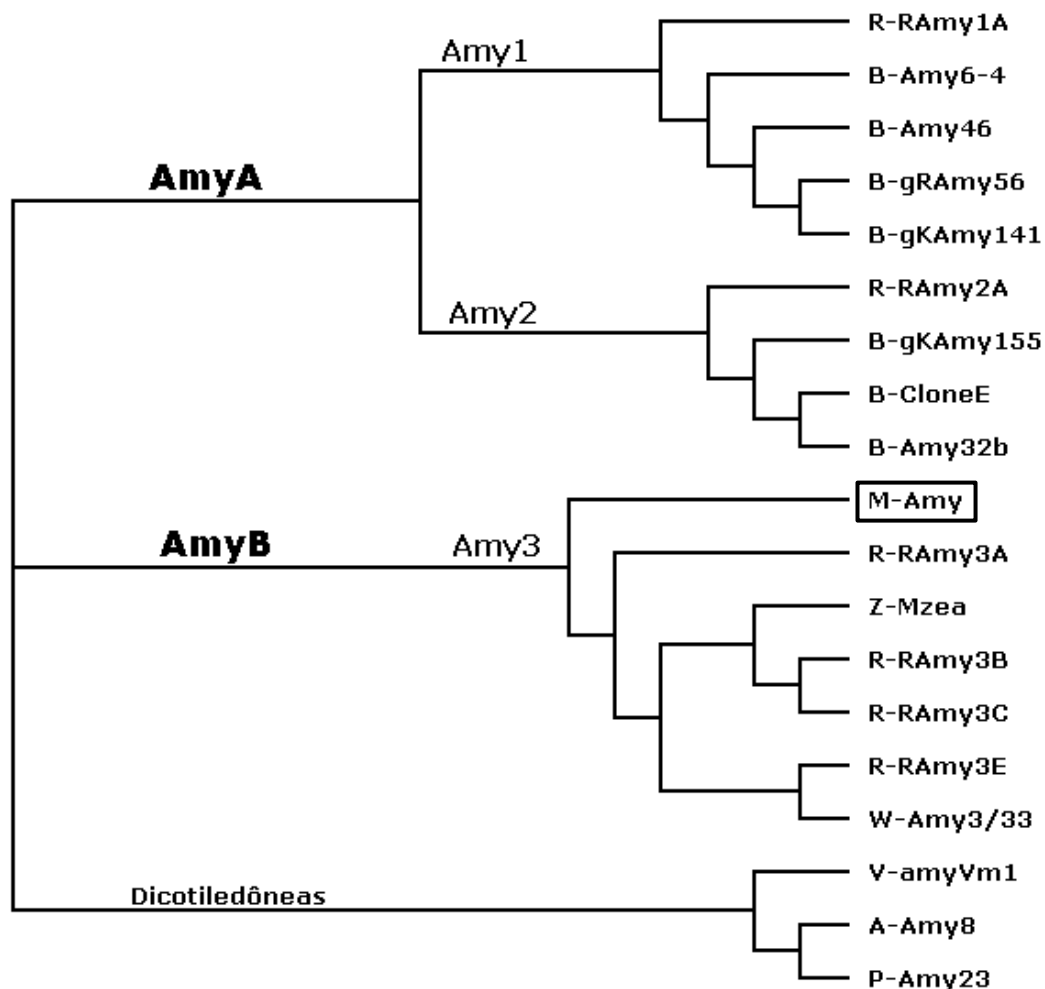


Figura 23: Cladograma das α -amilases descritas na figura 21 e 22 gerado com o programa ClustalX (THOMPSON e col., 1997) e visualizado com TreeView (Win32 version 1.6.1; PAGE, 1996). Cevada (*Hordeum vulgare*): B-gKAmy141 (M17125), B-Amy46 (J04202), B-Amy6-4 (K02637), B-gRAmy56 (X15227), B-CloneE (M17128), B-gKAmy155 (M17127), B-Amy32b (X05166). Arroz (*Oryza sativa*): R-RAmy1A (X16509), R-RAmy2A (M74177), R-RAmy3A (X56336), R-RAmy3B (X56337), R-RAmy3C (X56338), R-RAmy3D (M59351), R-RAmy3E (M59352). Trigo (*Triticum aestivum*): W-Amy3/33 (M16991). Milho (*Zea mays*): Z-Mzea (L25805). Maçã (*Malus x domestica*): A-Amy8 (AF153828). Batata (*Solanum tuberosum*): P-Amy23 (M79328). Feijão mungo (*Vigna mungo*): V-amylVm1 (X73301). Banana (*Musa spp.*): M-Amy.

Baseado em propriedades físico-químicas e sorológicas das proteínas, MITSUI e col. (1996) reclassificaram 10 isoformas da α -amilase do arroz com diferentes valores de pI, temperaturas ótimas e pesos moleculares, identificando também seus correspondentes genes (figura 24). Suas análises indicaram ainda que dois dos três genes estudados codificavam cada um, duas isoformas distintas e três grupos demonstram possuir domínios nos sítios ativos imunologicamente distintos. Estes resultados sugerem que algumas das isoformas podem ter sido formadas por modificações pós-tradução da proteína.

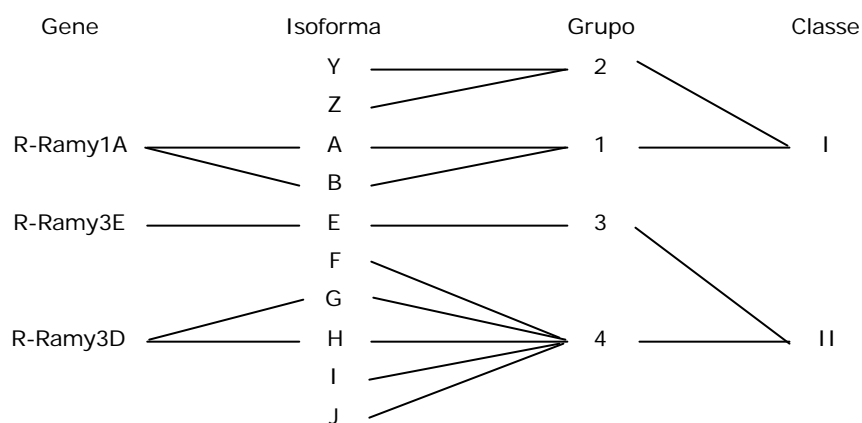


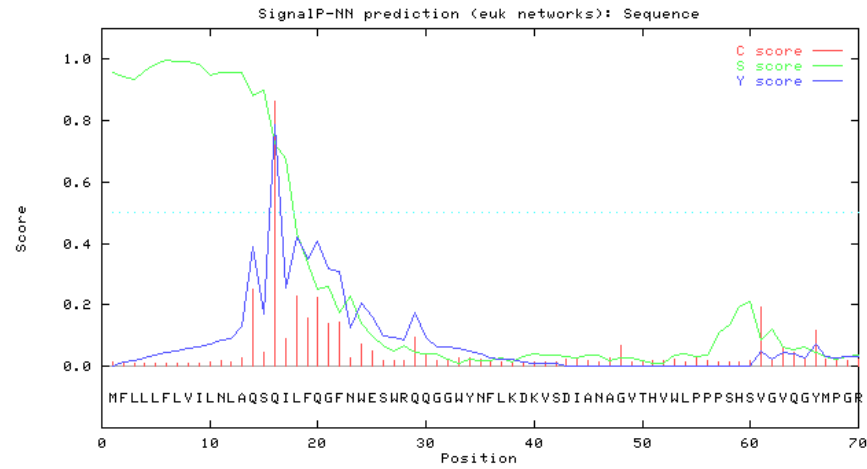
Figura 24: Classificação das isoformas da α -amilase expressas em células de arroz cultivadas em suspensão segundo MITSUI e col. (1996).

A estrutura primária da α -amilase de banana (seqüência de aminoácidos deduzida), apresentou, como possível região de modificação pós-tradução, uma seqüência de 15 resíduos, identificada como peptídeo sinal (NIELSEN e col., 1999). O método utilizado, SignalP V2.0.b2 (NIELSEN e col., 1997), avalia através de dois modelos, SignalP-NN (baseado em "neural networks") e SignalP-HMM (baseado em "hidden Markov models") a presença e localização do sítio clivagem na seqüência de aminoácidos. O sítio de clivagem está localizado entre os resíduos 15 e 16 (AQS⇌QI) do peptídeo traduzido, sendo o conjunto de resultados representados nas figuras 25-A e 25-B.

Fazendo uma comparação com o que acontece com uma semente de cereal durante a germinação, onde a α -amilase sintetizada nas células

da camada de aleurona é transportada para dentro do endosperma, a presença de um peptídeo sinal na α -amilase de banana sugere um comportamento semelhante, sendo a enzima direcionada, após sua síntese no citoplasma, para o interior do amiloplasto.

A



SignalP-NN

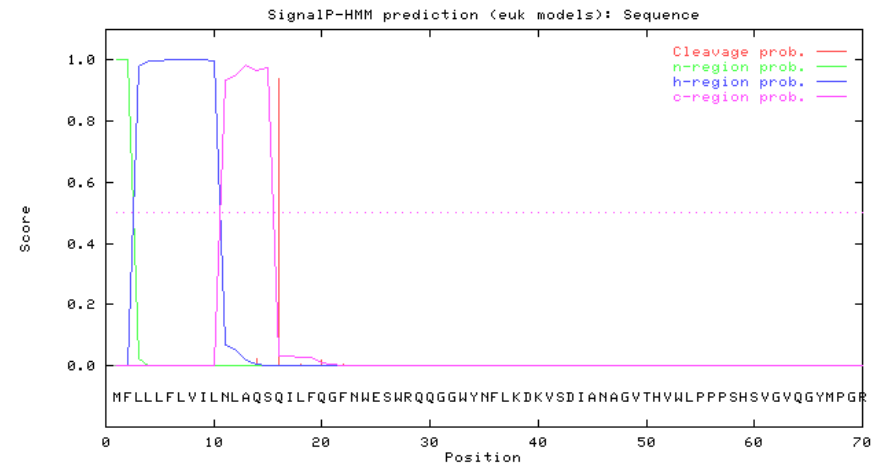
C-score: valores altos são obtidos imediatamente após o sítio de clivagem.

S-score: assume valores altos para todas as posições antes da clivagem.

Y-score: sumariza a presença do peptídeo sinal, pela combinação de uma alto valor para o C-score com o declive nos valores do S-score.

Figura 25: Resultados da predição de sitio de clivagem para o peptídeo sinal.

B



SignalP-HMM

Prediz a presença do peptídeo sinal através da posição do sítio de clivagem e faz uma aproximação sob as atribuições das regiões n-terminal, c-terminal e hidrofóbica do peptídeo sinal.

As α -amilases de diversas origens estão agrupadas em uma grande família de hidrolases do amido, que contém em suas seqüências de aminoácidos regiões bem definidas e que são altamente conservadas (JANEÈEK e BALÁŽ, 1992; JANEÈEK, 1993 e 1997; JANEÈEK e ŠEVÈÍK, 1999).

Comparando-se as estruturas primárias de α -amilases de diferentes origens, verifica-se a existência de regiões altamente conservadas (figura 26). Estas regiões se caracterizam por conter aminoácidos essenciais para o funcionamento da enzima, estando envolvidas com a ligação do substrato, como um resíduo de ácido glutâmico e dois resíduos de ácido aspártico, ou de cálcio e a formação do centro ativo (MACGREGOR e col., 2001). JANEÈEK (1997) descreve sete regiões conservadas nos membros pertencentes à família das α -amilases, onde estão localizados os três resíduos propostos como catalíticos. Em cereais temos adicionalmente mais uma região de consenso, não identificada em α -amilases de animais, bactérias e fúngicas (O'NEIL e col., 1990).

A estrutura secundária (folhas β pregueadas, α -hélices e alças) guarda três domínios comuns em α -amilases, onde estão dispostos os aminoácidos catalíticos, de ligação do substrato e de ligação com cálcio. Tais motivos são amplamente conservados na família das α -amilase (JANEÈEK, 1997). A presença destes domínios foi demonstrada na α -amilase de banana pela predição da estrutura secundária assumida pela seqüência de aminoácidos. A representação dos elementos da estrutura secundária da α -amilase de banana em um diagrama topológico pode ser vista na figura 27, o qual foi baseado no modelo proposto por KADZIOLA e col. (1994) para a cevada.

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	alça	alça	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 7$	$\beta 8$
	16	48	101	130	161	187	219	288	329
B-gRAmy56	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFDGWRDF FAKGYS	EIWT	GW WPAKAVTFVDN H D	GN PCIFYDH
B-gKAmy141	QVLFQGFNSESWK	GITHVWLPP	ADIVINHR	RRDWGP	APDIDHLN	GFDGWRDF FAKGYS	EIWT	GW WPAKAVTFVDN H D	GN PCIFYDH
B-Amy46	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFDGWRDF FAKGYS	EIWT	GW WPAKAVTFVDN H D	GT PCIFYDH
B-Amy6-4	QVLFQGFNWESWK	GITHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFDGWRDF FAKGYS	EIWT	GW WPAKAVTFVDN H D	GT PCIFYDH
R-RAmy1A	QVLFQGFNWESWK	GITHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD AWRL D FAKGYS	EIWT	GW WPAKATTFVDN H D	GN PCIFYDH
B-CloneE	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD AWRL D FARGYS	EVWD	GW WPAKAATTFVDN H D	GI PCIFYDH
B-Amy32b	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD AWRL D FARGYS	EVWD	GW WPAKAVTFVDN H D	GT PCIFYDH
B-gKAmy155	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHL	RLDWGP	APDIDHLN	GFD AW PLD FARGYS	EIWD	GW WPAKAVTFIDN H D	GI PCIFYDH
R-RAmy2A	KILFQGFNWESWR	GVTHVWLPP	ADVVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD AWRL D FARGYS	ELWD	GW WPAKAVTFVDN H D	GN PCIFYDH
R-RAmy3B	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWS	GW LPEKAVTFIDN H D	GV PCIFYDH
R-RAmy3C	QVLFQGFNWESWN	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWS	GW LPEKAVTFIDN H D	GV PCIFYDH
Z-Mzea	QVLFQGFNWESWK	GATHVWLPP	ADVVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWS	GW LPEKAVTFVDN H D	GT PCIFYDH
R-RAmy3E	QVLFQGFNWESWR	GATHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWS	GW MPDQAVTFVDN H D	GI PCIFYDH
W-Amy3/33	QILFQGFNWESWK	GATHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	ELYD	GW MPEKTVTTFIDN H D	GI PCIFYDH
R-RAmy3A	QILFQGFNWDSWK	GVTHVWLPP	ADIVVNH R	CLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWN	GW YPEKAVTFVDN H D	GV PCIFYDQ
R-RAmy3D	QVLFQGFNWESWK	GVTHVWLPP	ADVVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFD GWRL D FAKGYS	EIWN	GW LPEKAVTFVDN H D	GV PCIFYDH
M-Amy	QILFQGFNWESWR	GVTHVWLPP	ADIVINHR	RLDWGP	APDIDHLN	GFDGWRLD FAKGYS	EIWS	GW WPEKAVTFVDN H D	GV PSIFYDH
		*	*	*	+	*	+	*	##
			*	*	+	*	*	*	*

Figura 26: As regiões conservadas entre as α -amilase e sua relação com os elementos da estrutura terciária. Os três aminoácidos catalíticos (Asp, Glu e Asp) estão sombreados. Os resíduos envolvidos no sítio ativo e com a ligação de substrato são indicados por "*". Os resíduos ligantes do cálcio são indicados por "+" (O'NEILL e col., 1990; JANEÈEK, 1997). Os dois resíduos de triptofano envolvidos com a ligação de acarbose são indicados por "##" (KADZIOLA e col., (1998). Os números se referem à seqüência de aminoácidos deduzida para a α -amilase da banana (M-Amy).

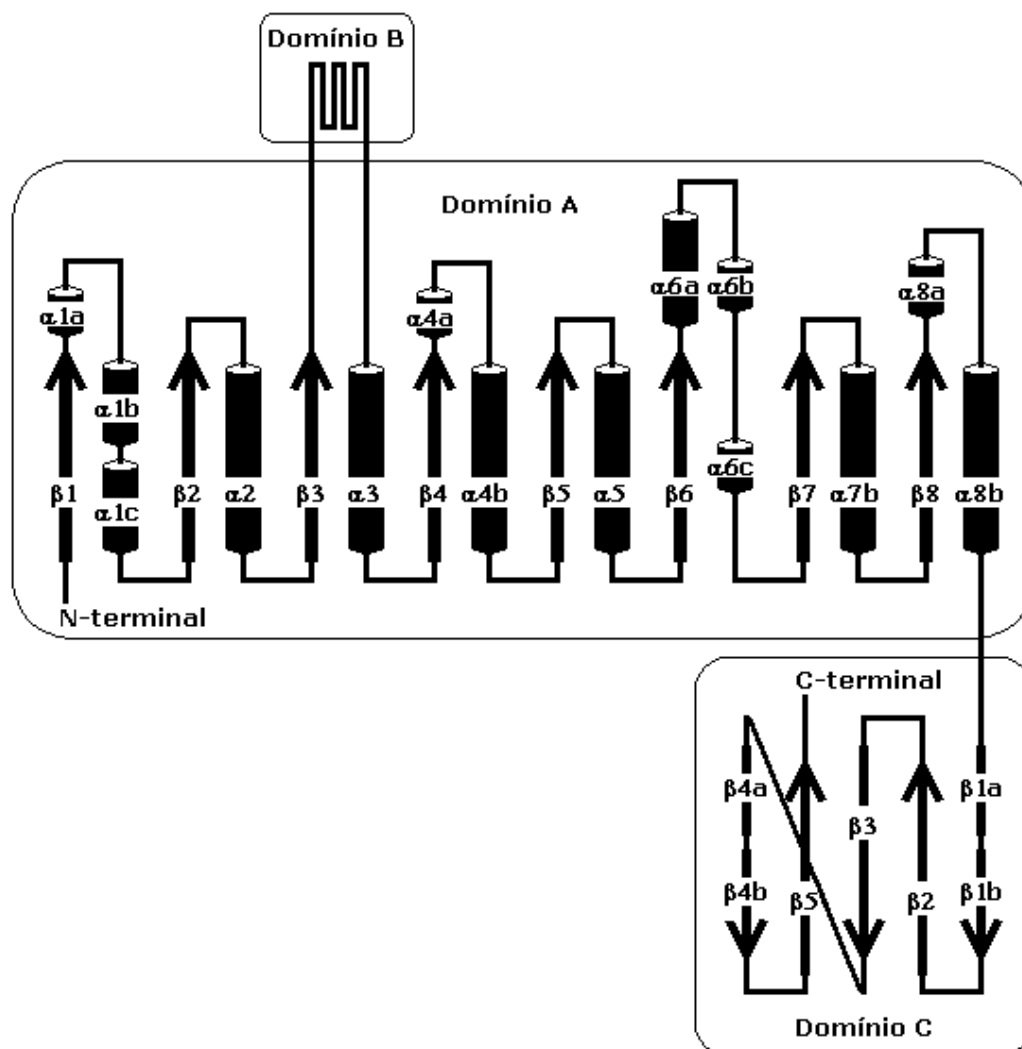


Figura 27: Representação dos domínios e dos elementos da estrutura secundária característicos da α -amilase de banana. α -hélices são representadas por cilindros, folhas β por setas e alças por linhas. Baseado em KADZIOLA e col. (1994).

É sabido que as proteínas podem assumir variados arranjos em sua estrutura terciária, as α -amilases possuem uma conformação típica, onde há destaque para a distribuição de 8 folhas β paralelas formando um cilindro envolvido por 8 α -hélices, em uma arquitetura tridimensional chamada barril $(\beta/\alpha)_8$ (MACGREGOR, 1988).

Diversas estruturas de α -amilases e de diferentes organismos já foram determinadas por cristalografia de raios X. A primeira estrutura foi determinada utilizando α -amilase de *Aspergillus oryzae* (MATSSURA e col., 1980), esta foi chamada de TAKA-amilase A (TAA) e representa o principal modelo estrutural, sendo a referência para todas as determinações posteriores. Também foram determinadas as estruturas das α -amilases pancreática e salivar de humanos (RAMASUBBU e col., 1991; BURK e col., 1993) e pancreática de porcos (QIAN e col., 1993).

Somente uma α -amilase de plantas teve sua estrutura determinada, a isozima de alto pI de cevada, sendo estudada sob diferentes abordagens. KADZIOLA e col. (1994) determinaram a estrutura nativa da proteína. Foram determinadas também as estruturas da enzima ligada a acarbose, um inibidor pseudotetrassacarídico que se liga especificamente com o sítio ativo da enzima (KADZIOLA e col., 1998), e ao inibidor duplo de amilase/subtilisina (BASI) (VALLEE e col., 1994). Os três estudos de cristalografia deram origem a modelos distintos que se encontram depositados no "Protein Data Bank" (BERMAN e col., 2000): α -amilase nativa (1AMY); α -amilase complexada com BASI (1AVA) e α -amilase ligada a acarbose (1BG9).

As α -amilases compartilham a estrutura barril $(\beta/\alpha)_8$ similar a encontrada para a triose fosfato isomerase (TIM, E.C. 5.3.1.1) determinada por BANNER e col. (1975) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) (KLEIN e SCHULZ, 1991). As α -amilases têm no entanto, características distintas em sua estrutura primária que as diferem da TIM e CGTase (JANEÈEK e col., 1995).

Vários membros da família das α -amilases formam ligações com íons cálcio. A presença de íons Ca^{2+} é necessária para a manutenção da estabilidade das α -amilases, estas requerem no mínimo um íon para cada

molécula da enzima. O cálcio não está envolvido na ligação do substrato ou na hidrólise deste, ele está localizado fora do sítio ativo, porém guarda proximidade das regiões catalíticas (MATSUURA e col., 1984; JANEÈEK e BALÁŽ, 1992).

O papel do íons Ca^{2+} está relacionado com a manutenção da rigidez estrutural entre estes domínios. Com a formação do complexo enzima-substrato, poderia ser gerado um estresse conformacional, o que resultaria no colapso da estrutura do centro ativo. A formação do complexo metal-quelato produz ligações intramoleculares cruzadas similares na sua função às pontes dissulfeto, as quais conferem à estrutura a rigidez necessária para uma eficiente atividade catalítica (HSIU e col., 1964).

A interação com cálcio preserva a estrutura do sítio ativo interligando dois fragmentos: o centro catalítico do barril $(\beta/\alpha)_8$ e o domínio B. Isto permite a formação de uma ponte iônica entre dois domínios protéicos que formam o centro ativo (BUISSON e col., 1987). O sítio primário de ligação de cálcio, um ácido aspártico, é bastante preservado, estando situado nas proximidades do sítio ativo. Existe ainda um segundo sítio localizado nas imediações de uma fissura onde ocorre a ligação do substrato e que envolve resíduos catalíticos (Asp e Glu), este sítio está associado ao efeito inibitório observado em altas concentrações de íons cálcio (JANEÈEK, 1997).

O modelo para a α -amilase de cevada proposto por KADZIOLA e col. (1994) demonstra a existência de três íons cálcio, com todos seus ligantes situados no domínio B exceto por uma interação com uma alça do domínio A. A proteína ligada ao inibidor acarbose (KADZIOLA e col., 1998) se apresenta concordante com a proteína nativa, interagindo com três íons cálcio. BRZOWSKI e DAVIES (1997) propuseram para a TAKA-amilase A em um complexo com acarbose, a presença de apenas um íon cálcio ligado ao resíduo de ácido aspártico e interagindo de forma menos direta, com a cadeia lateral de um resíduo crucial para a ligação do substrato, esta interação justifica um possível efeito inibitório do cálcio encontrado para esta enzima.

De acordo com os alinhamentos mostrados na figura 26, pode-se inferir que a α -amilase de banana suportaria a interação com até três íons Ca^{2+} , comportamento similar ao encontrado na α -amilase da cevada. A partir das estruturas determinadas para a α -amilase da cevada, foi construído um modelo que representa a possível coordenação entre aminoácidos da α -amilase de banana e íons Ca^{2+} . Este é mostrado na figura 28, onde pode ser feita a comparação entre as enzimas das duas espécies.

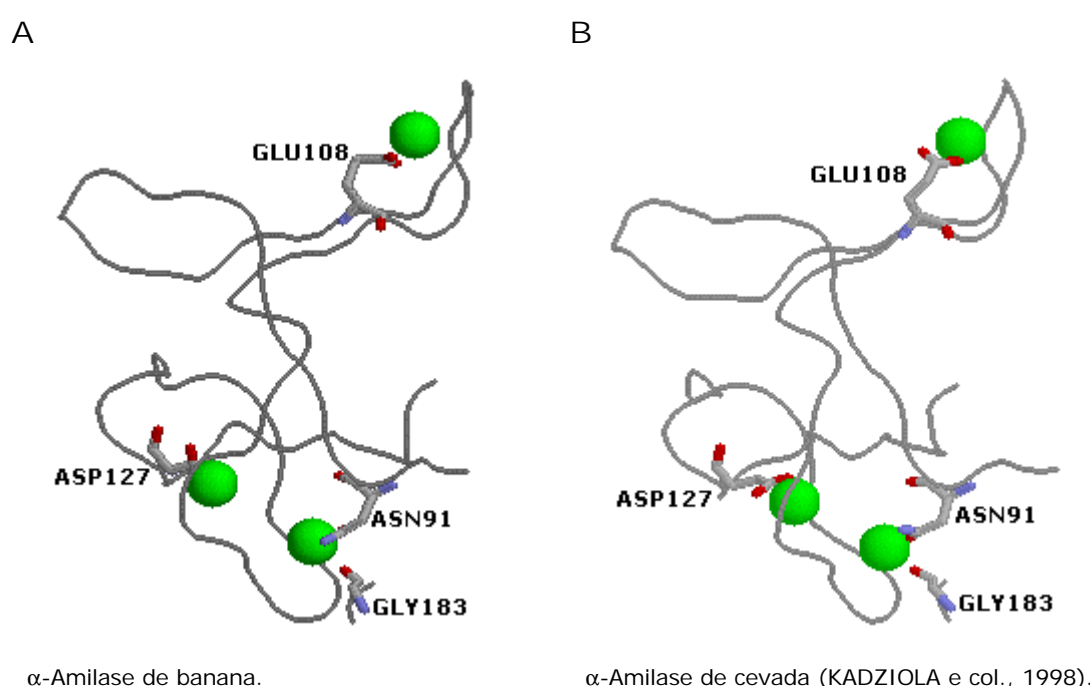


Figura 28: Modelo da coordenação entre aminoácidos da α -amilase e íons Ca^{2+} .

Enquanto a ligação com cálcio é considerada uma propriedade entre todas as α -amilases, a ligação com íons cloreto é uma característica de algumas poucas. A ligação com Cl^- ocorre em algumas amilases de animais, de bactérias gram-negativas e nas secretadas por glândulas pancreáticas e salivares de humanos. Estas são inativas na ausência do ânion, um ativador alostérico que se liga em um sítio específico, provendo a condição eletrostática necessária ao centro ativo. Nos vegetais as α -amilases mostram-se independentes do cloreto, tendo

substituído o resíduo de arginina necessário para a complexação do íon cloreto (D'AMICO e col., 2000).

A seqüência de aminoácidos derivada da ORF do clone 1099-1, foi submetida a modelagem com o sistema SWISS-MODEL (GUEX e col., 1997). O modelo estrutural obtido deriva das coordenadas dos modelos depositados no 'Protein Data Bank' para cevada (1AMY_, 1AVAA, 1AVAB e 1BG9_) e exo-amilase (*maltotetraose-forming*) de *Pseudomonas stutzeri* (1GCYA). Apesar dos quatro modelos estruturais da cevada derivarem da mesma proteína, estes têm diferenças estruturais importantes, consequência das várias abordagens utilizadas nas cristalografias de raios X, contribuindo individualmente para o modelo proposto.

O modelo estrutural da α -amilase de banana (figura 29) permitiu a identificação de sítios de interação com substrato e cálcio além da localização do centro ativo, devido a sua estreita relação com o modelos para cevada. Assim pode-se supor um comportamento similar entre as duas enzimas. WEGRZYN e col. (2000) obtiveram para a maçã um modelo estrutural utilizando-se das mesmas ferramentas empregadas no caso da banana, no entanto, por se tratar de uma proteína de dicotiledônea e desta forma evolutivamente distante da cevada, a modelagem da α -amilase de maçã resultou em três diferenças mais significativas: ausência de um peptídeo sinal, perda de uma alça e do resíduo envolvido com a coordenação do íon cálcio e a presença de apenas três folhas beta no domínio C.

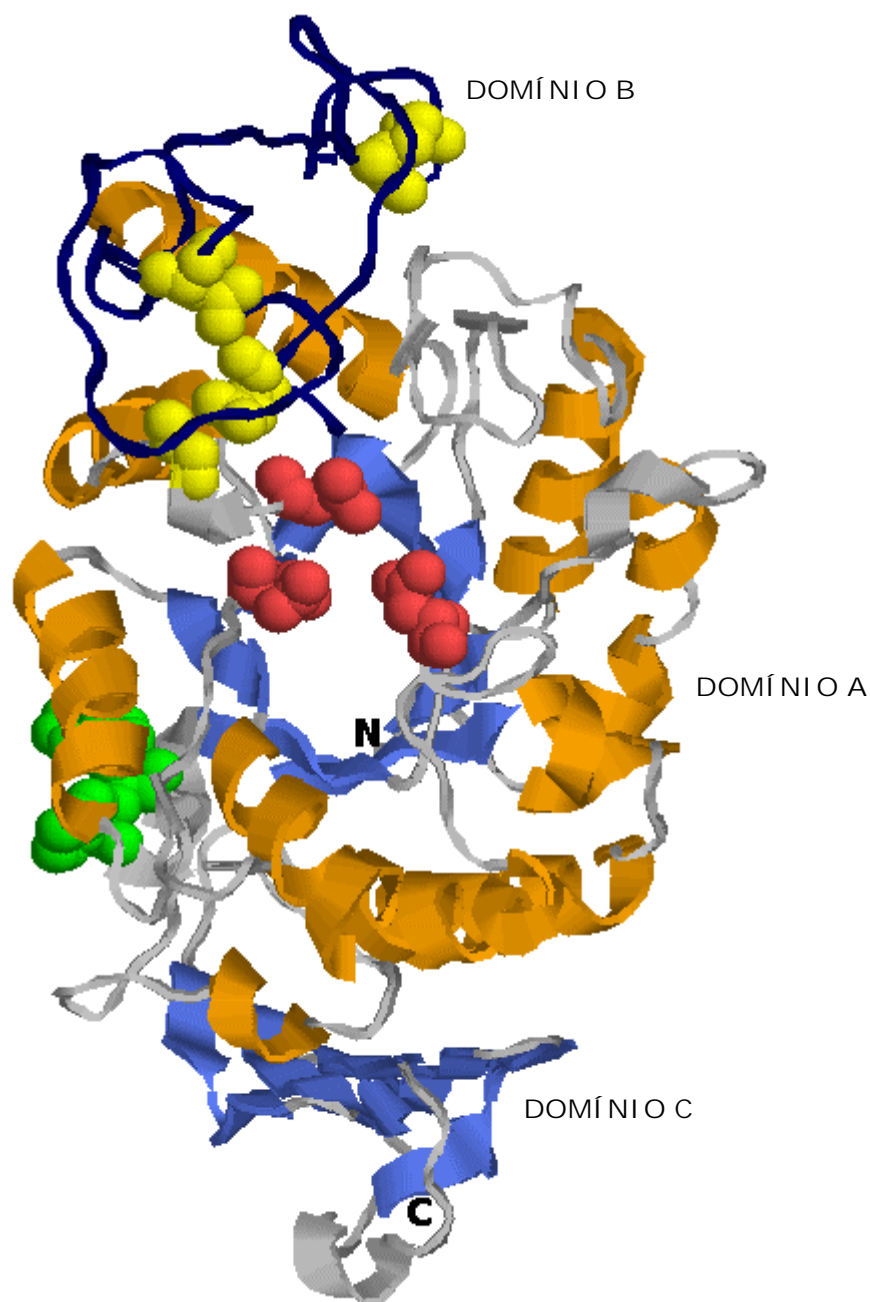


Figura 29: Modelo estrutural da α -amilase banana. Podem ser notados os três domínios (A, B e C) representados na figura 24. Em destaque os três resíduos catalíticos Asp179, Glu204 e Asp287 (em vermelho) e os dois resíduos de triptofano envolvidos com a coordenação da acarbose Trp274 e Trp275 (em verde). Em amarelo os resíduos Asn91, Gly183, Glu108 e Asp127, envolvidos na coordenação de íons cálcio (KADZIOLA e col., 1994 e 1998).

5.4. Estudo da expressão do gene da α -amilase em banana.

Durante o amadurecimento da banana, uma cascata de reações associadas a um pico respiratório e ao incremento na síntese protéica resulta na conversão massiva do amido em açúcares, desestruturação da parede celular, síntese de compostos voláteis e outras mudanças na composição da fruta. A elucidação das bases moleculares dos eventos correlacionados ao amadurecimento pode facilitar e melhorar o entendimento do controle destes processos (CLENDENNEN e MAY, 1997).

Para tornar possível a manipulação genética do amadurecimento e alterações no valor nutricional da banana, é necessária a identificação de transcritos relacionados ao amadurecimento, a obtenção de informações sobre a abundância e o padrão de expressão temporal e espacial de genes na polpa da fruta e o isolamento e caracterização de promotores genômicos (MEDINA-SUAREZ e col. 1997).

Desta forma, foram conduzidos experimentos relacionados à identificação do padrão na expressão e caracterização do gene da α -amilase, utilizando *northern* (ALWINE e col., 1977; LEHRACH e col., 1977) e *Southern blot* (SOUTHERN, 1975).

5.4.1. Análise por hibridização *northern blot*.

O desenvolvimento de um organismo depende da expressão coordenada de genes específicos, em plantas, além do núcleo e mitocôndria, presentes em todos eucariontes, há também plastídeos que contêm seu próprio material genético. Diferentes tipos de RNA estão presentes em células vegetais: o rRNA, que representa 70% da população total de RNA; o tRNA, o segundo mais abundante (15%); RNA de mitocôndrias e cloroplastos; hnRNA e mRNA, que pode representar de 1 a 5% do RNA celular total (CLARK, 1997; SAMBROOK e col., 1989). A análise do conteúdo de RNA de uma planta e mais especificamente da abundância de um mRNA, pode fornecer informações a respeito da

expressão de genes, processamento e degradação de transcritos e resposta a variações hormonais ou ambientais.

5.4.1.1. *Northern blot* com RNA total.

Como verificado por NASCIMENTO (1997), apenas o método descrito por LÓPEZ-GÓMES e GÓMEZ-LIM (1992) mostrou-se adequado para obtenção do RNA total de frutas e outras partes da bananeira. A otimização do protocolo procurou garantir a melhor relação entre qualidade e quantidade do RNA total. Foi obtido um rendimento médio de 67 μg de RNA por g de tecido para polpa de frutas e 13 $\mu\text{g/g}$ para outras partes da planta (raízes, folhas e casca).

Quantidades iguais de todos os RNA- extraídos (1 μg , exceto para folha, casca e raiz) foram aplicados em gel de agarose 1,5% contendo EtBr para testar a qualidade das amostras, o resultado pode ser visto na figura 30. Sucessivas extrações correspondentes ao dia 24 dpc apresentaram sempre baixo rendimento e o mesmo perfil nas eletroforeses, uma mancha ao longo da corrida relativa à amostra degradada. Assim, optou-se por suprimir este ponto nas eletroforese preparativas para *northern blot*.

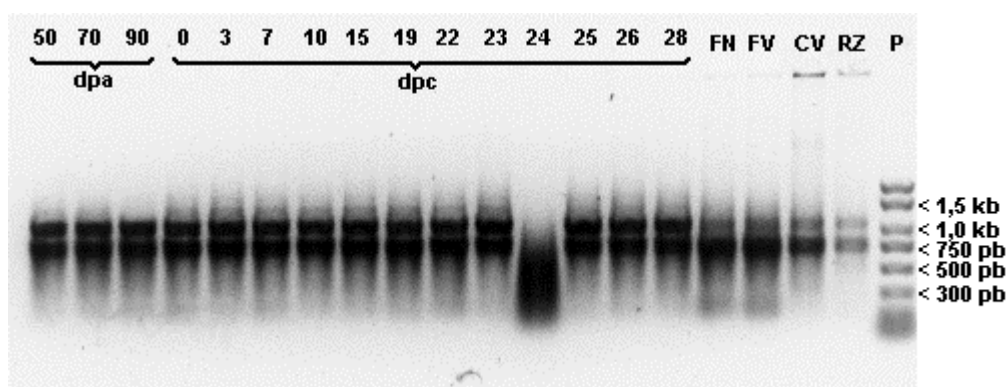


Figura 30: Eletroforese de RNA total em gel de agarose. As três primeiras linhas representam amostras de RNA previamente extraídas. FN: folha nova, FV: folha velha, CV: casca verde e RZ: raiz. P: padrão de pesos "PCR marker", as bandas referentes ao rRNA aparecem logo acima dos padrões de 750 pb (18S) e 1,0 kb (28S).

Amostras contendo quantidades iguais de RNA total (25 µg) previamente extraído de frutas com 50, 70 e 90 dias pós-antese e 0, 3, 4, 5 e 7 dias pós colheita, estas tratadas com etileno a 1000 ppm por 24h, foram fracionadas por eletroforese, transferidas e fixadas em membrana de nylon (membrana nº 1).

Os *Northern blots* da membrana nº1, na presença de formamida 50%, utilizando-se na síntese da sonda de DNA o inserto contido no clone 0499-1, não mostraram hibridização específica, ficando a membrana repetidas vezes sem marcação relativa às bandas esperadas para a α -amilase. Seguiram-se tentativas de detecção de transcrito tendo como molde o inserto de cDNA do clone 0899-1. Após autoradiografia da membrana, foi possível identificar apenas bandas fracas nas regiões do RNA ribossomal. Como alternativa ao método de marcação utilizado (Ready-To-Go DNA Labelling Beads –dCTP; Pharmacia), foi testada também incorporação de marcação por PCR (CLARK, 1997) e marcação com iniciadores específicos usando Klenow (AUSUBEL e col., 1997), porém sem detecção de sinal ou com marcação difusa.

Foi utilizado também um clone de arroz com 1,6 kb, C11761 (número no GenBank: C26166), obtido do "Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) DNA Bank" - Japão, para síntese de sonda marcada. Foram obtidos resultados semelhantes àqueles com clones de banana. A autorradiografia da membrana mostrou bandas intensas para os padrões mas sem marcação visível para α -amilase.

WEGRZYN e col. (2000) trabalhando com maçãs, não detectaram bandas de hibridização em nenhum ponto durante o desenvolvimento ou amadurecimento de frutas a 20 °C, nem detecção em folhas ou flores. Estes resultados foram obtidos utilizando uma sonda de 820 pb em amostras com 30 µg de RNA total.

Fatias de bananas com 0, 3, 7, 10, 15, 19, 22, 23, 24, 25, 26 e 28 dias pós-colheita, amostradas como descrito no item 3.1 e escolhidas com base nos resultados de determinação da atividade α -amilásica, açúcares solúveis e amido durante o amadurecimento das frutas (BASSINELLO e col., 2001), foram usadas para o isolamento de RNA

total. Foi feita eletroforese com RNA total utilizando 14 µg das amostras dos seguintes dias pós-colheita: 0, 3, 7, 10, 15, 19, 22, 23, 25, 26 e 28. O RNA previamente submetido a hidrólise parcial com NaOH 50 mM durante 5 min (SAMBROOK e col., 1989), foi transferido e fixado em membrana de nylon positivamente carregada (membrana nº 2).

Para a produção de uma sonda específica, o clone 1099-1 foi digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I, desta forma foi possível obter um fragmento de DNA com 1352 pb e que continha praticamente toda a extensão da ORF clonada, como pode ser visto nas figuras 16 e 17. Utilizando este DNA e kit de marcação (MegaPrime; Amersham), com protocolo padrão ou com uma mistura dos iniciadores anti-sentido específicos, foram feitas sucessivas tentativas de detecção do transcrito da α -amilase na membrana nº 2. Para esta sonda foram testadas diferentes condições de hibridização e diferentes combinações de tempos e temperaturas nas lavagens da membrana.

As autoradiografias dos *northern blots* (figura 31) mostram resultados semelhantes aos anteriormente obtidos. A marcação intensa nas bandas correspondentes aos padrões de peso molecular (RNA marker; Sigma) pode ser notada em todas as situações. Além disso, quando as hibridizações foram feitas sob temperatura de 42 °C e na presença de formamida, houve ainda, a detecção de marcação dos RNA ribossomais.

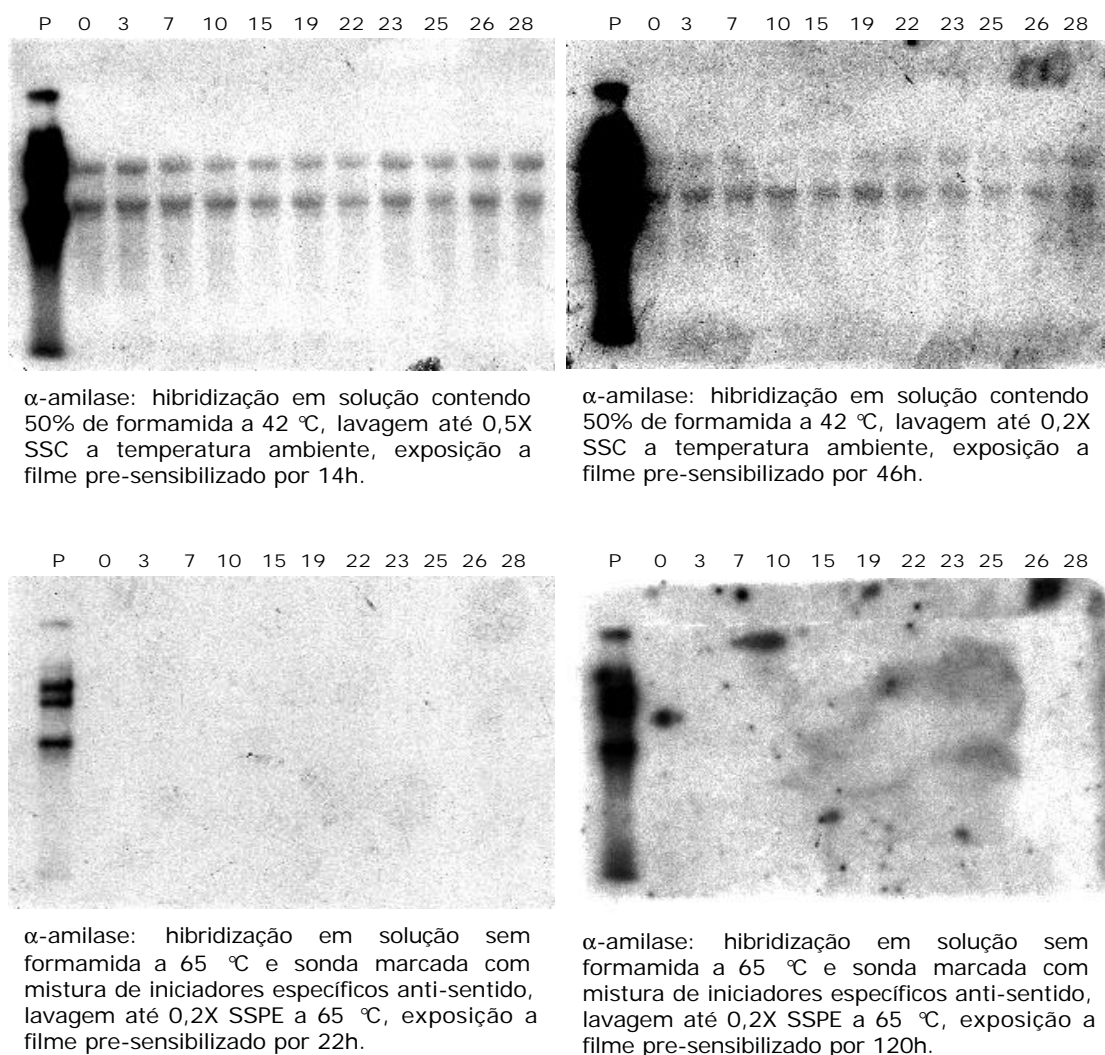


Figura 31: *Northern blot* com a membrana nº 2. Os números indicam os dias pós-colheita e P indica o padrão de pesos moleculares. Foi usado como sonda um fragmento de 1352 pb obtido pela digestão do clone 1099-1 com *Bam*HI e *Xho*I.

5.4.1.2 . *Northern blot* com mRNA e *riboprobe*.

Em contraste ao rRNA e tRNA, a maioria dos mRNA carregam em suas extremidades 3' uma "cauda poli(A)", com tamanho médio de 200 adenosinas, podendo assim, serem separados por cromatografia de afinidade em colunas contendo oligo(dT) celulose. Uma análise por *northern blot* com mRNA produz melhores resultados em relação ao uso do RNA total devido ao relativo enriquecimento dos transcritos.

O RNA total foi extraído de 10 g de tecido das amostras com 0, 10, 15, 19, 23 e 28 dias pós-colheita para purificação de mRNA. Estes pontos representam o início e o fim da amostragem (0 e 28 dpc), o início da degradação do conteúdo de amido (19 dpc), o pico de atividade α -amilásica (23 dpc), além de dois pontos que antecedem a degradação do amido (10 e 15 dpc) (BASSINELLO e col., 2001).

Foram obtidos em média 100 μ g de RNA total por grama de amostra. Para cada ponto de extração, um volume equivalente a 700 μ g de RNA total foi aplicado nas colunas oligo(dT), que garantiriam um rendimento mínimo de 7 μ g de mRNA (1%). Após a eluição e quantificação do mRNA, com rendimento médio de 1.6%, foi feita eletroforese e transferência para membrana HybonN+ (membrana nº 3).

O clone 1099-1, linearizado com *Bam*HI, foi utilizado na síntese *in vitro* de RNA radioativamente marcado, o qual foi usado como sonda (*riboprobe*) em hibridizações com as membranas. As condições, tanto de hibridização como de lavagem, para uso do *riboprobe* foram mais estridentes (AUSUBEL, 1997). O RNA constitui uma sonda com alta atividade específica pois, por ser simples fita, está sempre disponível ao longo da incubação e o híbrido RNA-RNA é mais estável que o correspondente DNA-RNA (SAMBROOK e col., 1989; Rapid-hyd buffer protocol, Amersham).

O *northern blot* obtido com o *riboprobe* e a membrana nº 3, por reação de hibridização por 15h a 70 °C em Rapid-hyd buffer e lavagens como descritas pelo fabricante, mostrou após exposição por 45h a filme não sensibilizado, marcação intensa em todas as linhas da eletroforese

exceto para o 28^º dpc. A ausência de mRNA para este ponto foi devida provavelmente à falhas na precipitação e ressuspensão da amostra após a concentração em excesso de sal e na presença de SDS. Este na amostra em questão, se tornou insolúvel, dificultado a recuperação do mRNA, fato que só pode ser confirmado após a revelação da autoradiografia do *northern blot* (figura 32-A). A intensa marcação detectada dificultou a visualização e interpretação do resultado, assim, a membrana foi novamente lavada e exposta a filme pré-sensibilizado por 3h 30min (figura 32-B).

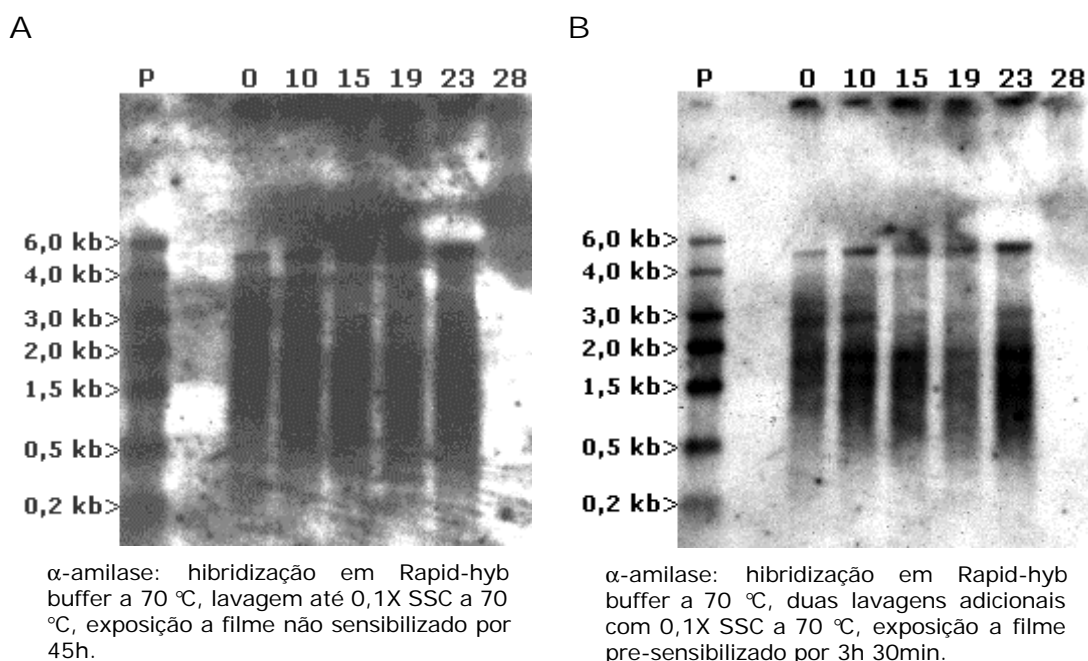


Figura 32: *Northern blot* com *riboprobe* e membrana nº 3. Os números indicam os dias pós-colheita e P indica o padrão de pesos moleculares.

A membrana foi lavada com SDS 0,5% fervente para remoção do *riboprobe* e rehibridizada com sonda de DNA, sintetizada com o fragmento *Bam*HI/*Xho*I do clone 1099-1 (1352 pb) e iniciadores randômicos, na ausência de formamida; mas o resultado obtido não foi diferente dos anteriores, não sendo possível identificar bandas que pudessem ser associadas ao transcrito para α -amilase.

O procedimento anterior, hibridização com *riboprobe* a 70 °C em Rapid-hyd buffer, foi executado também com a membrana nº 2, porém o

tempo de hibridização foi reduzido para 3h. A autorradiografia do *blot* foi revelada após 13h de exposição, mostrando marcação nas regiões do rRNA 28S e 18S.

CLENDENNEN e MAY (1997) realizando uma varredura diferencial de uma biblioteca de cDNA de polpa de banana, em vários estágios do amadurecimento, não conseguiram isolar nenhum transcrito para enzimas associadas à degradação de amido ou variações na respiração, indicando que estes transcritos podem não ser abundantes na polpa e que, algumas das mudanças na atividade destas enzimas podem ser devidas à mecanismos traducionais ou pós-traducionais, semelhantes a fosforilação ou disponibilidade de substrato.

MEDINA-SUAREZ e col. (1997), conseguiram identificar 25 diferentes mRNA relacionados ao amadurecimento da banana, mas apenas um relacionado à degradação de amido (β -amilase). Outras enzimas envolvidas na degradação do amido, como α -amilase, α -1,6-glicosidase e fosforilase, não tiveram clones de cDNA isolados. É possível que a sensibilidade alcançada pela técnica de *northern blot* seja insuficiente para detectar tais transcritos e talvez, ensaios com técnicas de maior capacidade de detecção para espécies de mRNA expressas em quantidades muito pequenas, como ensaio de proteção a ribonuclease ou RT-PCR (*reverse-transcriptase* PCR), sejam necessários para acompanhar o padrão de transcrição dos genes dessa enzimas.

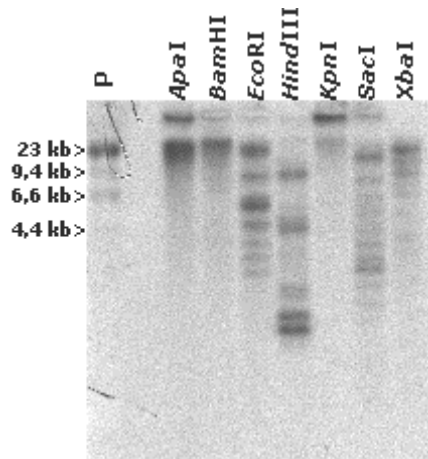
A determinação de um perfil de expressão da α -amilase em maçãs por WEGRZYN e col. (2000), foi possível unicamente quando se extraiu o RNA de frutas armazenadas a 0,5 °C e após longo período de exposição da membrana. A expressão pode ser detectada em outros tecidos somente com uso de RT-PCR. Foi observado ainda que, em frutas amadurecidas sob baixa temperatura, o transcrito acumulou-se temporariamente até os primeiros 9 dias, não sendo detectado posteriormente. Estes resultados reforçam a idéia de que o mRNA para α -amilase existe naturalmente em níveis muito baixos, razão pela qual a sua detecção encontra diversas barreias e trabalhos desta natureza com frutas são escassos.

5.4.2. Análise por hibridização *Southern blot*.

Para determinar o arranjo genômico e estimar o número de cópias do gene, ou genes da α -amilase, o DNA genômico de banana foi analisado por *Southern blot*. Foram realizadas preparações com diferentes digestões de DNA genômico por endonucleases e subseqüentes hibridizações por *Southern blot*. A escolha das enzimas levou em consideração a presença ou ausência de sítios de restrição no clone de cDNA da α -amilase.

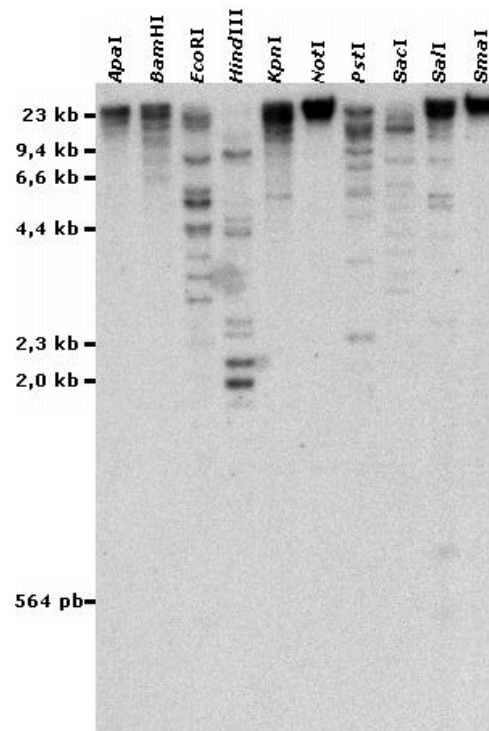
Numa primeira análise, o DNA extraído de folhas jovens foi digerido com *Apal*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *SacI* e *XbaI*. Após a eletroforese e transferência das amostras para a membrana de nylon, seguiram-se a hibridização com o fragmento *BamHI/XhoI* do clone 1099-1 a 42 °C por 12h em tampão contendo 50% de formamida, e lavagens à temperatura ambiente com até 0,5X SSC em SDS 0,1%. A autoradiografia obtida após exposição do *Southern blot* por 22h a filme pré-sensibilizado (figura 33-A), mostrou um grande número de fragmentos marcados e sem correlação direta com os sítios de restrição internos ao clone 1099-1.

A



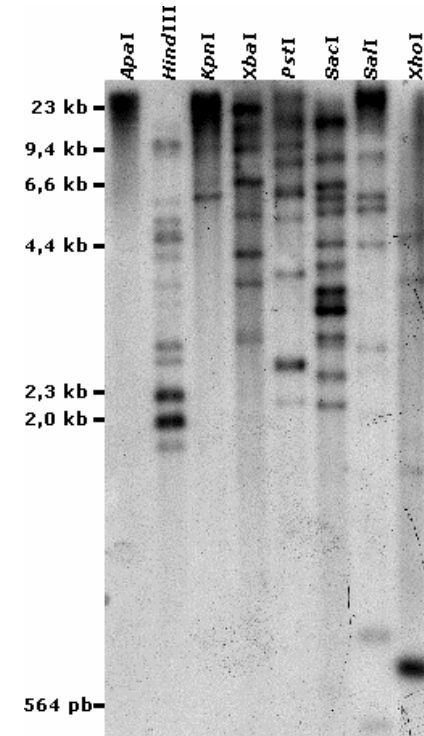
Hibridização a 42 °C em tampão contendo formamida a 50%, lavagens à temperatura ambiente até 0,5X SSC. Revelação após 22h de exposição.

B



Hibridização em Rapid-hyd buffer a 65 °C, com lavagens à temperatura de 65 °C em até 0,1X SSC. Exposição por 23h.

C



Hibridização a 65 °C em tampão sem formamida, lavagens à temperatura de 65 °C em até 0,1X SSC. Revelação após 86h de exposição.

Figura 33: *Southern blot* com DNA genômico de banana.

Visando confirmar os resultados anteriores, foram realizados outros dois *Southern blots*. Foram feitas digestões do DNA genômico com 12 enzimas de restrição (*ApaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI*) para uma eletroforese e outra preparação com 8 enzimas (*ApaI*, *HindIII*, *KpnI*, *XbaI*, *PstI*, *SacI*, *Sall* e *XhoI*). A primeira das duas membranas preparadas foi submetida à hibridização com o fragmento *BamHI/XhoI* do clone 1099-1, porém, em tampão "Rapid-hyd buffer" a 65 °C por 3h, com lavagens à temperatura de 65 °C em até 0,1X SSC em SDS 0,1%. O perfil obtido após 23h de exposição é mostrado na figura 33-B.

A terceira e última membrana preparada com DNA genômico extraído conforme o item 4.1, foi hibridizada com uma sonda sintetizada a partir do produto de PCR do clone 1099-1 com os iniciadores ESP-S e ESP-R a 65 °C em tampão sem formamida (HybondN⁺ positively charged nylon membrane manual; Amersham). Lavagens à temperatura de 65 °C em até 0,1X SSC e SDS 0,1% e revelada por autoradiografia após 86h de exposição (figura 33-C). Todos os resultados foram muito semelhantes, sendo que, para as mesmas enzimas, pode-se observar a mesma distribuição de bandas. Enquanto para o *Southern blot* das figuras 33-A e 33-B as amostras de DNA foram digeridas enzimaticamente por 48h, para o *Southern blot* 33-C as digestões foram conduzidas por 72h.

Os resultados dos *Southern blots*, realizados com amostras de DNA obtidas em extrações distintas e sob diferentes condições de hibridização, sugerem que os genes relacionados ao clone 1099-1 estariam arranjados em uma família multigênica com grande número de cópias.

Estudos recentes, com análise gênica da α -amilase de maçã (WEGRZYN e col., 2000), demonstram que genes associados a um clone de cDNA formam uma família com baixo número de cópias. Foram obtidos de 1 a 3 fragmentos ao ser usado um clone de 820 pb como sonda, mesmo hibridizações com uma sonda heteróloga, um clone de 1525 pb de *Vigna mungo*, produziram no máximo 4 bandas. Estudos sobre a estrutura e expressão do gene de α -amilase em *V. mungo*,

dicotiledônea como a maçã, suportam que este também está presente como cópia simples (YAMAUCHI, 1994).

O padrão de hibridização por *Southern blot* para banana está mais próximo daqueles encontrados em monocotiledôneas, como o arroz, onde o grupo de genes RAm3 (RAmy3A, RAm3B and RAm3C) estão organizados em um fragmento de DNA genômico de 28 kb. Estes genes demonstram diferentes padrões de expressão. RAm3A foi mais expresso em células de calos derivados do embrião, RAm3B e RAm3C foram mais expressos em sementes com 4 dias após o início da germinação, no entanto, demonstraram níveis distintos na expressão total, 25% para RAm3B e 75% para RAm3C (SUTLIFF e col., 1991).

Foi sugerido ainda, um número mínimo de 10 genes distintos no genoma do arroz (HUANG, 1990). No caso do trigo, uma variedade hexaplóide teve grande número de *loci* identificados, de 12 a 14 para genes α -Amy1 e de 10 a 11 para α -Amy2 (HUTTLY, 1988).

É interessante notar que, tanto as membranas de RNA total, quanto as de DNA genômico foram utilizadas em hibridizações com um clone de β -amilase (MEDINA-SUAREZ e col., 1997), outra importante enzima envolvida no metabolismo amido/sacarose, sendo que para esta, os resultados obtidos diferem bastante daqueles aqui apresentados. Nas reações de *northern blot*, foi possível notar a hibridização com um único fragmento em cada linha da eletroforese, o *Southern blot* sugere um baixo número de cópias para o gene da β -amilase, ao contrário da α -amilase, indicado pelo reduzido número de fragmentos marcados. Este comentário tem o intuito de frisar que os ensaios foram conduzidos corretamente e sem prováveis erros de técnica ou manipulação. O fato de não ter sido detectada marcação para o transcrito da α -amilase pode estar relacionado aos limites de detecção da metodologia empregada, pois, os níveis de estrigência e requerimentos de temperatura durante as hibridizações e lavagens foram determinados da mesma forma para as duas amilases.

6. Conclusão.

A seqüência de nucleotídeos do cDNA clonado representa o transcrito do gene da α -amilase de banana, apresentando grande semelhança com clones de outras espécies vegetais, sendo possível a obtenção da sua fase aberta de leitura (ORF) completa. A análise filogenética do clone isolado e de suas regiões de polimorfismo, permitiram classificar e agrupar a α -amilase de banana junto à subfamília Amy3 e à divisão AmyB das α -amilases de cereais.

O modelo das estruturas primária, secundária e terciária para a seqüência de aminoácidos deduzida, guarda todas as características presentes na família das α -amilases e naquelas estudadas por cristalografia de raios X.

Hibridizações por *Southern blot* demonstraram que a α -amilase de banana está organizada em um *cluster* multigênico, da mesma forma que as α -amilase de cereais. No entanto, não foi possível a determinação do padrão de expressão gênico, ao longo do amadurecimento da banana, por *northern blot*. Isto indica que seu mRNA deve estar presente em pequenas quantidades, não alcançando níveis que possam ser correlacionados com dados da literatura sobre o perfil de atividade da enzima e a degradação do amido na fruta.

7. Resumo

Para a obtenção da seqüência completa do cDNA da α -amilase foi realizada a varredura de uma biblioteca de cDNA, utilizando-se iniciadores planejados a partir do consenso entre seqüências de DNA ou aminoácidos disponíveis em bancos de dados. Após a excisão do vetor pBK-CMV carregando o inserto, foram obtidos subclones e todos foram seqüenciados. Foi obtida uma seqüência clonada de 1971pb, contendo uma ORF de 1251pb, codificando uma proteína de 416 aminoácidos (aa). Esta proteína apresentou um provável peptídeo sinal de 15 aa, peso molecular calculado de 45.080 Da e pI 5,84. A seqüência de bases obtida mostrou similaridade de 75% quando comparada com genes de outras monocotiledôneas como arroz, milho, cevada e trigo. Para a seqüência de aminoácidos, deduzida a partir região codificadora, esta semelhança foi de até 80%, mostrando-se altamente conservada. Os modelos das estruturas primária, secundária e terciária para a α -amilase de banana coincidem em diversos pontos com estruturas determinadas por cristalografia de raios X para α -amilases de outras espécies, incluindo a disposição espacial de resíduos catalíticos e de ligação de substrato e íons cálcio. Análises por *northern* e *Southern blot* sugerem que apesar da existência de uma família de genes com múltiplas cópias, a expressão destes nas frutas não alcança níveis detectáveis por *northern blot*.

8. Referências Bibliográficas.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ALWINE, J.C., KEMP, D.J., STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* v.74, n.12, p.5350-5354, 1977.

APPEL, R.D., BAIROCH, A., HOCHSTRASSER, D.F. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* v.19, n.6, p.258-260, 1994.

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

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

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

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

- BANNER, D.W., BLOOMER, A.C., PETSKO, G.A., PHILLIPS, D.C., POGSON, C.I., WILSON, I.A., CORRAN, P.H., FURTH, A.J., MILMAN, J.D., OFFORD, R.E., PRIDDLE, J.D., WALEY, S.G. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*. v.255, p.609-614, 1975.
- BASSINELLO, P.Z., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. Submitted. 2001.
- BAULCOMBE, D.C., HUTTLY, A.K., MARTIENSSEN, R.A., BARKER, R.F. JARVIS, M.G. A novel wheat α -amylase gene (α -amy3). *Mol. Gen. Genet.* v.209, p.33-40, 1987.
- BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.40, p.95-117, 1989.
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., RAPP, B.A., WHEELER, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* v.28, n.1, p.15-18, 2000.
- BERMAN, H.M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T.N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I.N., BOURNE, P.E. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* v.28, p.235-242, 2000.
- 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.* v.80, p.3963-3965, 1983.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.48, p.297-326, 1997.

- BRADY, C.J. Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* v.38, p.155-178, 1987.
- BRADY, C.J., O'CONNELL, P.B.H On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* v.3, p.301-310, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Mandioca e Fruticultura. Produtos Pesquisados pela Unidade. *Banana* [Online]. Disponível: <http://www.cnpmf.embrapa.br/banana.htm> [06 de novembro de 2000].
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. INMETRO. *Unidades Legais de Medir* [Online]. Disponível: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp> [02 de abril de 2001].
- BRZOZOWSKI, A.M., DAVIES, G.J. Structure of the aspergillus oryzae α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* v.36, p.10837-10845, 1997.
- BUISSON, G., DUEE, E., HASER, R., PAYAN, F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* v.6, n.13, p.3909-3916, 1987.
- BURK, D., WANG, Y., DOMBROSKI, D., BERGHUIS, A.M., EVANS, S.V., LUO, Y., WITHERS, S.G., BRAYER, G.D. Isolation, crystallization and preliminary diffraction analyses of human pancreatic alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* v.230, n.3, p.1084-1085, 1993.

- CLARK, M.S., ed. *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 529p.
- CLENDENNEN, S.K., MAY, G.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* v.115, n.2, p.463-469, 1997.
- CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agric. Food Chem.* v.43, p.347-351, 1995.
- D'AMICO, S., GERDAY, C., FELLER, G. Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α -amylases. *Gene.* v.253, n.1, p.95-105, 2000.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* v.1, n.4, p.19-21, 1983.
- DILLEY, D.R. Symposium: biochemical control systems – Postharvest fruit preservation: protein synthesis, ripening and senescence. *J. Food Sci.* v.37, n.4, p.518-520, 1972.
- GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behaviour. *J. Food Sci.* v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.
- GUEx, N., PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* v.18, n.15, p.2714-2723, 1997.
- HAMABATA, A., RODRIGUEZ, E., GARCIA-MAYA, M., BERNAL-LUGO, I. Effect of pH on the GA₃ induced α -amilase synthesis. *J. Plant Physiol.* v.143, p.349-352, 1994.

- HALLETT, I.C., WEGRZYN, T.F., MACRAE, E.A. Starch degradation in kiwifruit - *in-vivo* and *in-vitro* ultrastructural studies. *Int. J. Plant Sci.* v.156, n.4, p.471-480, 1995.
- HENKER, A., SCHINDLER, I., RENZ, A., BECK, E. Protein heterogeneity of spinach pullulanase results from the coexistence of interconvertible isomeric forms of the monomeric enzyme. *Biochem J.* v.331, n.3, p.929-935, 1998.
- HSIU, J., FISCHER, E.H., STEIN, E.A. Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. II. calcium and the catalytic activity. *Biochemistry.* v.3, n.1, p.61-66, 1964.
- HUANG, N., STEBBINS, G.L., RODRIGUEZ, R.L. Classification and evolution of α -amylase genes in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v.89, n.16, p.7526-7530, 1992.
- HUANG, N., SUTLIFF, T.D., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol. Biol.* v.14, n.5, p.655-668, 1990.
- HUTTLY, A.K., MARTIENSSEN, R.A., BAULCOMBE, D.C. Sequence heterogeneity and differential expression of the alpha-Amy2 gene family in wheat. *Mol. Gen. Genet.* v.214, n.2, p.232-240, 1988.
- HWANG, Y.S., THOMAS, B.R., RODRIGUEZ, R.L. Differential expression of rice α -amylase genes during seedling development under anoxia. *Plant Mol. Biol.* v.40, n.6, p.911-920, 1999.
- IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* v.124, n.6, p.587-590, 1999.

- ISRAEL, D. I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Research*. v.21, n.11, p.2627-2631, 1993.
- JANEÈEK, Š. α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* v.67, n.1, p.67-97, 1997.
- JANEÈEK, Š. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *Eur. J. Biochem.* v.224, n.2, p.519-524, 1994.
- JANEÈEK, Š. Sequence similarities in $(\alpha/\beta)_8$ -barrel enzymes revealed by conserved regions of alpha-amylase. *FEBS Lett.* v.316, n.1, p.23-26, 1993.
- JANEÈEK, Š., BALÁŽ, S. α -Amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS Lett.* v.304, n.1, p.1-3, 1992.
- JANEÈEK, Š., MACGREGOR, E.A., SVENSSON, B. Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from α -amylases. *Biochem. J.* v.305, pt.2, p.685-686, 1995.
- JANEÈEK, Š., ŠEVĚÍK, J. The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett.* v.456, n.1, p.119-125, 1999.
- KADZIOLA, A., ABE, J., SVENSSON, B., HASER, R. Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* v.239, n.1, p.104-121, 1994.
- KADZIOLA, A., SOGAARD, M., SVENSSON, B., HASER, R. Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* v.278, n.1, p.205-217, 1998.

- KHURSHEED, B., ROGERS, J.C. Barley alpha-amylase genes. Quantitative comparison of steady-state mRNA levels from individual members of the two different families expressed in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* v.263, n.35, p.18953-18960, 1988.
- KLEIN, C., SCHULZ, G.E. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* v.217, n.4, p.737-750, 1991.
- KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.47, p.509-540, 1996.
- KOHNO, A., NANMORI, T. Changes in α - and β -amylase activities during germination of seeds of alfafa (*Medicago sativa*). *Plant Cell Physiol.* v.32, n.4, p.459-466, 1991.
- KONISHI, Y., HARADA, M., D'INNOCENZO, M., LAJOLO, F.M. Purification and characterization of soluble and cell wall-bound acid α -glucosidases of ripe yellow banana pulp. *J. Appl. Glycosci.* v.48, n.1, p.19-25, 2001.
- LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M., BOEDTKER, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* v.16, n.21, p.4743-4751, 1977. Apud: MEDLINE [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [July 9, 2001].
- LII, C.Y.; CHANG, S.M.; YOUNG, Y.L. Investigation on the physical and chemical properties of banana starchs. *J. Food Sci.* v.47, p.1493-1497, 1982.
- LÓPEZ-GÓMES, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience.* v.27, n.5, p.440-442, 1992.

- MACRAE, E., QUICK, W.P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. *Planta*. v.188, p. 314-323, 1992.
- MACGREGOR, E.A. α -Amylase structure and activity. *J. Protein. Chem.* v.7, n.4, p.399-415, 1988.
- MACGREGOR, E.A., JANEÈEK, Š., SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. v.1546, n.1, p.1-20, 2001.
- MAO, W.W., KINSELLA, J.E. Amylase activity in banana fruit: properties and changes in activity with ripening. *J. Food Sci.* v.46, p.1400-1403, 1981.
- MARRIOTT, J., ROBINSON, M., KARIKARI, S.K. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. *J. Sci. Food Agric.* v.32, p.1021-1026, 1981.
- MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W., KAKUDO, M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem. (Tokyo)*. v.95, n.3, p.697-702, 1984.
- MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W., TANAKA, N., IGA, Y., YASUOKA, N., TODA, H., NARITA, K., KAKUDO, M. Molecular structure of taka-amylase A. I. Backbone chain folding at 3 Å resolution. *J. Biochem. (Tokyo)*. v.87, n.5, p.1555-1558, 1980.
- MCMURCHIE, E.J., MCGLASSON, W.B., EAKS, I.L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*. v.237, p.235-236, 1972.

- MEDINA-SUAREZ, R., MANNING, K., FLETCHER, J., AKED, J., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* v.115, n.2, p.453-461, 1997.
- MITSUI, T., YAMAGUCHI, J., AKAZAWA, T. Physicochemical and serological characterization of rice α -amylase isoforms and identification of their corresponding genes. *Plant Physiol.* v.110, n.4, p.1395-1404, 1996.
- MOTA, R.V. *Metabolismo amido-sacarose e determinação dos açúcares solúveis em alguns cultivares de banana (musa spp.)*. São Paulo, 1997. 75p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- NAKAMURA, Y. Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci.* v.121, n.1, p.1-18, 1996.
- NASCIMENTO, J.R.O. *Purificação, caracterização parcial e expressão da sacarose-fosfato sintase durante o amadurecimento da banana*. São Paulo, 1997. 91p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M., ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta.* v.203, n.3, p.283-288, 1997.
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. *J. Plant Physiol.* v.156, p.605-611, 2000.

- NIELSEN, H., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.* v.12, n.1, p.3-9, 1999.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* v.10, n.1, p.1-6, 1997.
- O'NEILL, S.D., KUMAGAI, M.H., MAJUMDAR, A., HUANG, N., SUTLIFF, T.D., RODRIGUEZ, R.L. The α -amylase genes in *Oryza sativa*: characterization of cDNA clones and mRNA expression during seed germination. *Mol. Gen. Genet.* v.221, n.2, p.235-244, 1990.
- PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences.* v.12, p.357-358, 1996.
- PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann. Rev. Plant Physiol.* v.33, p.431-454, 1982.
- PURGATTO, E., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R., CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta.* v.212, n.5-6, p.823-828, 2001.
- QIAN, M., HASER, R., PAYAN, F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* v.231, n.3, p.785-799, 1993.
- RAMASUBBU, N., BHANDARY, K.K., SCANNAPIECO, F.A., LEVINE, M.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human salivary alpha-amylase. *Proteins.* v.11, n.3, p.230-232, 1991.

ROSSETTO, M.R.M. *Efeito do ácido geberélico no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (Musa acuminata var. Nanicão)*. São Paulo, 2001. 79p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

RYCHLIK, W. OLIGO.EXE structure version 3.3 – 208. 1988-1990.

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

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

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

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

SMITH, T.F., WATERMAN, M.S., FITCH, W.M. Comparative biosequence metrics. *J. Mol. Evol*. v.18, n.1, p.38-46, 1981.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol*. v.98, n.3, p.503-517, 1975.

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

- SUBBARAO, K.V., DATTA, R., SHARMA, R. Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. *Phytochemistry*. v.49, n.3, p.657-666, 1998.
- SUN, Z.T., HENSON, C.A. A quantitative assessment of the importance of barley seed alpha-amylase, beta-amylase, debranching enzyme, and alpha-glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* v.284, n.2, p.298-305, 1991.
- SUTLIFF, T.D., HUANG, N., LITTS, J.C., RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an α -amylase multigene cluster in rice. *Plant Mol. Biol.* v.16, n.4, p.579-591, 1991.
- TERASHIMA, M., HAYASHI, N., THOMAS, B.R, RODRIGUEZ, R.L., KATOH, S. Kinetic parameters of two rice α -amilase isozymes for oligosaccharide degradation. *Plant Sci.* v.116, p.9-14, 1996.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* v.24, p.4876-4882, 1997.
- TUCKER, G.A., GRIERSON, D. Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening. *Planta.* v.155, p.64-67, 1982.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Serviço de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas. *Normalização técnica de documentos* [Online]. Disponível: http://www.bcq.usp.br/menunorma_tecnica.htm [23 de maio de 2001].
- VALLEE, F., KADZIOLA, A., BOURNE, Y., ABE, J., SVENSSON, B., HASER, R. Characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the complex between barley alpha-

amylase and the bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor from barley seeds. *J. Mol. Biol.* v.236, n.1, p.368-371, 1994.

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

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

WHEELER, D.L., CHAPPEY, C., LASH, A.E., LEIPE, D.D., MADDEN, T.L., SCHULER, G.D., TATUSOVA, T.A., RAPP, B.A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* v.28, n.1, p.10-14, 2000.

WHITAKER, J.R. *Principles of enzymology for the food science*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625p.

WILKINS, M.R., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J.C., WILLIAMS, K.L., APPEL, R.D., HOCHSTRASSER, D.F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* v.112, p.531-552, 1999.

WISCONSIN-PACKAGE Version 9.1. Madison, Wisc.: Genetics Computer Group (GCG), 1997.

YAMAUCHI, D., TAKEUCHI, H., MINAMIKAWA, T. Structure and expression of α -amylase gene from *Vigna mungo*. *Plant Cell Physiol.* v.35, n.4, p.705-711, 1994.

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