

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/11265
IB/80335

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1989

MÁRCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela candidata Marcia R. Braga
e aprovada pela comissão julgadora*



Arruda 19-7-89

"PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA LISINA-CETOGLUTARATO REDUTASE DE ENDOSPERMAS DE MILHO (*Zea mays* L.)"

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

ORIENTADOR: Prof.Dr. PAULO ARRUDA

- CAMPINAS -

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

.....
AUTOR 843p
..... EX
OMBO BC/ 11265
IB 901

Ao meu esposo, Ulysses,
e a meus filhos,
Daniel e Luciana

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, pela orientação desta tese e contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pelo fornecimento do germoplasma utilizado neste trabalho.

Aos Profs. Drs. José Carlos da Costa Maia, Suely Lopes Gomes e Maria Helena Juliani do Instituto de Química da USP - SP., pelas inúmeras e valiosas sugestões, empréstimo de drogas e alguns equipamentos, apoio e amizade constantes.

Ao Prof. Ladaslav Sodek, pelas várias discussões e importantes sugestões apresentadas durante a realização deste trabalho e na análise prévia do mesmo.

Ao Prof. Benedito de Oliveira, pelo apoio e amizade, pelas discussões constantes, empréstimo de drogas e pelo exame prévio desta tese.

Aos Profs. Drs. Hiroshi Aoyama, Renato Bonatelli Júnior e Antonio Celso Novaes de Magalhães, que também realizaram a análise prévia desta tese, pela leitura minuciosa e valiosas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri, pela pronta disposição em conceder a utilização de seu

laboratório para a realização dos experimentos de ultracentrifugação em gradientes de sacarose.

Ao Dr. Adilson Leite, pela colaboração na preparação dos anticorpos policlonais, na realização dos testes imunológicos e pela amizade.

À Elisabeth Bilo Ribas, pelo auxílio técnico, incentivo constante e inestimável amizade.

À Silvia Regina Turcinelli, pelo auxílio técnico, apoio e amizade.

Ao Márcio José da Silva, pelo cuidado na preparação das fotos.

A Luís Fernando Scucuglia Braga, pela paciência, dedicação e cuidado na confecção das figuras.

Às colegas e amigas do Laboratório de Genética Vegetal, Janie, Luciane, Rosely, Laura, Maria Luísa, Solange, Cristiane, Fátima, pelo incentivo e amizade.

A todos os amigos do Barracão de Genética, que durante estes últimos anos colaboraram comigo, apoiando-me e incentivando-me.

Ao meu esposo Ulysses, pelo companheirismo, estímulo e compreensão constantes e a meus filhos Daniel e Luciana, nos quais, sempre encontrei as forças necessárias para prosseguir.

À minha mãe Alice Baroza Brochetto, pela valiosa colaboração em diversos momentos.

Às entidades responsáveis pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho: FAPESP e CNPq, e ao auxílio financeiro recebido através dos Projetos: FINEP-PADCT, CNPq-PIG V e CABIO.

Í N D I C E

	pág.
ABREVIATURAS	
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Metabolismo de lisina.....	8
2. Objetivos do trabalho.....	24
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1. Obtenção do material.....	26
2. Ensaio de lisina-cetoglutarato redutase (LKR)....	27
3. Preparação dos extratos celulares.....	28
4. Fracionamento em sulfato de amônio.....	29
5. Estudos de algumas variáveis sobre a atividade de LKR.....	30
5.1. Influência do pH.....	30
5.2. Efeito da temperatura e da adição de agentes protetores sobre a estabilidade da enzima em extratos.....	31
6. Estudos cinéticos.....	31
6.1 Determinação de Km para L-lisina e alfa- cetoglutarato.....	31

6.2.	Estudo de inativação da enzima frente à baixas concentrações dos substratos - lisina e alfa-cetoglutarato.....	33
6.3.	Estudos de inibição pelo produto - sacaropina.....	34
7.	Eletroforese em géis de poliacrilamida em sistema não-denaturante (PAGE). Caracterização da banda de LKR.....	34
7.1.	Confeccção dos géis não-denaturantes.....	34
7.2.	Deteccção da atividade de LKR em PAGE.....	39
8.	Eletroforese em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS).....	40
8.1.	Outros métodos de fixação de proteínas em géis de poliacrilamida.....	43
9.	Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose..	43
10.	Determinação do peso molecular relativo (M_r) da enzima.....	45
10.1.	Gradientes de sacarose.....	45
10.2.	Filtração em gel Sephadex G-200.....	46
10.3.	Eletroforese em géis de poliacrilamida....	47
11.	Purificação de LKR e caracterização imunológica..	48
11.1.	Extração, fracionamento em $(NH_4)_2SO_4$ e ultracentrifugação.....	48
11.2.	Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose.....	49
11.3.	Cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose CL-6B.....	50

11.4. Preparação de anticorpo contra LKR.....	51
11.5. Western blot.....	53
12. Ensaio da atividade de catalase.....	54
13. Dosagem de hemoglobina.....	54
14. Dosagem de proteína.....	55
15. Reagentes.....	55
III. RESULTADOS.....	57
1. Padrão de atividade de LKR durante o desenvolvimento do endosperma de milho normal e opaco-2.....	57
2. Fracionamento em sulfato de amônio. Efeito do pH, temperatura e estocagem dos extratos e presença/ausência de agentes protetores, no extrato, sobre a atividade da enzima.....	59
3. Estudos cinéticos.....	66
4. Caracterização da banda de LKR e detecção da atividade da enzima em géis não-denaturantes (PAGE).....	74
4.1. Comparação do perfil eletroforético e da atividade de LKR em PAGE entre os materiais normal e opaco-2.....	78

4.2. Correlação entre a síntese de proteínas e o padrão de atividade de LKR durante o desenvolvimento do endosperma.....	80
5. Perfis cromatográficos em colunas de DEAE-celulose de extratos normais e opaco-2.....	81
6. Determinação do M_r de LKR através de ultracentrifugação, filtração em gel e eletroforese em géis de poliacrilamida.....	85
7. Purificação e caracterização imunológica de LKR.....	91
IV. DISCUSSÃO.....	103
V. CONCLUSÕES.....	113
VI. RESUMO.....	116
VII. SUMMARY.....	119
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

ABREVIATURAS

DAP	-	ácido diamino pimélico
dap	-	dias após a polinização
DEAE	-	dietilaminoetil
DTT	-	DL-ditiotreitol
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
HEPES	-	substância tamponante: ácido N-(2-hidroxietil)- piperazino-N'-2-etanosulfônico
HMW	-	alto peso molecular
LKR	-	lisina-cetoglutarato redutase
Mr	-	peso molecular relativo
MTT	-	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana
NAD ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
PMS	-	metilsulfato de fenazina
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
TEMED	-	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
Tris	-	tris-(hidroximetil)-aminometano
X g	-	vezes a aceleração da gravidade

I. INTRODUÇÃO

Entre os países subdesenvolvidos, os cereais, de uma maneira geral suplementam em aproximadamente 70% as necessidades humanas em proteínas. Nas regiões tropicais e sub-tropicais, por exemplo, o milho tem sido o responsável pelo fornecimento de calorias e proteínas na dieta humana porque ele é sem dúvida, o cereal que apresenta o maior número de produtos industrializados. Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, principalmente amido, e outros componentes, como proteínas, óleos e vitaminas, ele se constitui num produto bastante apreciado para ser utilizado comercialmente.

Muito embora o milho normal seja considerado uma excelente fonte de energia, suas proteínas são relativamente de baixa qualidade nutritiva, em virtude do baixo teor dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano em seu endosperma.

Durante o desenvolvimento da semente de milho, as proteínas de reserva, são sintetizadas nas células do endosperma. Este tecido, no milho, encerra cerca de 85% da proteína total. As proteínas do endosperma de milho são uma mistura complexa de polipeptídeos, a qual pode ser dividida em quatro classes proteicas diferentes com base nas

suas solubilidades em solventes distintos, de acordo com Osborne (1897) e Moreaux e Landry (1968), ou seja, as albuminas, globulinas, zeína (pertencente ao grupo das prolaminas) e glutelinas, sendo que as duas últimas são as principais proteínas de reserva que ocorrem no endosperma.

As frações proteicas representadas pelas albuminas e globulinas, pertencentes ao grupo das proteínas solúveis em água ou soluções salinas, diferem na sua composição de aminoácidos essenciais e pela concentração de ácido glutâmico. Estas duas frações, são bastante semelhantes na sua composição, entretanto as albuminas são mais ricas do que as globulinas em ácido aspártico, prolina, glicina e alanina, porém mais pobres em ácido glutâmico e arginina (Paulis e Wall, 1969).

O grupo das glutelinas, correspondem a proteínas de alto peso molecular e que são solúveis em solução alcalina. Esse grupo é composto de diferentes polipeptídeos que por sua vez diferem entre si na composição de aminoácidos. As glutelinas, em comparação com as prolaminas, são mais ricas em lisina, arginina, histidina e triptofano, porém apresentam menores teores de ácido glutâmico.

A fração prolamina representada pela zeína, é solúvel em álcool e apresenta os mais baixos valores de peso molecular das frações proteicas de reserva do endosperma. Esta é hoje a mais estudada das frações. Isto

porque a fração zeína compreende mais de 50% do total de proteínas da semente do milho e porque, geralmente, o baixo teor de lisina do endosperma está associado a alta proporção desta fração (Mertz e col.,1964; Mossé e col.,1966; Paulis e col.,1969; Sodek e Wilson,1971).

A zeína pode ser subdividida em três frações de acordo com a sua solubilidade em solventes alcoólicos, na presença ou ausência de agentes redutores (Esen,1986): alfa-zeína, solúvel em etanol a 95% ; beta-zeína, solúvel em etanol 60% e gama-zeína, solúvel em álcool ou tampões contendo 2-mercaptoetanol. Diferenças significativas foram observadas na composição de aminoácidos dessas subfrações, sendo que, a alfa-zeína é composta de 25% de glutamina, 20% de leucina, 15% de alanina, 11% de prolina e outros aminoácidos em menores proporções; a beta-zeína apresenta 16% de glutamina, 10% de leucina, 10% de prolina e contém proporções significativas dos aminoácidos sulfurados - metionina (11%) e cisteína (4%); já a gama-zeína difere ainda mais das outras zeínas por possuir um alto conteúdo de prolina, histidina, cisteína, glicina e valina e um baixo teor de glutamina e leucina (Esen e col.,1985; Pedersen e col.,1986).

É também conhecido que a zeína é uma fração heterogênea em tamanho e carga (Soave e col.,1975; Gianazza e col.,1976; Lee e col.,1976; Righetti e col.,1977), que consiste de vários polipeptídeos codificados por pelo menos

quatro famílias distintas de genes (Soave e col.,1978 e 1981a).Assim sendo, quando submetida à eletroforese em géis de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS), a zeína é resolvida em vários componentes de pesos moleculares distintos: gama-zeína - 27.000(Z-27); alfa-zeína - 23.000(Z-23), 21.000(Z-21) e beta-zeína - 15.000(Z-15) e 10.000(Z-10). As bandas de 23.000 e 21.000 estão sempre relacionadas aos polipeptídeos mais abundantes (mais que 70% do total), de acordo com Gianazza e colaboradores (1976). Por outro lado, quando a zeína é submetida à focalização isoeletrica (IEF), ela é resolvida em aproximadamente 15 componentes de pontos isoeletricos distintos (Soave e col.,1975; Gianazza e col.,1976). Baseado nas constantes de sedimentação e difusão, a zeína forma longas cadeias tomando uma forma esférica (Mossé e Landry, 1980).

A biossíntese das proteínas de reserva do endosperma se inicia somente aos 14 ou 15 dias após a polinização e continua até a maturidade da semente. Tem-se verificado também que esta síntese se dá ao nível dos polirribossomas associados ao retículo endoplasmático rugoso (Burr e Burr,1976; Larkins e Hurkman,1978; Viotti e col.,1978).

Atualmente são conhecidos pelo menos 13 mutantes de milho que são capazes de provocar alterações drásticas nas propriedades físicas e químicas da semente.

Alguns mutantes são capazes de influenciar a temperatura de gelatinização do amido, assim como alteram a digestibilidade e o próprio tipo de amido, ou seja, amilose, amilopectina e polissacarídeos solúveis em água e também açúcares mais simples. Por outro lado são conhecidos alguns mutantes, cujo efeito consiste em alterar principalmente a qualidade da proteína do endosperma da semente. Essas mutações provocam alterações na quantidade e na qualidade das frações proteicas, e têm merecido grande atenção dos pesquisadores, tendo em vista a utilização das mesmas, em programas de melhoramento da qualidade nutritiva das proteínas do endosperma, bem como em estudos básicos de genética visando a compreensão do processo regulatório da síntese de proteínas nesse cereal.

Entre os mutantes mais estudados destacam-se o opaco-2 (o2), floury-2 (f12), shrunken-2 (sh2), shrunken-4 (sh4), brittle (bt), brittle-2 (bt2) e sugary-2 (su2). Todos esses mutantes apresentam quantidades de lisina quase sempre maior que os tipos normais, sendo que, se colocássemos todos em uma escala descendente, o opaco-2 ficaria localizado no extremo superior, e os outros, numa posição intermediária entre o opaco-2 e os tipos normais (Dalby e Tsai, 1975; Misra e col., 1972).

Com base nos estudos que se tem até o momento, entende-se hoje que nos mutantes que apresentam alta lisina no endosperma, não somente a distribuição das

macromoléculas são alteradas, como também a composição da proteína (em termos de subfração). Os genes *o2* e *f12* e outros, podem não somente suprimir a biossíntese de zeína, mas também decrescer a proporção de alguns polipeptídeos de baixo teor de lisina na fração glutelina.

No mutante opaco-2, o mais estudado, além das características fenotípicas do endosperma serem modificadas em relação ao normal, o que o tornam opaco e farináceo, a quantidade de zeína, neste mutante é drasticamente diminuída, enquanto que as albuminas e globulinas e principalmente a glutelina é proporcionalmente aumentada (Jimenes, 1966; Mossé, 1966; Mossé e col., 1966). Recentemente, Marks e colaboradores (1985), através de técnicas de hibridização de DNA e RNA, demonstraram que esta redução da fração de zeína pode ser explicada por diferenças existentes no tempo de transcrição e no nível de expressão dos genes que codificam para zeína entre o genótipo normal e opaco-2. A inversão das proporções das frações proteicas do endosperma opaco-2 faz com que este apresente mais que o dobro de lisina em relação ao endosperma normal, o que lhe confere um valor nutritivo superior ao milho comum (Mertz e col., 1964; Mertz e col., 1968; Sodek e Wilson, 1971; Lee e col., 1976).

Os loci gênicos que controlam os níveis de zeína no endosperma, são definidos por vários autores como genes reguladores e entre as mutações que ocorrem no milho,

até o momento, são conhecidos os genes reguladores opaco-2, opaco-6, floury-2 e defective endosperm B-30. A localização dos genes reguladores nos cromossomos do milho e a porcentagem de zeína inibida por esses genes foram recentemente descritas por Soave e Salamini (1984). O gene opaco-2 é um gene recessivo, localizado no cromossomo 7, e o floury-2 está localizado no cromossomo 4 e apresenta-se com caráter semidominante. Da mesma forma que o gene o2, também o f12 confere à semente de milho, uma alta opacidade e uma textura farinácea. Entretanto, o duplo mutante f12o2 relatado por Nelson (1966) mostrou ser também rico em lisina, porém o fenótipo da semente aproximava-se muito do normal. Todavia, Nelson verificou que esse fenótipo não era estável e variava em função do germoplasma. Já em 1964, Mertz e colaboradores haviam verificado que a introdução do gene opaco-2 em uma linhagem de milho, levava a um aumento da lisina de aproximadamente 69%.

Afim de se entender os efeitos destes genes mutantes, e em especial do gene opaco-2, sobre o metabolismo de proteínas e aminoácidos do endosperma de milho, as alterações causadas por este gene têm sido extensivamente estudadas.

Assim vários outros efeitos têm sido observados além do efeito na síntese de zeína, como por exemplo: a) supressão completa da presença de uma proteína denominada b-32, recentemente descoberta e que

presumivelmente controla a síntese de zeína no endosperma (Soave e col., 1981b); b) aumento da atividade de ribonuclease no endosperma opaco-2 em relação ao endosperma normal (Dalby e Davies, 1967; Wilson e Alexander, 1967); c) aumento do nível de aminoácidos livres no endosperma mutante (Sodek e Wilson, 1971; Misra e col., 1975); d) ação direta sobre o metabolismo de lisina no endosperma, diminuindo o seu catabolismo em relação ao endosperma normal (Sodek e Wilson, 1970). O mesmo efeito de decréscimo na degradação de lisina também foi observado em um mutante de cevada rico em lisina (Brandt, 1975).

1. METABOLISMO DE LISINA

O endosperma de milho contém grandes quantidades de aminoácidos livres nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente (Arruda e col., 1978) e a possibilidade de uma correlação existente entre a composição de aminoácidos livres e a síntese de proteína no endosperma de milho foi sugerida por estes mesmos autores quando, comparando o milho normal com um duplo mutante (*su2o2*) de alta lisina, verificaram que o conteúdo de zeína apresentou enormes diferenças entre estes dois genótipos, sendo, 7,7 e 6,0 vezes maior no endosperma normal, respectivamente aos 24 e 47 dias após a polinização (dap). A redução na síntese de

zeína no duplo mutante foi associada a um acúmulo de aminoácidos livres, principalmente alanina, glutamina, ácido glutâmico, asparagina e ácido aspártico, que são importantes componentes da zeína, enquanto que o aumento das proteínas (não zeínas) poderia ocorrer em resposta ao aumento dos aminoácidos disponíveis, sendo que a extensão da resposta pode diferir em diferentes linhagens de milho (Sodek e Wilson, 1970).

A origem dos aminoácidos utilizados para a síntese de proteínas em sementes tornou-se um assunto cujo interêsse tem aumentado nos últimos anos e desde que, tem-se demonstrado que a lisina é o primeiro aminoácido nutricionalmente limitante na maioria dos cereais mais comumente empregados na alimentação humana (F.A.O., 1970), o conhecimento sobre o metabolismo deste aminoácido em plantas é de considerável importância.

Até o momento, tem-se estabelecido duas vias básicas para a biossíntese de lisina nos organismos vivos. Uma das vias é a do ácido diaminopimélico (DAP) (Figura 1) que ocorre em bactérias, certos fungos inferiores, algas e plantas superiores (Vogel e col., 1970) e a outra, é a via do ácido alfa-aminoadípico (AAA) e sacaropina (Figura 2) que ocorre em outras classes de fungos inferiores, em alguns fungos superiores, leveduras e Euglenoides (Wade, 1977; Wade e col., 1980; Trupin e Broquist, 1965; Jones e Broquist,

FIGURA 1 - Via biossintética de lisina através do ácido
diamino pimélico (DAP), (Vogel e col., 1970).

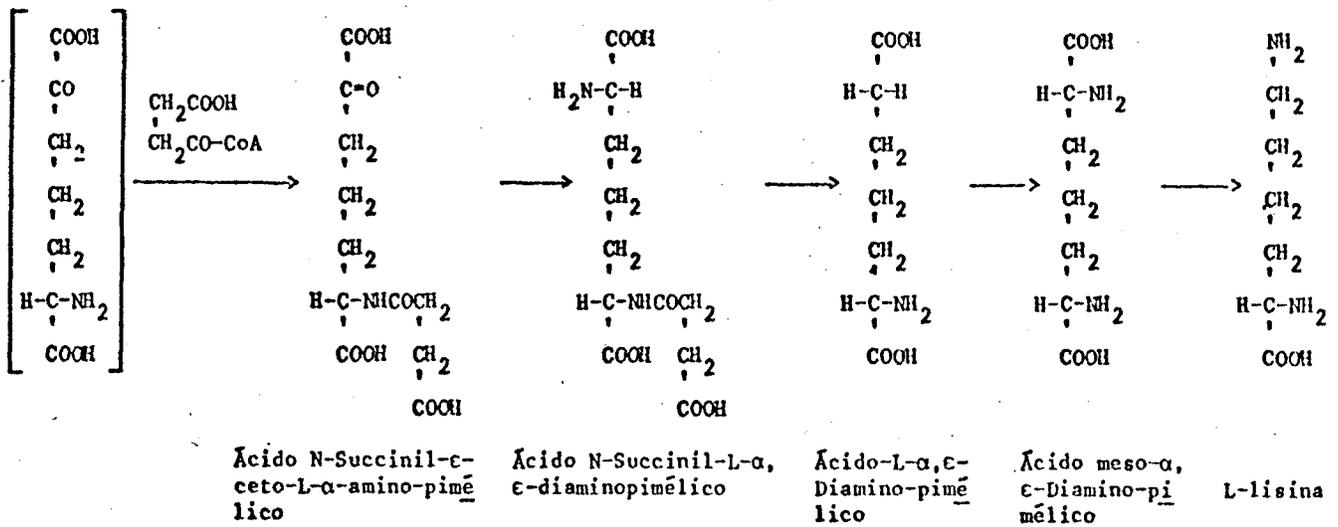
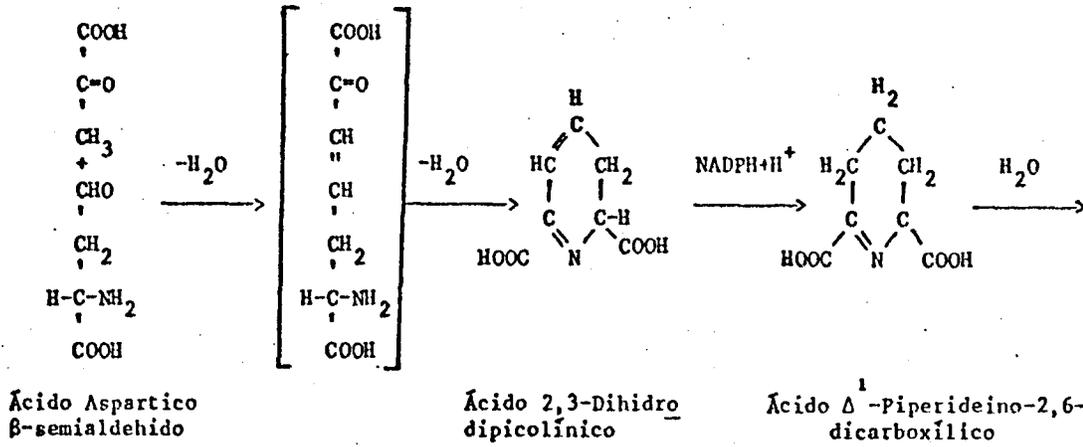
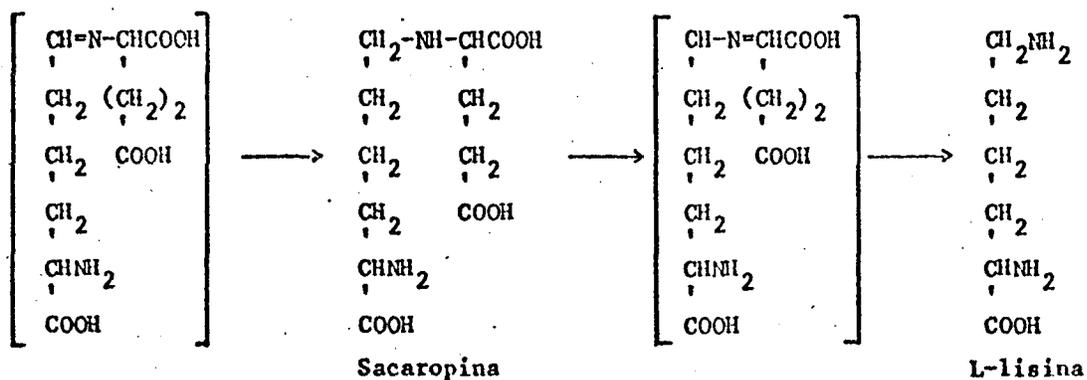
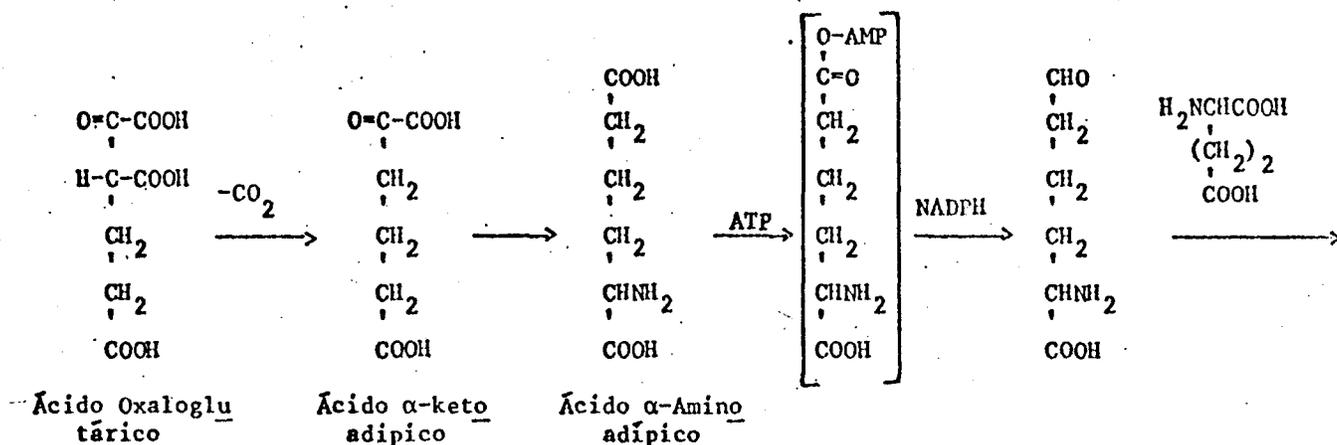
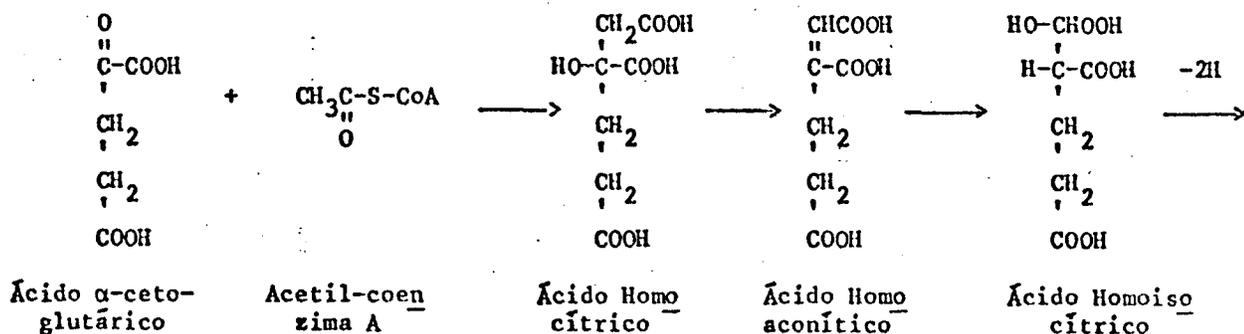


FIGURA 2 - Via biossintética de lisina através do ácido alfa-aminoadípico (AAA), (Vogel e col., 1970).



1965; Saunders e Broquist, 1966; Gaillardin e col., 1979; Vogel e col., 1970).

A suposição de que a via biossintética de lisina em plantas superiores é idêntica à que ocorre em bactérias e fungos está baseada tanto em estudos de incorporação "in vivo" de precursores radioativos da cadeia de biossíntese de lisina, e principalmente na demonstração da ocorrência de enzimas e de produtos intermediários desta via. Os estudos de incorporação "in vivo" dos precursores marcados têm sido realizados pela injeção direta dos mesmos em endospermas de cevada (Moller, 1974), de milho (Sodek, 1976) ou injeção no colmo de plantas de trigo e posterior análise dos endospermas (Bilinski e Mc Connell, 1957; Mc Connel, 1969). Já a demonstração e caracterização de enzimas da via do DAP em plantas superiores têm sido feita por diversos autores. Assim, a enzima diaminopimelato descarboxilase (EC 4.1.1.20), a qual catalisa o último passo desta via, tem sido encontrada em um grande número de tecidos de plantas superiores e extensivamente caracterizada (Shimura e Vogel, 1966; Vogel e Hirvonen, 1971; Mazelis e col., 1976; Mazelis e Creveling, 1976; Sodek, 1978). Da mesma forma, a enzima dihidropicolinato sintase (EC 4.2.1.52) que catalisa o primeiro passo desta via, também tem sido demonstrada e caracterizada em plantas superiores (Cheshire e Mifflin, 1975; Mazelis e col., 1977).

No caso específico de milho, os dados de Sodek (1976, 1978) e de Cheshire e Mifflin (1975) trouxeram fortes evidências de que a biossíntese de lisina, como também de outros aminoácidos, ocorre no endosperma e que a lisina é sintetizada através da via do DAP.

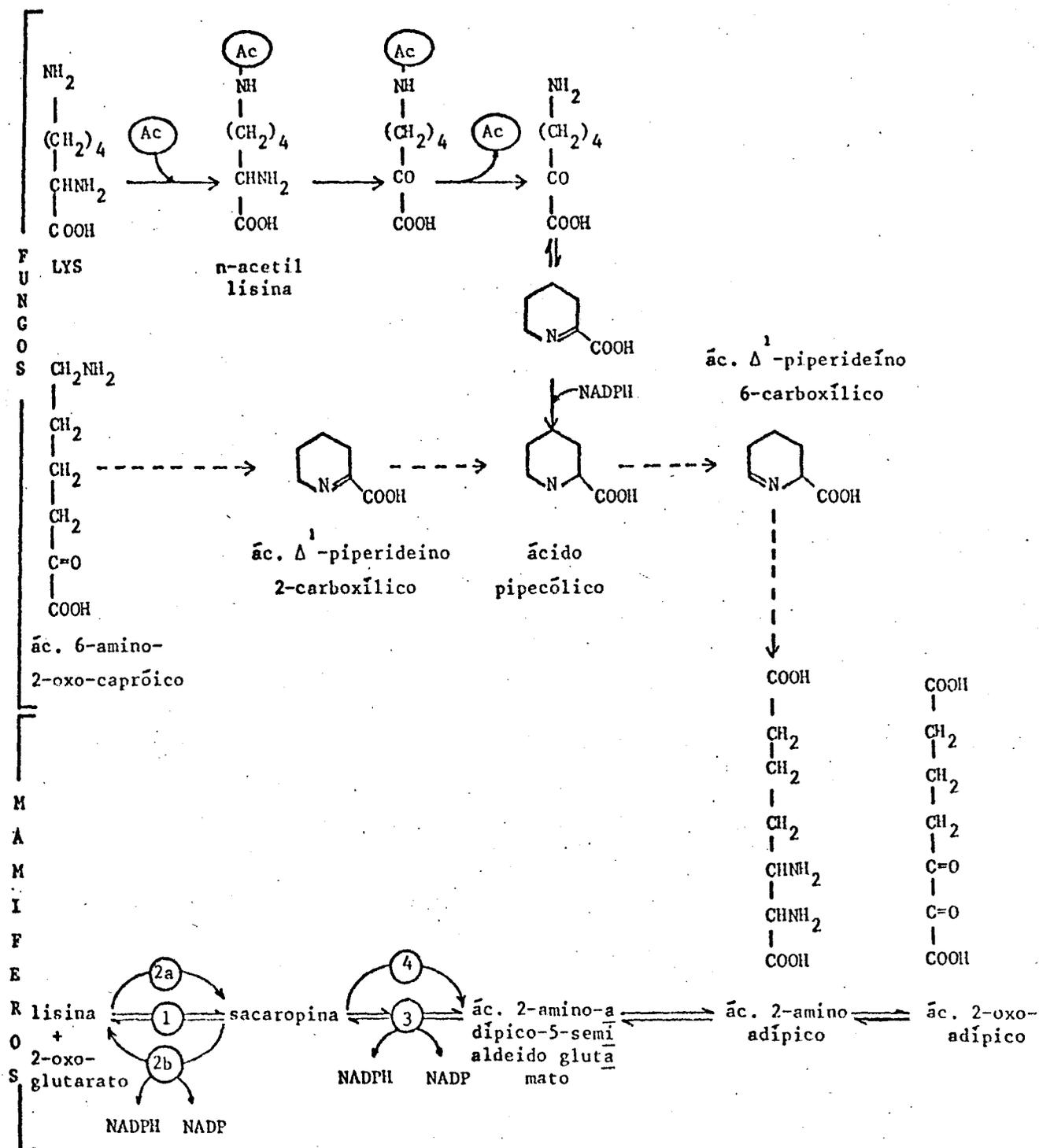
Da mesma forma que a biossíntese, o catabolismo de lisina ainda não está totalmente esclarecido, desde que, tem-se acumulado evidências de que pelo menos quatro vias catabólicas distintas têm sido propostas para fungos e leveduras, microorganismos aeróbicos e anaeróbicos e animais (Rodwell, 1969). Não existe nenhuma evidência de que qualquer uma das vias propostas para os microorganismos aeróbicos e anaeróbicos se aplica às plantas superiores. O fato de que o catabolismo anaeróbico de lisina envolve uma coenzima cobamida, torna improvável qualquer possibilidade de que as plantas superiores utilizem esta via, visto que, os derivados B₁₂ aparentemente não se encontram presentes nestas plantas. A via catabólica proposta para fungos e leveduras, também envolve intermediários que jamais foram encontrados em plantas superiores. Assim, Guengerich e Broquist (1976) descreveram uma rota, via 6-N-acetil lisina nos fungos *Rhizoctonia leguminicola*, *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que Rothstein e Miller (1954) sugeriram que em outros fungos, a lisina pode ser degradada até ácido aminoadípico e crotonil-CoA via ácido piperólico. Por outro lado, a via degradativa utilizada em mamíferos envolve um

número de compostos, os quais têm sido encontrado em plantas superiores, parecendo portanto, ser esta a rota mais provável em plantas. A via catabólica de lisina sugerida para fungos e mamíferos está demonstrada na Figura 3.

Nos mamíferos, a lisina pode ser convertida até alfa-aminoadipato-semialdeído através de duas vias distintas relatadas como passos iniciais do catabolismo de lisina nestes organismos. A primeira via, na qual, a sacaropina é um intermediário, é o reverso dos passos finais da síntese de lisina em fungos e leveduras (Figura 2). A outra via, é idêntica aos três passos iniciais do catabolismo de D-lisina em bactérias (Miller e Rodwell, 1971; Chang e Adams, 1974) e contém pipecolato como intermediário.

Os estudos das desordens hereditárias do metabolismo de lisina têm contribuído enormemente para a elucidação da via degradativa de lisina em mamíferos. Hutzler e Dancis (1968), investigando os passos iniciais desta via, em humanos, demonstraram que uma enzima - lisina-alfa-cetoglutarato redutase (EC 1.5.1.8) - era capaz de catalisar a conversão de lisina e alfa-cetoglutarato em sacaropina "in vitro". A enzima foi extraída, pelos autores, de fígado humano obtido por biópsia, e depois parcialmente purificada. Eles observaram um pH ótimo, para a reação, próximo da neutralidade e um requerimento específico para alfa-cetoglutarato e NADPH como cofator.

FIGURA 3 - Metabolismo de L- lisina em fungos e mamíferos,
(Wade e col., 1980).



- (1) sacaropina desidrogenase (2a) lisina 2-oxoglutarato redutase
- (2b) sacaropina oxidoredutase (3) sacaropina desidrogenase
- (4) sacaropina desidrogenase

Posteriormente, estudos feitos em pacientes com hiperlisinemia (os quais normalmente apresentam elevados níveis de lisina sérica) confirmaram que estes pacientes têm uma deficiência em lisina-alfa-cetoglutarato redutase e portanto, um bloqueio metabólico nos primeiros passos degradativos de lisina (Dancis e col., 1969).

A presença de sacaropina em fluídos fisiológicos humanos foi também relatada, primeiramente por Carson e colaboradores (1968), que descreveram um caso de sacaropinúria. Mais tarde, os estudos de pacientes que sofriam de sacaropinúria (Fellows, 1972, citado por Fellows, 1973) revelaram que esta desordem metabólica é causada pela ausência de uma enzima - sacaropina desidrogenase (EC 1.5.1.9) - que converte sacaropina em alfa-aminoadipato-delta-semialdeído e glutamato. Higashino e colaboradores (1965) já haviam encontrado que homogenados de fígado de rato eram capazes de oxidar sacaropina na presença de NAD^+ até o ácido alfa-aminoadípico-delta-semialdeído, o qual foi considerado como intermediário instável e que deveria ser imediatamente oxidado até o ácido alfa-aminoadípico. Esta enzima, sacaropina desidrogenase, foi purificada 120 vezes por Hutzler e Dancis (1970) que encontraram um pH ótimo entre 8,8 e 9,0 e um requerimento de NAD^+ e sacaropina.

A identificação de uma outra enzima - sacaropina oxidoredutase - que catalisa a hidrólise de sacaropina até lisina e alfa-cetoglutarato foi feita por

Wang e Lewis (1972) e Felows (1973). A enzima foi purificada 29,4 vezes por Felows (1973), de fígado de boi e apresentou um pH ótimo de 9,2 e um requerimento específico de NADP⁺ como cofator. Fígados de diferentes mamíferos foram testados para as atividades de lisina-alfa-cetoglutarato redutase, sacaropina oxidoredutase e sacaropina desidrogenase (Felows e Lewis, 1973). A atividade da primeira enzima foi detectada em todas as espécies estudadas, da mesma forma que a atividade de sacaropina desidrogenase, embora sempre em níveis mais baixos que esta, implicando que sob condições fisiológicas normais, a sacaropina deve ter uma alta taxa de "turnover". Embora a atividade de lisina oxidoredutase tenha sido detectada "in vitro", o efeito "in vivo" não é conhecido, mas existem indicações de que ela tenha efeitos relativos à dieta alimentar.

Continuando os estudos das deficiências metabólicas hereditárias na via degradativa de L-lisina, Dancis e colaboradores (1976) e Cederbaum e colaboradores (1979) encontraram defeitos enzimáticos múltiplos em alguns pacientes com hiperlisinemia familiar, ou seja, estes pacientes apresentaram deficiência das três atividades enzimáticas referidas acima. Estes resultados vieram mais uma vez fornecer evidências para a via degradativa de lisina com sacaropina como intermediário.

As enzimas lisina-cetoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase já foram também purificadas de

placenta humana, respectivamente, 450 e 380 vezes por Fjellstedt e Robinson (1975a,b), e caracterizadas em fígado humano, num estado de purificação parcial de 45 vezes por Hutzler e Dancis (1975). Em outros órgãos como músculo, cérebro, baço, pâncreas, pulmão, intestino, glândula supra renal ou em leucócitos e eritrócitos, somente foram detectados traços destas atividades. Mas, enquanto em mamíferos as enzimas acima catalisam reações distintas relacionadas à degradação de lisina, e nenhuma destas atividades é reversível (Fellows e Lewis, 1973), encontrou-se que em fungos, leveduras e *Neurospora crassa*, a mesma enzima - sacaropina desidrogenase - pode ser responsável tanto pela síntese como pela degradação de lisina (Trupin e Broquist, 1965; Saunders e Broquist, 1966; Wade e col., 1980) (Figura 3). Segundo Saunders e Broquist (1966) a reação catalisada pela sacaropina desidrogenase representa o evento terminal da biossíntese de lisina nestes organismos, que "in vitro" ocorre em pH alcalino. Já a reação inversa exibe um pH ótimo "in vitro" próximo da neutralidade e deve ocorrer "in vivo" somente sob condições específicas, por exemplo, de lisina como única fonte de nitrogênio no meio (D.M.Thomson, citado por Wade e col., 1980).

Recentemente, o metabolismo de L-[U-¹⁴C] lisina, também foi estudado em tecidos humanos usados para autópsia, e em macacos, por injeções intracerebroventricular e intravenosa (Chang, 1982). Os tecidos humanos, principalmente cérebro e rim, se apresentaram mais ativos em

converter lisina à pipecolato do que previamente descrito para tecidos de rato e fígado humano. Nos macacos, vinte e quatro horas após a injeção intraventricular, encontrou-se quantidades substanciais de pipecolato e alfa-aminoadipato marcados no cérebro e medula espinhal e quantidades muito menores no rim, fígado e plasma. A injeção intravenosa mostrou níveis muito reduzidos de metabólitos marcados em todos os órgãos e no plasma. Estes resultados são consistentes com os relatados anteriormente de que em cérebro de mamíferos o catabolismo de lisina via sacaropina parece ser inativado (Higashino e col., 1965; Hutzler e Dancis, 1968; Hutzler e Dancis, 1970).

Em resumo, a via de sacaropina parece ser a principal rota para o catabolismo de L-lisina até alfa-aminoadipato no fígado, enquanto que a via do pipecolato, pode ter alguma contribuição para o catabolismo de L-lisina em cérebro e rim.

Os estudos do catabolismo de lisina em plantas superiores têm sido realizados através de experimentos de incorporação de lisina ou outros intermediários marcados, embora já existam também alguns trabalhos realizados com sistemas enzimáticos livres de células. Existe considerável evidência de que a rota para aminoadipato semialdeído via ácido pipecólico seja bastante comum em plantas superiores particularmente nos membros das Leguminosae. O ácido L-pipecólico tem sido

encontrado em grandes quantidades como um aminoácido não-proteico em um grande número de espécies e foi isolado de *Phaseolus vulgaris* (Grobbelaar e col., 1954). Em extratos de *Pisum sativum* e *Phaseolus radiatus* (Meister e col., 1957) observou-se a redução enzimática de 1-piperideína-2-carboxilato por NAD(P)H até L-pipecolato. Outros experimentos com *Acácia* (Fowden, 1960) e com *P. sativum* (Mann e Smithies, 1955) também demonstraram, respectivamente, a conversão de lisina até ácido pipecólico e alfa-aminoadipato e de lisina diretamente até alfa-aminoadipato semialdeído.

Deste modo, a evidência para a conversão de L-lisina até ácido pipecólico e alfa-aminoadipato está bem estabelecida. Entretanto todos os estudos acima foram realizados com membros das Leguminosae, uma família na qual o ácido pipecólico é bastante comum como metabólito secundário. Estudos feitos posteriormente com *Nicotiana glauca* e *Sedum acre* usando-se precursores duplamente marcados, mostraram que o ácido pipecólico é proveniente somente da D-lisina (Leistner e col., 1973).

Poucos estudos têm sido realizados com plantas da família Graminae. Nigam e Mc Connell (1963) infiltraram plântulas de trigo de 3 semanas com L-[1-¹⁴C] lisina e DL-alfa-amino [6-¹⁴C] adipato e depois de 5 horas extraíram o tecido com etanol. Deste modo, encontraram que a lisina fornecia ¹⁴C em grandes quantidades para o ácido

pipecólico e alfa-aminoadipato e a seguir, para o glutamato. Estes resultados pareciam indicar que, se Leistner e colaboradores (1973) estavam corretos, as plântulas de trigo deveriam racemizar a L-lisina durante o seu metabolismo.

Mais tarde, Moller (1976) examinou o catabolismo de lisina através da injeção de vários compostos especificamente marcados em endospermas de plantas de cevada. Através da utilização de L-[U- 14 C] lisina, L-[14 C] sacaropina e 2,6, diamino [1,7- 14 C] pimelato, ele demonstrou que a via catabólica nesta planta se procede via sacaropina e alfa-aminoadipato-semialdeído. A formação de ácido pipecólico marcado também não foi observada, a menos que a DL-[1- 14 C] lisina fosse injetada, conforme as conclusões de Leistner e colaboradores (1973). Assim, parece que em plantas não-leguminosas, a lisina pode ser degradada via sacaropina, que é o reverso da via biossintética em fungos (Figura 2). Outras evidências do provável papel do alfa-aminoadipato e sacaropina no catabolismo de lisina em plantas superiores foram dadas por Nawaz e Sorensen (1973), que demonstraram a ocorrência bastante comum destes compostos nas partes verdes de nove famílias de plantas.

Alguns estudos sobre o metabolismo de lisina foram realizados em endospermas de milho, onde este aminoácido é limitante. Existem duas possibilidades de origem da lisina durante o desenvolvimento deste tecido.

Uma das possibilidades é através da biossíntese deste aminoácido pela via do aspartato (Sodek, 1976; Henke e Wahnbaeck, 1977 e 1979; Gengenbach e col., 1978), enquanto que, a outra possibilidade foi sugerida por Arruda e Silva (1979) onde a lisina seria translocada, em parte já pré-formada, de outros tecidos da planta, para o endosperma via seiva vascular, isto devido à considerável quantidade de lisina encontrada na seiva vascular do pedúnculo da espiga em desenvolvimento. Quando [^{14}C] lisina foi fornecida ao endosperma via seiva vascular, Sodek e Wilson (1970) observaram que ela era convertida em outros aminoácidos tais como, ácido glutâmico e prolina, o que trouxe fortes evidências da ocorrência de catabolismo desse aminoácido no endosperma. Comparando as quantidades de lisina encontrada na seiva vascular da espiga com o conteúdo de lisina no endosperma, Silva e Arruda (1979) sugeriram que a maior parte da lisina translocada para o endosperma deveria ser catabolizada.

Em continuação a estes estudos com endospermas de milho em desenvolvimento, recentemente, Arruda e colaboradores (1982), detectaram uma enzima que converte lisina em sacaropina. A enzima - lisina-cetoglutarato redutase - neste tecido, cataboliza a reação:

$$\text{Lisina} + \text{alfa-cetoglutarato} + \text{NADPH} \longrightarrow \text{sacaropina} + \text{NADP}^+$$

Em endospermas imaturos, esta enzima apresentou altos níveis de atividade a pH neutro e alta

especificidade tanto para o cofator NADPH, como para seus substratos lisina e alfa-cetoglutarato. A exemplo do que ocorre em mamíferos, supõe-se que ela deva participar do primeiro passo da via catabólica de lisina em endospermas de milho.

Visando correlacionar a atividade de lisina-cetoglutarato redutase com certos aspectos do metabolismo do endosperma, Arruda e Silva (1983) verificaram que a atividade da enzima aumenta acentuadamente com o início do desenvolvimento da semente, atinge um pico ao redor de 20 dias após a polinização (dap) e diminui em seguida em direção à maturidade do endosperma. Os autores verificaram também que o pico de atividade da enzima coincide com o período de maior acúmulo de nitrogênio e maior síntese de zeína no endosperma. Além disso, a atividade de lisina-cetoglutarato redutase parece ser tecido específica, pois não foi encontrada atividade em outros tecidos da plântula tais como, raiz e folha (Leite, 1988).

Desde que, a análise dos aminoácidos do exudato do sistema vascular da espiga demonstrou uma quantidade de lisina no exudato, duas vezes maior do que aquela necessária para a síntese de proteínas do endosperma, Arruda e Silva (1983), sugeriram uma possível associação da lisina-cetoglutarato redutase com a degradação do excesso de lisina translocado para o endosperma, durante o desenvolvimento da semente. Isso porque a alta velocidade de

síntese de zeína utilizaria pouca lisina para a síntese de proteínas, sendo que o acúmulo de lisina seria então prevenido pela atividade da lisina-cetoglutarato redutase.

Estudos mais recentes com esta enzima, demonstram que o gene *opaco-2* altera drasticamente sua atividade durante o desenvolvimento da semente. Esses mesmos resultados foram também observados por Hadzi e Sukalovic (1984). Esses dados sugerem que a lisina-cetoglutarato redutase está sob controle do gene *opaco-2*, indicando que o catabolismo de lisina pode ser um passo importante pelo qual o gene *opaco-2* aumenta o conteúdo desse aminoácido no endosperma de milho (Arruda e col., 1984).

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo desta tese, é fornecer subsídios para o esclarecimento do papel funcional da enzima lisina-cetoglutarato redutase no metabolismo de lisina durante o desenvolvimento do endosperma de milho.

Desde que trabalhos anteriores (Arruda e col., 1984; Hadzi e Sukalovic, 1984) indicavam um importante papel de controle do gene *opaco-2* sobre a enzima em estudo, utilizamos nesta tese uma linhagem de milho homozigota para endospermas normais e mutantes *opaco-2*, afim de que

pudéssemos, através de um estudo comparativo, conhecer o comportamento da enzima nestas duas versões genotípicas da mesma linhagem e determinar suas características moleculares e físicos-químicas, através de cromatografia em colunas de DEAE - celulose, gradientes de sacarose e eletroforese em géis de poliacrilamida.

Finalmente, tínhamos por objetivo a purificação da enzima e a produção de anticorpos contra a mesma, a fim de utilizá-los em estudos de imunoeletroforese e principalmente, de possibilitar a utilização destes anticorpos na elaboração de uma metodologia de seleção de mutantes com ausência de atividade de lisina-cetoglutarato redutase e portanto com alto teor de lisina, mas com características normais de sementes.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção do material de estudo

Para o trabalho em questão, utilizou-se uma linhagem isogênica de milho - L1038 - nas duas versões: normal e opaco-2.

A linhagem 1038 é derivada de uma população Tuxpeno e seus grãos, na versão normal, apresentam as seguintes características: dentado, consistência normal e cor amarela, enquanto que os grãos da versão opaco-2 têm consistência farinácea e cor amarelo-esbranquiçado. Esta linhagem foi obtida no Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da Unicamp e tem sido mantida através de auto-fecundação manual das plantas, utilizando-se para isto, somente a primeira espiga por ser ela prioritária no consumo de fotossintatos depois da panícula. O gene opaco-2 foi transferido de uma linhagem americana para a linhagem em estudo por meio de retrocruzamentos sucessivos.

As sementes das duas versões, normal e opaco-2, foram plantadas na Área Experimental da Unicamp, em linhas alternadas e adjacentes de 10 m de comprimento, com o espaçamento de 1 m entre linhas e 20 cm entre planta numa densidade de plantio de 50.000

plantas/ha. O experimento foi fertilizado com N, P_2O_5 e K_2O em quantidades de 60, 80 e 30 Kg/ha, respectivamente.

O material (somente espigas) foi coletado aos 15, 20, 25, 30 e 35 dias após a polinização (dap) e armazenado em freezer a $-20^{\circ}C$.

2. Ensaio de LKR

A atividade de lisina-cetoglutarato redutase (LKR, EC 1.5.1.8) foi medida pela incubação (feita em cubetas de plástico descartáveis de 1 ml), durante 30 minutos a $30^{\circ}C$, de uma mistura contendo 100 mM do tampão fosfato de potássio pH 7,0; 10 mM do ácido alfa-cetoglutarico neutralizado com KOH, 20 mM de lisina, 100 μ M de NADPH e a preparação da enzima (50-200 μ g de proteína) num volume final de 1 ml. A queda de absorbância em 340 nm, devido à oxidação do NADPH foi verificada de 10 em 10 minutos ou de 15 em 15 minutos, durante os 30 minutos, quando normalmente a reação é linear com o tempo. A atividade da enzima foi calculada a partir da média (entre duplicatas) da diferença entre a absorbância no tempo zero e a absorbância em 30 minutos, descontando-se os brancos (reação ocorrida na ausência do substrato lisina), levando-se em conta que $E^{0,1\text{mM}} = 0,622$ (340 nm) para o NADPH, ou seja, que a absorbância de uma solução de 0,1 mM de NADPH em 340 nm = 0,622. A atividade específica da enzima foi dada em nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

3. Preparação dos extratos celulares

No momento da preparação dos extratos celulares, as espigas eram retiradas do freezer, e uma quantidade suficiente de sementes eram retiradas muito rapidamente com o auxílio de uma pinça e colocadas sobre gelo. As espigas eram recolocadas no freezer caso ainda contivessem sementes. Das sementes, eram descartados manualmente, com o auxílio de um bisturi, o pericarpo e o embrião. A seguir, os extratos celulares eram preparados à partir dos endospermas imaturos, os quais eram homogeneizados, a não ser onde indicado diferente, na proporção de 1 endosperma : 1 ml do Tampão A (fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo 1 mM de EDTA e 1 mM de 2-mercaptoetanol) ou Tampão B (fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 contendo 1 mM EDTA, 5 mM de 2-mercaptoetanol ou 1 mM de DTT e 15% de glicerol) em aparelho tipo "mixer" da marca SUPEROHM. As suspensões obtidas eram sempre filtradas em gaze (4 camadas) umedecida com o tampão de extração gelado e os homogeneizados eram centrifugados por 10 minutos a 14.600 X g ou 20 minutos a 22.000 X g em rotor JA-20 180.0 da centrífuga Beckman. Nos casos em que se trabalhou com grandes volumes de extratos preparados em tampão contendo 15% de glicerol, o rotor utilizado foi o JA-14 137.0 da mesma centrífuga. Os sobrenadantes obtidos, denominados de FRAÇÃO I (FI) eram logo a seguir submetidos ao fracionamento com sulfato de amônio ou utilizados como indicado. Todo o material e soluções usadas foram mantidas entre 0 e 4°C.

4. Fracionamento em sulfato de amônio

Para a determinação de qual faixa de saturação com o sal poderia ser encontrada a maior atividade da enzima, foram feitas duas extrações idênticas do material L1038 normal de 20 dap em Tampão A, como descrito no ítem 3 acima (15 endospermas/preparação). A FRAÇÃO I de cada preparação foi tratada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quantidades crescentes de 0 a 80% , sendo um dos extratos, tratado de 0 - 20% , 20 - 40% , 40 - 60% e 60 - 80% e o outro de 0 - 30% , 30 - 50% e 50 - 70% . Os precipitados obtidos em cada uma das frações eram removidos por centrifugação de 10 minutos a 14.000 X g em rotor JA-20 180.0 , ressuspensos em 1,5 ml do tampão de extração e dessalinizados em coluna de Sephadex G-25 (1,5 X 8,5 cm) equilibradas com o mesmo tampão. O volume vazio de cada coluna (6,5 ml) era descartado e a fração coletada em 2,5 ml. Alíquotas de 50 ul de cada fração foram utilizadas para os ensaios de LKR. Os resultados obtidos das duas preparações foram superpostos a fim de se obter o resultado final. Cada experimento foi repetido no mínimo por duas vezes.

Após determinação da faixa de saturação onde se concentrava a maior atividade de LKR - entre 35-60% - as FRAÇÕES I (FI) passaram a ser saturadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 35% e centrifugadas como descrito acima. Os precipitados eram desprezados e os sobrenadantes saturados até 60% com o sal. Os precipitados desta fração, obtidos por centrifugação, eram sempre ressuspensos em mínimo

volume do tampão de extração e a seguir dessalinizados em colunas de Sephadex G-25 (1,5 X 11 cm; $V_0 = 8,0$ ml) ou (1,5 X 20 cm; $V_0 = 14,6$ ml) equilibradas em tampão de extração, sempre na ausência de glicerol. A fração de 35-60% (FII), dessalinizada era coletada num volume de 2,0-4,0 ml ou 9,0-11 ml conforme a coluna especificada acima e logo utilizada para os ensaios de LKR e/ou para outros experimentos.

5. Estudos de algumas variáveis sobre a atividade de LKR

5.1 - Influência do pH

Para estes experimentos, utilizou-se preparações de 20 endospermas de 20 dap da versão normal, em Tampão A como descrito no item 3 acima. Alíquotas de 50 μ l da FII (proveniente da saturação de 0-35% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), que continham ao redor de 5 mg/ml de proteína, foram utilizadas para os ensaios de atividade da enzima realizados na faixa de pH entre 5,0 e 9,0 com três diferentes tampões a uma concentração de 100 mM no ensaio: acetato de sódio pHs 5,0 e 5,5; fosfato de potássio pHs 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e Tris-HCl pHs 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0

5.2 - Efeito da temperatura e da adição de agentes protetores sobre a estabilidade da enzima em extratos

Vinte endospermas normais de 20 dap foram, macerados em Tampão A ou Tampão B, de acordo com o ítem 3, acima. A fração FII (4 ml) foi dividida em várias alíquotas, as quais foram colocadas, separadamente durante 5 minutos, em diferentes temperaturas: 0°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C. Após o tratamento térmico, tomou-se de cada uma destas alíquotas, 50 ul para ensaio de LKR, sempre feito em duplicatas. Duas outras alíquotas foram armazenadas separadamente, uma no freezer a -20°C (alíquota FII_f ou FII_f*, preparada respectivamente em Tampão A ou Tampão B) e outra na geladeira (FII_g e FII_g*, relativamente ao Tampão A ou Tampão B), a fim de se verificar a estabilidade da preparação em diferentes tampões.

6. Estudos cinéticos

6.1 - Determinação de Km para lisina e alfa-cetoglutarato

Para estes experimentos utilizou-se alíquotas de 50 ul/ensaio da FII obtida de preparações de 50 endospermas normais e

opaco-2 de 22 dap homogeneizados em Tampão B, os quais continham respectivamente 2,49 e 5,16 mg/ml de proteína, e atividades específicas de 11,75 e 0.43 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Para a determinação do Km para lisina foram utilizadas as concentrações de 120, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 mM de lisina final no ensaio, contra diferentes concentrações fixas de alfa-cetoglutarato: 5, 10, 20 e 40 mM. As concentrações dos outros reagentes foram mantidas nos valores usuais de ensaio.

Para a determinação do Km para alfa-cetoglutarato foram testadas as concentrações de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, e 0 mM de alfa-cetoglutarato final no ensaio contra diferentes concentrações fixas de lisina: 120, 80, 40 e 20 mM. Também neste caso, manteve-se as concentrações dos outros reagentes nos valores usuais de ensaio.

Os gráficos foram expressos em velocidade da enzima (V) como atividade específica - nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ - versus concentração do substrato [S]. Os valores de Km foram calculados através de análise em computador pelo método de Wilkinson (1961).

6.2 - Estudo de inativação da enzima frente à baixas concentrações dos substratos - lisina e alfa-cetoglutarato

Nestes experimentos, 25 endospermas normais e mutantes de 22 dap, foram homogeneizados em Tampão B e tratados, como descrito anteriormente nos ítem 3 e 4, até obtenção das FII. As quantidades de proteína e as atividades específicas destas duas frações eram, respectivamente, de 2,91 mg/ml e 7,22 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, para o material normal e 4,97 mg/ml e 2,65 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, para o material opaco-2. Os ensaios foram iniciados com 50 ul destes extratos, na presença de 0,625 mM de lisina ou de alfa-cetoglutarato e incubados a 30°C durante 10 minutos. Após este período, eram adicionados aos ensaios, pequenos volumes que elevassem a concentração final dos mesmos para 40 mM de lisina ou 10 mM de alfa-cetoglutarato. A queda na absorbância a 340 nm foi acompanhada de 5 em 5 minutos nos primeiros 10 minutos e a seguir de 10 em 10 minutos nos últimos 20 minutos de reação. Tanto os ensaios, como todos os controles e brancos, foram feitos em duplicatas.

6.3 - Estudos de inibição pelo produto - sacaropina

Tanto os extratos utilizados aqui, como as quantidades, foram os mesmos descritos logo acima. Os ensaios foram preparados e dosados de maneira usual, exceto que, a eles, acrescentou-se quantidades de sacaropina suficientes para obtenção de concentrações finais de ensaio de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mM.

7. Eletroforese em géis de poliacrilamida não-denaturantes (PAGE). Caracterização da banda de LKR.

7.1 - Confeção dos géis não-denaturantes

Os experimentos de eletroforese (em cuba vertical) em sistema de tampões descontínuos e não-denaturantes foram realizados a pH neutro de acordo com as instruções de Hames e Rickwood (1981). Os géis foram preparados em tamanho normal de (9 X 12)cm com um gradiente de acrilamida de 5-10% ou, onde indicado, a uma concentração fixa de 6% de acrilamida no gel de resolução. Como catalizador utilizou-se a riboflavina a 0,005 mg/ml final por mistura de gel ou o persulfato de amônio a 0.035% final por mistura do gel de resolução.

Os tampões e reagentes utilizados, estão especificados abaixo, onde o "empilhamento" das proteínas é feito a pH 7,0, e a separação em pH 8,0.

a) Preparação dos géis de resolução -
Gradiente ou Concentração fixa de
Acrilamida

SOLUÇÕES ESTOQUES	GRADIENTE		CONC. FIXA
	5%	10%	6%
- Acrilamida:Bisacrilamida(30:0,8)...	1,67 ml	3,33 ml	6,0 ml
- Tampão de resolução:			
- Tris-HCl 0,565 M pH 7,5.....	1,25 ml	1,25 ml	3,75 ml
- Riboflavina 5 mg/ml	10 ul	10 ul	30 ul
ou			
(Persulfato de amônio 1,5%).....	(0,23 ml)	(0,23 ml)	(1,5 ml)
- Glicerol 87%.....	1,15 ml		
- H ₂ O q.s.p.....	10 ml	10 ml	30 ml
- TEMED.....	3,3 ul	3,3 ul	20 ul

b) Preparação do gel de empilhamento:

SOLUÇÕES ESTOQUES

- Acrilamida:Bisacrilamida(30:0,8).....1,25 ml
- Tampão do gel de empilhamento:
(Tris-Fosfato 0,408 M pH 5,5-acertado com H_2PO_4) .2,5 ml
- Riboflavina 5mg/ml.....10 ul
- ou
- (Persulfato de amônio 1,5%)(0,75 ml)
- H_2O q.s.p.....10 ml
- TEMED.....15 ul

c) Tampão do Reservatório:

- Barbital 30 mM (5,52 g/l) e Hepes 4,2 mM (1.0 g/l) a pH 7,5 ajustado com NaOH (tampão usado sem diluir).

d) Tampão de Amostra:

- Em todos os experimentos, as amostras foram colocadas no gel no próprio tampão de extração da enzima, acrescidas de 10% de sacarose e de 0,002% de Azul de Bromofenol, quando necessário.

A polimerização dos géis preparados com Riboflavina era feita sob incidência de luz fluorescente de 15 watts, durante 30 minutos em cada parte do gel (resolução e empilhamento).

Para os experimentos de detecção de proteína no gel utilizou-se cerca de 10-150 ug de proteína/canal do gel, enquanto que, para a detecção da banda da enzima LKR foram utilizados de 100-400 ug de proteína/canal.

Todos os materiais, soluções e inclusive a corrida em eletroforese eram mantidos entre 0 e 4°C, em geladeira, para que não ocorresse denaturação da enzima, durante a realização do experimento. O gel era submetido a uma voltagem constante de 120 volts (amperagem = 40 mA inicial) e a duração da corrida era em torno de 4 a 6 horas. Terminada a corrida, o gel era cuidadosamente retirado da placa e dependendo se o gel fosse, respectivamente, revelado para a atividade da enzima LKR ou corado para proteína, ele era ou não, lavado duas vezes com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 gelado.

A fixação de proteínas no gel era feita por um período de 0,5 a 2 horas com a seguinte mistura:

SOLUÇÃO CORANTE:

- Comassie Blue R-250..... 2,5 g
- Metanol 50 %..... 908 ml
- Acido acético glacial..... 92 ml

Posteriormente, o gel era descorado na seguinte solução:

SOLUÇÃO DESCORANTE:

- Metanol P.A.....300 ml
- Acido acético glacial.....70 ml
- H₂O destilada.....630 ml

A mobilidade relativa (R_f) das proteínas, ou da enzima, era calculada dividindo-se a distância de migração destas, ou pela distância da frente de corrida do gel, visualizada pela posição do corante Azul de Bromofenol no gel ou pelo tamanho total do gel (quando era permitido que o Azul de Bromofenol saísse completamente do gel, no caso dos géis de gradiente).

7.2 - Detecção da atividade de LKR em PAGE

A banda da enzima LKR podia ser visualizada no gel descrito acima (preparado com riboflavina) por um processo semelhante ao descrito por Susor e Rutter (1971). Para isto, assim que fosse terminada a corrida, o gel era lavado com tampão gelado como descrito logo acima e incubado por 1,5 horas a 30°C em 20 ml da mistura de reação para a enzima contendo: tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, lisina 20 mM, alfa-cetoglutarato (a pH 7,0) 10 mM e NADPH 500 µM. Depois deste tempo, o gel era lavado, sob agitação lenta, durante 10 minutos com tampão, para que se pudesse retirar o excesso de NADPH não impregnado no gel e logo a seguir, colocado sobre um transiluminador de luz UV onde era então, rapidamente fotografado, com filme de 400 ASA Tri-X-Pan com o auxílio de um filtro laranja.

A visualização da banda de LKR no gel, sob luz UV é possível devido ao fato de que seu substrato, NADPH, fluoresce (em UV) enquanto que o produto da reação, NADP+, não. Deste modo, enquanto que a maior parte do gel, impregnado com NADPH fica fluorescente, quando colocado sobre uma fonte de luz UV, a região onde se encontra a banda da enzima LKR, não vai apresentar fluorescência por que todo o NADPH existente ali foi logo oxidado pela enzima até NADP+.

Devido à possível ocorrência de variações dos valores de R_f entre uma corrida e outra e para minimizar este tipo de erro, estes experimentos eram feitos em duplicatas num mesmo gel de modo que, logo após a corrida, este podia ser dividido de tal forma que parte do gel podia ser submetida à fixação das proteínas e parte podia ser revelado para a atividade da enzima.

8. Eletroforese em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS)

A metodologia de eletroforese em sistema de tampões descontínuos e dissociantes, descrita por Laemmli (1970), foi utilizada com diferentes objetivos durante a realização deste trabalho, sendo eles: a) observação do perfil de bandas obtidos através desta metodologia, em comparação com a metodologia anterior (PAGE) para o material normal e opaco-2, nos vários tratamentos realizados; b) acompanhamento do estado de purificação da enzima LKR durante todas as etapas de purificação da mesma e c) determinação do peso molecular relativo (M_r) da enzima.

Como em PAGE, os géis também foram feitos em tamanho normal e com um gradiente de acrilamida de 5 a 20%. O catalizador usado foi sempre o persulfato de amônio.

Os tampões e reagentes utilizados estão especificados abaixo, como se segue:

a) Gel de resolução (vol. final = 20 ml)

SOLUÇÕES ESTOQUES	Mist.de 5%	Mist. de 20%
- Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8).....	1,66 ml	6,66 ml
- Tampão de resolução:		
Tris-HCl 3M pH 8,8.....	1,24 ml	1,24 ml
- SDS 10%.....	0,10 ml	0,10 ml
- Persulfato de amônio 1,5%.....	0,24 ml	0,24 ml
- Glicerol 87%	1,15 ml	1,15 ml
- H ₂ O q.s.p.....	10 ml	10 ml
- TEMED.....	3,30 ul	3,30 ul

b) Gel de empilhamento

SOLUÇÕES ESTOQUES	
- Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8).....	1,30 ml
- Tampão de empilhamento:	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	2,50 ml
- SDS 10%	0,10 ml
- Persulf. de amônio.....	0,75 ml
- H ₂ O.....	5,35 ml
- TEMED.....	10 ul

c) Tampão do reservatório:

- Tris-glicina 0,0125 M pH 8,3 contendo 0,1% de SDS (3,0 g de Tris-base; 14,4 g de glicina; 10 ml de SDS 10% e H₂O q.s.p. 1 litro, usado sem diluir).

d) Tampão de amostra (2 X concentrado):

- Tampão do Reservatório (acima).....4,0 ml
- SDS 10%.....2,5 ml
- 2-mercaptoetanol 100%0,5 ml
- Azul de Bromofenol 0,2%.....0,05 ml
- H₂O q.s.p.....10 ml

Este tampão era guardado a -20°C em alíquotas de 1 ml.

A quantidade de proteína colocada por pocinho, nestes géis variava entre 10-100 ug, dependendo da metodologia de fixação de proteínas que iria ser usada a seguir ou do objetivo final do experimento.

A corrida em PAGE-SDS foi sempre realizada à temperatura ambiente sob voltagem constante de 50 V no gel de empilhamento e de 100 V no gel de resolução.

8.1 - Outros métodos de fixação de proteínas em géis de poliacrilamida

Normalmente, a fixação de proteínas em PAGE ou PAGE-SDS foi sempre feita como descrito no item 7.1 acima, mas dependendo da sensibilidade requerida ou do objetivo do experimento, também foram utilizados, respectivamente, os seguintes métodos: a) Metodologia de fixação com a associação Comassie Blue-Prata, descrita por De Moreno e colaboradores (1985) e b) Fixação com KCl 0,25 M descrita por Hager e Burges (1980).

9. Cromatografia de troca iônica em DEAE - celulose

Nos experimentos de cromatografia de troca iônica do material normal e opaco-2, procurou-se aplicar às colunas extratos um pouco mais purificados e para tanto, o procedimento usado foi o seguinte: 60 endospermas de 22 dap (de cada material) foram homogeneizados em 35 ml do Tampão B; os homogenados foram filtrados em gaze e submetidos a uma centrifugação de 3.000 X g (Rotor JA-20), por 10 minutos a 4°C, para remoção dos restos celulares. Os sobrenadantes foram a seguir submetidos à centrifugação de 105.000 X g em rotor 70 Ti (Centrífuga Beckman - Ultra Model LB - 80 M) por

1 hora a 4°C e estes sobrenadantes fracionados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A fração entre 35-60% de cada material, obtida por centrifugação a 22.000 X g, era ressuspensa em 1 ml, coletada após dessalinização em 3,5 ml e diluída (1:1), em Tampão B, para uma concentração de proteína ao redor de 3 mg/ml, para posterior aplicação às colunas (5 X 0,9 cm) de DEAE-celulose, previamente montadas e equilibradas em Tampão B. As quantidades de proteínas colocadas nas colunas foram de 22,23 e 22,26 mg respectivamente para o material normal e opaco-2. Seguindo-se a colocação das amostras, as colunas foram lavadas com o Tampão de equilíbrio (50-60 ml) até obtenção de absorvância a 280 nm, menor que 0,05 e então, a eluição era feita com gradientes lineares (60 ml) de 0-0,5 M de KCl no mesmo tampão. As frações coletadas tinham um volume de 2,0 ml e alíquotas de 5-10 μl e 100 μl foram utilizadas para as dosagens de proteína e atividade de LKR, respectivamente. As frações eluídas das colunas com gradiente de KCl e que apresentaram maior atividade da enzima, foram reunidas e precipitadas até 70% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os precipitados de cada material, assim obtidos, foram ressuspensos em volumes mínimos do Tampão B (0,5-0,7 ml) para uma concentração de proteína em torno de 1 mg/ml, dessalinizados por diálise contra duas vezes 500 ml do mesmo tampão e a seguir, este material foi usado nos experimentos de PAGE e PAGE-SDS, ou para outros ensaios.

10. Determinação do Peso Molecular Relativo (M_r) da enzima

O M_r da enzima foi determinado por três metodologias diferentes, como se segue:

10.1 - Gradientes de sacarose

Para estes experimentos, foram utilizados 40 endospermas de 20 dap de cada versão - normal e opaco-2 - homogeneizados em Tampão B sem glicerol, como descrito no item 3 acima. Alíquotas de 0,2 ml da FII, quer do material normal como do material mutante e que continham, respectivamente, cerca de 1,5 e 2,0 mg de proteína, foram depositadas em gradientes lineares de sacarose (5 a 20%) de 4,6 ml (volume total = 4,8 ml) preparados com o tampão de extração da enzima, também na ausência de glicerol. Após a centrifugação a $90.000 \times g$ em um rotor SW 65K da Spinco, por 17 horas a $4^\circ C$, as frações (25 de 0,2 ml) eram colhidas do fundo para o topo do gradiente com o auxílio de uma bomba peristáltica. Dois marcadores, hemoglobina bovina (M_r 64.500) e catalase (M_r 240.000) eram colocados juntamente com a amostra, em quantidades de 3 a 5 mg respectivamente, ou em gradientes paralelos e seus perfis determinados

segundo itens 12 e 13 (Material e Métodos). Em alguns dos experimentos só foi colocada a hemoglobina como marcador. Alíquotas de 150 μ l destas frações foram utilizadas para a dosagem da atividade de LKR.

O peso molecular da enzima, foi calculado em relação a um ou outro dos padrões utilizados, de acordo com Martin e Ames (1961), através da fórmula:

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{r_{\text{padrão}}}{r_{\text{desconh.}}} = \left(\frac{M_r \text{ padrão}}{M_r \text{ desconh.}} \right)^{2/3}$$

onde, r = distância em centímetros do topo do gradiente à banda de proteína, S_1 e S_2 correspondem respectivamente aos coeficientes de sedimentação do padrão e da amostra e M_r = peso molecular relativo.

10.2 - Filtração em gel Sephadex G-200

Uma coluna (1,7 X 60 cm) de Sephadex G-200 foi montada e equilibrada em Tampão B diminuído de glicerol. O fluxo variou entre 8 e 10 ml/hora e a pressão de operação usada foi de 10,5 a 11 cm. O volume de exclusão da coluna foi determinado pelo volume de eluição de Blue Dextran 2.000 ($M_r = 2.000.000$) e para a calibração das colunas foram

utilizadas os seguintes padrões: catalase (de fígado bovino), albumina bovina e ovalbumina, numa concentração de 10 a 15 mg/ml de proteína. A amostra e os padrões (0,7 a 1,0 ml, contendo 15% de glicerol) foram aplicadas à coluna e a seguir foram coletadas frações de 2,0 ml, em presença de glicerol para uma concentração de 10% final, onde indicado.

A amostra, submetida à filtração em gel, foi proveniente do material normal com 20 dap homogeneizado em Tampão B. Nestes experimentos foram utilizadas, tanto alíquotas da FII, como também, uma fração mais purificada deste material, obtida após cromatografia em DEAE-celulose. Maiores detalhes, se encontram em Resultados - item 6.

10.3 - Eletroforese em géis de poliacrilamida

A eletroforese em PAGE-SDS ou PAGE foi feita como essencialmente descrita anteriormente nos itens 7 e 8, sendo que, para a determinação do M_r da enzima eram aplicados, nos géis, padrões de peso molecular. Deste modo, em PAGE, utilizou-se um "kit" de calibração da Pharmacia de alto peso molecular (HMW), o qual foi preparado de acordo com as instruções do fabricante para este tipo de gel, e continha os seguintes padrões: tiroglobulina (669.000) que não entrou no gel; ferritina (440.000); catalase (232.000); lactato desidrogenase (140.000) e albumina (67.000). Em

PAGE-SDS, este mesmo "Kit" HMW, foi preparado sob condições dissociantes, também de acordo com as instruções do fabricante. Neste caso, os valores de peso molecular utilizados como padrões passavam a ser os seguintes: tiroglobulina (330.000); ferritina (metade da subunidade - 220.000); albumina (67.000); catalase (60.000); lactato desidrogenase (36.000) e ferritina (18.500).

O peso molecular da amostra foi estimado através de uma curva de calibração de $\log M_r$ versus mobilidade da amostra e dos padrões no gel (R_f) e através do método de Plikaytis e colaboradores (1986).

11. Purificação de LKR e caracterização imunológica

A purificação da enzima e sua caracterização através de testes imunológicos, foram feitas como se segue (Ver também Tabela IV):

11.1 - Extração, fracionamento em $(NH_4)_2SO_4$ e ultracentrifugação

Todas as etapas foram realizadas entre 0 e 4°C. O material utilizado para a purificação da enzima foi

a versão normal da linhagem em estudo. Cerca de 3.000 endospermas de 20 dap foram utilizados para a extração de LKR homogeneizados em liquidificador com 1.000 ml do Tampão B. O homogeneizado foi filtrado em gaze, centrifugado a 22.100 X g (FI), fracionado até 35-60% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dessalinizado em 4 colunas de Sephadex G-25 (20 X 1,5)cm como descrito anteriormente no item 3. O volume total obtido das 4 colunas (43 ml) foi logo diluído para 78 ml (FII) em Tampão B e submetido a uma centrifugação de 1 hora a 105.000 X g em rotor 70 Ti - Centrífuga Beckman Ultra Model LB-80M. O sobrenadante (FRAÇÃO III ou FIII - 76 ml) foi diluído três vezes no tampão acima, para uma concentração de proteína em torno de 3 mg/ml e foi a seguir aplicado em uma coluna de DEAE-celulose.

11.2 - Cromatografia de troca iônica em DEAE - CELULOSE

Uma coluna de DEAE-celulose de dimensões (18 X 2,5)cm foi montada e equilibrada em Tampão B para este experimento. A amostra acima (FIII), contendo 1172 mg de proteína, foi aplicada à coluna e a seguir, a coluna foi lavada com cerca de 500 ml do mesmo tampão, até obtenção de absorbância a 280 nm menor que 0,05. A eluição da coluna foi feita com um gradiente linear (250 ml) de 0-0,5 M de KCl em

Tampão B. As frações coletadas tinham um volume de 5 ml e alíquotas de 20 μ l foram utilizadas para a dosagem de LKR. As frações que apresentaram maior atividade específica da enzima LKR (frações de 25 a 29) foram reunidas e precipitadas até 70% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O precipitado, obtido por centrifugação a 23.700 X g, foi ressuspenso num mínimo volume do tampão de extração e dializado contra 2,7 litros do mesmo tampão, durante a noite.

11.3 - Cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose CL-6B

A FRAÇÃO acima (FIV) obtida após diálise em 3,0 ml, contendo 17,34 mg de proteína, foi submetida à cromatografia de afinidade em uma coluna (8 X 1,5)cm de Blue-Sepharose CL-6B, montada e equilibrada também em Tampão B. Durante a lavagem e eluição da coluna, o fluxo foi de 9 ml/hora, enquanto que, durante a aplicação da amostra, manteve-se um fluxo menor de 6,6 ml/hora. Após a penetração de toda a amostra, a coluna foi fechada por 30 minutos para permitir que houvesse máxima ligação da proteína (enzima) à resina. A seguir, a coluna foi lavada com 50 ml do tampão de equilíbrio até absorvância a 280 nm menor que 0,01 e a eluição foi então feita com um gradiente linear (30 ml) de 0 a 15 mM de NADPH no mesmo tampão. As frações coletadas

(2ml/tubo) foram individualmente colocadas em sacos de diálise e então dialisadas contra 1,5 e 3,0 litros de Tampão B, durante a noite. Alíquotas de 15 ul e 100 ul destas frações foram utilizadas para a dosagem de atividade da enzima e proteína respectivamente. Todas as frações do pico de atividade de LKR (frações 10 a 16) foram novamente dialisadas (1 fração/tubo de diálise) contra duas trocas de 2 litros do tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e DTT 1mM durante a noite. A seguir, elas foram recolhidas individualmente, liofilizadas e guardadas a -20°C (FRAÇÃO V) ou logo utilizadas na preparação do anticorpo e nos experimentos de eletroforese em géis de poliacrilamida.

11.4 - Preparação de anticorpo contra LKR

Cinco das amostras liofilizadas, como descrito acima, que continham maior atividade de LKR (frações de 11 a 15) e um total de 2,5 mg de proteína, foram ressuspensas cada uma em 100 ul de H₂O e 100 ul do tampão de amostra 2 X concentrado, normalmente usado em PAGE-SDS (ver ítem 8 descrito anteriormente). A seguir, as amostras foram fervidas durante 5 minutos e aplicadas em 3 géis de PAGE-SDS (cerca de 40 ul de amostra/canal - sendo, 23 canais usados com as amostras e 4 restantes com os padrões de HMW) preparados e corridos, como descrito neste mesmo ítem. A

fixação das proteínas nos géis, após corrida, foi feita com KCl 0,25 M e DTT 1mM (Hager e Burgess, 1980) e a banda de alto peso molecular (134.000), enriquecida durante a purificação de LKR (Figura 21) foi removida dos canais com o auxílio de um bisturí. Os pedacinhos de géis foram deixados durante a noite a -70°C , liofilizados no dia seguinte até ficarem completamente secos e a seguir macerados com 13 ml tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 estéril. A suspensão, assim obtida, foi utilizada para injeção alternada, com diferença de 1 semana, em dois coelhos machos da linhagem New Zealand, em três etapas durante um período de cerca de 2 meses. Na 1^a etapa aplicou-se 1 ml da suspensão, acrescido de 1 ml do tampão acima e 2 ml do Adjuvante Completo de Freund; na 2^a etapa (15 dias após a primeira) aplicou-se 2 ml da suspensão, misturados em 2 ml de Adjuvante Incompleto de Freund; na 3^a (cerca de 30 dias após a 2^a) foram aplicados 3 ml da suspensão, misturados com 2 ml do Adjuvante Incompleto de Freund.

Tanto o soro imune como não-imune dos coelhos foi coletado por decantação das hemáceas do sangue, deixado em geladeira durante a noite (ou por 3 horas a 37°C) e posterior centrifugação de 15 minutos a $3.000 \times g$ (Centrífuga de mesa Excelsa Baby - FANEM). A seguir, os dois tipos de soro foram aliquotados em tubos eppendorffs, submetidos a mais uma centrifugação de 5 minutos a $10.000 \times g$ e os sobrenadantes guardados em pequenos volumes de 200 μl

a -20°C , até um pouco antes do uso, nos ensaios imunológicos.

11.5 - Western Blot

Seguindo-se à corrida das amostras dos experimentos de purificação (ou de outros experimentos) em PAGE-SDS, os géis eram deixados durante 2 horas à temperatura ambiente em Tampão de Transferência (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,1% e metanol 20%) e posteriormente suas proteínas eram transferidas para membranas de nylon Hybond-N, por um período de 2 horas com o auxílio de um aparelho da LKB - Multiphor Novablot Electrophoresis Transfer Unit - operando a $0,8 \text{ mA/cm}^2$ no mesmo tampão acima. As membranas eram, em seguida, incubadas com agitação rotatória, a 37°C por 1 hora em solução salina tamponada (TBS) a pH 7,6 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM) contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite desidratado e desengordurado (Molico) e logo após, transferidas para uma solução de TBS contendo 5% de Molico e mais o antisoro a uma diluição de 1:500, na qual, eram incubadas a 37°C , durante a noite, também com agitação rotatória. As membranas eram então, enxaguadas 2 vezes rapidamente com Tween-20 0,1% em TBS (TBS-T) e depois lavadas 3 vezes por períodos de 15 minutos em TBS-T. As membranas, assim lavadas, eram

incubadas a 37°C, com agitação, com o conjugado Proteína A - I¹²⁵I (10 uCi) em TBS durante 4 horas, depois do que elas eram novamente enxaguadas, lavadas como descrito acima e secas normalmente sobre papel de filtro Watman 3MM. Depois de totalmente secas, elas eram expostas sobre filme de Raio X, durante a noite a -70°C.

12. Ensaio da atividade de catalase

A catalase, quando colocada como padrão nos gradientes de sacarose, era medida de acordo com a metodologia descrita por Terenzi e colaboradores (1971) utilizando-se H₂O₂ e KI como reagentes.

13. Dosagem de hemoglobina

A hemoglobina bovina, também utilizada como padrão nos gradientes de sacarose, era medida pela sua absorvância em 545 nm, de uma diluição de 150 ul de cada fração do gradiente para 1 ml da mistura de reação da enzima LKR, depois de terminada a incubação da mesma.

14. Dosagem de Proteína

A quantificação de proteínas foi feita por uma modificação do método de Bradford (Spector, 1978).

Nos experimentos em coluna, a quantidade total de proteína foi monitorada através da absorbância a 280 nm.

15. Reagentes

L-lisina, ácido alfa-cetoglutárico, NADPH (tipo III), resina de troca iônica, DEAE-celulose, catalase, albumina de soro bovino, ovalbumina, DTT, 2-mercaptoetanol, barbital, SDS, TEMED, MTT e PMS foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EUA.

As resinas Sephadex G-25 e G-200, Blue-Sepharose CL-6B e o "Kit" de peso molecular HMW (ART NO.17-0445-01/10 - C-009-03) foram adquiridos da Pharmacia, F. Chem. AB. Uppsala, Suécia.

Proteína A - I¹²⁵ e o filme de Raio X (Hyperfilm - MP) eram provenientes da Amersham International PLC.

Adjuvantes completo e incompleto de Freund eram da Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA.

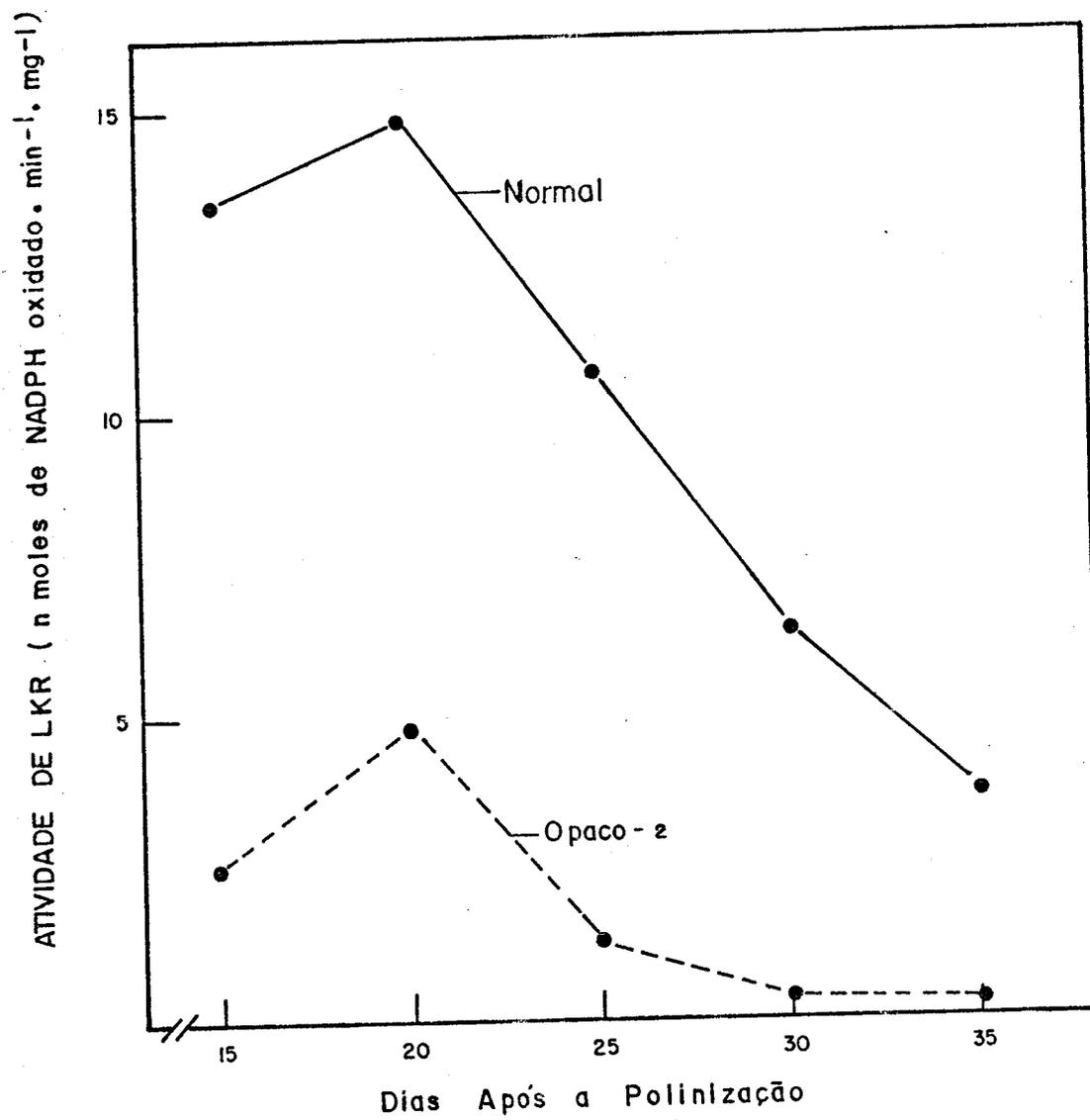
Todos os demais reagentes utilizados foram sempre provenientes da E. Merck de Darmstadt, Alemanha, ou Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover.

III. RESULTADOS

1. Padrão de atividade de LKR durante o desenvolvimento do endosperma de milho normal e opaco-2

Arruda e Silva (1983), já haviam demonstrado que a atividade de LKR aumenta com o início do desenvolvimento do endosperma, atinge um pico ao redor de 20 dap e então decresce progressivamente em direção à maturidade da semente. Posteriormente, Arruda e colaboradores (1984), concomitantemente à Hadzi e Sukalovic (1984), investigando sementes de linhagens de milho normal e mutante opaco-2, sugeriram que esta enzima estava sob controle do gene opaco-2, de modo que a presença deste gene mutante no endosperma de milho, levava a um declínio na atividade de LKR durante o desenvolvimento deste tecido, a exemplo do que pode ser observado para a linhagem utilizada como material de estudo desta tese (Figura 4), onde aos 20 dap a versão normal apresenta níveis de atividade de LKR três vezes maiores que a versão opaco-2.

FIGURA 4 - Atividade da enzima LKR em função da maturação da semente, em dias após a polinização (dap).



2. Fracionamento em sulfato de amônio. Efeito do pH, temperatura e estocagem dos extratos em presença/ausência de agentes protetores no extrato, sobre a atividade da enzima.

Uma alta atividade de LKR entre 25 e 70% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ já havia sido previamente encontrada por Arruda e colaboradores, no entanto, afim de iniciarmos o trabalho proposto já com preparações um pouco mais ricas em atividade da enzima, procuramos encontrar a faixa de saturação, com o sal, mais estreita, na qual pudesse estar concentrada a atividade da enzima.

Os experimentos foram feitos com sementes de 20 dap da versão normal, como descrito em Material e Métodos - item 4, e os resultados dos experimentos feitos em duas etapas se encontram na Tabela I. A superposição destas duas etapas de fracionamento (Figura 5) nos permitiu concluir que poderíamos encontrar a atividade de LKR mais precisamente entre 35 e 60% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A recuperação de proteína nestes experimentos foi sempre em torno de 60 a 70%.

A partir da determinação da faixa de saturação onde poderia se encontrar maior atividade de LKR, todos os outros experimentos passaram a ser realizados com a fração obtida entre 35-60% (FRAÇÃO II ou FII) ou com uma

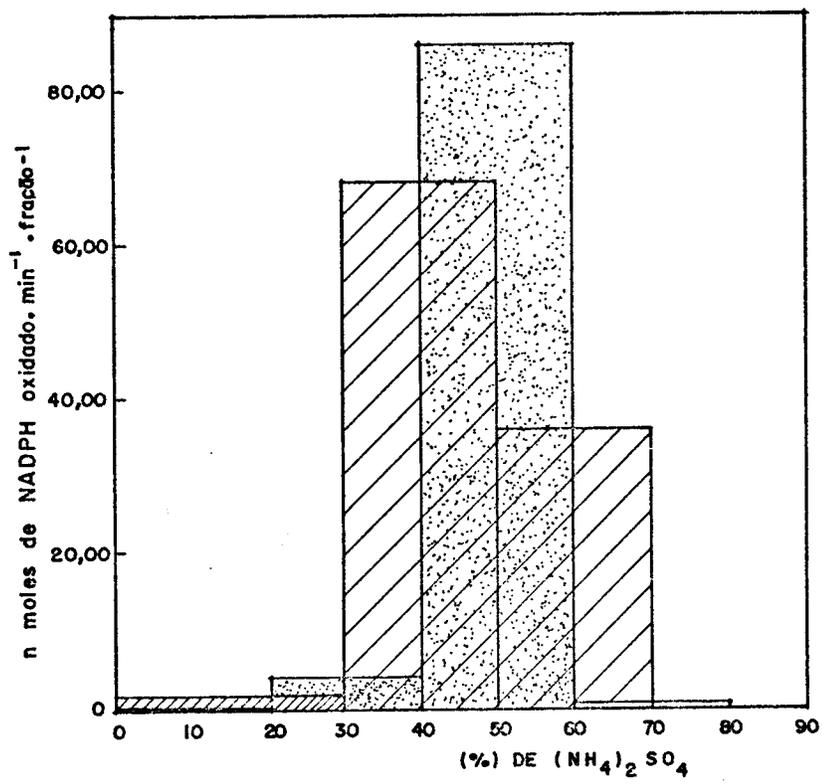
TABELA I - Fracionamento em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando-se o material L1038 normal, 20 DAP. O extrato foi preparado segundo Material e Métodos, sendo que para os ensaios foram sempre utilizados 50 μl de cada fração. (EB = extrato bruto).

Etapa 1 - Fracionamento: 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%						
FRAÇÃO	PROTEINA (mg)	VOLUME TOTAL (ml)	ATIVIDADE TOTAL (nmoles.min ⁻¹ fração ⁻¹)	RECUPERAÇÃO APARENTE (%)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (nmoles. .min ⁻¹ mg ⁻¹)	PURIFICAÇÃO
EB	33,75	15,0	117,36	(100)	3,48	(1,0)
F1 (0-20%)	0,43	2,5	1,07		2,49	
F2 (20-40%)	8,16	2,5	3,75	77,6*	0,46	3,4**
F3 (40-60%)	9,56	2,5	86,24		9,02	
F4 (60-80%)	2,99	2,5	0,00		0,00	
Etapa 2 - Fracionamento: 0-30%, 30-50%, 50-70%						
EB	31,54	14,6	172,13	(100)	5,46	(1,0)
F1 (0-30%)	1,14	2,5	0,80		0,70	
F2 (30-50%)	10,77	2,5	68,59	61,6*	6,37	2,3**
F3 (50-70%)	6,79	2,5	36,71		5,41	

* Representa a recuperação aparente levando-se em conta a soma das atividades totais durante o fracionamento

** Representa a purificação obtida em relação ao EB, levando-se em conta a soma das atividades específicas durante o fracionamento.

FIGURA 5 - Superposição das duas etapas do fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A atividade de LKR, aqui está expressa em atividade total.fração⁻¹, ou seja, em nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.volume de fração⁻¹.  e , correspondem respectivamente às etapas I (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) e II (0-30%, 30-50% e 50-70%).



fração ainda mais purificada que esta. Deste modo, a FII foi então utilizada nos experimentos que se seguem, conforme descrito em Material e Métodos - ítem 5.

A influência do pH na atividade de LKR foi estudada na faixa de pH 5,0 a 9,0, utilizando-se para isto três diferentes tampões como está demonstrado na Figura 6. Como podemos observar, a enzima apresentou um máximo de atividade em pH 7,0 quando foi utilizado o tampão fosfato de potássio. Esse resultado está em acordo com o encontrado anteriormente por Arruda e colaboradores (1982).

O efeito do aumento da temperatura e da estocagem dos extratos sob diferentes condições foram testados em extratos preparados na ausência (Tampão A) e presença (Tampão B) de protetores enzimáticos - glicerol 15% e 2-mercaptoetanol 5mM - como descrito em Material e Métodos - ítems 3 e 5.2. Na Tabela II pode ser observado que a atividade específica da enzima em função da temperatura tem o mesmo comportamento, independente do extrato ser preparado em Tampão A ou Tampão B.

Quando se mediu a atividade da enzima da FII, na presença e ausência de protetores, durante a estocagem de alíquotas guardadas em geladeira (g) ou freezer (f) (Tabela III), verificou-se que para o material normal, a atividade específica da enzima praticamente não se altera até depois de 24 horas da extração da mesma, independente da preparação, mas a partir de 48 horas, observa-se uma queda

FIGURA 6 - Atividade de LKR em função do pH. (Δ — Δ), tampão acetato de sódio; (O—O), tampão fosfato de potássio e (*—*—*), tampão Tris-HCl. Todos os tampões foram utilizados na concentração de 100 mM final nos ensaios.

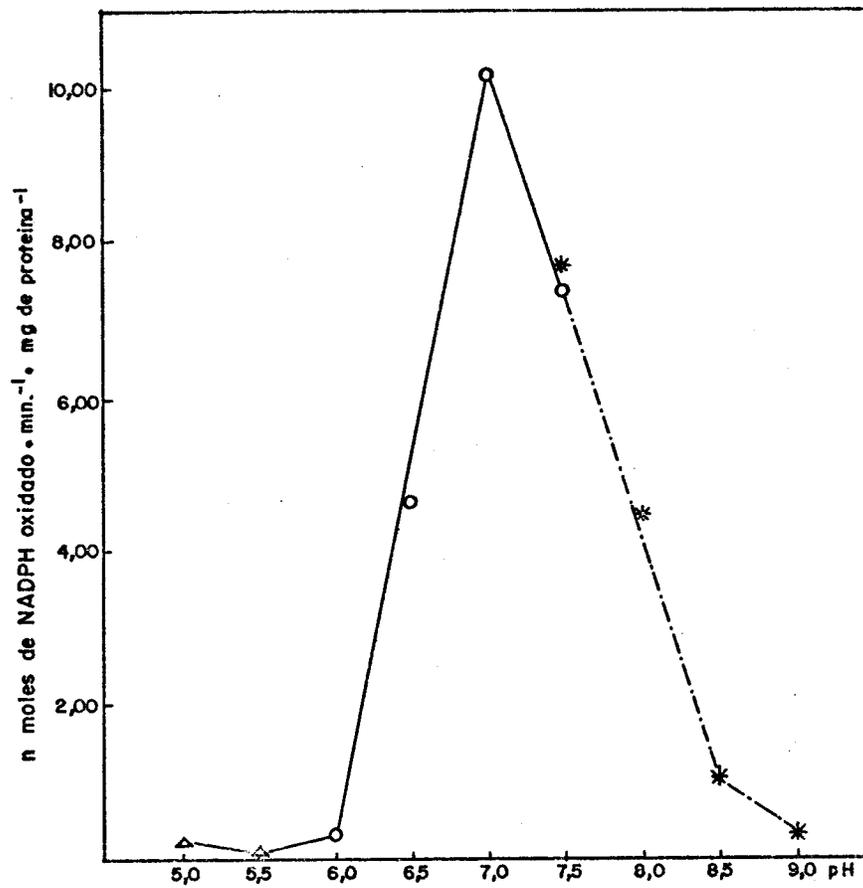


TABELA II - Efeito da temperatura sobre a atividade de LKR na fração de 35-60% da L1038 normal, preparada em Tampão A (fosfato de potássio 100mM pH 7.0 contendo 1mM de EDTA e 1mM de 2-mercaptoetanol) ou Tampão B (fosfato de potássio 100mM pH 7.0 contendo 1mM EDTA, 5mM de 2-mercaptoetanol, e 15% de glicerol).

Temperatura (°C)	atividade de LKR (nmoles de NADPH oxidado.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹)	
	Tampão A	Tampão B
0	10,07	10,74
30	10,58	11,89
35	10,37	11,52
40	10,05	11,38
45	6,57	9,05
50	0,10	0,00

TABELA III - Efeito da estocagem da fração de 35-60% sobre a estabilidade da enzima LKR, utilizando-se a L1038 normal como material, na ausência (Tampão A) e presença (* - Tampão B) de protetores - 2mercaptoetanol 5 mM e glicerol 15%.

Tempo (horas)	FIIg (nmoles de NADPH oxidado.min ⁻¹ . mg de proteínas ⁻¹)	FIIif	FIIg*	FIIif*
0	10,07	10,69	10,69	10,69
24	11,58	11,98	11,15	7,41
48	7,07	6,77	11,21	8,33
1 mês	0,70	5,06	10,43	9,05

FIIg e FIIif - correspondem às aliquotas da fração proteica obtidas entre 35-60% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estocadas respectivamente em geladeira e freezer. (ver Material e Métodos).

de atividade na preparação feita em Tampão A. Na preparação da enzima em Tampão B, pode-se observar atividade até 1 mês após a extração, mesmo na alíquota estocada em geladeira - FIIg*. Em contrapartida, nas alíquotas estocadas em geladeira (FIIg) e freezer (FIIIf) preparadas em Tampão A, a atividade da enzima se apresentou quase ausente em FIIg e com uma queda de cerca de 50% em FIIIf. Extratos mais purificados que a FII apresentaram uma estabilidade de LKR inversamente proporcional ao nível de purificação da enzima, mesmo em Tampão B. Estes resultados não estão demonstrados, mas foram observados na medida em que os experimentos de purificação foram sendo realizados, e na realidade, estão em acordo com o esperado.

3. Estudos cinéticos

Uma vez que, o material vegetal utilizado neste estudo, difere genotipicamente daquele usado por Arruda e colaboradores (1982), era de interêsse determinar os valores de K_m para os substratos lisina e alfa-cetoglutarato, neste material.

Para tanto, na determinação do K_m para lisina, de acordo com Material e Métodos - item 6.1, a concentração de NADPH foi mantida a um nível constante, enquanto que a lisina foi tomada como substrato variável

(concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 80 e 120 mM) na presença de concentrações fixas de alfa-cetoglutarato (5, 10, 20 e 40 mM) e na determinação do Km para alfa-cetoglutarato, da mesma forma a concentração de NADPH permaneceu constante, enquanto que, o alfa-cetoglutarato passou a ser o substrato variável (concentrações de 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 mM) em presença de concentrações fixas de lisina (20, 40, 80 e 120 mM).

Os dados apresentados em gráficos de V (velocidade) versus [S] (concentração do substrato) estão demonstrados nas Figuras 7(A,B) e 8(A,B) respectivamente para o material normal e opaco-2.

O Km para lisina, nos materiais normal e opaco-2, foi calculado através de análise em computador, pelo método de Wilkinson (1961) para uma concentração constante de 5 mM de alfa-cetoglutarato. Os valores encontrados foram de 8,7 e 4,1 mM, respectivamente para a versão normal e opaco-2, os quais estão bem próximos do valor de 5,2 mM encontrado por Arruda e colaboradores (1982).

O Km para alfa-cetoglutarato não foi calculado nesta tese, devido ao fato de que os estudos cinéticos realizados com este substrato demonstraram resultados bastantes complexos, como pode ser constatado nas Figuras 7(B) e 8(B) donde se observa forte inibição da

FIGURA 7 - Cinética de LKR no material normal. (A): Velocidade de LKR em nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (V) versus concentração do substrato L-lisina, em diferentes concentrações fixas de alfa-cetoglutarato: 5 mM (□—□), 10 mM (■—■), 20 mM (○—○) e 40 mM (●—●). (B): Velocidade de LKR versus concentração do substrato alfa-cetoglutarato, em diferentes concentrações fixas de L-lisina: 20 mM (□—□), 40 mM (■—■), 80 mM (○—○) e 120 mM (●—●). Os ensaios foram realizados com alíquotas de 50 ul da FRAÇÃO II, obtida de uma preparação de 50 endospermas normais, de 22 dap, em Tampão B e que continha 2,49 mg/ml de proteína e atividade específica de 11,75 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. (Ver Material e Métodos - ítem 6.1).

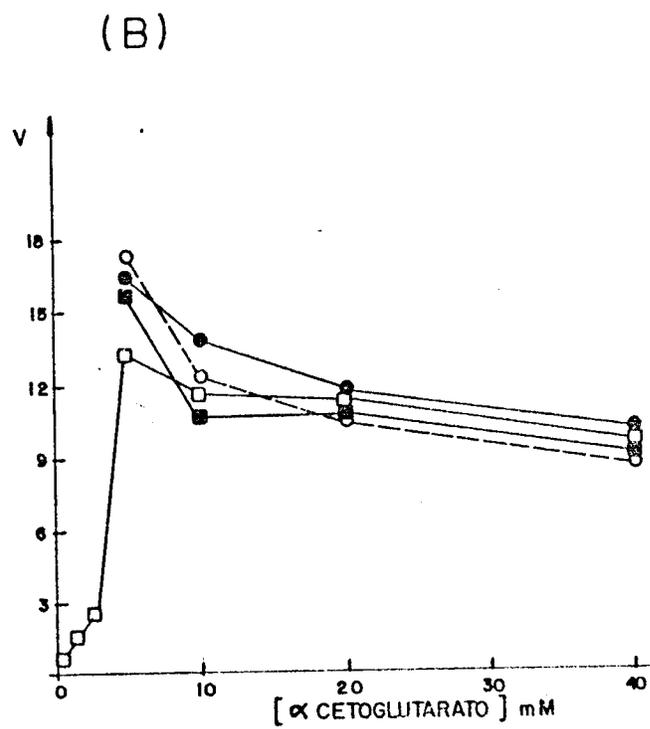
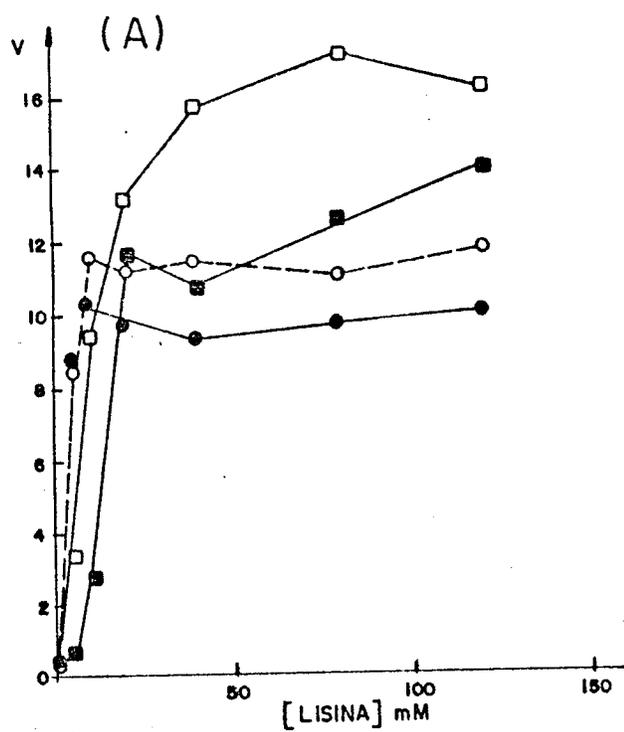
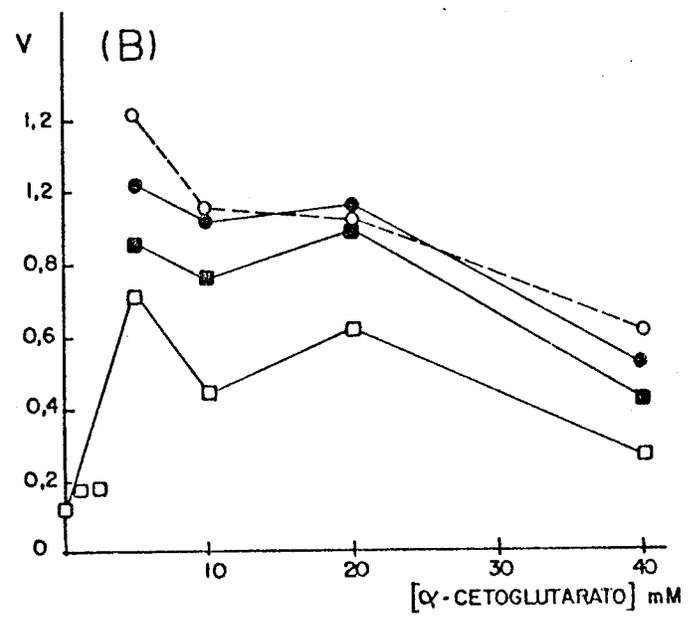
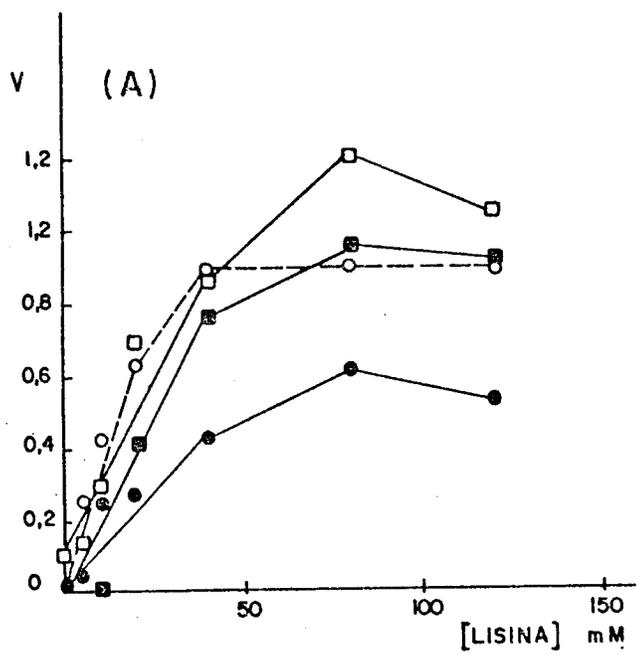


FIGURA 8 - Cinética de LKR no material mutante opaco-2. (A): Velocidade de LKR em nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$ (V) versus concentração do substrato L-lisina, em diferentes concentrações do substrato alfa-cetoglutarato: 5 mM (\square — \square), 10 mM (\blacksquare — \blacksquare), 20mM (\circ — \circ) e 40 mM (\bullet — \bullet). (B): Velocidade de LKR versus concentração do substrato alfa-cetoglutarato em diferentes concentrações fixas de L-lisina: 20 mM (\square — \square), 40 mM (\blacksquare — \blacksquare), 80 mM (\circ — \circ) e 120 mM (\bullet — \bullet). Os ensaios foram realizados com alíquotas de 50 μl da FRAÇÃO II de uma preparação de 50 endospermas mutantes opaco-2, homogeneizados em Tampão B, e que continha 5,16 mg/ml de proteína e atividade específica de 0,43 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$. (Ver Material e Métodos - ítem 6.1).

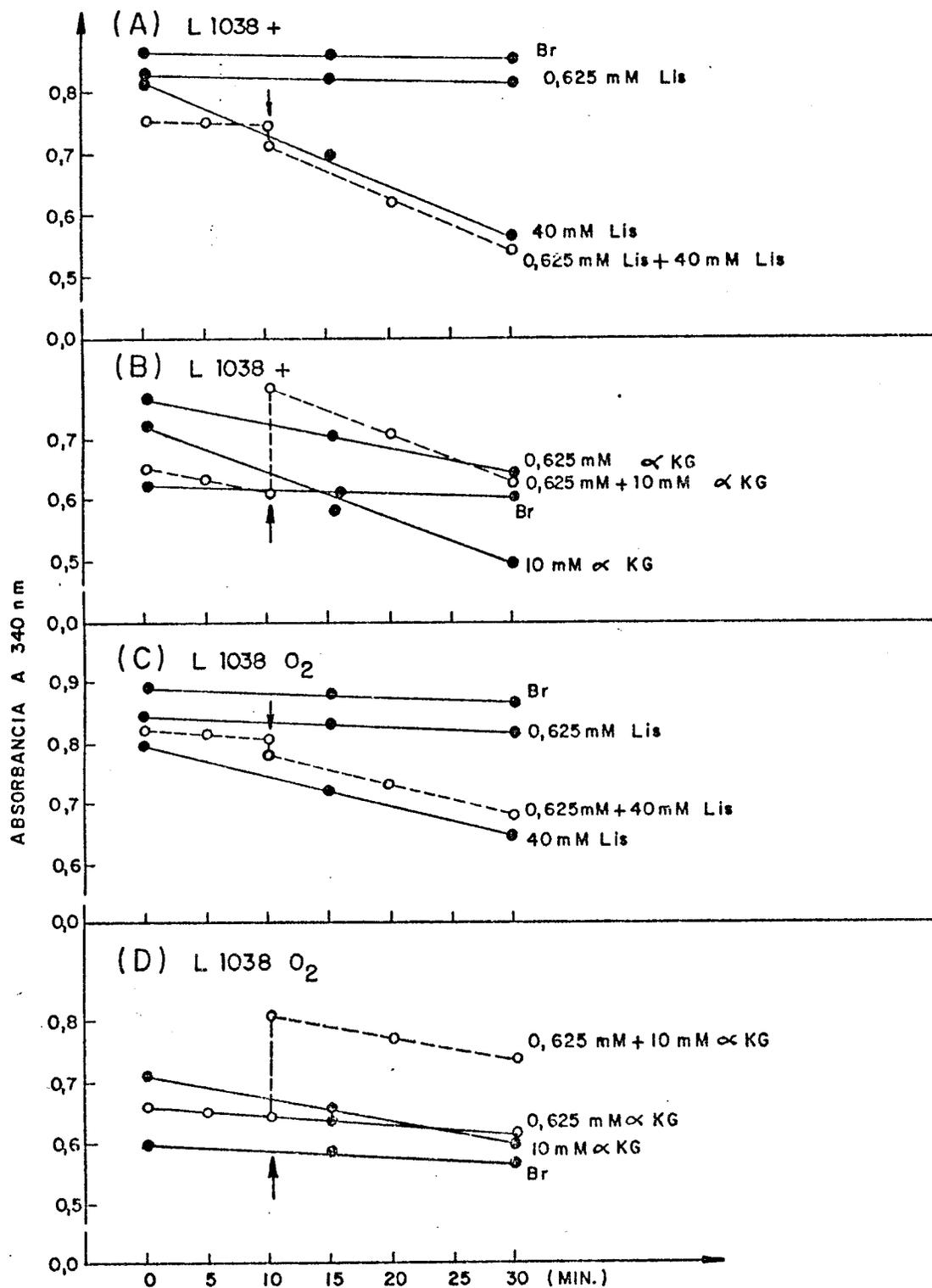


atividade de LKR à medida que se aumenta a concentração de alfa-cetoglutarato.

Durante os estudos de determinação de Km para lisina e alfa-cetoglutarato, pudemos verificar que em presença de baixas concentrações destes substratos ocorriam desvios da curva normal de velocidade versus concentração do substrato (V versus [S]). Uma das explicações para tal fato, poderia ser que, nestas condições, a enzima sofre inativação durante o transcorrer do ensaio. Com base nesta suposição, foram realizados experimentos segundo Material e Métodos - item 6.2. Os resultados estão mostrados na Figura 9, onde 9A e 9B, correspondem respectivamente ao estudo da enzima frente a baixas concentrações de lisina e alfa-cetoglutarato para o material normal (FII) e 9C e 9D, correspondem a lisina e alfa-cetoglutarato para a versão opaco-2 (FII). As FII normal e opaco-2, continham 2,91 e 4,97 mg/ml de proteína e atividades específicas de 7,22 e 2,65 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, respectivamente.

Nas Figuras 9A, B, C e D estamos mostrando e comparando os níveis de queda de absorvância a 340 nm, dos brancos (reação ocorrida na ausência do substrato em questão) com os níveis de queda em baixas concentrações, seguindo-se logo após, a adição de altas concentrações do substrato, adicionado aos 10 minutos de ensaio (seta sobre os gráficos). A medida de absorvância foi feita de 5 em 5

FIGURA 9 - Estudo do comportamento da enzima LKR em presença de baixas concentrações de substrato. Os gráficos estão expressos em absorbância a 340 nm versus tempo de reação em minutos. Br (= reação ocorrida na ausência de substrato); (——) ensaios controles; (---) ensaios experimentais. A seta indica o tempo em que foi adicionada uma maior quantidade do substrato em estudo. (A) e (B) referem-se, respectivamente, ao estudo de lisina e alfa-cetoglutarato, no material normal; (C) e (D) referem-se igualmente a lisina e alfa-cetoglutarato, no material opaco-2. (Ver Material e Métodos - ítem 6.2).

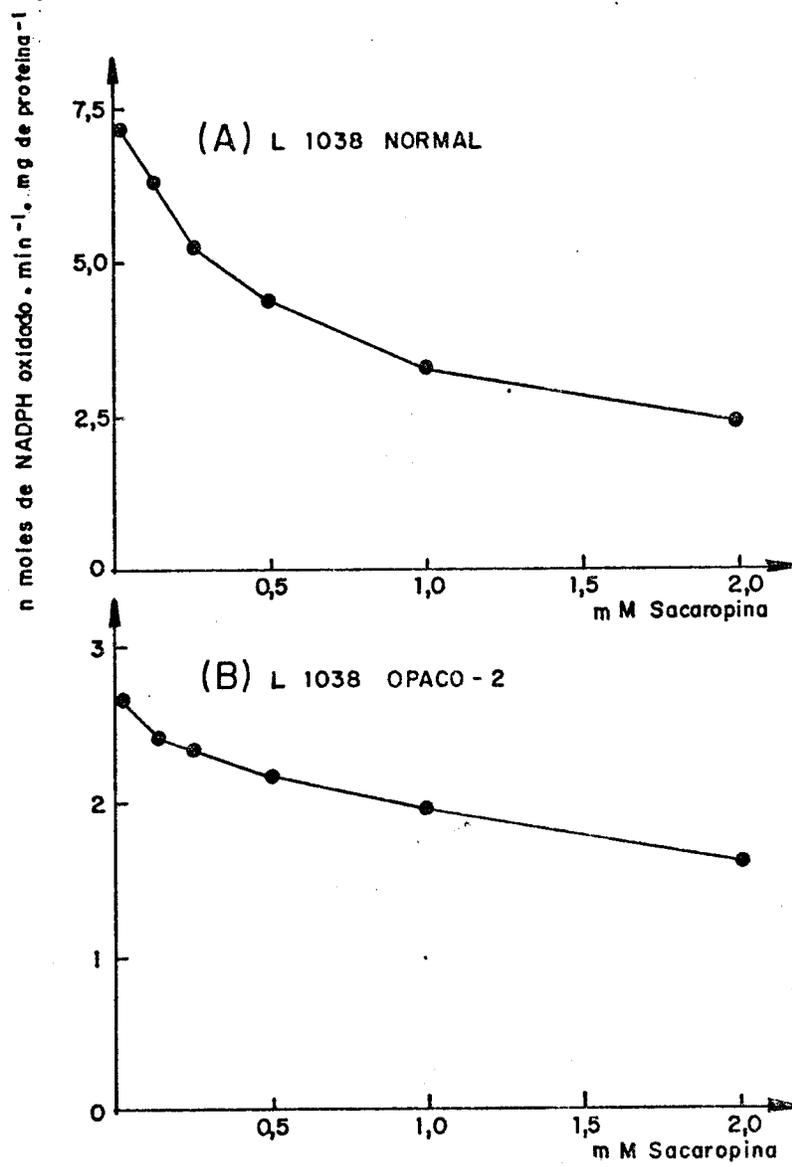


minutos nos primeiros 10 minutos e a seguir de 10 em 10 minutos nos últimos 20 minutos dos ensaios. Podemos observar, em todos os gráficos, que nos primeiros 10 minutos (com 0,625 mM de lisina ou de alfa-cetoglutarato - pontilhado) tem-se uma queda da absorbância a 340 nm, paralela às retas controles com 0,625 mM de substrato durante todo o tempo de ensaio. A partir do momento da adição de maior quantidade de substrato, a queda da absorbância se torna mais acentuada, atingindo os níveis dos ensaios normais (com 40 mM de lisina e 10 mM de alfa-cetoglutato).

Com estes dados podemos então afirmar que a enzima não sofre inativação em presença de baixas concentrações de substrato (lisina ou alfa-cetoglutarato) e que portanto, os desvios observados nos gráficos de cinética não se devem a este fato.

Como descrito em Material e Métodos - item 6.3, as FII dos materiais normal e opaco-2 foram submetidas a testes de inibição da enzima, pelo produto da reação - sacaropina - adicionado aos ensaios em concentrações crescentes de 0 a 2 mM final. O objetivo era determinar quais eram os níveis de inibição pelo produto. Assim, observou-se que com 2mM de sacaropina final nos ensaios, estes níveis foram da ordem de 66% e 40%, respectivamente, para L1038 normal e L1038 opaco-2. Baseando-se apenas nesses resultados da Figura 10(A,B) não foi possível se determinar

FIGURA 10 - Estudo de inibição da enzima pelo produto sacaropina de 0 a 2 mM final nos ensaios. (A) material normal, (B) material opaco-2. (Ver Material e Métodos - item 6.3).



qual tipo de inibição ocorre. O estudo da cinética da inibição pelo produto da reação, não chegou a ser realizado durante o trabalho desta tese, podendo vir a ser feito em trabalhos posteriores.

4. Caracterização da banda de LKR e detecção da atividade da enzima em géis não-denaturantes (PAGE)

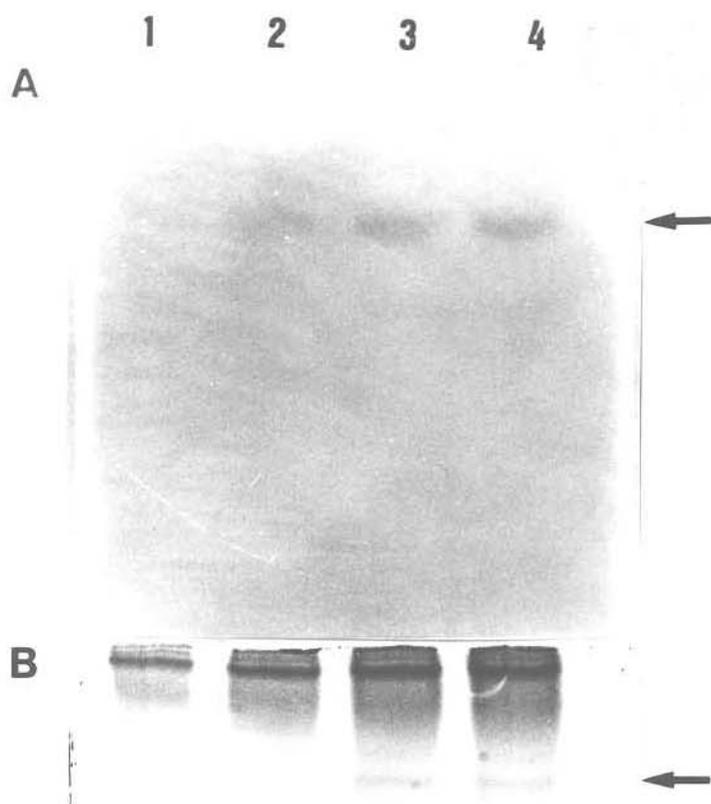
O estabelecimento da metodologia de eletroforese sob condições não-dissociantes, descrita em Material e Métodos - ítem 7, foi um passo importante, o qual, possibilitou o monitoramento da enzima de maneira mais adequada durante as etapas de purificação da mesma através da detecção da sua atividade diretamente em gel, o que, seria impossível de ser feito em PAGE-SDS. Os experimentos iniciais foram feitos em géis de 6% de acrilamida com persulfato de amônio. Talvez devido à possível inibição da enzima pelos íons NH_4^+ nesta linhagem, nem sempre se conseguiu observar atividade da mesma em gel, nestas condições. Posteriormente, os géis passaram a ser preparados com riboflavina 0,005 mg/ml, onde este problema foi solucionado. Mais tarde, a confecção dos géis com gradiente de acrilamida de 5 a 10% também possibilitou uma melhor resolução de bandas.

A FRAÇÃO II de uma preparação de 20 endospermas normais de 25 dap em 10 ml do Tampão B, contendo 8 mg/ml de proteína e atividade específica de LKR de $10,8$ nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, foi submetida a PAGE de 6% (com persulfato de amônio como catalizador), em diferentes quantidades de proteína - 70 ; 150 ; 220 e 300 ug - que foram colocadas em duplicatas num mesmo gel, de modo que após a corrida, metade do gel foi fixado para proteína com Comassie Blue R-250 e a outra metade foi revelada para a atividade da enzima, de acordo com Material e Métodos - ítem 7.2.

Na Figura 11A tem-se a metade do gel que foi fotografada sobre uma fonte de luz UV logo após a incubação com a mistura de reação para LKR. Pode ser observado, da esquerda para a direita, uma banda com intensidade crescente de $R_f = 0,22$, correspondente à banda da enzima em diferentes quantidades crescentes de proteína aplicadas no gel. A partir das medidas de R_f das bandas de proteína na outra metade do gel fixada com Comassie-Blue (Figura 11B) pudemos encontrar a banda correspondente à banda da enzima, de R_f também igual a $0,22$ (distância da banda = 1,7 cm ; frente de corrida = 6,8 cm).

Uma outra metodologia para a detecção da enzima no gel também foi utilizada, afim de que esta pudesse também nos indicar que a banda vista em UV correspondia à banda de LKR. Ela consistia da adição de MTT-

FIGURA 11 - PAGE, a 6%, da FRACÇÃO II de uma preparação de 20 endospermas normais de 25 dap em 10 ml do Tampão B, contendo 8 mg/ml de proteína e atividade específica de LKR de 10,8 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. (A) padrão de atividade de LKR em gel. (B) padrão de bandas de proteína. A seta indica a banda de proteína correspondente à atividade da enzima. 1, 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, a 70, 150, 220 e 300 ug de proteína aplicadas no gel. A fixação de proteínas em (B) foi feita com Coomassie Blue R-250.



tetrazolium 0,5 mg/ml e PMS 0,2 mg/ml na mistura de reação para LKR em gel e posterior incubação de 3 a 4 horas a 30°C no escuro. Em alguns experimentos, a mesma parte do gel submetida à incubação para LKR foi também utilizada para visualização da banda da enzima após incubação com o sistema acima. Após um período de cerca de 2,5 horas podia ser observado o aparecimento de bandas claras na mesma posição no gel onde anteriormente se via ausência de fluorescência (banda de LKR) enquanto que, todo o restante do gel adquiria uma coloração escura.

A reação com MTT e PMS para a detecção da enzima no gel se baseia no fato de que o MTT age como acceptor terminal de elétrons proveniente da oxidação do NADPH, adquirindo uma coloração escura intensa ao se reduzir. O PMS também é usado porque serve como carregador de íons H^+ entre a coenzima reduzida (ou o grupo prostético da enzima) e o sal de tetrazolium. Portanto, no caso da enzima LKR, uma redutase, se observa uma ausência da coloração escura na região do gel onde se encontra a enzima (onde todo o NADPH deve estar na forma de $NADP^+$) e a presença de coloração na maior parte do gel onde o NADPH se encontra impregnado.

Os resultados não são apresentados nesta tese porque esta metodologia demonstrou ser menos específica que a primeira. Várias vezes se observou além da banda correspondente à posição da enzima, o aparecimento nem

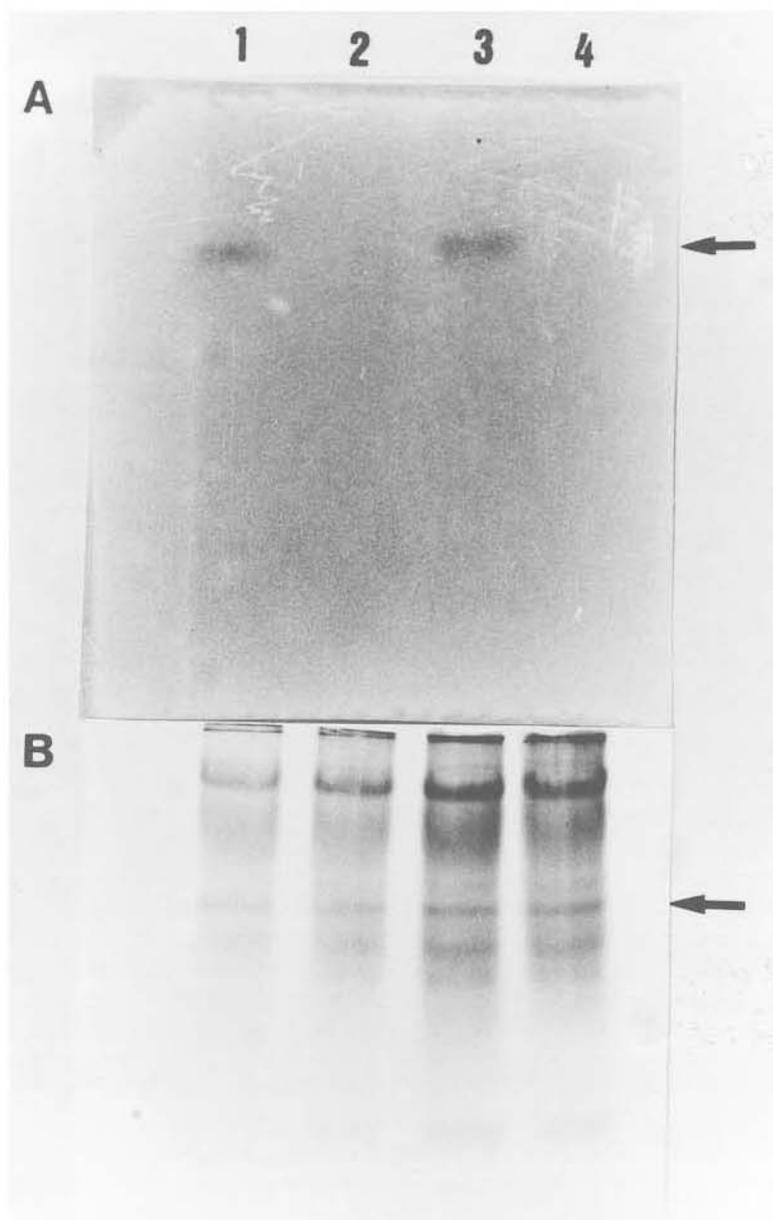
sempre constante de outra banda não correspondente à enzima e de menor peso molecular. Estes dados voltarão a ser discutidos posteriormente (ver ítem 5 - Resultados).

4.1 - Comparação do perfil eletroforético e da atividade de LKR em PAGE entre o material normal e opaco-2

Afim de se determinar a possibilidade de ocorrência de variações no perfil de bandas de proteína ou na atividade de LKR vista em gel não-denaturante, entre o material normal e mutante, alíquotas da FII de endospermas normais e opaco-2 com 25 μ g, contendo respectivamente 8,2 e 8,5 mg/ml de proteína e atividades específicas de 10,7 e 1,2 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína, foram utilizadas, para um experimento de eletroforese feito em duplicata num mesmo gel como descrito anteriormente.

Na Figura 12A, pode-se observar a parte do gel revelada para a enzima, após a incubação com a mistura de reação para LKR e fotografada sobre um transiluminador de luz UV. Nesta metade do gel colocou-se uma maior quantidade de proteína em relação à outra metade (Figura 12B), ou seja, duplicatas de 40 e 50 μ l da FII normal e opaco-2, alternadamente. Pode ser notado, na Figura 12A o aparecimento de uma banda somente onde foi colocado no gel a

FIGURA 12 - PAGE, a 6%, da FRAÇÃO II de preparações de 25 endospermas normais e opaco-2 de 25 dap, em 20 ml do Tampão B, as quais continham respectivamente, 8,2 e 8,5 mg/ml de proteína e atividades específicas de 10,7 e 1,2 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. (A) padrão de atividade de LKR vista em gel. (B) padrão de bandas de proteína. A seta indica a banda de proteína correspondente à atividade da enzima, vista no mesmo gel. 1 e 3 correspondem à preparação de endospermas normais, contendo respectivamente, 40 e 50 ul do extrato, no gel, em (A) e 10 e 20 ul, no gel, em (B); 2 e 4 correspondem à preparação de endospermas opaco-2, contendo respectivamente, 40 e 50 ul do extrato, no gel em (A) e 10 e 20 ul, no gel em (B). A fixação de proteínas em (B) foi feita com Coomassie Blue R-250.



FII do material normal com 40 e 50 μ l, enquanto que, no material opaco-2, nada foi detectado. O R_f desta banda, neste experimento foi igual a 0,29 (distância de corrida da banda = 1,9 cm; distância da frente do gel = 6,5 cm).

A parte do gel corada para proteína com Comassie Blue R-250, pode ser visualizada na Figura 12B, onde se aplicou alíquotas de 10 e 20 μ l em duplicatas dos extratos acima, também colocados em ordem alternada. Apesar de a atividade, em gel, ter sido diferente entre os endospermas normal e opaco-2, não foi possível (pelo menos por esta metodologia) se observar um padrão diferencial de bandas de proteína em todo o gel para estes materiais.

4.2 - Correlação entre a síntese de proteínas e o padrão de atividade de LKR durante o desenvolvimento do endosperma

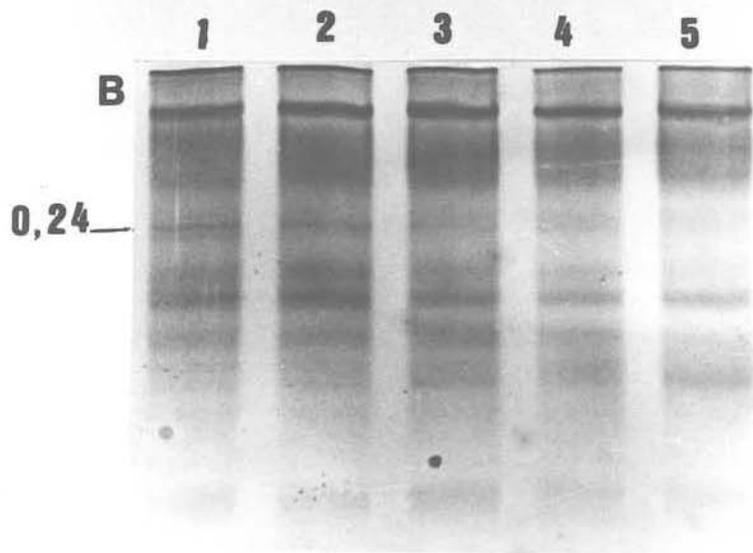
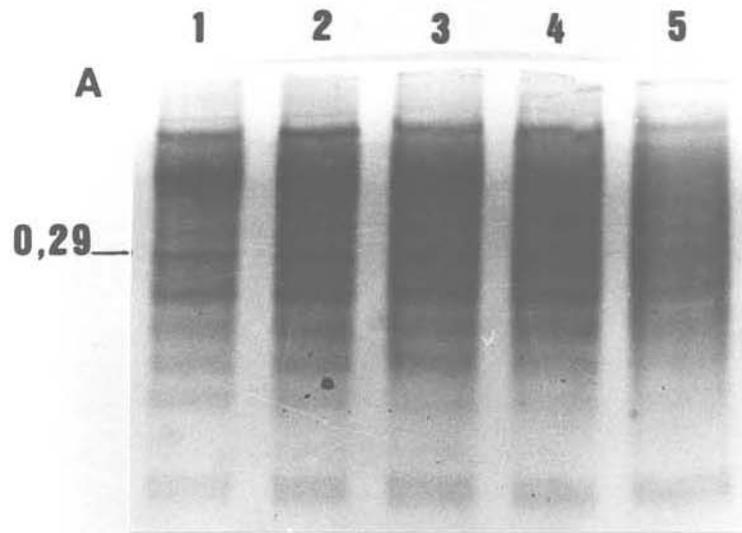
De posse dos dados da Figura 4, onde foi feito um estudo comparativo entre o material normal e mutante, sobre a variação da atividade de LKR em função da maturação da semente, queríamos verificar se também em gel de poliacrilamida, sob condições não-denaturantes, poderíamos notar alguma correspondência entre a atividade da enzima, observada nestes extratos, e a intensidade de bandas de proteína no gel.

As Figuras 13A e 13B, correspondem, respectivamente, aos experimentos feitos com os extratos normais e opaco-2 de 15 a 35 dap. Estes extratos foram todos preparados em Tampão B com 10 endospermas, de acordo com Material e Métodos - ítem 3, e continham de 2 a 7 mg/ml de proteína. Em cada canal, nos géis, foram colocados volumes que contivessem exatamente 100 ug de proteína. Nota-se na Figura 13A uma banda de $R_f = 0,29$ (distância de corrida da banda = 2,20 cm ; frente do gel = 7,5 cm) localizada na mesma região onde, nos experimentos anteriores, observou-se atividade de LKR em gel, a qual diminui de intensidade à medida que o endosperma atinge a maturidade. Da mesma forma, na Figura 13B, correspondente ao material opaco-2, também pode-se notar uma banda de $R_f = 0,24$ (distância de corrida da banda = 1,9 cm ; distância da frente do gel = 8,0 cm) que apresenta maior intensidade entre 15 a 20 dap e diminui de intensidade à medida que se aumenta os dap.

5. Perfis cromatográficos em colunas de DEAE-celulose de extratos normais e opaco-2

Como mencionado anteriormente (ítem 4 - Resultados), o sistema de revelação de LKR em gel não-denaturante com MTT-PMS sugeriu a presença de isoenzimas nestes extratos, enquanto que, o sistema de revelação do gel

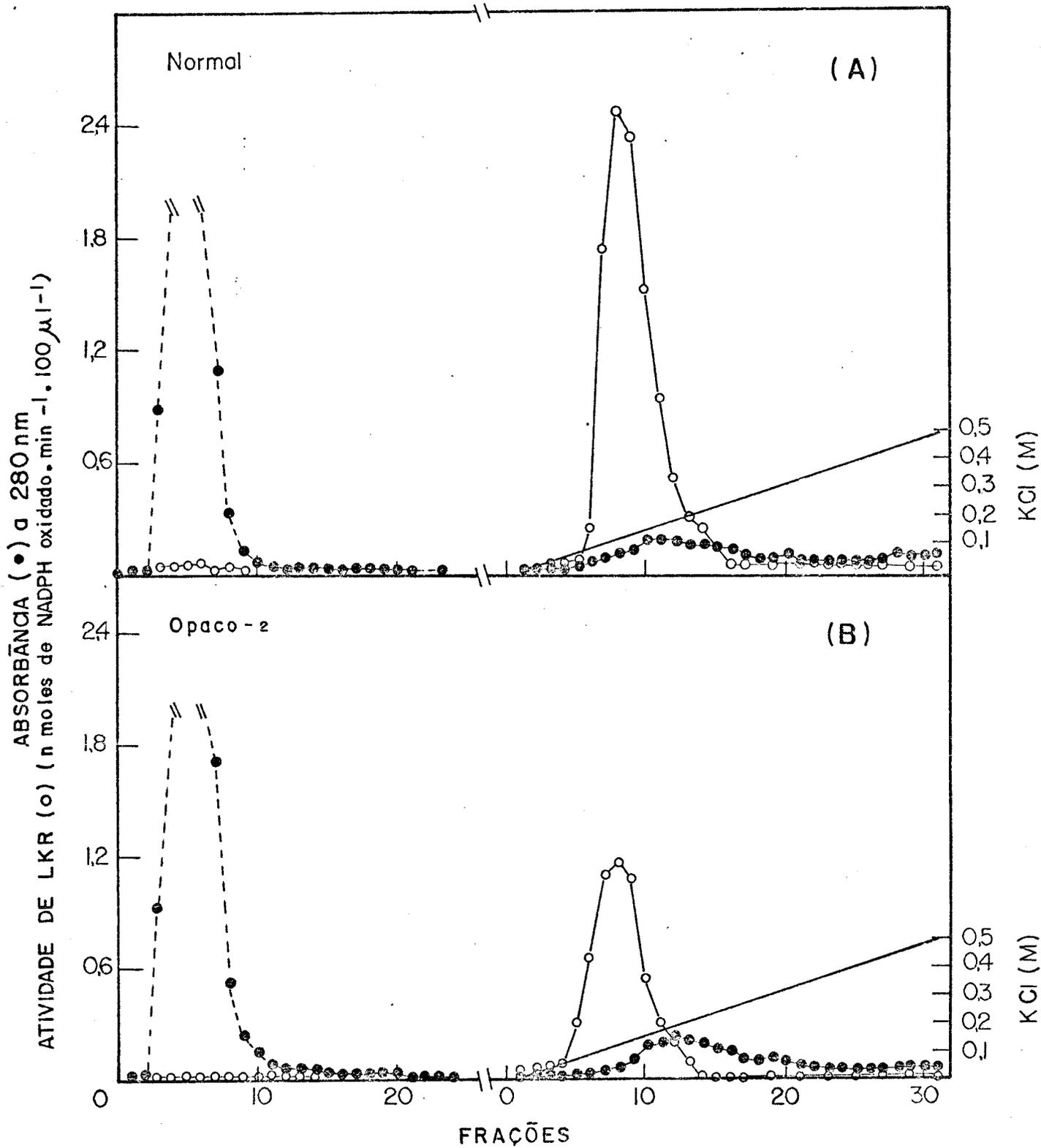
FIGURA 13 - PAGE, a 6%, da FRAÇÃO II de preparações de 10 endospermas normais (A) e opaco-2 (B), de 15 a 35 dap, em Tampão B. As preparações continham de 2 a 7 mg/ml de proteína, e em cada canal dos géis colocou-se 100 ug de proteína. Os canais 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem, respectivamente, em (A) e em (B), a 15, 20, 25, 30 e 35 dap. Notar em (A) a banda de $R_f = 0,29$ e em (B), a banda de $R_f = 0,24$. As proteínas foram fixadas com Coomassie Blue R-250.



sobre luz UV sempre demonstrou a presença de uma única banda da enzima para o material normal. Afim de se solucionar esta questão, extratos de endospermas normais e mutantes de 22 dap foram cromatografados em DEAE-celulose e analisados para a atividade de LKR.

As Figuras 14A e 14B mostram, respectivamente, os perfis cromatográficos em colunas de DEAE-celulose de extratos normais e opaco-2, que haviam sido previamente centrifugados a 105.000 X g e depois fracionados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até a faixa de 35-60%, como descrito em Material e Métodos - ítem 9. Estes extratos foram preparados em Tampão B com 60 endospermas de cada material e a quantidade de proteína aplicada às colunas em cada caso foi de 22,23 mg do extrato normal e 22,26 mg do extrato opaco-2, com atividades específicas de 14,05 e 8,22 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$, respectivamente. É interessante salientar que, nos dois casos, o pico de atividade de LKR é simétrico e que toda a atividade da enzima foi eluída em 0,2 M de KCl. Mesmo em outros experimentos (resultados não demonstrados) em que se testou gradientes de KCl de 0 a 0,8 M, para eluição das colunas, observou-se sempre a presença de um único pico de atividade de LKR. Assim, em concordância com o resultado observado em géis não-denaturantes, revelados com o sistema de luz UV, a cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose mostrou a existência de somente uma forma da enzima LKR na fração solúvel dos endospermas da linhagem em questão. Desta forma,

FIGURA 14 - Cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-celulose para o material normal (A) e opaco-2 (B). (●---●) absorvância a 280 nm; (○—○) atividade de LKR .100 ul de fração⁻¹. Para a preparação dos extratos, em (A) e (B), partiu-se do mesmo número de endospermas (60) e a quantidade de proteína aplicada às colunas, também foi a mesma em ambos experimentos (22,2 mg). Os valores de atividade específica da enzima nestes extratos eram, respectivamente, de 14,05 e 8,22 nmoles de NADPH oxidado .min⁻¹.mg de proteína⁻¹, para o material normal e opaco-2. (Ver Material e Métodos - ítem 9).



o sistema MTT-PMS usado para revelação dos géis acima foi, neste caso, considerado como inespecífico e portanto abandonado neste estudo.

Quanto ao nível de atividade total recuperada nestes experimentos, levando-se em conta o número total de endospermas ou o total de frações eluídas no pico de LKR em cada caso, obteve-se respectivamente para o material normal, 3,35 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.endosperma⁻¹ e 201,63 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹, e para a versão opaco-2, 1,76 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.endosperma⁻¹ e 106,44 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.

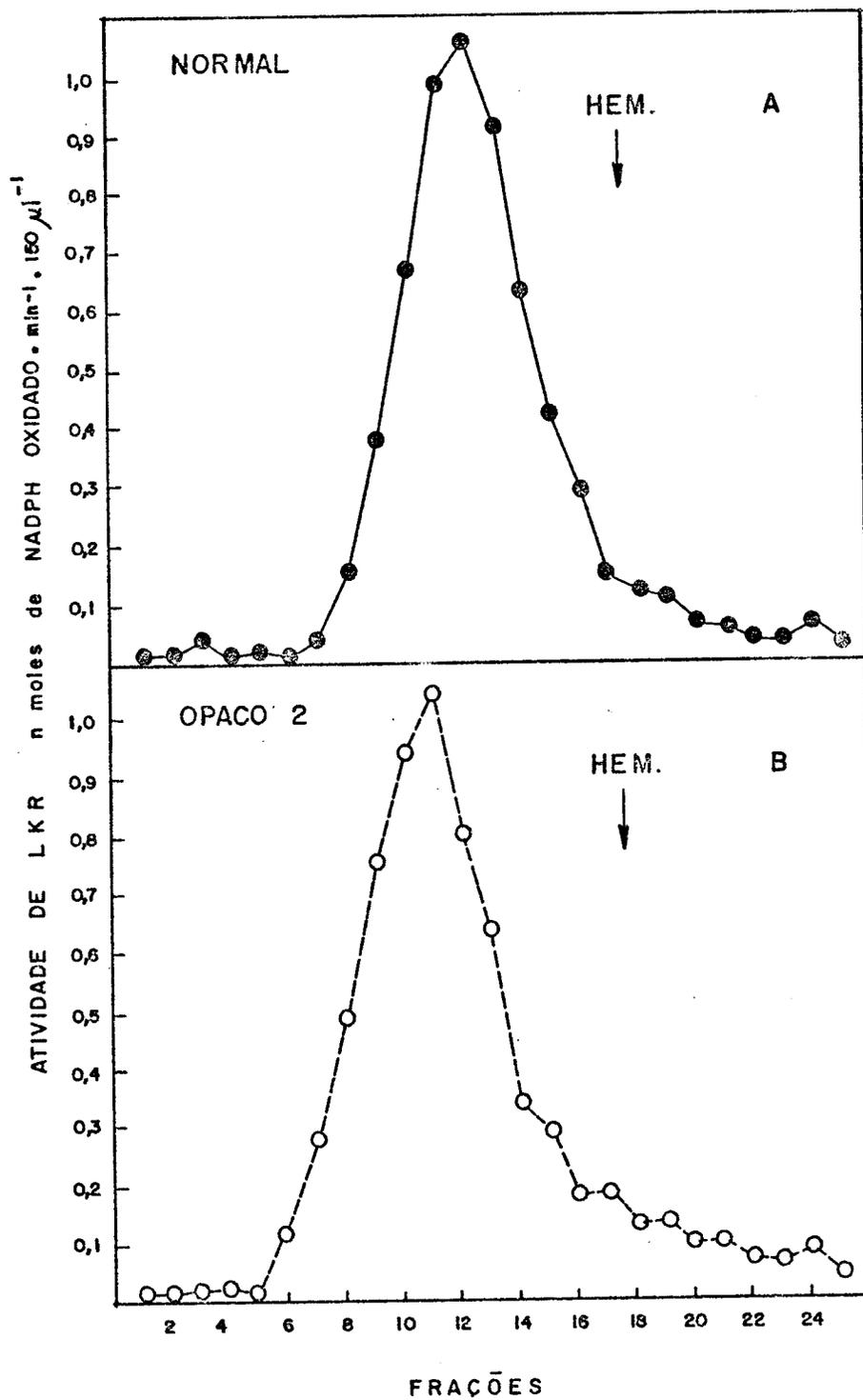
6. Determinação do M_r de LKR através de ultracentrifugação, filtração em gel e eletroforese em géis de poliacrilamida

Os estudos previamente realizados em colunas de troca iônica em DEAE-celulose e em eletroforese sob condições não-dissociantes, com extratos normais e opaco-2, já haviam demonstrado a existência de um único pico de atividade para a enzima LKR, a qual aparentava possuir um alto peso molecular devido aos baixos valores de R_f anteriormente demonstrados nestes géis.

Afim de confirmarmos estes resultados e ao mesmo tempo, determinarmos o M_r da enzima, a FII dos materiais normal e opaco-2 de 20 dap, foi submetida à análise em gradientes de sacarose conforme descrito em Material e Métodos - item 10.1. Na Figura 15, observa-se um típico perfil obtido para estes experimentos. O material normal (Figura 15A) e o material opaco-2 (Figura 15B) continham neste caso, em 0,2 ml de amostra, respectivamente 1,5 e 2,0 mg de proteína com atividades específicas de 6,8 e 4,4 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Neste experimento específico não foi possível determinar a atividade de catalase, mesmo colocada em grande quantidade (7,5 mg) num gradiente paralelo, mas em experimentos anteriores, observou-se atividade desta enzima próximo à fração 11. As setas no gráfico indicam a posição de sedimentação da hemoglobina bovina tipo II ($M_r = 64.500$) colocada como padrão juntamente com as amostras em cada um dos gradientes. Deste modo, tanto em relação à catalase, em outros experimentos, como em relação à hemoglobina, encontramos um peso molecular de cerca de 160.000, para o único pico de atividade observado, em gradientes de sacarose, tanto para o material normal como para o opaco-2 da linhagem 1038.

A filtração em gel Sephadex G-200 também foi utilizada para a determinação do peso molecular de LKR. Para tanto, foram realizados experimentos preliminares em que a FRAÇÃO II proveniente de 60 endospermas do material

FIGURA 15 - Perfil de sedimentação para a enzima LKR, em gradientes lineares de sacarose (5 a 20%). (A) material normal. (B) material opaco-2. As quantidades de proteína aplicadas nestes gradientes foram de 1,5 mg em (A) e 2,0 mg em (B), com atividades específicas de 6,8 e 4,4 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, respectivamente. A seta indica a posição de sedimentação da hemoglobina bovina (Mr 64.500) utilizada como padrão interno nos gradientes. (Ver Material e Métodos - ítem 10.1).



normal, preparada segundo Material e Métodos - ítem 4, ou as frações eluídas com KCl de colunas de DEAE-celulose, que continham maior atividade da enzima, foram submetidas à filtração em gel Sephadex G-200 numa coluna (1,7 X 60 cm) previamente equilibrada e calibrada como descrito em Material e Métodos - ítem 10.2. Em vista do fato de nestas condições, não se ter conseguido detectar atividade de LKR nas frações da coluna de G-200 ou às vezes, a atividade observada, além de apresentar baixos níveis, também continha perfis de degradação, os experimentos passaram, desta forma, a ser realizados com maiores quantidades de endospermas normais, já que para o opaco-2, os resultados seriam ainda mais difíceis de serem obtidos, devido aos baixos níveis de atividade de LKR observados no mutante.

Na Figura 16, observa-se o perfil obtido após cromatografia de troca iônica em coluna (1,5 X 8,7 cm) de DEAE-celulose da FII obtida do extrato de 500 endospermas normais de 20 dap em 250 ml do Tampão B, segundo Material e Métodos - ítem 4. A quantidade de proteína aplicada à coluna foi de 188 mg, com atividade específica de 7,33 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

As frações (11, 12, 13 e 14) eluídas com KCl e que continham alta atividade específica de LKR, foram reunidas, precipitadas com (NH₄)₂SO₄ até 70%, e após ressuspensão em 0,7 ml do Tampão B, foram diretamente aplicadas à coluna de G-200. A quantidade de proteína

FIGURA 16 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose para o material normal. A quantidade de proteína aplicada à coluna foi de 188 mg, com atividade específica para LKR de 7,33 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. (●—●) absorvância a 280 nm; (○—○) atividade de LKR.100 ul de fração⁻¹. A seta indica o momento em que foi iniciada a eluição com o gradiente de KCl (0 a 0,5 M).

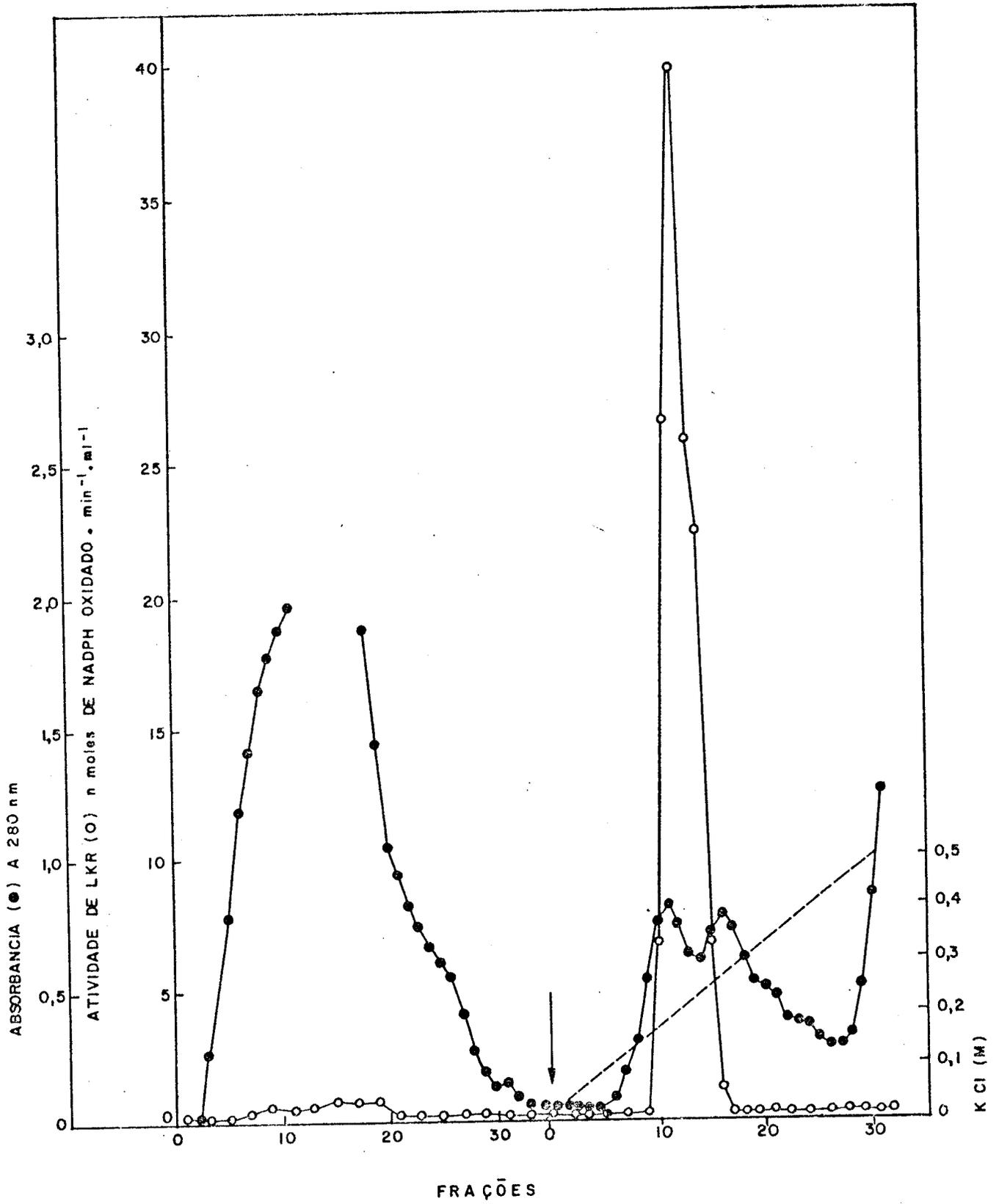
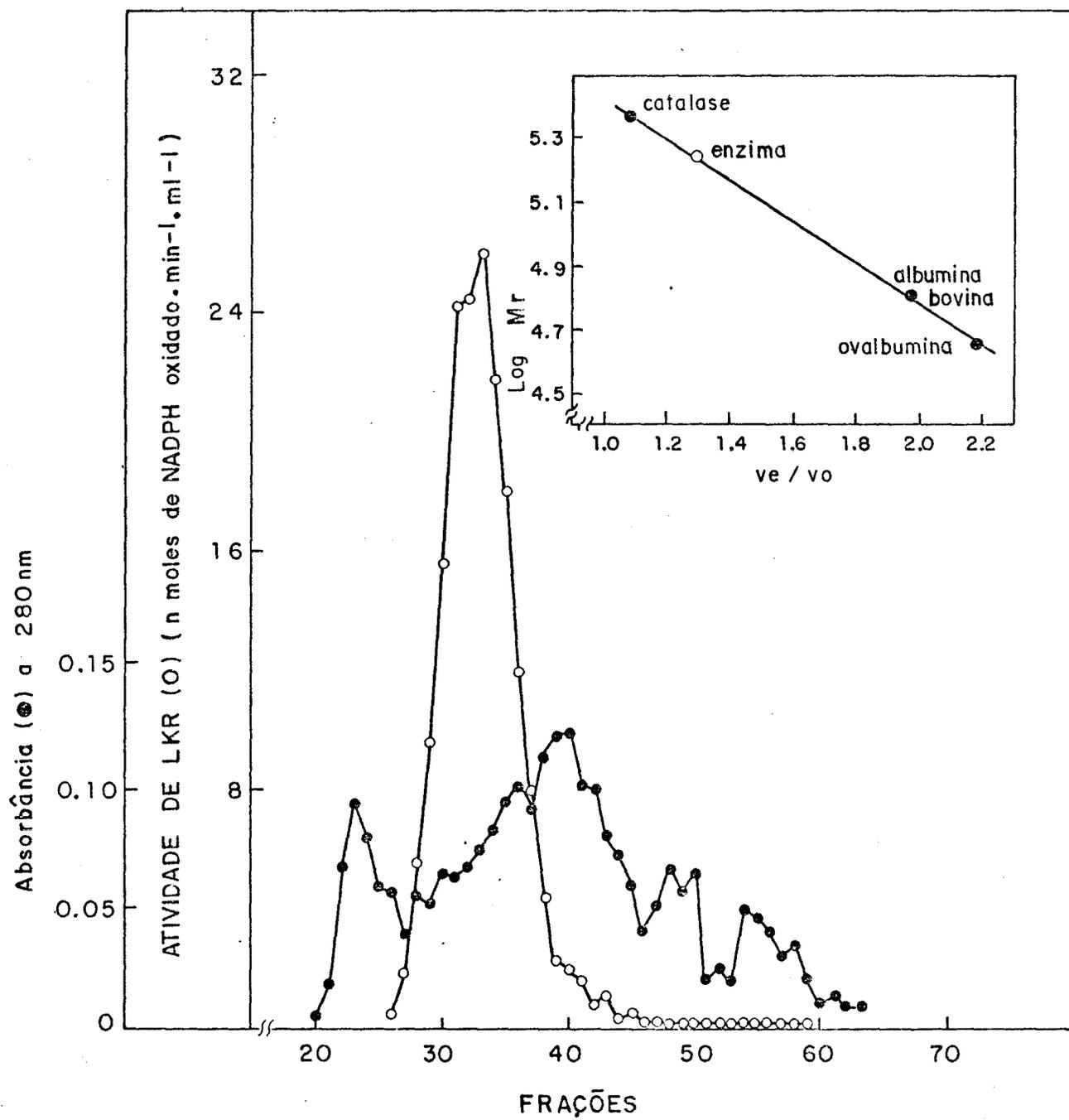


FIGURA 17 - Filtração em gel Sephadex G-200 das frações (11, 12, 13 e 14) do gradiente de KCl na coluna de DEAE-celulose (Fig. 16), as quais continham maior atividade de LKR e cerca de 8 mg de proteína total. (●—●) absobância a 280 nm; (○---○) atividade de LKR. 50 ul de fração⁻¹.



aplicada à coluna foi cerca de 8 mg e a coleta das frações foi feita em tubos contendo glicerol para uma concentração final de 10%. Na Figura 17, pode ser observado o perfil, após filtração em gel, para a enzima.

O peso molecular (M_r) calculado para a enzima, através da curva de calibração preparada para esta coluna, foi de 170.000, o que está em bom acordo com aquele obtido em gradientes de sacarose.

Somente para se ter uma idéia do grau de purificação obtido para a enzima, neste tipo de experimento, encontrou-se que o aumento da atividade específica de LKR foi da ordem de 27 vezes em relação à FII.

As metodologias de eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência (PAGE) e presença do agente dissociante - dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS) foram também empregadas na determinação do peso molecular da enzima LKR. Como para estes experimentos, preferiu-se utilizar a enzima num estado de maior purificação, os resultados se encontram no próximo item.

7. Purificação e caracterização imunológica de LKR

Para os experimentos de purificação (Tabela IV), utilizou-se somente endospermas da versão normal com 20

TABELA IV - Purificação de LKR de endospermas imaturos de milho normal de 22 dap.

Passos de Purificação	Volume (ml)	Proteína (total) (mg/ml)	Atividade (total) (nmoles. min ⁻¹)	Atividade específica (nmoles de NADPH oxidado.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	Rendimento (%)	Purificação (- vezes)
- Centrifugação a 22.000Xg (FI)	1158	3,73	6514	1,51	100	1
- Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ (35-60%) (FII)	76	20,22	8023	5,22	123	3,5
- Centrifugação a 105.000Xg (FIII)	76	15,42	8919	7,61	134	5,0
- DEAE - celulose (FIV)	3	5,78	2534	146,12	39	97
- Afinidade em Blue-Sepharose CL-6B (FV)	8	0,25	822	414,31	13	275

dap. O homogeneizado de cerca de 3000 endospermas foi previamente centrifugado a 22.000 X g, fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na faixa de 35-60%, e submetido à centrifugação de 105.000 X g antes de ser aplicado em uma coluna de DEAE-celulose (Figura 18), como descrito em Material e Métodos - ítem 11.1. A quantidade de proteína aplicada nesta coluna foi de 1172 mg, com atividade específica de 7,6 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$. As frações (25 a 29) de maior atividade de LKR eluídas com o gradiente de KCl, na cromatografia em DEAE-celulose, foram reunidas e submetidas à cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose CL-6B (Figura 19). A enzima foi eluída com 12 mM de NADPH, através de um gradiente de 0-15 mM de NADPH. Testes anteriores de adição de diferentes concentrações combinadas dos substratos - lisina e alfa-cetoglutarato - com NADPH, não melhoraram a eluição da enzima da coluna de afinidade. A preparação mais pura da enzima, obtida após cromatografia de afinidade, teve um enriquecimento de 275 vezes em atividade específica com relação ao primeiro passo de purificação, sendo que, a recuperação foi de 12,6% e a atividade específica final foi de 414 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

A enzima purificada foi a seguir, resolvida por eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições denaturantes (PAGE-SDS) e não-denaturantes (PAGE), segundo Material e Métodos - ítems 7 e 8.

FIGURA 18 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do sobrenadante de 105.000 X g, de uma preparação de cerca de 3000 endospermas normais de 20 dap em Tampão B (ver também Tabela IV e Material e Métodos - ítem 11.2). A quantidade de proteína aplicada à coluna foi de 1172 mg, com atividade específica de 7,6 nmoles de NADPH oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$. (●---●) absorvância a 280 nm; (○—○) atividade de LKR. 20 ul de fração $^{-1}$.

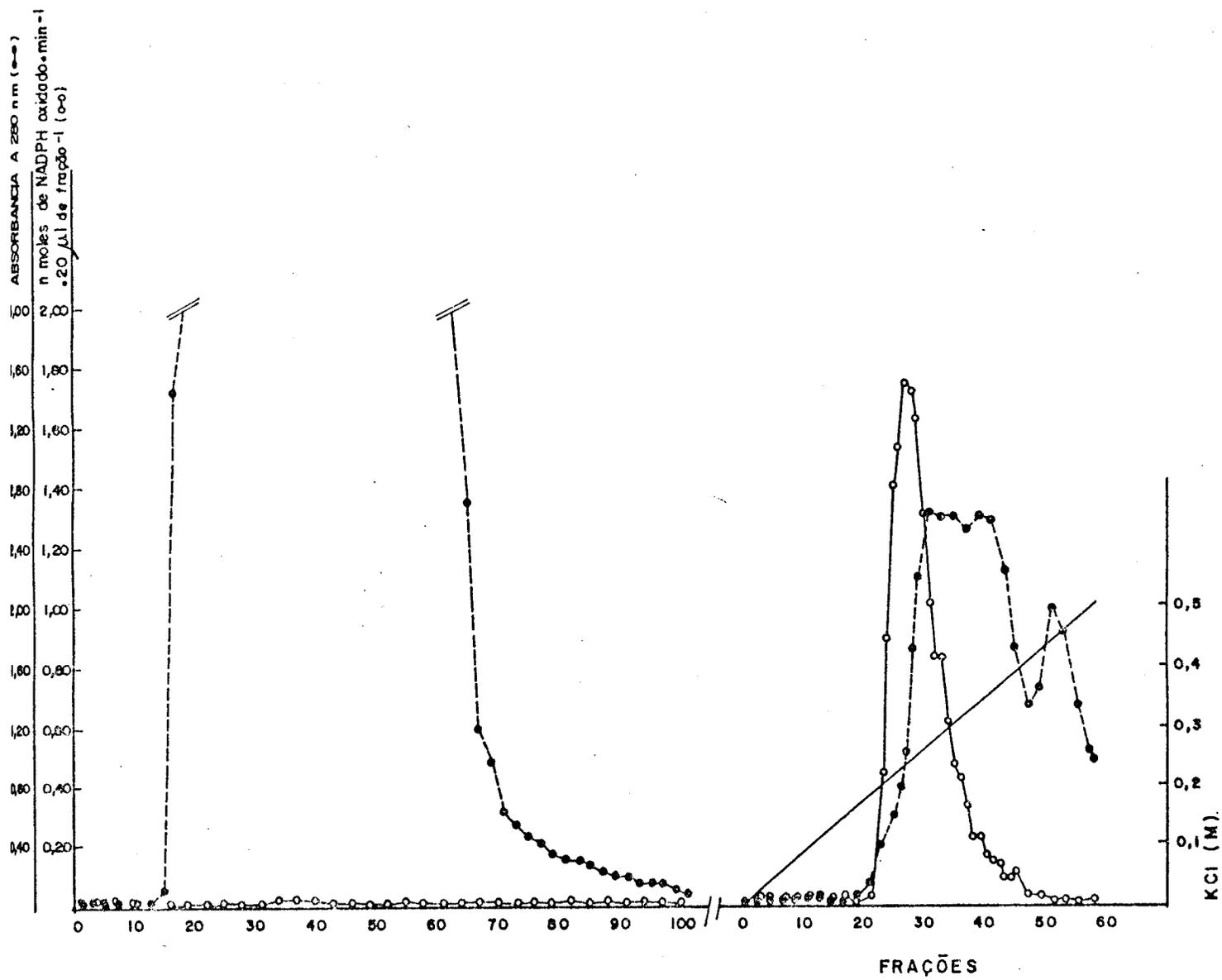


FIGURA 19 - Cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose CL-6B, das frações (25 a 29) de maior atividade de LKR, eluídas com o gradiente de KCl, da cromatografia em DEAE-celulose (Fig. 18). A quantidade de proteína aplicada à coluna foi de 17,34 mg, com atividade específica de 146,1 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. (●----●) proteína total em mg/ml ; (O----O) atividade de LKR.15 ul de fração⁻¹ (ver também Tabela IV e Material e Métodos - item 11.3).

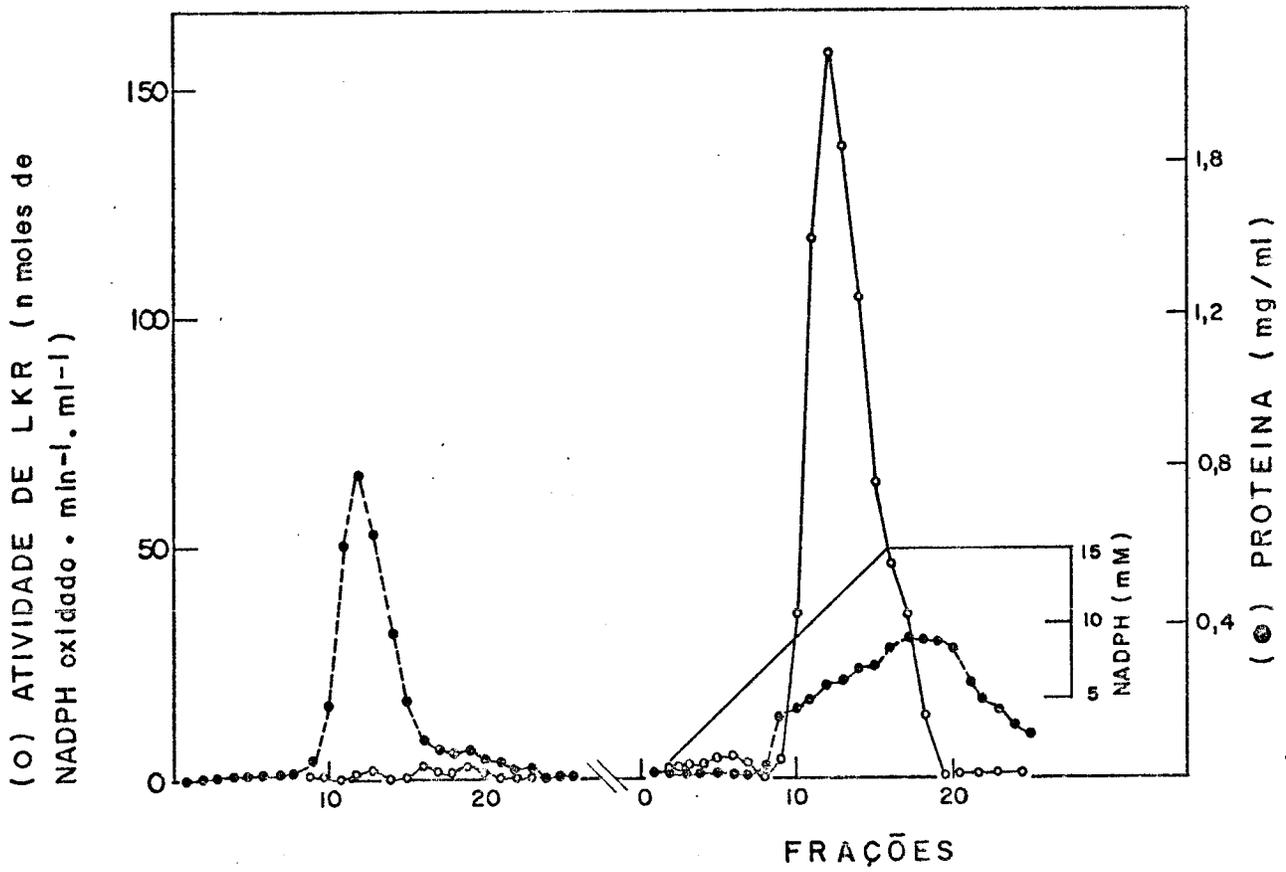


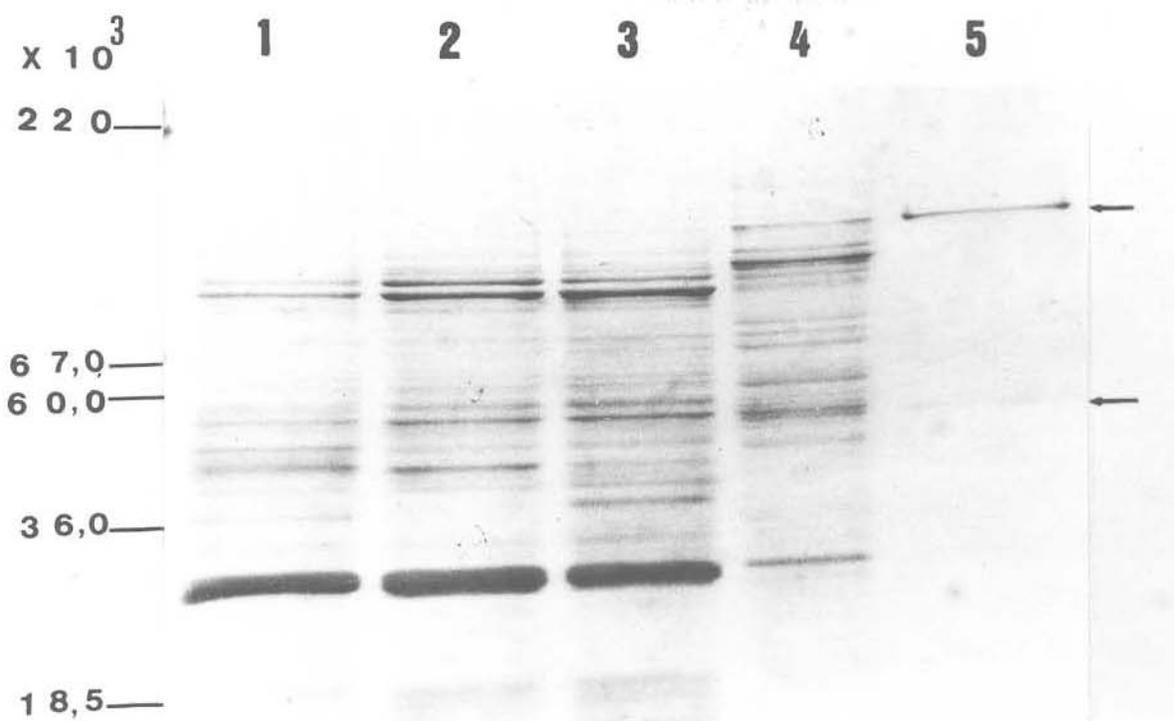
FIGURA 20 - (A) PAGE, de gradiente (5 a 10%), dos passos da purificação de LKR (ver também Tabela IV). Os canais do gel, 1, 2, 3, 4 e 5, correspondem respectivamente, às frações FI, FII, FIII, FIV e FV desta tabela. A fixação de proteínas (10 ug/canal do gel) foi feita pelo método de De Moreno e colaboradores (1985). (B) Atividade de LKR revelada em parte do mesmo gel, para a FIV (cerca de 300 ug de proteína). Os padrões de peso molecular utilizados aqui foram: ferritina - 440.000, catalase - 232.000, lactato desidrogenase - 140.000 e albumina bovina - 67.000.

Nas Figuras 20(A,B) observa-se o perfil de bandas proveniente da eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não-denaturantes, de todos os passos de purificação. Este gel foi feito em duplicata para a fixação de proteínas (20A), pelo método combinado de Comassie Blue-Prata (De Moreno e col., 1985), e para a detecção da atividade da enzima, somente na FRAÇÃO IV (20B), como especificado em Material e Métodos - ítem 7.2. A quantidade de proteína colocada individualmente nos canais de 1 a 5 do gel foi da ordem de 10 ug, enquanto que, no canal 6 do mesmo gel, a quantidade de proteína foi da ordem de 300 ug. As Figuras acima, demonstram que em PAGE, a enzima purificada em Blue-Sepharose aparenta ser homogênea, como pode ser visto pela única banda de proteína, a qual, também é correspondente à atividade da enzima detectada na parte do gel revelado para a atividade da mesma.

O peso molecular da enzima nativa foi estimado neste experimento, tanto através da curva de calibração com os padrões de peso molecular (HMW) como através do tratamento de Plikaytis e colaboradores (1986) e foi da ordem de 140.000.

Quando o mesmo experimento acima foi feito sob condições denaturantes, verificou-se (Figura 21) que a enzima purificada se encontrava ainda parcialmente homogênea. A quantidade de proteína aplicada em cada canal do gel também foi da ordem de 10 ug e a fixação das mesmas

FIGURA 21 - PAGE-SDS, de gradiente (5 a 20%), dos passos de purificação de LKR (Tabela IV). A fixação de proteínas (10 ug/canal do gel) foi feita pelo método de De Moreno e colaboradores (1985). Os padrões de peso molecular utilizados foram: ferritina - 220.000, albumina bovina - 67.000, catalase - 60.000, lactato desidrogenase - 36.000 e ferritina - 18.500.

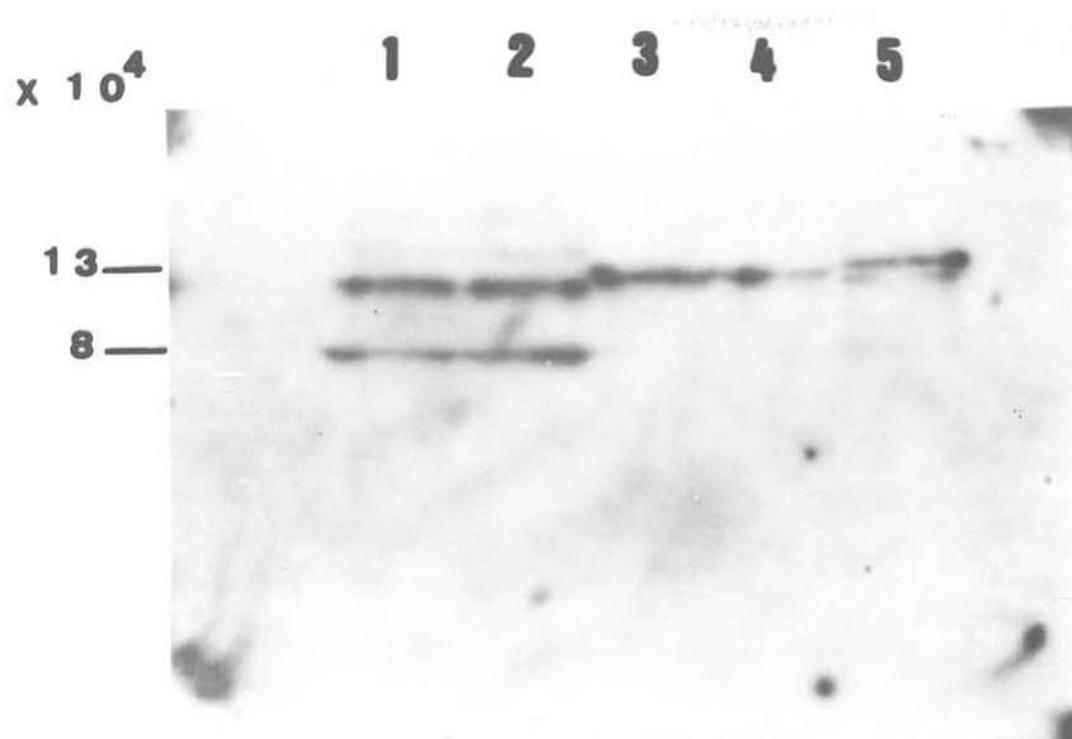


também foi feita pelo método indicado logo acima. No canal onde a enzima se encontra com maior grau de purificação, nota-se a presença de uma banda predominante de alto peso molecular (134.000), e uma outra banda bem menos intensa de menor peso molecular (54.000). A preparação de anticorpos policlonais, foi feita (segundo Material e Métodos - item 11.4) contra esta banda removida de um gel de PAGE-SDS, cujas proteínas foram fixadas com KCl 0,25 M de acordo com Hager e Burgess (1980). Desde que, as diversas tentativas de eluição ou eletroeluição da enzima, a partir de géis não-denaturantes, como também, os esforços no sentido de se recuperar a atividade de LKR, posteriormente à sua eluição de géis dissociantes (Hager e Burgess, 1980) foram sempre infrutíferas, e pelo fato de que, esta foi a única banda que se mostrou enriquecida durante os passos de purificação, em PAGE-SDS, nos pareceu bastante provável que esta banda correspondesse à enzima LKR.

Após a obtenção dos anticorpos, e devido à pouca quantidade do material de estudo ainda existente, o título do antisoro contra LKR não foi determinado, mas estima-se que seja no mínimo 1:500.

Os estudos de Western blot contra um gel de PAGE-SDS de todas as etapas da purificação da enzima (idêntico ao da Figura 21) revelou que os anticorpos foram capazes de reconhecer uma única banda de M_r 130.000 nos extratos mais purificados, mas reconheceram duas bandas nos

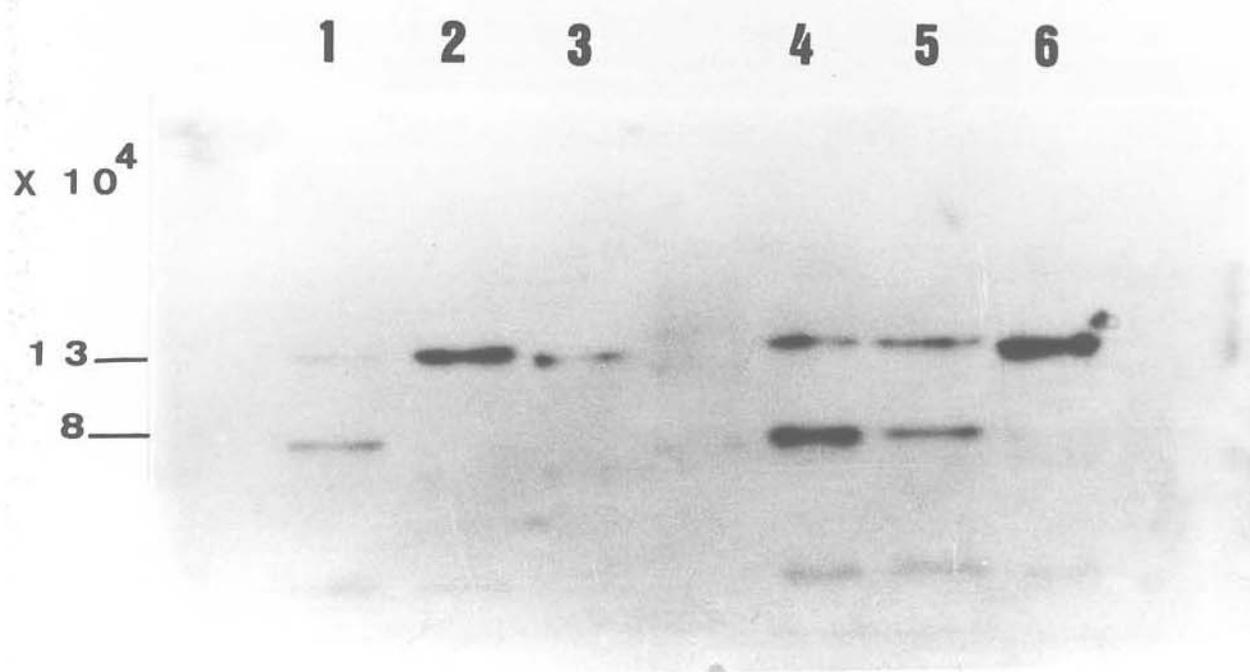
FIGURA 22 - Western blot da enzima em PAGE-SDS, de gradiente (5 a 20%), com os anticorpos policlonais produzidos contra a mesma. O gel foi preparado identicamente ao gel da Figura 21, com exceção de que, em cada canal, colocou-se 100 ug de proteína, de cada uma das frações da Tabela IV. 1, 2, 3, 4 e 5, correspondem respectivamente, às frações FI, FII, FIII, FIV e FV. (Ver Material e Métodos - ítem 11.5).



extratos da centrifugação a 22.000 X g e da precipitação com sulfato de amônio. Os resultados estão apresentados na Figura 22. A origem desta segunda banda nos é desconhecida, desde que todos os outros resultados indicam a existência de uma única forma da enzima LKR.

Afim de verificarmos se o mesmo poderia ocorrer com a versão opaco-2, extratos da versão normal e opaco-2, preparados semelhantemente aos três estágios iniciais da purificação de LKR, foram submetidos à eletroforese em um gel de PAGE-SDS e posteriormente analisados por Western blot. A Figura 23 mostra que, também em extratos mutantes menos purificados, ocorre reconhecimento por parte dos anticorpos de uma mesma banda de proteína correspondente àquela vista em extratos normais.

FIGURA 23 - Western blot da enzima em PAGE-SDS, de gradiente (5 a 20%), com os anticorpos policlonais produzidos contra a mesma. Neste experimento, são comparadas diferentes frações do material normal (1, 2 e 3) e opaco-2 (4, 5 e 6). Em cada canal do gel aplicou-se 50 µg de proteína. Canais 1 e 4, sobrenadante de 3.000 X g; 2 e 5, fração proveniente da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 35-60% ; 3 e 6, sobrenadante de 105.000 X g.



IV. DISCUSSÃO

Desde a descoberta do valor nutritivo superior do mutante de milho opaco-2 (Mertz e col., 1964), considerável atenção tem sido dada a este gene mutante para o entendimento dos efeitos por ele causados no metabolismo de aminoácidos e proteínas no endosperma de milho. O gene opaco-2 age como um gene regulatório, modificando a composição das proteínas do endosperma e aumentando seu conteúdo de lisina, um aminoácido limitante no milho comum. O decréscimo no catabolismo deste aminoácido pode ser o responsável, pelo menos em parte, por esse aumento (Silva e Arruda, 1979).

Atualmente, muito pouco é conhecido sobre o metabolismo de lisina em endospermas de milho. Os estudos desta tese se relacionam, à enzima - lisina-cetoglutarato redutase (LKR) - caracterizada, neste tecido, por Arruda e colaboradores (1982) e que deve participar do primeiro passo do catabolismo de lisina, a exemplo do que ocorre em mamíferos (Hutzler e Dancis, 1968; Dancis e col., 1969).

A enzima LKR foi estudada em uma linhagem de milho homozigota - L1038 - nas versões normal e opaco-2. Os experimentos onde estudamos as variações das atividades de LKR ao longo do desenvolvimento dos endospermas normais e

mutantes (Figura 4) mostram que o padrão de atividade, no endosperma opaco-2, é drasticamente diminuído em relação ao normal e está bem correlacionado com a ação do gene opaco-2 sobre uma menor intensidade de síntese de zeína no endosperma mutante, em desenvolvimento (Resultados deste laboratório, não publicados). Ao mesmo tempo, esses resultados indicam que o controle da atividade da enzima pode ser um importante mecanismo, pelo qual, o gene opaco-2 aumenta o conteúdo de lisina no endosperma de milho. As variações dos padrões de atividade da enzima podem também estar associados à síntese da enzima, como sugerem os experimentos de eletroforese em PAGE (Fig. 13A,B) pela intensidade de bandas de proteínas correspondentes à atividade da enzima em gel.

Como demonstrado anteriormente por Arruda e colaboradores (1982), a enzima LKR de milho, da mesma forma que a enzima de mamíferos, difere em alguns aspectos da enzima de microorganismos (Saunders e Broquist, 1966; Wade e col., 1980), ou seja, tanto a enzima de milho como a de mamíferos, requerem NADPH ao invés de NADH como cofator; a sua função é degradativa e não de síntese e no equilíbrio a reação é favorecida na direção da formação da sacaropina. O pH ótimo encontrado para a enzima de milho, em nossos experimentos foi igual a 7,0, confirmando assim, o valor obtido anteriormente por Arruda e colaboradores (1982). Hutzler e Dancis (1968) também haviam relatado um valor de pH ótimo igual a 7,0 para a enzima de fígado humano, mas num

estudo posterior (Hutzler e Dancis, 1975) encontraram que o valor correto era de 7,8. Já para a mesma enzima de placenta humana (Fjellstedt e Robinson, 1975a) o valor de pH encontrado foi de 7,35.

A estabilidade da atividade de LKR frente à variações da temperatura e durante a estocagem dos extratos foi testada de maneira semelhante à enzima de fígado humano (Hutzler e Dancis, 1975), em que, no primeiro caso, a enzima foi exposta à diferentes temperaturas por curtos intervalos de tempo e a seguir analisada para a atividade residual e no segundo caso, uma fração dos extratos foi estocada a -20°C e monitorada para a atividade da enzima. Nossos resultados estão em perfeito acordo com aqueles encontrados por estes autores, sendo que, tanto a enzima de milho como a de fígado humano perdem a atividade rapidamente em temperaturas acima de 40°C (Tabela II). Estes autores também encontraram, a exemplo do que ocorre com a FIIIf de milho (Tabela III), uma queda de 50% na atividade original depois de um mês de estocagem a -20°C . Nossos resultados (Tabela III) demonstram que esta queda pode ser evitada ou minimizada pela presença de 2-mercaptoetanol ou DTT no extrato, os quais não foram utilizados nos extratos da enzima de fígado humano. Estas observações sugerem que o sítio ativo da enzima de milho envolve grupos $-\text{SH}$. Uma fração um pouco mais purificada da enzima de fígado, também perdeu sua atividade em uma semana, após estocagem a -20°C .

Existem ainda outras características em que, as enzimas de fígado e de milho são muito semelhantes. Exemplo disto, é o fato de que Hutzler e Dancis (1975) encontraram para a enzima de fígado um efeito de inibição pelo produto da reação, da ordem de 30%, quando 1 mM de sacaropina foi adicionada no sistema padrão de ensaio. Para a enzima de milho, encontramos uma inibição de 54% para o material normal e de 27% para o mutante opaco-2, com 1 mM de sacaropina nos ensaios. Taxas de inibição maiores ainda foram encontradas com 2 mM de sacaropina nos ensaios (Figuras 10A e 10B). A inibição encontrada para a enzima de fígado foi do tipo competitiva tanto para lisina, como para alfa-cetoglutarato. Já para a enzima de placenta humana (Fjellstedt e Robinson, 1975a) a inibição por sacaropina demonstrou ser competitiva em relação alfa-cetoglutarato e não-competitiva em relação à lisina. Infelizmente, não chegamos a realizar estudos mais detalhados para determinar que tipo de inibição ocorre com a enzima de milho.

Os estudos de velocidade inicial de LKR no material normal e opaco-2 (Figuras 7 e 8) demonstram padrões de cinética bastante complexos, onde se observa inibição da atividade da enzima em altas concentrações do substrato - lisina ou alfa-cetoglutarato. A constante de Michaelis foi determinada somente para lisina, já que a cinética de alfa-cetoglutarato se apresentou mais complexa que a de lisina. Os valores de K_m encontrados para lisina, na linhagem em estudo, foram de 8,7 e 4,1 mM, respectivamente para os

materiais normal e opaco-2, enquanto que Arruda e colaboradores (1982) encontraram um valor de 5,2 mM para lisina, no híbrido de milho ML-2000 X ML-2001. Como discutido anteriormente por Arruda e Silva (1983), a concentração de lisina do endosperma estimada com base no conteúdo de água deste tecido, é de 5,8 mM aos 10 dap, 2-3 mM nos estágios intermediários e 7-11 mM de 40 até 55 dap, concentrações altas bastante para suportar a atividade da enzima. Entretanto, como também mencionado por estes autores para maiores evidências da atividade da enzima "in vivo", torna-se necessário a localização da enzima no endosperma.

Os experimentos desta tese, utilizando-se cromatografias em coluna de DEAE-celulose, gradientes de sacarose, filtração em Sephadex G-200 e revelação da atividade da enzima em géis de poliacrilamida não-denaturante, demonstram que no milho, existe apenas uma única forma da enzima LKR na fração solúvel de endospermas normais e mutantes opaco-2. A enzima é eluída da cromatografia de troca iônica com concentrações de KCl em torno de 0.2 M, e o peso molecular calculado para a enzima variou dependendo da técnica utilizada de 160.000 em gradiente de sacarose e filtração em gel, até 134.000 calculado em géis de poliacrilamida.

Nós purificamos a LKR de endospermas de milho normal por um fator de 275 vezes e esta é a primeira

preparação quase que homogênea da enzima obtida de tecidos vegetais. Os anticorpos policlonais contra LKR (purificada de endospermas normais) através dos testes de Western blot reconheceu em gel de SDS uma única banda de peso molecular de 130.000 nos estágios de maior purificação da enzima e além desta, uma outra banda de menor peso molecular ($M_r = 80.000$) nos estágios de menor grau de purificação. O mesmo foi observado em extratos da versão opaco-2. Até o momento, desconhecemos a explicação para tais resultados, desde que, os experimentos de gradientes de sacarose, feitos com a FRAÇÃO II (35-60%), e os de cromatografia de troca iônica, sempre demonstraram a presença de uma única forma da enzima LKR, nestes extratos.

Em tecidos humanos, esta enzima foi anteriormente purificada, 45 vezes, de fígado (Hutzler e Dancis, 1975) e, 450 vezes, de placenta (Fjellstedt e Robinson, 1975a). A enzima de placenta, apresentou um peso molecular de 480.000 em Sepharose 4B e tanto esta como a enzima de fígado não puderam ser separadas das atividades de sacaropina desidrogenase presente nestes mesmos tecidos. No caso da enzima de placenta humana, não foi obtida nenhuma indicação de separação destas duas atividades, quer através do processo de purificação ou através da presença de detergentes nos extratos, mas as indicações de que estas são duas enzimas distintas, neste tecido, são as seguintes: a) requerimento de cofator NADPH para LKR e de NAD^+ para SDH; b) pH ótimo de 7,35 para LKR e 8,5-8,9 para SDH; e

principalmente, c) inibição de LKR por L-lisina-p-nitroanilida, o que não ocorre com a SDH. No caso das enzimas de fígado, existe o mesmo requerimento diferencial destes cofatores e os valores de pH ótimo são de 7.8 para LKR e 8.8 para SDH.

Resultados anteriores deste laboratório (Arruda e col., 1984) obtidos através de estudos com endospermas de milho isolados de híbridos ou de linhagens nas versões normal e opaco-2, demonstram que a atividade de sacaropina desidrogenase também se encontra presente neste tecido e que da mesma forma como ocorre em placenta e fígado humanos, a enzima catalisa a conversão de sacaropina em alfa-aminoadípico-delta-semialdeído, requer NAD^+ como cofator, e tem pH ótimo alcalino de 8,6. Os valores de Km encontrados para sacaropina e NAD^+ na enzima de milho foram de 0,05 e 0,2 mM, respectivamente. Desde que, as dosagens de atividade de SDH não foram feitas nesta tese, não podemos descartar a hipótese de que também na fração solúvel de endospermas se encontrem juntamente presentes as atividades de LKR e SDH, a exemplo do que ocorre em tecidos humanos. No entanto, a aparente homogeneidade obtida para a enzima LKR, purificada através de cromatografia de afinidade, e verificada posteriormente em gel de SDS, parece anular esta hipótese. Ainda neste particular, é de muito interesse ressaltar que mesmo que as enzimas de milho se encontrem juntas, elas apresentam ainda outras características que as colocam como enzimas distintas, como foi observado por

Arruda e colaboradores (1984). Assim, a análise, feita por estes autores, das atividades de LKR e SDH em diferentes linhagens de milho, nas versões normal e opaco-2, de 15 a 30 dap, demonstrou que: a) aparentemente, ao contrário da LKR, os níveis de atividade de SDH, durante o desenvolvimento do endosperma, em algumas linhagens é bastante baixo ou nulo em qualquer uma das versões estudadas; b) a atividade de SDH não é alterada pela presença do gene opaco-2, indicando que este gene afeta somente a primeira enzima da via degradativa de lisina, neste tecido, e não afeta a segunda enzima. A presença de um possível inibidor da atividade de LKR nos endospermas mutantes também foi descartada por estes autores. Isto vem, portanto, mais uma vez reforçar a suposição de que a degradação de lisina é um meio importante pelo qual o gene opaco-2 aumenta o conteúdo de lisina no endosperma.

Uma comparação feita entre as correspondentes enzimas de levedura, com as enzimas de milho, placenta e fígado humano (ver TABELA V) revela que aquelas têm diferenças contrastantes com respeito ao peso molecular, pH ótimo, requerimento de cofator e principalmete, como mencionado anteriormente (ver Introdução - item 1), uma mesma enzima pode ser responsável pela síntese e degradação de lisina, via sacaropina, em levedura, *N. crassa* e alguns fungos. Entretanto, a conversão de sacaropina até alfa-aminoadípico-delta-semialdeído e glutamato é catalizada pela enzima - sacaropina desidrogenase, NAD⁺ (EC 1.5.1.9) ou

	Tecido	pH	Cofator	Inibidor	Temp. °C	P.M.	Estabilidade	Especificidade	Km				
									Lis.	Sacaropina	Oxoglutarato	Cofator	
L K R	Tecidos Humanos	7,8	NADPH	Produto da reação: sacaropina a 1×10^{-3} M	23°C	-	1 mês a -20°C ou 10 min. em Temperat. abaixo de 40°C	Pelos Substratos	$1,5 \times 10^{-3}$ M	-	1×10^{-3} M	8×10^{-5} M	Hutzler e Dancis (1968, 1975)
	Fígados de mamíferos	7,0	NADPH	NH ₄ Cl 5×10^{-2} M	30°C	-	4h a 30°C	-	-	-	-	-	Fellows (1973); Fellows e Lewis (1973)
	Placenta Humana	7,35	NADPH	p-lisina-p-nitroanilida e S-2-aminoetil-L-cisteína a 1×10^{-2} M e sacaropina a $3,3 \times 10^{-4}$ M	37°C	480.000	a pH 7,5 na presença de 2-ME 5×10^{-3} M e EDTA 1×10^{-4} M	Pelos Substratos	-	-	-	-	Fjellstedt e Robinson (1975)
	Piricularia oryzae	6,8	NADPH	-	27°C	-	-	-	-	-	-	-	Wade e col. (1980)
	Milho	7,0	NADPH	Produto da reação - sacaropina: 1 a 2×10^{-3} M	30°C	130.000 a 160.000	1 mês a 20°C (na FII); 1 semana a 4°C (FV)	Pelos Substratos	$5,2 \times 10^{-3}$ M e $8,7 \times 10^{-3}$ M na L1038	-	-	-	-
S D H	Levedo e N. crassa	7 e 10	NAD	Reagentes Sulfidrilo p-hidroximercuribenzoato a 5×10^{-5} M	25°C	49.000	entre pH 5 e 8 e em concentrações de KCl acima de 0,1M	Pelo Substrato	$1,2 \times 10^{-2}$ M	-	$4,4 \times 10^{-2}$ M	$4,6 \times 10^{-5}$ M	Saunders e Broquist (1966)
	Fígado Humano	8,8-9,0	NAD	p-Hidroxi-mercuro benzoato a 1×10^{-4} M; HgCl ₂ e CuSO ₄ a 1×10^{-3} M	30°C	-	à -20°C diversos meses (extrato bruto) 5 à 37°C (extrato purificado 120 vezes)	Pelo Substrato	-	5×10^{-4} M	-	4×10^{-4} M	Hutzler e Dancis (1970)
	Fígados de mamíferos	8,8	NAD	-	30°C	-	-	-	-	-	-	-	Fellows e Lewis (1973)
	Placenta Humana	8,5-8,9	NAD; NADP - menor velocidade de reação	Glutamato a 5×10^{-4} M	37°C	480.000	-	Pelo Substrato	-	$1,15 \times 10^{-3}$ M	-	$6,45 \times 10^{-5}$ M	Fjellstedt e Robinson (1975)
	P. oryzae	9,6	NAD	-	27°C	-	-	Pelo Substrato	-	-	-	-	Wade e col. (1980)
Milho	8,6	NAD	-	30°C	-	-	-	-	-	$4,5 \times 10^{-5}$ M	-	2×10^{-4} M	Fellows e Lewis (1973)

NADP⁺ (EC 1.5.1.10) - (ver Figura 3), como também ocorre em mamíferos e plantas superiores, demonstrando assim, que a via de sacaropina é uma via catabólica comum entre todos estes organismos.

A partir da discussão acima, parece que um completo conhecimento das enzimas implicadas, quer na síntese ou degradação de lisina, principalmente em plantas, é um passo necessário para que se possa desenvolver uma abordagem experimental que permita o desenvolvimento de novos e diferentes métodos para a produção de mutantes com alto teor de lisina e portanto, com maior valor nutritivo. Nesta tese, estudamos e caracterizamos a enzima - lisina ceto-glutarato redutase (LKR) - a qual, deve participar do primeiro passo do catabolismo de lisina em endospermas de milho. A purificação e a produção de anticorpos policlonais contra a enzima purificada, realizada nesta tese, servirão em breve na elaboração de metodologias de seleção de mutantes com ausência de atividade da enzima e características normais de semente, e que portanto, possuam altos teores de lisina no endosperma.

V. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

a) a atividade de LKR é encontrada na fração solúvel de endospermas normais e mutantes opaco-2. Extratos fracionados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mostraram que a enzima está concentrada na faixa de 35-60%.

b) durante o desenvolvimento do endosperma, a atividade de LKR sofre flutuações que parecem ser coincidentes com a sua síntese, e nos estágios intermediários (ao redor de 20 dap), a enzima, no material normal, chega a atingir níveis de atividade três vezes maiores que aqueles encontrados no material opaco-2.

c) a enzima LKR tem algumas características bastante semelhantes às enzimas de placenta e fígado humano, como: requerimento pelo cofator NADPH, pH ótimo, termoestabilidade, inibição pelo produto sacaropina, e a exemplo destas, deve participar do primeiro passo do catabolismo de lisina em endospermas de milho.

d) a cinética da enzima, tanto para lisina como para alfa-cetoglutarato, mostrou ser bastante complexa para ambos os substratos, principalmente para alfa-cetoglutarato. Os

valores de Km encontrados somente para lisina foram de 8,7 e 4,1 mM, respectivamente para o material normal e opaco-2.

e) o estudo comparativo da enzima nos dois materiais - normal e opaco-2 - em PAGE e PAGE-SDS não demonstrou qualquer diferença no padrão de bandas de proteínas, enquanto que, a detecção da atividade de LKR em gel não denaturante, só é possível para o material normal.

f) os perfis da atividade de LKR obtidos através de cromatografia em DEAE-celulose, ultracentrifugação em gradientes de sacarose e filtração em gel Sephadex G-200, demonstraram a presença de um único pico da enzima na fração solúvel de endospermas normais e opaco-2, o qual, sempre apresenta menores níveis de atividade no endosperma opaco-2, em relação ao normal, indicando que a enzima LKR está sob o controle do gene opaco-2.

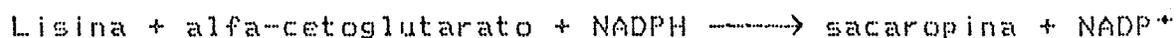
g) O peso molecular encontrado para a enzima variou de 130.000 (em géis) a 160.000 pelas técnicas acima. A enzima deve ser uma molécula monomérica.

h) Os estudos da caracterização imunológica realizados com os anticorpos policlonais contra a enzima purificada através de uma sequência de passos de fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ultracentrifugação e cromatografias de troca iônica e afinidade, demonstraram o reconhecimento, por parte destes anticorpos, de uma única banda de Mr 130.000 nos extratos purificados e de duas bandas nos extratos da centrifugação a

3.000 X g ou a 22.000 X g e na fração saturada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 35-60%. A origem desta segunda banda, até o momento, nos é desconhecida.

VI. RESUMO

Neste trabalho, foram determinadas algumas características da enzima lisina-cetoglutarato redutase (EC 1.5.1.8) de endospermas normais e opaco-2 da linhagem homozigota de milho - L 1038. A exemplo do que ocorre em mamíferos, esta enzima deve participar do primeiro passo do catabolismo de lisina e catalisa a reação:



Durante o desenvolvimento do endosperma, a atividade de LKR mostrou variações significativas em ambos os genótipos, as quais, parecem ser coincidentes com a sua síntese, sendo que, ela aumentou logo no início do desenvolvimento da semente, encontrou um pico aos 20-25 dias após a polinização e decresceu, em seguida, em direção à maturidade da semente. O padrão de atividade, no endosperma opaco-2, é drasticamente diminuído em relação ao normal, chegando a ser três vezes menor que este nos estágios intermediários do desenvolvimento do endosperma. Ao mesmo tempo, quando extratos de endospermas normais e mutantes opaco-2 foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida (sob condições não-denaturantes), e a seguir, a atividade de LKR foi revelada em gel, uma banda correspondente à atividade da enzima, foi possível de ser

visualizada somente no material normal. Estes resultados indicam que a enzima LKR está sob controle do gene opaco-2.

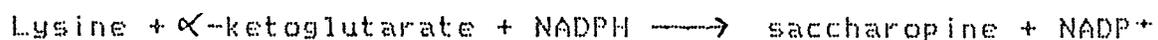
Cerca de 3.000 endospermas da versão normal, no período de maior atividade de LKR, foram utilizados para a purificação da enzima através de uma sequência de passos de fracionamento em sulfato de amônio, ultracentrifugação e cromatografias de troca iônica e afinidade. A preparação mais pura obtida da cromatografia de afinidade foi enriquecida 275 vezes e tinha uma atividade específica de 414 nmoles de NADPH.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. A enzima deve ser uma monômero de Mr 130.000 a 160.000, conforme determinado por filtração em gel Sephadex G-200, ultracentrifugação em gradientes de sacarose e eletroforese em géis de poliacrilamida. A banda mais intensa de Mr 134.000, proveniente da eletroforese sob condições denaturantes da enzima purificada, foi utilizada para a preparação de anticorpos policlonais, em coelhos New Zealand. Os experimentos de Western blot, utilizando-se estes anticorpos, foram realizados com os extratos provenientes dos diferentes passos da purificação da enzima, resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (sob condições denaturantes). Os resultados demonstraram o reconhecimento, por parte destes anticorpos, de uma única banda de Mr 130.000 nos extratos purificados. Entretanto, nos extratos da centrifugação a 3.000 X g ou a 22.000 X g e naqueles fracionados com sulfato de amônio, além desta banda, uma segunda banda de menor peso molecular (Mr =

80.000), foi também reconhecida por estes anticorpos. A origem desta banda, até o momento nos é desconhecida, desde que todos os resultados obtidos, neste trabalho, indicam a existência de uma única forma da enzima na fração solúvel de endospermas normais e mutantes opaco-2.

A enzima de milho tem propriedades bastante similares às enzimas de fígado e placenta humanos, tais como: requerimento pelo cofator NADPH, pH ótimo, termoestabilidade e inibição pelo produto - sacaropina. A cinética da enzima mostrou ser bastante complexa para ambos substratos. Os valores de Km encontrados para lisina foram de 8,7 e 4,1 mM, respectivamente para as versões normal e opaco-2

VII. SUMMARY

Lysine-ketoglutarate reductase (LKR, EC 1.5.1.8) was investigated in endosperms of homozygous normal and opaque-2 versions of L1038 maize inbred line. The enzyme catalyses the following reaction:



The enzyme activity in both genotypes increased with the onset of seed development, reached a peak around 20 days after pollination and then decreased towards seed maturity. The enzyme activity of opaque-2 endosperm was 2-3 times lower than the normal endosperm. Extracts from normal and opaque-2 endosperms were resolved by polyacrilamide gel electrophoresis and developed for LKR activity. A band corresponding to the enzyme activity was detected only in the normal extract. These results suggest that LKR is under control of opaque-2 gene.

Three thousand endosperms of the normal version of L1038 taken at the period of highest enzyme activity were used for the purification of LKR through a sequence of steps including ammonium sulfate fractionation, ultracentrifugation, and ion-exchange and affinity chromatography. The purest preparation obtained after affinity chromatography was 275 fold enriched and had a specific activity of 414 nmol.min⁻¹.mg protein⁻¹. The

molecular weight of the enzyme as determined by gel filtration, gradient centrifugation and gel electrophoresis was in the range of 130.000 to 160.000. Polyclonal antibodies against the purified enzyme were raised in rabbits. Western blot analysis using anti-LKR antibodies was carried out with extracts of different purification steps resolved by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. A single immunoprecipitated band of 130.000 was observed in the purified extract. In crude and ammonium sulphate fractionated extracts an additional band of 80.000 cross-reacted with the anti-LKR antibodies. The origin of this band is unknown, since all other data demonstrated a unique form of LKR both in normal and opaque-2 endosperms.

The maize enzyme was very similar to that found in human tissues in several aspects, including specificity for NADPH, pH optimum, thermal stability and product inhibition. Kinetic studies with lysine and alfa-ketoglutarate revealed complex K_m for both substrates. The K_m for lysine was 8,7 and 4,1 mM, respectively for normal and opaque-2 materials.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arruda, P. e Silva, W.J. (1979). Aminoacids composition of vascular sap of maize ear peduncule. *Phytochemistry* **18**:409-410.

Arruda, P.; Sodek, L. e Silva, W.J. (1982). Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, **69**:988-989.

Arruda, P. e Silva, W.J. (1983). Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize: its possible role in metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* **22**:2687-2689.

Arruda, P.; Silva, W.J. e Teixeira, J.P.F. (1978). Protein and free aminoacids in a high lysine maize double mutant. *Phytochemistry* **17**:1217-1218.

Arruda, P.; Toccozilli, J.M.G.; Vieira, A. e Silva, W.J. (1984). Degradation of lysine in maize: possible pathway and genetic control. *Maize Genet. Coop. News Let.* **58**:50.

Brandt, A.B. (1975). In vivo incorporation of lysine ^{14}C into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. *FEBS Letters* **52**:288-291.

- Bilinski, E. e McConnell, W.B. (1957). The utilization of acetate for amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem. Physiol.* **35**:357-364.
- Burr, B. e Burr, F.A. (1976). Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**:515-519.
- Carson, N.A.J.; Scally, B.G.; Neill, D.W. e Carré, I.J. (1968). Saccharopinuria: a new inborn error of lysine metabolism. *Nature (London)* **218**:679.
- Cederbaum, S.D.; Shaw, K.N.F.; Dancis, J.; Hutzler, J. e Blaskovics, J. C. (1979). Hiperlysinemia with saccharopinuria due to combined lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase deficiencies presenting as cistinuria. *J. Pediat.* **95**:234-238.
- Chang, Y.F. (1982). Lysine metabolism in the human and the monkey: Demonstration of pipecolic acid formation in the brain and other organs. *Neurochem. Res.* **7**:577-588.
- Chang, Y.F. e Adams, E. (1974). D-Lysine catabolic pathway in *Pseudomonas putida*: interrelations with L-lysine catabolism. *J. Bacteriol.* **117**:753-764.

Cheshire, R.M. e Mifflin, B.J. (1975). The control of lysine biosynthesis in maize. *Phytochemistry* **14**:695-698.

Dalby, A. e Davies, I.I. (1967). Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and opaque-2 maize. *Science* **155**:1537-1575.

Dalby, A. e Tsai, C.Y. (1975). Comparison of lysine and zein and nonzein protein contents in immature and mature maize mutants. *Crop Science* **15**:513-515.

Dancis, J.; Hutzler, J.; Cox, R.P. e Woody, N.C. (1969). Familial hyperlysinemia with lysine-ketoglutarate reductase insufficiency. *J. Clin. Invest.* **48**:1447-1452.

Dancis, J.; Hutzler, J.; Woody, N.C. e Cox, R.P. (1976). Multiple enzyme defects in familial hyperlysinemia. *Pediat. Res.* **10**:686-691.

De Moreno, M.R.; Smith, J.F. e Smith, R.V. (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie Blue-Silver stain procedure. *Anal. Biochem.* **151**:466-470.

- Esen, A. (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* **80**:623-627.
- Esen, A.; Beitz, J.A.; Paulis, J.W. e Wall, J.S. (1985). Isolation and characterization of a methionine-rich protein from maize endosperm. *J. Cereal Sci.* **3**:143-152.
- F.A.O. (1970). Aminoacid content of foods and biological data on proteins. *Nutritional Studies Nº 24*. Food and Agricultural Organization, Rome.
- Fellows, F.C.I. (1972). Tese de Ph.D. The Queen's University of Belfast.
- Fellows, F.C.I. (1973). Biosynthesis and degradation of saccharopine, an intermediate of lysine metabolism. *Biochem. J.* **136**:321-327.
- Fellows, F.C.I. e Lewis, M.H.R. (1973). Lysine metabolism in mammals. *Biochem. J.* **136**:329-334.
- Fjellstedt, T.A. e Robinson, J.C. (1975a). Purification and properties of L-lysine-alfa-ketoglutarate reductase from human placenta. *Arch. Biochem. Biophys.* **168**:536-548.

Fjellstedt, T.A. e Robinson, J.C. (1975b). Properties of partially purified saccharopine dehydrogenase from human placenta. Arch. Biochem. Biophys. **171**:191-196.

Fowden, L. (1960). The metabolism of labelled lysine and pipercolic acid by *Acacia phyllodes*. J. Exp. Bot. **11**:302-315.

Gaillardin, C.M.; Poirier, L.; Ribet, A.M. e Heslot, H. (1979). General and lysine specific control of saccharopine dehydrogenase levels in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Biochimie **61**:473-482.

Gengenbach, B.G.; Walter, T.J.; Green, C.E. e Hibberd, K.A. (1978). Feedback regulation of lysine, treonine, and methionine biosynthetic enzymes in corn. Crop. Sci. **18**:472-476.

Gianazza, E.; Righetti, P.G.; Piolli, F.; Galante, E. e Soave, C. (1976). Size and charge heterogeneity of zein in normal and opaque-2 maize endosperms. Maydica **21**:1-17.

Grobbelaar, N.; Zacharius, R.M. e Steward, F.C. (1954). The bulk isolation of L(-)pipercolic acid from *Phaseolus vulgaris* and its quantitative determination. J. Am. Chem. Soc. **76**:2912-2915.

Guengerich, F.P. e Broquist, H.P. (1976). Lysine catabolism in *Rhizoctonia leguminicola* and related fungi. J. Bacteriol. **126**:338-347.

Hadzi, V. e Sukalovic, T. (1984). Activity of nitrogen metabolism enzymes in the process of kernel development in different maize genotypes. FEBS Letters **171**:59-62.

Hager, D.A. e Burgess, R.R. (1980). Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. Anal. Biochem. **109**:76-86.

Hames, B.D. e Rickwood, D., editores. (1981). Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, IRL Press Limited, Oxford e Washington, D.C.

Henke, R.R. e Wahnbaeck, R. (1977). Beta-aspartokinase from developing endosperm of maize. Biochem. Biophys. Res. Commun. **79**:38-45.

Henke, R.R. e Wahnbaeck-Spencer, R. (1979). Variations in beta-aspartate kinase activity during the development of maize endosperm. FEBS Letters **99**:113-116.

- Higashino, K.; Tsukada, K. e Lieberman, I. (1965). Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **20**:285-290.
- Hutzler, J. e Dancis, J. (1968). Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **158**:62-69.
- Hutzler, J. e Dancis, J. (1970). Saccharopine cleavage by a dehydrogenase of human liver. *Biochim. Biophys. Acta* **206**:205-214.
- Hutzler, J. e Dancis, J. (1975). Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **377**:42-51.
- Jimenes, J.R. (1966). Protein fractionation studies of high lysine corn. Em: Proc. High Lysine Corn Conf., Mertz, E.T. e Nelson, O.E., eds. Corn Ind. Res. Found. Washington, D.C.
- Jones, E.E. e Broquist, H.B. (1965). Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **240**:2531-2536.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.

Landry, J. e Moureaux, T. (1970). Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52:1021-1037.

Larkins, B.A. e Hurkman, W.J. (1978). Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* 62:256-263.

Lee, K.H.; Jones, R.A.; Dalby, A. e Tsai, C.Y. (1976). Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. *Biochem. Genet.* 14:641-649.

Leistner, E.; Gupta, R.N. e Spector, I.P. (1973). A general method for the determination of precursor configuration in biosynthetic precursor-product relationship. Derivation of pipercolic acid from D-lysine, and of piperidine alkaloids from L-lysine. *J. Am. Chem. Soc.* 95:4040-4047.

Leite, I.C. (1988). Tese de doutorado: Estudo sobre a enzima lisina alfa-cetoglutarato redutase no milho. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.

Mann, P.J.G. e Smithies, W.R. (1955). Plant enzyme reactions leading to the formation of heterocyclic compounds. I. The formation of unsaturated pyrrolidine and piperidine compounds. *Biochem. J.* **61**:89-100.

Marks, M.D.; Lindell, J.S. e Larkins, B.A. (1985). Quantitative analysis of the accumulation of zein mRNA during maize endosperm development. *J. Biol. Chem.* **260**:16445-16450.

Martin, R.G. e Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**:1372-1379.

Mazelis, M. e Creveling, R.K. (1976). Diaminopimelate decarboxylase from wheat germ. *Plant Physiol. Suppl.* **57**:46.

Mazelis, M.; Mifflin, B.J. e Pratt, H.M. (1976). A chloroplast - localized diaminopimelate decarboxylase in higher plants. *FEBS Letters* **64**:197-200.

Mazelis, M.; Whatley, F.R. e Whatley, J. (1977). The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. The occurrence, characterization and some regulatory

properties of dihydropicolinate synthase. FEBS Letters
84:236-240.

McConnell, W.B. (1969). Studies of wheat plants using ^{14}C
labelled compounds. XXII. Incorporation into wheat
proteins. Can. J. Biochem. 47:19-23.

Meistner, A.; Radhakrishnan, A.N. e Buckley, S.D. (1957).
Enzymatic synthesis of L-pipecolic acid and L-proline.
J. Biol. Chem. 229:789-800.

Mertz, E.T.; Bates, L.S. e Nelson, O.E. (1964). Mutant gene
that changes protein composition and increase lysine
content of maize endosperm. Science 145:279-284.

Mertz, E.T.; Lloyd, N.E. e Bressani, R. (1968). Studies on corn
proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and
endosperm extracts. Cereal Chem. 35:146-149.

Miller, D.L. e Rodwell, V.W. (1971). Metabolism of basic
aminoacids in *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem.
246:2758.

Misra, P.S.; Janbunathan, R.; Mertz, E.T.; Glover, D.V.;
Barbosa, H.M. e Mc Wirtter, K.S. (1972). Endosperm protein
synthesis in maize mutants with increased lysine
content. Science 176:1425-1426.

Misra, P.S.; Mertz, E.T. e Glover, D.V. (1975). Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.* 52:734-739.

Moller, B.L. (1974). Lysine biosynthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 54:638-643.

Moller, B.L. (1976). Lysine catabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 57:687-692.

Mossé, J. (1966). Alcohol soluble proteins of cereal grains. *Fed. Proc.* 25:1663-1669.

Mossé, J. e Landry, J. (1980). Recent researchers on maize proteins: zeins and glutelins. Em: *Cereal for Food and Beverages. Recent Progress in Cereal Chemistry.* Inlett, G.E. e Munck, L., eds. Academic Press, New York.

Mossé, J.; Baudet, J.; Landry, J. e Moureaux, T. (1966). Étude sur les protéins du maïs. II. Comparaison entre les compositions in acides aminés et les proportions mutuelles de fractions protéiques de grains normaux et mutants. *An. Physiol. Veg.* 8:331-344.

Moureaux, T. e Landry, J. (1968). Extraction sélective des protéines du grain de maïs et en particulier de la fraction "glutelines". C. R. Acad. Sci., Paris, **226**:2302-2305.

Nawaz, R. e Sorensen, H. (1977). Distribution of saccharopine and 2-aminoadipic acid in higher plants. *Phytochemistry* **16**:599-600.

Nelson, O.E. (1966). Opaque-2, floury-2 and high-lysine maize. Em: Proc. High Lysine Corn Conf., Mertz, E.T. e Nelson, O.E., eds. Corn Ind. Res. Washington, D.C.

Nigam, S.N. e McConnell, W.B. (1963). Studies on wheat plants using carbon-14 compounds. XIX. Observations on the metabolism of lysine-C¹⁴. *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**:1367-1371.

Osborne, T.B. (1897). The amount and properties of the proteins of the maize kernel. *J. Amer. Chem. Soc.* **19**:525-532.

Paulis, J.W. e Wall, J.S. (1969). Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. *Cereal Chem.* **46**:263-273.

Paulis, J.W.; James, C. e Wall, J.S. (1969). Comparison of glutelin proteins in normal and high-lysine corn endosperm. *J. Agric. Food Chem.*, **17**:1301-1305.

Pedersen, K.; Argos, P.; Naravana, S.V.L. e Larkins, B.A. (1986). Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high-sulphur zein protein of Mr 15,000. *J. Biol. Chem.* **261**:6279-6284.

Plikaytis, B.D.; Carlone, G.M.; Edwards, P. e Mayer, W. (1986). Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **152**:346-364.

Righetti, P.G.; Gianazza, E.; Viotti, A. e Soave, C. (1977). Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta* **136**:115-123.

Rodwell, V.W. (1969). Em: Metabolic Pathways. Greenberg, D.M., ed., 3rd ed., Vol III pg 191-235. Academic Press, New York.

Rothstein, M. e Miller, L.L. (1954). The metabolism of L-lysine-6-C¹⁴. *J. Biol. Chem.* **211**:851-858.

- Saunders, P.P. e Broquist, H.P. (1966). Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **241**:3435-3440.
- Shimura, Y. e Vogel, H.J. (1966). Diaminopimelate decarboxylase of *Lemna perpusilla*: partial purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* **118**:396-404.
- Silva, W.J. e Arruda, P. (1979). Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochemistry* **18**:1803-1805.
- Soave, C. e Salamini, F. (1984). Organization and regulation of zein gene in maize endosperm. *Phil. Trans. R. Soc., Lond.* **304**:341-347.
- Soave, C.; Piolli, F.; Viotti, A.; Salamini, F. e Righetti, P.G. (1975). Synthesis and heterogeneity of endosperm protein in normal and opaque-2 maize. *Maydica* **20**:83-94.
- Soave, C.; Suman, M.; Viotti, A. e Salamini, F. (1978). Linkage relationship between regulatory and structural gene loci involved in zein synthesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* **52**:263-267.

Soave, C.; Reggiani, R.; Di Fonzo, N. e Salamini, F. (1981a). Clustering of genes for 20 K zein subunits in the short arm of maize chromosome 7. *Genetics* **97**:363-377.

Soave, C.; Tardini, L.; Di Fonzo, N. e Salamini, F. (1981b). Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the opaque-2 and opaque-6 loci. *Cell* **27**:403-410.

Sodek, L. (1976). Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry* **15**:1903-1906.

Sodek, L. (1978). Partial purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from maize endosperm. *Rev. Bras. Bot.* **1**:65-69.

Sodek, L. e Wilson, C.M. (1970). Incorporation of leucine-¹⁴C and lysine-¹⁴C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch. Biochem. Biophys.* **140**:29-38.

Sodek, L. e Wilson, C.M. (1971). Amino acid composition of proteins isolated from normal, "opaque-2" and "floury-2" corn endosperm by a modified Osborne procedure. *J. Agric. Food Chem.* **19**:1144-1150.

Spector, T. (1978). Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.* **86**:142-146.

Susor, W.A. e Rutter, W.J. (1971). Method for the detection of pyruvate kinase, aldolase and other pyridine nucleotide linked enzyme activities after electrophoresis. *Anal. Biochem.* **43**:147-155.

Terenzi, H.; Roselino, E. e Passeron, S. (1971). Two types of pyruvate kinase in *Mucor rouxii*. Changes in the enzymatic pattern related to aerobic development. *Eur. J. Biochem.* **18**:342-350.

Trupin, J.S. e Broquist, H.P. (1965). Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **240**:2524-2530.

Viotti, A.; Sala, E.; Alberi, P. e Soave, C. (1978). Heterogeneity of zein synthesized in vitro. *Pl. Science Lett.* **13**:365-375.

Vogel, H.J.; Thompson, J.S. e Shockman, G.D. (1970). Characteristic metabolic patterns of prokaryotes and eukaryotes. *Simp. Soc. Gen. Microbiol.* **20**:107-119.

Wade, M. (1977). Investigations into design of a selective fungicide based on differential pathways of lysine biosynthesis. Tese de Ph.D., London University.

Wade, M.; Thompson, D.M. e Mifflin, B.J. (1980). Saccharopine: an intermediate of L-lysine biosynthesis and degradation in *Pyricularia oryzae*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:11-20.

Wang, F.C.I. e Lewis, M.H.R. (1972). Lysine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **130**:74p-75p.

Wilkinson, G.N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**:324-332.

Wilson, C.M. e Alexander, D.E. (1967). Ribonuclease activity in normal and opaque-2 mutant endosperm of maize. *Science* **155**:1575-1576.