

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/46931

IB/81701

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**



**Estudos enzimáticos da biossíntese e degradação de lisina em *Coix lacryma-jobi*,
milho e arroz.**

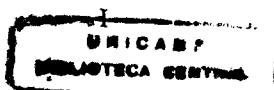
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Juverlande Lugli
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Signature]

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Aluno: Juverlande Lugli

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

**Campinas, SP
Agosto/2001**



UNIDADE IB/81701
 N.º CHAMADA T/UNICAMP
L967e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 46931
 PROC. 16.392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD _____

CM00161231-E

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Lugli, Juverlande
L967e Estudos enzimáticos da biossíntese e degradação de lisina em *Coix lacryma-jobi*, milho e arroz/Juverlande Lugli. - - Campinas, S.P: [s.n.], 2001.
 f.:ilus.

Orientador: Ricardo Antunes de Azevedo
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Milho – Aspectos genéticos. 2. Arroz. 3. Enzimas-Análise.
 4. Coix. I. Azevedo, Ricardo Antunes de. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 23.08.2001.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo. (orientador)

Prof. Dr. Claudio Luís Messias.

Profª Dra Maria Regina Calil.

Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira.

Profª Dra. Silvia Maria Guerra Molina.

Profª Dra Anete Pereira de Souza.

Dedicatória

...Pai, olha o que eu fiz! Agora não, veja mais tarde.

...Pai, vamos jogar bola, pode ser no quintal mesmo. Não agora não, quem sabe mais tarde.

...Pai, posso ver o que você está fazendo, Não estou ocupado.

...Pai, posso comprar um pirulito, Não sei, fale com sua mãe.

...Pai o que é isto? Não dá para explicar agora, é muito complicado para você entender.

...Eu, vamos sair um pouco. Não posso tenho que estudar.

...Eu, venha fazer companhia para mim. Já vou.

...Eu, precisamos conversar a respeito das crianças, Agora não dá, depois a gente conversa....

...Eu, sente comigo um pouco aqui. Depois, daqui a pouco.

Agora, não, daqui a pouco, já vou, mais tarde, não posso, estas foram sempre as minhas respostas quando diante de um livro, de uma separata, ou de um microcomputador, pois aí está o resultado, uma tese, que a mim particularmente trará uma grande satisfação por tê-la terminado. As custas deste trabalho, deixei por várias vezes a família em segundo plano, portanto só me resta dedicar todo esse esforço a minha esposa **ROSANA** e aos meus dois filhos **BRUNA e FÁBIO** que souberam com paciência esperar, pois são eles que me deram coragem e perspicácia para que esse trabalho tivesse um fim.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela orientação, compreensão e sobretudo pela paciência com que lidou com as minhas limitações, e sempre incentivando para que este trabalho tivesse êxito.

Aos Professores: Dr. Claudio Luis Messias, Dra Ana Paula Pellegrino e Dra Maria Silvia Guerra Molina pela participação na pré-banca, contribuindo com valiosas sugestões na correção deste trabalho.

Aos Professores: Dr. Claudio Luis Messias, Dra Maria Regina Calil, Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira e Dr. Marcelo Menossi Teixeira, pela participação na banca examinadora, e Dra Maria Silvia Guerra Molina e Dra. Anete Pereira de Souza, pela participação como suplente.

À secretária da Pós-Graduação, Zaíra pelos serviços prestados durante o período da realização da tese.

À Dra Salete Aparecida Gaziola pela grande ajuda na realização deste trabalho, sempre de forma prestativa e desinteressada.

Ao Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, amigo sempre compreensivo, dando toda liberdade e facilidades em seu laboratório para a realização dos meus experimentos.

À Profa Dra Anete Pereira de Souza, pela presteza e ajuda oferecendo o laboratório para dar continuidade às minhas pesquisas, bem como o apoio técnico na confecção da tese.

À amiga Dilaine, pela grande ajuda na leitura deste manuscrito, contribuindo também com sugestões para o enriquecimento da tese.

À amiga Tereza, ex-secretária da Pós-Graduação da Genética, e excelente profissional, pela ajuda e incentivo nas horas de desânimo.

À secretária do Departamento de Genética e Evolução, Ana Rita, pela amizade presteza e boa vontade, ajudando-me muitas vezes.

Aos amigos que não são muitos, mas que de uma maneira direta ou indireta, apoiaram-me de forma animadora para que eu pudesse realizar mais uma etapa da minha vida profissional.

À minha mãe e irmãs, e certamente ao meu pai, se vivo estivesse, que me deram todo o apoio e estão orgulhosos pela realização de mais uma fase da minha vida.

À minha grande sogra Virgínia, que é diferente de todas as sogras, sempre participando das minhas preocupações e torcendo para o meu sucesso.

E em especial, evidentemente, às três pessoas que de alguns anos para cá entraram na minha vida de maneira sorrateira e que são servis aos meus agrados e desagradados, mostrando-me todo o tempo o prazer de viver.

ÍNDICE

Título	I
Ficha catalográfica	II
Banca examinadora	III
Dedicatória	IV
Agradecimentos	V
Índice	VI
Lista de figuras e tabelas	VII
Lista de abreviações	VIII
Resumo	IX
Summary	XI
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Via metabólica do ácido aspártico	3
2.2. Regulação da via biossintética do ácido aspártico	5
2.3. Aspartato quinase	7
2.4. Homoserina desidrogenase	12
2.5. Lisina oxoglutarato redutase, Sacaropina desidrogenase e Dihidrodi- picolinato sintase envolvidas na via metabólica da lisina	14
2.6. Características morfológicas e fisiológicas do cereal <i>Coix</i>	21
3. Apresentação dos trabalhos e objetivos	24
3.1. Artigo 1. Enzymes of Lysine Metabolism from <i>Coix lacryma-jobi</i> Seeds.....	25
3.2. Artigo 2. Aspartate Kinase in the Maize Mutants <i>Ask1-LT19 opaco-2</i>	47
3.3. Artigo 3. Effects of Calcium, S-Adenosylmethionine, S-(2-Amino- ethyl-L-Cysteine, Methionine, Valine and Salt Concentration on Rice Aspartate Kinase Isoenymes.....	53
4. Discussão	61
5. Conclusão	71
6. Referências bibliográficas	73

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

Artigo1.

Tabela I. Atividade da AK, HSDH, LOR e SDH em diferentes tecidos de <i>Coix</i>	41
Tabela II. Atividade da AK, HSDH, LOR e SDH em endosperma em desenvolvimento de <i>Coix</i>	42
Figura 1. Perfil de eluição da AK em coluna de FFQ-Sepharose	43
Figura 2. Perfil de eluição da HSDH em coluna de FFQ-Sepharose	44
Figura 3. Perfil de eluição da LOR/SDH em coluna de DEAE-Sepharcel	45
Figura 4. Coloração para atividade de SDH	46
Figura 5. Coloração para atividade de SDH em gel não desnaturante	46

Artigo 2.

Figura 1. Distribuição da atividade da AK durante o desenvolvimento do endosperma de milho	48
Tabela 1. O efeito de lisina e treonina sobre a atividade da AK isolada de milho	49
Tabela 2. O efeito de lisina e treonina sobre a atividade da AK isolada de plântula de milho	49
Tabela 3. O efeito de lisina e treonina sobre a atividade da AK isolada de anteras de milho	49
Tabela 4. O efeito de lisina e treonina sobre a atividade da AK isolada de endosperma de linhagem selvagem de milho	50

Artigo 3.

Figura 1. Propriedades da AK de sementes de arroz separada por coluna cromatografia de FFQ-Sepharose	55
Figura 2. Propriedades da AK de sementes de arroz separada por coluna cromatografia de FFQ-Sepharose.....	56
Figura 3. Efeito do cloreto de potássio sobre a atividade da AK em arroz	56
Figura 4. Efeito de antagonistas de cálcio sobre a atividade da AK em sementes de arroz separada por coluna de cromatografia de FFQ-Sepharose	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	S-2-aminoetil-L-cisteína
AK	Aspartato quinase
DHDPS	Dihidrodipicolinato sintase
EGTA	Etileno Glicol bis (β -aminoetil) eter, ácido tetra acético
FFQ	Fast Flow Q-Sepharose
HSDH	Homoserina desidrogenase
kDa	Unidade de massa molecular
K _m	Constante de Michaelis
LKR	Lisina ceto-glutarato
LOR	Lisina oxo-glutarato
Lt	Gene que codifica uma enzima sensível a lisina
NADP	Nicotinaminda Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinaminda Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SAM	S-Adenosilmetionina
SDH	Sacaropina desidrogenase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil de sódio
TS	Treonina sintase
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

A via de biossíntese do ácido aspártico vem sendo extensivamente estudada por fazer parte da formação de aminoácidos essenciais, os quais são necessários na dieta humana e na dos animais. A baixa qualidade dos grãos dos cereais reside nas proteínas de reserva que são deficientes nesses aminoácidos essenciais, principalmente lisina, treonina e metionina. Desta maneira, a obtenção de cereais com alto valor nutritivo é a meta de muitos pesquisadores, os quais utilizam de diversas estratégias para o melhoramento desses grãos. Alguns programas de melhoramento genético têm como meta a obtenção de mutantes, naturais ou induzidos, com alto teor de lisina. Por outro lado, tais mutantes tornam-se indesejáveis para outras características quando comparados com os selvagens. Cereais como o *Coix*, milho e arroz foram objetivo de nosso trabalho, considerando que no caso do *Coix* e arroz, ambos de grande importância agrônômica, muito pouco se conhece com relação as enzimas envolvidas no metabolismo e na degradação da via do aspartato.

A fase inicial dos estudos com *Coix* foi dedicada à purificação e caracterização das principais enzimas do metabolismo da via: AK e HSDH, e LOR/SDH que fazem parte da degradação de lisina. A enzima AK foi inibida por treonina e lisina separadamente, sugerindo a presença de duas isoenzimas, sendo uma sensível à lisina e outra à treonina, esta última correspondendo a 60% do total da atividade da AK, contrastando com outras espécies de plantas, onde o componente predominante é a lisina. A enzima AK sensível à lisina foi eluída em cromatografia de troca iônica após a forma sensível à treonina. A enzima HSDH foi parcialmente inibida por treonina, indicando assim a presença de uma isoforma sensível e a outra resistente à treonina. As enzimas LOR/SDH passaram pelos mesmos processos de purificação (e co-purificadas em colunas de cromatografia de troca iônica), sendo sugerida a existência de um único polipeptídeo bifuncional contendo as atividades de LOR/SDH, assim como observado em outras espécies de plantas. Foi observada uma única banda de atividade de SDH em gel não desnaturante. Os K_m para sacaropina e NAD foram determinados como sendo 0,143 e 0,531 mM, respectivamente.

Foram conduzidas análises de linhagens selvagens e mutantes de milho. A enzima AK foi isolada e caracterizada em vários tecidos da linhagem selvagem, do mutante *opaco-2*, do mutante *Ask1-LT19* e do duplo mutante. Nenhuma variação foi detectada na sensibilidade da AK à inibição por treonina em todos os genótipos dos três tecidos analisados (plântula,

antera e endosperma). Por outro lado, houve uma evidente na redução da sensibilidade da AK à inibição por lisina quando comparados o tipo selvagem e o mutante. A redução na sensibilidade à lisina nas plântulas, anteras e endosperma foi de 37, 41 e 25% respectivamente. Houve uma redução de 54% na sensibilidade a lisina no duplo mutante quando este foi comparado com o mutante *opaco-2*. Estes dados sugerem que o gene (*Ask1*) de AK, que codifica a sensibilidade a lisina pode ser regulado pelo gene *opaco-2*.

Os efeitos da presença de cálcio e inibidores de calmodulina, aminoácidos e análogos, bem como concentração de KCl, foram analisados para duas isoenzimas, AK-lis e AK-tre isoladas e purificadas de arroz. Os resultados demonstraram que nenhuma das substâncias testadas foram capazes de produzir qualquer alteração significativa na AK-tre. Por outro lado, a atividade de AK-lis foi levemente aumentada por cálcio. S-adenosilmetionina sozinha foi capaz de inibir a atividade em até 12% de AK-lis, sendo intensificada com adição de lisina. Aminoetilcisteína também inibiu a atividade de AK-lis, mas não na mesma intensidade que a lisina. Os resultados também mostraram que a atividade de AK-lis foi sinergisticamente inibida por S-adenosilmetionina, como observado em outras espécies de plantas. Embora tenha sido observado um aumento na atividade de AK pela presença de cálcio, o grau de alteração não foi suficiente para indicar um papel regulatório de cálcio sobre AK.

SUMMARY

The aspartic acid biosynthesis pathway has been widely studied in the last three decades, and special attention has been given to the essential amino acids, which are necessary to human and animal diet. The low quality of cereal grains is attributed to the endosperm protein, which may be deficient in certain essential amino acids, such as lysine, threonine and methionine. Research groups have tried several strategies for improving cereals and obtaining high nutritional value grains. Some programs involving plant breeding have obtained natural or induced mutants, with high lysin content. On the other hand, this high lysine content was always associated to undesirable agronomic traits. Cereals as *Coix*, maize and rice were used in our work. Considering the case of *Coix* and rice, both of great agronomic importance, very little is known about the enzymes involved in the metabolism and degradation of the aspartate pathway.

The first step was the purification and characterization from *Coix* of the main enzymes of the aspartate metabolic pathway, AK and HSDH, and LOR/SDH which are involved in lysine degradation. The enzyme AK was inhibited by threonine and lysine separately, suggesting the presence of two isoenzymes, one being sensitive to lysine and the other sensitive to threonine, the latter corresponded to 60% of the total AK activity, which is not found in other plants species, where the main component is the lysine-sensitive form. The lysine-sensitive enzyme was eluted from an ion exchanged chromatography column after the threonine-sensitive form. The HSDH enzyme activity was partially inhibited by threonine, showing the presence of threonine-sensitive and resistant isoenzymes. The enzymes LOR/SDH were submitted to the same purification process, and were co-purified from an ion exchange chromatography column, suggesting the existence of a single bifunctional polipeptide containing both LOR/SDH activities. The same behavior was also observed in other plant species. A single SDH activity band was observed on non-denaturing PAGE gels. The K_m for saccharopine and NAD were determined as 0.143 and 0.531 mM, respectively.

Analysis of AK was also carried out in maize wild types and mutant. The AK enzyme was purified and characterized from seedlings, anthers and endosperm tissue isolated from wild type maize, *Ask1*-LT19 and *opaco2* mutant and the *Ask1*-LT19/*opaco2* double mutant. No variation was detected in AK sensibility to the threonine feedback in all genotypes of the three tissues tested. On the other hand, there was a clear evidence in the reduction of the sensibility of AK to inhibition by lysine when the wild type was compared with the *Ask1*-LT19

mutant. These reductions in enzyme sensitivity of the *Ask*-LT19 seedlings, anthers and endosperm were of 37, 41 and 25% respectively. There was a 54% reduction of the sensitivity of the double mutant endosperm AK to lysine when the *opaco2* mutant was compared with the double mutant *Ask1*-LT19/*opaco2*. The data suggested that the gene encoding the lysine-sensitive AK (*ASK1*) might be regulated by the *opaco2* mutation in maize.

The activities of the two AK isoenzymes (AK-Thr, AK-lys) have been isolated from developing rice seeds. The enzymes were studied in the presence of calcium, calmodulin inhibitors, amino acids and their analogues, as well as KCl concentration. The results demonstrated that none of the substances tested were able to produce any significant alteration in AK-thr. However, the activity of AK-lys was slightly increased by calcium. S-adenosylmethionine alone inhibited the activity by 12%, and it was intensified with lysine addition. S-(2-aminoethyl)-L-cysteine also inhibited the activities of AK-lys, but not in the same extent of lysine. The results with rice AK indicate that AK-lys is also synergistically inhibited by S-adenosylmethionine, as observed for other plant species. Although some increase in AK activity was observed in the presence of calcium, the extent of the alterations was not sufficient to indicate a regulatory role of calcium on rice AK activity.

1. INTRODUÇÃO

Em animais, dos 20 aminoácidos existentes somente 11 podem ser sintetizados, enquanto que os 9 remanescentes são denominados essenciais e sua ingestão via dieta é necessária, ao passo que plantas, fungos e bactérias têm a habilidade de sintetizá-los. Quatro desses 9 aminoácidos (lisina, treonina metionina e isoleucina) são sintetizados a partir de um precursor comum, o ácido aspártico.

A alimentação do homem é baseada principalmente em cereais por serem estes uma fonte de fácil obtenção, destacando-se o trigo, o arroz e o milho. Apesar de serem importantes para alimentação humana e animal, os cereais possuem reduzido conteúdo protéico, cerca de 10% do peso seco (Earle *et al.*, 1946). A baixa qualidade deve-se às proteínas de reserva, as quais são deficientes principalmente em lisina, treonina e metionina, necessitando sua suplementação na alimentação com proteínas de origem animal ou vegetal.

A obtenção de cereais com alto valor nutritivo tem sido objetivo de estudo de vários grupos de pesquisa em todo mundo, utilizando-se de diversas estratégias, desde o melhoramento genético clássico até as mais modernas técnicas de biologia molecular.

Alguns programas de melhoramento genético têm como propósito a obtenção de mutantes espontâneos com alto teor de aminoácidos essenciais, com ênfase em lisina. Sendo assim, mutantes com alto teor deste aminoácido foram isolados, contudo mostraram baixa produtividade e eram mais susceptíveis a patógenos quando comparados com a linhagem selvagem (Koie *et al.*, 1976; Nelson, 1980).

Os aminoácidos essenciais, bem como outros aminoácidos, são regulados por retroinibição. Deste modo, o estudo do metabolismo dos aminoácidos essenciais tem-se mostrado extremamente importante e promissor para o desenvolvimento de estratégias que permitam aumentar a qualidade nutricional dos cereais. Tal estudo contribui com o conhecimento primordial sobre a regulação dos níveis de aminoácidos presentes e fundamentais no metabolismo celular de plantas. A importância dos aminoácidos se deve não somente ao papel primário de constituir as proteínas, mas também por participarem em diversos outros processos importantes, como por exemplo o transporte e armazenamento de nitrogênio e síntese de compostos secundários e de fito-hormônios, tornando-se ainda mais desejável a compreensão e manipulação da regulação de suas vias metabólicas. Apesar de

todos os avanços, o conhecimento obtido até hoje sobre a genética, a bioquímica e os aspectos moleculares da regulação das vias metabólicas de aminoácidos essenciais em plantas é bastante restrito quando comparado com os estudos realizados com os microrganismos.

Cereais como o arroz, que tem grande importância nos países em desenvolvimento, têm sido estudados com a intenção de se melhorar os níveis de aminoácidos essenciais, uma vez que este cereal, como os demais, possui deficiência nos aminoácidos essenciais tais como: lisina, treonina e triptofano. Embora o conteúdo protéico do arroz (9%) seja menor que o do trigo (12%), suas proteínas de reserva apresentam o maior valor nutricional dentre os cereais. Este fato deve-se aos níveis mais elevados de aminoácidos essenciais, incluindo lisina e treonina, presentes no arroz. Mesmo assim, é prioritário aumentar o conteúdo destes aminoácidos essenciais em arroz, para o melhoramento da qualidade nutricional de variedades desta espécie.

Recentemente, grande progresso vem sendo obtido nos estudos genéticos, bioquímicos e do metabolismo de nitrogênio, bem como sobre a biossíntese de aminoácidos em plantas. Este último é um campo de fundamental importância para a síntese de proteínas, uma vez que as plantas utilizam os aminoácidos e seus precursores, assim como os produtos de seu catabolismo, para muitas atividades metabólicas. Deste modo, evidencia-se a importância do estudo da regulação, biossíntese e degradação dos aminoácidos essenciais.

Além do arroz, outro cereal que está sendo estudado é o *Coix lacryma-jobi* conhecido simplesmente como *Coix*; este cereal não é muito importante agronomicamente no Brasil e pouco se conhece quanto aos aspectos relacionados com a regulação e síntese dos aminoácidos essenciais nesta planta. A importância do estudo de *Coix* é dada pela relação que esta espécie tem com o milho. Os estudos feitos neste cereal têm o intuito de verificar sua potencialidade em nível bioquímico e molecular para o entendimento da síntese de proteínas de reserva (Ottoboni *et al.*, 1990; Targon *et al.*, 1992).

No presente estudo, foi dada a ênfase aos aminoácidos lisina e treonina em *Coix*, visto que estes são os principais aminoácidos do ponto de vista nutricional, presentes em baixos níveis neste cereal. Sendo assim, um entendimento mais profundo do sistema de regulação da via que dá origem a estes aminoácidos é de extrema importância. Este conhecimento nos informará a respeito das propriedades das enzimas envolvidas na biossíntese e catabolismo da lisina e treonina. Desta forma em uma fase ulterior, será possível elaborar estratégias que possibilitem a obtenção de cereais com alto teor de lisina e treonina nas sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Via metabólica do ácido aspártico

A via de biossíntese do ácido aspártico tem sido extensivamente estudada por estar associada à formação dos aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina e isoleucina, os quais são necessários à dieta humana e da maioria dos animais. O estudo dos mecanismos de síntese e degradação desta via e seus produtos finais é a meta principal dos pesquisadores. A via tem início com o ácido aspártico que é a base da formação dos aminoácidos, um composto estável com quatro carbonos.

A primeira enzima da via metabólica do ácido aspártico é a aspartato quinase, também conhecida como aspartoquinase (AK). Esta enzima catalisa a conversão do aspartato em β -aspartil fosfato, que por sua vez é convertido pela ação da enzima aspartato semialdeído desidrogenase em β aspartil semialdeído. Até nesse ponto a via é comum a todos os quatro aminoácidos nela formados, seguindo daí em duas ramificações, uma delas originando o aminoácido lisina e a outra originando treonina, isoleucina e metionina.

A partir do composto β -aspartil semialdeído observa-se duas vias, numa delas este é reduzido a homoserina pela enzima Homoserina desidrogenase (HSDH) seguindo-se novas reações até a síntese de treonina, quando a via apresenta nova ramificação uma conduzindo à síntese de isoleucina e a outra de metionina que posteriormente é convertida a S-adenosilmetionina.

Na ramificação que leva à formação do aminoácido lisina, o β -aspartil semialdeído é transformado em 2,3-dihidrodipicolinato pela enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS). Em seguida, a piperidina 2,6-dicarboxilato sob ação da dihidrodipicolinato redutase, desencadeia outras reações enzimáticas até finalmente originar o aminoácido lisina (Fig.1 pag.4).

Cinco enzimas têm um papel fundamental na via metabólica do ácido aspártico, e são importantes na regulação de biossíntese e degradação dos aminoácidos lisina e treonina. A primeira delas, como já mencionado é a AK, seguida por HSDH, DHDPS, lisina oxoglutarato redutase (LOR) também conhecida como lisina cetoglutarato redutase (LKR) e a sacaropina desidrogenase (SDH).

A enzima AK é fundamental na regulação do direcionamento do fluxo de carbono nas ramificações que originam os aminoácidos lisina, treonina, isoleucina e metionina. Uma série de isoformas de AK já foram identificadas; estas são reguladas via retroinibição pelos aminoácidos lisina, treonina e S-adenosilmetionina.

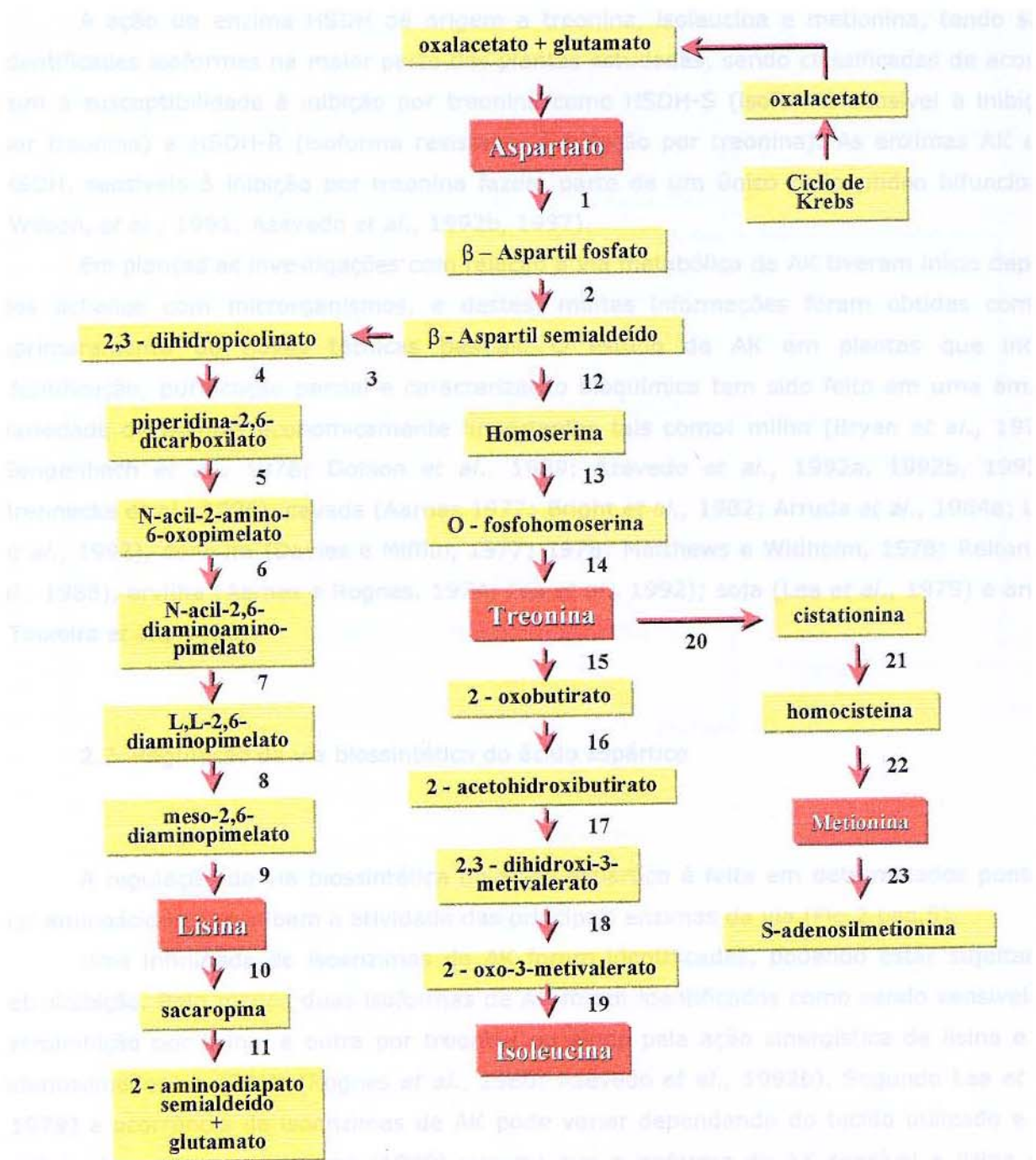


Figura 1: Via metabólica do ácido aspártico, adaptado de Bryan, J. K. , 1990.

1 Aspartato Quinase; 2 Aspartato Semialdeído Desidrogenase; 3 Dihidrodipicolinato Sintase; 4 Dihidrodipicolinato Redutase; 5 Piperidina Dicarboxilase Acilase; 6 Acildiaminopimelato Aminotransferase; 7 Acildiaminopimelato Deacilase; 8 Diaminopimelato Epimerase; 9 Diaminopimelato Descarboxilase; 10 Lisina Oxoglutarato Redutase; 11 Sacaropina Desidrogenase; 12 Homoserina Desidrogenase; 13 Homoserina Quinase; 14 Treonina Sintase; 15 Treonina Desidratase; 16 Acetolato Sintase; 17 Acetohidroxiato Redutoisomerase; 18 Dihidroxiato Desidratase; 19 Aminotransferase de Cadeia Ramificada; 20 Cistationa-γ-Sintase; 21 Cistationa-β-Liase; 22 Metionina Sintase; 23 Metionina Adenosil Transferase.

A ação da enzima HSDH dá origem a treonina, isoleucina e metionina, tendo sido identificadas isoformas na maior parte das plantas estudadas, sendo classificadas de acordo com a susceptibilidade à inibição por treonina como HSDH-S (isoforma sensível à inibição por treonina) e HSDH-R (isoforma resistente à inibição por treonina). As enzimas AK e a HSDH, sensíveis à inibição por treonina fazem parte de um único polipeptídeo bifuncional (Wilson, *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992b, 1997).

Em plantas as investigações com relação à via metabólica da AK tiveram início depois dos achados com microrganismos, e destes, muitas informações foram obtidas com o aprimoramento de novas técnicas básicas. O estudo da AK em plantas que inclui identificação, purificação parcial e caracterização bioquímica tem sido feito em uma ampla variedade de plantas economicamente importantes tais como: milho (Bryan *et al.*, 1970; Gengenbach *et al.*, 1978; Dotson *et al.*, 1989; Azevedo *et al.*, 1992a, 1992b, 1992c; Brennecke *et al.*, 1996), cevada (Aarnes 1977; Bright *et al.*, 1982; Arruda *et al.*, 1984a; Lea *et al.*, 1992), cenoura (Davies e Mifflin, 1977; 1978; Matthews e Widholm, 1978; Relton *et al.*, 1988), ervilha (Aarnes e Rognes, 1974; Lea *et al.*, 1992); soja (Lea *et al.*, 1979) e arroz (Teixeira *et al.*, 1998).

2.2. Regulação da via biossintética do ácido aspártico

A regulação da via biossintética do ácido aspártico é feita em determinados pontos, por aminoácidos que inibem a atividade das principais enzimas da via (Fig.2 pag.5).

Uma infinidade de isoenzimas de AK foram identificadas, podendo estar sujeitas a retroinibição. Pelo menos duas isoformas de AK foram identificadas como sendo sensíveis a retroinibição por lisina, e outra por treonina ou ainda pela ação sinérgica de lisina e S-adenosilmetionina (SAM) (Rognes *et al.*, 1980; Azevedo *et al.*, 1992b). Segundo Lea *et al.* (1979) a ocorrência de isoenzimas de AK pode variar dependendo do tecido utilizado e do estágio de crescimento. Bryan (1990) sugeriu que a isoforma de AK sensível a lisina era predominante em células de crescimento rápido, como por exemplo em cultura de células. A forma sensível à treonina foi observada em cevada (Bright *et al.*, 1982) e em milho (Azevedo *et al.*, 1992a). Em arroz foram verificados duas isoformas de AK, uma predominante e sensível à inibição por lisina e a outra sensível à inibição por treonina (Teixeira *et al.*, 1998).

A retroinibição da atividade da AK por lisina e treonina pode ser regulada pela sua própria síntese, desde que ambos os aminoácidos lisina e treonina sejam derivados do produto da ação enzimática da AK, o β -aspartil fosfato.

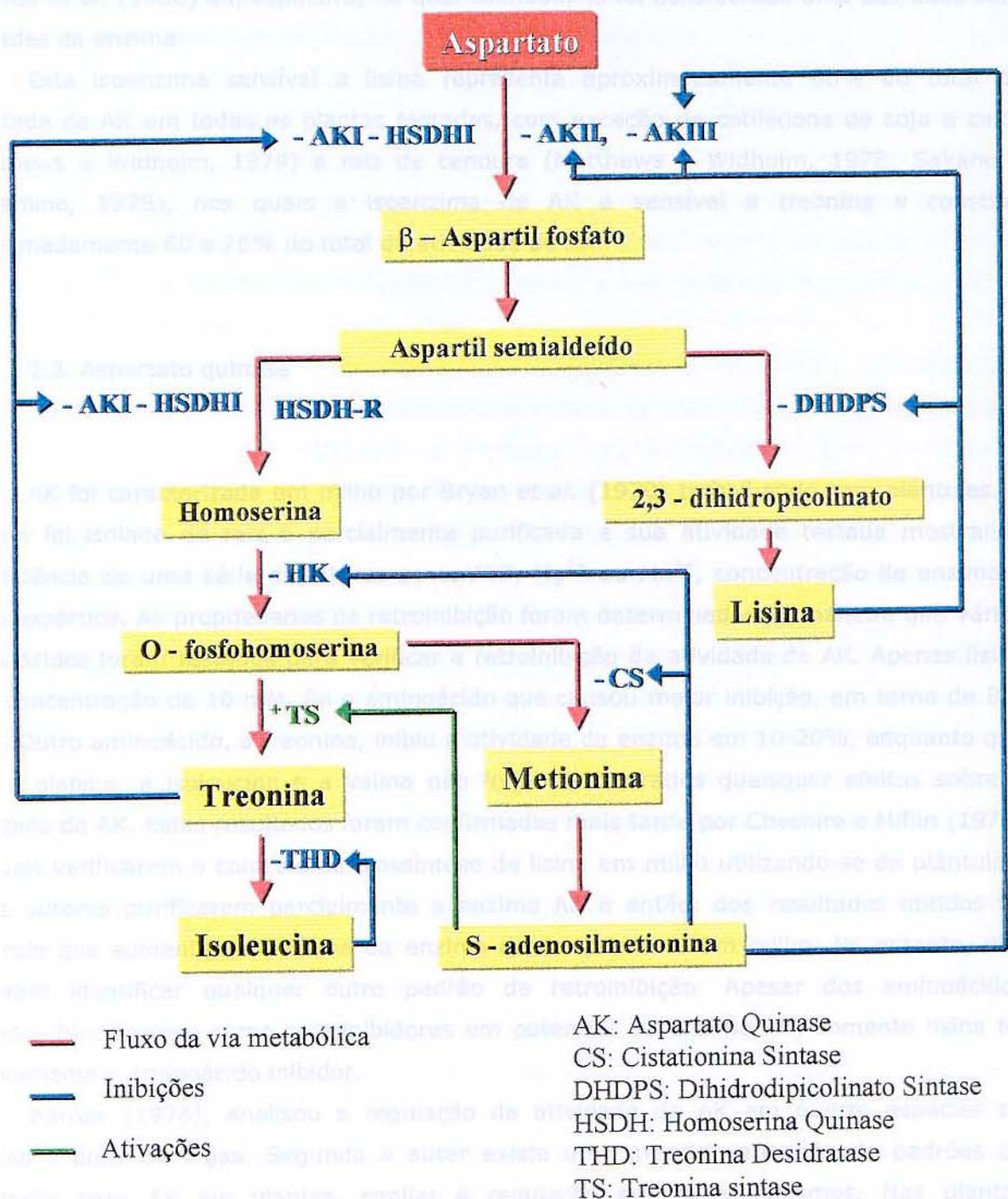


Figura 2 Regulação da via metabólica do ácido aspártico, adaptado de Bryan, J.K. 1990.

O envolvimento do cálcio e da calmodulina na regulação da AK foi proposto por Kochhar *et al.* (1986) em espinafre, no qual calmodulina foi considerada uma das duas sub-unidades da enzima.

Esta isoenzima sensível a lisina representa aproximadamente 80% do total da atividade de AK em todas as plantas testadas, com exceção de cotilédone de soja e calos (Matthews e Widholm, 1979) e raiz de cenoura (Matthews e Widholm, 1978; Sakano e Komamine, 1978), nos quais a isoenzima de AK é sensível a treonina e constitui aproximadamente 60 a 70% do total da atividade de AK.

2.3. Aspartato quinase

AK foi caracterizada em milho por Bryan *et al.* (1970) trabalhando com plântulas. A enzima foi isolada de raiz e parcialmente purificada e sua atividade testada mostrando dependência de uma série de fatores como ATP, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , concentração de enzima e ácido aspártico. As propriedades de retroinibição foram determinadas de maneira que vários aminoácidos foram testados para verificar a retroinibição da atividade de AK. Apenas lisina com concentração de 10 mM, foi o aminoácido que causou maior inibição, em torno de 80-85%. Outro aminoácido, a treonina, inibiu a atividade da enzima em 10-20%, enquanto que com a alanina, a isoleucina e a valina não foram encontrados quaisquer efeitos sobre a atividade da AK. Estes resultados foram confirmados mais tarde por Cheshire e Mifflin (1975) os quais verificaram o controle da biossíntese de lisina em milho utilizando-se de plântulas. Esses autores purificaram parcialmente a enzima AK e então, dos resultados obtidos foi sugerido que somente uma forma da enzima estava presente em milho. No entanto, não puderam identificar qualquer outro padrão de retroinibição. Apesar dos aminoácidos testados funcionarem como retroinibidores em potencial da enzima AK, somente lisina foi efetivamente o aminoácido inibidor.

Aarnes (1974), analisou a regulação da atividade de AK em quatro espécies de plantas e duas de algas. Segundo o autor existe uma grande variedade de padrões de regulação para AK em plantas, similar à regulação em microrganismos. Nas plantas examinadas, a atividade da AK foi inibida por lisina e treonina juntos, o que mostrou pela primeira vez, a presença de duas isoenzimas diferentemente sensíveis à lisina e treonina.

Aarnes e Rognes (1974) encontraram em ervilha isoformas de AK e HSDH, ambas sensíveis a inibição por treonina. Estas enzimas foram parcialmente purificadas em colunas de troca iônica e filtração em gel. A AK nesta planta mostrou ser ativada pela presença dos aminoácidos alanina, valina e isoleucina. O aminoácido lisina não teve nenhum efeito na

atividade da AK de ervilha, mesmo com adição conjunta com treonina. Quanto à enzima HSDH, dois picos de atividades foram encontrados na eluição em coluna de Sephadex G-200, sendo um sensível e outro resistente à inibição por treonina.

Chibber *et al.* (1977), analisaram duas linhagens de milho, uma normal e uma mutante *opaco-2*, e verificaram que as duas linhagens apresentaram o mesmo nível de atividade para ambos os genótipos e o mesmo padrão de inibição por lisina. Henke e Wahanbaeck (1977), mostraram também que a lisina foi o aminoácido capaz de inibir atividade da AK (isolada de endosperma de milho) entretanto, esta inibição não foi total, atingindo o máximo de 60%. Os aminoácidos treonina e metionina não mostraram nenhum efeito sobre atividade de AK.

A AK de milho também foi isolada por Gengenbach *et al.* (1978), de diferentes tecidos, entre eles: plântula, raiz, endosperma, cultura de calo e células em suspensão. Todos estes tecidos foram testados na presença dos aminoácidos lisina, treonina e metionina, sozinhos ou em combinação. As culturas de células em suspensão mostraram a mais alta atividade específica entre os tecidos testados (3,3 nmol de NADP/min/mg de proteína), enquanto que no endosperma, ocorreu a mais baixa (1,1 nmol de NADP/min/mg de proteína); este resultado indicou que em tecido de crescimento rápido pode haver uma maior atividade de AK. O efeito dos produtos finais (aminoácidos) testados sobre a atividade de AK foi similar a todas as enzimas analisadas. A lisina em concentração de 1mM inibiu atividade de AK de 60 a 89% e com aumento para a concentração de 10mM a inibição alcançou 82 a 96%. Outros aminoácidos como isoleucina inibiram levemente a atividade de AK. Já metionina não afetou esta atividade, mas em combinação com treonina e lisina ocorreu uma inibição adicional da atividade da enzima extraída do endosperma, quando comparado com a lisina somente. Treonina também não produziu qualquer efeito adicional sobre atividade de AK, entretanto em combinação com lisina pouco efeito adicional foi observado na raiz, plântula e endosperma.

Utilizando plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L. var. Maris Freeman), a AK foi purificada por Bright *et al.* (1978a), a atividade da enzima foi verificada, sendo esta fortemente inibida por lisina, 50% de inibição em concentração de 0,25 mM de lisina, ao passo que treonina sozinha ou conjuntamente com lisina não apresentou inibição. Segundo os autores, a caracterização da AK neste estudo foi semelhante aos achados em cevada por Shewry e Mifflin (1977) e Aarnes (1977), e em milho por Bryan *et al.* (1970) e Cheshire e Mifflin (1975), com a enzima AK sendo regulada predominantemente por lisina. Os autores sugerem ainda que o fato de não encontrar inibição por treonina, possa ser devido às diferenças nas variedades utilizadas, como também às diferenças nas idades dos tecidos estudados. Além disso, surgiram dificuldades em se obter conclusões a partir das preparações de baixa atividade específica, obtendo-se baixas alterações nas absorbâncias na

presença de grande quantidade de proteína. Ademais não foi encontrada evidência em dois estágios de crescimento testados para a sensibilidade à AK no decorrer do tempo, como foi descrito por Matthews *et al.* (1975) com a enzima HSDH de milho.

Green e Donovan (1980) testaram o efeito dos 20 aminoácidos mais o análogo de lisina, a aminoetilcisteína (AEC), suplementados exogenamente sobre o crescimento de raiz originado de embrião de milho. A AEC mostrou ser um inibidor em potencial do crescimento da raiz, enquanto que lisina foi o que apresentou efeito equivalente à inibição de AEC. A lisina inibiu o crescimento numa concentração de 1mM e uma inibição sinérgica em torno de 90% da raiz e plântula em crescimento foi observado pela adição de lisina e treonina. O efeito sinérgico não foi observado com outras combinações dos outros aminoácidos derivados do ácido aspártico. Treonina em concentração de 2mM inibiu o crescimento da raiz em 60%, ao passo que metionina e homoserina apresentaram inibição sinérgica equivalente à pela lisina mais treonina. Estes resultados sugerem que a inibição por lisina mais treonina afetou um dos passos da via do ácido aspártico antes da síntese de homoserina. Cultura de calos de milho quando colocados na presença de 2 mM de AEC, levou a uma inibição de 90% do crescimento, ao passo que quando utilizado lisina mais treonina na mesma concentração, a inibição do crescimento da raiz foi de 100%. Lisina e treonina causaram mais inibição em raiz do que em plântula, quando estas vieram de embriões crescidos em meio contendo 2 mM de lisina mais treonina (Azevedo, 1988).

A adição simultânea de lisina e treonina inibiu o crescimento de calus de milho, resultados descritos por Green e Phillips (1974). Estes autores propuseram um sistema de seleção para isolar plantas resistentes à inibição por lisina e treonina, o qual poderia resultar em mutantes com superprodução de lisina, treonina e metionina. Este sistema foi usado em milho por Hibberd *et al.* (1980), que descreveram o isolamento de uma linhagem de milho (D33) utilizando cultura de tecidos, onde as enzimas da via do ácido aspártico foram menos sensíveis a retroinibição por lisina. As células da linhagem D33 foram capazes de crescer num meio contendo lisina mais treonina; deste modo, a partir destas células, foram obtidas plantas resistentes. Com esses resultados foi possível selecionar mais células resistentes, e suas progênes foram testadas do ponto de vista genético e bioquímico a partir de uma linhagem estável.

Hibberd e Green (1982) fizeram análise genética da progênie das plantas regeneradas a partir de uma linhagem estável denominada LT19 e verificaram que a resistência à lisina mais treonina era devido a um único gene dominante designado atualmente de *Ltr1*. Cultura de tecidos iniciada com embriões resistentes, era também resistente a inibição por lisina mais treonina. Uma superprodução de treonina solúvel ocorreu em endosperma de plantas resistentes a lisina mais treonina, 75 a 110 vezes quando comparado com o endosperma de plantas sensíveis. Estes resultados foram também

confirmados quando o gene mutante *Ltr1* foi transferido para outras linhagens homozigotas de milho, Cat100-1 e L1038 contendo endosperma normal, "brittle", "shrunk" e opaco-2 (Azevedo *et al.*, 1990). O efeito da mutação foi basicamente o mesmo, contudo o efeito sinérgico sobre o aumento de treonina solúvel foi observado quando a mutação estava combinada com as mutações do endosperma. Um aumento de 45 a 144 vezes de treonina solúvel e 3 a 10 vezes de aminoácidos totais foi observado no duplo mutante (*Ltr1/opaco-2*). Ademais, o gene *Ltr1* intensificou o efeito do gene *opaco-2* sobre a síntese de aminoácidos e proteínas no endosperma do milho. O gene *Ltr1* foi também mapeado no braço curto do cromossomo 7 a 10.6 centimorgans do gene *opaco-2*, perto dos genes que codificam os polipeptídeos da principal proteína do milho, a zeína, alguns dos quais são regulados pelo gene *opaco-2* (Azevedo *et al.*, 1990).

Cattoir-Reynaerts *et al.* (1981 e 1983) e Hibberd e Green (1982) descreveram mutantes de várias espécies de plantas que acumulavam lisina, metionina e treonina, detectados em muitos tecidos incluindo sementes, entretanto em sementes de milho, não houve acúmulo em nenhum dos mutantes selecionados. Isto deve-se à degradação de lisina em endosperma durante o desenvolvimento da semente. Este fato foi descrito pela primeira vez por Sodek e Wilson (1970) usando lisina com carbono marcado, o que foi confirmado por Brandt (1975).

A sensibilidade da atividade da AK ao cálcio ou calmodulina foi questionada por Bonner *et al.* (1986), trabalhando com células de cenoura em suspensão. Os autores conseguiram preparações da enzima com recuperação de até 300 vezes. A inibição da atividade por trifluorperazina (antagonista não-específico de calmodulina), foi quase idêntica àquela observada por Sane *et al.* (1984) nas mesmas concentrações. A maioria das enzimas da via do aspartato, incluindo AK, estão localizadas nos cloroplastos e mais de 90% das calmodulinas das plantas estão no citosol, sendo que apenas 1 a 2% estão associados aos cloroplastos (Dieter, 1984). Segundo os autores, a concentração de calmodulina dentro dos cloroplastos é baixa, de 1 a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ (Muto, 1982). Deste modo, a concentração de calmodulina dentro dos cloroplastos deve ser menor do que aquela que foi usada para os testes. Pensando assim, os autores não encontraram evidência neste trabalho para garantir um papel para cálcio e calmodulina como reguladores da sensibilidade de AK em planta.

Dotson *et al.* (1989), purificaram e identificaram duas isoformas de AK de milho em cultura de células em suspensão. Essas isoformas foram sensíveis à inibição por lisina, enquanto que com treonina nenhuma tipo de inibição foi encontrada em todos os estágios testados. Os passos de purificação utilizados foram colunas de cromatografia de Phenil Sepharose, Sephacryl S300 e mono Q sendo que, somente a coluna de cromatografia com troca iônica (Mono Q HR r/r) foi eficiente para separação das duas isoformas de AK. A

primeira isoforma foi purificada mais de 1200 vezes, enquanto que a segunda forma, em ordem de eluição, ultrapassou 1300 vezes na purificação.

Azevedo *et al.* (1992a), purificaram AK de células de milho, até próximo da homogeneidade, após cinco passos de purificação, incluindo sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, filtração em gel e gel de poliacrilamida. Destas cinco etapas, cromatografia de troca iônica e filtração em gel provaram ser os melhores métodos para purificação da enzima de cultura de milho, confirmando os resultados obtidos em cenoura por Relton *et al.* (1988) e Dotson *et al.* (1989).

Azevedo *et al.* (1992b) observaram dois picos de atividade eluídos da coluna de troca iônica, os quais mostraram inibição por lisina e uma leve inibição por treonina; dois picos também foram sensíveis a S-adenosilmetionina. O perfil de eluição da enzima de coluna de filtração em gel, inicialmente mostrou um pico de atividade que pôde ser separado em dois, pela adição de lisina, treonina e S-adenosilmetionina. Os mesmos autores coraram gel de poliacrilamida para atividade de AK, o qual mostrou uma larga banda contendo a fração enzimática sensível à inibição a lisina. Esta banda foi eletroeluída do gel e analisada, mostrando três bandas de proteínas, (a banda menor foi identificada com sendo AK). Foi determinado também o peso molecular da forma sensível a lisina em torno de 150 kDa e a forma sensível a treonina de 180 kDa. Os autores concluíram de que em plantas superiores, no mínimo três formas de AK estão presentes, duas sensíveis a lisina e uma a treonina.

Cultura de tecidos de milho foi usada para selecionar plantas resistentes a AEC por Azevedo e Arruda (1995), de maneira que calos embrionários de milho da linhagem Cat-100 foram tratados com Nitrato de sódio e selecionados em meio de cultura contendo 0,25 mM de AEC. Sessenta e três plantas foram regeneradas, transferidas para o solo e crescidas até a maturidade. Das 63 plantas regeneradas, duas delas (AEC-1 e AEC-5) quando auto-polinizadas segregaram tanto plantas sensíveis quanto resistentes. Após análise da progênie obtida das regeneradas AEC-1 e AEC-5, verificou-se que a resistência das plantas AEC-1 e AEC-5 foi devido a um gene dominante e um recessivo respectivamente. Os aminoácidos solúveis do endosperma desses mutantes, foram extraídos e quantificados por cromatografia líquida de alta resolução. Estes mutantes apresentaram um aumento na concentração de lisina solúvel quando comparado com as plantas sensíveis.

2.4. Homoserina desidrogenase

Duas formas moleculares de HSDH e uma de AK sensível a lisina de plântulas de aveia, foram parcialmente purificadas com fracionamento de sulfato de amônio, coluna de cromatografia DEAE-Sephadex e filtração em gel, por Aarnes (1977). A enzima AK, através deste procedimento resultou na purificação de até 27 vezes (produção de 17%) com uma atividade específica de 8 a 11 unidades/mg de proteína. A AK foi sensível à inibição por lisina em todos os estágios de purificação e a inibição não foi competitiva com respeito ao aspartato, indicando ligação de aspartato e lisina em dois sítios diferentes da enzima. Os seguintes aminoácidos foram levemente inibitórios, todos na concentração de 8 mM cada: treonina 19%, metionina 25%, L-leucina 35%, L-isoleucina 14%, L-alanina 15%, L-homoserina 6% e valina 35% de inibição. Os valores de K_m para aspartato e ATP foram de 6,6 mM e 4,2 mM respectivamente. A enzima HSDH após eluição em Sephadex-200 produziu duas formas de enzima de diferentes pesos moleculares, HSDH I com 150 kDa e a HSDH II com 75 kDa. As duas formas da enzima tiveram diferentes sensibilidades à L-treonina que na concentração de 0,1 mM, causou 50% de inibição da HSDH I enquanto que a HSDH II não foi afetada. Ambas as formas moleculares foram inibidas por L-cisteína e L-aspartato e o efeito inibitório da cisteína sobre HSDH I não foi competitivo com respeito à treonina.

Em ervilha, formas diferentes de AK e da HSDH, que eram sensíveis à inibição por treonina em concentração de 5mM, foram extraídas e parcialmente purificadas em colunas de troca iônica e filtração em gel (Aarnes e Rognes, 1974). A AK mostrou inibição pelos aminoácidos isoleucina, valina e alanina, conforme os achados de Bryan *et al.* (1970) para a isoforma sensível ao aminoácido lisina estudada em milho. A lisina não teve nenhum efeito na atividade de AK de ervilha, mesmo quando eram adicionados concomitantemente com treonina. Para HSDH, dois picos de atividade foram encontrados na eluição em coluna de Sephadex G-200, um deles sensível e outro resistente à inibição a treonina. As atividades de AK e HSDH foram eluídas em um único pico em colunas de troca iônica e filtração em gel, isso sendo assumido pelos autores como um indício de que as enzimas fazem parte de um complexo bifuncional, o que já havia sido descrito em *E. coli* por Patte *et al.* (1967).

Bright *et al.* (1978b), estudaram o efeito dos aminoácidos lisina, treonina e metionina no crescimento de embriões excisados de trigo e cevada. Os embriões cresceram num meio contendo íons nitrato e amônio, com adição de lisina (1mM) mais treonina (1mM). Estes aminoácidos causaram inibição sinérgica na medida do crescimento da primeira folha e no peso seco. A inibição foi especificamente acompanhada pela metionina, homocisteína e homoserina. Já treonina em concentração de 0,2 a 0,3 mM causou quase 50% de inibição do

crescimento. Quando utilizada a lisina, observou-se aumento sinérgico da inibição em concentração acima de 3 mM. Segundo os autores a inibição é explicada por um modelo no qual lisina atua como retroinibidor da AK e treonina de HSDH. Deste modo, a inibição por lisina mais treonina foi maior em altas concentrações. Como conclusão, as medidas de peso seco e o comprimento das primeiras folhas mostraram claramente que o crescimento do embrião de trigo e cevada pode ser inibido de uma maneira sinérgica por lisina mais treonina.

Matthews e Widholm (1978), examinaram as atividades das enzimas AK, HSDH e DHDPS de raiz e extratos de cultura de células de cenoura em suspensão de 1 ano e 11 anos. A atividade da AK da cultura de células em suspensão foi inibida em 85% por 10 mM de L-lisina e 15% por 10 mM de L-treonina, enquanto que a atividade de AK na raiz foi inibida 45% por lisina e 55% por treonina na mesma concentração de 10 mM, sendo que estas diferenças, segundo os autores, se deviam às alterações na proporção das duas formas de AK (lisina e treonina sensível), uma vez que a atividade é consistentemente inibida por lisina e treonina em 100%. Somente uma das formas de HSDH e a DHDPS foi encontrada no extrato de raiz e cultura em suspensão. A forma sensível a treonina da AK é predominante na raiz de cenoura (acima de 50%), enquanto que a forma sensível a lisina é predominante em cultura de células (78%). A forma sensível a lisina de AK também está mais presente em células de cenoura em suspensão.

Walter *et al.* (1979) isolaram e caracterizaram duas isoformas de homoserina desidrogenase de cultura de células em suspensão de milho. Os autores partiram de um extrato impuro, onde a atividade da enzima foi inibida em 73% pela treonina, e os 27% restantes do total da atividade não foram afetados mesmo em altas concentrações de treonina. As enzimas HSDH resistente e sensível à treonina foram separadas por afinidade em coluna "Blue Sepharose" e duas distintas enzimas foram purificadas. A HSDH resistente à treonina teve um peso molecular de 70 kDa, um dímero de duas sub-unidades de 38 kDa. Já a sensível à treonina teve um peso molecular de 190 kDa, também um dímero com duas sub-unidades aparentemente diferentes com pesos moleculares de 89 kDa e 93 kDa.

Krishnaswamy e Bryan (1986) utilizaram anticorpos monoclonais, altamente específicos contra a isoenzima HSDH de milho sensível a treonina. Os resultados em gel de poli-acrilamida sob condições de desnaturação indicaram que a enzima era composta de sub-unidades de peso molecular idêntico. Aparente micro heterogeneidade das sub-unidades foi observada durante focalização isoelétrica, mas mapas peptídicos geraram clivagem parcial com três diferentes reações químicas, não revelando nenhuma diferença entre as proteínas separadas por este processo. Os autores concluíram que as sub-unidades de centrifugações dimericas e tetraméricas ativas das enzimas são idênticas ou muito similares.

HSDH de folhas de espinafre foi purificada até a homogeneidade por Pavagi *et al.* (1995), usando fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, filtração em gel e técnicas de FPLC. A enzima purificada apresentou uma massa molecular de 220 kDa e quatro sub-unidades de massa molecular de 55 kDa, provavelmente ocorrendo um tetrâmero. A enzima foi sensível a treonina e exibiu atividade de AK, também sensível a treonina, motivo pelo qual foi sugerido que a enzima HSDH poderia ser uma proteína bifuncional. Testaram a reação cruzada a qual foi positiva com anticorpos da isoenzima AK purificada. Ambas as atividades HSDH e AK foram estimuladas por cálcio e calmodulina.

2.5. Lisina oxo-glutarato redutase, Sacaropina desidrogenase e Dihidrodipicolinato sintase envolvidas com a via metabólica do Ácido Aspártico

Além das enzimas envolvidas na biossíntese, outras fazem parte da degradação dos aminoácidos essenciais. Dentre elas, destacamos as enzimas lisina oxoglutarato redutase (LOR) e a sacaropina desidrogenase (SDH), que atuam na degradação da lisina. A LOR condensa lisina e 2-oxoglutarato em sacaropina na presença de NADPH, ao passo que SDH hidrolisa a sacaropina em α -aminoadípico-semialdeído e glutamato na presença de NAD ou NADP. Os estudos vêm sendo conduzidos em microrganismos, plantas e mamíferos.

Duas hipóteses podem ser consideradas na degradação da lisina como sendo um dos principais fatos para o acúmulo de lisina na sementes: 1º Durante o desenvolvimento das sementes a translocação da lisina do endosperma ocorre em excesso de 2 a 3 vezes o nível necessário de lisina para síntese de proteínas (Arruda e Silva, 1979). O excesso de lisina translocada é degradado no endosperma normal, mas isto não ocorre nos mutantes ricos em lisina; segundo, que a LOR mostra baixa atividade no endosperma de *opaco-2*, o qual está caracterizado com alto nível de lisina. A mutação (*opaco-2*) não afeta a SDH no entanto, LOR deve metabolizar o excesso de lisina que pode estar se acumulando no mutante resistente. (Arruda *et al.*, 1984b).

Ogawa e Fujioka (1978), purificaram e caracterizaram a enzima sacaropina desidrogenase de levedura (fermento de pão) até a homogeneidade, cuja purificação total do extrato bruto alcançou cerca de 1.200 vezes com uma recuperação de 24%. A determinação do peso molecular por equilíbrio de sedimentação, Sephadex G-100, filtração e eletroforese em gel de poliácridamida revelou o valor de 39 kDa e portanto, a enzima SDH mostrou ser constituída de uma única cadeia polipeptídica. Foi determinado também um alto pH iso-elétrico de 10,1, assim como a sequência NH₂ terminal de Ala-Ala---. Os autores

observaram ainda que a enzima possui três moléculas de cisteína residuais; nenhuma banda de dissulfeto foi encontrada.

Sacaropina desidrogenase, também de levedura, foi purificada por Storts e Bhattacharjee (1987), 1.122 vezes usando precipitação com ácido, sulfato de amônio, DEAE-Sepharose, filtração em gel e cromatografia ("Reactive red-120 agarose"). Os autores encontraram uma enzima com um peso molecular de 69 kDa, consistindo de um único polipeptídeo de 50 kDa, baseado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Foram verificadas algumas propriedades da enzima, como pH ótimo 9,5, o K_m para L-sacaropina e NAD^+ , 2,32 e 0,054 mM, respectivamente.

A purificação e caracterização de uma enzima com atividade de LOR e SDH, foi feita por Markovitz *et al.* (1984). Os autores descreveram que as atividades das enzimas redutase e desidrogenase ocorrem em uma única proteína com base nos seguintes achados: 1° as taxas de atividade de redutase e desidrogenase permanecem constantes por mais de 500 vezes de purificação de ambas as enzimas de extrato de mitocôndria, fígado bovino e de babuíno; o perfil de atividade da redutase e desidrogenase entre elas se sobrepõe após a eluição em colunas de DEAE-celulose e Sephacryl S-300; 2° a coloração em gel poliacrilamida mostrou que ambas atividades migraram na mesma distância em direção aniônica. 3. A enzima altamente purificada com atividades para redutase e desidrogenase mostrou uma única banda polipeptídica de peso molecular de 115 kDa em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Foi concluído ainda que a enzima nativa vinda de fígado de bovino e babuíno tem um peso molecular aparente de 468 KDa, determinado por filtração em gel. Tal fato sugere uma estrutura tetramérica de sub-unidades idênticas. Finalmente, os autores propõem que a enzima bifuncional poderia ser chamada de aminoadípico semialdeído sintase.

Blemings *et al.* (1994), descreveram a localização das enzimas LOR e SDH em fígado de rato. Comparações de marcadores de atividade enzimática como: beta-hexosaminidase, lisossomas, catalases, peroxissomas, citocromos, membrana mitocondrial interna e externa, monoamina oxidase, ornitina aminotransferase de matriz mitocondrial, mostraram que LOR e SDH são encontradas somente na matriz mitocondrial. Estes resultados são consistentes com a entrada obrigatória da lisina na matriz mitocondrial para que ocorra o catabolismo da lisina. Assim surge a possibilidade de que o transporte de lisina na mitocôndria seja associado ao controle da degradação da lisina.

Simonson e Eckel (1985) desenvolveram um método enzimático para medir sacaropina, de maneira que a enzima SDH oxida lisina e 2-oxoglutarato com a correspondente conversão de NAD para NADH. O equilíbrio natural favorece a formação da sacaropina mas, usando hidrazina para bloquear um dos produtos, o 2-oxoglutarato altera a reação oxidativa da sacaropina. Segundo os autores, o ponto estável é alcançado em 15-20

minutos. Embora em altas concentrações de 2-oxoglutarato a reação seja diminuída, o produto final é recuperado na sua totalidade. Os autores relatam que o método é específico, conveniente e capaz de medir sacaropina diretamente em proteínas livres ou de extratos.

Em plantas, a maioria das informações das enzimas LOR e SDH sobre a degradação de lisina foi alcançada a partir de estudos de incorporação e metabolismo de aminoácidos marcados com C^{14} . Lisina marcada levou à incorporação do composto em ácido α -aminoadípico e ácido glutâmico, sacaropina e ácido diaminopimélico. Em endosperma de milho e cevada, lisina marcada foi incorporada em ácido glutâmico, prolina e sacaropina. Estes achados indicaram que a lisina é principalmente catabolisada em plantas via sacaropina. A primeira evidência enzimática para a operação da via da sacaropina em plantas foi obtida pela demonstração da atividade de LOR em endosperma de milho em desenvolvimento. É sabido que os primeiros passos envolvidos no catabolismo de lisina em plantas são semelhantes aos encontrados em mamíferos e são catabolisados pela enzima bifuncional LOR e SDH. Em fungos e leveduras, a LOR e SDH catalisam os passos finais da biossíntese de lisina e estão presentes como dois polipeptídeos separados (tópico revisado por Azevedo *et al.*, 1997).

Arruda *et al.* (1982), verificaram a atividade de LOR em endosperma de milho em desenvolvimento; a enzima mostrou especificidade para os substratos lisina, 2-oxoglutarato e NADPH, na presença desses dois compostos o NADPH foi oxidado, e na ausência de um destes substratos a oxidação foi mínima. Outras características da enzima foram determinadas: pH ótimo em torno de 7 e temperatura ótima de 30°C. A oxidação de NADPH foi também linear com o tempo, e a atividade foi proporcional a quantidade de extrato adicionado ao ensaio. O K_m para lisina e LOR foi de 5,2 e 1,8 mM, respectivamente.

A purificação parcial e a caracterização da LOR de endosperma imaturo de milho bem como a atividade desta enzima no endosperma normal e no mutante *opaco-2* durante o desenvolvimento da semente foram estudadas por Brochetto-Braga *et al.* (1992). Arruda e Silva (1983), demonstraram que a LOR é bastante ativa no endosperma de milho em desenvolvimento. Esta enzima exibe especificidade para lisina e α -cetoglutarato, e é dependente de NADPH como co-fator, tendo como produto final a sacaropina. A atividade da enzima LOR é bastante reduzida no mutante *opaco-2*, o que está relacionado com os níveis de zeína no mutante (Arruda *et al.*, 1982; Brochetto-Braga *et al.*, 1992).

A proteína do milho zeína é carente do aminoácido lisina (Dalby e Tsai, 1975), sendo encontrada em grande quantidade no endosperma em desenvolvimento, e embora a lisina seja sintetizada no endosperma (Sodek, 1976), quantidades razoáveis deste aminoácido (aproximadamente 5%) são encontradas fora do endosperma. Acredita-se que seja produzidas por hidrólise de proteínas solúveis acumuladas nas folhas e transferidas para o endosperma durante o desenvolvimento da semente (Arruda e Silva, 1979). Neste caso,

poderia se esperar um excesso de lisina acumulada no endosperma. Entretanto, isto não acontece, a quantidade total de lisina não ultrapassa 1,5% e a concentração de lisina livre no endosperma em desenvolvimento é inexpressiva. A baixa concentração de lisina livre deve-se à retroinibição das enzimas envolvidas na via metabólica do ácido aspártico (Arruda e Silva, 1983).

A alta atividade de LOR durante o desenvolvimento do endosperma poderia evitar o acúmulo de lisina livre. Neste caso, seria esperado que a síntese de zeína e o catabolismo de lisina fossem regulados pelo mesmo sistema, sugerindo assim que os genes que codificam LOR e a proteína zeína poderiam estar sob o controle do mesmo sistema regulatório (Brochetto-Braga *et al.*, 1992). Ainda há evidência de que LOR possa estar sob o controle do gene *opaco-2*, o qual é um gene transativador da expressão da zeína no endosperma do milho. Há indicações de que o catabolismo de lisina seja maior no endosperma da linhagem normal do que no mutante (*opaco-2*). Tais suposições foram confirmadas com experimentos feitos com lisina marcada com C¹⁴ em sementes em desenvolvimento quando estas estavam segregando em linhagens normal e mutante (Sodek e Wilson, 1970).

Karchi *et al.* (1994), estudaram a regulação da síntese e o acúmulo de lisina em sementes de plantas transgênicas de tabaco; as duas enzimas, DHDPS e AK de bactéria, insensíveis à retroinibição por lisina, expressas nesta planta, exibiram altos níveis de transcritos, resultando somente num leve aumento de lisina livre acumulada no estágio de desenvolvimento da semente. Por outro lado, a quantidade de lisina diminuiu na planta controle à medida que ela alcançou a maturidade. Foi analisado se o aumento do catabolismo poderia contribuir com a falta de lisina livre acumulada na semente das plantas transgênicas. Para tanto, analisou-se a atividade da enzima LOR. Observou-se que tanto no controle como na planta transgênica, os tempos de aparição das atividades das enzimas LOR e DHDPS estavam estreitamente correlacionados, sugerindo que a síntese de lisina e o catabolismo estavam regulados coordenadamente durante o desenvolvimento da semente. Notoriamente a atividade de LOR foi significativamente mais alta nas sementes das plantas transgênicas do que nas do controle.

Gaziola *et al.* (1997), fizeram a purificação parcial e caracterização de LOR e SDH em sementes imaturas de arroz. Os procedimentos de purificação envolveram vários passos, entre eles, a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel, levando a uma recuperação de 30% para LOR (uma produção razoável quando comparada com a de milho que foi de apenas 0,6%) e 24% para SDH (enquanto que a de milho foi de 2%).

Um único pico de atividade de LOR e um único e coincidente pico de atividade de SDH foram eluídos nas mesmas frações com 160 mM de KCl. A massa molecular da enzima LOR foi estimada em 203 kDa usando Sephacril S200, e de 202 kDa determinada por "Ferguson

plots" e, 396 kDa para LOR e SDH. Estas massas foram estimadas usando duas bandas obtidas em géis não-desnaturantes, as quais indicaram que a banda de 202 kDa deve ser uma holoenzima e a de 396 kDa representa uma molécula dimérica ou tetramérica, uma vez que as composições das sub-unidades do polipeptídeo bifuncional em arroz não foram ainda determinadas. Estudos cinéticos foram consistentes com mecanismos ordenados de seqüências para LOR, onde 2-oxoglutarato foi o primeiro substrato e sacaropina foi o último (Gaziola *et al.*, 1997).

A regulação do catabolismo de lisina através das enzimas LOR e SDH em *Arabidopsis* foi estudada por Tang *et al.* (1997a). Os autores clonaram um cDNA de *Arabidopsis* que codifica um polipeptídeo bifuncional contendo as atividades das duas enzimas ligadas uma à outra. Análise de gel de RNA mostrou duas bandas de mRNA, uma grande contendo seqüências de mRNA de LOR e SDH e uma seqüência menor contendo somente a da SDH. Entretanto, hibridações usando cDNA de seqüência tanto de LOR quanto SDH como molde, sugeriram que os dois mRNA aparentemente são codificados pelo mesmo gene. Para testar se esses dois mRNA são mesmo funcionais, extrato de proteínas de células de *Arabidopsis* foram fracionados por cromatografia de troca iônica. O resultado revelou dois picos separados, um contendo ambas as atividades das enzimas (LOR e SDH) e o outro contendo somente atividade para sacaropina. (Tang *et al.* 1997b).

Kemper *et al.* (1998), verificaram a estrutura e regulação das enzimas LOR e SDH do endosperma de milho. Os autores mostraram que estas enzimas eram ativadas por Ca^{2+} a altas concentrações de sal, solventes orgânicos e Mg^{2+} . A atividade da LOR dependente de Ca^{2+} foi inibida por um antagonista de calmodulina, o N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalenesulfonamida, e calmidazolium. A digestão com elastase separou a enzima bifuncional em três polipeptídeos de 125 kDa e dois de 65 e 57 kDa, contendo domínios funcionais de LOR e SDH, respectivamente.

Clones de cDNA designados ZLKRSDH, que codificam a enzima bifuncional LOR e SDH de milho, foram isolados por Kemper *et al.* (1999). O suposto polipeptídeo advindo daqueles clones tem domínio de LOR N-terminal e domínio de SDH C-terminal que são similares aos polipeptídeos (LYS1 e LYS9) de proteínas monofuncionais de levedura. A proteína bifuncional LOR/SDH está localizada no citoplasma da camada de sub-aleurona do endosperma do milho. Transcritos e polipeptídeos, bem como as atividades das enzimas, mostraram respectivamente uma alta e baixa regulação durante o desenvolvimento do endosperma. Além disso, os autores analisaram a expressão do clone ZLKRSDH no desenvolvimento das sementes das linhagens normal e do mutante *opaco-2*. No endosperma do mutante, o nível de mRNA foi reduzido em mais de 90%. Concomitantemente, houve reduções nos níveis de polipeptídeo e na atividade de LOR/SDH. Assim, concluiu-se que os níveis de lisina no endosperma podem ser controlados em nível transcrição pelo fator de transcrição do *opaco-2*.

Gaziola *et al.* (1999) estudaram variedades de milho QPM ("Quality Protein Maize") produzidas pela introdução de um gene modificador ao *opaco-2*. As variedades BR 451, 473 e *opaco-2* e a linhagem selvagem foram usadas para estudar as principais enzimas que controlam o metabolismo de lisina no endosperma em desenvolvimento. As enzimas AK e HSDH, as quais estão envolvidas na biossíntese de lisina e treonina respectivamente, exibiram padrões de atividade idênticos, com máximo de atividade específica após 16 dias de polinização. As variedades de QPM exibiram níveis altos de atividade da AK no endosperma, sugerindo um aumento na taxa de biossíntese de lisina quando comparadas com os genótipos do *opaco-2* e o tipo selvagem. Resultados similares foram obtidos para as enzimas LOR e SDH, as quais tiveram suas atividades fortemente reduzidas na variedade mutante *opaco-2* quando comparadas com a linhagem selvagem. As variedades QPM exibiram níveis reduzidos de atividade de LOR e SDH, comparada com a variedade *opaco-2*. O padrão de desenvolvimento da atividade da enzima mostrou diferenças quando comparado com as enzimas envolvidas na biossíntese de lisina, com atividade observada somente após 16 dias de polinização e atividade máxima após 24 dias. Os autores sugeriram que o gene modificador tem intensificado o efeito do mutante *opaco-2* sobre as enzimas LOR e SDH, e que estas alterações levam a um aumento na lisina solúvel no endosperma das variedades QPM quando comparadas com o *opaco-2* e a linhagem selvagem.

Kumpaisal *et al.* (1987) purificaram e caracterizaram a enzima DHDPS de trigo cerca de 5100 vezes, e determinaram o peso molecular em filtração em gel como 123 kDa, a qual exibiu atividade máxima em pH 8,0. Verificaram também a retroinibição em baixa concentração de lisina, e segundo os autores a lisina atua como inibidor alostérico, deste modo controlando sua própria síntese, e bloqueando a ramificação específica da lisina quando ocorrem níveis altos deste aminoácido. Foi observado que a enzima era composta de quatro sub-unidades idênticas com um único sítio de ligação por sub-unidade, sugerindo que a enzima nativa com peso molecular de 123 kDa poderia ser um tetrâmero.

DHDPS de milho foi altamente purificada de cultura de células em suspensão e de folhas, por Frisch *et al.* (1991a) em 4000 vezes, e a recuperação da enzima foi de 25% para ambas as fontes de milho. Baseado em SDS-PAGE duas sub-unidades de aproximadamente 38 e 72 kDa foram obtidas. O mesmo padrão foi observado quando bandas da proteína de gel não denaturante foram excisadas e submetidas à eletroforese em gel bidimensional. Foi confirmado pelos autores que o polipeptídeo de 38 kDa era um monômero comparando com a sequência N-terminal de aminoácidos do cDNA da DHDPS de milho. Oito aminoácidos N-terminal do polipeptídeo de 38 kDa correspondiam exatamente a região do clone de cDNA da enzima DHDPS de um mutante auxotrófico de *E. coli*. Além disso, os autores propuseram que o polipeptídeo de 72 kDa foi co-purificado de uma proteína não relacionada com um

peso molecular de aproximadamente 140 kDa. O K_m para aspartato semi-aldeído foi estimado em 0,6 mM.

Dereppe *et al.* (1992) propuseram o procedimento de purificação, caracterização e investigação das propriedades funcionais da DHDPS de plântula de ervilha, usando uma combinação de passos convencionais e cromatografia por afinidade. A enzima apresentou um peso molecular de 127 kDa, composta de três sub-unidades de 43 kDa determinadas por filtração em gel. Estas estruturas triméricas são semelhantes às estruturas triméricas de outras aldolases tais como 2-ceto-3-deoxi-6-ácido fosfogluconico, as quais catalisam condensação de aldol. A composição de aminoácidos da DHDPS de ervilha e de *E. coli* é semelhante, sendo mais significativa, a diferença no conteúdo de metionina, que é ausente na bactéria. Ainda a DHDPS é altamente específica para os substratos piruvato e L-aspartato- β -semialdeído e segue a cinética de Michaelis-Menten para ambos os substratos que possuem os valores da constante de Michaelis de 1,70 e 0,40 mM, respectivamente. Os autores concluíram que em todos os estágios de purificação a enzima apresentou duas bandas de atividade, onde os pesos moleculares dessas duas bandas corresponderiam à enzima nativa de 127 kDa e sub-unidades 43 kDa, de modo similar aos obtidos em milho (Frisch *et al.*, 1991b) e espinafre (Wallsgrave e Mazelis, 1981).

Shaver *et al.* (1996) estudaram mutantes que mostravam retroinibição por lisina. Para isso transformaram uma linhagem de *E. coli* que não tinha atividade para a enzima com um cDNA de milho (DHDPS sensível à inibição de lisina). As células foram tratadas com agente mutagênico etilmetanosulfonato, e os mutantes para DHDPS selecionados pelo crescimento em meio mínimo contendo o inibidor análogo a lisina (S-2-aminoetil-L-cisteína). Deste modo, dez mutações de pares de bases foram identificadas na seqüência do cDNA da enzima DHDPS de milho, estes mutantes foram específicos para um dos três resíduos de aminoácidos (aminoácido 157, 162 e 166), os quais estavam localizados dentro de uma pequena região do polipeptídeo. Nenhuma outra mutação foi encontrada na seqüência de cDNA da enzima, indicando que a alteração foi somente em um dos três resíduos de aminoácidos, e suficiente para eliminar a inibição por lisina na DHDPS de milho. A identificação destas mutações específicas que mudam por completo a sensibilidade da enzima, conduzindo a uma isoforma insensível a lisina, ajudou a entender o mecanismo de ligação à lisina e a mudança conformacional envolvida na inibição da atividade de DHDPS. Finalmente, os autores concluíram que os genes derivados destes mutantes poderiam servir para melhorar a qualidade nutricional do milho, assim como de outros cereais que servem de alimento para animais e o homem, mas têm conteúdo de lisina inadequado.

2.6. Características morfológicas e fisiológicas do cereal *Coix lacryma-jobi*

O *Coix lacryma-jobi* é um cereal conhecido em quase todos os países do mundo, com os mais diversos nomes. No Brasil, ele recebe várias denominações, sendo mais conhecido como Capim de Contas ou de Nossa Senhora, Rosário ou simplesmente *Coix*.

O gênero *Coix*, é originário dos países asiáticos (Uphof, 1968; Arora 1977) e foi descrito pela primeira vez em 1753, e recentemente foi descrito por Clayton (1981) como pertencente a família *Gramineae*, tribo *Andropogoneae* e sub tribo *Coiceneae* (Clayton e Renvoize, 1986).

No Brasil, o *Coix* foi introduzido em 1938 com o nome de Adlay, cultivado e distribuído largamente entre instituições oficiais e particulares. É uma espécie anual e perene chegando a atingir até 1,6 m de altura, produzindo frutos cariópses livres, de tamanho e forma variados. Apresenta cinco espécies morfológicamente distintas de acordo com o formato das folhas e sementes, sendo *Coix lacryma-jobi* Linn; *C. Gigantea* Koen; *C. Aquatica* Robx; *C. Puellarun* Balansa e *C. Pailanei* Mimeur. A variedade Adlay é uma gramínea aparentada ao milho que contém aproximadamente 21% de proteínas no endosperma, sendo estas albuminas, globulinas, prolaminas e proteínas residuais. As prolaminas constituem a principal fração protéica do Adlay, a qual é denominada de coixina, representando mais de 70% das proteínas, divididas em alfa, beta e gama-coixinas. A alfa corresponde a mais de 80% das prolaminas e são compostas de 12 polipeptídeos agrupados em 4 classes de tamanho. Estas coixinas são codificadas por uma família multigênica semelhante as encontradas no milho. As gamas coixinas correspondem a 15% das coixinas e são constituídas por uma única proteína de 22 kDa, bastante homóloga à gama zeína de 28 kDa (De Wet, 1982).

As coixinas são sintetizadas no endosperma durante o desenvolvimento da semente, acumulando-se nas organelas e em corpos protéicos e caracterizam-se por seu alto teor de prolina e glutelina; no entanto, as coixinas são pobres em aminoácidos essenciais fazendo com que a semente tenha um baixo valor nutritivo. Por outro lado, Jain e Banerjee (1974) mostraram a importância deste cereal na alimentação animal assim como na fabricação de farinha para panificação, preparo de mingau e fermentação de cerveja.

A análise dos aminoácidos revelou que as albuminas e globulinas do endosperma da Adlay são ricas em ácido glutâmico, ácido aspártico, glicina e alanina. As proteínas do endosperma da Adlay foram comparadas com as de milho variedade Maya, verificando-se que 51,7% destas proteínas são representadas por prolaminas, enquanto que análise de aminoácidos da variedade Maya mostrou que existe uma similaridade na composição de aminoácidos das frações protéicas da Maya e da Adlay (Ottoboni, 1989).

Análise por SDS-PAGE, revelou que as coixinas estão separadas e apresentam cinco componentes com pesos moleculares de 27, 25, 22, 15 e 17,5 kDa, chamadas de C1, C2, C3, C5 e C4, respectivamente (De Wet, 1982).

Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares foram conduzidos por Ottoboni *et al.* (1990), onde os mesmos estudaram a relação filogenética das proteínas zeínas e coixinas determinadas por reação cruzada e análise de "Southern blot". As proteínas foram fracionadas para obter as formas alfa, beta e gama-zeínas e as mesmas para *Coix*. As alfa coixinas são compostas de 4 classes polipeptídicas de 27 a 15 kDa correspondendo de C1 a C5, com propriedades muito semelhantes às de alfa-zeína de 22 e 19 kDa. Semelhante à alfa-zeína, C1 e C2 de alfa-coixina correspondem a 80% do total de prolaminas de *Coix*. A análise da fração que correspondeu à gama coixina continha uma banda de proteína de 22 kDa (C3); esta fração possuía propriedades similares às da gama-zeína e representavam apenas 15% do total de coixina. A fração beta-zeína era composta de uma proteína de banda maior de 17 kDa, enquanto que a beta-coixina consistia de uma mistura de alfa e gama-coixina. Os anti-soros contra gama-coixina mostraram forte reação cruzada com a gama-zeína de milho. A homologia entre as coixinas e zeínas foram mais tarde investigadas usando análise de "Southern blot". DNA genômico de milho e *Coix* foram digeridos com várias enzimas e hibridados com os clones de cDNA que representavam as frações de 19 e 22 kDa, bem como as de 28 e 16 kDa das zeínas; deste modo, o genoma de *Coix* mostrou seqüências complexas de hibridação cruzada com o cDNA de alfa-zeína, enquanto com os clones de 19 kDa nenhuma hibridação cruzada foi observada.

Leite *et al.* (1992) clonaram e caracterizaram um cDNA que codificava uma coixina rica em enxofre, usando biblioteca de cDNA construída a partir de mRNA polissomal preparado de endosperma imaturo de *Coix*. As seqüências deduzidas de aminoácidos do clone de cDNA se tratava de um polipeptídeo de 194 resíduos, os quais apresentavam 64% de homologia com a beta-zeína de 17 kDa. A proteína madura continha uma composição de prolaminas semelhantes e um alto conteúdo de metionina sulforada (cerca de 11,6%) e 5,2% de cisteína.

O gene *opaco-2* de milho que exerce função sobre os genes do endosperma de milho e *Coix* foi estudado por Cord-Neto *et al.* (1995), de maneira que os autores mostraram que o *opaco-2* regula em nível de transcrição a estrutura e o desenvolvimento de diferentes classes das beta-prolaminas de milho e *Coix*. Um novo "O2-binding box" foi identificado nos genes destas proteínas, que junto com as regiões previamente identificadas em outros endospermas expressam genes, formando uma coleção de elementos O2-cis, fazendo com que haja implicações regulatórias sobre o papel do mutante O2 no mecanismo que controla a expressão coordenada dos genes no desenvolvimento do endosperma.

Vettore *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram cDNA e clones genômicos que codificam homólogos de *opaco-2*. A região que codifica o gene *opaco-2* de *Coix* é interrompida por cinco íntrons e codifica um polipeptídeo de 408 aminoácidos. Comparações desta sequência de aminoácidos com duas diferentes sequências da proteína O2 de milho, mostraram que as mesmas são semelhantes. A proteína do mutante O2 de *Coix* tem especificidade de ligação e padrão de expressão similares.

Souza Filho *et al.* (1999) identificaram um fator de ligação ao DNA que reconhece um promotor da proteína alfa-coixina de *Coix* e que interage com a proteína do mutante *Opaco-2* de *Coix*. Foram utilizados expressão "transiente" e ensaio de mobilidade eletroforética para investigar os elementos cis e proteínas ligadas ao DNA envolvidas na regulação e expressão da gene para a alfa coixina. Um conjunto de deleções unidirecionais foi gerado em um fragmento de 926 pb do promotor da alfa-coixina, que foi previamente fusionado com o gene reporter *GUS*. A construção foi ensaiada pela expressão transiente no endosperma imaturo de milho. Deste modo não houve decréscimo expressivo na atividade do gene *GUS* com as deleções progressivas de -1084 a -238. Entretanto, deleções de -238 até 158, afetaram parcialmente o gene "*opaco-2 box*", resultando num decréscimo acentuado da atividade do gene *GUS*, enfatizando assim, a importância de O2 box na expressão quantitativa do gene.

3. APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS E OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente de forma parcial algumas enzimas que estão envolvidas na via metabólica do ácido aspártico de *Coix*, como também analisar os mecanismos de regulação destas enzimas em milho e arroz, tendo como meta esclarecer de maneira mais ampla possível a regulação da biossíntese dos aminoácidos que dela fazem parte.

Do resultado destes estudos foram gerados três trabalhos. O primeiro deles envolve de uma maneira geral a caracterização bioquímica em sementes de *Coix* em desenvolvimento, uma vez que enzimas AK, HSDH, LOR e SDH ainda não tinham sido estudadas em *Coix*.

O segundo trabalho trata dos mecanismos de regulação envolvendo mutantes em linhagens de milho e análise dos genótipos dos mutantes que mostram resistência à inibição causada por lisina e treonina, com a determinação da atividade da enzima aspartato quinase durante o desenvolvimento do endosperma. Primeiramente, a enzima foi parcialmente purificada e a retroinibição por lisina e treonina analisada em plântula, antera e endosperma da linhagem selvagem e mutantes.

O último trabalho está relacionado com os efeitos causados por alguns compostos na regulação da atividade de duas isoenzimas de aspartato quinase de arroz, uma sensível a treonina e a outra a lisina. As enzimas foram também parcialmente purificadas em sementes de arroz em desenvolvimento, e as atividades analisadas na presença de aminoácidos e seus análogos, cálcio e inibidores de calmodulina e em diferentes concentrações de KCl.

3.1. Artigo 1: Enzymes of lysine metabolism from *Coix lacryma-jobi* seeds

J. Lugli; A. Campbell; S. A. Gaziola; R. J. Smith; P. J. Lea and R. A. Azevedo. Submetido à revista *Plant Physiology and Biochemistry*

3.2. Artigo 2: Aspartate kinase in the maize mutants *ASK1LT19* and *Opaque-2*

K. Brennecke; A. J. Souza Neto; J. Lugli; P. J. Lea and R. A. Azevedo. *Phytochemistry*. 1995, 41(3): 707-712.

3.3. Artigo 3: Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes

J. Lugli; S. A. Gaziola and R. A. Azevedo. *Plant Science*. 2000, 150:51-58.

Enzymes of Lysine Metabolism from *Coix lacryma-jobi* Seeds

J. Lugli¹, A. Campbell², S. A. Gaziola², R. J. Smith³, P. J. Lea³ and R. A. Azevedo²

¹ *Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas CEP 13083-970, Brazil;* ² *Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba CEP 13400-970, Brazil;* ³ *Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster LA1 4YQ, U.K.*

ABBREVIATIONS USED: AEC = S-2- aminoethyl-L-cysteine; AK = aspartate kinase; DHDPS = dihydrodipicolinate synthase; HSDH = homoserine dehydrogenase; LOR = lysine 2-oxoglutarate reductase; SAM = S-adenosylmethionine; SDH = saccharopine dehydrogenase; TS = threonine synthase.

Keywords: *Coix lacryma-jobi*, aspartate kinase, lysine 2-oxoglutarate reductase, saccharopine dehydrogenase.

Corresponding author: R. A. Azevedo. *E-mail:* raazeved@carpa.ciagri.usp.br

Running headline: Lysine metabolism in Coix

ABSTRACT

Lysine, threonine, methionine and isoleucine are synthesized through the aspartate metabolic pathway. The concentrations of soluble lysine and threonine in cereal seeds are very low. *Coix lacryma-jobi* (Coix) is a maize-related grass and the enzymological aspects of the aspartate metabolic pathway are completely unknown. In order to obtain information on lysine metabolism in this plant species, two enzymes involved in the biosynthesis of these amino acids (aspartate kinase and homoserine dehydrogenase) and two enzymes involved in lysine degradation (lysine 2-oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase) were isolated and partially characterized in Coix seeds. Aspartate kinase activity was inhibited by threonine and lysine separately, suggesting the presence of two isoenzymes, one sensitive to lysine and the other sensitive to threonine, with the latter corresponding to around 60% of the total aspartate kinase activity. In contrast to previous results from other plant species, the threonine-sensitive aspartate kinase eluted from an ion exchange chromatography column after the lysine-sensitive form. The homoserine dehydrogenase activity extracted from the seeds was partially inhibited by threonine, indicating the presence of threonine-sensitive and threonine-resistant isoenzymes. Lysine 2-oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase were shown to be specific to the endosperm tissue and co-purified on an anion exchange chromatography column, suggesting that the two activities are linked on a single bifunctional polypeptide as observed for other plant species. One single SDH activity band was observed on non-denaturing PAGE gels. The K_m for saccharopine of SDH was determined as 0.143 mM and the K_m for NAD as 0.531 mM. Although saccharopine dehydrogenase activity was shown to be stable, LOR, AK and HSDH were extremely unstable under all buffer systems tested.

INTRODUCTION

Coix lacryma-jobi (common name Coix) is a maize-related grass (tribe Andropogoneae) mainly grown and cultivated in Asia. Molecular analysis based on nucleotide sequence homology studies, have shown over 95% homology to maize probes¹. The potential of Coix as a cereal seed, having a similar chemical composition to other graminaceous species, has been examined, suggesting a role as a foodstock for poultry². It has also been shown that Coix seeds possess an antitumor activity, due to an acidic fraction composed of palmitic, stearic, oleic and linoleic fatty acids³. Antibiotic compounds with activity against bacteria, have also been isolated from extracts of etiolated seedlings of Coix⁴.

Essential amino acids like lysine and threonine are particularly important in cereal crops due to the low concentrations in the seeds⁵. These amino acids, plus methionine and isoleucine have a common precursor, aspartate⁶. The aspartate metabolic pathway in plants is strongly feedback regulated at key regulatory steps⁷. Several enzymes of the aspartate pathway have been shown to be important for the control of the fluxes of carbon and nitrogen through the pathway, leading to the synthesis of these amino acids⁷. Among them, aspartate kinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserine dehydrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3), dihydrodipicolinate synthase (DHDPS, EC 4.1.2.52) and threonine synthase (TS, EC 4.2.99.2) have been characterized in a number of plants species with some of them containing different isoenzymic forms⁷⁻¹⁵. In the case of AK and HSDH, the isoenzymes sensitive to threonine feedback inhibition have been shown to be part of a single bifunctional polypeptide^{14,16-18}. The genes encoding these enzymes have also been cloned in some plant species^{16, 18-22}. Distinct regulatory aspects such as the effects of amino acids, *S*-adenosylmethionine (SAM), *S*-2-aminoethyl-L-cysteine, calcium and light, among others, have also been investigated and characterized for some of the enzymes²³⁻²⁹.

Although a considerable amount of information is available concerning the biochemical and molecular regulation of lysine biosynthesis, much less is known about the degradation of lysine in cereal seeds⁵⁻⁷. Two enzymes, lysine 2-oxoglutarate reductase, also known as lysine α -ketoglutarate reductase (LOR, EC 1.5.1.8) and saccharopine dehydrogenase (SDH, EC 1.5.1.9), control the catabolism of lysine via saccharopine in seeds^{5-7,30}. These two enzymes have been isolated, purified and characterized in a limited number of plant species and shown to exist as a single bifunctional polypeptide³¹⁻³⁴, although a monofunctional SDH has also been observed³³. In general, the activity of LOR has been shown to be modulated by calcium, ionic strength, phosphorylation, whereas SDH does not appear to be regulated³⁵⁻³⁸.

The synthesis and assembly of the Coix storage proteins in the protein bodies in seeds, have been investigated and grouped into two classes, gamma- and alpha-coixins³⁹. Coix, maize and sorghum storage proteins are coded by homologous genes, which are co-ordinately expressed in the endosperm in a temporal-specific manner⁴⁰. The opaque-2 mutation of maize is known to have numerous pleiotropic effects. This gene encodes a basic bZIP protein, which is a transcription activator of alpha- and beta-prolamin genes⁴¹. Furthermore, the *opaque-2* gene has been shown to influence the expression of AK⁴²⁻⁴⁴ and also enzymes of the lysine degradation pathway in the maize endosperm^{30,38}, suggesting a fundamental role of the opaque-2 protein in the overall control of lysine metabolism in maize. Coix cDNA and genomic clones encoding an *opaque-2* maize homologue have been isolated and characterized, with the Coix opaque-2 protein exhibiting the same binding specificity and expression patterns of the

maize opaque-2⁴⁰. Although a DHDPS Coix gene has been cloned and shown not to be under the control of the *opaque-2* gene⁴⁵, no other genes or enzymes of the aspartic acid metabolic pathway have so far been isolated from Coix.

In this paper we report on the isolation and characterization of the enzymes involved in lysine metabolism, AK, HSDH, LOR and SDH, from Coix seeds. Some regulatory aspects have also been investigated and a comparison with other cereal crops enzymes is presented.

EXPERIMENTAL

Material

Coix lacryma-jobi seeds (cv. Adlay) were used for the extraction of the enzymes. Seeds were harvested at five distinct stages of development based on the colour of the seed capsule as described previously by Targon *et al.*³⁹. Plants were grown in the field station of the Genetics Department, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz in the summer season of 1997-1998 and 1998-1999, and developing seeds were harvested into liquid nitrogen and stored frozen at -80 °C, until used for enzyme extraction. Seeds of Coix were sown in a commercial potting medium and the seedlings grown in a glass house maintained at 25-30°C and a 16 h photoperiod at 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 15 days, when leaves and roots were harvested and kept frozen at -80°C until used for enzyme extraction.

Extraction of the enzymes

All procedures were carried out at 4 °C unless stated otherwise. After the removal of the seed capsule, endosperms were used for enzyme extraction.

AK and HSDH were extracted in a common buffer essentially as described by Teixeira *et al.*¹⁴. LOR and SDH were extracted in a common buffer exactly as described by Gaziola *et al.*³². Coix immature endosperm were extracted in 5 volumes of the respective buffers for each enzyme. The extracts were filtered through several layers of gauze and centrifuged at 15000 *g* for 30 min to remove completely the cell debris.

Ammonium sulphate precipitation

The supernatant was divided in two fraction and precipitated by slowly adding solid ammonium sulphate and gently stirring for 30 min to give precipitation sequences of 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % and 0-30 %, 30-50 %, 50-70 % ammonium sulphate saturation. After each step, the suspension was centrifuged at 15000 *g* for 30 min and the precipitated

protein dissolved in a small volume of buffer A, (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM DTT, 0.1 mM L-lysine, 0.1 mM L-threonine and 10 % (v/v) glycerol) for AK-HSDH or buffer B, (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 10 % (v/v) glycerol) for LOR-SDH. The dissolved pellets were then loaded onto Sephadex G25 columns (10 mL total volume) equilibrated in buffers A (for AK and HSDH) and B (for LOR and SDH) and run under gravity. The desalted samples were assayed for the respective enzymes.

Enzymes partial purification

The enzymes were extracted as described above and partially purified with ammonium sulphate (30-60 % saturation for AK-HSDH and 30-55 % saturation for LOR-SDH). After desalting the resuspended protein pellets on Sephadex G25 columns as described above, the extracts were used in all experiments.

An anion exchange chromatography step was also performed for the enzymes. In the case of AK-HSDH extracts, both step-wise and linear gradient types of elution were tested. The desalted samples were applied to a FFQ-Sepharose column (2.5 x 6 cm; flow rate 1 mL/min) equilibrated in buffer A. The column was washed with buffer A (unbound fraction - stored at -20 °C for further analysis) and a step-wise elution (0-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 mM KCl) was carried out. A final wash with 1 M KCl was also performed and the fractions stored for further analysis of enzyme activity. Similarly, another sample was eluted using 0-500 mM KCl, from the same column and same running conditions). For LOR-SDH, the desalted enzyme samples were applied to a DEAE-Sepharose column (2.5 x 7 cm; flow rate 1 mL/min) equilibrated in buffer B. The column was washed with buffer B (unbound fraction - stored at -20 °C for further analysis) and a linear gradient (0-500 mM KCl) was carried out. A final wash with 1 M KCl was also performed and the fractions stored for further analysis of enzyme activity.

Enzyme assays

Enzyme activities were assayed in all experiments exactly as described previously by Brennecke *et al.*⁴³ for AK, Teixeira *et al.*¹⁴ for HSDH and Gaziola *et al.*³² for LOR and SDH.

SDH activity staining

SDH activity staining was also performed using non-denaturing PAGE gels as described by Gaziola *et al.*³⁷. Maize and rice SDH enzyme samples, partially purified as described by Gaziola *et al.*³⁷, were also applied to the gels and used as controls of SDH activity and for enzyme comparison.

Protein determination

The protein concentration of all samples was determined by the method of Bradford⁴⁶ using bovine serum albumin as a standard.

Kinetics analysis

The partially purified SDH enzyme was used for kinetic studies. Activities were monitored continuously in order to obtain initial velocity data. The K_m values for saccharopine and NAD were determined graphically from the double-reciprocal plots of activity against the variable substrate concentration, maintaining the remaining substrates fixed at the routine assay concentrations. The K_m determined here is therefore a close approximation to that defined by Dalziel⁴⁷, where K_m is the concentration that gives half the true maximum rate in the presence of infinitely large concentrations of the other substrates.

RESULTS AND DISCUSSION

Enzymes, which have been previously shown in other plant species to play an important role in lysine metabolism, have been isolated from Coix. AK, HSDH, LOR and SDH activities were initially measured in Coix leaves and roots obtained from 15 day old seedlings and from developing seeds (stage 2). AK and HSDH activities were detected in all tissues, with the seeds exhibiting a much higher specific activity when compared to leaves and roots (Table I). On the other hand, LOR and SDH activities could only be recovered from developing seeds (Table I). It has been shown previously for other plant species, that seeds exhibit a higher specific activity of AK and HSDH^{14,43,44}. The result for LOR and SDH confirms previous data obtained for cereal seeds like maize³¹ and rice³², in which the activities of both enzymes were only detected in the endosperm tissue. However, it has been shown recently in *Phaseolus vulgaris* that LOR and SDH activities could also be observed in other tissues⁴⁸. The data thus present further confirmation that the activities of LOR and SDH, involved in the degradation of lysine, are limited to the seeds of cereal crops. These enzymes are able to catalyse a high rate of lysine catabolism and thus prevent accumulation of lysine in the soluble form, even following the introduction of the genes encoding AK and DHDPS⁴⁹. Furthermore, it has been shown that LOR and SDH activities in cereal seeds are normally much higher when compared to the activities in the seeds of other plant species⁵⁻⁷. For instance, in the opaque-2 maize mutant, which contains a much higher concentration of lysine in the seeds, the activities of LOR and SDH are drastically reduced^{32,38}. In addition, rice seeds, which normally accumulate the highest concentration of lysine among cereal crops, have also been shown to contain reduced activities of LOR and SDH^{32,37}.

The inhibition patterns observed for AK in relation to the amino acids lysine and threonine, clearly showed that threonine inhibited AK activity more effectively than lysine (Table I and II). This result is novel, since lysine has been widely shown to be the main inhibitor of AK activity in higher plants⁷. This result was further confirmed when AK was partially purified (see later). Another strong indication that the threonine-sensitive isoenzyme of AK may play a major role in Coix seeds, was the detection of a high HSDH activity, that was also inhibited by threonine (Table II). These data suggest that there are also two HSDH isoenzymes present in Coix, one threonine-sensitive, which in plants is part of a bifunctional polypeptide with the threonine-sensitive AK^{16,17}, and the other resistant to threonine inhibition.

The activities of all enzymes were also determined in the developing Coix endosperm, which was harvested at five distinct stages as originally described by Targon *et al.*³⁹. Stage 2 exhibited the highest levels of specific activities for all four enzymes (Table II) and was used

for partial purification and characterization, while stages 4 and 5 did not exhibit activity of any of the enzymes analysed.

Partial purification of the enzymes was limited to an anion exchange chromatography step since the enzymes, with the exception of SDH, were shown to be extremely unstable after ammonium sulphate precipitation, even after several types of variation to the buffer system had been tested. It appears that this may be a characteristic of Coix, since these enzymes have been highly purified from seeds of other plant species⁷.

AK was initially submitted to a preliminary step-wise elution from the anion exchange chromatography column and was eluted between 200-300 mM KCl (Fig. 1[a]). When the same sample was eluted with a 0-500 mM KCl linear gradient, two overlapping peaks of AK activity were eluted in the same 200-300 KCl mM range. When AK activity was determined in the presence of lysine and threonine separately, there was a clear indication that the peaks corresponded to two AK isoenzymes, one sensitive to threonine and the other sensitive to lysine (Fig. 1[b]). In general, threonine inhibited AK activity to a greater extent, again indicating that in this plant species, the threonine-sensitive isoenzyme of AK is predominant. Further confirmation of these results was obtained from the partial purification of HSDH from the same column (Fig. 2). One single peak of HSDH activity was eluted from the anion exchange column in the same KCl concentration range as that of the AK isoenzymes (Fig. 2[a]). However, when threonine was tested on each fraction containing HSDH activity, the first group of fractions in elution order were not inhibited, whereas the second group, corresponding to the majority of HSDH activity, was strongly inhibited by threonine, indicating the existence of two overlapping peaks of HSDH activity. Similar results in terms of the separation of AK isoenzymes from an ion exchange column have been observed previously, but not in this elution order^{12,14}. In previous experiments the threonine-sensitive AK isoenzyme, has been shown to be eluted first from anion exchange chromatography columns^{12,14}. Moreover, in all plant species tested the lysine-sensitive AK was shown to be predominant⁷, but this is not the case for Coix.

Although it has been shown in the literature that the threonine-sensitive AK and HSDH are one single polypeptide^{7,17,20}, our data for Coix still does not allow us to conclude the same for this plant species. It is however, very likely, but further purification of both, AK and HSDH activities and the molecular cloning of the relevant genes is still necessary.

As discussed above, LOR and SDH activities were shown to be restricted to the endosperm tissue (Table II). The activity of LOR was shown to be very unstable and most of the experiments resulted in almost complete loss of LOR activity after the ammonium sulphate stage. However, we were able to perform some experiments in which both enzymes were further purified on a DEAE-Sephacel column (Fig. 3). One single peak of LOR activity was

observed, which co-eluted exactly with the peak of SDH activity. Contrary to that which has been observed in other plant species (e.g. maize³¹), when LOR activity was markedly higher than SDH activity, in Coix SDH activity was in general higher (Table II and Fig. 3). Such a result may be due to the high losses of LOR activity during extraction and purification. The co-purification observed for both enzymes on the anion exchange chromatography column and during the ammonium sulphate fractionation (data not shown), suggest that in Coix, LOR and SDH are also probably present as a bifunctional polypeptide, as has been observed for these enzymes in all other plant species studied so far⁶. Although a monofunctional SDH has been reported previously³³, in this study no evidence was found for the presence of such a monofunctional SDH enzyme protein. However, as for AK and HSDH, further purification and molecular cloning of the genes are necessary to confirm the existence of the bifunctional polypeptide LOR-SDH.

Since SDH activity was highly stable during manipulation, an anion exchange partially purified Coix SDH sample was applied to a non-denaturing acrylamide gel, which was then stained for SDH activity. One band dependent upon saccharopine was normally observed (Fig. 4), however two other very weak bands appeared in gels when high amounts of protein was loaded. In this case, the least electronegative band (the predominant one) always accounted for over 98% of the total SDH activity. Further analysis of the SDH bands of activity was carried out by running the Coix SDH sample with two partially purified SDH samples isolated from the developing seeds of maize and rice and the band patterns of all three plant species was compared (Fig. 5). As observed in Fig. 4, the Coix sample analysed exhibited one band of SDH activity (Fig. 5[c]), whereas the rice sample exhibited 4-5 bands of SDH activity (Fig. 5 [b]), confirming the presence of multimeric forms of SDH in rice³⁷. Based on the relative mobility of the bands of activity, the two weak SDH bands of Coix ran to about the same position as the most electronegative band of rice SDH band (Fig. 5[b]). Although maize exhibited one major band, in a similar manner to Coix (Fig. 5[a]), the Coix band did not run to same position as that of maize, nor to the same position of any of the rice SDH bands. Unfortunately, LOR activity was strongly reduced in the Coix samples used, otherwise the gels could have also been stained for LOR activity and the presence of monofunctional and bifunctional isoenzymes of SDH, could have been confirmed.

Kinetics analysis was also carried out on the SDH sample used for activity staining. The K_m for saccharopine of SDH was determined as 0.143 mM, whereas the K_m for NAD was 0.531 mM. These results are similar to those observed for SDH purified from rice³² and maize³¹.

CONCLUSIONS

Coix is a plant species which is gaining importance as a crop in some countries, and although it is a gramineae related to maize, some aspects related to the enzymes of lysine metabolism have been shown to be different for this plant species. Particularly important is the clear and unique data suggesting that the threonine-sensitive AK isoenzyme is predominant in the seed, exhibiting different chromatographic properties from those shown for other cereals. The implication of such a result may be related to the relative flux of carbon through the pathway leading to the synthesis of either threonine or lysine. It appears that the catabolism of lysine in Coix is very similar to that of other cereal crops. Further investigation involving the quantification of both soluble and protein lysine and threonine in the Coix seeds, may help to improve our understanding of the regulatory aspects of the pathway in this plant species.

Acknowledgements

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant no. 98/12461-0. R.A.A. and J.L. acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), respectively, for the research fellowships.

REFERENCES

1. Weerakoon, L.K., Weber, D.F. and Schneerman, M.C. Estimated genetic relatedness of maize to 23 plant species by RFLP analysis. *Maydica* **38** (1993) 231-237.
2. Gupta, J.J. and Yadav, B.P.S. Job`s tears (*Coix lachryma*) grain as a new cereal feed for poultry. *Indian Journal of Animal Sciences* **66** (1996) 106-109.
3. Numata, M., Yamamoto, A., Moribayashi, A. and Yamada, H. Antitumor components isolated from the chinese herbal medicine Coix. *Planta Medica* **60** (1994) 356-359.
4. Ishiguro, Y., Okamoto, K., Ojima, F. and Sonoda, Y. A novel antimicrobial substance in etiolated seedlings of adlay. *Chemistry Letters* **7** (1993) 1139-1140.
5. Molina, S.M.G., Gaziola, S.A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. Manipulating cereal crops for high lysine. *Scientia Agricola* (2001) in press.
6. Azevedo, R.A. and Lea, P.J. Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids* (2001) in press.

7. Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.L. and Lea, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46** (1997) 395-419.
8. Aarnes, H. and Rognes, S.E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **13** (1974) 2717-2724.
9. Walter, T.J., Connelly, J.A., Gengenbach, B.G. and Wolf, F. Isolation and characterization of two homoserine dehydrogenases from maize suspension cultures. *Journal of Biological Chemistry* **254** (1979) 1349-1355.
10. Relton, J.M., Bonner, P.L.R., Wallsgrove, R.M. and Lea, P.J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot suspension cultures. *Biochimica Biophysica Acta* **953** (1988) 48-60.
11. Frisch, D.A., Gengenbach, B.G., Tommey, A.M., Sellner, J.M. and Myers, D.E. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. *Plant Physiology* **96** (1991) 444-452.
12. Azevedo, R.A., Blackwell, R.D., Smith, R.J. and Lea, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. *Phytochemistry* **31** (1992) 3725-3730.
13. Dereppe, C., Bold, G., Ghisalba, O., Ebert, E. and Schar, H.P. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. *Plant Physiology* **98** (1992) 813-821.
14. Teixeira, C.M.G., Gaziola, S.A., Lugli, J. and Azevedo, R.A. Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds. *Journal of Plant Physiology* **153** (1998) 281-289.
15. Laber, B., Maurer, W., Hanke, C., Grafe, S., Ehlert, S., Messerschmidt, A. and Clausen, T. Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase. *European Journal of Biochemistry* **263** (1999) 212-221.
16. Wilson, B.J., Gray, A.C. and Matthews, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Plant Physiology* **97** (1991) 1323-1328.
17. Azevedo, R.A., Smith, R.J. and Lea, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* **31** (1992) 3731-3734.
18. Weisemann, J.M. and Matthews, B.F. Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Plant Molecular Biology* **22** (1993) 301-312.
19. Ghislain, M., Frankard, V., Van Den Bossche, D., Matthews, B. and Jacobs, M. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **24** (1994) 835-851.

20. Muehlbauer, G.J., Somers, D.A., Matthews, B.J. and B.G. Gengenbach. Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiology* **106** (1994) 1303-1312.
21. Frankard, V., Vauterin, M. and Jacobs, M. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. *Plant Molecular Biology* **34** (1997) 233-242.
22. Vauterin, M., Frankard, V. and Jacobs, M. The *Arabidopsis thaliana* *dhdps* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Molecular Biology* **39** (1999) 695-708.
23. Rognes, S.E., Lea, P.J. and Mifflin, B.J. S-adenosylmethionine - a novel regulator of aspartate kinase. *Nature* **287** (1980) 357-359.
24. Bonner, P.L.R., Hetherington, A.M. and Lea, P.J. Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin. *FEBS Letters* **195** (1986) 119-121.
25. Azevedo, R.A., Smith, R.J. and Lea, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. *Phytochemistry* **31** (1992) 3735-3737.
26. Curien, G., Job, D., Douce, R. and Dumas, R. Allosteric activation of *Arabidopsis* threonine synthase by S-adenosylmethionine. *Biochemistry* **37** (1998) 13212-13221.
27. Dey, M. and Guha-Mukherjee, S. Phytochrome activation of aspartate kinase in etiolated chickpea (*Cicer arietinum*) seedling. *Journal of Plant Physiology* **154** (1999) 454-458.
28. Dey, M. and Guha-Mukherjee, S. Aspartate metabolism in *Cicer* immature seeds requires Ca^{2+} , protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Science* **150** (2000) 85-91.
29. Lugli, J., Gaziola, S.A. and Azevedo, R.A. Effects of calcium, S adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. *Plant Science* **150** (2000) 51-58.
30. Arruda, P., Kemper, E.L., Papes, F. and Leite, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends in Plant Science* **5** (2000) 324-330.
31. Gonçalves-Butruille, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A. and Arruda, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiology* **110** (1996) 765-771.
32. Gaziola, S.A., Teixeira, C.M.G., Lugli, J., Sodek, L. and Azevedo, R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. *European Journal of Biochemistry* **247** (1997) 364-371.
33. Tang, G., Miron, D., Zhu-Shimoni, J.X. and Galili, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9** (1997) 1305-1316.

34. Miron, D., Ben-Yaacov, S., Reches, D., Schupper, A. and Galili, G. Purification and characterization of bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase from developing soybean seeds. *Plant Physiology* **123** (2000) 655-663.
35. Miron, D., Ben-Yaacov, S., Karchi, H. and Galili, G. *In vitro* dephosphorylation inhibits the activity of soybean lysine-oxoglutarate reductase in a lysine-regulated manner. *Plant Journal* **12** (1997) 1453-1458.
36. Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Capella, A.N., Gonçalves-Butruille, M., Azevedo, R.A. and Arruda, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. *European Journal of Biochemistry* **253** (1998) 720-729.
37. Gaziola, S.A., Sodek, L., Arruda, P., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. Degradation of lysine in rice seeds: Effect of calcium, ionic strength, S-adenosylmethionine and S-2-aminoethyl-L-cysteine on the lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme. *Physiologia Plantarum* **110** (2000) 164-171.
38. Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Papes, F., Martinez Moraes, K.C., Leite, A. and Arruda, P. The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* **11** (1999) 1981-1994.
39. Targon, M.L.N., Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Ludevid, D., Puigdomenech, P. and Arruda, P. Synthesis and deposition of coixin in seeds of *Coix lacryma-jobi*. *Plant Science* **83** (1992) 169-180.
40. Vettore, A.L., Yunes, J.A., Neto, G.C., daSilva, M.J., Arruda, P. and Leite, A. The molecular and functional characterization of an *opaque-2* homologue gene from Coix and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Molecular Biology* **36** (1998) 249-263.
41. Neto, G.C., Yunes, J.A., daSilva, M.J., Vettore, A.L., Arruda, P. and Leite, A. The involvement of opaque-2 on beta-prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Molecular Biology* **27** (1995) 1015-1029.
42. Azevedo, R.A., Arana, J.L. and Arruda, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*19* with *opaque-2* maize mutant. *Plant Science* **70** (1990) 81-90.
43. Brennecke, K., Souza-Neto, A.J., Lugli, J., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *opaque-2*. *Phytochemistry* **41** (1996) 707-712.
44. Gaziola, S.A., Alessi, E.S., Guimarães, P.E.O., Damerval, C. and Azevedo, R.A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999) 1268-1275.

45. Dante, R.A., Neto, G.C., Leite, A., Yunes, J.A. and Arruda, P. The *DapA* gene encoding the lysine biosynthetic enzyme dihydrodipicolinate synthase from *Coix lacryma-jobi*: cloning, characterization, and expression analysis. *Plant Molecular Biology* **41** (1999) 551-561.
46. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1976) 248-254.
47. Danziel, K. The interpretation of kinetic data for enzyme-catalysed reactions involving three substrates. *Biochemical Journal* **114** (1969) 547-556.
48. Lima, S.T.C. Caracterização da enzima lisina cetoglutarato redutase (LKR)/sacaropina desidrogenase (SDH) estudada em *Phaseolus vulgaris*/ Ph.D. Thesis, State University of Campinas, Campinas, Brazil (1999). p.91.
49. BrinchPedersen, H., Galili, G., Knudsen, S. and Holm, P.B. Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Molecular Biology* **32** (1996) 611-620.

Table I Activity of AK, HSDH, LOR and SDH in different tissues of Coix. The effect of the amino acids lysine (Lys) and threonine (Thr) were tested separately and in combination (LT) on AK activity, whereas threonine was tested on HSDH activity.

Table II Activity of AK, HSDH, LOR and SDH in Coix developing endosperms. The effect of the amino acids lysine (Lys) and threonine (Thr) were tested separately and in combination (LT) on AK activity, whereas threonine was tested on HSDH activity.

Figure 1 AK elution profiles from a FFQ-Sepharose column. In (a), AK activity (O) was eluted with a KCl step-wise sequence (0-100, 100-200, 200-300, 300-400 and 400-500 mM). In (b), AK activity (O) was eluted with a KCl linear gradient (0-500 mM). Each fraction of activity was tested in the presence of 5 mM L-threonine (■), 5 mM L-lysine (□) and 5 mM L-lysine plus 5 mM L-threonine (Δ). Activity expressed in nmol. mg⁻¹ protein.

Figure 2 HSDH elution profiles from a FFQ-Sepharose column. In (a), HSDH activity (O) was eluted with a KCl step-wise sequence (0-100, 100-200, 200-300, 300-400 and 400-500 mM). In (b), HSDH activity (O) was eluted with a KCl linear gradient (0-500 mM). Each fraction of activity was also tested in the presence of 5 mM L-threonine (■). Activity expressed in nmol. mg⁻¹protein.

Figure 3 LOR and SDH elution profiles from a DEAE-Sephacel column. LOR (O) and SDH (■) activities were eluted with a KCl linear gradient (0-500 mM). LOR and SDH activities were expressed in nmol NADPH min⁻¹. mg⁻¹protein and nmol NAD min⁻¹ . mg⁻¹ protein, respectively.

Figure 4 Activity staining of SDH. Partially purified SDH from the anion exchange chromatography step was applied to non-denaturing 7% gels and stained for SDH activity. Lane a, SDH activity staining in which the substrate, saccharopine, was excluded from the reaction mixture. Lane b, stained for SDH activity.

Figure 5 SDH activity staining in non-denaturing PAGE. SDH activity containing extracts partially purified from maize (lane a), rice (lane b) and *Coix* (lane c) were applied to non-denaturing 7% gels and stained for SDH activity.

Tabela I. Atividade da AK, HSDH, LOR e SDH em diferentes tecidos de Coix.

Enzyme	Treatment	Seed (stage 2) % Inhibition	Activity	Leaf % Inhibition	Activity	Root % Inhibition
AK ^b	Control	-	1.02	-	0.42	-
	+5mM Lys	51	0.48	53	0.18	57
	+5mM Thr	39	0.42	59	0.18	57
	+5 mM LT	64	0.12	88	0.06	86
HSDH ^b	Control	-	1.14	-	0.24	-
	+5 mM Thr	44	0.66	42	0.12	50
LOR ^c	Control	-	0	-	0	-
SDH ^d	Control	-	0	-	0	-

a These values are the mean of three measurements, with the standard error of the mean below 5% in all cases.

b Activity expressed in nmol . mg⁻¹protein.

c Activity expressed in nmol NADPH min⁻¹ . mg⁻¹protein.

d Activity expressed in nmol NAD min⁻¹ . mg⁻¹protein.

Tabela II. Atividade da AK, HSDH, LOR e SDH de endosperma de Coix em desenvolvimento.

Enzyme ^e	Treatment	Stage 1		Stage 2		Stage 3	
		Activity	% Inhibition	Activity	% Inhibition	Activity	% Inhibition
AK ^b	Control	1.80	-	4.80	-	1.32	-
	+5mM Lys	0.90	50	3.24	32	0.96	27
	+5mM Thr	0.78	57	2.58	46	0.90	32
	+5 mM LT	0.12	94	0.72	85	0.48	64
HSDH ^b	Control	3.18	-	3.30	-	1.56	-
	+5 mM Thr	1.68	47	1.62	51	0.72	54
LOR ^c	Control	0.72	-	1.73	-	0.97	-
SDH ^d	Control	0.74	-	1.61	-	1.19	-

a These values are the mean of three measurements, with the standard error of the mean below 5% in all cases.

b Activity expressed in $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

c Activity expressed in $\text{nmol NADPH min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$.

d Activity expressed in $\text{nmol NAD min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$.

e No enzyme activity was observed in stages 4 and 5.

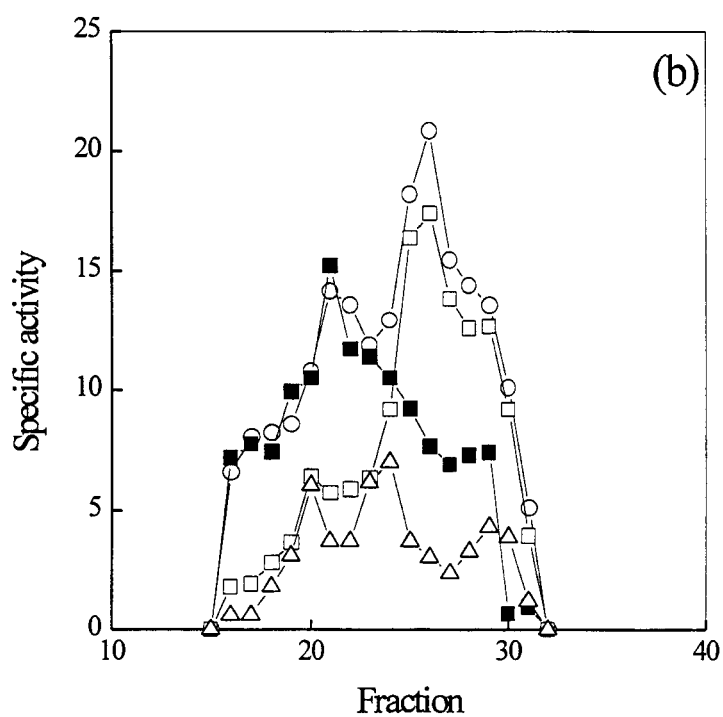
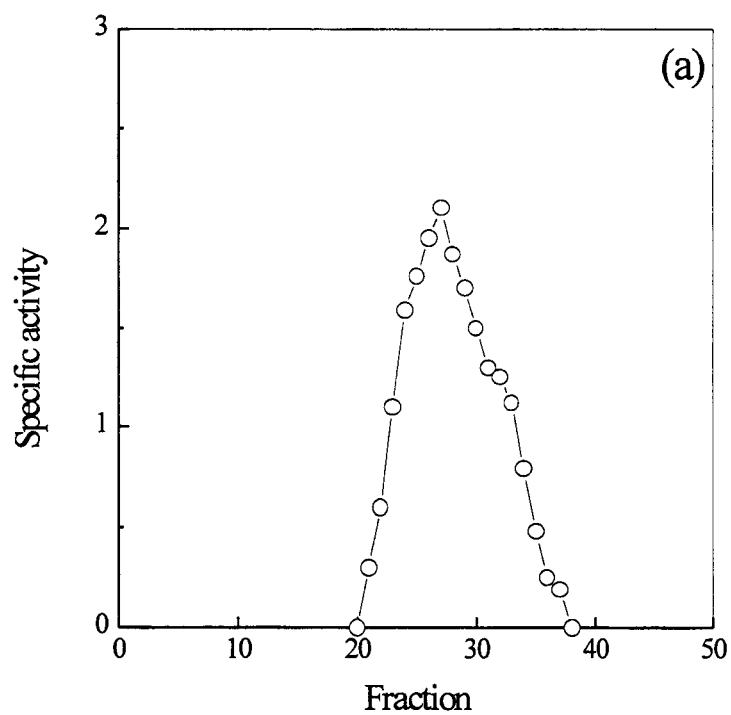


Figura 1. Perfil de eluição da AK em coluna de FFQ-Sepharose.

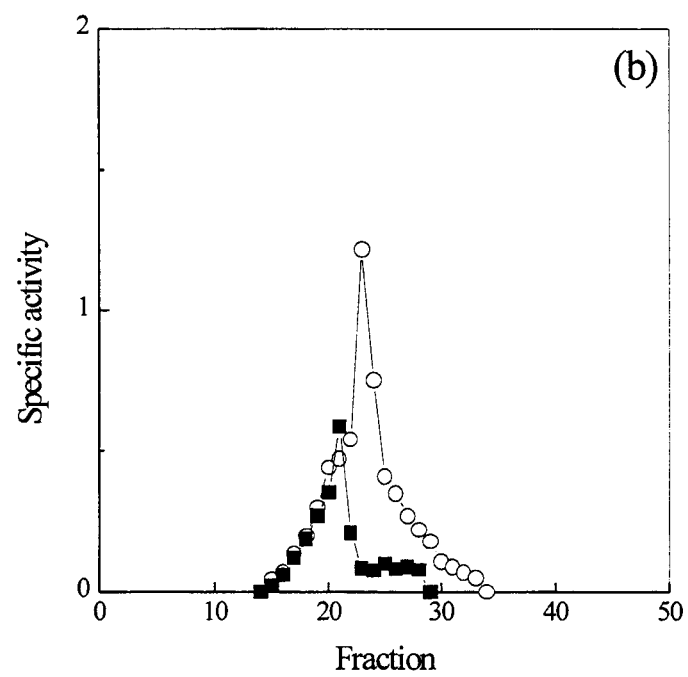
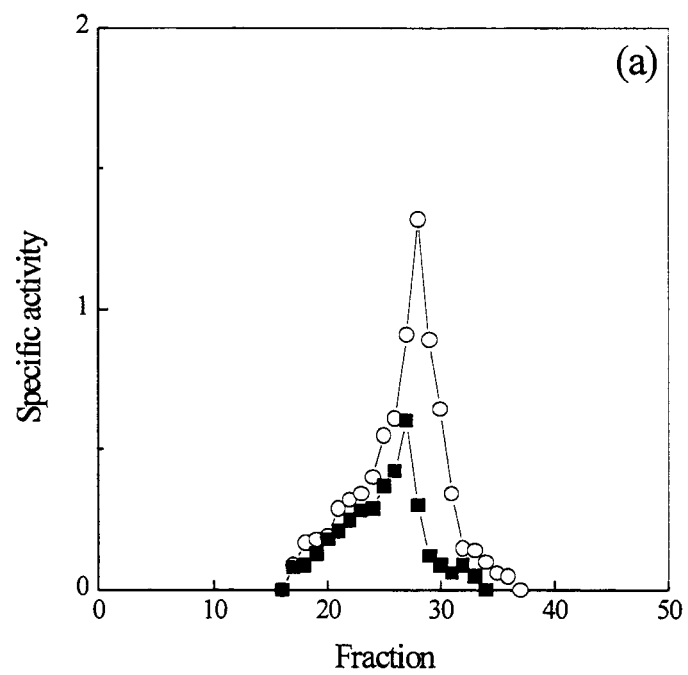


Figura 2. Perfil de eluição de HSDH em coluna de FFQ-Sepharose.

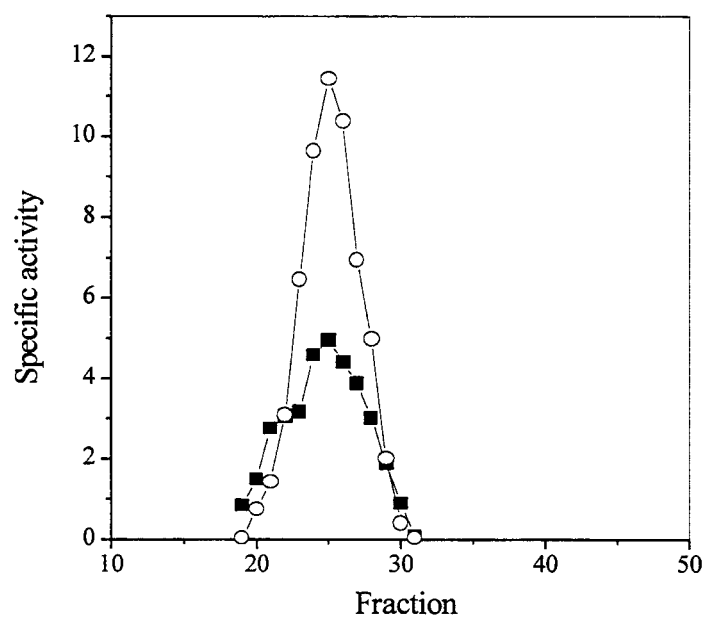
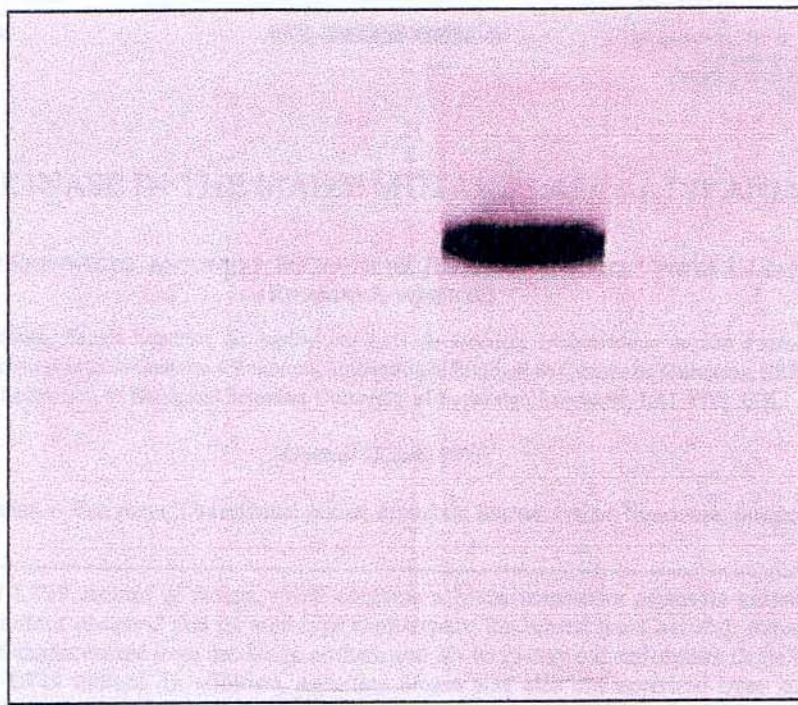
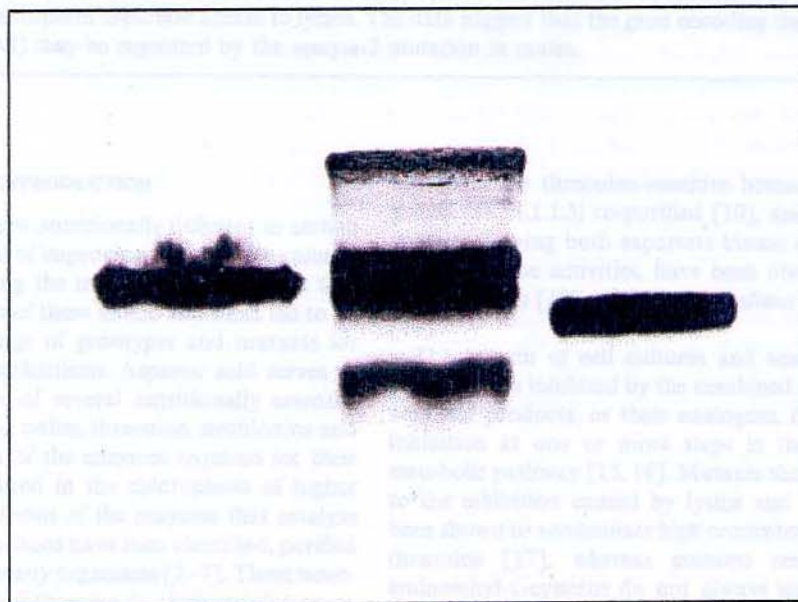


Figura 3. Perfil de eluição da LOR/SDH em coluna de FFQ-Sepharose.



Pista a b

Figura 4. Coloração para atividade de SDH.



Pista a b c

Figura 5. Coloração para atividade de SDH em gel não desnaturante. Pista: a) milho; b) arroz; c) Coix.



ASPARTATE KINASE IN THE MAIZE MUTANTS *ASK1-LT19* AND *OPAQUE-2*

KATHERY BRENNECKE, ANTONIO J. SOUZA NETO, JUVERLANDE LUGLI,* PETER J. LEA†‡ and
 RICARDO A. AZEVEDO

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, CEP 13400-970, Brazil; *Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, CEP 13081-970, Brazil;

†Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster, LA1 4YQ, U.K.

(Received 22 June 1995)

Key Word Index—*Zea mays*, Gramineae; maize; aspartate kinase; lysine; threonine; mutants.

Abstract—The *Ask1-LT19* mutant of maize, which contains a lysine insensitive aspartate kinase was repeatedly backcrossed to the mutant *opaque-2* and its wild type counterpart, the inbred line Cat100-1. Aspartate kinase was partially purified and characterized from seedlings, anthers and 20- to 25-day old endosperm tissue isolated from the wild type and *Ask1-LT19* mutant. In addition, aspartate kinase was also characterized from 20- to 25-day old endosperms isolated from the *opaque-2* mutant and the double mutant *Ask1-LT19/opaque-2*. No major variation was detected in the sensitivity of aspartate kinase to feedback inhibition by threonine in the three tissues of all the genotypes tested. On the other hand, there was clear evidence of a reduction in sensitivity of aspartate kinase to inhibition by lysine, when the wild type was compared with the *Ask1-LT19* mutant. The reductions in lysine sensitivity in the *Ask1-LT19* seedlings, anthers and endosperm were 37, 41 and 25%, respectively. When the *opaque-2* mutant was compared with the double mutant *Ask1-LT19/opaque-2*, there was a 54% reduction in the sensitivity of the double mutant endosperm aspartate kinase to lysine. The data suggest that the gene encoding the lysine-sensitive aspartate kinase (*Ask1*) may be regulated by the *opaque-2* mutation in maize.

INTRODUCTION

The seeds of cereals are nutritionally deficient in certain amino acids. The goal of improving the nutritive value of cereals and elucidating the molecular mechanisms that regulate the synthesis of these amino acids has led to an examination of a range of genotypes and mutants for altered regulatory mechanisms. Aspartic acid serves as a common precursor of several nutritionally essential amino acids, including lysine, threonine, methionine and isoleucine, with most of the enzymes required for their synthesis being localized in the chloroplasts of higher plants [1]. Multiple forms of the enzymes that catalyse identical chemical reactions have been identified, purified and characterized in many organisms [2-7]. These isoenzymes, which exhibit differences in their regulatory or catalytic properties, are of particular interest due to their potential involvement in the regulation of specific pathways. Aspartate kinase (EC 2.7.2.4) is the first enzyme of the aspartic acid metabolic pathway. Different isoenzymic forms of the enzyme showing inhibition by lysine, threonine and lysine plus *S*-adenosylmethionine have been identified in higher plants [4, 6-9]. In maize cell cultures, the threonine-sensitive aspartate kinase isoen-

zyme and the threonine-sensitive homoserine dehydrogenase (EC 1.1.1.3) co-purified [10], and a bifunctional protein showing both aspartate kinase and homoserine dehydrogenase activities, have been observed in carrot [11], soybean [12], *Arabidopsis thaliana* [13] and maize [14].

The growth of cell cultures and seedlings of many plants can be inhibited by the combined action of amino acid end products, or their analogues, due to feedback inhibition at one or more steps in the aspartic acid metabolic pathway [15, 16]. Mutants showing resistance to the inhibition caused by lysine and threonine have been shown to accumulate high concentrations of soluble threonine [17], whereas mutants resistant to *S*-2-aminoethyl-L-cysteine do not always lead to the overproduction of lysine [16, 18]. In barley, lysine plus threonine resistant mutants, contained altered forms of aspartate kinase isoenzymes, that were less sensitive to lysine feedback inhibition [19, 20]. In *Nicotiana sylvestris*, one lysine plus threonine-resistant mutant exhibited overproduction of soluble threonine in leaves and seeds associated with an aspartate kinase less sensitive to feedback inhibition by lysine [21]. In maize mutants resistant to lysine plus threonine inhibition [17, 22], isoenzymes of aspartate kinase extracted from ears and cell cultures have been shown to be altered in their sensitivity to lysine [23]. The maize mutant used in this study was originally

‡Author to whom correspondence should be addressed.

designated as *Ltr*1* [15, 17]. It has since been renamed as *Ask1*-LT19 and has been shown to contain a lysine-insensitive aspartate kinase due to a mutation in the *Ask1* gene [23]. The *Ask1* gene, which is the structural gene for one of the aspartate kinase isoenzymes sensitive to lysine in maize, has been mapped on the short arm of chromosome 7 at 10.6 centimorgans from the *opaque-2* gene and shown to be regulated by the *opaque-2* gene, when soluble and total amino acids were analysed [24]. Furthermore, it was observed that the *Ask1*-LT19 mutation intensified the effects of the *opaque-2* mutation on storage protein synthesis in maize endosperm [24].

The *opaque-2* mutation is regulated by a well characterized endosperm gene, which in its recessive form (*o2o2*) reduced the zein content of the endosperm by up to 70% [25, 26]. The reduction of zein synthesis in the *opaque-2* endosperm caused an accumulation of the soluble protein fraction including albumins, globulins, glutelins and soluble amino acids, which led to an increase in the total level of lysine [27, 28]. Furthermore, the activity of lysine-ketoglutarate reductase, the first enzyme in the catabolism of lysine, was greatly reduced in activity in the endosperm tissue of *opaque-2* [29, 30] and may have been under the control of the *opaque-2* gene. Therefore, we have used the *opaque-2* mutant to examine the effect of combination with the *Ask1*-LT19 mutant on the regulation of aspartate kinase activity.

In the present paper, we have determined the distribution of aspartate kinase activity during endosperm development. The enzyme has been partially purified and the feedback regulation by lysine and threonine examined in seedlings, anthers and endosperms of wild type (*Ask1Ask1/O2O2*), *Ask1*-LT19 (*ASK1ASK1/O2O2*), *opaque-2* (*Ask1Ask1/o2o2*) single mutants and the double mutant *Ask1*-LT19/*opaque-2* (*ASK1ASK1/o2o2*).

RESULTS

Aspartate kinase was extracted from developing seeds, and a peak of maximum activity was detected *ca* 20–25 days after pollination for the inbred line Cat100-1. Both threonine and lysine alone, or in combination, inhibited the activity of the enzyme, with lysine showing the highest inhibitory action (Fig. 1). Developing seeds, 22 days after pollination, were selected for aspartate kinase extraction for the genotypes tested, since the activity was at the highest level. Aspartate kinase activity was also determined in endosperm and scutellum separately, where the activity detected in the scutellum was 90% higher than that observed in endosperm (Table 1). The levels of inhibition of aspartate kinase activity caused by threonine and lysine were slightly different for each tissue. The inhibition by threonine was higher in the scutellum (32%), than in endosperm (21%), while lysine inhibition was higher in the endosperm (53%) than in the scutellum (47%).

The extraction of soluble amino acids from anther spikelets and their identification by TLC, confirmed the presence of the *Ask1*-LT19 mutation in the homozygous dominant form (*ASK1ASK1*, which accumulates

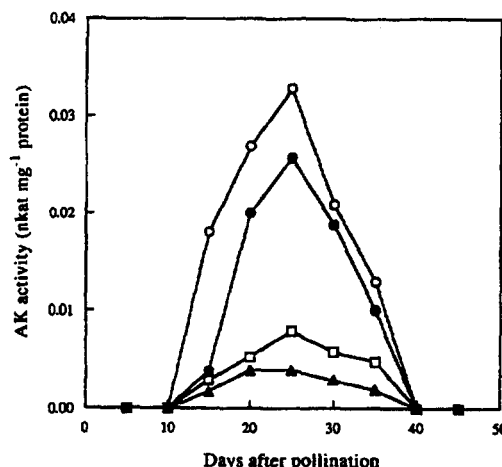


Fig. 1. Distribution of aspartate kinase activity during the development of maize endosperm. Aspartate kinase activity (○), aspartate kinase activity in the presence of 5 mM lysine (□), 5 mM threonine (●) and 5 mM lysine plus 5 mM threonine (▲).

threonine and contains a lysine-insensitive aspartate kinase), and recessive form (*Ask1Ask1*, which does not accumulate threonine and contains a lysine-sensitive aspartate kinase). The single mutant *Ask1*-LT19 (*ASK1ASK1/O2O2*) accumulates threonine and has a normal endosperm. The wild type (*Ask1Ask1/O2O2*) does not accumulate threonine and has a normal endosperm. The double mutant *Ask1*-LT19/*opaque-2* (*ASK1ASK1/o2o2*) accumulates threonine and has an *opaque-2* endosperm. The single mutant *opaque-2* (*Ask1Ask1/o2o2*) does not accumulate threonine and has an *opaque-2* endosperm.

Table 2 shows the results obtained in seedlings when aspartate kinase activity was determined in the wild type and in the *Ask1*-LT19 mutant. The activity of aspartate kinase was only slightly higher in the single mutant than in the wild type seedlings, but variation in the inhibition caused by lysine was observed. Lysine (5 mM) caused a 65% inhibition of aspartate kinase activity in the wild type, while the same concentration of lysine only inhibited aspartate kinase activity by 41% in the *Ask1*-LT19 mutant. Threonine, on the other hand, did not show any variation, causing identical levels of inhibition of aspartate kinase activity in the two genotypes tested. The combined action of lysine and threonine showed a clear additive effect of inhibition on aspartate kinase activity. In the *Ask1*-LT19 mutant, the addition of lysine and threonine together did not produce as strong an inhibition of aspartate kinase activity as observed for the wild type.

The results obtained for aspartate kinase isolated from anthers (Table 3) were very similar to those obtained for aspartate kinase extracted from seedlings. However, the specific activity of aspartate kinase was lower in anthers than in seedlings. Aspartate kinase extracted from endosperm tissue showed different pattern of inhibition by lysine and threonine (Table 4). In the endosperm tissue,

Table 1. The effect of lysine and threonine on aspartate kinase activity extracted from wild type maize (Cat100-1)

Treatment	Tissue			
	Endosperm		Scutellum	
	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)
Control	0.028	—	0.053	—
+ 5 mM threonine	0.022	21	0.036	32
+ 5 mM lysine	0.013	53	0.028	47
+ 5 mM lysine + 5 mM threonine	0.009	86	0.010	81

*nkat mg⁻¹ protein.Table 2. The effect of lysine and threonine on aspartate kinase activity isolated from seedlings of wild type maize (Cat100-1) and the *Ask1*-LT19 mutant

Treatment	Genotypes			
	Wild type <i>Ask1 Ask1/O2O2</i>		<i>Ask1</i> -LT19 <i>ASK1ASK1/O2O2</i>	
	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)
Control	0.0141	—	0.0153	—
+ 5 mM threonine	0.0097	31	0.0109	29
+ 5 mM lysine	0.0047	65	0.0090	41
+ 5 mM lysine + 5 mM threonine	0.0015	89	0.0067	56

*nkat mg⁻¹ protein.Table 3. The effect of lysine and threonine on aspartate kinase activity isolated from anthers of wild type maize (Cat100-1) and the *Ask1*-LT19 mutant

Treatment	Genotypes			
	Wild type <i>Ask1 Ask1/O2O2</i>		<i>Ask1</i> -LT19 <i>ASK1ASK1/O2O2</i>	
	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)
Control	0.0111	—	0.0124	—
+ 5 mM threonine	0.0074	33	0.0087	30
+ 5 mM lysine	0.0038	66	0.0075	39
+ 5 mM lysine + 5 mM threonine	0.0010	91	0.0050	60

*nkat mg⁻¹ protein.

threonine inhibition was reduced to *ca* 20%, which was lower than the inhibition observed in seedlings and anthers.

The inhibition by lysine, on the other hand, was reduced by 25% in the endosperm of the single mutant *Ask1*-LT19 in relation to the wild type and by 54% in the endosperm of the double mutant in relation to the single *opaque-2* mutant.

DISCUSSION

The extraction of high concentrations of soluble threonine from anther spikelets, identified by TLC separation, has proved to be a reliable indicator of the presence of the *Ask1*-LT19 mutation, since the overproduction of soluble threonine is the main effect of the altered aspartate kinase on amino acid metabolism [24].

Table 4. The effect of lysine and threonine on aspartate kinase activity isolated from the endosperm of wild type maize (Cat100-1), the *Ask1*-LT19 mutant, the *opaque-2* mutant and the double mutant

Treatment	Genotypes							
	Wild type <i>Ask1/Ask1/O2O2</i>		<i>Ask1</i> -LT19 <i>ASK1/ASK1/O2O2</i>		<i>Opaque-2</i> <i>Ask1/Ask1/o2o2</i>		Double mutant <i>ASK1/ASK1/o2o2</i>	
	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)	Activity*	Inhibition (%)
Control	0.0312	0	0.0331	0	0.0265	—	0.0305	—
+ 5 mM threonine	0.0247	21	0.0257	22	0.0239	10	0.0237	22
+ 5 mM lysine	0.0171	45	0.0219	34	0.0106	60	0.0220	28
+ 5 mM threonine	0.0091	71	0.0146	56	0.0074	72	0.0158	48

*nkat mg⁻¹ protein.

The results obtained in seedlings, anthers and endosperms showed that lysine was the major inhibitor of aspartate kinase activity and confirmed the results reported previously by Dotson *et al.* [23], who analysed the effect of two mutations, in the *Ask1* and *Ask2* genes, on aspartate kinase isolated and purified from immature maize ears. Dotson *et al.* [23] analysed the *Ask1*-LT19 and *Ask2*-LT20 mutations in the heterozygous form, which made analysis difficult, since lysine-sensitive and insensitive forms of aspartate kinase were present. Moreover, the genetic background and the tissue used were different, which might have altered the effect of the end product amino acids on enzyme activity. The reduced inhibitory effect of lysine on aspartate kinase activity confirmed that the *Ask1* gene encodes one of the isoenzymes of lysine-sensitive aspartate kinase in maize. Although Dotson *et al.* [23] were not able to identify a threonine-sensitive aspartate kinase, the data presented in this paper indicate that the inhibition caused by threonine was not altered in all tissues tested and was thus independent of the presence of a mutation in the *Ask1* gene. Other genes must, therefore, be responsible for the threonine-sensitive aspartate kinase in maize.

The additive effect on the inhibition of aspartate kinase by lysine and threonine confirmed the results obtained in previous reports for maize aspartate kinase [7, 10]. The reduced inhibition by lysine and threonine observed in the mutant *Ask1*-LT19 was due to a reduced sensitivity of the lysine-sensitive aspartate kinase. Of particular interest is the extent of the reduced inhibitory effect of lysine in the double mutant (*ASK1/ASK1/o2o2*). This result indicates that the lysine-sensitive aspartate kinase isoenzyme coded by the *Ask1* gene may be regulated by the *opaque-2* gene. This suggestion is also supported by the effect of lysine on aspartate kinase from the endosperm of the single mutant *Ask1*-LT19 (*ASK1/ASK1/O2O2*), in which the reduction of lysine inhibition with the introduction of the mutated *Ask1* gene was not as strong (Table 4). These results support, at the enzyme level, the interaction between the *Ask1* and *opaque-2* genes that was previously proposed, based on the regulatory effect of the *Ask1*-LT19 mutation by the *opaque-2* mutation, when amino acids (soluble threonine and total soluble amino acids) and storage protein were analysed [24]. Moreover, the *Ask1* gene was mapped on chromosome 7 linked to the *opaque-2* gene and possibly linked to zein polypeptides, which are regulated by the *opaque-2* gene [24].

EXPERIMENTAL

Plant material. The maize inbred line Cat100-1 of the maize collection of the Departamento de Genética, Universidade Estadual de Campinas and the *opaque-2* mutant were donated by Dr P. Arruda. The *Ask1*-LT19 mutant (previously designated *Ltr*1*) introduced in the inbred line Cat100-1 was kindly donated by Dr K. A. Hibberd.

Identification of aspartate kinase activity during seed development Cat100-1 maize plants were self-pollinated

and maize ears collected every 5 days and used for aspartate kinase extraction. Endosperm and scutellum tissues were sepd and both used for aspartate kinase extraction.

Identification of the *Ask1* gene. The *Ask1*-LT19 mutant was backcrossed to near isogenic condition to the maize mutant *opaque-2* of the inbred line Cat100-1 and its wild type counterpart. Single and double mutants were selected on the basis of endosperm phenotype and accumulation of soluble threonine as detected by TLC. Seeds from maize ears containing the two single mutations, the double mutant and the wild type were planted and grown to maturity. Prior to pollination, the presence of the *Ask1*-LT19 mutation was detected by the overproduction of soluble threonine in anther spikelets.

Soluble threonine extraction and TLC. Anther spikelets were collected from each plant before anthesis and used for threonine extraction. One anther spikelet from each plant was homogenized with 30 μ l distilled-deionized H₂O in 0.5 ml microfuge tubes using a glass rod. The homogenates were centrifuged in a microcentrifuge at 16000 rpm and the supernatant used for amino acid analysis. Aliquots of 5 μ l were applied to cellulose TLC plates. The chromatograms were developed in *n*-BuOH-Me₂CO-NH₄OH (33%, w/v)-H₂O (5:5:2.5:1) for 90 min. After sepn of the amino acids, the plates were dried for 3 days at room temp. and sprayed with 0.2% (w/v) ninhydrin in Me₂CO. Threonine (1%, w/v) soln in H₂O was used as a standard to identify the amino acid. Anthers and immature endosperms (30 days after pollination) for each genotype were harvested and kept at -80° for further analysis. Mature seeds were planted and grown at 24° in a 16:8 hr light:dark period for 10 days and watered at 48 hr intervals. At the end of this period (seeds normally showing 5 leaves), leaves were harvested and fr. wt recorded. The leaf samples were immediately frozen in liquid N₂ and used for aspartate kinase extraction.

Enzyme extraction. All procedures were carried out at 4° unless state otherwise. Aspartate kinase was extracted and partially purified from 10 g tissue for seedlings, anthers, immature endosperms and scutellum. Samples were ground with liquid N₂ in an ice-cold pestle and mortar with 5:1 (v/w) extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4) with 50 mM KCl, 2 mM lysine, 2 mM threonine, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 15% (v/v) glycerol and 5% (v/w) insoluble PVP]. The extract was filtered through several layers of miracloth (Calbiochem) and the filtrate was centrifuged at 10000 rpm for 30 min. (NH₄)₂SO₄ (35–60% satn) was added to the supernatant and the protein pellet collected by centrifugation at 16000 rpm for 30 min. Pellets were resuspended and desalted on Sephadex G25 columns (1.8 $\times$ 10 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 50 mM KCl, 0.1 mM lysine, 0.1 mM threonine and 10% (v/v) glycerol.

Aspartate kinase assay. The hydroxamate assay described in ref. [31] was used with some modifications. The assay was performed in 1.5 ml microfuge tubes and the assay mixt. comprised: 100 μ l 250 mM aspartic acid

(pH 7.4); 100 μ l 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM DTT and 20% (v/v) glycerol; 50 μ l 125 mM MgSO₄; 50 μ l 200 mM ATP (pH 7.4); 50 μ l 4 M hydroxylamine (pH 7.4), and 50 μ l H₂O. The assay was started by the addition of 100 μ l enzyme, incubated at 35° for 1 hr and terminated by addition of 500 μ l of 0.67 M FeCl₃ containing 0.37 M HCl and 20% (w/v) TCA.

The microfuge tubes were centrifuged for 5 min at 16000 rpm to remove pptd protein and the *A* of the supernatant read at 505 nm. The extinction coefficient for DL-aspartic acid hydroxamate at 505 nm was 750 cm⁻¹ M⁻¹. The assay solns were read against a blank containing all the components minus the substrate. Lysine (10 mM) and threonine (10 mM) were added substituting the H₂O component of the assay.

Protein determination. Protein was estimated by the dye-binding method of ref. [32] supplied as a kit by Bio-Rad. BSA was used as standard.

Acknowledgements—This research was supported by grant No. 92/4892-5 from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). R.A.A. received Fellowship 300799/93-4 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). K.B. and A.J.S.N. received scholarships from FAPESP 94/1207-5 and 94/1208-1, respectively. We are indebted to Claire Pickerill for her strenuous efforts in typing this manuscript.

REFERENCES

1. Bryan, J. K. (1990) in *The Biochemistry of Plants* (Mifflin, B. J. and Lea, P. J., eds), Vol. 16, pp. 161–169. Academic Press, San Diego, CA.
2. Patte, J. C., Le-Bras, G. and Cohen, G. N. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 245.
3. Walter, T. J., Connelly, J. A., Gengenbach, B. G. and Wolf, F. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1349.
4. Bright, S. W. J., Mifflin, B. J. and Rognes, S. E. (1982) *Biochem. Genet.* **20**, 229.
5. Relton, J. M., Bonner, P. L. R., Wallsgrave, R. M. and Lea, P. J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 48.
6. Dotson, S. B., Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. (1989) *Plant Physiol.* **91**, 1602.
7. Azevedo, R. A., Blackwell, R. D., Smith, R. J. and Lea, P. J. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3725.
8. Davies, H. M. and Mifflin, B. J. (1978) *Plant Physiol.* **62**, 536.
9. Rognes, S. E., Lea, P. J. and Mifflin, B. J. (1980) *Nature* **287**, 357.
10. Azevedo, R. A., Smith, R. J. and Lea, P. J. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3731.
11. Weisemann, J. M. and Matthews, B. F. (1993) *Plant Mol. Biol.* **22**, 301.
12. Matthews, B. F., Weisemann, J. M., Lewin, K. M., Wadsworth, G. J. and Gebhardt, J. S. (1992) in *Bio-synthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants* (Singh, B. K., Flores, H. E. and Shannon, J. C., eds), pp. 294–295. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

13. Ghislain, M., Frankard, V., Vandenbossche, D., Mathews, B. F. and Jacobs, M. (1994) *Plant Mol. Biol.* **24**, 835.
14. Muehlbauer, G. J., Somers, D. A., Matthews, B. F. and Gengenbach, B. G. (1994) *Plant Physiol.* **106**, 1303.
15. Green, C. E. and Philips, R. L. (1974) *Crop Sci.* **14**, 827.
16. Azevedo, R. A. and Arruda, P. (1995) *J. Plant Physiol.* **145**, 321.
17. Hibberd, K. A. and Green, C. E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 559.
18. Negruțiu, I., Cattoir-Reynaerts, A., Verbruggen, I. and Jacobs, M. (1984) *Theor. Appl. Genet.* **68**, 11.
19. Arruda, P., Bright, S. W. J., Kueh, J. S. H., Lea, P. J. and Rognes, S. E. (1984) *Plant Physiol.* **76**, 442.
20. Lea, P. J., Blackwell, R. D. and Azevedo, R. A. (1992) in *Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology* (Shewry, P. R., ed.), pp. 181–208. CAB International, Oxford, U.K.
21. Frankard, V., Ghislain, M. and Jacobs, M. (1991) *Theor. Appl. Genet.* **82**, 273.
22. Diedrick, T. J., Frisch, D. A. and Gengenbach, B. G. (1990) *Theor. Appl. Genet.* **79**, 209.
23. Dotson, S. B., Frisch, D. A., Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. (1990) *Planta* **182**, 546.
24. Azevedo, R. A., Arana, J. L. and Arruda, P. (1990) *Plant Sci.* **70**, 81.
25. Mertz, E. T., Bates, L. C. and Nelson, O. E. (1964) *Science* **145**, 279.
26. Or, E., Boyer, S. K. and Larkins, B. A. (1993) *Plant Cell* **5**, 1599.
27. Sodek, L. and Wilson, C. M. (1971) *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1144.
28. Habben, J. E., Kirleis, A. W. and Larkins, B. A. (1993) *Plant Mol. Biol.* **23**, 825.
29. Arruda, P. and Silva, W. J. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2687.
30. Brochetto-Braga, M. R., Leite, A. and Arruda, P. (1992) *Plant Physiol.* **98**, 1139.
31. Bonner, P. L. R. and Lea, P. J. (1990) in *Enzymes of Primary Metabolism* (Lea, P. J. ed.), Vol. 3, pp. 297–313. Academic Press, London.
32. Bradford, M. M. (1976) *Analyt. Biochem.* **72**, 248.

Effects of calcium, *S*-adenosylmethionine, *S*-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes

Juvelande Lugli ^a, Salete A. Gaziola ^b, Ricardo A. Azevedo ^{b,*}

^a Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Cidade Universitária 'Zeferino Vaz', Campinas, CEP 13081-970, Brazil

^b Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Piracicaba, CEP 13400-970, S.P., Brazil

Received 25 March 1999; received in revised form 19 July 1999; accepted 27 August 1999

Abstract

The activities of two aspartate kinase (EC 2.7.2.4) isoenzymes that have been partially purified from developing rice seeds, were studied in the presence of calcium, calmodulin inhibitors, *S*-adenosylmethionine, *S*-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine, methionine, valine and increased salt concentrations. None of the compounds tested was able to produce any significant alteration in threonine-sensitive aspartate kinase activity. On the other hand, the activity of the lysine-sensitive aspartate kinase was slightly increased by calcium. The increase in activity was not observed when EGTA was added in combination with calcium. *S*-adenosylmethionine alone inhibited the activity by 12% and intensified the inhibition caused by lysine. *S*-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine also inhibited the activity of aspartate kinase, but not to the same extent of lysine. Methionine and valine stimulated slight increases in activity, whereas KCl up to 500 mM did not cause any change in aspartate kinase activity. These results with rice aspartate kinase indicate that lysine-sensitive aspartate kinase is also synergistically inhibited by *S*-adenosylmethionine, as observed for other plants species. Although some increase in aspartate kinase activity was observed in the presence of calcium, the magnitude of the alterations was not sufficient to indicate a regulatory role of calcium on aspartate kinase. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Aspartate kinase; Calcium; Lysine; *Oriza sativa* L.; *S*-adenosylmethionine; *S*-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine

1. Introduction

Aspartate kinase (AK), the first enzyme of the aspartic acid metabolic pathway, which leads to the synthesis of lysine, threonine, methionine and isoleucine, has been studied in several plant species [1]. The purification of AK has shown that at least two isoenzymes can be separated by ion exchange chromatography [2]. The predominant AK is the lysine feedback inhibited isoenzyme (AK-Lys) [1], whereas a threonine-sensitive isoenzyme (AK-Thr) represents the major isoform in a smaller number

of plant species [3–5]. Both AK isoenzymes have been characterized in detail in a range of plants [6–10]. The AK-Thr isoenzyme was shown to be part of a bifunctional protein with homoserine dehydrogenase (HSDH; EC 1.1.1.3) in maize [11–13], carrot [14] and rice [10]. In addition, the enzymes lysine 2-oxoglutarate reductase (LOR; EC 1.5.1.8) and saccharopine dehydrogenase (SDH; EC 1.5.1.9), which are involved in the metabolism of lysine, have also been shown to be bifunctional polypeptides [15,16].

Certain aspects of AK regulation by intermediates of the aspartate pathway as well as other compounds, have been studied in some plant species. The synergistic feedback inhibition of AK-Lys by *S*-adenosylmethionine (SAM) has been

Abbreviations: AEC, *S*-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine; AK, aspartate kinase; SAM, *S*-adenosylmethionine.

* Corresponding author. Fax: +55-19-433-6706.

E-mail address: raazeved@carpa.ciagri.usp.br (R.A. Azevedo)

reported in plants [6,17]. The *opaque-2* maize gene has been shown to influence the expression of AK-Lys in maize endosperm [18–20]. A regulatory role for calcium and calmodulin on AK activity isolated from spinach leaves has also been proposed [21], however such a mechanism was not observed in other plants species such as carrot [22] and maize [23].

In this paper we have tested two AK isoenzymes, AK-Lys and AK-Thr, isolated and purified from developing rice seeds [10], in the presence of calcium, EGTA, calmodulin inhibitors, *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC), SAM, methionine, valine and KCl.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The IAC-165 upland rice variety (*Oriza sativa* L.) donated by Dr Akihiko Ando (Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo) was used for the purification of AK isoenzymes.

2.2. Partial purification of AK

Rice plants were grown in the field of the Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, during the 1997–1998 summer season. Immature rice seeds (milky stage) were harvested directly into liquid nitrogen and used for enzyme extraction at 4°C. AK was extracted in 3 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer containing 200 mM KCl, 0.1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM L-lysine, 2 mM L-threonine, 10% (v/v) glycerol and 5% (w/v) PVPP (buffer A). The homogenate was filtered through gauze, centrifuged at $15000 \times g$ for 30 min to remove cell debris from the extract and the supernatant adjusted to 20% ammonium sulphate saturation by gently stirring for 30 min. The suspension was centrifuged at $15000 \times g$ for 30 min and the supernatant brought to 50% ammonium sulphate saturation by gently stirring for 30 min. Precipitated protein recovered by centrifugation at $15000 \times g$ for 30 min, was dissolved in a small volume of 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer con-

taining 1 mM DTT, 0.1 mM L-lysine, 0.1 mM L-threonine and 10% (v/v) glycerol (buffer B), and loaded to a Sephadex G25 column (2.6×30 cm) equilibrated in buffer B and run under gravity. The desalted sample was applied at a flow rate of 1 ml/min to a Fast Flow Q Sepharose column (2.6×15 cm) equilibrated in buffer B containing 100 mM KCl. A linear gradient from 100–350 mM (300 ml total volume; flow rate 1 ml/min) was applied and 4 ml samples collected and used for the determination of AK activity in the presence of 5 mM L-lysine, 5 mM L-threonine and control (without lysine or threonine). Two AK peaks that partially overlapped, as described by Teixeira et al. [10], were eluted and two fractions of AK activity (not in the overlapping area), one from the AK-Thr peak (first peak in the elution order) and the other from the AK-Lys peak (second peak in the elution order) were used for the analyses.

2.3. AK assay

The hydroxamate assay for AK activity was used, exactly as described by Teixeira et al. [10].

2.4. Effect of calcium, calmodulin inhibitors and KCl concentration on AK activity

AK-Lys and AK-Thr activities were determined in the presence of 1.6 mM calcium (CaCl_2), 1.6 mM EGTA, 1.6 mM calcium plus 1.6 mM EGTA, 2 μM calmidazolium and 50 $\mu\text{g/ml}$ compound 48/80. Varying concentrations of KCl (0, 100, 200, 300, 400 and 500 mM, adjusted to final concentration in the assay) were also tested on AK activity. Blanks with and without the compounds being tested were included. A negative control lacking the substrate (aspartic acid) was also assayed on each occasion.

2.5. Effect of methionine, valine, AEC and SAM on AK activity

AK-Thr activity was determined in the presence of 1–5 mM L-methionine, 1–5 mM L-valine, 1–5 mM AEC, 0.2–1 mM SAM and 1 mM SAM plus 5 mM L-threonine, while AK-Lys activity was determined in the presence of 1–5 mM L-methionine, 1–5 mM L-valine, 1–5 mM AEC, 0.2–1 mM SAM and 1 mM SAM plus 5 mM L-lysine.

2.6. Protein assay

The determination of protein concentration was carried out by the method of Bradford [24]. BSA was used as the standard.

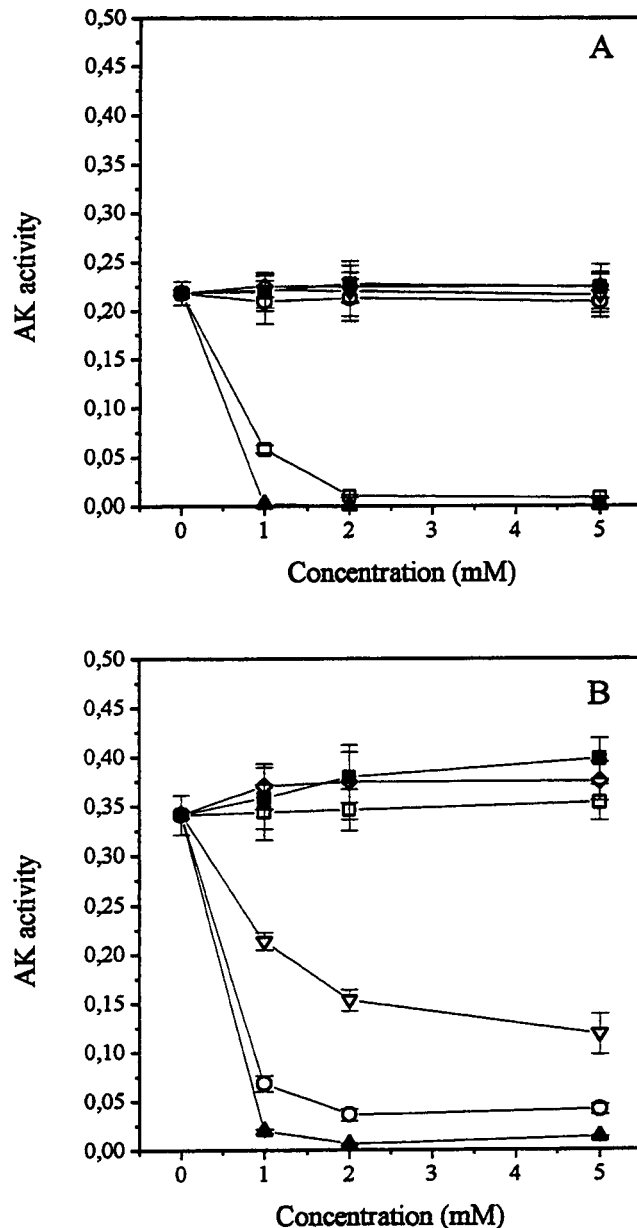


Fig. 1. Properties of rice seed AK separated by chromatography on Fast Flow Q-Sepharose. Two fractions, representing AK-Thr (A) and AK-Lys (B) were selected and tested separately in the presence of 1, 2 and 5 mM of lysine (○), threonine (□), lysine plus threonine (▲), AEC (▽), methionine (◇) and valine (■). AK specific activity is expressed in nkat/mg protein.

3. Results

Two peaks of rice AK activity were eluted from an anion exchange chromatography column and tested in the presence of lysine and threonine. The first peak in the elution order was strongly inhibited by threonine, while the second peak was inhibited by lysine. The fraction of AK-Thr (peak 1) selected was inhibited by 73, 95 and 96% by 1, 2 and 5 mM threonine, respectively, and 4% by 5 mM lysine (Fig. 1A), while the fraction of AK-Lys (peak 2) selected was inhibited by 80, 90 and 88% by 1, 2 and 5 mM lysine, respectively, and activated by 3.5% by 5 mM threonine (Fig. 1B).

The addition of AEC from 1 to 5 mM did not affect AK-Thr (Fig. 1A), but on the other hand was able to inhibit AK-Lys activity by 65.4% (5 mM AEC), although to a lesser extent than lysine at the same concentration (88%) (Fig. 1B).

Methionine and valine had a similar effect on both isoenzymes of AK. Small increases in AK-Thr activity were obtained with methionine and valine at all concentrations tested (3.2 and 2.7% at 5 mM, respectively) (Fig. 1A), while higher levels of AK-Lys activity were observed in response to the addition of increasing concentrations of methionine and valine (10 and 16.7% at 5 mM, respectively) (Fig. 1B).

The addition of SAM to the AK assay did not alter AK-Thr activity or produce any synergistic or additive effect when added in combination with 5 mM threonine (Fig. 2A). However, SAM alone produced an inhibition of the AK-Lys isoenzyme by around 12% at all concentrations tested (0.2, 0.5 and 1 mM), whereas when added to the assay mixture at 1 mM in combination with 5 mM lysine the inhibition of the AK-Lys isoenzyme was intensified (94.7%) (Fig. 2B), when compared to the inhibition caused by lysine alone at 5 mM (88%) (Fig. 1B).

Salt concentration has been shown to stimulate LOR activity in maize endosperm [16]. The effect of salt concentration on AK activity was also tested. Increasing concentrations of KCl in the assay mixture did not affect either isoenzyme of AK (Fig. 3).

When AK isoenzymes were assayed in the presence of 1.6 mM EGTA, the AK-Thr activity was unaffected (Fig. 4A), while AK-Lys activity was slightly reduced (2.3%) (Fig. 4B). The addition of 1.6 mM calcium and 1.6 mM EGTA together did

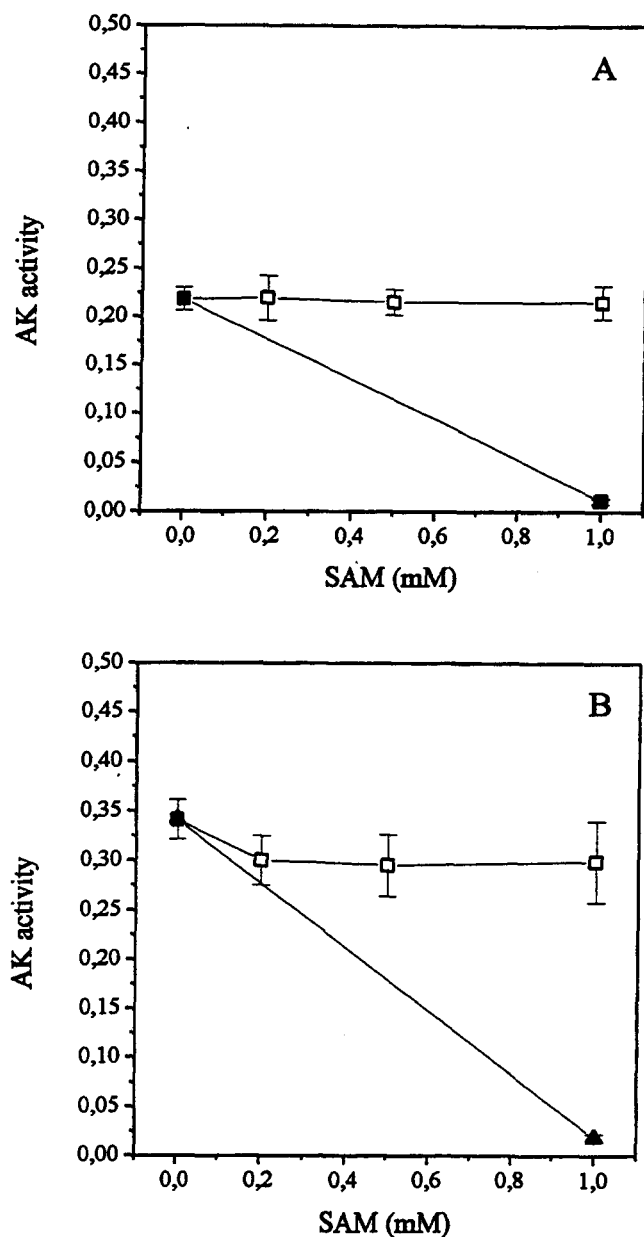


Fig. 2. Properties of rice seed AK separated by chromatography on Fast Flow Q-Sepharose. Two fractions, representing AK-Thr (A) and AK-Lys (B) were selected and tested separately in the presence of 0.2, 0.5 and 1 mM of SAM ($\square$), 1 mM SAM plus 5 mM threonine ($\blacksquare$) in (A), and 1 mM SAM plus 5 mM lysine ($\blacktriangle$) in (B). AK specific activity is expressed in nkat/mg protein.

not produce any significant variation in AK-Thr activity (Fig. 4A), while an inhibition of 3.8% of AK-Lys was observed (Fig. 4B). The addition of 1.6 mM calcium alone led to an increase of 2.3% on the AK-Thr activity (Fig. 4A), however, the same concentration of calcium produced a greater increase in AK-Lys activity (8.2%) (Fig. 4B). The

addition of two calmodulin inhibitors, calmidazolium and compound 48/50 did not result in any significant alteration in the activity of either AK isoenzyme (Fig. 4).

4. Discussion

In rice two AK isoenzymes have been recently isolated, partially purified and some regulatory properties studied [10]. These two isoenzymes have been characterized as sensitive to threonine (AK-Thr) and sensitive to lysine inhibition (AK-Lys). The effect produced by several different compounds of the aspartic acid metabolic pathway, as well as many others not directly involved in the pathway, have been investigated [1]. In the case of rice AK, very little is known.

Amino acids and their analogues have been used as selective agents to select regulatory mutants of the aspartate pathway [25–34]. AEC, which can be incorporated into proteins in place of lysine [25], has been used to select mutants with altered AK and/or dihydrodipicolinate synthase (DHDPS, EC 4.2.1.52), however most of the mutants have been poorly characterized in relation to the regulatory properties of AK or DHDPS [27,29–31]. The fractions taken from the two AK peaks eluted from a Fast Flow Q-Sepharose

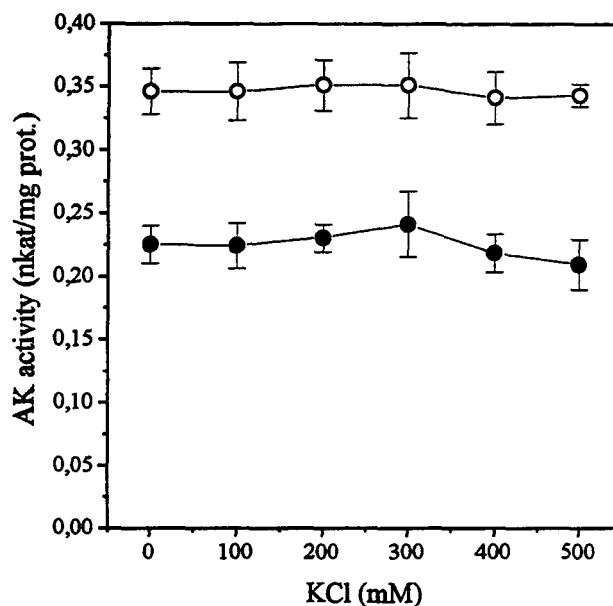


Fig. 3. Effect of KCl on the activity of rice seed AK. AK-Thr ($\bullet$) and AK-Lys ($\circ$) separated by Fast Flow Q-Sepharose chromatography.

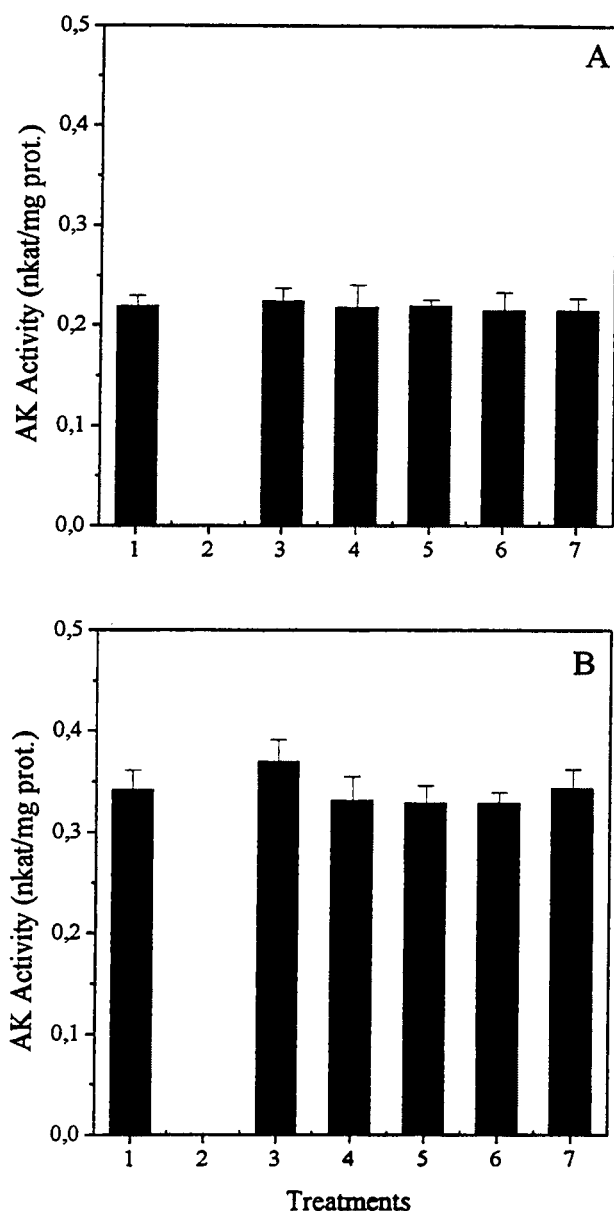


Fig. 4. The effect of calcium antagonists on rice seed AK separated by chromatography on Fast Flow Q-Sepharose. Two fractions, representing AK-Thr (A) and AK-Lys (B) were selected and tested separately. Control (1), control minus aspartic acid (2), plus 1.6 mM calcium (3), plus 1.6 mM EGTA (4), plus 1.6 mM EGTA plus calcium (5), plus 2 μ M calmidazolium (6), plus 50 μ g/ml compound 48/80 (7).

column were characterized as AK-Thr and AK-Lys, based on the inhibitory effects of threonine and lysine (Fig. 1). The results clearly showed that the AK-Thr was not affected by AEC, whereas the AK-Lys isoenzyme was inhibited by AEC, but not to the same extent as obtained with any concentration of lysine tested. This result is interesting, since AEC can inhibit growth, but at much lower con-

centrations than that needed for lysine [27]. AEC can inhibit DHDPS activity [34], a process that requires higher concentrations of lysine, and can substitute to a limited extent for lysine as a substrate for rice lysine 2-oxoglutarate reductase (LOR, EC 1.5.1.8) (unpublished results).

Methionine, another amino acid derived from aspartic acid, did not exhibit any effect on rice AK-Thr activity, with the same result also observed for valine, both being amino acids tested at various concentrations (Fig. 1A). The stimulation of AK-Lys activity by methionine and valine (Fig. 1B) is difficult to explain. The effect of methionine on AK activity has been studied in some plants [1], however the results varied considerably. Henke and Wahnbaeck [35] observed that methionine did not inhibit AK activity from maize endosperm, confirming the results observed previously by Bryan et al. [36] for the enzyme extracted from maize seedlings. In barley, Shewry and Mifflin [37] first proposed a concerted inhibition of AK by lysine and methionine, whereas in pea an inhibition of 10% of AK activity was observed [38]. Yamada et al. [39] reported that AK isolated from carrot cell cultures was not inhibited by methionine alone or in combination with lysine. It appears that the effect of methionine on AK activity is dependent upon plant species and plant tissue, and the present data does not establish a pattern. The increase in activity caused by valine (Fig. 1) confirms the previous report by Bryan et al. [36], who observed a stimulation of maize AK activity. The significance of these results are also difficult to envisage, since valine is not directly involved in the metabolism of the aspartic acid pathway.

The role of SAM in regulating aspartic acid pathway enzymes has been investigated in some plant species [6,17,40,41]. Rognes et al. [17] reported that SAM exhibited a synergistic effect on lysine inhibition of AK activity from barley and also when tested alone. In maize Azevedo et al. [6] observed that SAM alone could slightly inhibit AK-Lys and in a synergistic way with lysine. In *Arabidopsis* the inhibition of AK activity by lysine was enhanced by low concentrations of SAM, and although SAM did not exhibit any effect on AK activity alone at low concentrations, at concentrations higher than 0.4 mM, SAM stimulated AK activity [41]. Previously the stimulatory effect of SAM on the activity of an enzyme of the aspartic acid metabolic pathway has only been observed

for threonine synthase (TS; EC 4.2.99.2) [40,42]. However, the synergistic inhibitory effect of SAM with lysine on AK activity has been a common feature in plants [6,17,26,43]. The results observed for rice AK isoenzymes (Fig. 2) are consistent with the previous data obtained for maize [6], suggesting a high similarity between maize and rice AK isoenzymes.

The modulation of AK activity by calcium and calmodulin inhibitors have been previously investigated in spinach [21], carrot [22], maize [23], barley [44] and chickpea [45]. Sane et al. [21] suggested that calcium and calmodulin could modulate AK activity from spinach leaves. In another report, Kochhar et al. [46] proposed that calmodulin was a subunit of the AK-Lys of spinach leaves. Recently, Kochhar et al. [47] reported that AK-Lys from spinach leaves exhibited an apparent molecular mass of 280 kDa, with 4 large (53 kDa) and 4 small (17 kDa) subunits. The large subunit activity could be stimulated more than 2-fold by the addition of the small subunit, which was characterized as identical to calmodulin [47]. These results observed in spinach do not agree with those from highly purified carrot [22] and maize [23] AK isoenzymes, in which no evidence was obtained to support a regulatory role for calmodulin or calcium in relation to AK activity. Kemper et al. [16] demonstrated that maize LOR, an enzyme involved in lysine catabolism, is modulated by calcium. LOR from tobacco has also been shown to be modulated by calcium and protein phosphorylation [48]. The results for rice AK isoenzymes clearly show that the isoenzyme AK-Thr is not regulated by calcium (Fig. 4). The rice AK-Lys showed a slight increase in activity in the presence of 1.6 mM calcium, which was lost by the addition of EGTA to the assay mixture. It is difficult to support a regulatory role for calcium on rice AK-Lys, when compared to the results reported for spinach AK, in which more than 2-fold stimulation was determined [47]. In maize, LOR activity was not altered by the addition of calcium alone, but the addition of EGTA led to a 3-fold reduction in enzyme activity [16]. LOR activity was completely restored when calcium was added to the assay medium, clearly demonstrating the importance of calcium [16]. Furthermore, the use of calmodulin inhibitors, prevented the calcium enhancement of LOR. For rice AK isoenzymes the use of calmodulin inhibitors did not produce any changes in activity (Fig. 4).

Kemper et al. [16] also demonstrated that LOR activity in maize seeds is activated by high salt concentrations. During the purification procedure of the rice AK isoenzymes an anion exchange chromatography column was used in which the concentration of KCl was increased considerably. This could, if one of the AK isoenzymes was activated by high ionic strength, lead to misinterpretation of the individual properties of the rice enzymes. In rice, AK isoenzymes did not exhibit alterations in activity (Fig. 3) indicating that they are not activated by salt concentration.

Acknowledgements

The authors would like to thank Professor Peter J. Lea for critically reading this manuscript. This work was financed by grants to RAA from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 96/7928-1 and 98/12461-0). R.A.A. received a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

References

- [1] R.A. Azevedo, P. Arruda, W.L. Turner, P.J. Lea, The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants, *Phytochemistry* 46 (1997) 395–419.
- [2] P.J. Lea, R.D. Blackwell, R.A. Azevedo, Analysis of barley metabolism using mutant genes, in: P.R. Shewry, (Ed.), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, CAB International, Wallingford, 1992, pp. 181–208.
- [3] J. Lugli, R.A. Azevedo, Isolation of aspartate kinase from *Coix lacryma-jobi*, *Maize Newsl.* 68 (1994) 77.
- [4] B.J. Matthews, J.M. Widholm, Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots, *Planta* 141 (1978) 315–323.
- [5] B.J. Matthews, J.M. Widholm, Enzyme expression in soybean cotyledon, callus and suspension culture, *Can. J. Bot.* 57 (1979) 299–304.
- [6] R.A. Azevedo, R.D. Blackwell, R.J. Smith, P.J. Lea, Three aspartate kinase isoenzymes from maize, *Phytochemistry* 31 (1992) 3725–3730.
- [7] S.W.J. Bright, B.J. Mifflin, S.E. Rognes, Threonine accumulation in the seed of a barley mutant with an altered aspartate kinase, *Biochem. Genet.* 20 (1982) 229–243.
- [8] S.B. Dotson, D.A. Somers, B.G. Gengenbach, Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell suspension cultures, *Plant Physiol.* 91 (1989) 1602–1608.

- [9] B. Heremans, M. Jacobs, A mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. With modified control of aspartate kinase by threonine, *Biochem. Genet.* 35 (1997) 139–153.
- [10] C.M.G. Teixeira, S.A. Gaziola, J. Lugli, R.A. Azevedo, Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds, *J. Plant Physiol.* 153 (1998) 281–289.
- [11] R.A. Azevedo, R.J. Smith, P.J. Lea, Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase, *Phytochemistry* 31 (1992) 3731–3734.
- [12] G.J. Muehlbauer, D.A. Somers, B.J. Matthews, B.G. Gengenbach, Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family, *Plant Physiol.* 106 (1994) 1303–1312.
- [13] M. Ghislain, V. Frankard, D. Van Den Bossche, B. Matthews, M. Jacobs, Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* 24 (1994) 835–851.
- [14] B.J. Wilson, A.C. Gray, B.F. Matthews, Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities, *Plant Physiol.* 97 (1991) 1323–1328.
- [15] S.A. Gaziola, C.M.G. Teixeira, J. Lugli, L. Sodek, R.A. Azevedo, The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide, *Eur. J. Biochem.* 247 (1997) 364–371.
- [16] E.L. Kemper, G. Cord-Neto, A.N. Capella, M. Gonçalves-Butruille, R.A. Azevedo, P. Arruda, Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize, *Eur. J. Biochem.* 253 (1998) 720–729.
- [17] S.E. Rognes, P.J. Lea, B.J. Mifflin, *S*-adenosylmethionine — a novel regulator of aspartate kinase, *Nature* 287 (1980) 357–359.
- [18] R.A. Azevedo, J.L. Arana, P. Arruda, Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*19* with *opaque-2* maize mutant, *Plant Sci.* 70 (1990) 81–90.
- [19] K. Brennecke, A.J. Souza-Neto, J. Lugli, P.J. Lea, R.A. Azevedo, Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *opaque-2*, *Phytochemistry* 41 (1996) 707–712.
- [20] S.A. Gaziola, E.S. Alessi, P.E.O. Guimarães, C. Dameraval, R.A. Azevedo, Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism, *J. Agric. Food. Chem.* 47 (1999) 1268–1275.
- [21] P.V. Sane, S. Kochhar, N. Kumar, V.K. Kochhar, Activation of plant aspartate kinase by calcium and calmodulin-like factors from plants, *FEBS Lett.* 175 (1984) 238–242.
- [22] P.L.R. Bonner, A.M. Hetherington, P.J. Lea, Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin, *FEBS Lett.* 195 (1986) 119–121.
- [23] R.A. Azevedo, R.J. Smith, P.J. Lea, Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin, *Phytochemistry* 31 (1992) 3735–3737.
- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [25] S.W.J. Bright, L.C. Featherstone, B.J. Mifflin, Lysine metabolism in a barley mutant resistant to *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine, *Planta* 146 (1979) 629–633.
- [26] V. Frankard, M. Ghislain, M. Jacobs, Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*, *Plant Physiol.* 99 (1992) 1285–1293.
- [27] R.A. Azevedo, P. Arruda, Dominant and recessive mutations conferring resistance to *S*-2-aminoethyl-L-cysteine in maize, *J. Plant Physiol.* 145 (1995) 321–326.
- [28] K.A. Hibberd, C.E. Green, Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 559–563.
- [29] B. Heremans, M. Jacobs, Selection of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mutants resistant to aspartate-derived amino acids and analogues, *Plant Sci.* 101 (1994) 151–162.
- [30] E. Jacobsen, Isolation, characterization and regeneration of an *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant cell line of dihaploid potato, *J. Plant Physiol.* 123 (1986) 307–315.
- [31] C.J. Boyes, I.K. Vasil, In vitro selection for tolerance to *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine and overproduction of lysine by embryogenic calli and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum, *Plant Sci.* 50 (1987) 195–203.
- [32] G.W. Schaeffer, F.T. Sharpe, Lysine in seed protein from *S*-aminoethyl-L-cysteine resistant anther derived tissue culture of rice, *In vitro* 17 (1981) 345–352.
- [33] R. Kumpaisal, T. Hashimoto, Y. Yamada, Uptake of lysine by wild type and *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant suspension-cultured cells of *Triticum aestivum*, *Plant Cell Physiol.* 30 (1989) 1099–1105.
- [34] I. Negrutiu, A. Cattoir-Reynaerts, I. Verbruggen, M. Jacobs, Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris* (Spegazzini and Comes), *Theor. Appl. Genet.* 68 (1984) 11–20.
- [35] R.R. Henke, R. Wahnbaeck, Aspartokinase from developing endosperm of maize, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70 (1977) 38–44.
- [36] P.A. Bryan, R.D. Cawley, C.E. Brunner, J.K. Bryan, Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41 (1970) 1211–1217.
- [37] P.R. Shewry, B.J. Mifflin, Properties and regulation of aspartate kinase from barley seedlings, *Plant Physiol.* 59 (1977) 69–73.
- [38] P.J. Lea, W.R. Mills, B.J. Mifflin, The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts, *FEBS Lett.* 98 (1979) 165–168.
- [39] Y. Yamada, R. Kumpaisal, T. Hashimoto, Y. Sugimoto, A. Suzuki, Growth and aspartate kinase activity in wheat cell suspension culture: effects of lysine analogs and aspartate-derived amino acids, *Plant Cell Physiol.* 27 (1986) 607–617.
- [40] J.T. Madison, J.F. Thompson, Threonine synthase from higher plants — stimulation by *S*-adenosylmethionine and inhibition by cysteine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 (1971) 684–691.
- [41] B. Heremans, M. Jacobs, Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an

- altered aspartate kinase, J. Plant Physiol. 146 (1995) 249–257.
- [42] G. Curien, D. Job, R. Douce, R. Dumas, Allosteric activation of *Arabidopsis* threonine synthase by *S*-adenosylmethionine, Biochemistry 37 (1998) 13212–13221.
- [43] J.M. Relton, P.L.R. Bonner, R.M. Wallsgrove, P.J. Lea, Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot suspension cultures, Biochim. Biophys. Acta 953 (1988) 48–60.
- [44] S.S. Rao, S. Kochhar, V.K. Kochhar, Analysis of photo-control of aspartate kinase in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings, Biochem. Mol. Biol. Int. 47 (1999) 347–360.
- [45] H. Dey, S. Guha-Mukherjee, Phytochrome activation of aspartate kinase in etiolated chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings, J. Plant Physiol. 154 (1999) 454–458.
- [46] S. Kochhar, V.K. Kochhar, P.V. Sane, Calmodulin is a subunit of lysine sensitive isoenzyme of aspartate kinase from plants, in: S.K. Sinha, P.V. Sane, S.C. Bhargava, P.K. Agrawal (Eds.), Proceedings of the International Congress of Plant Physiology, vol. 1, Society for Plant Physiology and Biochemistry, New Delhi, 1990, pp. 700–704.
- [47] S. Kochhar, V.K. Kochhar, P.V. Sane, Subunit structure of lysine sensitive aspartate kinase from spinach leaves, Biochem. Mol. Biol. Int. 44 (1998) 795–806.
- [48] H. Karchi, M. Daphna, S. Yaacov, G. Galili, The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seeds requires calcium and protein phosphorylation, Plant Cell 7 (1995) 1963–1970.

4. DISCUSSÃO

A via do ácido aspártico resulta na síntese de aminoácidos importantes para a dieta humana e dos animais. Desses, destacam-se a lisina, a treonina e a metionina. Estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de melhorar a quantidade desses aminoácidos nas sementes dos cereais. Deste modo, as enzimas da via do aspartato são fatores chave na manipulação de várias espécies de plantas, com a finalidade de aumentar o conteúdo nutricional dos principais cereais como: milho, arroz, *Coix*, cevada, entre outros.

Várias enzimas fazem parte do metabolismo e do catabolismo da via metabólica do ácido aspártico, entre elas, as principais são: Aspartato quinase (AK), Homoserina desidrogenase (HSDH), Lisina oxoglutarato redutase (LOR) e Sacaropina desidrogenase (SDH).

Nosso trabalho inicialmente foi realizado com o cereal *Coix*. Tal escolha se deve ao fato deste cereal ser muito semelhante ao milho, facilitando assim os estudos que envolve as principais enzimas da via do ácido aspártico.

Foram utilizados três tecidos para definir em qual deles a recuperação da atividade das enzimas era mais intensa. Os experimentos foram conduzidos com tecidos de folha, raiz e semente. Inicialmente trabalhou-se com as enzimas AK e HSDH cuja a atividade detectada nas sementes (endosperma) foi a que exibiu maior atividade específica, 66% maior do que nas folhas e 86% maior em relação à atividade recuperada em raízes, resultados semelhantes a outros cereais como arroz (Teixeira *et al.*, 1998) e milho (Azevedo *et al.*, 1992).

De todos os tecidos analisados, a semente demonstrou ser o melhor material biológico para recuperação e purificação das enzimas, fato já esperado uma vez que a semente é a fonte de armazenamento de nutrientes da planta.

O isolamento das enzimas foi feito em diferentes estágios de desenvolvimento da semente com a finalidade de se verificar em qual deles a recuperação das enzimas era maior. O resultado do experimento mostrou que atividade específica da AK pôde ser detectada em 3 dos 5 estágios analisados. Apenas os dois últimos estágios, 4 e 5, não apresentaram nenhuma atividade, sendo o estágio 2 o de maior atividade para todas as enzimas (Tab. II, pag. 42). Deste modo, este estágio foi usado para purificação e caracterização de todas as enzimas.

Os experimentos realizados para verificar a atividade da enzima HSDH, mostraram também que esta enzima pôde ser detectada em 3 dos 5 estágios analisados, sendo que, os

Os experimentos realizados para verificar a atividade da enzima HSDH, mostraram também que esta enzima pôde ser detectada em 3 dos 5 estágios analisados, sendo que, os estágios 1 e 2 apresentaram maior atividade (Tab. II pag. 42). Em termos percentuais esses dois estágios apresentaram maior atividade que os estágios 3 e 4, já que o efeito inibitório do aminoácido treonina (5mM) foi praticamente o mesmo nos dois estágios com baixa inibição. Os resultados apresentados nesses experimentos sugerem que a presença das enzimas AK e HSDH foi detectada no início do desenvolvimento da maturação da semente.

Essa variação na distribuição das enzimas depende do tecido e do estágio de crescimento da planta, onde as enzimas são predominantes em tecidos de crescimento rápido como o caso do endosperma (Lea *et al.*, 1979; Bryan, 1990). Por outro lado poderíamos esperar que a atividade nas folhas fosse também maior, uma vez que é conhecida a localização das duas enzimas nos cloroplastos das plantas (Bryan *et al.*, 1977). A baixa atividade encontrada nos dois tecidos de folha e raiz pode ser atribuída à alta taxa de oxidação ocorrida no processo de extração, levando em consideração a baixa atividade que normalmente ocorre nestes tecidos.

Para as enzimas LOR e SDH, as atividades foram recuperadas em sementes, ou seja, no endosperma. Isto tem sido demonstrado em publicações anteriores, onde a enzima LOR é muito ativa em endosperma de milho em desenvolvimento (Arruda *et al.*, 1983; Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996) e em arroz (Gaziola *et al.*, 1997). Por outro lado, Lima (1999) verificou atividade das enzimas LOR/SDH em outros tecidos de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Estudos relacionados com a enzima AK envolvendo linhagens mutantes de milho *opaco-2*, culminou na distribuição da atividade da enzima AK durante o desenvolvimento do endosperma da semente. A enzima foi parcialmente purificada e a regulação por retroinibição por lisina e treonina analisada em plântulas, anteras e endosperma do tipo selvagem e no mutante simples e duplo. (Tópico discutido mais adiante).

A atividade máxima da enzima AK nas sementes de milho foi atingida após 25 dias da polinização. Um alto efeito inibitório foi observado mediante tratamento com lisina nos três tecidos analisados, (plântula, anteras e endosperma) comparados com treonina ou em combinação.

A concentração de lisina no mutante *opaco-2* é alta, como consequência da baixa atividade, ou a reduzida quantidade das enzimas LOR/SDH (Kemper *et al.*, 1999). Um aspecto interessante ocorre em arroz onde o acúmulo de lisina normalmente é maior do

Assim, distintas isoenzimas mostraram retroinibição por lisina, treonina ou sinergisticamente por lisina e seus análogos.

Os tratamentos feitos com lisina e treonina indicaram a presença de duas isoenzimas reguladas de maneira independente por cada um desses aminoácidos, nas sementes e folhas. O padrão de inibição da atividade da AK com relação aos aminoácidos lisina e treonina mostra normalmente uma inibição por lisina em plantas. Em *Coix* isto, entretanto, isto não ocorreu, o aminoácido treonina inibiu a atividade da AK mais efetivamente do que a lisina (Tab. I e II, pag. 41 e 42). Em geral, a isoenzima sensível a lisina corresponde a 80% do total da atividade de AK em todas as plantas testadas até o momento (Azevedo *et al.*, 1997). No nosso caso, esse resultado foi surpreendente sendo confirmado quando foi feito a purificação parcial das isoenzimas demonstrando que AK sensível a treonina, teve uma alta atividade de HSDH, que também era sensível a treonina (Tab. II pag. 42). Estes dados sugerem que pode haver duas isoenzimas de HSDH presentes em *Coix*, uma sensível a treonina, e a outra resistente a inibição por treonina, que fazem parte de um polipeptídeo bifuncional. A grande maioria das plantas estudadas apresenta duas isoformas de HSDH, uma sensível e a outra resistente à inibição por treonina. Em arroz, o padrão de inibição obtido indica a existência de uma isoenzima sensível à inibição por treonina, que é capaz de inibir cerca de 40 a 60% da atividade específica. O restante da atividade não inibida por treonina foi atribuído a uma isoforma resistente (Teixeira *et al.*, 1998). Em milho a isoforma resistente representa cerca de 20% da atividade total da HSDH, e o restante fica por conta da isoforma sensível à treonina (Di Camelli e Bryan, 1975). É sabido que a maior parte da atividade de HSDH encontrada em plantas pode ser atribuída à isoforma sensível à treonina.

A precipitação de proteínas através de fracionamento com sais básicos ainda é o método mais comumente utilizado. A proteína precipitada, usualmente mantém suas características e sua atividade específica recuperada quando o "pellet" do precipitado é redissolvido. Além disso, esses sais podem estabilizar as proteínas contra desnaturação por agentes proteolíticos como também evitar contaminação bacteriana. O mais empregado para este fim é o sulfato de amônio sendo usado como primeiro passo de purificação e também para concentrar as proteínas durante esse processo. O fracionamento foi feito a partir do extrato bruto, inicialmente com duas seqüências de concentrações de sulfato de amônio para determinar a concentração ótima. Sendo assim, para *Coix* as enzimas AK/HSDH puderam ser melhor recuperadas do "pellet" precipitado na concentração que variou entre 40-60% de saturação, isto representou 87,8% da atividade total da enzima. A faixa de saturação que correspondeu ao fracionamento de 40-60% com sulfato de amônio foi usada

nos experimentos de purificação. Resultados semelhantes foram encontrados em cenoura (Relton *et al.*, 1988) e em milho (Azevedo *et al.*, 1992a).

A purificação parcial das enzimas ficou limitada ao processo de cromatografia de troca-iônica, com exceção da enzima LOR, a qual se mostrou bastante instável ao processo de precipitação com sulfato de amônio, mesmo após mudanças nos sistemas de tampões. Isto parece ser característico de *Coix*, uma vez que estas enzimas são bem purificadas em outras espécies de plantas (Azevedo *et al.*, 1997).

Os experimentos com cromatografia de troca iônica utilizando o processo de "step-wise" revelaram que toda a atividade da AK foi eluída da coluna na concentração de 200-300 mM de KCl, e nenhuma atividade foi encontrada nas demais concentrações. A coluna foi lavada com 1 M de KCl, de maneira que toda a proteína remanescente foi retirada e as frações testadas, não se encontrando nenhuma atividade da AK, confirmando que todas as unidades da enzima foram retiradas na eluição com 300 mM de KCl.

As amostras também foram eluídas em um gradiente linear de 0-500 mM KCl e dois picos sobrepostos de atividade de AK foram obtidos na mesma concentração de 200-300 mM de KCl. Na presença de lisina e treonina separadamente houve uma nítida indicação de que os dois picos corresponderiam a duas isoenzimas, uma sensível a treonina e a outra sensível a lisina (Fig. 1b pag. 43).

As frações que correspondiam ao pico da concentração de 300 mM de KCl foram inibidas por lisina e treonina. Estes resultados indicam a presença de duas formas de enzimas em *Coix*, uma sensível a inibição por treonina, a qual correspondeu a 50% do total da atividade sendo o principal componente, e a outra sensível a lisina, correspondendo aproximadamente 30% do total da atividade. Estes resultados diferem dos encontrados em outras plantas, onde a maioria das isoenzimas são sensíveis a lisina, representando assim o componente que ocorre em maior quantidade. Em outras plantas a atividade de AK foi eluída em torno de 200 mM de KCl (Azevedo *et al.*, 1992a).

Em outras espécies de plantas a atividade de AK inibida por lisina em geral é predominante, porém no caso de *Coix* a atividade de AK inibida por treonina foi expressiva indicando que nesta espécie de planta, a isoenzima de AK sensível a treonina é predominante. A confirmação destes resultados foi obtida após purificação parcial de HSDH da mesma coluna (Fig. 2a, pag. 44). A amostra do único pico de atividade de HSDH foi eluída de coluna de troca iônica na mesma concentração da isoenzima de AK (Fig. 2b, pag. 44), contudo quando cada fração foi analisada individualmente para a atividade de HSDH, as primeiras frações não foram inibidas, enquanto que as demais em ordem de eluição, apresentaram uma alta atividade da enzima HSDH, expressivamente inibida por treonina,

confirmando deste modo, a existência de dois picos sobrepostos de atividade de HSDH. Em se tratando de separação das isoenzimas, resultados semelhantes foram observados em milho (Azevedo *et al.*, 1992b) e arroz (Teixeira *et al.*, 1998).

As enzimas LOR/SDH estão envolvidas na degradação de lisina. Os passos que seguem na degradação oxidativa deste aminoácido foram estudados primeiramente em mamíferos pela lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR) e sacaropina desidrogenase (SDH). A LOR condensa lisina e 2-oxoglutarato em sacaropina na presença de NADPH, enquanto que a SDH hidrolisa sacaropina em α -aminoadípico-semialdeído e glutamato na presença de NAD ou NADP, deste modo a maioria dos achados é de que a atividade destas enzimas está limitada somente ao endosperma das sementes, e que devido ao catabolismo, evitam o acúmulo deste aminoácido na forma solúvel nas sementes.

A compreensão da biossíntese e degradação de lisina em plantas tem uma enorme importância devido à concentração limitada dos aminoácidos essenciais nas sementes, fato bastante discutido em publicações anteriores. Informações valiosas vêm sendo adquiridas ao longo dos anos no sentido de desvendar as propriedades das enzimas envolvidas na biossíntese e catabolismo de lisina, dentre elas destacam-se o uso de mutantes no qual a atividade das enzimas LOR/SDH são alteradas de algum modo de maneira a reduzir o catabolismo da lisina no endosperma das sementes, fazendo com que mutantes com alto teor de lisina sejam produzidos.

Tais mutantes são alvos de muitos estudos como é o caso do mutante denominado opaco-2 (Mertz *et al.*, 1964), com modificação no metabolismo da proteína de estocagem, zeína, no endosperma de milho. O gene responsável (gene *opaco-2*) está localizado no braço curto do cromossoma 7 e seu maior efeito está na redução da quantidade zeína, que é em torno de 70%. Este gene faz parte de um complexo de polipeptídeos codificado por uma família multigênica (Soave *et al.*, 1978). O mutante opaco-2 também afeta o catabolismo de lisina, experimentos com lisina marcada demonstraram que o aminoácido é menos degradado no endosperma mutante do que no da linhagem selvagem (Sodek e Wilson, 1970).

As atividades de LOR/SDH em *Coix*, ficaram restritas apenas ao endosperma, pois em folhas e raízes nenhuma atividade foi observada (Tab. II, pag. 42). A maioria dos experimentos feitos utilizando sulfato de amônio para recuperação da atividade de LOR, resultaram na perda da atividade da enzima. Entretanto, em alguns, onde a purificação em coluna de "DEAE-Sephacel" ocorreu, um único pico de atividade de LOR foi observado, o qual eluiu na mesma posição do pico da SDH, e sua atividade foi bem menor do que a de SDH, diferentemente do que tem-se verificado em outras espécies de plantas, por exemplo

em milho (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996), quando atividade de LOR foi bem mais alta do que a de SDH. De qualquer maneira, a atividade de SDH em *Coix* foi em geral alta (Tab. II pag. 42 e Fig. 3 pag. 45), enquanto que a baixa atividade de LOR pode ser atribuída à perda durante à extração e purificação da enzima.

A co-purificação observada para as duas enzimas em coluna de troca iônica e durante o procedimento com sulfato de amônio, sugere que as enzimas LOR/SDH de *Coix* estão presentes possivelmente como um polipeptídeo bifuncional, como observado em outras espécies de plantas estudadas até agora.

Extrato de proteínas de SDH foi aplicado em gel não-desnaturante de poliacrilamida, o qual foi corado para atividade de SDH, observando-se uma banda dependente de sacaropina (Fig. 4, pag. 46). Além disso, duas outras bandas muito fracas apareceram quando altas quantidades de proteína foram carregadas. A banda predominante mostrou 98% de atividade total de SDH. Comparações das bandas da enzima SDH de *Coix* (Fig. 5c) foram feitas com amostras padrão isoladas de sementes de milho e arroz. A amostra padrão de arroz exibiu 4 a 5 bandas de atividade de SDH (Fig. 5b, pag. 46) sugerindo a confirmação da presença de formas multiméricas da enzima em arroz (Gaziola *et al.*, 2000). Baseado na mobilidade relativa das bandas de atividade, as duas bandas fracas da enzima SDH de *Coix* migraram na mesma posição da maioria das bandas eletro-negativas da banda da SDH de arroz. A banda da SDH de *Coix* não migrou na mesma posição da banda de milho, nem mesmo na mesma posição da banda da SDH de arroz. Infelizmente, como a atividade enzimática de LOR foi bastante reduzida nas amostras de *Coix*, os géis não puderam ser corados para atividade de LOR, assim a presença de uma isoenzima de SDH mono ou bifuncional não pode ser confirmada.

Análise da cinética da SDH em *Coix* foi conduzida, o K_m da sacaropina da SDH foi determinada como sendo 0,143 mM, enquanto que o K_m para NAD foi de 0,531 mM. Tais resultados são semelhantes àqueles observados para SDH purificado de arroz e milho por Gaziola *et al.* (1997) e Gonçalves-Butruille *et al.* (1996), respectivamente.

A análise da distribuição da atividade da AK em plântula, antera e endosperma em desenvolvimento mostrou que lisina foi o maior inibidor da atividade da enzima, confirmando os resultados obtidos por Dotson *et al.* (1990), os quais analisaram os efeitos de duas mutações nos genes *Ask1* e *Ask2* de AK isoladas e purificadas de espigas de milho imaturo.

A inibição por lisina na atividade da enzima AK em milho, confirma que o gene *Ask1* codifica uma das isoenzimas de AK sensível a lisina. Ademais, nossos dados indicam que a inibição causada por treonina não foi alterada em todos os tecidos analisados, comportando-se de maneira independente do gene *Ask1*, sugerindo que outros genes devem estar

envolvidos na sensibilidade da enzima AK de milho. Já o efeito aditivo sobre a inibição causada por lisina e treonina na atividade de AK, vem confirmar também trabalhos anteriores (Azevedo *et al.*, 1992a, 1992b).

No mutante Ask1-LT19, uma inibição maior por lisina e treonina foi observada e atribuiu-se a uma redução na sensibilidade da enzima AK sensível à inibição por lisina. O efeito inibitório por lisina no duplo mutante (*ASK1 ASK1/o2o2*) mostra que a isoenzima AK sensível a lisina codificada pelo gene *Ask1* pode ser regulada pelo gene *opaco-2*. Esta sugestão é também corroborada pelo efeito da lisina sobre AK do endosperma do mutante simples Ask1-LT19 (*ASK1 ASK1/O2O2*), cuja redução da inibição da lisina com a introdução do mutante do gene *Ask1* não foi significativa.

O efeito inibitório causado por certos aminoácidos e seus análogos sobre algumas enzimas da via do ácido aspártico, é um grande desafio para explicar os mecanismos de regulação desta via. Estes mecanismos envolvem outros processos como obtenção de mutantes que alteram a atividade da enzimas da via.

Isoenzimas de AK têm sido retroinibidas por seus produtos finais, e seus análogos (Azevedo *et al.*, 1997). Estas isoenzimas têm mostrado serem inibidas por lisina e/ou treonina sozinhos, ou de forma sinérgica por lisina e aminoetilcisteína (AEC). Além disso outros compostos, como cálcio e calmodulina, foram propostos como estimuladores de AK em espinafre (Sane *et al.*, 1984) sendo a primeira demonstração da modulação por calmodulina em AK de plantas. Evidenciou-se que a calmodulina é uma das duas subunidades da enzima AK (Kochhar *et al.*, 1998).

Duas isoenzimas de AK de arroz foram isoladas e parcialmente purificadas e caracterizadas como sendo uma sensível a treonina (AK-tre) e outra sensível a lisina (AK-lis). Dois picos de atividade foram obtidos em coluna de troca iônica (FFQ-Sepharose). A atividade da AK observada, do primeiro pico, foi fortemente inibida por treonina, sendo identificadas como AK-tre e para o segundo pico a atividade foi inibida por lisina, designado então como AK-lis. A fração que correspondeu à AK-tre foi inibida em 73, 95 e 96% com concentração de 1, 2 e 5 mM de treonina respectivamente e apenas 4% por 5 mM de lisina, enquanto que a fração AK-lis (2º pico) as porcentagens de inibição por lisina foram respectivamente, de 80, 90 e 88% nas mesmas concentrações de lisina (1, 2 e 5 mM) e apenas 3,5% com 5 mM de treonina.

Com adição de 1 a 5 mM de AEC na fração que continha atividade de AK-tre não houve inibição, mas esta substância foi capaz de inibir a atividade da fração AK-lis em 65,4% (5 mM). Estes resultados mostraram que AK-tre não foi afetada por AEC, enquanto que AK-lis

foi inibida, embora não igual à inibição por lisina que foi de 88%. AEC inibe a atividade de AK-lis, com a mesma concentração (5mM), porém em menor intensidade.

Azevedo e Arruda (1995) utilizaram cultura de tecidos em milho para selecionar plantas resistentes a AEC. Um gradiente de concentração de AEC foi utilizado, resultando em uma inibição de 80% com apenas 0,12 mM de AEC, enquanto que em calos em crescimento a inibição foi drástica com concentração de 0,25 mM. AEC também inibe outras enzimas importantes da via do ácido aspártico, como por exemplo a DHDPS, sendo necessárias concentrações menores de AEC do que de lisina, para que se verifique o mesmo efeito inibitório.

A análise dos aminoácidos metionina e valina não demonstrou qualquer efeito inibitório significativo sobre as duas isoenzimas em arroz. Ao contrário, houve um leve aumento de atividade quando presentes em concentrações de 5 mM. Um pequeno aumento de 3,2% na atividade de AK-tre foi obtido com metionina, e de 2,7% com valina. Um aumento maior na atividade de AK-lis de 10 a 16,7%, nas mesmas concentrações, para metionina e valina respectivamente. O aumento na atividade da AK-lis causado por valina (Fig.1, pag. 55) confirma os resultados obtidos anteriormente por Bryan *et al.* (1970), Aarnes e Rognes (1974).

O efeito de ativação na isoenzima de AK-lis por valina ainda permanece por ser explicado para este caso, Possivelmente faltaria um sítio catalítico específico para esse aminoácido, de maneira que seriam necessárias concentrações maiores de valina para que o efeito de ativação fosse atingido (Teixeira, 1997). Já o efeito do aminoácido metionina sobre a atividade da AK vem sendo estudado em algumas plantas (Azevedo *et al.*, 1997), contudo os resultados têm sido contraditórios.

A regulação da AK pela SAM tem sido investigada em muitas espécies de plantas (Madison e Thompson, 1976; Rognes *et al.*, 1980; Azevedo *et al.*, 1992a). SAM é um importante regulador da atividade em plantas superiores de AK sensível a baixas concentrações de lisina, sendo este mecanismo de regulação considerado altamente conservado. Além disso, existe uma expressiva interação sinérgica entre os dois aminoácidos lisina e metionina, de maneira que a própria síntese é inibida no primeiro passo regulatório da via (Rognes *et al.*, 1980).

Dois picos de atividade foram eluídos em colunas de troca iônica, sendo que ambos mostraram inibição por lisina e uma leve inibição por treonina, sendo que um deles foi sensível a SAM. Não foi observado um efeito sinérgico com a SAM mais lisina, e atribui-se este fato ao uso de alta concentração de lisina. De qualquer modo, com a adição da SAM, dois efeitos foram observados, no primeiro pico, a atividade foi similar ou até maior do que o

controle e com a adição da SAM mais lisina houve uma contribuição parcial da lisina no efeito de inibição (Azevedo *et al.*, 1992a).

No nosso estudo, em arroz a adição da SAM ao ensaio não alterou a atividade da AK-tre nem sequer produziu algum efeito aditivo ou sinérgico quando adicionado em combinação com 5 mM de treonina. Entretanto, com a adição da SAM sozinha (1 mM) ocorreu uma inibição da isoenzima AK-lis em torno de 12% em todas as concentrações testadas, e quando em combinação com 5 mM de lisina, a inibição foi intensificada em quase 95% (Fig. 2b pag. 56). O efeito sinérgico da SAM com lisina parece ser uma característica comum em outras espécies de plantas (Azevedo *et al.*, 1992a; Rognes *et al.*, 1980), bem como a estimulação da atividade da SAM à AK (Heremans e Jacobs, 1995) assim como de outra enzima, treonina sintase envolvida na síntese do ácido aspártico (Madison e Thompson, 1976)

A ação moduladora da atividade da isoenzima AK por cálcio e inibidores de calmodulina vem sendo estudada em várias espécies de plantas como cenoura, milho, espinafre e aveia (Bonner *et al.*, 1986, Azevedo *et al.*, 1992c, Sane *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1999), respectivamente.

Os resultados encontrados para as isoenzimas AK de arroz mostram claramente que a isoenzima AK-tre não foi regulada por cálcio (Fig. 4, pag. 57). A enzima AK-lis mostrou um leve aumento na atividade em presença de 1,6 mM de cálcio, que foi perdido pela adição de EGTA (quelante de cálcio) na mistura do ensaio. Assim é difícil estimar neste caso, um papel regulatório do cálcio sobre a AK-lis de arroz ao comparar os resultados descritos em AK de espinafre, com peso molecular de 280 kDa, com 8 subunidades, 4 grandes e 4 pequenas. As atividades das subunidades maiores puderam ser estimuladas em mais de duas vezes com a adição das sub-unidades menores, as quais foram caracterizadas como sendo idênticas à calmodulina (Kochhar *et al.*, 1998). Estes resultados observados em espinafre não estão de acordo com os observado com as isoenzimas de AK de cenoura (Bonner *et al.*, 1986) e de milho (Azevedo *et al.*, 1992c), onde nenhuma evidência foi obtida para assegurar um papel regulatório para calmodulina ou cálcio em relação à atividade de AK.

A adição de inibidores de calmodulina não afetou a atividade de ambas isoenzimas (AK-Tre e AK-lis). Esses resultados divergentes, embora tenham sido demonstrados em LOR, foram diferentes dos encontrados por Kemper *et al.* (1998), onde houve inibição da atividade de LOR por antagonistas da calmodulina.

Tem-se demonstrado que a concentração de KCl estimula outra enzima bifuncional (LOR/SDH) envolvida na degradação de lisina, em endosperma de milho, mais precisamente o domínio LOR (Kemper *et al.*, 1998), onde a ativação ocorreu por altas concentrações de

KCl. Em arroz, não houve alteração na atividade da isoenzima de AK (Fig. 3, pag. 56), indicando que essas isoenzimas não são ativadas pela modificação na concentração de sais de KCl.

Os trabalhos apresentados aqui tiveram como base a avaliação de uma série de processos, como purificação e caracterização de enzimas, análise de mutantes e efeitos de compostos inibidores das enzimas que fazem parte da via de biossíntese dos aminoácidos essenciais do ácido aspártico. O objetivo final destes estudos é a compreensão do mecanismos de regulação com a intenção de melhorar o valor nutricional de alguns cereais. Assim, uma pequena parcela de contribuição foi dada, e muitos estudos ainda serão necessários para elucidar a complexidade da via metabólica do ácido aspártico.

5. CONCLUSÃO

Coix:

1. Em endosperma de *Coix* a atividade de AK foi inibida por treonina e lisina, sugerindo a presença de duas isoenzimas sendo uma sensível a treonina e a outra sensível a lisina.
2. A isoenzima de AK, que é sensível a treonina, correspondeu aproximadamente 60% do total da atividade da AK em *Coix*, sugerindo que nesta espécie de planta a forma sensível a treonina é predominante.
3. As enzimas AK, HSDH e LOR/SDH tiveram suas atividades recuperadas em maior nível na semente (endosperma) de *Coix*. Deste modo assim como em outros cereais, estas enzimas possuem atividade máxima no endosperma.
4. A detecção de uma alta atividade de HSDH, que também é inibida por treonina, sugere a presença de duas isoenzimas de HSDH em *Coix*, uma sensível a treonina e a outra resistente à inibição por treonina.

Milho:

5. A inibição causada por treonina não apresentou alteração em todos os tecidos testados, e desta forma caracterizou-se como independente da presença da mutação do gene *Ask1*. Portanto, em milho, outros genes devem ser responsáveis pela AK sensível a treonina.
6. AK sensível a lisina, codificada pelo gene *Ask1*, pode ser regulada pelo gene *opaco-2*.

Arroz:

7. Dos compostos testados, aminoetilcisteína e S-adenosilmetionina não produziram qualquer alteração significativa sobre a atividade de AK-tre, sugerindo que em *Coix* estes compostos não influenciaram na atividade da enzima AK-tre.
8. O aumento da atividade de AK observado na presença de cálcio não é suficiente para sugerir que cálcio tenha um papel regulatório sobre a enzima AK.

9. Em arroz a atividade de AK-lis é também inibida por SAM como em outras espécies de plantas.
10. As isoenzimas de AK de arroz mostraram claramente que a AK-tre não é regulada por cálcio.
11. Os resultados observados para a isoenzima AK de arroz são consistentes com os dados preliminares obtidos em milho, sugerindo assim, uma alta similaridade entre as isoenzimas AK de arroz e de milho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarnes, H. Aspartate kinase from some higher plants and algae. *Physiol. Plant*, 1974, 32: 400-402.
- Aarnes, H. A. lysine-sensitive aspartate kinase and two molecular formas of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. *Plant Sci. Lett.* 1977, 9: 137-145.
- Aarnes, H. and Rognes, S.E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Phytochem.* 1974, 13: 2717-2724.
- Arora, R. K. Job's-tears *Coix lacryma-jobi*. A minor food and fodder crop of Northeastern India. *Economic Botany*. 1977, 31: 358-366.
- Arruda, P. and Silva, W.J. Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochem.* 1979, 18: 1803-1805.
- Arruda, P. and Silva, W. J. Lysine-Ketoglutarate reductase activity in maize: Its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochem.* 1983, 22: 2687-2689.
- Arruda, P.; Sodek, L. and Silva, W. J. Lysine-ketoglutarato reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 1982, 69: 988-989.
- Arruda, P.; Bright, S. W. J. ; Kueh, J. S. H.; Lea, P. J. and Rognes, S. E. Regulation of aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to lysine plus threonine: construction and analysis of combinations of the *Lt1a*, *Lt1b* and *Lt2* mutant genes. *Plant Physiol.* 1984a, 76: 442-426.
- Arruda, P.; Tocozzilli, J. M. G.; Vieira, A. and Silva, W. J. Degradation of lysine in maize: possible pathway and genetic control. *Maize Gen. Coop. News Lett.* 1984b, 58: 50-52.
- Azevedo, R. A. Mutantes da via metabolica do ácido aspártico em milho obtidos através de cultura de tecidos. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1988. 138 p.

- Azevedo, R. A. Isolation, purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from maize. Tese de doutorado no Institute of Environmental and Biological Sciences. Universidade de Lancaster, Inglaterra, 1992. 250 p.
- Azevedo, R. A.; Arana, J. L. and Arruda, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*19* with opaque-2 maize mutant. *Plant Sci.* 1990, 70: 81-90.
- Azevedo, R. A. and Arruda, P. Dominant and recessive mutants conferring resistance to S-2-aminoethyl-L-cysteine in maize. *J. Plant Physiol.* 1995, 145: 321-326.
- Azevedo, R. A.; Arruda, P.; Turner, W. L. and Lea, P. J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochem.* 1997, 46: 395-419.
- Azevedo, R. A.; Blackwell, R. D.; Smith, R. J. and Lea, P. J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. *Phytochem.* 1992a, 31: 3725-3730.
- Azevedo, R. A.; Smith, R. J. and Lea, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. 1992b. *Phytochem.* 31: 3731-3734.
- Azevedo, R. A.; Smith, R. J. and Lea, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. 1992c. *Phytochemistry* 31:3735-3737.
- Blemings, K.P.; Crenshaw, T.D.; Swick, R.W. and Benevenga, N.J. Lysine- α -ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase are located only in the mitochondrial matrix in rat liver. *Nutrient Metabolism.* 1994, 1215-1221.
- Bonner, P. L. R.; Hetherington, A. M. and Lea, P. J. Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin. *Febs Lett.* 1986, 195: 119-121.
- Brandt, A. B. In vivo incorporation of lysine C¹⁴ into the endosperm protein of wild type and high lysine barley. 1975 *Febs Lett.* 52: 288-291.

- Brennecke, K.; Souza Neto, A. J.; Lugli, J.; Lea, P. J. and Azevedo, R. A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *Opaque-2*. *Phytochem.* 1996, 41: 707-712.
- Bright, S.W.J.; Mifflin, B.J. and Rognes, S.E. Threonine accumulation in the seed of a barley mutant with an altered aspartate kinase. *Biochem. Genet.* 1982, 20: 229-243.
- Bright, S. W. J.; Shewry, P. R. and Mifflin, B. J. Aspartate kinase and the synthesis of aspartate derived amino acids in wheat. *Planta*. 1978a, 139: 119-125.
- Bright, S. W. J.; Wood, E. A. and Mifflin, B. J. The effect of Aspartate-derived Amino Acids (Lysine, threonine, Methionine) on the growth of Excised embryos of wheat and barley. *Planta*, 1978b, 139: 113-117.
- Brochetto-Braga, M. R.; Leite, A. and Arruda, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and *opaque-2* maize endosperms. *Plant Physiol.* 1992, 98: 1139-1147.
- Bryan, J. K. Advances in biochemistry of amino acid biosynthesis. In: Intermediary nitrogen metabolism, Mifflin, B. J. and Lea, P. J., Eds; Academic Press: London, 1990; pp 161-195.
- Bryan, J. K. ; Lissik, E. A. and Matthews, B. F. Changes in enzyme regulation during growth of maize. III. Intracellular location of homoserine dehydrogenase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 1977, 59: 673-679.
- Bryan, P. A.; Cawley, R. D.; Brunner, C. E. and Bryan, J. K. Isolation and characterization of lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, 41: 1211-1217.
- Cattoir-Reynaerts, A.; Degryse, E.; Negrutiu, I.; Aerts, M. and Jacobs, M. Effects of aspartate derived amino acids on growth of barley and *Arabidopsis* plants and callus. *Z. Pflanzenphysiol.* 1981, 101: 67-74.
- Cattoir-Reynaerts, A.; Degryse, E.; Verbruggen, I. and Jacobs, M. Selection and characterization of carrot (*Daucus carota* cultivar Berlicum) embryoid cultures

- resistant to inhibition by lysine plus threonine. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 1983, 178: 81-90.
- Cheshire, R. M. and Miflin, B. F. The control of lysine biosynthesis in maize. *Phytochemistry*. 1975, 14: 695-698.
- Chibber, B. A. K.; Voicu, E.; Mertz, E. T. and Glover, D. V. Studies on corn protein: XI. Distribution of lysine during germination of normal and opaque-2 maize. *Cereal Chem*. 1977, 54: 558-564.
- Clayton, W. D. Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae) *Rew Bull*. 1981, 35: 813-818.
- Clayton, W. D. and Renvoize, S. A. Genera *graminiun* grasses of the world. *Rew. Bull. Add. Series XIII*. 1986. London 389p.
- Cord-Neto, G.; Yunes, J. A.; Silva, M. J.; Vettore, A. L.; Arruda, P. and Leite, A. The involvement of opaque-2 on beta-prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggestion a more general role for this transcriptional activator. *Plant Molecular Biology*. 1995, 27: 1015-1029.
- Dalby, A. and Tsay, Y. Comparison of lysine and zein and non-zein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop Sci*. 1975, 15:513-515.
- Damerval, C.; de Vienne, D. Quantification of dominance for proteins pleiotropically affected by opaque-2 in maize. *Heredity* 1993, 70, 38-51.
- Damerval, C. and Le Guilloux, M. Characterization of novel proteins affected by the o2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol. Gen. Genet*. 1998, 257: 354-361.
- Dante, R. A. Clonagem, caracterização e estudo da expressão do gene *DapA* que codifica a enzima dihidrodipicolinato sintase de *Coix lacryma-jobi* L. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1998. 85p.
- Davies, H. M. and Miflin, B. J. Aspartate kinase from carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters*. 1977, 9: 323-332.

- Davies, H. M. and Miflin, B. J. Regulatory isoenzymes of aspartate kinase and the control of lysine and threonine biosynthesis in carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 1978, 62: 536-542.
- De Wet, J. M. J. Phylogenetic of the Tripsacinae in the Andropogoneae (Graminae). *Rew. Bull.* 1982, 320p.
- Dereppe, C.; Bold, G.; Ghisalba, O.; Ebert, E. and Schar, H.P. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. *Plant Physiol.* 1992, 98:813-821.
- Di Camelli, C. A. and Bryan, J. K. Changes in enzyme regulation during growth of maize. II. Regulationships among multiple molecular forms of homoserine dehydrogenase. *Plant Physiol.* 1975, 55: 999-1005.
- Dieter, P. Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants. *Plant Cell Environ.* 1984, 7:371-380.
- Dotson, S. B.; Frisch, D. A.; Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. Lysine-insensitive aspartate kinase in two threonine-overproducing mutants of maize. *Planta* 1990, 182: 546-553.
- Dotson, S. B.; Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 1989, 91: 1602-1608.
- Earle, F. R.; Curtis, J. J. and Hubbard, J. E. Composition of the component parts of the corn kernel. *Cereal Chem.* 1946, 23: 504-511.
- Frisch, D. A.; Gengenbach, B. G.; Tommey, A. M.; Sellner, J. M.; Somers, D. A. and Myers, D. E. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. *Plant Physiol.* 1991a, 96: 444-452.
- Frisch, D. A.; Tommey, A. M. Gengenbach, B. G. and Somers, D. A. Direct genetic selection of maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in a *Escherichia coli daA⁻* auxotroph. *Mol. Gen. Genet.* 1991b, 228:287-293.

- Galili, G. Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell*. 1995, 7:899-906.
- Gaziola, S. A.; Alessi, E. S.; Damerval, C. and Azevedo, R. A.; Quality protein maize (QPM): A biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47:1268-1275.
- Gaziola, S. A.; Sodek, L.; Arruda, P.; Lea, P. J. and Azevedo, R. A. Degradation of lysine in rice seeds: Effect of calcium, ionic strength, S-adenosylmethionine and S-2-aminoethyl-L-cysteine on the lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme. *Physiologia Plantarum*. 2000, 110:164-171.
- Gaziola, S. A.; Teixeira, C. M. G.; Ando, A.; Sodek, L. and Azevedo, R. A. Lysine biosynthesis and degradation in rice developing seeds. Enzyme isolation and regulation. *Int. Rice. Res. Notes* 1996, 21: 27-28.
- Gaziola, S. A.; Teixeira, C. M. G.; Lugli, J.; Sodek, L. and Azevedo, R. A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization and regulatory properties of a lysine2-oxoglutarate/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. *Eur. J. Biochem.* 1997, 247: 364-371.
- Gengenbach, B. G.; Walter, T. J.; Green, C. E. and Hibberd, K. A. Feedback regulation of lysine, threonine and methionine biosynthetic enzymes in corn. *Crop Science*, 1978, 18: 472-476.
- Ghislain, M.; Frankard, V. and Jacobs, M. A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J.*, 1995, 8:733-743.
- Gonçalves-Butruille, M.; Szajner, P.; Torigoi, E.; Leite, A. and Arruda, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* 1996, 110: 765-771.
- Green, C. E. and Donovan, C. M. Effect of aspartate-derived amino acids and aminoethylcysteine on growth of excised mature embryos of maize. *Crop Science*, 1980, 20: 358-362.

- Green, C. E. and Phillips, R. L. Potential selection system for mutants with increased lysine, threonine and methionine in cereal crops. *Crops Science*, 1974, 14: 827-830.
- Henke, R. R. and Wahnbaeck, R. Aspartokinase from developing endosperm of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, 79: 38-45.
- Heremans, B. and Jacobs, M. A mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with modified control of aspartate kinase by threonine. *Biochem. Genet.* 1997, 35: 139-153.
- Heremans, B. and Jacobs, M. Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an altered aspartate kinase. *J. Plant Physiol.* 1995, 146: 249-257.
- Hibberd, K. A. and Green, C. E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1982, 79: 559-563.
- Hibberd, K. A.; Walter, T.; Green, C. E. and Gengenback, B. G. Selection and characterization of a feedback-insensitive tissue culture of maize. *Planta*, 1980, 148: 183-187.
- Jain, S. K. and Banerjee, D. K. Preliminary observations on the ethnobotany of the genus *Coix* . *Econ. Bot.* 1974, 28: 38-42.
- Kaneko, T.; Hashimoto, T.; Kumpaisal, R. and Yamada, Y. Molecular cloning of wheat dihydropicolinate synthase. *J. Biol. Chem.* 1990, 256: 17451-17455.
- Karchi, H.; Miron, D.; Bem-Yaacov, S. and Galili, G. The lysine dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seeds requires calcium and protein phosphorylation. *The Plant Cell.* 1995, 7:1963-1970.
- Kemper, E. L.; Cord-Neto G.; Capella A. N.; Gonçalves-Butruille, M.; Azevedo, R. A. and Arruda, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur. J. Biochem.* 1998, 253:720-729.

- Kemper, E. L; Cord-Neto, G.; Papes, F.; Moraes, K. C.; Leite A. and Arruda, P. The role of *opaque-2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell*, 1999, 10:1981-94.
- Kochhar, S.; Kochhar, V. K. and Sane, P. V. Isolation, characterization and regulation of enzymes of aspartate kinase differentially sensitive to calmodulin from spinach leaves. *Biophys. Acta*. 1986, 880: 220-225.
- Kochhar, S.; Kochhar, V. K. and Sane, P. V. Subunit structure of lysine sensitive aspartate kinase from spinach leaves. *Biochem. and Mol. Biol. Int.* 1998, 44(4): 795-806.
- Koie, B.; Doll, H. and Kreis, M. Evaluation of a hight-lysine barley gene using chromossome-double monopolids. *Genetika*, 1976, 8: 177-182.
- Krishnaswamy, S. and Bryan, J. K. Use of monoclonal antibodies for the purification and characterization of threonine-sensitive isoenzyme of maize homoserine dehydrogenase. *Archives of Biochem. and Biophys.* 1986, 246(1): 250-262.
- Kumpaisal, R.; Hashimoto, T. and Yamada, Y. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension cultures. *Plant Physiol.* 1987, 85:145-151.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227:680-685.
- Lea, P. J.; Blackwell, R. D. and Azevedo, R. A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In *Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*; Shewry, P. R., Ed.; CAB International: Oxford, 1992, pp 181-208.
- Lea, P. J.; Mills, W.R. and Mifflin, B. J. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplas. *FEBS Letters*. 1979, 98:165-168.
- Leite, A.; Yunes, J. A.; Turcinelli, S. R. and Arruda, P. Cloning and characterization of a cDNA encoding a sulfur-rich coixin. *Plant. Mol. Biol.* 1992, 18(1): 171-4.

- Lima, S. T. C. Caracterização da enzima lisina ceto-glutarato redutase (LKR) sacaropina desidrogenase (SDH) estudada em feijão (*Phaseolus vulgaris*) Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1999, 91p.
- Madison, J. T. and Thompson, J. F. Threonine synthase from higher plants: stimulation by S-adenosyl-methionine and inhibition by cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1976, 71:684-891.
- Matthews, B. F.; Gurman, A. W. and Bryan, J. K. Changes in enzyme regulation during growth of maize I. Progressive desensitization of homoserine dehydrogenase during seedling growth. *Plant Physiology*. 1975, 55: 991-998.
- Matthews, B. F. and Widholm, J. K. Regulation of lysine and threonine suspension in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. *Planta*. 1978, 141: 315-321.
- Matthews, B. F. and Widholm, J. K. Enzyme expression in soybean cotyledon, callus and cell suspension culture. *Canadian Journal of Botany*. 1979, 57(4): 299-304.
- Markovitz, P. J.; Chuang, D. T. and Cox, R. P. Familial hyperlysinemias: purification and characterization of the bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities. *J. Biol. Chem.* 1984, 259:11643-11646.
- Mertz, E. T.; Bates, L. S. and Nelson, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, 1964, 145: 279-280.
- Muehlbauer, G. J.; Somers, D. A.; Matthews, B. F. and Gengenbach, B. G. Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiol.* 1994, 106:1303-1312.
- Muto, S. Distribution of calmodulin within wheat leaf cells. *FEBS Lett.* 1982, 147:161-164.

- Negrutiu, I.; Cattoir-Reynaerts, A.; Verbruggen, I. and Jacobs, M. Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase (EC4.2.1.52) from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.* 1984, 68:11-20.
- Nelson, O. E. Genetic control of polysaccharide and storage protein synthesis in the endosperm of barley, maize and sorghum. In: Pomeranz, Y. (ed.) *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 3. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, 1986. pp. 41.
- Ogawa, H. and Fujioka, M. Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 1978, 253:3666-70.
- Ottoboni, L. M. M. As proteínas do endosperma de *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay: Caracterização e comparação com proteínas do endosperma do milho e teosinte. 1989. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 170p.
- Ottoboni, L. M. M.; Leite, A.; Targon, M. L. P. N.; Crozier, A. and Arruda, P. Characterization of the storage protein in seeds of *Coix lacryma-jobi* var. Adlay. *J. Agri. Food Cem.* 1990, 381:631-635.
- Patte, J.; Le Bras, G. and Cohen, G. N. Regulation by methionine of the synthesis of a third aspartate kinase and of a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta.* 1967, 136:245-247.
- Pavagi, S.; Kochhar, S.; Kochhar, V. K. and Sane, P. V. Purification and characterization of homoserine dehydrogenase from spinach leaves. *Biochem. Mol. Int.*, 1995, 36(3): 649-658.
- Rao, S. S.; Kochhar, S. and Kocchar, V. K. Analysis of photocontrol of aspartate kinase in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Biochem. Mol. Int.* 1999, 47(3): 347-360.
- Relton, J. M.; Bonner, P. L. R.; Wallsgrove, R. M. and Lea, P. J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartato kinase purified from carrot cell suspension culture. *Bioch Byoph. Acta.* 1988, 953: 48-60.

- Rognes, S. E., Lea, P. J. and Miflin, B.J. S-adenosylmethionine: a novel regulator of aspartate kinase. *Nature*. 1980, 287:357-359.
- Sakano, K. and Komamine, A. Change in the proportion of two aspartokinases in carrot root tissue in response to in vitro culture. *Plant Physiology*, 1978, 61: 115-118.
- Sane. P. V; Kochhar, S.; Kumar, N. and Kochhar, V. K. Activation of plant aspartate kinase by calcium and calmodulin-like factor from plants. *FEBS Letters*, 1984, 175: 238-242.
- Shaver, J. M.; Bittel, D. C.; Sellner, J. M.; Frisch, D.A.; Somer, D.A. and Gengenbach, B. Single amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93:1962-1966.
- Shedlarsky, J. C. and Gilvarg, C. The pyruvate aspartic semialdehyde condensing enzyme of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 1970, 245:1362-1373.
- Shewry, P. R. and Miflin, B. J. Properties and regulation of aspartate kinase from barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 1977, 59: 69-73.
- Silk, G. W.; Matthews, B. F.; Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. Cloning and expression of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.* 1994, 26:989-993.
- Silk, G. W.; Matthews, B. F.; Somers, D. A. and Gengenbach, B. G. Clonig and expression of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.* 1994, 26:989-993.
- Simonson, M. S. and Eckel, R. E. Enzymatic measurement of saccharopine with saccharopine dehydrogenase. *Anal Biochem.* 1985, 147:230-233.
- Soave, C.; Tardini, L.; Di Fonzo, N. and Salamini, F. Linkage relationship between regulatory and structural gene loci involved in zein synthesis in maize. *Theor. Appl. Gent.* 1978. 52: 263-267.

- Sodek, L. Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry*. 1976, 15:1903-1906.
- Sodek, L and Wilson, C. M. Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in the developed endosperm of normal and *opaque-2* corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 86:29-30.
- Souza-Filho, G. A. Silva, M. J.; Vettore, A. L.; Yunes, J. A.; Leite, A.; Arruda, P. and Ottoboni, L. M. M. Identification of a DNA-binding factor that recognizes an alpha-coixin promoter and interacts with a *Coix* Opaco-2 like protein. *Plant Mol. Biol.* 1999, 39(1): 95-104.
- Storts, D. R. and Bhattacharjee, J. K. Purification and properties of saccharopine dehydrogenase (Glutamate forming) in *Saccharomyces cerevisiae* lysine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 1987, 169:416-418.
- Tang, G.; Miron, D.; Zhu-Shimoni, J. X. and Galili, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-Ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1997a, 9:1305-1316.
- Tang, G.; Miron, D.; Zhu-Shimoni, J. X.; Amir, R. and Galili, G. Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive of *Escherichia coli*. *Plant. Mol. Biol.* 1997b, 34:287-294.
- Targon, M.L.P.N.; Ottoboni, L.M.M.; Leite, A.; Ludevid, D.; Puigdomenech, P. and Arruda, P. Synthesis and deposition of coixin in seeds of *Coix lacryma-jobi*. *Plant Sci.* 1992, 83:169-180.
- Teixeira, C. M. G. A. Identificação e purificação parcial de isoenzimas da aspartato quinase (AK) e homoserina desidrogenase (HSDH) de sementes de arroz (*Oriza sativa*): Evidências para a existência de um polipeptídeo bifuncional com atividades de AK e HSDH. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 1997.

- Teixeira, C. M. G.; Gaziola S.A; Lugli, J. and Azevedo R.A. Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds. *J. Plant Physiol.* 1998, 153:281-289.
- Uphof, J. C. The dictionary of economic products. Stechert-Hafner service Agency. Inc. New York. 1968.
- Vauterin, M. and Jacobs, M. Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Mol. Biol.* 1994, 25:545-550.
- Vettore, A. L.; Yunes, L. A.; Cord-Neto, G.; Silva, M. J.; Arruda, P. and Leite, A. The molecular and functional characterization of an *Opaco2* homologue gene from *Coix* and new classification of plant bZIP protein. *Plant Mol. Biol.* 1998, 36(2): 249-63.
- Wallsgrave R. M and Mazelis M. M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. *Phytochemistry* 1981, 20: 2651-2655.
- Walter, T. J.; Connely, J. A.; Gengenbach, B. G. and Wold, F. Isolation and characterization of two homoserine dehydrogenase from maize suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 1979, 254(4): 1349-1355.
- Wilson, B. J.; Gray, A. C. and Matthews, B. F. Bifunctional protein in carrot contain both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Plant. Physiology.* 1991, 97:1323-1328.