

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



Renato Rodrigues Ferreira

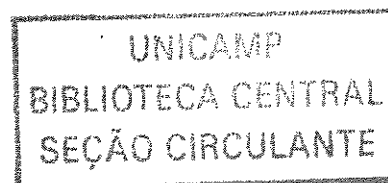
**“ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DA ASPARTATO QUINASE E HOMOSERINA
DESIDROGENASE DE SEMENTES DE SORGO”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Renato Rodrigues Ferreira</i> <i>[Signature]</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética Vegetal e
Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Campinas - SP
2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F4131
V	EX
TOMBO BC	01442
PROC.	16-86-105
C	☐
D	☒
PREÇO	21.000
DATA	24.1.05
Nº CPD	

BIBID 336746

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

F413i

Ferreira, Renato Rodrigues

Isolamento, purificação parcial e caracterização bioquímica da aspartato quinase e homoserina desidrogenase de sementes de sorgo / Renato Rodrigues Ferreira.--
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Ricardo Antunes de Azevedo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Sorgo. 2. Purificação. I. Azevedo, Ricardo Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

200500879

Campinas, 13 de agosto de 2004.

Banca Examinadora

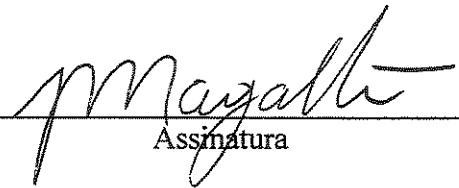
Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek


Assinatura

Prof. Dr. José Ronaldo Magalhães


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda

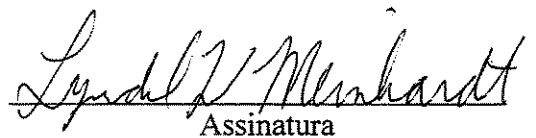

Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Mattos Bellato

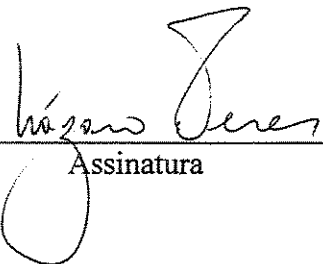

Assinatura

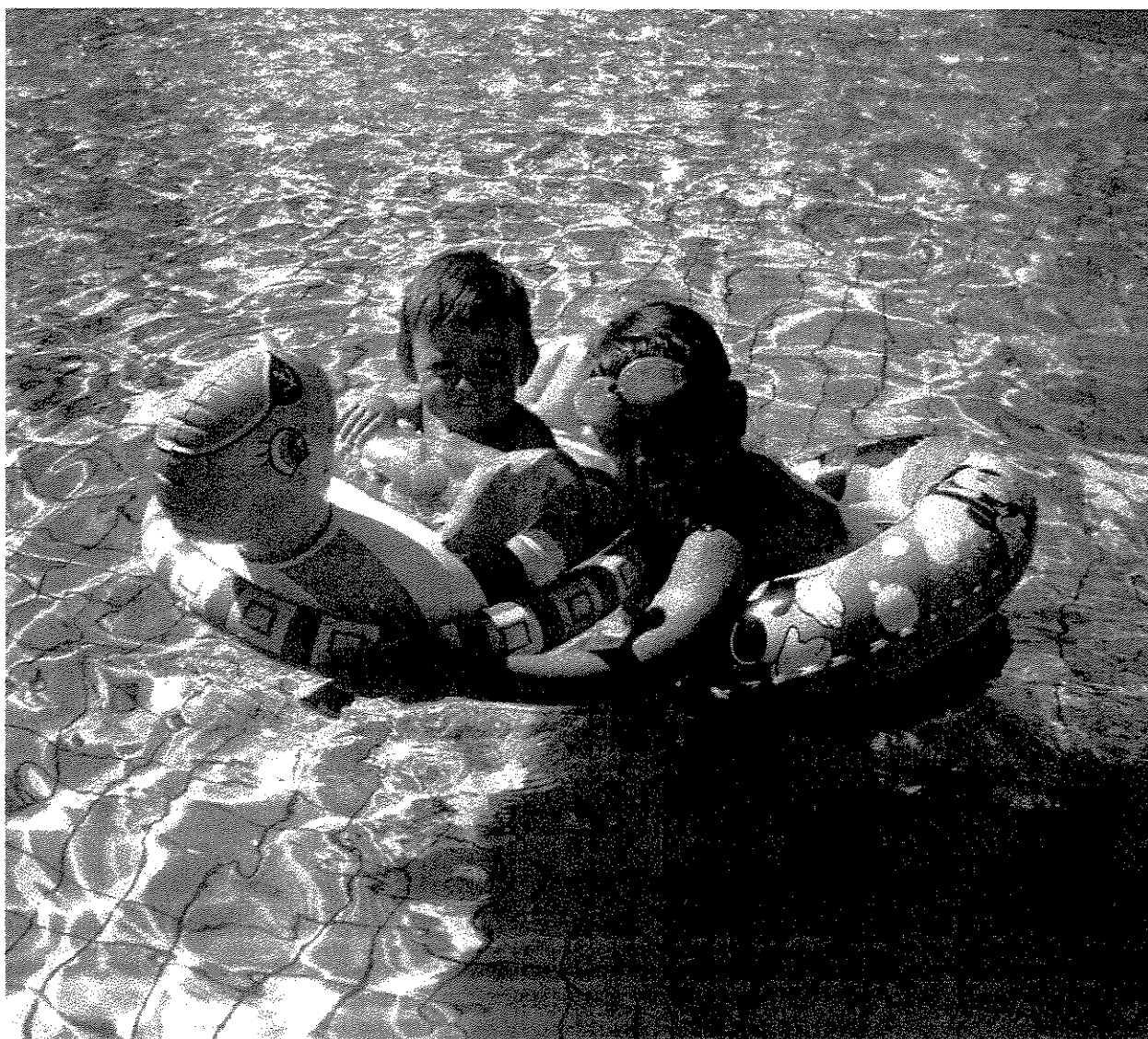
Suplentes

Prof. Dr. Lyndel Wayne Meinhardt


Assinatura

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres


Assinatura



“O sucesso nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a determinação e a persistência para um objetivo, ele vencerá os obstáculos e, se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis.”

JOSÉ DE ALENCAR

*À minha querida esposa
Patrícia e aos meus queridos
pais, José Antonio e Isabel...*

OFEREÇO

*Aos meus dois filhos muito
amados Gabriel e Rafael, que são
as verdadeiras essências de
minha existência. A cada sorriso,
a cada gesto, a cada palavra de
carinho, consigo mais forças
para seguir em frente...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde e guiou meus passos neste caminho;

À minha esposa Patrícia da Silva Ortolani Ferreira que sempre me apoiou nesta árdua jornada, demonstrando todo o amor e dedicação que tem por mim e nossos dois filhos queridos;

Aos meus pais, José Antonio Stênico Ferreira e Isabel de Fátima Rodrigues Ferreira, verdadeiros lutadores, que mesmo diante de todas as adversidades impostas pela vida, souberam com muita união, superar todos esses desafios, sendo meus exemplos de vida;

Aos meus sogros, Milton Antonio Ortolani e Haydeé da Silva Ortolani que sempre me apoiaram;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, muito mais que um orientador, um grande amigo que sempre me apoiou, incentivou e auxiliou em questões profissionais e particulares, contribuindo para minha formação acadêmica e meu crescimento como ser humano, sendo um exemplo de conduta que pretendo sempre seguir;

Ao Prof. Dr. Peter John Lea (Department of Biological Sciences, University of Lancaster, UK) pelas preciosas sugestões e discussões científicas;

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira (Depto. Genética / ESALQ), que me incentivou a ingressar na pós-graduação;

Aos membros da Banca prévia deste trabalho, Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello (CENA), Profa. Dra. Silvia Maria Guerra Molina (ESALQ) e Profa. Dra. Cláudia Mattos Bellato (CENA), pelas avaliações e importantes alterações sugeridas;

Aos docentes da UNICAMP, Prof. Dr. Ladaslav Sodek, Prof. Dr. Paulo Mazzafera e Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pelos ensinamentos que muito me auxiliaram na condução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz G. Nussio (Depto. Zootecnia / ESALQ), ao Dr. Francisco Mittidieri (Dow Agrosciences) e ao banco de germoplasma ICRISAT (Índia) que gentilmente cederam os materiais vegetais que pesquisamos neste trabalho;

Ao Departamento de Genética e Evolução (IB / UNICAMP), por me acolher como aluno de pós-graduação;

Aos meus colegas do laboratório de Genética Bioquímica de Plantas que compartilharam comigo as experiências desses seis anos, Ana P. Pelegrino, Angela P. Vitória, Bertha D. A. Berdejo, Cileide M. M. C. A. de Souza, Leandro F. Aguiar, Liliane S. Camargos, Lyndel W. Meinhardt, Vanderlei A. Varisi, Patrícia F. Cardoso, Priscila L. Gratão, Ricardo F. Fornazier e Salete A. Gaziola, que contribuíram muito para realização deste trabalho;

Aos meus grandes amigos e parceiros, Alejandro A. Toro, Ariane Vendemiatti, Fabrício S. Delite, Georgia B. Pompeu, Guilherme J. G. Pereira, José A. Carmezini, Leonardo O. Médice e Rui A. G. Júnior, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando incondicionalmente nas questões profissionais e pessoais, sendo cúmplices de minha conquista;

Aos meus amigos do Depto. Genética / ESALQ, Alessandro Riffel, Esteban R. Gonzalez, Guillermo R. Salvatierra, Irving J. Berger, Mateus Mondin, Reinaldo M. Barata e Raul S. Almeida, pela força e apoio durante todos estes anos;

A Carlos R. Macedônio responsável pelo setor de Informática (Depto. Genética – ESALQ) pela paciência em me auxiliar sempre que necessário nos assuntos referentes à sua área;

A todos os alunos, funcionários e docentes (Depto. Genética e Evolução / UNICAMP e Depto. Genética / ESALQ) que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento desta pesquisa (Processos FAPESP nº: 98/12461-0 e 01/13216-4) e concessão de bolsa de estudo (Processo FAPESP nº: 00/05960-2).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
ABREVIATURAS	xiv
RESUMO.....	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Via metabólica do ácido aspártico.....	3
3.1.1. Aspartato quinase	5
3.1.2. Homoserina desidrogenase	9
3.1.3. Dihidrodipicolinato sintase	10
3.1.4. Enzimas ASD, DHPR e DDC	11
3.2. Genes da AK e HSDH.....	11
3.3. Mutantes bioquímicos	13
3.4. Plantas transgênicas	16
3.5. Milho opaco-2 e QPM.....	18
3.6. Catabolismo de lisina	20
3.7. Sorgo: utilização e características	21
3.7.1. Qualidade protéica e alimentação de ruminantes	22

3.7.2. Proteínas de reserva	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Material vegetal	27
4.2. Extração de AK e HSDH.....	28
4.3. Precipitação com sulfato de amônio.....	28
4.4. Ensaio da AK.....	29
4.5. Ensaio da HSDH	30
4.6. Cálculo da atividade da AK.....	30
4.7. Cálculo da atividade da HSDH	31
4.8. Purificação parcial da AK e HSDH.....	31
4.8.1. Cromatografia de troca aniônica do tipo <i>step-wise</i>	32
4.8.2. Cromatografia de troca aniônica do tipo gradiente linear	32
4.8.3. Cromatografia de filtração em gel e determinação da massa molecular	33
4.8.3.1. Cromatografia de filtração em gel Superose 12HR 10 / 30.....	33
4.8.3.2. Cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200.....	33
4.9. Modulação da AK e HSDH	34
4.10. Transmitância de infravermelho-próximo	34
4.11. Extração de proteínas de reserva	34
4.12. Extração de aminoácidos	36
4.13. Análise quantitativa de aminoácidos	36
4.14. Separação e análise da composição de aminoácidos solúveis em HPLC.....	37

4.15. Determinação de proteína total	38
4.16. Análises estatísticas.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Considerações gerais	40
5.2. Isolamento de enzimas envolvidas na biossíntese de treonina de sementes de sorgo	41
5.3. Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear.....	65
5.4. Cromatografia de filtração em gel em FPLC.....	67
5.5. Cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200	69
5.6. Tabela de Purificação	71
5.7. Modulação da AK e HSDH.....	72
5.8. Transmitância de infravermelho-próximo	75
5.9. Proteínas de reserva de sorgo	76
5.10. Aminoácidos solúveis de sorgo.....	81
5.11. Considerações sobre proteínas de reserva e aminoácidos solúveis de sorgo	85
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1. Reações enzimáticas importantes na assimilação de amônia. GS, glutamina sintetase; GOGAT, glutamato sintase; AS, asparagina sintetase; AAT, aspartato aminotransferase (Lea & Azevedo, 2003).....pg.04
- FIGURA 2 – Via metabólica do ácido aspártico.....pg.06
- FIGURA 3. Esquema do método de extração das frações das proteínas de reserva de sorgo segundo Youssef (1998).....pg.35
- FIGURA 4. Absorbâncias relativas às atividades de AK (A) e HSDH (B) nas frações obtidas da eluição do tipo gradiente linear (0 – 500 mmol.L⁻¹ KCl) em coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel. Os tratamentos estão indicados na própria figura.....pg.66
- FIGURA 5. Atividades específicas da AK (A) e HSDH (B) em nmol.ml⁻¹.mg prot⁻¹ a partir das frações obtidas de cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12HR 10 / 30 em sistema FPLC.....pg.68
- FIGURA 6. Massa molecular da AK determinada por cromatografia de filtração em gel (Superose 12HR 10 / 30), onde Ln (PM): Log neperiano da massa molecular; Ve: volume de eluição da amostra; V0: volume vazio da coluna. Padrões: (A) β-amilase (200 kDa), (B) BSA (67 kDa), (C) Anidrase Carbônica (29 kDa) e (D) Citocromo c (12,4 kDa).....pg.69
- FIGURA 7. Absorbâncias relativas as atividades de AK (A) e HSDH (B) nas frações eluídas em cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200. Os tratamentos estão indicados na própria figura.....pg.70

FIGURA 8. Massa molecular da AK determinada por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200), onde Ln (PM): Log neperiano da massa molecular; Ve: volume de eluição da amostra; V0: volume vazio da coluna. Padrões: (A) β -amilase (200 kDa), (B) Álcool Desidrogenase (150 kDa), (C) Anidrase Carbônica (29 kDa) e (D) Citocromo c (12,4 kDa).pg.71

FIGURA 9. Atividades de AK (A) e HSDH (B) eluídas a partir cromatografia de troca aniônica do tipo gradiente linear (0-500 mmol.L⁻¹ KCl). C: controle; L1: 1 mmol.L⁻¹ lisina; L5: 5 mmol.L⁻¹ lisina; T1: 1 mmol.L⁻¹ treonina; T5: 5 mmol.L⁻¹ treonina; LT1: 1 mmol.L⁻¹ lisina + treonina; LT5: 5 mmol.L⁻¹ lisina + treonina; M1: 1 mmol.L⁻¹ metionina; M5: 5 mmol.L⁻¹ metionina; V1: 1 mmol.L⁻¹ valina; V5: 5 mmol.L⁻¹ valina; Ca: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂; EGTA: 1,6 mmol.L⁻¹ EGTA; Ca+EGTA: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ + EGTA; CALM: 10 µg/mL calmodulina; Ca+CALM: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ + 10 µg/mL calmodulina; 48/80: 50 µg/mL componente 48/80; SAM: 1 mmol.L⁻¹ SAM; SAM+T: 1 mmol.L⁻¹ SAM + 5 mmol.L⁻¹ treonina; SAM+L: 1 mmol.L⁻¹ SAM + 5 mmol.L⁻¹ lisina; KCL1: 100 mmol.L⁻¹ KCl; KCL2: 200 mmol.L⁻¹ KCl; KCL3: 300 mmol.L⁻¹ KCl; KCL4: 400 mmol.L⁻¹ KCl; KCL5: 500 mmol.L⁻¹ KCl.....pg.74

FIGURA 10. Concentração de proteínas totais e óleo (A), lisina e metionina (B) de sementes de milho e sorgo. 1 – milho normal; 2 – milho opaco-2; 3 – milho QPM BR451; 4 – milho QPM BR473; 5 – milho Zeneca 8392; 6 – sorgo MASSA 03; 7 – sorgo IS111676; 8 – sorgo IS22204; 9 – sorgo IS16227; 10 – sorgo IS10477; 11 – sorgo IS11758; 12 – sorgo IS16199; 13 – sorgo IS25792; 14 – sorgo IS5603; 15 – sorgo IS16210. Desvio padrão: média de 5 repetições com 23 sementes cada análise.....pg.77

TABELA 1. Padrão de retroinibição da enzima AK isolada de plantas superiores. L = lisina, T= treonina, SAM = S-adenosilmetionina, LSAM = lisina + S-adenosilmetionina, LT = lisina + treonina, LM = lisina + metionina, LTM = lisina + treonina + metionina (Azevedo et al., 1997).....pg.07

TABELA 2. Protocolo para purificação parcial da AK a partir de 200 g de sementes imaturas de sorgo (estágio 2). Passos sequenciais de purificação da AK a partir de um dos vários experimentos.....pg.72

TABELA 3. Análise de variância para médias de concentrações (mg.mL^{-1}) das frações das proteínas de reserva de diferentes genótipos de sorgo ($\alpha = 0,05$).....pg.78

TABELA 4. Média de 2 repetições de ensaios realizados a partir de 1 g sementes de cada genótipo, referentes as concentrações (mg.mL^{-1}) das frações das proteínas de reserva de sementes de sorgo, determinadas pelo método de Lowry. GEN: Genótipos; M 03: MASSA 03; Alb: Albuminas; Glb: Globulinas; Kf1: Kafirinas 1; Kf2: Kafirinas 2; Glt: Glutelinas; T: Total....pg.79

TABELA 5. Análise de variância para médias de concentrações (nmol.mL^{-1}) dos aminoácidos solúveis de diferentes genótipos de sorgo ($\alpha = 0,05$).....pg.82

TABELA 6. Média das concentrações (nmol.mL^{-1}) dos aminoácidos solúveis lisina, treonina metionina e totais de sementes de sorgo. GEN: Genótipos; Lys: Lisina; Thr: Treonina; Met: Metionina.....pg.83

ABREVIATURAS

48/80 – componente 48/80

AAT – aspartato aminotransferase

AEC – S-2-aminoetil-L-cisteína

AK – aspartato quinase

AK-HSDH – isoenzima bifuncional com atividade de AK e HSDH

AS – asparagina sintetase

ASA – β -aspartil semialdeído

ASD - aspartato semialdeído desidrogenase

ask1 – gene de milho codificador da isoenzima AK monofuncional sensível a retroinibição por lisina

ask2 – gene de milho codificador da isoenzima AK monofuncional sensível a retroinibição por lisina

BSA – albumina de soro bovino

CALM – calmodulina

Coluna de Sephacryl S-200 – coluna preparativa para cromatografia de filtração em gel para separação de proteínas de 5 a 250 kDa

Coluna de Sephadex G-25 – coluna para cromatografia de filtração em gel com matriz de dextrano para separação de proteínas de 1 a 5 kDa

Coluna Superose 12HR 10/30 – coluna para cromatografia de filtração em gel de sistema FPLC

CS – cistationina γ -sintase

dapA – gene codificador da enzima DHDPS de *Corynebacterium*

coluna de DEAE-Sephacel – coluna preparativa para cromatografia de troca aniônica

DDC – diaminopimelato descarboxilase

DHDPS – dihidrodipicolinato sintase

DHPR – dihidrodipicolinato redutase

DTT – ditionitroreitol

EDTA – ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico

EGTA - Mg^{2+} etilenoglicol-bis-(β -aminoetil ter) N', N', N', N', - ácido tetracético

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

FPLC – Cromatografia líquida de rápida performance
 GH – hidrocloreto de guanidina
 g_n – padrão de aceleração devido a gravidade
 GOGAT – glutamato sintase
 GS – glutamina sintetase
 GUS – gene repórter (β -glucuronidase)
 Coluna HiPrep 16/10 Q XL – coluna para cromatografia de troca aniônica com resina de agarose
 HK – homoserina quinase
 HPLC – cromatografia líquida de alta performance
 HSDH – homoserina desidrogenase
 ICRISAT – International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
 LM – lisina + metionina
 LOR – lisina 2-oxoglutarato redutase
 LSAM – Lisina + s-adenosilmetionina
 LT – lisina + treonina
 LTM – Lisina + treonina + metionina
ltr1 – gene estrutural do loci da AKII
ltr2 – gene estrutural do loci da AKIII
lysC – gene mutante de *E. coli* codificador de AK
 MCW – solução de metanol, clorofórmio e água
 ME - β -mercaptoetanol
metL – gene de *E. coli* codificador da isoenzima AKII-HSDHII
 NIT – *near-infrared transmittance*
 OPA – *orto*-ftalaldeído
opaco-2 – gene mutante de endosperma de milho
 pAKHSDH1 – cDNA total do gene de milho codificador da isoenzima bifuncional AK-HSDH
 pAKHSDH2 – cDNA total do gene de milho codificador da isoenzima bifuncional AK-HSDH
 pAKHSDH3 – cDNA parcial do gene de milho codificador da isoenzima bifuncional AK-HSDH
 PCR – reação em cadeia da polimerase
 PMSF – fenilmetil sulfonil fluoreto
 PVPP – polivinilpoli-pirrolidona

QPM – *quality protein maize*

SAM – s-adenosilmetionina

SDH – sacaropina desidrogenase

SDS – detergente iônico dodecil sulfato de sódio

Southern blot – técnica de hibridização de DNA

TCA – ácido tricloroacético

TDH – treonina desidratase

thrA – gene de *E. coli* codificador da isoenzima AKI-HSDHI

TRIS – Tris (hidroximetil)-aminometano

TS – treonina sintase

ZLKRS DH – gene codificador de LOR-SDH de milho mutante opaco-2

RESUMO

Sementes de cereais não são boas fontes de aminoácidos essenciais, particularmente lisina e treonina, sintetizados a partir da via metabólica do ácido aspártico. Embora muitas enzimas desta via tenham sido estudadas em várias espécies de plantas superiores, o metabolismo de lisina e treonina ainda é totalmente desconhecido em sorgo. Neste trabalho, foram estudadas duas enzimas, aspartato quinase (AK) e homoserina desidrogenase (HSDH). Condições ótimas de ensaio foram estabelecidas para a determinação das atividades de AK e HSDH. Os maiores níveis de atividade foram observados em sementes imaturas de sorgo, utilizando-se para ambos ensaios 50 µL de amostra e um período de incubação de 10 à 30 min, dependendo da enzima a ser avaliada e da concentração de proteínas do extrato. Particularmente para HSDH, o co-fator mais efetivo para determinação de atividade foi o NADP. Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de filtração em gel foram os métodos de separação de proteínas utilizados para purificar e identificar as isoenzimas de AK e HSDH de sementes de sorgo. Dois picos de atividade de AK foram eluídos a partir de coluna de troca aniônica (DEAE-Sephacel) com 183 e 262 mmol.L⁻¹ KCl. Os dois picos foram fortemente inibidos por lisina. Com relação à HSDH, dois picos sobrepostos foram eluídos com 145 e 183 mmol.L⁻¹ KCl, sendo o primeiro pico resistente à inibição por treonina e o segundo sensível à inibição por este aminoácido. Entretanto, através de coluna cromatográfica de filtração em gel (Sephacryl S-200) foi observado um pico de atividade de AK co-eluído juntamente com o pico de HSDH, ambos sensíveis à inibição por treonina, sugerindo a presença de uma isoenzima bifuncional AK-HSDH em sorgo e a massa molecular dessa isoenzima foi estimada em 164 kDa. A AK foi purificada cerca de 30 vezes pelos métodos utilizados.

As atividades de AK e HSDH foram estudadas na presença de lisina, treonina, metionina, valina, cálcio, EGTA, calmodulina, SAM, AEC e concentrações crescentes de KCl. A AK foi inibida por treonina e lisina, confirmando a existência de duas isoenzimas, uma sensível à inibição por treonina e outra à inibição por lisina, sendo esta última predominante em sementes de sorgo. Metionina, SAM + lisina e AEC, também inibiram a atividade de AK, entretanto, KCl e cálcio também não promoveram alterações na atividade desta enzima, confirmando que a AK de sorgo não é regulada por cálcio. HSDH foi inibida por treonina indicando a existência de uma HSDH sensível à treonina, porém, a maior parte da atividade não foi inibida por treonina, confirmando a existência de uma segunda HSDH quantitativamente predominante, resistente à

inibição por treonina. Valina e SAM + treonina também inibiram a atividade de HSDH enquanto que KCl e cálcio não promoveram nenhuma alteração na atividade da enzima.

Com relação às proteínas de reserva de sorgo presentes nas sementes do híbrido comercial MASSA 03, foi observada alta concentração de glutelinas e baixa concentração de kafirinas, equivalentes às concentrações encontradas nos mutantes alta lisina. Semelhantemente, em relação aos aminoácidos solúveis, o sorgo MASSA 03, também apresentou concentrações compatíveis às dos genótipos mutantes alta lisina, sugerindo que este híbrido comercial também apresenta característica de alta lisina. Entretanto, para programas de melhoramento, o genótipo de sorgo mais viável seria o mutante IS16227, devido a seu alto desempenho no que diz respeito às proteínas de reserva e aminoácidos solúveis.

SUMMARY

Cereal seeds are poor sources of essential amino acids, in particular lysine and threonine, which are synthesized as part of the aspartic acid metabolic pathway. Many of the enzymes of this pathway have been studied in several higher plants species, however, the metabolism of lysine and threonine in sorghum is unknown. In this work were studied two of the enzymes of this pathway in sorghum, aspartate kinase (AK) and homoserine dehydrogenase (HSDH). Assay conditions were optimized for the determination of AK and HSDH activities. The highest levels of activity for both enzymes were observed from immature sorghum seeds using 50 μL of sample and an incubation period from 10 to 30 min. The co-factor that had the greatest effect on HSDH activity was NADP. To separate, purify and identify the various isoforms of the AK and HSDH from sorghum seeds, the extracts were subjected to ammonium sulphate precipitation, anion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. Two AK activity peaks at 183 and 262 mmol.L^{-1} KCl were eluted by anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel). Both of these activity peaks were strongly inhibited by lysine. For HSDH, two activity peaks were eluted at 145 and 183 mmol.L^{-1} KCl, with the first peak being resistant to threonine inhibition while the second was sensitive to threonine inhibition. However, through gel filtration chromatography (Sephacryl S-200), one peak of AK activity co-eluted with one peak of HSDH and both were sensitive to threonine inhibition, suggesting the presence of a bifunctional AK-HSDH isoenzyme in sorghum, with a molecular mass estimated as 164 kDa. Using these protein separation methods, AK was partially purified by 30-fold when compared to the crude extract.

The activities of AK and HSDH were studied in the presence of lysine, threonine, methionine, valine, calcium, EGTA, calmodulin, SAM, AEC and increasing concentrations of KCl. AK showed inhibition by threonine and lysine confirming the existence of two isoenzymes, one sensitive to threonine and the other sensitive to lysine, the latter being predominant in sorghum seeds. Methionine, SAM plus lysine and AEC also inhibited AK activity, however, increasing KCl concentrations and calcium did not produce any significant effect on AK activity, confirming that calcium does not play a role in AK regulation in sorghum seeds. HSDH also exhibited some inhibition by threonine, but the majority of its activity was not inhibited, thus indicating the existence of a threonine sensitive isoenzyme and a second predominant isoenzyme, which was resistant to threonine inhibition. Valine and SAM plus threonine also

inhibited HSDH, however, increasing concentrations of KCl and calcium had no inhibitory effect.

Regarding seed storage proteins of sorghum, the commercial hibrid MASSA 03 used in this study showed a high concentration of glutelins and a low concentration of kafirins similarly to what was described for several high lysine mutants lines. Furthermore, the concentration of soluble amino acids was also compatible to those of the high lysine mutant lines, which suggest that this commercial hibrid may also be considered as a high lysine sorghum.

Finally, for genetic improvement programs, the sorghum mutant genotype IS16227 should be evaluated due to its higher contents and quality of its seed storage proteins and soluble amino acid.

1. INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são os principais compostos nitrogenados das plantas e a base da síntese de proteínas e enzimas. Existem 20 diferentes aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, embora possam estar sujeitos a alterações tais como fosforilação, metilação e acetilação. Além daqueles que compõem as proteínas, mais de 300 aminoácidos adicionais foram caracterizados em plantas. Estes aminoácidos podem representar um papel vital como intermediários de uma via metabólica, como o caso da ornitina, homoserina ou cistationina. Além disso, também podem atuar como principal reserva de nitrogênio, como o caso da canavanina ou ainda podem ser sintetizados em resposta a agentes estressores, além de existir grande possibilidade de que alguns deles possam atuar como agentes inseticidas ou fungicidas (Azevedo et al., 1997; Molina et al., 2001; Lea & Azevedo, 2003).

Os seres humanos e os animais monogástricos não são capazes de sintetizar nove dos aminoácidos que compõem as proteínas, sendo eles, lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, leucina, valina e histidina, apesar de serem capazes de converter metionina a cisteína e fenilalanina a tirosina (Lea & Azevedo, 2003). Devido a esse fato, estes aminoácidos são denominados de essenciais e devem ser adquiridos através da dieta (Galili et al., 2002). Os vegetais e a maioria das bactérias e fungos têm a capacidade de sintetizar todos os vinte aminoácidos necessários à síntese protéica (Azevedo et al., 1997). Os aminoácidos podem ser classificados em famílias de acordo com a via de síntese em que estão envolvidos. Estas vias sofrem uma complexa regulação para que não haja desperdício de energia e de nutrientes importantes como carbono, nitrogênio e enxofre.

Normalmente, as enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos essenciais estão localizadas nos cloroplastos foliares ou nos plastídeos de órgãos não fotossintetizantes, tais como sementes e raízes (Lea & Azevedo, 2003). Quatro dos aminoácidos, lisina, treonina, metionina e isoleucina, são sintetizados em uma via ramificada com o aspartato como precursor comum (Rognes, 1990; Azevedo et al., 1997).

Na década de 90, pesquisas revelaram que as fontes de proteínas vegetais forneciam 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, com grãos de cereais representando 47%, enquanto que legumes, nozes e sementes oleaginosas somente 8%. As fontes protéicas vegetais em países desenvolvidos constituíam de baixa proporção em comparação com as fontes animais, porém eram a principal fonte de países em desenvolvimento (Millward, 1999). Entretanto, os

cereais são geralmente deficientes em lisina e treonina, e legumes em metionina. Devido às deficiências apontadas, tem sido de grande interesse o estudo da via de conversão do aspartato a lisina, treonina, metionina e isoleucina nesses vegetais (Azevedo et al., 1997).

O sorgo, por sua vez, é um importante cereal amplamente utilizado na alimentação animal, porém apresenta deficiência em lisina e treonina, sendo o metabolismo destes aminoácidos praticamente desconhecido nesta cultura. Neste contexto se insere este trabalho.

Para a obtenção de material nutritivamente superior que acumule estes aminoácidos, a manipulação genética de enzimas da via do ácido aspártico, particularmente neste caso, aquelas consideradas como chaves na regulação da biossíntese de lisina e treonina, pode ser de relevante importância.

Com base na literatura, consideramos a possibilidade das enzimas da via do aspartato apresentarem comportamentos similares as de outros cereais, onde para ocorrer acúmulo de lisina e treonina é necessário simultaneamente, aumentar a biossíntese e reduzir o catabolismo em sementes. Contudo, no processo de ensilagem a planta toda é utilizada e o acúmulo de lisina no grão poderia não ser necessário, mas apenas nas folhas, como já demonstrado para outros cereais, mas de qualquer forma a contribuição das sementes, compondo 30% do total da massa verde utilizada não deve ser desprezada. No entanto, será que esta linha de pensamento baseada em dados da literatura é verdadeira para sorgo?

No desafio para desvendar essa questão, foi proposto neste trabalho o estudo da via de biossíntese de lisina e treonina nesta planta, o qual será concentrado no isolamento e caracterização de duas das principais enzimas regulatórias desta via, a aspartato quinase (AK) e homoserina desidrogenase (HSDH).

2. OBJETIVOS

- Otimização das condições de ensaio das enzimas AK e HSDH;
- Verificar a presença das enzimas AK e HSDH em diferentes órgãos de plantas de sorgo;
- Purificar parcialmente as enzimas AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo;
- Isolar e caracterizar possíveis isoformas de AK e HSDH de sorgo;
- Verificar o efeito de aminoácidos, cálcio e outros efetores na atividade de AK e HSDH;
- Quantificação de proteínas de reserva em diferentes genótipos de sorgo;
- Quantificação de aminoácidos solúveis em diferentes genótipos de sorgo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Via metabólica do ácido aspártico

A asparagina é um dos principais componentes transportador e de reserva de nitrogênio nas plantas. Este composto é sintetizado pela transferência de um nitrogênio do grupo amida da glutamina para aspartato. A enzima asparaginase atua no metabolismo da asparagina formando aspartato e amônia, sendo que esta última é reassimilada através do ciclo glutamato sintase também conhecido como ciclo GS / GOGAT (Lea & Azevedo, 2003) (Figura 1).

O aspartato é o precursor comum da síntese dos aminoácidos essenciais treonina, lisina, metionina e isoleucina (Azevedo et al., 1997; Azevedo, 2002; Azevedo & Lea, 2001). Devido às baixas concentrações de lisina e treonina encontradas nas sementes dos cereais, várias pesquisas estão sendo realizadas no sentido de se obter maiores conhecimentos sobre o controle genético e bioquímico de cada ramo da via do ácido aspártico, que leva à biossíntese destes aminoácidos, para futura manipulação genética com a finalidade de se produzir plantas superprodutoras e acumuladoras de lisina e treonina nas sementes (Azevedo, 2002; Lea & Azevedo, 2003).

Inicialmente, a regulação da via do aspartato foi estudada com mais detalhes em plantas de *Lemna paucicostata*, onde o metabolismo de ^{14}C -aspartato foi monitorado na síntese de proteínas e dos aminoácidos solúveis lisina, treonina, metionina e isoleucina, na presença desses aminoácidos sozinhos e combinados (Giovanelli et al., 1989). A análise dos resultados obtidos permitiu algumas conclusões importantes: (1) a enzima aspartato quinase não foi a principal reguladora do fluxo de carbono da via; (2) dihidrodipicolinato sintase foi proposta como a enzima chave da síntese de lisina; (3) *in vitro*, a síntese de treonina não sofreu regulação; (4) evidências de que a cistationina γ -sintase é a enzima chave da síntese de metionina e (5) isoleucina inibiu a conversão de treonina à isoleucina, sendo que a enzima chave foi a treonina desidratase (Giovanelli et al., 1989).

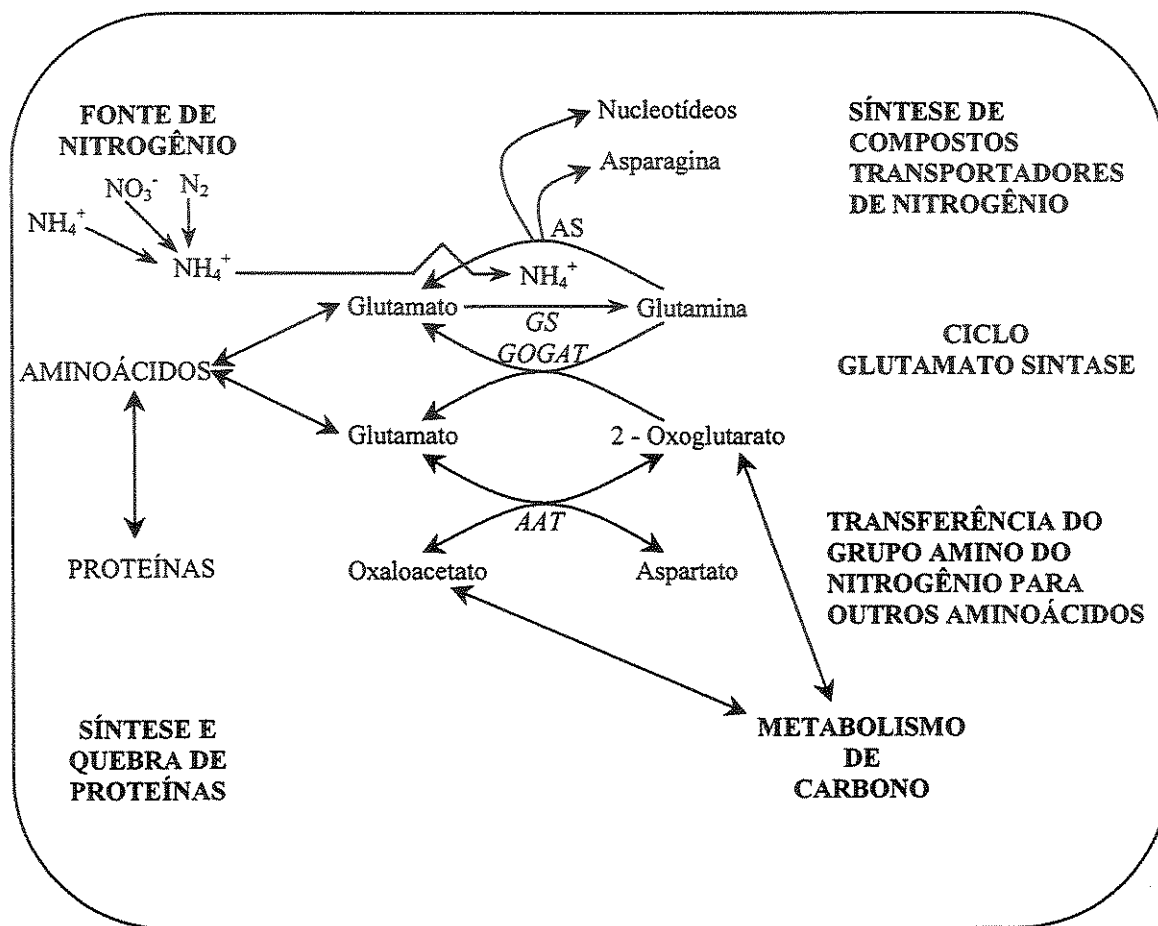


FIGURA 1. Reações enzimáticas importantes na assimilação de amônia. GS, glutamina sintetase; GOGAT, glutamato sintase; AS, asparagina sintetase; AAT, aspartato aminotransferase (Lea & Azevedo, 2003).

A aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), primeira enzima da via, catalisa a fosforilação do aspartato em β -aspartil fosfato, que por sua vez é convertido a β -aspartil semialdeído (ASA) em uma reação catalisada pela enzima aspartato semialdeído desidrogenase (EC 1.2.1.11). A partir deste ponto a via é dividida em dois ramos, um responsável pela biossíntese de lisina, enquanto que o outro ramo, após sofrer outra divisão subsequente, forma dois sub-ramos, sendo um deles responsável pela biossíntese de treonina e o outro pela biossíntese de metionina. O aminoácido lisina é sintetizado a partir do ASA após sete reações enzimáticas consecutivas iniciadas pela enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52). No outro ramo da via, ASA é reduzido a homoserina com NADPH ou com NADH servindo como um substrato (Azevedo &

Lea, 2001), em uma reação catalisada pela enzima homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3). A homoserina é fosforilada para *O*-fosfohomoserina pela ação da enzima homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39), a qual é convertida a treonina pela enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2) (Laber et al., 1999). Isoleucina é sintetizada a partir de treonina após uma sequência de cinco reações enzimáticas. A síntese do aminoácido metionina segue um ramo separado da via, iniciado a partir da *O*-fosfohomoserina seguindo três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationina γ -sintase (CS, EC 4.2.99.9), cistationina β -liase (EC 4.4.1.8) e metionina sintase (EC 2.1.1.13). S-adenosilmetionina (SAM), um dos principais doadores de grupos metil em plantas (Rognes et al., 1980), é sintetizada a partir de metionina em uma reação enzimática catalisada pela enzima S-adenosilmetionina sintase (EC 2.5.1.6) (Azevedo, 2002) (Figura 2).

A regulação da síntese de alguns aminoácidos por retroinibição foi descrita previamente em bactérias e plantas superiores. Estudos bioquímicos, moleculares e genéticos têm aumentado grandemente o conhecimento a respeito da regulação da via do aspartato, revelando que muitas enzimas presentes nos ramos desta via são positiva ou negativamente reguladas por retroinibição pelos aminoácidos produtos finais ou seus análogos (Azevedo & Lea, 2001) e por interações gênicas (Brennecke et al., 1996).

3.1.1. Aspartato quinase

A aspartato quinase (AK) foi inicialmente identificada, purificada e caracterizada em microrganismos, principalmente em estudos com *Escherichia coli*. Entretanto, em plantas, a AK é estudada há cerca de 35 anos e sua identificação, purificação e caracterização bioquímica realizada em alguns cultivares economicamente importantes tais como *Arabidopsis thaliana* (Azevedo et al., 1997), milho (Azevedo et al., 1992a,b,c), cevada (Bright et al., 1982), cenoura (Bonner et al., 1986), grão-de-bico (Dey & Guha-Mukhrjee, 1999), arroz (Teixeira et al., 1998), tabaco (Frankard et al., 1992), ervilha (Azevedo & Lea, 2001) e soja (Azevedo et al., 1997, Azevedo & Lea, 2001), entre outras (Tabela 1).

Vários graus de inibição da atividade de AK por retroinibição foram observados através de estudos utilizando aminoácidos como lisina, treonina e metionina. Diferentes isoenzimas mostraram ser inibidas por lisina, treonina ou sinergisticamente por lisina e SAM, sendo que esta última pode também inibir sozinha a atividade de AK ou pode, em altas concentrações, estimular sua atividade em *A. thaliana*, (Azevedo & Lea, 2001). Devido à retroinibição da atividade de

AK, os aminoácidos produtos finais lisina e treonina podem regular suas próprias sínteses (Azevedo et al., 1997).

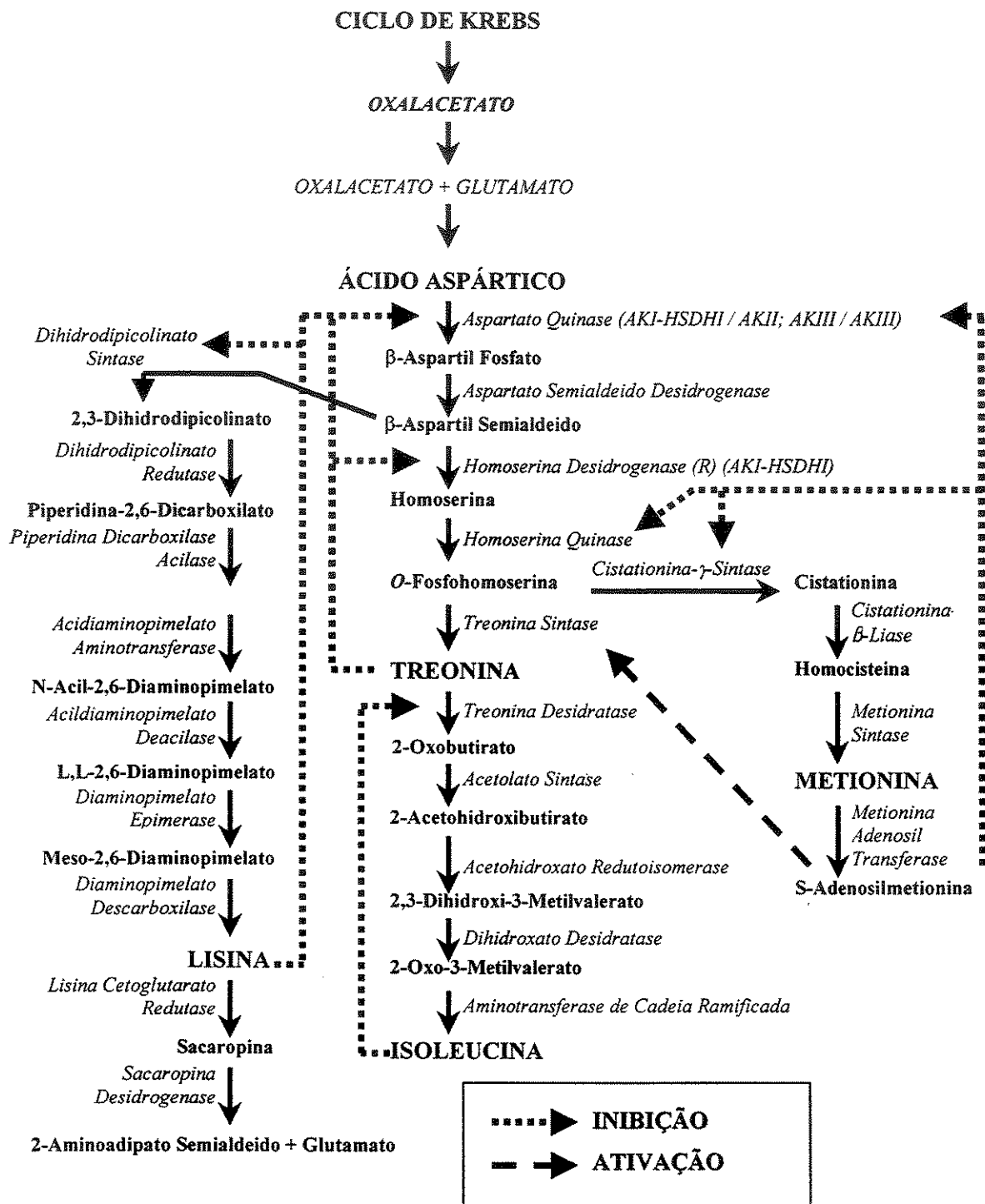


FIGURA 2 – Via metabólica do ácido aspártico.

Outro aspecto importante da regulação da AK muito estudado e que tem levado a muitas controvérsias, é a possibilidade de regulação da atividade enzimática por cálcio e calmodulina. Cálcio é conhecido como modulador da atividade de várias enzimas e como um importante mensageiro secundário na transdução de sinais em plantas (Dey & Guha-Mukhrjee, 2000; Lugli et al., 2000). Calmodulina, por sua vez, é considerada como o componente central de um complexo sistema em cascata de proteínas quinases que, interagindo com outros componentes, exerce controle sobre muitos dos metabólitos essenciais e funções fisiológicas da célula (Lugli et al., 2000).

TABELA 1. Padrão de retroinibição da enzima AK isolada de plantas superiores. L = lisina, T= treonina, SAM = S-adenosilmetionina, LSAM = lisina + S-adenosilmetionina, LT = lisina + treonina, LM = lisina + metionina, LTM = lisina + treonina + metionina (Azevedo et al., 1997).

PLANTA	RETROINIBIÇÃO
<i>Arabidopsis thaliana</i>	L, T
Cevada	L, T, LT, LM, LS, LSAM
Cenoura	L, T
Pepino	L, T, LT
<i>Lemna paucicostata</i>	L, T, LSAM
Milho	L, T, LT, LTM, LSAM, SAM
Mostarda	L, T
Aveia	L, T
Ervilha	L, T
Rabanete	L, T
Arroz	L, T, LT
Centeio	L, T, LT
Sorgo	L, T, LT
Soja	L, T
Espinafre	L, T
Girassol	L, T
Tabaco	L, LSAM
Trigo	L, T, LT

Diferentes estudos sugeriram que as isoenzimas de AK sensíveis a lisina e treonina são estimuladas por cálcio com calmodulina integrando a holoenzima como uma de suas subunidades. Em grão-de-bico e cevada, este modelo de regulação foi proposto. No entanto, em cenoura, milho e arroz, as isoenzimas de AK sensíveis a lisina e treonina não foram afetadas por cálcio, EGTA, calmodulina ou antagonistas de calmodulina. Além disso, sítios de ligação de

cálcio ou seqüências genéticas de calmodulina não foram relacionadas com a seqüência do gene da AK em muitas espécies de plantas. De maneira semelhante à da AK, a modulação da atividade de HSDH sensível a treonina de folhas de espinafre também foi relatada como sendo estimulada por cálcio (Azevedo et al., 1997; Azevedo & Lea, 2001; Azevedo, 2002).

A distribuição das isoenzimas de AK pode variar muito, dependendo do tecido vegetal e estágio de desenvolvimento. A isoenzima AK sensível à lisina aparece como predominante em células de tecidos de crescimento rápido (Lea et al., 1979; Bryan, 1990) e, em geral, chega a representar cerca de 80% da atividade total da enzima nas plantas estudadas, com exceção de *Coix lacryma-jobi* (Lugli et al., 2002), cotilédones e cultura de células de soja (Azevedo & Lea, 2001; Azevedo, 2002) e raízes de cenoura, onde a isoenzima AK sensível a treonina representa 60 a 70% da atividade total de AK (Azevedo et al., 1997; Azevedo, 2002).

Estudos a partir de cromatografia de troca aniônica e filtração em gel forneceram os melhores meios de separação e purificação das isoenzimas de AK (Azevedo & Lea, 2001). Em folhas de cevada, três picos de atividade da enzima foram eluídos em coluna de DEAE-celulose, sendo o primeiro pico referente à isoenzima da AK sensível à inibição por treonina, denominada de AKI e os outros dois picos, um referente à isoenzima sensível à inibição por lisina e o outro por lisina mais SAM, denominadas de AKII e AKIII, respectivamente. Em milho, duas isoenzimas de AK sensíveis a lisina foram eluídas em colunas de cromatografia de troca aniônica, sendo que a isoenzima sensível à treonina se sobrepôs ao primeiro pico, referente a AK sensível a lisina (Azevedo et al., 1997).

A determinação da massa molecular das isoenzimas da AK foi realizada em muitas plantas e revelou algumas variações entre as espécies (Azevedo & Lea, 2001). Foram relatadas massas de valores 104 kDa, 124 kDa e 140 kDa para a isoenzima AK sensível à lisina de milho quando analisada por eletroforese não desnaturante (PAGE) e 254 kDa por cromatografia de filtração em gel (Dotson et al., 1989). Em outro trabalho com milho, também foram relatadas diferentes massas moleculares para esta isoenzima, variando de 139 kDa por PAGE não desnaturante e 150 kDa por cromatografia de filtração em gel. As subunidades que compõem esta isoenzima foram relatadas como possuindo massas de 49 kDa e 60 kDa através de SDS-PAGE (Azevedo et al., 1992a). A AK sensível à lisina de cenoura, também mostrou considerável variação na massa molecular quando determinada por diferentes métodos, variando de 100 kDa a

253 kDa (Relton et al., 1988; Azevedo & Lea, 2001), enquanto que a isoenzima da AK sensível à treonina apresentou uma massa de aproximadamente 180 kDa (Azevedo et al., 1997).

3.1.2. Homoserina desidrogenase

A homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) está localizada principalmente nos cloroplastos e foi caracterizada inicialmente em procariotos, principalmente em *E. coli*, a qual foi inibida por treonina (Azevedo & Lea, 2001). Esta enzima foi muito estudada em extratos brutos ou parcialmente purificados de plantas superiores. Duas isoenzimas de HSDH, uma sensível (HSDH-S) e outra resistente à inibição por treonina (HSDH-R) foram observadas em plantas e purificadas até a homogeneidade em culturas de células em suspensão e plântulas de milho. As duas isoenzimas apresentaram grandes diferenças em relação a massa molecular. Para a HSDH resistente à treonina foi determinada uma massa de 70 kDa e para a isoenzima sensível à treonina uma massa de 190 kDa. A atividade da isoenzima alostérica da HSDH sensível a treonina pode ser facilmente alterada e está envolvida na biossíntese de aminoácidos, enquanto que a função fisiológica da isoenzima citoplasmática resistente a treonina permanece desconhecida (Azevedo et al., 1997).

Em *E. coli*, três isoenzimas de AK foram identificadas e duas delas também apresentaram atividade de HSDH. Esta proteína bifuncional AKI-HSDHI foi inibida por treonina enquanto AKII-HSDHII foi inibida por metionina. A terceira isoenzima, AKIII que apresentou somente atividade de AK, foi inibida por lisina (Azevedo et al., 1997).

Em plantas, foi relatada a existência de uma proteína bifuncional contendo atividades de AK e HSDH (Aarnes & Rognes, 1974). Em cenoura porém, o padrão de inibição por retroinibição não foi determinado, sendo observadas muitas semelhanças entre a seqüência de aminoácidos da AKI-HSDHI de *E. coli* e a isoenzima de cenoura (Wilson et al., 1991). Em milho, também foram obtidas evidências bioquímicas da co-purificação de AK sensível a treonina e HSDH (Azevedo et al., 1992b). Todos estes estudos estão de acordo com os resultados inicialmente obtidos em ervilha, onde se encontrou a primeira evidência em plantas da existência de uma proteína bifuncional contendo atividade AK sensível a treonina e HSDH semelhantemente ao encontrado em *E. coli* (Azevedo et al., 1997; Azevedo & Lea, 2001; Paris et al., 2002).

3.1.3. Dihidrodipicolinato sintase

A primeira enzima da biossíntese de lisina, dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52), catalisa a condensação do piruvato e aspartato semialdeído para ácido dihidrodipicolínico (figura 2). A DHDPS foi purificada e caracterizada aos níveis bioquímicos e moleculares em plantas, mostrando ser sensível à inibição por lisina em baixas concentrações. Vários estudos apontam que o passo regulatório chave na biossíntese de lisina é a DHDPS (Vauterin et al., 1999). Apenas uma forma dessa enzima foi detectada em plantas, ao contrário da AK e HSDH, as quais possuem diferentes isoenzimas. Em trigo, por exemplo, uma única DHDPS de 123 kDa foi identificada e separada em quatro polipeptídeos variando de 32 kDa a 35 kDa através de cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência (Kumpaisal et al., 1987). Diferentes massas moleculares de DHDPS têm sido observadas, variando de 115 kDa em espinafre, 127 kDa em ervilha, 130 kDa em milho e 167 kDa em tabaco (Azevedo & Lea, 2001).

Em *Nicotiana sylvestris*, a estrutura da DHDPS foi confirmada como sendo um tetrâmero, com maior sensibilidade à lisina quando comparada a *E. coli*. Dois clones de cDNA que codificam duas subunidades 35 kDa e 36 kDa da DHDPS foram primeiramente isolados em trigo. A sequência de aminoácidos mostrou uma homologia de 94% (Kaneko et al., 1990). Um clone de cDNA de DHDPS de milho foi isolado e mostrou codificar uma proteína de 35,8 kDa, com 86 a 88% de homologia com a sequência de aminoácidos de trigo (Frisch et al., 1991). Por mutagênese, foram obtidos e selecionados alguns mutantes de milho que expressam uma DHDPS de *E. coli*, os quais se mostraram resistentes à s-2-aminoetil-L-cisteína (AEC). A substituição de um único aminoácido nas posições 157, 162 e 166, revelou eliminar a inibição por lisina da enzima por retroinibição. Clones de cDNA codificando DHDPS também foram isolados em soja, álamo e *A. thaliana*. No entanto, apenas 74% das sequências de aminoácidos idênticas foram detectadas entre as proteínas de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Silk et al., 1994). Todos os clones de cDNA de DHDPS mostraram conter os mesmos peptídeos sinais de plastídeos, confirmando a localização da enzima no cloroplasto. Em trabalhos mais recentes, as 900 bases da região *upstream* da sequência do promotor do gene de *A. thaliana* foi utilizado para estudos de expressão do gene repórter *GUS* em *A. thaliana* e *N. sylvestris* (Vauterin et al., 1999). A DHDPS foi expressa no meristema e tecido vascular das raízes, caules e folhas, em particular nas células companheiras do floema, mas não nas células palissádicas fotossinteticamente ativas de folhas maduras (Azevedo & Lea, 2001). Os estudos de localização da DHDPS estão de

acordo com os dados obtidos à partir dos genes que codificam as isoenzimas AK-HSDH (Zhu-Shimoni et al., 1997; Zhu-Shimoni & Galili, 1998).

3.1.4. Enzimas ASD, DHPR e DDC

Existem algumas outras enzimas relacionadas à via do aspartato bem menos estudadas em plantas, como é o caso da (1) aspartato semialdeído desidrogenase (ASD, EC 1.2.1.11), responsável pela redução, dependente de NADPH, do aspartil fosfato para aspartato semialdeído; (2) dihidrodipicolinato redutase (DHPR, EC 1.3.1.26), que catalisa a redução do ácido dihidrodipicolínico para ácido tetradipicolínico e (3) diaminopimelato descarboxilase (DDC, EC 4.1.1.20), que catalisa a descarboxilação, dependente de fosfato, do ácido *meso*-diaminopimélico para lisina (Azevedo & Lea, 2001).

ASD, parcialmente purificada a partir de tecidos de milho, exibiu alta atividade e mostrou ser resistente à inibição por lisina, treonina e isoleucina, porém, foi muito sensível à inibição por metionina. No caso da DHPR, essa enzima também foi parcialmente purificada em milho e apresentou sensibilidade à inibição por ácido dipicolínico e por nucleotídeos pirimidinas oxidados. Uma massa molecular de 84 kDa foi determinada para DHPR e tal como para ASD, estudos detalhados somente foram conduzidos em microrganismos. Semelhantemente, a enzima DDC também foi purificada e isolada em algumas espécies de plantas (Tyagi et al., 1983), exibindo grande similaridade em suas propriedades químicas e físicas entre as plantas estudadas, porém grandes diferenças foram encontradas em relação as enzimas bacterianas (Azevedo & Lea, 2001).

3.2. Genes da AK e HSDH

Atualmente, a maior parte dos resultados sobre o papel da AK e HSDH em plantas tem sido obtidos por meio de análises moleculares. O gene que codifica a isoenzima AK-HSDH bifuncional de cenoura foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNAs, onde um fragmento amplificado de cDNA permitiu a identificação de dois clones parcialmente sobrepostos (Weisemann & Matthews, 1993). Utilizando o cDNA de cenoura como sonda, a partir de uma biblioteca de cDNA de soja, os clones foram isolados e a comparação das seqüências de cDNA de cenoura e soja mostraram uma homologia superior a 85% e uma homologia maior ainda em

relação ao gene *thrA* de *E. coli* codificador da isoenzima AKI-HSDHI do que em relação ao gene *metL* codificador da isoenzima AKII-HSDHII (Azevedo et al., 1997).

A determinação da sequência genômica da isoenzima AK-HSDH de plantas foi primeiramente relatada em *A. thaliana*. O gene da AK-HSDH de cenoura foi utilizado para isolar os genes análogos de uma biblioteca de DNA genômico de *A. thaliana*. Os resultados das sequências de ácidos nucleicos revelaram a presença de 2 elementos regulatórios na região *upstream*, um peptídeo sinal de cloroplasto e uma sequência homóloga a encontrada na enzima γ -glutamil quinase (Hu et al., 1992).

Recentemente, foi relatado o isolamento de um cDNA de AK-HSDH de *A. thaliana* pelo complemento funcional de um mutante de levedura. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos diferiram consideravelmente das relatadas previamente, sugerindo que há pelo menos dois genes diferentes que codificam a enzima em *A. thaliana* (Azevedo et al., 1997).

Outro estudo recente caracterizou os genes de milho que codificam AK-HSDH. Os cDNAs totais, pAKHSDH1 e pAKHSDH2 e o cDNA parcial pAKHSDH3, apresentaram grande homologia com as enzimas monofuncionais AK e HSDH de procariotos e *Saccharomyces cerevisiae* e com as proteínas bifuncionais AK-HSDH de procariotos, levedura, cenoura e *A. thaliana* (Muehlbauer et al., 1994). Características de retroinibição revelaram que tanto a AK como a HSDH foram inibidas por treonina. AKI-HSDHI e AKII-HSDHII que continham peptídeos sinais, confirmaram a localização das duas enzimas no cloroplasto. Os dados genéticos das enzimas de milho revelaram a existência de pelo menos 5 genes que codificam AK, 3 que codificam AK-HSDH bifuncional e 2 que codificam AK monofuncional. pAKHSDH1 e pAKHSDH2 foram mapeados no braço longo do cromossomo 4 e no braço curto do cromossomo 2, enquanto que os genes *ask1* e *ask2* codificadores das isoenzimas de AK sensíveis a lisina monofuncionais foram mapeados no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 2 (Azevedo & Lea, 2001). Foi relatado também, o isolamento de um clone de cDNA de uma biblioteca de *A. thaliana*, codificador de uma isoenzima monofuncional de AK através da utilização de fragmentos de PCR homólogos como sonda hibridizadora. A ausência de um gene de HSDH codificador da região carboxiterminal do peptídeo sugeriu que o cDNA codifica para enzima sensível a lisina. Análises de *Southern blot* indicaram a existência de 2 formas do gene presentes em *A. thaliana* e a massa molecular das subunidades das enzimas

individuais foi estimada em 52,5 kDa e os mRNAs foram intensamente expressos em caule, folhas e órgãos florais (Azevedo et al., 1997; Azevedo & Lea, 2001).

A análise de todos esses resultados mostrou muita similaridade entre a regulação da via em plantas e microrganismos em vários aspectos, tais como a regulação por retroinibição pelos aminoácidos produtos finais, a presença de diferentes conjuntos de isoenzimas, a existência de uma proteína bifuncional e o isolamento de mutantes superprodutores de aminoácidos (Azevedo et al., 1997).

3.3. Mutantes bioquímicos

O aumento do valor nutricional de plantas cultivadas, foi reconhecido há muito tempo, como absolutamente necessário. O aminoácido essencial lisina está presente em baixíssimas concentrações em sementes de cereais e a necessidade de aumentá-lo, tem encorajado inúmeros grupos de pesquisa a investigarem o metabolismo de lisina (Azevedo, 2002).

Quatro estratégias são utilizadas para se tentar produzir plantas com altas concentrações de lisina: melhoramento vegetal convencional, identificação de mutantes naturais, indução de mutantes bioquímicos e produção de plantas transgênicas (Azevedo & Lea, 2001).

Os programas de melhoramento vegetal convencional foram utilizados para selecionar plantas com qualidades protéicas melhoradas e vários estudos têm documentado variabilidade para concentração de lisina entre genótipos de milho (Garcia & Souza Jr, 2002). Esta técnica é mais dificultada devido à necessidade de investimentos a longo prazo e demanda de muito tempo para encontrar progressos (Azevedo & Lea, 2001; Azevedo, 2002).

A utilização de mutantes naturais também foi muito importante para se tentar obter novas variedades com altos níveis de lisina. A identificação de alguns mutantes de cevada alta lisina (Munck, 1992) e principalmente do mutante de milho opaco-2, foram algumas das mais importantes descobertas, porém estes exibiram características agrônômicas indesejáveis. Tais problemas somente começaram a serem superados com o desenvolvimento do milho QPM (Azevedo & Lea, 2001). Este assunto será mais discutido em detalhes à frente.

A seleção de mutantes bioquímicos foi relatada como sendo uma importante ferramenta no aumento da qualidade nutricional de algumas plantas e tem ajudado no entendimento da regulação da via. Vários mutantes foram isolados em plantas através da utilização de técnicas de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro*. Alguns destes mutantes apresentaram

padrões regulatórios alterados de enzimas que são menos sensíveis ou insensíveis à inibição pelos próprios aminoácidos produtos finais da via biossintética ou seus análogos (Azevedo et al, 1997).

Tais mutantes podem ser obtidos através do cultivo de células tratadas com agentes mutagênicos, em meio sólido e líquido contendo agentes seletivos que inibem o crescimento. As células que eventualmente se desenvolvem em tais condições podem conter mutantes com enzimas alteradas em suas características regulatórias (Azevedo & Lea, 2001). Em cevada, outra técnica para a seleção de mutantes bioquímicos induzidos foi muito eficiente. O sistema envolveu o tratamento de sementes com um componente mutagênico, normalmente azida sódica (Bright et al., 1982a). Embriões de sementes de milho maduros derivados de sementes tratadas com agentes mutagênicos foram plaqueados em meio sólido contendo agentes seletivos e de uma maneira similar à cultura de tecidos acima referida e os mutantes que se desenvolveram, foram selecionados (Azevedo & Lea, 2001). Independentemente do procedimento adotado, as plantas selecionadas devem ser mais estudadas a níveis bioquímicos e genéticos seguido de análises agronômicas completas (Azevedo, 2002).

Vários mutantes foram obtidos por este procedimento. Em milho, foram selecionadas linhas de células resistentes à inibição por lisina + treonina e produziram duas linhas estáveis, LT19 e LT20, que apresentaram resistência à inibição por treonina e lisina como característica dominante (Azevedo et al., 1997). Estes mutantes exibiram altos níveis de treonina mas não de lisina no endosperma (Hibberd & Green, 1982). Constatou-se que os genes denominados *ask1* e *ask2* codificam isoenzimas de AK sensíveis à lisina, as quais, nos mutantes foram insensíveis à inibição pelo aminoácido. Um duplo mutante LT19/opaco-2 exibiu um efeito sinérgico no aumento de treonina solúvel (144 vezes), no total de aminoácidos solúveis (3 vezes) e na concentração das proteínas de reserva do endosperma. Outras análises com o duplo mutante revelaram um aumento da atividade da AK em comparação com o selvagem, sugerindo que o gene *opaco-2* possa regular o gene *ask1*. Mais recentemente, a análise de variedades QPM em comparação com o mutante *opaco-2* e variedades selvagens, confirmaram essa possível ação reguladora (Azevedo & Lea, 2001).

Mutantes resistentes à inibição por lisina mais treonina também foram isolados e caracterizados em outras espécies de plantas. Em cevada, por exemplo, os mutantes R3004, R2502 e R3202, apresentaram diferentes padrões de inibição. No mutante R3004, AKIII foi

menos sensível à inibição por lisina enquanto que AKII foi totalmente insensível à inibição por este aminoácido em R2502 e R3202. As mutações levaram a uma superprodução de treonina solúvel (de 15 a 70 vezes) e produção menos intensa de lisina. Análises genéticas revelaram que os dois genes *ltr1* e *ltr2* são estruturais do loci da AKII e AKIII (Azevedo et al., 1997).

Um mutante de *A. thaliana* (RLT40) resistente à inibição por lisina mais treonina, exibiu aumento de 6 vezes na concentração de treonina solúvel, o que se deu também devido à insensibilidade parcial da isoenzima AK sensível à lisina, enquanto que a isoenzima da AK sensível à treonina não sofreu alteração no padrão de retroinibição por treonina. Um segundo mutante (RL4) contendo uma isoenzima da AK sensível à treonina modificada, mostrou um pequeno aumento de lisina (Azevedo et al., 1997), mas um duplo mutante (RLT40/RL4), não exibiu nenhum aumento na produção de lisina ou treonina. A superprodução e o acúmulo de treonina (45 a 70 vezes), foi observado em um mutante de tabaco (RLT70) que apresentou uma AK totalmente insensível à inibição por este aminoácido (Azevedo et al., 1997). Geralmente as alterações no padrão de inibição por retroinibição das isoenzimas da AK não resultaram no acúmulo de lisina, mas apenas de treonina (Shaul & Galili, 1993; Azevedo & Lea, 2001).

Estes resultados indicaram que a enzima DHDPS pode ser o principal ponto regulatório para obtenção de mutantes superprodutores de lisina. No intuito de se obter mutantes com uma DHDPS insensível à retroinibição por lisina, mutantes foram obtidos utilizando lisina e AEC como agentes seletivos. Mutantes de *A. thaliana*, cevada, milho, batata e trigo resistentes à AEC apresentaram resultados muito similares, com nenhum deles exibindo alterações expressivas na concentração de lisina solúvel, e em muitos casos a resistência foi atribuída à absorção reduzida de AEC pelo sistema radicular (Azevedo, 2002). Porém, um mutante de tabaco resistente à AEC (RAEC-1) foi obtido, contendo uma DHDPS completamente insensível à inibição por lisina. O mutante exibiu um aumento de 28 vezes na quantidade de lisina solúvel nas folhas. Através do cruzamento do RAEC-1 com o mutante RLT70 resistente à lisina + treonina, produzindo um duplo mutante contendo uma AK e uma DHDPS insensíveis à inibição por lisina, os quais revelaram uma superprodução de lisina solúvel representando mais de 50% do total de aminoácidos solúveis (Frankard et al., 1992). Infelizmente um fenótipo anormal esteve associado ao acúmulo de lisina em folhas. Os dados obtidos confirmaram que a DHDPS normalmente exerce um controle sobre a biossíntese de lisina, formando um dreno de aspartato semialdeído

para lisina (Azevedo & Lea, 2001) e direcionando moléculas de carbono para a biossíntese de treonina (Azevedo, 2002).

3.4. Plantas transgênicas

Baseado na mesma idéia de desregular o padrão de inibição por retroinibição da AK e DHDPS, o desenvolvimento de técnicas de transformação de plantas permitiu a produção de plantas transgênicas expressando enzimas AK e DHDPS insensíveis à inibição por lisina, oferecendo uma nova estratégia para melhorar a produção de lisina e treonina (Azevedo, 2002). Pesquisas iniciais foram conduzidas com plantas de tabaco transgênicas expressando uma enzima DHDPS de *E. coli* nos cloroplastos, que foi menos sensível à inibição por lisina do que a enzima endógena da planta. A superprodução de lisina solúvel e o acúmulo nas folhas foram observados e relacionados com os níveis de atividade da DHDPS (Azevedo & Lea, 2001).

Similarmente, outra linha de tabaco transgênico foi produzida expressando uma isoenzima mutante de AK insensível à lisina de *E. coli* no citoplasma e cloroplastos (Shaul & Galili, 1992). Como observado nos mutantes bioquímicos contendo AK insensível à inibição por lisina, treonina solúvel foi superproduzida e acumulada em ambos os tipos de plantas transgênicas, mas em altas concentrações quando AK foi direcionada para o cloroplasto. A síntese de lisina e treonina foi demonstrada estar sob regulação combinada pela AK, DHDPS e HSDH, quando plantas transgênicas de tabaco expressando as enzimas AK e DHDPS de *E. coli* exibiram grandes concentrações de lisina solúvel acompanhada pela redução de treonina, quando comparada com as plantas de tabaco transgênicas expressando separadamente DHDPS e AK, respectivamente. As variações nas concentrações de lisina e treonina poderiam ser explicadas pela competição entre DHDPS e HSDH por aspartato semialdeído, substrato comum de ambas (Shaul & Galili, 1993).

Plantas transgênicas de tabaco contendo o promotor da AK-HSDH foram recentemente produzidas e utilizadas no estudo da regulação molecular desta isoenzima. A expressão do gene repórter *AK-HSDH-GUS* foi mostrada estar sujeita a regulação espacial e temporal em tecidos vegetativos, flores e sementes em desenvolvimento. Análises similares foram realizadas em *A. thaliana* na qual constatou-se que o gene repórter *AK-HSDH-GUS* é regulado metabolicamente pelos metabólitos relacionados à fotossíntese, sacarose e fosfato, mas não pelos compostos nitrogenados (Frankard et al., 1991).

Uma estratégia semelhante foi empregada em cevada, soja e canola. Em cevada, altas concentrações de lisina e metionina em plantas transgênicas expressando DHDPS e AK de bactérias foram detectadas. DHDPS codificada pelo gene *dapA* de *Corynebacterium* e AK codificada pelo gene mutante *lysC* de *E. coli* foram marcadas no cloroplasto e expressas a partir de um promotor específico de sementes em soja transgênica e canola (Falco et al., 1995). Em ambas as plantas, um grande aumento na concentração de lisina solúvel foi observado em sementes com acúmulo de ácido aminoadípico em canola e sacaropina em soja (Azevedo & Lea, 2001).

Em geral, uma produção superior de lisina pôde ser obtida pela alteração da sensibilidade da DHDPS à lisina, porém, o acúmulo deste aminoácido em sementes de cereais necessita também da manipulação da LOR e SDH, devido a cinco pontos importantes: (1) todos os cereais mutantes ou transgênicos não exibiram nenhum acúmulo significativo de lisina nas sementes, mas apenas em outros tecidos; (2) as enzimas de degradação de lisina, LOR e SDH, são específicas de endosperma apenas em cereais; (3) o mutante *opaco-2*, que exibiu altas concentrações de lisina solúvel e incorporada em proteínas nas sementes, foi mostrado conter várias vezes menos atividades de LOR e duas vezes menos de SDH quando comparado ao milho selvagem. Esta redução na atividade no mutante *opaco-2* deveu-se à redução na concentração protéica de LOR-SDH pela diminuição da transcrição do gene *ZLKRSDH*. Além disso, constatou-se que o gene *opaco-2* do milho regula a atividade de AK e LOR; (4) intermediários do catabolismo de lisina acumulados nas sementes de plantas de soja e canola que superexpressam lisina, sugerem a presença de atividades de LOR e SDH reduzidas. (5) entre os cereais e embora ainda abaixo dos valores recomendados pela FAO, o arroz exibiu a mais alta concentração de lisina, com baixas atividades de LOR e SDH. Também, em *Phaseolus vulgaris*, as atividades de LOR e SDH mostraram ser 10 vezes mais baixas que em endosperma de milho (Azevedo & Lea, 2001).

Ao contrário da lisina, a superprodução e o acúmulo de treonina pode ser obtido através da alteração da sensibilidade da AK à lisina. O acúmulo de treonina em todos os tecidos, incluindo sementes, sugere que a degradação de treonina não está sob rigoroso controle (Azevedo & Lea, 2001).

Como já mencionado anteriormente, o principal problema nutricional de sementes de cereais é a deficiência em lisina. Baseado em informações obtidas em 30 anos de estudos da via

metabólica do aspartato, foi sugerido que a superprodução e acúmulo deste aminoácido poderiam ser obtidos pela combinação da manipulação genética da biossíntese e degradação de lisina. Tal sugestão foi baseada principalmente no fato de que a manipulação das enzimas envolvidas na biossíntese não produziu acúmulo de lisina em sementes de cereais. Isto poderia ser explicado pelo fato de que plantas leguminosas e o mutante de milho opaco-2 exibiram uma acentuada redução na taxa de degradação de lisina em sementes, permitindo a incorporação do excesso do aminoácido nas proteínas de reserva e acúmulo da forma solúvel no endosperma (Azevedo, 2002).

3.5. Milho opaco-2 e QPM

O mutante natural de milho opaco-2, caracterizado como alta lisina, começou a ser estudado na década de 60 (Mertz et al., 1964). Esta mutação conferiu um fenótipo opaco ao grão e um endosperma farináceo. A alta concentração de lisina observada no endosperma ocorreu devido a um aumento na concentração de lisina solúvel e nas frações das proteínas de reserva que possuíam maiores níveis deste aminoácido, enquanto que nas prolaminas, os níveis de lisina foram diminuídos (Lefèvre et al., 2002). Além disso, várias outras características do grão opaco-2, tais como níveis de atividade de RNase e das enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio, foram também alteradas quando comparadas ao genótipo selvagem. Redução na protandria e alterações na atividade fotossintética também foram observadas nas plantas opaco-2. Como consequência da estrutura da semente e da qualidade nutricional, as plantas de milho opaco-2 apresentaram reduzida produtividade e os grãos, maior susceptibilidade a patógenos, fatos que levaram a um inicial descrédito em se continuar pesquisando este mutante. Tais problemas, somente começaram a serem superados com a introdução de genes modificadores do fenótipo opaco que permitiram o desenvolvimento de uma boa produtividade de grãos em linhas de milho opaco-2, que também exibiram as características de alta lisina e triptofano, porém com um fenótipo diferenciado translúcido, o qual foi denominado de *quality protein maize* (QPM) (Gaziola et al., 1999). Linhagens QPM foram incluídas em programas de melhoramento de milho e vários híbridos foram produzidos e introduzidos no mercado de sementes (Vasal, 1994). Aspectos agrônômicos, tais como dureza dos grãos e produtividade entre outros, foram investigadas para as diferentes variedades QPM (Azevedo, 2002).

O gene *opaco-2* foi estudado em detalhes. Um ativador transcricional foi codificado pelo gene *opaco-2*. Formas multifosforiladas de proteínas do *opaco-2* e os níveis de transcritos do gene *opaco-2* estão sujeitos a mudanças diurnas (Ciceri et al., 1997). Vários genes pertencentes a diferentes vias metabólicas tais como glicólise, biossíntese de aminoácidos e proteínas de reserva, foram diretamente ou indiretamente marcados no gene *opaco-2* (Azevedo, 2002).

Análises moleculares e bioquímicas também confirmaram que o gene *opaco-2* regula a atividade de LOR no endosperma de milho (Arruda et al., 2000). No mutante *opaco-2*, a quantidade de proteínas e mRNAs de LOR foram reduzindo de acordo com o padrão de expressão durante o desenvolvimento do grão. Além disso, a presença de caixas de *opaco-2* foram observadas na região regulatória 5', confirmando o controle transcricional do gene codificador de LOR-SDH pelo gene *opaco-2* (Arruda et al., 2000). Abordagens por transcriptoma e proteoma sobre o papel regulatório do gene *opaco-2* confirmaram um sítio de restrição na extremidade 3' do gene *opaco-2* associado com a quantidade de mRNAs de LOR-SDH (Lefèvre et al., 2000). As variedades QPM exibiram menores atividades de LOR e SDH quando comparadas ao tipo selvagem, mas também quando comparadas ao mutante *opaco-2*. Porém, em relação ao metabolismo de lisina, o efeito do gene *opaco-2* não foi restrito à degradação de lisina, mas também envolveu a biossíntese deste aminoácido. Análise de aminoácidos totais e solúveis, proteínas de reserva e atividade enzimática de um duplo mutante *opaco-2/ask1* (gene codificador de AK sensível a lisina), indicaram que o gene *ask1* pode ser regulado pelo gene *opaco-2* (Brennecke et al., 1996). Além disso, análises genéticas mapearam o gene *ask1* ligado ao *opaco-2*. Outras evidências sobre o papel regulatório do gene *opaco-2* em relação às isoenzimas da AK foram recentemente relatadas baseada na característica quantitativa do locus no cromossomo 2, o qual está ligado ao loci codificador AK2 e AK-HSDH2 (Wang & Larkins, 2001). Estudos bioquímicos indicaram que a AK insensível à lisina é um candidato para a característica quantitativa do locus afetando o conteúdo de aminoácidos solúveis no milho *opaco-2* (Azevedo, 2002).

Embora esteja muito clara a importância do milho mutante *opaco-2* para o entendimento do metabolismo de lisina, outros mutantes alta-lisina de milho, como o *floury* e outras espécies vegetais disponíveis há muito tempo, nunca foram investigadas com relação ao metabolismo de lisina. Isto aumenta a necessidade de se estudar o metabolismo de lisina e sua regulação em tais genótipos. Um projeto de pesquisa está sendo conduzido no laboratório de Genética Bioquímica

de Plantas (ESALQ/USP), sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, com a finalidade de se estudar o metabolismo de lisina, treonina e metionina em mutantes alta-lisina de milho, sorgo e cevada. Por exemplo, endospermas em desenvolvimento dos milhos mutantes *opaco-1*, *opaco-5*, *opaco-7*, *opaco-10*, *opaco-11*, *opaco-13*, *floury-1*, *floury-2* e *floury-3* estão sendo caracterizados para as atividades de AK, HSDH, DHDPS, LOR e SDH e expressão gênica. Além disso, a distribuição das proteínas de reserva, concentrações de aminoácidos totais e solúveis em sementes maduras e em desenvolvimento estão também sendo caracterizadas (Azevedo, 2002).

Resultados iniciais revelaram variações entre os mutantes em relação ao tipo selvagem e os genótipos de milho *opaco-2* para as enzimas envolvidas no metabolismo de lisina. Embora algumas variações significativas tenham sido verificadas entre as linhas de milho selvagens e as melhoradas para AK e HSDH, interessante, alguns mutantes de alta lisina apresentaram taxas similares de degradação de lisina quando comparadas aos seus respectivos selvagens. Estes resultados sugeriram que a baixa taxa de degradação pode não explicar o aumento nos níveis de lisina solúvel no endosperma de tais mutantes, ao contrário do que foi observado no milho mutante *opaco-2* (Azevedo, 2002).

3.6. Catabolismo de lisina

Devido à necessidade de se obter sementes de cereais com uma alta concentração de lisina, a via de degradação de lisina (figura 2) foi recentemente estudada com maior profundidade. Estudos iniciais de catabolismo de lisina em plantas foram conduzidos utilizando ^{14}C -lisina no qual a radioatividade foi incorporada em glutamato e aminoadipato semialdeído. Esta reação é catalisada por duas enzimas, lisina α -cetoglutarato redutase (LKR), também conhecida como lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR), a qual catalisa a formação de sacaropina e sacaropina desidrogenase (SDH) que por sua vez, hidrolisa sacaropina a glutamato e aminoadipato semialdeído. A maior parte da atividade está presente em um polipeptídeo bifuncional, embora formas monofuncionais de ambas as enzimas também tenham sido detectadas. Primeiramente, foi proposto que estas enzimas eram restritas do endosperma de cereais, mas estudos mais recentes indicaram que elas são expressas em outros tecidos, particularmente durante estresse osmótico. A caracterização bioquímica da enzima bifuncional LOR-SDH tem revelado que somente a atividade da LOR é estimulada por lisina, via uma

complexa cascata de fosforilação dependente de cálcio. No mutante *opaco-2* de milho, as sementes mostraram conter altas concentrações de lisina. Análises bioquímicas e moleculares revelaram que o gene *opaco-2*, o qual codifica um fator de ativação transcricional, regula a atividade de LOR em endosperma de milho. No mutante *opaco-2*, as atividades enzimáticas da LOR, proteínas e mRNAs mostraram ser reduzidas de acordo com a alteração do padrão de expressão durante o desenvolvimento do grão. Elevadas concentrações de lisina foram detectadas em sementes maduras de um mutante *knockout* de *Arabidopsis thaliana* o qual foi desprovido da expressão do gene que codifica a enzima bifuncional LOR-SDH (Fornazier et al., 2003).

3.7. Sorgo: utilização e características

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), cultivado para silagem, tem atualmente recebido considerável atenção, particularmente nos USA, onde sua tolerância à seca e extenso período adequado ao plantio leva a sua utilização em áreas de pouca chuva (McDonald et al., 1991).

A produção de silagem é um dos processos mais importantes na conservação de plantas forrageiras. Este processo tem importância econômica em muitos países, inclusive o Brasil, em virtude da produção irregular das plantas forrageiras durante as estações do ano (Brito, 1995).

A escassez na produção de forragens nos períodos críticos do ano, aliado ao baixo valor nutritivo incapaz de suprir os requisitos mínimos dos animais são, entre outros, fatores que determinam grande queda nos índices de produtividade da pecuária nacional (Brito, 1995). Segundo Chaves (1997), a baixa produção de forragens durante o inverno, é um dos principais fatores responsáveis pelos baixos índices de produtividade dos rebanhos e grande redução na capacidade de suporte dos pastos. Assim, os sistemas de produção em pasto dependem de suplementação de volumosos durante a época seca quando se tem escassez de forragem. Sendo assim, a procura de alternativas e formas de suprir tais necessidades e minimizar os problemas decorrentes da seca na produção de forragens, têm sido uma constante nas pesquisas no campo da nutrição animal (Brito, 1995). Além disso, com a paulatina substituição dos sistemas extensivos de produção de leite e carne, por sistemas intensivos, baseados na maximização da expressão do potencial genético, principalmente de bovinos, a demanda por silagem de boa qualidade tem aumentado (McDonald et al., 1991).

As culturas de milho e sorgo têm sido as mais utilizadas no processo de ensilagem, por sua facilidade de cultivo, altos rendimentos e especialmente pela qualidade da silagem produzida, sem necessidade de aditivo para estimular a fermentação (Zago, 1999). Segundo Brito (1995), o sorgo vem sendo utilizado na alimentação animal por se constituir em um volumoso de bom valor energético, principalmente nas regiões semi-áridas e tropicais onde se apresenta com melhor rendimento de nutrientes por área e produção de matéria seca mais elevada em relação ao milho. Seu uso também se justifica pela alta produção de forragem, maior tolerância à seca e ao calor, capacidade de explorar maior volume de solo e também pela possibilidade de se cultivar a rebrota (Zago, 1999).

A variabilidade genética para características nutricionais, nesta espécie, tem permitido um eficiente trabalho de melhoramento, com o desenvolvimento de híbridos modernos de alto valor nutritivo que proporcionam alto desempenho animal, semelhante aos obtidos com silagem de bons híbridos de milho (Zago, 1999).

Os dois componentes químicos mais importantes do sorgo para silagem são os carboidratos e proteínas, porém o conteúdo de proteína é baixo em relação a outras gramíneas forrageiras, especialmente as de clima temperado. Normalmente a porcentagem de proteína bruta está entre 7 e 10% na matéria seca, ocorrendo pequenas mudanças durante a ensilagem. Silagem de sorgo geralmente contém ao redor de 50% de nitrogênio protéico, dependendo do conteúdo de matéria seca no momento da ensilagem. Outra fração é composta de peptídeos, aminoácidos livres e uma fração amoniacal que raramente ultrapassa 10% (Wilkinson, 1978).

3.7.1. Qualidade protéica e alimentação de ruminantes

No Brasil o sorgo é amplamente utilizado na alimentação de animais não ruminantes e ruminantes, como já mencionado. Este fato faz com que se torne evidente a necessidade de se melhorar a qualidade protéica deste vegetal, principalmente com relação aos ruminantes, como o caso de bovinos, responsáveis por grande parte da economia nacional.

Animais não ruminantes, tais como seres humanos, aves domésticas, suínos etc, não podem sintetizar nove dos vinte aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, dependendo absolutamente da dieta para obtenção desses aminoácidos essenciais. Porém, estes animais podem absorver eficientemente os aminoácidos ligados a proteínas, como também os solúveis (Galili et al., 2002).

Dentre os aminoácidos essenciais, lisina e metionina são considerados os mais importantes, pois estão presentes em níveis limitados na maioria das plantas cultivadas utilizadas para a alimentação de animais não ruminantes e ruminantes. Grãos de cereais geralmente apresentam baixos níveis de lisina (Shotwell & Larkins, 1989), enquanto que legumes são geralmente deficientes em metionina (Duke, 1981). Devido ao significado nutricional vital da lisina e metionina, muitos esforços estão sendo direcionados para se aumentar os níveis destes dois aminoácidos essenciais em suas formas solúveis ou ligadas a proteínas (Galili et al., 2002).

Embora animais ruminantes, tais como bovinos e ovinos, também não possam sintetizar aminoácidos essenciais, para estes animais a situação é mais complexa, devido à presença de uma flora microbiana especial em seus rumens, que metabolizam aminoácidos não essenciais em aminoácidos essenciais e os incorporam nas proteínas microbianas, que mais tarde, se tornam disponíveis para a nutrição do animal. Embora esta micro-flora do rúmen possa produzir tais aminoácidos, ela pode também degradar as proteínas absorvidas e converter seus aminoácidos em outros compostos nitrogenados (Galili et al., 2002).

Além disso, as proteínas microbianas, embora de melhor qualidade do que as proteínas vegetais, fornecem apenas cerca de 65% do total de proteínas necessárias para a produção intensiva de leite, por exemplo (Leng, 1990). Assim, a alimentação de ruminantes com dietas balanceadas à base de proteínas e enriquecidas com aminoácidos essenciais é importante para minimizar sua degradação pela micro-flora do rúmen. Mais de 40% das proteínas da dieta podem ser perdidas no rumem de animais de pastejo devido à degradação microbiana (Ulyatt et al., 1988). Este fenômeno também pode limitar a disponibilidade de lisina e metionina para animais ruminantes jovens (Merchen & Trigemeyer, 1992) e para vacas leiteiras em períodos de lactação (Rulquin & Verite, 1993).

Portanto, animais ruminantes também sofrem limitações em relação aos aminoácidos essenciais. Entretanto, proteínas com conteúdo de lisina e metionina ótimos para nutrição de ruminantes, são altamente resistentes à degradação no rumem. No entanto, as tentativas para se melhorar a qualidade nutricional dos alimentos para estes animais requerem de abordagens mais específicas, baseadas principalmente na natureza de suas floras microbianas (Galili et al., 2002).

3.7.2. Proteínas de reserva

As proteínas de reserva presentes nas sementes dos vegetais servem como a principal reserva nutritiva para as plantas em germinação. Os componentes desta reserva são responsáveis por determinar a qualidade nutricional dos grãos na alimentação de animais não ruminantes. O entendimento da organização genética e regulação dos genes envolvidos no acúmulo das proteínas de reserva podem resultar em uma nova abordagem para se aumentar o valor nutricional dos grãos de cereais (Balconi et al., 1998).

Milho e sorgo são cereais muito utilizados na alimentação animal principalmente na América do Norte e América do Sul e como alimentação humana em outras partes do mundo. Isto é especialmente verdade para sorgo, utilizado como alimento humano em algumas regiões da África. Ambos cereais variam no conteúdo de proteína de 6-18%, e as proteínas de reserva geralmente compreendem 70-90% do total de proteína. Zeínas são as principais proteínas de reserva de milho, enquanto que para sorgo são as kafirinas (Bean et al., 2000).

De uma forma geral, as proteínas de reserva de cereais têm sido tipicamente separadas de acordo com Osborne (1907), que as dividiu em quatro classes a partir de trigo. Desde então esta classificação foi aplicada virtualmente a todos os cereais, embora freqüentemente modificada. O fracionamento de Osborne divide as proteínas de cereais em proteínas solúveis em água (albuminas), proteínas solúveis em sais (globulinas), proteínas solúveis em álcool (prolaminas) e proteínas solúveis em ácidos ou bases (glutelinas). Estas extrações são tipicamente realizadas sequencialmente. Este sistema de classificação, apesar de muito utilizado, apresenta consideráveis sobreposições entre as classes de proteínas. Desde então outros sistemas de classificação estão sendo propostos. Para proteínas de milho e sorgo, Esen (1987) propôs um sistema de classificação onde as classes de proteínas são definidas com base na solubilidade, estrutura, composição de aminoácidos e massa molecular. Este trabalho tem levado a uma melhoria nos procedimentos de extração de proteínas de reserva de milho e sorgo (Bean & Lookhart, 2000).

As prolaminas são as principais proteínas de reserva de muitos cereais. Elas constituem um grupo de proteínas solúveis em álcool que são depositadas em corpos protéicos durante o desenvolvimento do endosperma. Estas proteínas geralmente compreendem metade das proteínas dos grãos maduros e contém altos níveis de prolina e glutamina e baixos níveis de lisina e triptofano (de Freitas et al., 1994).

Para este trabalho, seguimos a nomenclatura proposta por Esen (1987), que dividiu as zeínas em grupos α , β e γ . Esta mesma nomenclatura tem sido aplicada para proteínas de sorgo. Para milho, α -zeínas compreendem 75-85% do total de zeínas, β -zeínas 10-15% e γ -zeínas 5-10%. Para sorgo, α -kafirinas representam 66-84% do total de kafirinas, β -kafirinas 7-8% e γ -kafirinas 9-12% (Hamaker et al., 1995).

Com base em sua solubilidade, zeínas, as prolaminas de milho, tem sido classificadas em três classes distintas: α , β e γ -prolaminas. Esta classificação foi estendida para prolaminas de sorgo e coix (Leite et al., 1990). No entanto, a solubilidade nem sempre reflete características estruturais comuns de tais proteínas. Por exemplo, Kirihaara et. al. (1988) sequenciaram uma zeína rica em metionina que a partir de sua solubilidade foi classificada como β -prolamina, porém sua estrutura levou à introdução de uma quarta classe de prolamina, a δ -zeína. A coixina de 17 kDa, uma das prolaminas de coix, foi primeiramente descrita como α -prolamina baseada em suas propriedades de solubilidade, porém a clonagem de sua sequência a partir de cDNA revelou alta similaridade com a β -zeína de 14 kDa (de Freitas et al., 1994).

Prolaminas de milho têm sido classificadas como α -zeína (22 kDa), β -zeína (19 kDa), γ -zeína (27 kDa) e δ -zeína (10 kDa) com base na massa e solubilidade, como proposto por Esen (1987). Uma classificação similar tem sido proposta para prolaminas de sorgo, denominadas kafirinas. Em sorgo e milho, as α -prolaminas estão localizadas no interior dos corpos protéicos e as β e γ -prolaminas estão presentes na superfície (Chandrashekar & Mazhar, 1999).

Ainda em milho, γ -prolaminas representam 5-10% do total de zeínas e são compostas por dois polipeptídeos, um de 28 kDa e outro de 16 kDa. A zeína de 16 kDa apresenta solubilidade similar as β -prolaminas. A γ -zeína de 28 kDa é codificada por um ou dois genes, enquanto que a γ -zeína de 16 kDa é codificada por um único gene (de Freitas et al., 1994).

Em coix, γ -coixina representa cerca de 15% das prolaminas totais e compreendem um único polipeptídeo de 22 kDa, altamente homólogo a γ -zeína de 28 kDa (de Freitas et al., 1994).

As prolaminas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) compreendem 50-60% do total de proteínas do endosperma e tem sido classificadas em três grupos principais de acordo com sua massa molecular, modo de extração e estrutura. Pela analogia com as prolaminas de milho (zeínas), confirmada por estudos imunológicos, os três grupos foram denominados de α -kafirina, a qual é subdividida em α_1 -kafirina (24-29 kDa) e α_2 -kafirina (22 kDa), β -kafirina (19 kDa) e γ -

kafirina (27 kDa). A análise da composição dos aminoácidos dos três grupos de proteínas purificados indica diferentes conteúdos de aminoácidos sulfurados. α -kafirina contém baixos níveis de cisteína, enquanto β e γ -kafirina apresentam altos níveis de grupos SH (El Nour et al., 1998).

Haikerval & Mathieson (1975) relataram que as frações do grão de sorgo que contém mais proteína são o embrião, seguida pelo endosperma e pericarpo. A proteína predominante no grão de sorgo é a prolamina, que apresenta 83% da proteína do endosperma, seguida da glutelina. Pela determinação do conteúdo de aminoácidos das frações protéicas, a prolamina é deficiente em lisina, aminoácidos sulfurados e treonina, mas dispõe de elevadas concentrações de glutamato, leucina, prolina e alanina. As albuminas e globulinas, proteínas de melhor qualidade, encontram-se em menor quantidade, ocorrendo principalmente no embrião do grão de sorgo (Copelin et al., 1978).

Vários estudos têm demonstrado que as proteínas kafirinas podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua solubilidade: um solúvel em álcool, chamada de kafirina verdadeira ou kafirina 1 e o outro solúvel, a partir do resíduo da fração anterior, em tampão com o auxílio de um agente redutor. Do mesmo modo, a fração posterior foi chamada de kafirina 2. Quando analisadas por eletroforese, a forma reduzida das duas frações continham componentes do mesmo polipeptídeo correspondente a α , β e γ -kafirinas, embora em diferentes proporções (El Nour et al., 1998).

De acordo com a literatura, as diferenças na solubilidade derivam do fato que as prolaminas solúveis em um agente redutor estão presentes no endosperma na forma de polímeros dissulfídicos de alta massa molecular, enquanto que aquelas extratíveis com álcool estão na forma de cadeias polipeptídicas únicas. No entanto, nenhuma demonstração direta destas diferenças foi encontrada, devido ao fato de que todos os padrões eletroforéticos publicados foram formados por agentes redutores (El Nour et al., 1998).

O endosperma de sorgo contém menores concentrações de γ -prolaminas que milho e coix. γ -kafirina, a γ -prolamina de sorgo, representa de 2-5% do total de prolaminas e é composto de um único polipeptídeo de 27 kDa (de Freitas et al., 1994).

Estudos moleculares têm revelado alto grau de similaridade entre os genes que codificam as prolaminas de milho, coix e sorgo, sugerindo que estes genes se originaram de um ancestral comum e que divergiram após a separação das espécies (de Freitas et al., 1994).

A genética tem representado um importante papel na definição da existência e efeito de genes controladores da deposição de zeínas ao longo do desenvolvimento dos tecidos do endosperma. Por exemplo, as mutações recessivas *opaco-2* (*o2*) e *opaco-7* (*o7*) resultam em uma diminuição específica do acúmulo de α -zeínas, respectivamente, enquanto que a *opaco-15* (*o15*), exercem seu efeito primariamente sobre a γ -zeína. A mutação recessiva *opaco-6* (*o6*) e a mutação dominante ou semi-dominante *floury-2* (*fl2*) causam uma redução geral no acúmulo de todas as classes de zeínas (Balconi et al., 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foi definido para este trabalho a utilização de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* [L] Moench), híbrido comercial MASSA 03, devido ao fato de ser uma variedade que apresenta características de triplo propósito, isto é, permite a obtenção de silagem de qualidade, tem grãos e palhada adequadas para plantio direto e não apresenta tanino, tendo portanto bom valor nutritivo (Dow Agrosiences, 2001). Este material vegetal, gentilmente cedido pelo Dr. Luiz Gustavo Nussio (Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo) foi utilizado para os procedimentos de extração, isolamento e purificação das enzimas AK e HSDH. As plantas foram cultivadas na estação experimental do Departamento de Genética, ESALQ-USP, Piracicaba durante o verão de 2001 - 2002 e as sementes de sorgo imaturas (estágio anterior ao leitoso [*estágio 1*: 93 dias após o plantio], estágio leitoso [*estágio 2*: 97 dias após o plantio] e estágio posterior ao leitoso [*estágio 3*: 101 dias após o plantio]) foram coletadas diretamente em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C para posterior extração enzimática.

Posteriormente, para os estudos relativos a transmitância de infravermelho-próximo (NIT), determinação das frações das proteínas de reserva e aminoácidos solúveis, foram utilizados sementes maduras de sorgo MASSA 03 e de nove genótipos mutantes alta lisina gentilmente cedidos por um banco de germoplasma da Índia ICRISAT (*International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*). Os genótipos cedidos foram: IS11167, IS5603, IS16227, IS25792, IS10477, IS22204, IS16210, IS16199 e IS11758.

4.2. Extração de AK e HSDH

A extração da AK e HSDH foi conduzido a 4 °C. As sementes imaturas de sorgo provenientes do estágio 2, foram utilizadas para este procedimento. A extração foi realizada em 5 volumes de tampão 50 mmol.L⁻¹ Tris - HCl (pH 7.4) contendo 200 mmol.L⁻¹ KCl, 0.1 mmol.L⁻¹ PMSF, 0.1 mmol.L⁻¹ EDTA, 1 mmol.L⁻¹ DTT, 2 mmol.L⁻¹ L-lisina, 2 mmol.L⁻¹ L-treonina, 10% (v/v) glicerol and 5% (m/v) PVPP (tampão A), utilizando-se liquidificador (mantido a 10 °C) para a homogeneização do extrato. Os extratos foram filtrados em seis camadas de gaze e centrifugados a 10000 g_n, centrífuga Beckmann, modelo JA-MC por um período de 30 min para remover completamente os materiais indesejáveis precipitados, como paredes e membranas celulares. A fase líquida dos extratos foi submetida à precipitação sequencial com (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio) para determinação da faixa de precipitação das enzimas AK e HSDH.

4.3. Precipitação com sulfato de amônio

Sulfato de amônio, o sal mais comumente utilizado para o fracionamento de proteínas por precipitação, foi utilizado como o primeiro passo de purificação e para concentrar AK e HSDH durante este processo. O extrato bruto foi inicialmente precipitado através de três sequências de sulfato de amônio para a determinação da concentração ótima para precipitação da AK e HSDH:

- Sequência A: 0-20%; 20-40%; 40-60% e 60-80% de saturação com sulfato de amônio;
- Sequência B: 0-30%; 30-50% e 50-70% de saturação com sulfato de amônio;
- Sequência C: 0-30%; 30-60% e 60-80% de saturação com sulfato de amônio.

Para este procedimento, sulfato de amônio sólido foi adicionado vagarosamente ao extrato enzimático e homogeneizado por agitação lenta por um período de 30 min a 4 °C. As amostras foram precipitadas através de centrifugação a 10000 g_n por 30 min a 4 °C. O *pellet* formado foi ressuspensionado com o mínimo volume possível de tampão 25 mmol.L⁻¹ Tris - HCl (pH 7.4) contendo 1 mmol.L⁻¹ DTT, 0.1 mmol.L⁻¹ L-lisina, 0.1 mmol.L⁻¹ L-treonina e 10% (v/v) glicerol (tampão B). As precipitações subsequentes com sulfato de amônio foram conduzidas nas mesmas condições utilizadas previamente e cada *pellet* foi dessalinizado em colunas Sephadex G-25 equilibradas no mesmo tampão B. As amostras dessalinizadas foram utilizadas para determinação das atividades específicas da AK e HSDH.

4.4. Ensaio da AK

O ensaio da atividade da AK foi conduzido para um volume final de 500 μL como descrito por Brennecke et al. (1996), com algumas modificações de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. A mistura do ensaio compreendeu 100 μL 100 mmol.L^{-1} Tris - HCl (pH 7.4) contendo 1 mmol.L^{-1} DTT e 20% (v/v) glicerol (solução AK1), 100 μL 500 mmol.L^{-1} ácido aspártico (pH 7.4) (solução AK2), 50 μL 125 mmol.L^{-1} sulfato de magnésio (solução AK3), 50 μL 200 mmol.L^{-1} ATP (pH 7.4) (solução AK4), 50 μL 4 mol.L^{-1} hydroxilamina (pH 7.4) (solução AK5), 100 μL de água deionizada e 50 μL de extrato enzimático. O ensaio foi iniciado pela adição de 50 μL ATP e incubado a 35 °C por 30 min. O ensaio foi finalizado através da adição de 500 μL de reagente ácido de cloreto férrico (FeCl_3) contendo 670 mmol.L^{-1} FeCl_3 , 370 mmol.L^{-1} HCl e 20% (m/v) TCA. Após centrifugação por 10 min a 10000 g_n , para remoção de precipitados protéicos, a absorbância do sobrenadante foi medida a 505 nm (espectrofotômetro Beckman modelo DU-640). Controles contendo 10 μL 10 mmol.L^{-1} L-lisina (solução AKL), 10 μL 10 mmol.L^{-1} L-treonina (solução AKT) e 10 μL 10 mmol.L^{-1} L-lisina mais 10 mmol.L^{-1} L-treonina (solução AKLT), foram incluídos no ensaio para se identificar possíveis isoenzimas sensíveis a inibição por lisina e treonina. Três repetições (extratos diferentes) foram realizadas para cada ensaio.

SOLUÇÕES	BRANCO	CONTROLE	LISINA	TREONINA	LISINA + TREONINA
AK1	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
AK2	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
AK3	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
AK5	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
ÁGUA	150 μL	50 μL	-	-	-
AKL	-	-	50 μL	-	-
AKT	-	-	-	50 μL	-
AKLT	-	-	-	-	50 μL
ENZIMA	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
AK4	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

4.5. Ensaio da HSDH

A atividade da HSDH foi determinada pela formação do NADPH na reação reversa da enzima, que tem como substrato a homoserina, levando a formação do aspartato semialdeído, utilizando o NADP^+ como co-fator. O ensaio da atividade da HSDH foi realizado espectrofotometricamente a 340 nm (espectrofotômetro Beckman modelo DU-640) em um volume final de 1.0 mL a 30 °C como descrito por Teixeira et al. (1998) com modificações de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. A mistura do ensaio compreende 800 μL 100 mmol.L^{-1} Tris-HCl (pH 9.0) contendo 150 mmol.L^{-1} KCl, 1 mmol.L^{-1} DTT e 0.5 mmol.L^{-1} EDTA (solução HSDH1), 100 μL 200 mmol.L^{-1} DL-homoserina (solução HSDH3), 100 μL 4.8 mmol.L^{-1} NADP (solução HSDH2), 50 μL de água deionizada e 50 μL de extrato enzimático. O efeito da treonina na atividade da HSDH foi determinada pela adição de 10 μL de uma solução 10 mmol.L^{-1} do aminoácido na mistura do ensaio (solução HSDHT). Três repetições (extratos diferentes) foram realizadas para cada ensaio.

SOLUÇÕES	BRANCO	CONTROLE	TREONINA
HSDH1	800 μL	800 μL	800 μL
HSDH3	-	100 μL	100 μL
ENZIMA	50 μL	50 μL	50 μL
ÁGUA	100 μL	-	-
HSDHT	-	-	10 μL
HSDH2	100 μL	100 μL	100 μL

A reação foi iniciada com a adição do NADP^+ e a absorbância a 340 nm determinada imediatamente após ao início da reação (tempo inicial). Após esta primeira leitura, as amostras foram incubadas a 30 °C por 30 min, sendo realizadas novas leituras após este período (tempo final). As diferenças entre as absorbâncias iniciais e finais foram utilizadas para determinação da atividade da enzima.

4.6. Cálculo da atividade da AK

Para o cálculo da AK foi determinada uma curva de hidroxamato e a partir desta curva foi possível calcular a quantidade de hidroxamato formado na reação baseada na absorbância obtida

no ensaio. A curva foi feita com as soluções de DL-Aspartato- β - hidroxamato nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol.L⁻¹, lidas em espectrofotômetro a 505 nm. Foi feita uma regressão linear com os valores encontrados e a reta obtida foi utilizada para calcular o hidroxamato formado em cada ensaio enzimático. A atividade específica em nmol foi obtida dividindo-se a quantidade de hidroxamato formado pela quantidade de proteína da amostra e pelo tempo de ensaio em segundos (nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹).

4.7. Cálculo da atividade da HSDH

Para calcular a atividade da HSDH foi levada em consideração a diferença entre a absorbância obtida no tempo inicial e no tempo final de incubação. Para cada amostra o ensaio foi feito em triplicata e a média das absorbâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da atividade da enzima. Cada nmol de NADPH formado significa um aumento de 0,00622 na absorbância a 340 nm. O número de nmol de NADPH reduzidos foi calculado pela diferença de absorbância obtida no ensaio de cada amostra e então dividido pelo tempo de ensaio em minutos para obter a quantidade de nmol de NADPH formado por minuto. Este valor foi dividido pela quantidade de proteína total da amostra, obtendo-se a atividade específica da enzima em nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹.

4.8. Purificação parcial da AK e HSDH

Os procedimentos de extração e purificação foram realizados a 4 °C de acordo com Teixeira et al. (1998). Para os ensaios enzimáticos foram utilizadas sementes imaturas de sorgo (estágio 2), extraídas em 5 volumes de tampão A. Os extratos foram filtrados em seis camadas de gaze e centrifugados a 10000 g_n por 30 min para remover completamente compostos indesejáveis, tais como parede e membranas celulares do extrato. Sulfato de amônio sólido foi adicionado vagarosamente na concentração de 20-60% de saturação, gentilmente agitado por pelo menos 1 h e o precipitado protéico recuperado por centrifugação a 10000 g_n por 30 min. Os *pellets* de proteínas foram dissolvidos em um pequeno volume de tampão B. As amostras foram eluídas sob gravidade em colunas Sephadex G-25 (2.5 x 20 cm) equilibradas com 5 volumes de coluna de tampão B. As amostras dessalinizadas foram utilizadas para os procedimentos de purificação posteriores.

4.8.1. Cromatografia de troca aniônica do tipo *step-wise*

Os extratos vegetais, precipitados na faixa de 20-60% de saturação com sulfato de amônio, foram dessalinizados em colunas Sephadex G-25. As enzimas AK e HSDH, à partir de então, foram parcialmente purificadas em colunas preparativas com resina DEAE-Sephacel (2.5 x 8 cm; fluxo 1 mL.min⁻¹) equilibradas em tampão B. Após o equilíbrio da coluna, uma eluição do tipo *step-wise* foi realizada (100, 200, 300, 400 e 500 mmol.L⁻¹ KCl). Uma eluição final com 1 mol.L⁻¹ KCl também foi realizada e as frações foram analisadas para as atividades enzimáticas.

Posteriormente, foram realizados também experimentos de cromatografia de troca aniônica do tipo *stepwise*, em coluna pronta HiPrep 16/10 Q XL com resina de agarose de troca aniônica, da marca Amersham Pharmacia Biotech, de acordo com as especificações do manual de instruções. A coluna foi inicialmente lavada com 100 mmol.L⁻¹ KCl e as proteínas eluídas nesta concentração desprezadas e em seguida, foi eluída com 350 mmol.L⁻¹ KCl e todo o pico de proteína recolhido e precipitado em 70% de saturação com sulfato de amônio, para posterior utilização em cromatografia de filtração em gel.

4.8.2. Cromatografia de troca aniônica do tipo gradiente linear

A AK foi extraída a partir de 200 g de sementes imaturas de sorgo (estágio 2), precipitadas com sulfato de amônio para uma saturação de 20-60% e dessalinizadas em colunas de Sephadex G-25.

Após a saída de toda fração não ligante, o gradiente foi iniciado empregando-se um sistema de dois reservatórios interligados (gerador de gradiente), um contendo 100 mL de tampão de eluição com 100 mmol.L⁻¹ KCl e outro contendo 100 mL de tampão 500 mmol.L⁻¹ KCl. O fluxo de eluição foi de 1 mL / min. As frações começaram a ser coletadas, com a ajuda de coletor de frações automático da marca LKB-Pharmacia modelo Redifrac, depois da retirada de um volume interno da coluna, num total de 50 frações de 4 mL cada, coletadas e mantidas em gelo.

As frações foram testadas para a atividade da AK controle e tratamentos com L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina na concentração final de 10 mmol.L⁻¹. Todas as frações também foram testadas para a atividade da HSDH controle e tratamento com L-treonina 10 mmol.L⁻¹. Os ensaios foram feitos de acordo com a metodologia anteriormente descrita.

4.8.3. Cromatografia de filtração em gel e determinação da massa molecular

4.8.3.1. Cromatografia de filtração em gel Superose 12HR 10 / 30

O precipitado obtido da combinação das frações da coluna de DEAE-Sephacel (70% de saturação) foi ressuspensionado em tampão B, num volume final de 5 mL. A amostra (1 mL) foi aplicada em uma coluna de filtração em gel Superose 12HR 10 / 30 em sistema FPLC, equilibrada com o mesmo tampão. As frações de 0,5 mL foram coletadas num fluxo de 0,5 mL / min e utilizadas para medidas de atividade e proteína. O volume restante (4 mL) foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25 e utilizado para testes posteriores.

A coluna foi mantida em sala refrigerada (15 °C) e previamente calibrada exatamente nas mesmas condições com um conjunto de marcadores de peso molecular que incluem Azul de Dextrano (2000 kDa), β -amilase (200 kDa), BSA (67 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa) e Citocromo c (12,4 kDa). Os valores das massas molares das enzimas foram obtidos pela inferência do volume de eluição da enzima em relação aos obtidos pelos padrões através de regressão linear.

4.8.3.2. Cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200

A purificação das enzimas AK e HSDH em sementes imaturas de sorgo também foi realizada por cromatografia de filtração em gel. O precipitado obtido da combinação das frações da coluna de DEAE-Sephacel (70% de saturação) foi ressuspensionado em tampão B, num volume final de 6,5 mL. A amostra (5,5 mL) foi aplicada em uma coluna preparativa de filtração em gel S-200 Pharmacia LKB (83,2 x 2,6 cm), equilibrada com o mesmo tampão. As frações de 2 mL foram coletadas num fluxo de 0,5 mL / min e utilizadas para medidas de atividade e proteína. O volume restante (1,0 mL) foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25 e utilizado para dosar atividade das enzimas e proteína.

A coluna foi mantida refrigerada (10 °C) e previamente calibrada exatamente nas mesmas condições com um conjunto de marcadores de peso molecular que incluem Azul de Dextrano (2000 kDa), β -amilase (200 kDa), Álcool Desidrogenase (150 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa) e Citocromo c (12,4 kDa). Os valores das massas molares das enzimas foram obtidos pela

inferência do volume de eluição da enzima em relação aos obtidos pelos padrões através de regressão linear.

4.9. Modulação da AK e HSDH

As enzimas AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo, purificadas a partir de cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear (0-500 mmol.L⁻¹ KCl), foram estudadas utilizando-se diversos compostos moduladores que são conhecidos por regular as atividades destas enzimas: lisina, treonina, lisina mais treonina, metionina, valina e S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), nas concentrações de 1 e 5 mmol.L⁻¹. 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂, 1,6 mmol.L⁻¹ Mg²⁺ etilenoglicol-bis-(β-aminoetil uter) N', N', N', N', - ácido tetracético (EGTA), 10 µg / mL de calmodulina, 50 µg / mL de componente 48/80, 1 mmol.L⁻¹ S-adenosilmetionina (SAM) e KCl nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mmol.L⁻¹.

4.10. Transmitância de infravermelho-próximo

As sementes maduras de sorgo também foram analisadas por transmitância de infravermelho-próximo através do analisador de sementes *Infratec 1255 Food and Feed Analyser*. A medida deste aparelho é baseada no fato que os principais constituintes do grão, tais como proteínas e outros compostos, absorvem radiação magnética na região infravermelho-próximo (*near-infrared region*) do espectro (800 – 1100 nm). Através de análise não destrutiva, este instrumento fornece a porcentagem de proteínas, óleo, lisina e metionina a partir de uma média de leitura de 23 sementes. Esses dados foram obtidos a partir de cinco repetições e os materiais analisados foram: cinco variedades de milho (normal ESALQ, opaco-2, QPM BR451, QPM BR473 e Zeneca 8392) e dez genótipos de sorgo (MASSA 03, IS11167, IS5603, IS16227, IS25792, IS10477, IS22204, IS16210, IS16199 e IS11758).

4.11. Extração de proteínas de reserva

Para este procedimento foi utilizado o método de Youssef (1998), onde as sementes de sorgo foram liofilizadas e posteriormente maceradas até a formação de uma farinha homogênea, posteriormente agitada com éter de petróleo por 30 min, para retirada de lipídeos (Figura 3).

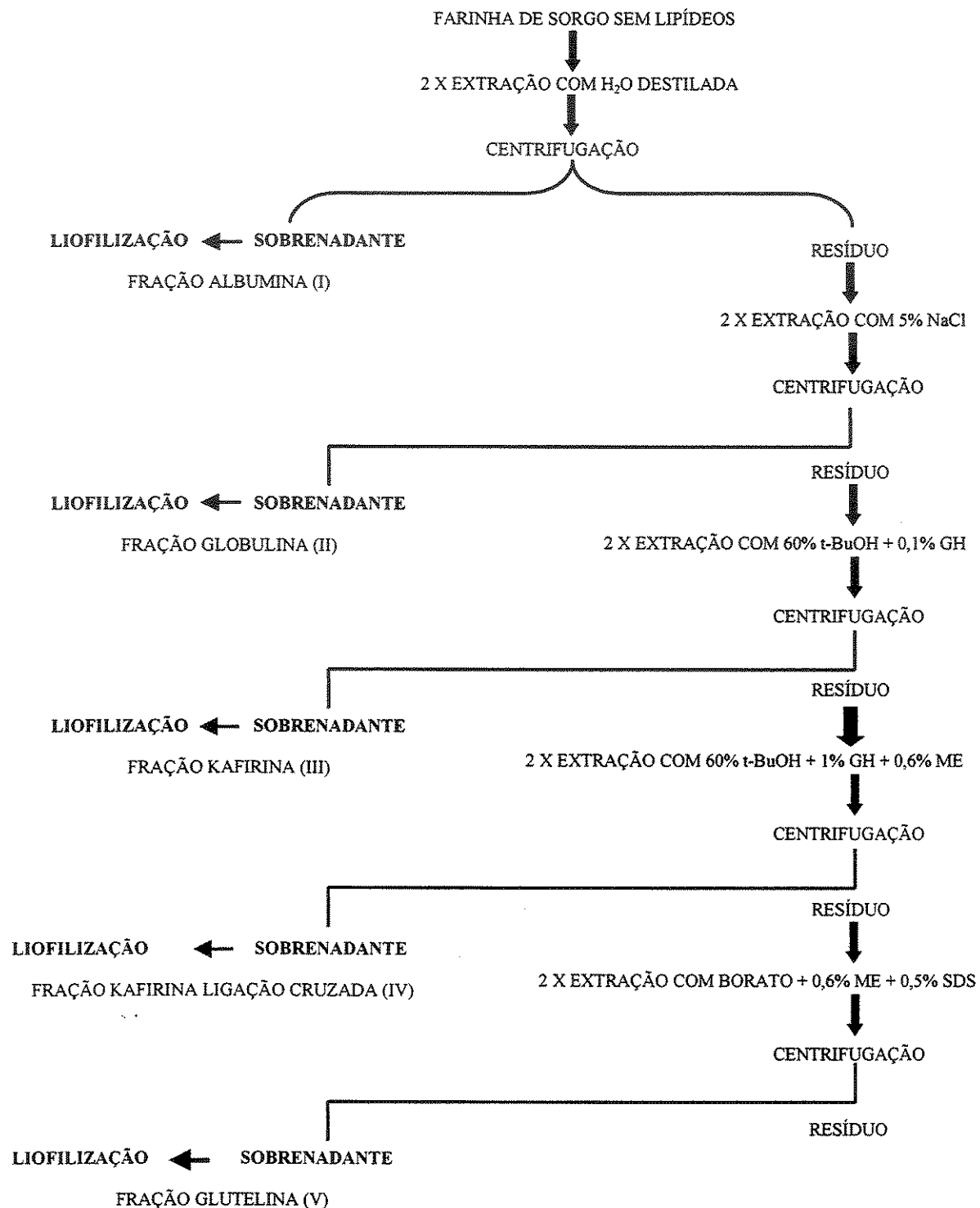


FIGURA 3. Esquema do método de extração das frações das proteínas de reserva de sorgo segundo Youssef (1998).

Cada amostra (1 g) foi colocada em um béquer com 10 mL de solvente e agitado por 1 h a 25 °C em um agitador magnético e depois centrifugada à 16000 g_n por 10 min. O diagrama esquemático da extração é mostrado na Figura 3. Os solventes utilizados foram água deionizada, 1% NaCl, 60% t-butanol (t-BuOH) + 0,1% GH (hidrocloreto de guanidina), 60% t-BuOH + 1% GH + 0,6 mol.L⁻¹ ME (β -mercaptoetanol) e tampão borato pH 10 (0,0125 mol.L⁻¹ tetraborato de sódio + 0,043 mol.L⁻¹ NaOH + 0,425 mol.L⁻¹ NaCl) + 0,6 mol.L⁻¹ ME + 0,5% SDS, para extrair albumina, globulina, kafirina, kafirina de ligação cruzada, e glutelina, respectivamente.

Todos os sobrenadantes foram agitados por 1 h com água deionizada, para retirada dos resíduos provenientes da extração anterior e posteriormente, centrifugados por 10 min. Isto não foi feito com o a fração de albumina devido a não existência de fração anterior. Todas as frações foram liofilizadas, e posteriormente ressuspensas em 1 mL de água deionizada para leitura em espectrofotômetro a fim de se medir a concentração das proteínas.

4.12. Extração de aminoácidos

Os aminoácidos foram extraídos segundo o método descrito por Bielecki & Turner (1966) para posterior análise qualitativa em HPLC.

Para 1g de material fresco foi macerado em nitrogênio líquido e em seguida, acrescentou-se 10 mL de solução MCW (600 mL de metanol, 250 mL de clorofórmio, 150 mL de água deionizada). A mistura foi incubada *over-night* a 4 °C e posteriormente, centrifugada a 1000 g_n por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação, para 4 mL de sobrenadante foi misturado a 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água bidestilada. Após este procedimento, aguardou-se a separação das fases e utilizou-se a fase hidrossolúvel para a análise dos aminoácidos em HPLC.

4.13. Análise quantitativa de aminoácidos

As concentrações dos aminoácidos totais foram quantificadas nas sementes maduras dos diferentes genótipos já citados, segundo o método descrito por Yenm & Cocking (1955). Feita a extração dos aminoácidos como já descrito anteriormente, uma alíquota dessa solução foi

analisada para aminoácidos solúveis (Yenm & Coking, 1955). Uma curva foi feita utilizando-se leucina como padrão nas concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200 nmol.mL⁻¹. Uma fração solução de aminoácidos foi colocada em um tubo de ensaio completando o mesmo para 1000 mL. Tanto para análise das amostras desconhecidas quanto para a curva padrão acrescentou-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio (0,2 mol.L⁻¹, pH 5,0), 0,2 mL de reativo de ninidrina (5% em metilglicol) e 1 mL de KCN (2% de uma solução 0,01 mol.L⁻¹ em metilglicol). Cobriu-se o tubo de ensaio com esferas de vidro, para que não houvesse evaporação, deixou-se em banho-maria 100 °C por 20 min. Deixou-se atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 1 mL de etanol 60%. A leitura em espectrofotômetro dos padrões e das amostras contra o branco foi feita em 570 nm. Padronizou-se uma concentração de 500 nmol.mL⁻¹ para cada amostra, que foram então submetidas ao HPLC.

4.14. Separação e análise da composição de aminoácidos solúveis em HPLC

Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados em HPLC de fase reversa. Foi utilizado uma coluna Spherisorb ODS-2 C18 e eluído em um gradiente linear formado pelas soluções de metanol 65% e tampão fosfato pH 7,5 (50 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio, 50 mmol.L⁻¹ de fosfato dissódico, 1,5 mL de ácido acético, 20 mL de tetrahidrofurano, 20 mL de metanol) num fluxo de 0,8 mL / min. O gradiente elevou a proporção de metanol de 20% a 28% entre 0 e 5 min, de 28% a 58% entre 5 e 35 min, de 58% a 75% entre 35 e 40 min, 75% a 95% entre 40 e 56 min, 95% a 96% entre 56 e 60 min e 96% a 100% entre 60 e 61 min. O fluido da coluna foi monitorado por um detector fluorescente Shmatdzu (model RF350) operando com um comprimento de onda de excitação de 350 nm e um comprimento de onda de emissão de 388 nm. Foram misturados 20 µL da solução de aminoácidos e 40 µL do reagente OPA. Após 2 min foram injetados no aparelho de HPLC. Os dados são expressos em nmol.mL⁻¹ do sobrenadante e o percentual em mol do total de aminoácidos recuperados (excluindo prolina e triptofano por não formar um derivado com OPA). Os componentes dos reagentes seguem a seguir:

Tampão A

- 50 mmol.L⁻¹ Acetato de sódio;
- 50 mmol.L⁻¹ Na₂HPO₄;
- 1,5 mL ácido acético concentrado
- Completar para 960 mL com água *Milli-Q*;
- 20 mL tetrahidrofurano;
- 20 mL metanol;
- Filtrar e desgaseificar com ultrasom + vácuo.

Tampão B

- 650 mL de metanol;
- 350 mL de água *Milli-Q*;
- Desgaseificar com ultrasom + vácuo.

Reagente OPA

1. Tampão Borato

- 2,4 g de ácido bórico em 90 mL água *Milli-Q*;
- Ajustar o pH para 9,5 com NaOH 2 N.

2. Solução OPA-borato

- 50 mg de OPA em 1 mL de metanol;
- 6,5 mL de tampão borato (1), pH 9,5, filtrar em *Millipore* 0.22 µm.

3. Solução de derivatização

- 2,5 mL de solução OPA-borato (2);
- 20 µL de β-mercaptoetanol.

4.15. Determinação de proteína total

A concentração de proteína total (mg.mL⁻¹) foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando-se o reagente da Bio Rad, sendo 20 µL das amostras dessalinizadas adicionadas a 1 mL do reagente previamente diluído de acordo com as especificações do

fabricante. No branco, foram adicionados 20 μL de tampão B a 1 mL do reagente. A leitura da absorbância para cada amostra foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se cubetas de poliestireno descartáveis. Para cada reagente de Bradford preparado foi feita uma curva com a proteína albumina de soro bovino (BSA) como padrão e a partir dela calculou-se a concentração das amostras. Para a obtenção da curva padrão foi utilizada uma solução estoque de BSA na concentração de 1 mg / mL para o preparo de soluções 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 0,8 mg / mL de BSA. Todas as soluções foram medidas pelo método de Bradford e os resultados foram plotados em gráfico mg / mL x absorbância, a regressão linear foi calculada e a reta traçada. Estes valores foram utilizados como referência para a determinação da quantidade de proteína. Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo a média das absorbâncias utilizadas para calcular a quantidade de proteína de acordo com a curva padrão. Para melhor adequação dos valores de absorbância à curva padrão traçada, as amostras foram diluídas na proporção necessária para que os valores da absorbância ficassem entre 0,15 e 0,35 e esta diluição foi considerada na determinação da quantidade de proteína (mg / mL).

Para se determinar as concentrações protéicas de cada fração das proteínas de reserva utilizou-se o método de Lowry et al (1951), onde em 100 μL de cada amostra foram adicionados à 2,5 mL da solução 1 (5 mL de CuSO_4 0,5% + 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio 1% + 49 mL de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 mol.L⁻¹), após incubação por 10 min acrescentou-se 300 μL do reagente de Folin, agitou-se bem e incubou-se novamente por 40 min, para posterior leitura à 560 nm.

4.16. Análises estatísticas

Os dados sobre proteínas de reserva e aminoácidos solúveis foram analisados pelo procedimento de Análise de Variância e as médias foram comparadas utilizando-se diferenças mínimas significativas através do teste de Duncan para o nível de probabilidade de 1%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Considerações gerais

Durante nossos estudos, foi observado que as enzimas AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo apresentavam particularidades que dificultavam muito os procedimentos de purificação.

Para se conseguir valores razoáveis de atividades das enzimas AK e HSDH, foi necessário se concentrar muito as proteínas dos extratos através de extrações realizadas a partir de 200 à 500 g de material vegetal. Mesmo utilizando para esse procedimento inibidor de compostos fenólicos (PVPP), inibidor de proteases (PMSF), baixa temperatura e, seguidamente, precipitação com sulfato de amônio, as amostras apresentavam perdas expressivas nas atividades de ambas as enzimas.

Antes de se iniciar a purificação por cromatografia de troca iônica e filtração em gel das enzimas AK e HSDH, as amostras tinham que ser clarificadas por centrifugação e/ou filtração, sendo que esses procedimentos induziam a perda total das atividades enzimáticas.

Com relação a cromatografia de troca iônica, o extrato dessalinizado induzia a perda da eficiência da coluna, sendo que a resina perdia a capacidade de troca e tinha que ser substituída à cada experimento. Tanto o processo cromatográfico de troca iônica como o processo de filtração em gel, não foram eficientes em separar por completo os picos encontrados de AK e HSDH, revelando a presença de picos intercalados de difícil interpretação.

Juntamente com esses procedimentos, foi tentado se obter géis de atividades de AK e HSDH, porém devido ao baixo fator de purificação obtido pelas técnicas utilizadas, não se conseguiu concentrar as enzimas AK e HSDH a ponto de se conseguir altas atividades necessárias para obtenção de géis de boa qualidade.

Os resultados obtidos nesse trabalho são originados de várias repetições de experimentos os quais revelaram sempre resultados similares, mesmo que uma considerável parte dos mesmos tenham sido perdidos por conta dos problemas encontrados. Mesmo assim foram observados muitos resultados importantes para o estudo de AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo, que contribuíram com conhecimentos básicos para futuros estudos genéticos e moleculares relativos a este cereal.

5.2. Isolamento de enzimas envolvidas na biossíntese de treonina de sementes de sorgo

ARTIGO:

Isolation of enzymes involved in threonine biosynthesis from sorghum seeds

Renato Rodrigues Ferreira¹, Ariane Vendemiatti², Lyndel Wayne Meinhardt¹, Peter John Lea³ and Ricardo Antunes Azevedo^{2*}

*¹Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ²Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CP 83, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; ³Department of Biological Sciences, Lancaster University, Lancaster, Lancashire, LA1 4YQ, United Kingdom; *Corresponding author: raazeved@esalq.usp.br*

Abstract

Cereal seeds are poor in essential amino acids, particularly lysine, tryptophan and threonine. The amino acids lysine and threonine are synthesized in the aspartate pathway. Although the most of the enzymes of the aspartate pathway have been isolated and characterized in higher plant species, the metabolism of lysine and threonine is totally unknown in sorghum. We have isolated two enzymes, aspartate kinase (AK) and homoserine dehydrogenase (HSDH) from sorghum. Optimum assay conditions were established for the determination of AK and HSDH activities. The highest level of activity was observed in immature seeds. AK was shown to be inhibited by threonine and lysine indicating the existence of at least two isoenzymes, one sensitive to threonine inhibition and the other sensitive to lysine inhibition with the latter being predominant in sorghum seeds. HSDH was shown to be inhibited by threonine indicating the existence of a threonine-sensitive HSDH, however, most of the activity was not inhibited by threonine, suggesting the existence of a second predominant isoenzyme of HSDH resistant to threonine inhibition.

Key words: amino acids, aspartate kinase, homoserine dehydrogenase, lysine, threonine.

Isolamento de enzimas envolvidas na biossíntese de treonina em sementes de sorgo: As sementes dos cereais são pobres em aminoácidos essenciais, principalmente lisina, triptofano e treonina. Os aminoácidos lisina e treonina são sintetizados na via metabólica do aspartato. Apesar da maioria das enzimas da via do aspartato terem sido isoladas e caracterizadas em várias espécies de plantas, o metabolismo de lisina e treonina é totalmente desconhecido em sorgo. Foram isoladas duas enzimas, aspartato quinase (AK) e homoserina desidrogenase (HSDH) de sorgo. Condições ótimas de ensaio para determinação da atividade de AK e HSDH foram estabelecidas. As atividades mais elevadas de AK e HSDH foram observadas em sementes imaturas. A atividade da AK foi inibida por treonina e lisina, indicando a existência de duas isoenzimas da AK, uma sensível a inibição por treonina e outra sensível a inibição pela lisina, sendo esta última predominante nas sementes de sorgo. A atividade de HSDH foi inibida por treonina indicando a existência de uma isoenzima sensível a treonina, entretanto, a maioria da atividade não foi inibida por treonina, sugerindo a existência de uma segunda isoenzima de HSDH predominante resistente a inibição pela treonina.

Palavras chave: aminoácidos, aspartato quinase, homoserina desidrogenase, lisina, treonina.

INTRODUCTION

The classic role of agricultural crops as the major food supplier to feed a growing and hungry population is still substantial, but today there is also a great demand to improve the nutritional quality of the food (Kingston-Smith and Thomas, 2003). This may help to solve problems encountered in cases where plants are the major or sole source of food, as well as plant feeds for livestock, which are consumed as human foods (Galili et al., 2002).

Non-ruminant animals (such as humans, poultry, and pigs) cannot synthesize 9 out of the 20 protein amino acids and therefore have to obtain them in their diets. Although ruminant animals (such as cattle and sheep) also cannot synthesize essential amino acids, they have special microbial flora in their rumen, which are able to synthesize essential amino acids and incorporate them into microbial proteins, that later become available for nutrition. However, these microbial proteins provide only 65% of the total protein required for intensive milk production. Hence, ruminant animals also suffer from limitations in essential amino acids (Leng, 1990).

Cereal grains represent the main dietary source of protein for human and livestock worldwide. Sorghum is one of the most important cereal crops, thus being, a major source of energy and protein for millions of people, especially in Africa and for livestock worldwide. Unfortunately the protein quality is low due to essential amino acid imbalance due to the ratio between the different storage proteins (Azevedo et al., 2003; 2004). The largest group, the prolamins, contains only traces of lysine and threonine (Vernaillen et al., 1993).

Essential amino acids like lysine and threonine are particularly important in cereal crops, due to the low concentration in the seeds (Fornazier et al., 2003). These amino acids, plus methionine and isoleucine have a common precursor, aspartate (Azevedo and Lea, 2001). The aspartate metabolic pathway in plants is strongly feedback regulated at key enzyme steps (Azevedo et al., 1997). 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 lysine and threonine (Azevedo et al., 1997). 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 characterised in a number of plants species, with some being shown to be present in different isoenzymic forms (Azevedo et al., 1992a; Teixeira et al., 1998; Vauterin et al., 1999).

inhibition have been observed in plants (Azevedo et al., 1997). 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 (Azevedo and Lea, 2001; Paris et al., 2002). Distinct regulatory properties, such as the effects of amino acids, S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC), SAM, calcium and light, among others, have also been investigated for some of the enzymes of the aspartate pathway (Rognes et al., 1980; Azevedo et al., 1992b; Lugli et al., 2000).

In this paper we have described for the first time the isolation of the enzymes involved in threonine biosynthesis, AK and HSDH, from sorghum seeds. Some regulatory aspects have also been investigated and a comparison with other cereal crop enzymes has been presented.

MATERIAL AND METHODS

Plant material: The massa 03 variety of sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench), kindly donated by Dr. Luiz Gustavo Nussio (Departamento de Produção Animal, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo) was used for the extraction and isolation of the AK and HSDH enzymes. Plants were grown in the experimental station of the Departamento de Genética, ESALQ-USP, Piracicaba during the summer season of 2001-2002, and immature sorghum seeds (previous to milky stage [stage 1, 93 days], milky stage [stage 2, 97 days], and after the milky stage [stage 3, 101 days]) were harvested directly into liquid nitrogen and stored at -70 °C until used in the extraction procedure.

Since these enzymes had not been previously isolated and characterized from sorghum, several parameters related to extraction, purification and enzyme assays were optimized using stage 2 sorghum seeds as follows:

Extraction of AK and HSDH: Extraction was carried out at 4 °C. Immature sorghum seeds (stage 2) were used and extracted in 5 volumes of 50 mmol.L⁻¹ Tris - HCl (pH 7.4) buffer containing 200 mmol.L⁻¹ KCl, 0.1 mmol.L⁻¹ PMSF, 0.1 mmol.L⁻¹ EDTA, 1 mmol.L⁻¹ DTT, 2 mmol.L⁻¹ L-lysine, 2 mmol.L⁻¹ L-threonine, 10% (v/v) glycerol and 5% (w/v) PVPP (buffer A). The extract was filtered through six layers of gauze and centrifuged at 10000 g_n for 30 min to remove completely the cell debris from the extract.

Ammonium sulphate precipitation: Ammonium sulphate, the most commonly used salt for fractionating proteins by precipitation was used as a first step of purification and was also used for concentrating AK and HSDH during purification. The crude extract was initially precipitated with three sequences of increasing ammonium sulphate concentration, to determine the optimum concentration:

- Sequence A: 0-20%; 20-40%; 40-60% and 60-80% ammonium sulphate saturation;
- Sequence B: 0-30%; 30-50% and 50-70% ammonium sulphate saturation;
- Sequence C: 0-30%; 30-60% and 60-80% ammonium sulphate saturation.

Solid ammonium sulphate was added slowly to the extract and stirred for 30 min at 4 °C. The sample was precipitated at 10000 g_n for 30 min at 4 °C. The pellet was resuspended with the minimum possible volume of 25 mmol.L⁻¹ Tris - HCl (pH 7.4) buffer containing 1 mmol.L⁻¹ DTT, 0.1 mmol.L⁻¹ L-lysine, 0.1 mmol.L⁻¹ L-threonine and 10% (v/v) glycerol (buffer B). The subsequent ammonium sulphate precipitations were carried out under the same conditions using the previous supernatant fraction and each pellet was desalted on Sephadex G-25 columns equilibrated in the same buffer. The desalted samples were used to measure AK and HSDH activities.

AK assay: AK activity was assayed routinely in a final volume of 500 μ L as described by Brennecke et al. (1996) with modifications according to the results obtained in this investigation. The assay mixture comprised 100 μ L 100 mmol.L⁻¹ Tris - HCl (pH 7.4) containing 1 mmol.L⁻¹ DTT and 20% (v/v) glycerol, 100 μ L 500 mmol.L⁻¹ aspartic acid (pH 7.4), 50 μ L 125 mmol.L⁻¹ magnesium sulphate, 50 μ L 200 mmol.L⁻¹ ATP (pH 7.4), 50 μ L 4 mol.L⁻¹ hydroxylamine (pH 7.4), 100 μ L H₂O and 50 μ L of enzyme extract. The assay was started by the addition of 50 μ L ATP and incubated at 35 °C for 30 min. The assay was terminated by the addition of 500 μ L of FeCl₃ reagent [670 mmol.L⁻¹ FeCl₃, 370 mmol.L⁻¹ HCl and 20% (w/v) TCA]. After centrifugation for 10 min at 10000 g_n , to remove precipitated protein, the absorbance of the supernatant was measured at 505 nm. Controls containing 10 μ L 10 mmol.L⁻¹ lysine, 10 μ L 10 mmol.L⁻¹ threonine and 10 μ L 10 mmol.L⁻¹ lysine plus 10 mmol.L⁻¹ threonine were normally included to ensure that the activity measured was due to AK and to identify the isoenzymes sensitive to lysine and threonine. Three replications (different extracts) were carried out for each assay.

HSDH assay: HSDH activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm in a final volume of 1.0 mL at 30 °C as described by Teixeira et al. (1998) with modifications according to the results obtained in this investigation. The assay mixture contained 800 μL 100 mmol.L^{-1} Tris-HCl (pH 9.0) containing 150 mmol.L^{-1} KCl, 1 mmol.L^{-1} DTT and 0.5 mmol.L^{-1} EDTA, 100 μL 200 mmol.L^{-1} DL-homoserine, 100 μL 4.8 mmol.L^{-1} NADP, 50 μL of H_2O and 50 μL enzyme. The effect of threonine on HSDH activity was determined by the addition of 10 μL of a 10 mmol.L^{-1} solution of the amino acid, to the assay mixture. Three replications (different extracts) were carried out for each assay.

Partial purification of AK and HSDH for determination of the optimum enzyme volume, incubation time, activity during seed development, and tissue specificity: Extraction and purification procedures were carried out at 4 °C. For the optimization of the enzyme assays, immature sorghum seeds (milky stage) were used and extracted in 5 volumes of buffer A. The extract was filtered through six layers of gauze and centrifuged at 10000 g_n for 30 min to remove completely the cell debris from the extract. Solid ammonium sulphate was added slowly to 20-60% saturation by gently stirring for at least 1 h, and the precipitated protein recovered by centrifugation at 10000 g_n for 30 min. The protein pellets were dissolved in a small volume of buffer B. The sample was loaded onto a Sephadex G-25 column (2.5 x 20 cm) equilibrated with 5 column volumes of buffer B and run under gravity. The desalted sample was used for the determination of optimum enzyme volume, incubation time, activity during seed development, tissue specificity, and NADP and NAD as HSDH substrates.

Optimum enzyme volume for AK and HSDH: The effect of volume of extract on AK and HSDH assays was determined by adding 50, 100, 150 and 200 μL of partially purified enzyme extract to the assay mixtures as described above.

Optimum time of incubation for AK and HSDH: The effect of time of incubation of the AK and HSDH assays was determined by incubating the assay mixtures for 15, 45, 75, 105 and 120 min at 35 °C.

AK and HSDH activities during seed development: Immature sorghum seeds from the three developing stages were used. The AK and HSDH activities were determined of the partially purified enzyme extract, as described above.

Tissue specificity of the AK and HSDH: AK and HSDH were extracted and partially purified as described above, from sorghum leaves, etiolated leaves and roots (normal seedlings and etiolated seedlings) obtained from 15 d old seedlings grown in a glasshouse at 14/10 h photoperiod (or shade) and 22-25 °C, and immature seeds (stage 2) and mature seeds. AK and HSDH activities were determined as described above.

NADP and NAD as co-enzyme substrates for HSDH: HSDH can use either NADP or NAD as the coenzyme substrate. We have tested NADP (4.8 and 2 mmol.L⁻¹) and NAD (4.8 and 2 mmol.L⁻¹) as substrates for HSDH in the assay mixture, using a partially purified extract (stage 2) as the source of enzyme, as described above.

Anion exchange chromatography step-wise elution of AK and HSDH: Partially purified AK and HSDH, following 20-60% saturated ammonium sulphate precipitation and desalting on a Sephadex G-25 column, were further purified on a DEAE-Sephacel column (2.5 x 8 cm; flow rate 1 mL.min⁻¹) equilibrated in buffer B. The column was washed with buffer B and a step-wise elution (0-100, 100-200, 200-300, 300-400 and 400-500 mmol.L⁻¹ KCl) was carried out. A final wash with 1 mol.L⁻¹ KCl was also performed and the fractions were analysed for enzyme activities.

Effect of calcium and EGTA on AK and HSDH activities: AK and HSDH activities were determined in the presence of 1.6 mmol.L⁻¹ CaCl₂, 1.6 mmol.L⁻¹ EGTA and 1.6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ plus 1.6 mmol.L⁻¹ EGTA. Blanks with and without the compounds being tested were included. Negative controls lacking the substrates, aspartic acid and homoserine, were also assayed on each occasion.

Effect of methionine and valine on AK and HSDH activities: AK and HSDH activities were determined in the presence of 1-5 mmol.L⁻¹ L-methionine and 1-5 mmol.L⁻¹ L-valine. Blanks and negative controls were tested as described above.

Effects of lysine, threonine and AEC on AK and HSDH activities: AK and HSDH activities were determined in the presence of 1-5 mmol.L⁻¹ L-lysine, 1-5 mmol.L⁻¹ L-threonine, 1-5 mmol.L⁻¹ L-lysine plus 1-5 mmol.L⁻¹ L-threonine and 1-5 mmol.L⁻¹ AEC. Blanks and negative controls were tested as described above.

Protein determination: The protein concentration of all samples was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

RESULTS AND DISCUSSION

AK and HSDH tissue specificity: AK and HSDH, which have been previously shown to play an important role in lysine metabolism (Azevedo et al., 1997) in several plant species, have been isolated from sorghum tissues. AK and HSDH activities were initially measured in leaves and roots (light grown and etiolated) obtained from 15 d old seedlings and mature and immature seeds. AK and HSDH activities were shown to be low or zero in all the seedling tissues tested, with the immature seeds exhibiting a much higher activity when compared to leaves and roots (Table 1). It has been shown previously for other plant species (e.g. maize and rice) that developing seeds normally exhibit the highest AK and HSDH activities with very low levels in other tissues (Brennecke et al., 1996; Teixeira et al., 1998; Gaziola et al., 1999), which agree with the results observed in sorghum. Furthermore, it is interesting that no activity was observed in the etiolated tissue which suggest that carbohydrate might induce the synthesis of AK.

Table 1. The specific activity of AK and HSDH isolated from various tissues of sorghum.

Specific activity (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ prot)	Sorghum Tissues					
	Leaves	Etiolated Leaves	Roots (Normal Seedlings)	Roots (Etiolated Seedlings)	Mature Seeds	Immature Seeds
AK	2.46 ± 0.21	0	1.83 ± 0.14	0	1.77 ± 0.22	8.19 ± 0.43
HSDH	0.89 ± 0.03	0	0.31 ± 0.02	0	0.73 ± 0.05	3.15 ± 0.22

AK and HSDH activities in developing seeds: The activities of AK and HSDH enzymes were also determined in the developing sorghum seeds. The three developing stages analyzed exhibited very similar levels of AK and HSDH activities (Table 2), suggesting that any of the three stages could be used for the isolation of the enzymes. However, in other plant species, endosperm or seed developmental stages have shown large variations in the distribution of enzyme activity (Azevedo et al., 1997). In maize, AK activity was shown increase at 12 days after pollination reaching a peak of maximum activity at 16 days after pollination (DAP), reducing dramatically after this period (Brennecke et al., 1996). In rice, the variation in activity has not been shown to vary as observed in maize, exhibiting higher activity in the milky stage (Teixeira et al., 1998). The determination of enzyme activity during seed development is important for future purification of the enzyme. Furthermore, in the case of AK and HSDH which have been shown to exist as distinct isoenzymes, the analyses of different stages may help to elucidate or determine different regulatory patterns for lysine and threonine biosynthesis during seed development. Studies with maize endosperms have also shown that enzymes involved in the metabolism of lysine exhibit distinct patterns of activity. AK and HSDH, which are involved in lysine and threonine biosynthesis, are normally higher in the early stages of seed development in order to provide lysine for incorporation in the storage proteins. However, the enzymes lysine 2-oxoglutarate reductase (LOR) and saccharopine dehydrogenase, involved in lysine catabolism, exhibit peaks of activity later during the endosperm development, suggesting the degradation of lysine not used in protein synthesis (Gaziola et al., 1999).

Based on these results and the data from the literature, seeds at stage 2 were used for the partial purification of the enzymes, the optimization of the enzyme assays and the other analyses carried out in this study.

Table 2. The specific activity of AK and HSDH isolated from sorghum seeds, at three different stages of development.

Specific activity (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ prot)	Seed Development Stage		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
AK	7.12 ± 0.63	6.89 ± 0.59	6.87 ± 0.53
HSDH	3.27 ± 0.21	3.33 ± 0.33	3.41 ± 0.18

Solid ammonium sulphate precipitation: Precipitation by the addition of neutral salts is probably the most commonly used simple method for fractionating proteins. The precipitated protein is usually not denatured and activity is recovered upon re-dissolving the pellet. In addition, these salts can stabilise proteins against denaturation, proteolysis or bacterial contamination (England and Seifter, 1990). Solid ammonium sulphate is the most commonly used salt and was used as the first step of purification and also used for concentrating AK and HSDH during these process.

AK has been shown to precipitate between 30-55% saturation of ammonium sulphate in *Cicer* (Dey and Guha-Mukherjee, 2000), 20-50% in rice (Lugli et al., 2000), 0-60% in *Nicotiana sylvestris* leaves (Frankard et al., 1992), 35-60% in maize anthers, immature endosperms and scutellum (Brennecke et al., 1996; Gaziola et al., 1999), 40-60% in carrot cells (Relton et al., 1988) and 0-66% in tobacco (Shaul and Galili, 1993). Three sequences of precipitation with ammonium sulphate were tested using stage 2 sorghum seeds (Figure 2). AK activity could be almost completely recovered from the pellets precipitated with 20-60% saturation of solid ammonium sulphate with very little left over after 60% (Figure 2 A,C,E). The HSDH activity also could be recovered with 20-60% with ammonium sulphate saturation (Figure 2 B,D,F). Although both enzymes could be recovered in the same fractions, it appears that HSDH activity is more concentrated between 30-50% saturation, whereas AK has a much wider distribution which could be due to different isoenzyme distribution. These results were not significantly different from the results previously reported for other plant species and the 20-60% ammonium sulphate saturation was adopted during enzyme purification, allowing the purification of both enzymes simultaneously.

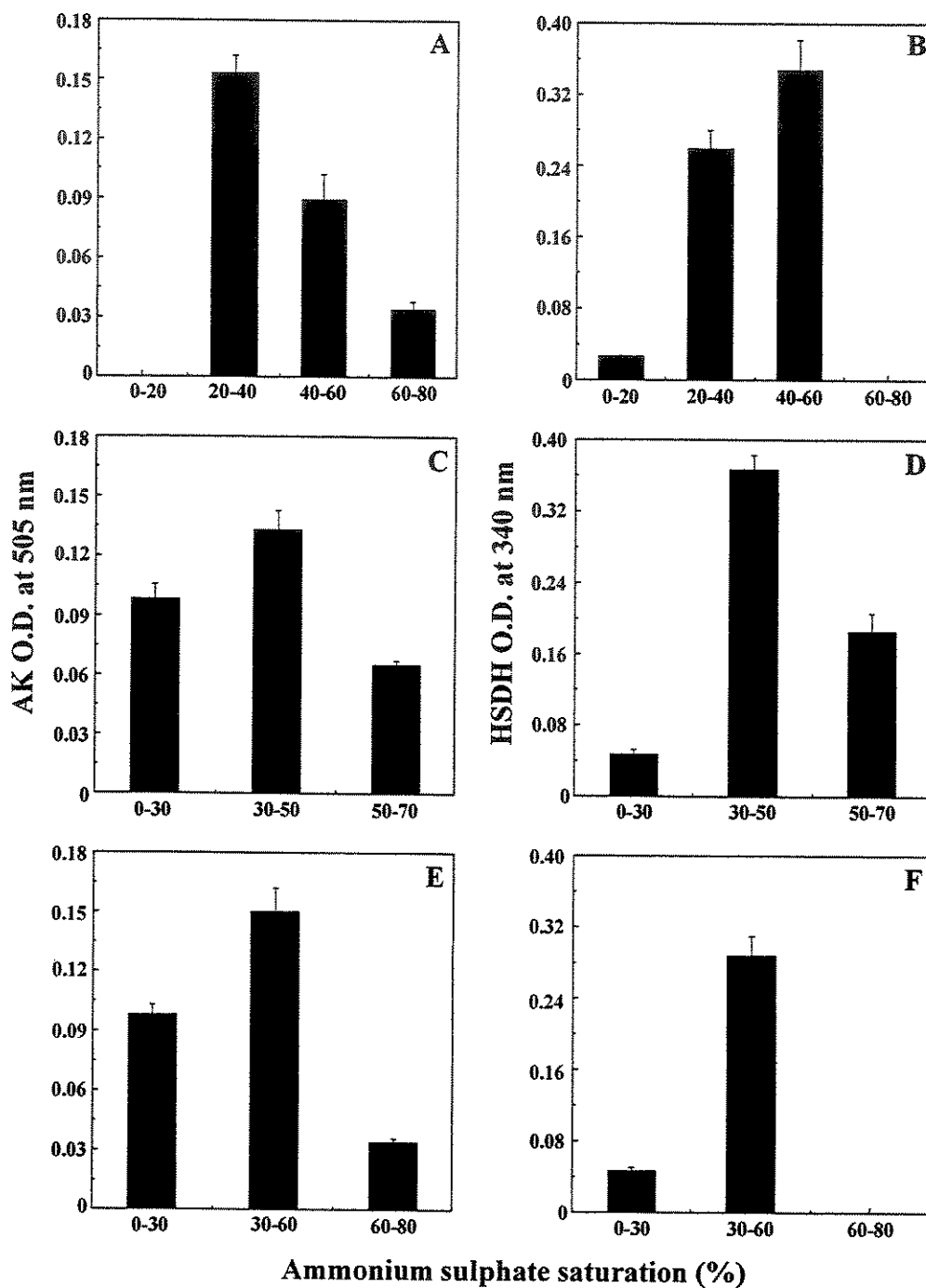


Figure 2. Ammonium sulphate precipitation of AK (A,C,E) and HSDH (B,D,F) isolated from sorghum seeds.

Enzyme assays optimization: A fundamental aspect in determining enzyme activity and further characterization of the enzyme is that the assay is reliable and enzyme activity is determined accurately. Previous reports have used distinct assay conditions depending on the plant or even tissue to be analyzed. Since these enzymes had not been previously isolated from sorghum, we decided to check some of these conditions for AK and HSDH assays in order to ensure accurate determinations of enzyme activity.

In many situations, sample volume can be reduced due to the amount of tissue or protein enzyme in the extract and very little can be used for the enzyme assay during a purification procedure. For instance, in the case of AK, which exhibits very low activity levels, larger amount of enzyme must be added to the assay mixture. Furthermore, the presence of isoenzymes that can be identified based on inhibition patterns require the use of more sample in assay test. We have established a total of 1 mL volume for the enzyme assays in this research. Previous reports have routinely used 100 μ L of plant extract as a standard volume for the assays (Bonner and Lea, 1990; Azevedo et al., 1992c). In this study, we measured both enzyme activities varying the amount of plant extracted added to the assays (Figure 3). The increase in plant extract added to the AK assay did not ensure a linear increase of AK activity above 100 μ L (Figure 3A), although a continuous increase in activity was observed up to 200 μ L enzyme extract. For HSDH, plant extract volumes higher than 100 μ L did not alter HSDH activity, suggesting that volumes higher than 100 μ L should be avoided (Figure 3B). Moreover, when plant extracts containing a higher concentration of enzyme protein is used, dilutions or lower volumes of extract should be used to ensure that over or under estimated HSDH activities are not determined.

Another aspect that should be considered is how long the assay is run. As observed for volume enzyme used in the assay, it is important that the assay also shows linearity over the period of incubation. Similarly to the results observed for enzyme volume, the AK assay did not show a linear increase in activity if time zero is considered, since a highest increase in activity was observed during the first 15 min of incubation, but being linear afterwards for up to 105 min of incubation (Figure 4A). A very similar variation was observed for HSDH (Figure 4B). Although a more detailed analysis of each assay can be carried out to check other parameters (e.g. substrate concentration), the combination of period of incubation and volume of plant extract should be considered during the purification procedure and altered according to the variations in the concentration of AK and HSDH enzyme proteins in the extracts.

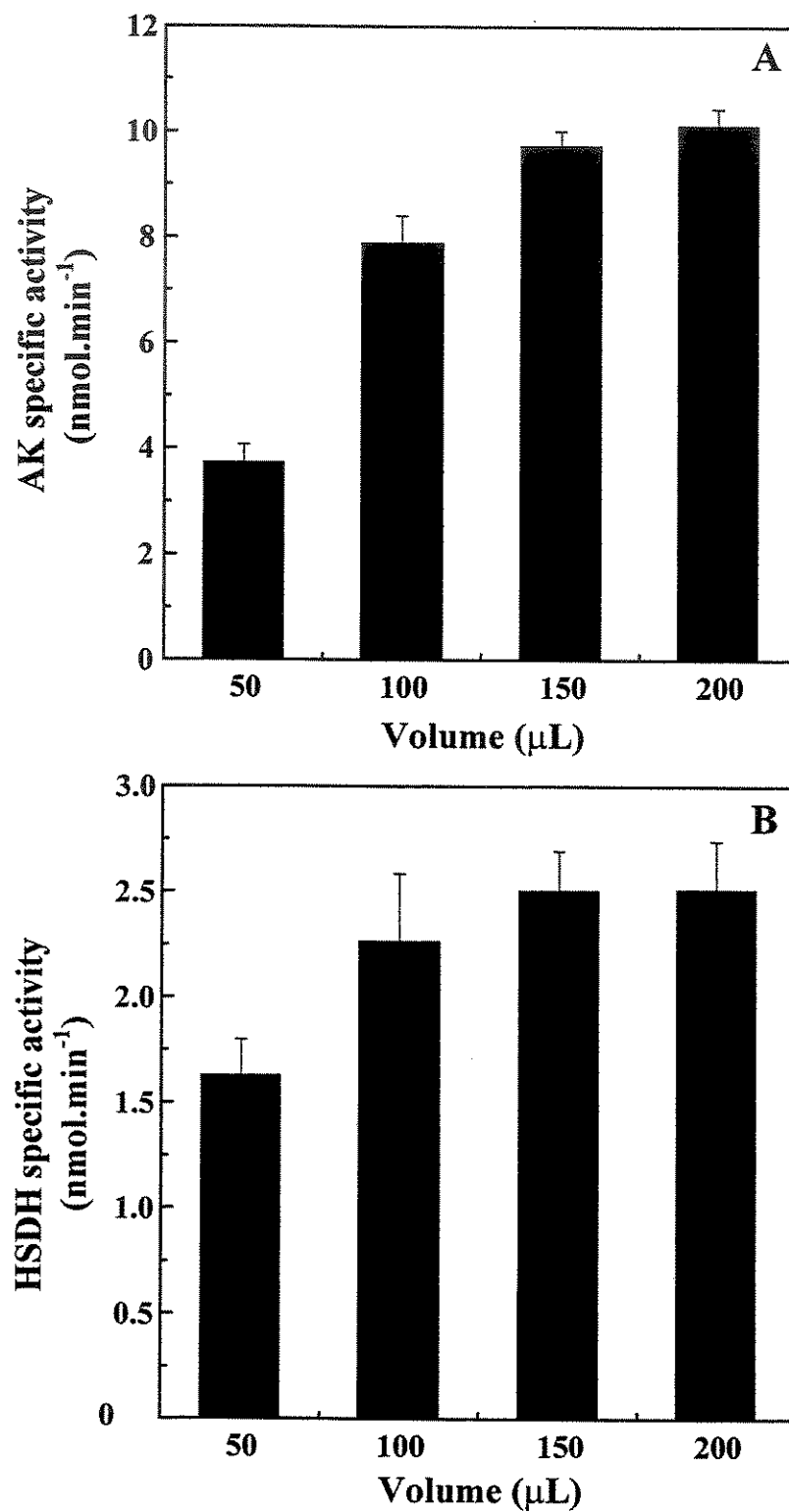


Figure 3. The effect of the volume of sorghum seed extract in the assay, on the determined activities of AK (A) and HSDH (B).

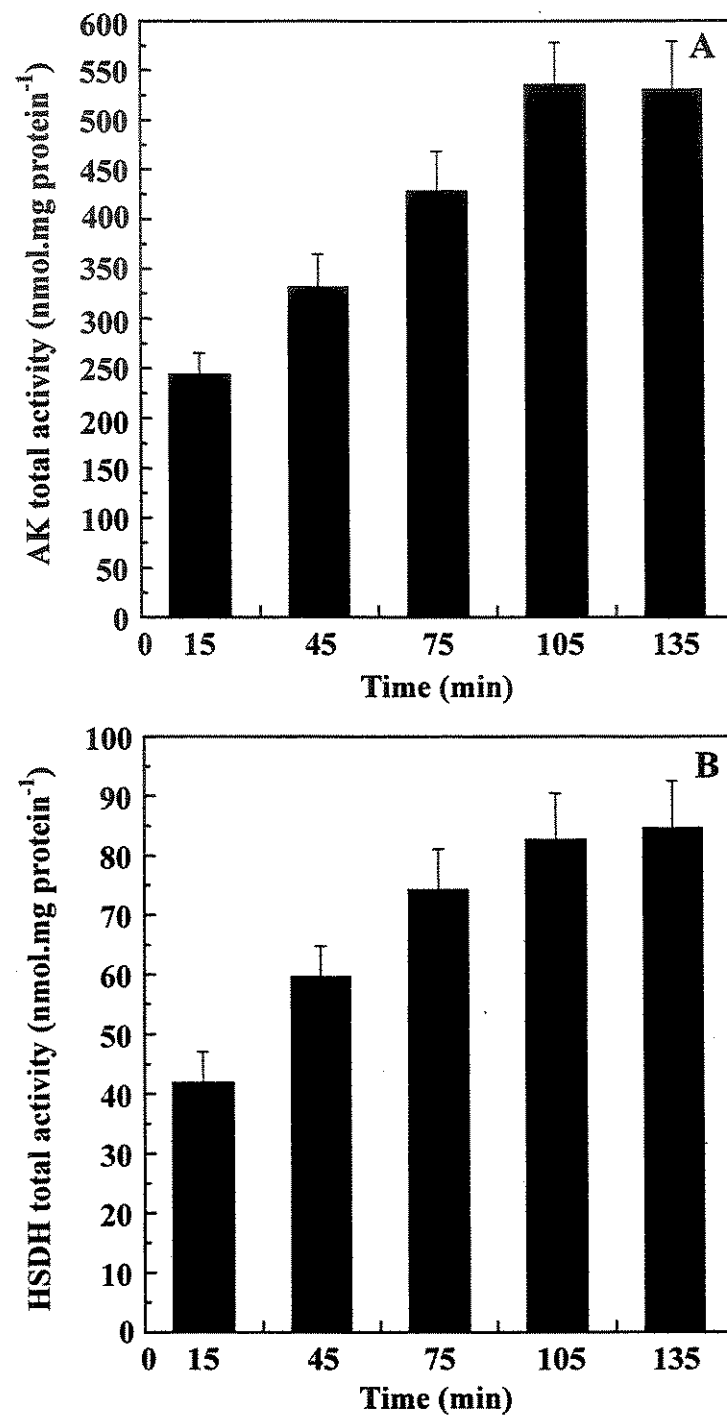


Figure 4. The effect of assay time on the determined activities of AK (A) and HSDH (B) isolated from sorghum seeds.

Based on these data, we have used in all further analyses 50 μL of plant extract, but reduced the time of incubation in both assays to periods varying between 10-30 min, depending on the enzyme to be measured and concentration of enzyme protein in the extracts.

NADP and NAD as substrates for HSDH: In higher plants, HSDH catalyses the reduction of aspartate semialdehyde to homoserine (Figure 1) by NADPH, with NADH also serving as a co-enzyme substrate (Azevedo and Lea, 2001). The great majority of the investigations carried out with HSDH have measured the activity in the reverse direction of the reaction, using NAD^+ or NADP^+ as co-enzyme substrates, due to the fact that aspartate semialdehyde is a difficult substrate to obtain. The sorghum HSDH was shown use NADP^+ more efficiently, even at the lower concentration tested, when compared to the HSDH activity obtained when using NAD^+ (Table 3). Although variation in the range of efficiency between NADP^+ and NAD^+ has been observed in the literature among plant species, NADP^+ was consistently more efficient as observed in sorghum.

Table 3. The activity of HSDH isolated from sorghum seeds using either NAD^+ or NADP^+ as a substrate.

Specific Activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$)	Substrate-			
	NADP^+ ($2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NADP^+ ($4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAD^+ ($2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAD^+ ($4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
HSDH	0.905 ± 0.057	1.302 ± 0.028	0.199 ± 0.055	0.529 ± 0.048

Enzymes partial purification: In order to study some properties of AK and HSDH, the enzymes were partially purified from developing stage 2 sorghum seeds using ammonium sulphate precipitation, followed by step-wise elution from an anion-exchange chromatography column. Both enzymes were co-eluted between 100 and 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl (Figure 5). Residual AK activity from the second peak (200-300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl), was also observed in the 300-400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl step-wise fraction (Figure 5A). Preliminary analysis of the fractions containing higher AK and HSDH activities in the presence of lysine and threonine, did not allow the identification of specific peaks containing the distinct isoenzymes of AK (lysine-sensitive and threonine-sensitive) or HSDH (threonine-resistant and threonine-sensitive) (data not shown).

Therefore, the fractions containing AK activity and HSDH activity were combined and used in all further analyses.

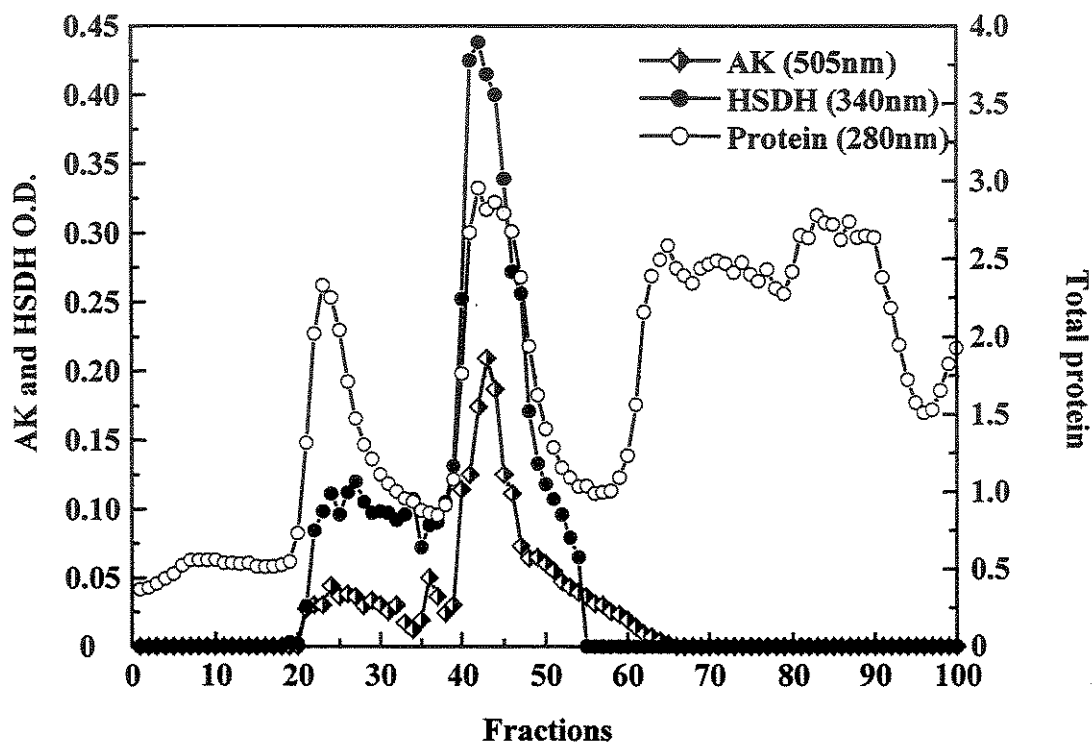


Figure 5. Step-wise elution of AK and HSDH isolated from sorghum seeds, from an anion-exchange chromatography column, using increased concentrations of KCl.

Effect of lysine, threonine and AEC on AK and HSDH activities: The combined fractions containing AK and HSDH activities from the step-wise anion-exchange chromatography procedure were analyzed in the presence of the amino acids lysine and threonine (Figure 6). Both amino acids were shown to be able to inhibit AK, indicating the existence of at least two isoenzymes of AK, one sensitive to lysine and the other sensitive to threonine, even though the purification procedure used, was not able to separate distinct peaks (Figure 6A). The inhibition patterns also revealed that the lysine-sensitive AK isoenzyme is predominant in sorghum seeds since lysine inhibited AK activity more strongly, when compared to threonine at all concentrations tested (Figure 6A). Moreover, when both amino acids were added together to the assay mixture, a stronger inhibitory effect was observed further confirming the existence of two isoenzymes of AK in sorghum (Figure 6A). According to previous reports, lysine has been

widely shown to be the main inhibitor of AK activity in higher plants (Azevedo et al., 1997), the only clear exception being coix seeds, in which the threonine-sensitive AK isoenzyme is predominant (Lugli et al., 2002). AK from sorghum appears to follow the pattern of isoenzyme distribution exhibited by the majority of other plant species. The addition of AEC to the assay mixture is also interesting, since this lysine analogue was not able to produce a strong inhibition of AK activity (Figure 6A). AEC has been shown to be able to substitute for lysine in proteins (Azevedo et al., 1997) and also to act as a substrate for LOR activity, but not to the same extent as lysine (Gaziola et al., 2000) in rice seeds. The effect of these amino acids on HSDH activity were very different (Figure 6B), with only a slight inhibition by lysine at the highest concentration tested, which has not been reported previously. Threonine inhibited HSDH activity more effectively above the concentration of 2 mmol.L^{-1} , but still the majority of HSDH activity could not be inhibited by the amino acid-, indicating that at least two isoenzymes of HSDH are present in sorghum seeds, one resistant to threonine inhibition which is predominant, and the other sensitive to threonine inhibition, a pattern that essentially agrees with what has been reported for HSDH from other plant species (Azevedo et al., 1997). Surprisingly, the addition of lysine and threonine together produced a stronger inhibition of HSDH when compared to threonine alone, which has not been reported previously. In a similar way, AEC also inhibited HSDH activity, but at the lower concentration tested. Further investigation with separated HSDH and AK isoenzymes may help to elucidate such results.

Effect of methionine and valine on AK and HSDH activities: The effect of methionine and valine on AK and HSDH activities have been investigated previously in other plant species and have shown distinct results (Lugli et al., 2000). In sorghum seeds, the addition of both amino acids to the assay mixture did not only result in any significant alteration in AK activity (Figure 6C). However, at 5 mmol.L^{-1} methionine partially inhibited HSDH activity, whereas valine was able to inhibit HSDH activity to the same extent as methionine at all concentrations tested (Figure 6D). Methionine is also synthesized in the aspartate metabolic pathway (Figure 1), whereas valine is not. The inhibition of HSDH activity by methionine and valine had not been previously tested or reported, as far as we are aware. These results are difficult to explain and further investigation is clearly necessary.

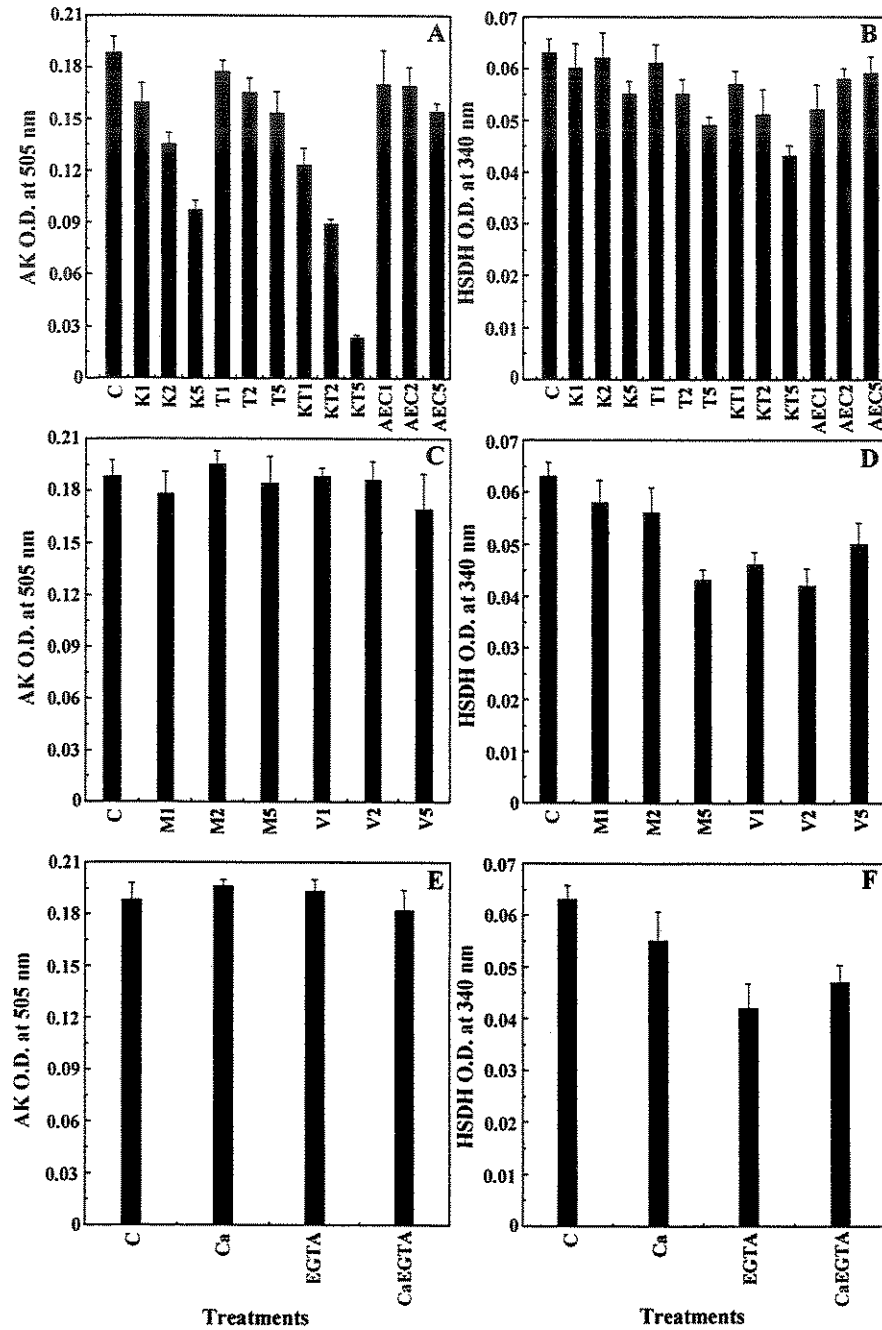


Figure 6. The effect of the addition of amino acids (K, lysine; T, threonine; M, methionine; V, valine), Ca, EGTA and aminoethyl L-cysteine (AEC) alone and in combination at mM concentrations, on the determined activities of AK (A,C,E) and HSDH (B,D,F) isolated from sorghum seeds.

Effect of calcium and EGTA on AK and HSDH activities: It is well established that calcium plays an important role in plant signaling (Hetherington and Bownlee, 2004). The regulatory action of calcium ranges from control of ion transport to gene expression. A rapid and transient increase in cytosolic calcium concentration upon different extra-cellular stimuli is considered as the primary event in different physiological responses (Shacklock et al., 1992) and in the activation of different biochemical pathways (Karchi et al., 1995). In earlier studies, it was shown that phytochrome activation of AK is mediated through calcium (Dey and Guha-Mukherjee, 1999). Further evidence was provided when elevated level of intracellular calcium in immature seeds activated AK (Dey and Guha-Mukherjee, 2000). However, such a regulatory role for calcium on AK could not be confirmed in a series of other reports with different plants species (Azevedo and Lea, 2001). AK isoenzymes highly purified from carrot cell cultures (Relton et al., 1988), maize cell cultures (Azevedo et al., 1992c) and rice seeds (Lugli et al., 2000) were not affected by calcium and EGTA. The effect of calcium and EGTA on the combined pool of fractions containing AK and HSDH activity, from the step-wise anion exchange chromatography was tested (Figure 6). The activity of AK was not affected by any of the treatments, indicating that calcium does not regulate AK activity from sorghum seeds (Figure 6E). Although calcium did not stimulate HSDH activity, the addition of EGTA alone and in combination with extra calcium suggest that HSDH may be stimulated by calcium under some circumstances (Figure 6F). It is, likely that the calcium concentration within the cell system is high enough to maintain HSDH activity at its maximum, so that the addition of extra calcium does not further stimulate the activity, but addition of EGTA could reduced HSDH activity (Figure 6F). Although a controversy exists about the regulatory role for calcium on AK activity in plants, such a regulation by calcium of enzymes involved in lysine catabolism has been reported (Kemper et al., 1998; Gaziola et al., 2000).

A comprehensive purification procedure is under way on our laboratory which will allow the isolation of the specific isoenzymes from sorghum and will help to characterize the properties of each isoenzyme. Furthermore, we will also be able to identify the existence of a bifunctional enzyme containing threonine-sensitive AK and HSDH domains as has been reported in other plant species (Azevedo, 2002).

Acknowledgements: This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Grant n°. 01/13216-4) and The British Council. R.A.A. and R.R.F. also would like to thank CNPq and FAPESP (00/05960-2), respectively, for the fellowship and scholarship granted.

REFERENCES

- Azevedo RA (2002) Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. *Amino Acids* 22:217-230.
- Azevedo RA, Arruda P, Turner WL, Lea PJ (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* 46:395-419.
- Azevedo RA, Blackwell RD, Smith RJ, Lea PJ (1992a) Three aspartate kinase isoenzymes from maize. *Phytochemistry* 31:3725-3730.
- Azevedo RA, Damerval C, Landry J, Lea PJ, Bellato CM, Meinhardt LW, Le Guilloux M, Delhay S, Toro AA, Gaziola SA, Berdejo BDA (2003) Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. *Eur J Biochem* 270:4898-4908.
- Azevedo RA, Damerval C, Lea PJ, Landry J, Bellato CM, Meinhardt LW, Le Guilloux M, Delhay S, Toro AA, Gaziola SA, Varisi VA, Gratão PL (2004) Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. *Funct Plant Biol*, in press.
- Azevedo RA, Lea PJ (2001) Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids* 20:261-279.
- Azevedo RA, Smith RJ, Lea PJ (1992b) Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. *Phytochemistry* 31:3735-3737.
- Azevedo RA, Smith RJ, Lea PJ (1992c) Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* 31:3731-3734.
- Bonner PLR, Lea PJ (1990) Enzymes of lysine synthesis. In: Dey PM, Harborne JB, Lea PJ (eds), *Methods in Plant Biochemistry, Enzymes of Primary Metabolism*, vol 3, pp.297-315. Academic Press, San Diego, USA.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-259.

- Brennecke K, Souza Neto AJ, Lugli J, Lea PJ, Azevedo RA (1996) Aspartate kinase in the maize mutants Ask1-LT19 and Opaque-2. *Phytochemistry* 41:707-712.
- Dey M, Guha-Mukherjee S (1999) Phytochrome activation of aspartate kinase in etiolated chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings. *J Plant Physiol* 154:454-458.
- Dey M, Guha-Mukherjee S (2000) Aspartate metabolism in *Cicer* immature seeds requires Ca^{2+} , protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Sci* 150:85-91.
- Englard S, Seifter S (1990) Precipitation techniques. In: Deutscher MP (ed), *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, vol 182, pp.285-301. Academic Press, San Diego, USA.
- Fornazier RF, Azevedo RA, Ferreira RR, Varisi VA (2003) Lysine catabolism: flow, metabolic role and regulation. *Braz J Plant Physiol* 15:9-18.
- Frankard V, Ghislain M, Jacobs M (1992) Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* 99:1285-1293.
- Galili G, Galili S, Lewinsohn E, Tadmor Y (2002) Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. *Crit Rev Plant Sci* 21:167-204.
- Gaziola SA, Alessi ES, Guimarães PEO, Damerval C, Azevedo RA (1999) Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. *J Agric Food Chem* 47:1268-1275.
- Gaziola SA, Sodek L, Arruda P, Lea PJ, Azevedo RA (2000) 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. *Physiol Plant* 110:164-171.
- Hetherington AM, Brownlee C (2004) The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Ann Rev Plant Biol*, in press.
- Karchi H, Miron D, Ben-Yaacov S, Galili G (1995) The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires Ca^{2+} and protein phosphorylation. *Plant Cell* 7:1963-1970.
- Kemper EL, Cord-Neto G, Capella AN, Gonçalves-Butruille M, Azevedo RA, Arruda P (1998) Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur J Biochem* 253:720-729.

- Kingston-Smith AH, Thomas HM (2003) Strategies of plant breeding for improved rumen function. *Ann Appl Biol* 142:13-24.
- Leng RA (1990) Factors affecting the utilization of poor quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr Res Rev* 3:277-303.
- Lugli J, Campbell A, Gaziola SA, Smith RJ, Lea PJ, Azevedo RA (2002) Enzymes of lysine metabolism from *Coix lacrima-jobi* seeds. *Plant Physiol Biochem* 40:25-32.
- Lugli J, Gaziola SA, Azevedo, RA (2000) Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. *Plant Sci* 150:51-58.
- Paris S, Wessel PM, Dumas R (2002) Overproduction, purification, and characterization of recombinant bifunctional threonine-sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Express Purif* 24:105-110.
- Relton JM, Bonner PLR, Wallsgrove RM, Lea PJ (1988) Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension culture. *Biochim Biophys Acta* 953:48-60.
- Rognes SE (1990) Threonine biosynthesis. In: Dey PM, Harborne JB, Lea PJ (eds), *Methods in Plant Biochemistry, Enzymes of Primary Metabolism*, vol 3, pp.315-325. Academic Press, San Diego, USA.
- Rognes SE, Lea PJ, Mifflin BJ (1980) S-adenosylmethionine - a novel regulation of aspartate kinase. *Nature* 287:357-359.
- Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ (1992) Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorpho-genesis. *Nature* 358:753-755.
- Shaul O, Galili G (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* 23:759-768.
- Teixeira CMG, Gaziola AS, Lugli J, Azevedo RA (1998) Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds. *J Plant Physiol* 153:281-289.
- Vauterin M, Frankard V, Jacobs M (1999) The *Arabidopsis thaliana dhdds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Mol Biol* 39:695-708.

Vernaillen S, Laureys F, Jacobs M (1993) A potential screening system for identifying Sorghum ecotypes with increased lysine in the seeds. Plant Breed 111:295-305.

5.3. Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear

A cromatografia por troca iônica foi utilizada para a purificação parcial das enzimas AK e HSDH em sementes imaturas de sorgo, utilizando-se um gradiente linear de 0 - 500 mmol.L⁻¹ KCl em colunas de DEAE-Sephacel. As atividades de AK foram recuperadas nas frações correspondentes a 155 - 262 mmol.L⁻¹ KCl, sendo observado pelo menos dois picos, o primeiro eluído em 183 mmol.L⁻¹ KCl e o outro em 236 mmol.L⁻¹ KCl (Figura 4A). Pelos resultados apresentados até agora em sorgo, fica evidente a sobreposição de possíveis isoformas, tanto de AK como de HSDH, que ainda necessitam de uma melhor separação para caracterização precisa. Assim, tanto o primeiro pico como o segundo, referem-se claramente às isoformas de AK sensíveis à inibição por lisina, sendo que percebe-se também uma isoforma de AK sobreposta ao primeiro pico de AK eluída juntamente com o pico de HSDH sensível à inibição por treonina, podendo ser esta isoforma caracterizada como AK-HSDH bifuncional. No caso da HSDH (Figura 4B), foi observada uma eluição deslocada de 110 – 251 mmol.L⁻¹ KCl, onde dois picos que se sobrepõem, sendo o primeiro pico eluído em 145 mmol.L⁻¹ KCl e o segundo em 183 mmol.L⁻¹ KCl. O primeiro refere-se a uma isoforma da enzima resistente à inibição por treonina e o segundo, à isoforma sensível à inibição por treonina, podendo este fazer parte do polipeptídeo bifuncional AK-HSDH, como já mencionado. Em sementes imaturas de arroz foram encontrados dois picos de atividade de AK, um caracterizado como sendo uma isoforma sensível à inibição por treonina e outro sensível à inibição por lisina (Lugli et al., 2000), sendo que a isoforma inibida por treonina eluiu juntamente com a HSDH, sugerindo a presença de um polipeptídeo bifuncional nesta planta, com atividade AK-HSDH (Teixeira et al., 1998), o que tem sido observado em várias plantas, como em cenoura (Wilson et al., 1991) e em milho (Azevedo et al., 1992b).

Em contrapartida, Lugli et al. (2002), estudando coix, detectaram a presença de duas isoformas da AK, uma sensível a inibição por lisina e outra sensível a inibição por treonina, sendo esta última predominante nesta espécie, já que em plantas superiores estima-se a predominância da isoforma sensível a inibição por lisina (Azevedo & Lea, 2001), além de não se ter claros indícios que a isoforma sensível a treonina seja parte de um polipeptídeo bifuncional com atividade de AK-HSDH. No caso de sorgo, nossos resultados sugerem a presença de pelo menos três isoformas de AK, duas delas sensíveis a inibição por lisina e uma outra sensível a inibição por treonina (Figura 4A).

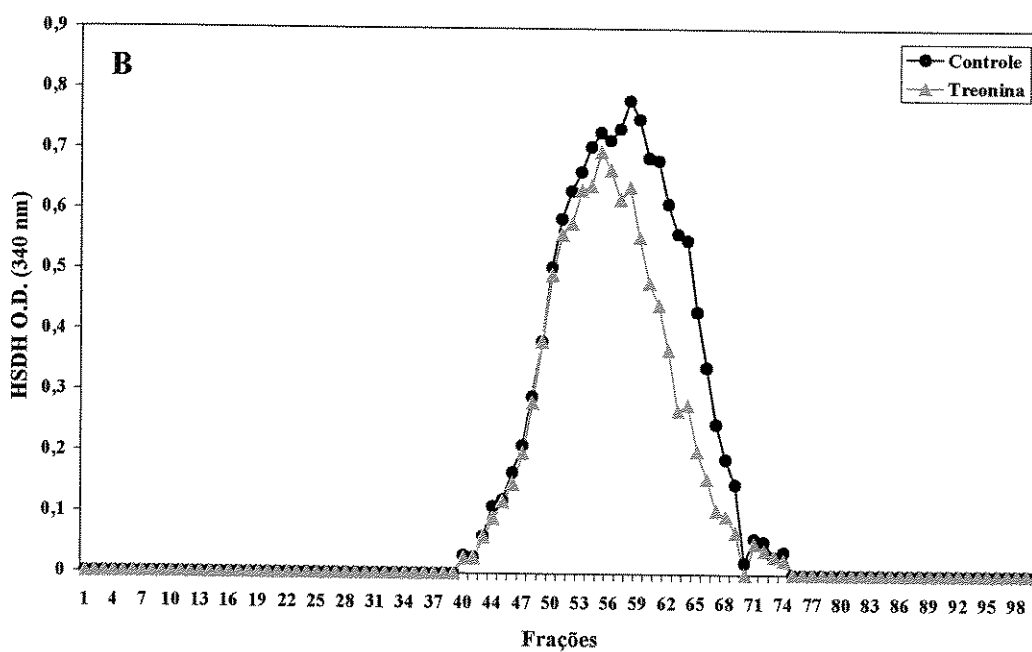
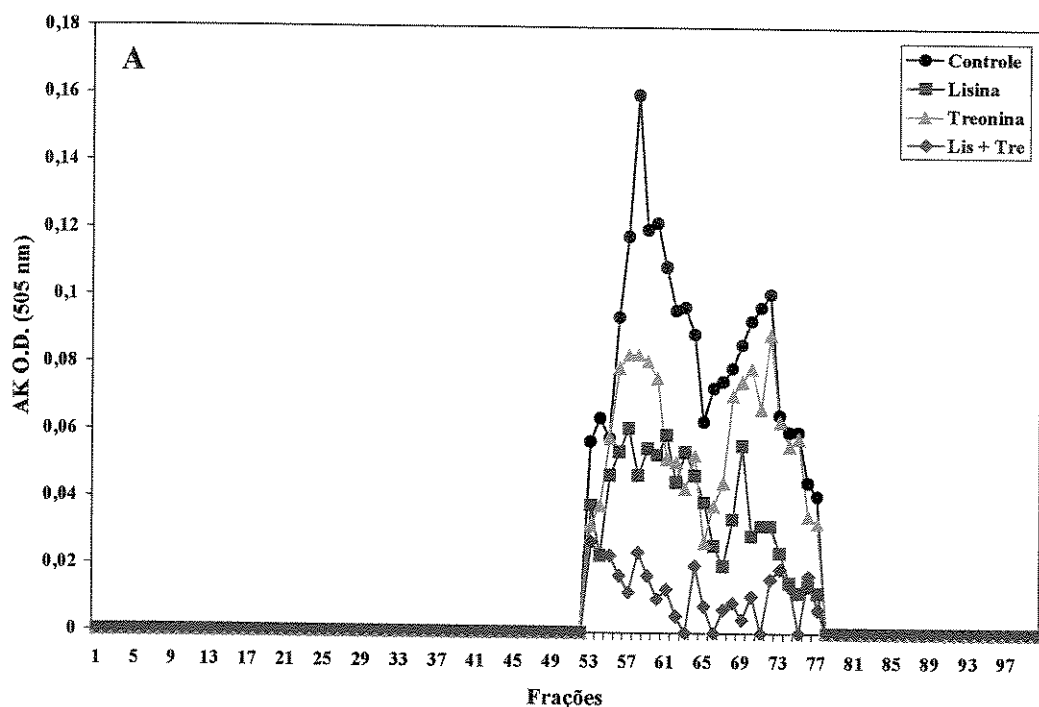


FIGURA 4. Absorbâncias relativas às atividades de AK (A) e HSDH (B) nas frações obtidas da eluição do tipo gradiente linear ($0 - 500 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ KCl}$) em coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel. Os tratamentos estão indicados na própria figura.

A adição de lisina juntamente com treonina revelou um efeito sinérgico inibindo fortemente a atividade de AK em sementes imaturas de sorgo. Aparentemente, para HSDH foi observada a presença de dois picos de atividade e de pelo menos duas isoformas da enzima, uma resistente e outra sensível a inibição por treonina (Figura 4B).

5.4. Cromatografia de filtração em gel em FPLC

A purificação das enzimas AK e HSDH em sementes imaturas de sorgo também foi realizada por cromatografia de filtração em gel, utilizando-se coluna Superose 12HR 10 / 30 em sistema FPLC. O perfil de eluição de AK revelou a presença de pelo menos um pico de atividade bem característico e um segundo pico de menor intensidade (Figura 5A). Em contrapartida, HSDH apresentou somente um pico de atividade (Figura 5B). Em arroz, por sua vez, esta cromatografia revelou a presença de somente um pico de atividade de AK, porém este pode ser separado em dois pela adição de treonina e lisina separadamente, confirmando a presença de duas isoformas da AK, uma sensível a inibição por treonina e outra sensível a inibição por lisina (Teixeira et al., 1998), reforçando a hipótese que isto é uma característica de todos os vegetais (Azevedo & Lea, 2001). Similarmente, HSDH de arroz eluiu apresentando somente um pico de atividade, sendo este fortemente inibido por treonina (Teixeira et al., 1998). Este padrão indica a possível existência de uma isoforma da HSDH sensível à treonina, o que também pode ser válido para a atividade de HSDH de sementes imaturas de sorgo.

A massa molecular da AK de sementes imaturas de sorgo foi determinada através de cromatografia de filtração em gel (Superose 12HR 10 / 30). O pico de atividade da enzima foi estimado ter uma massa molecular de aproximadamente 154 kDa (figura 6). As massas moleculares das isoformas da AK sensíveis a lisina variam grandemente entre as espécies vegetais.

Em arroz, Teixeira et al. (1998) estimaram a massa molecular desta isoforma em 167 kDa, enquanto que em milho Dotson et al. (1989) e Azevedo et al. (1992a) estimaram em 254 kDa e 150 kDa, respectivamente. A massa molecular da AK sensível à lisina de cenoura também apresentou variações entre 100 kDa e 253 kDa (Relton et al., 1988). Em relação às isoformas da AK sensíveis a treonina, Teixeira et al. (1998), trabalhando com arroz, encontraram uma massa molecular de 186 kDa, enquanto que em milho, Azevedo et al. (1992a) determinaram massa molecular de 180 kDa para esta isoforma da AK.

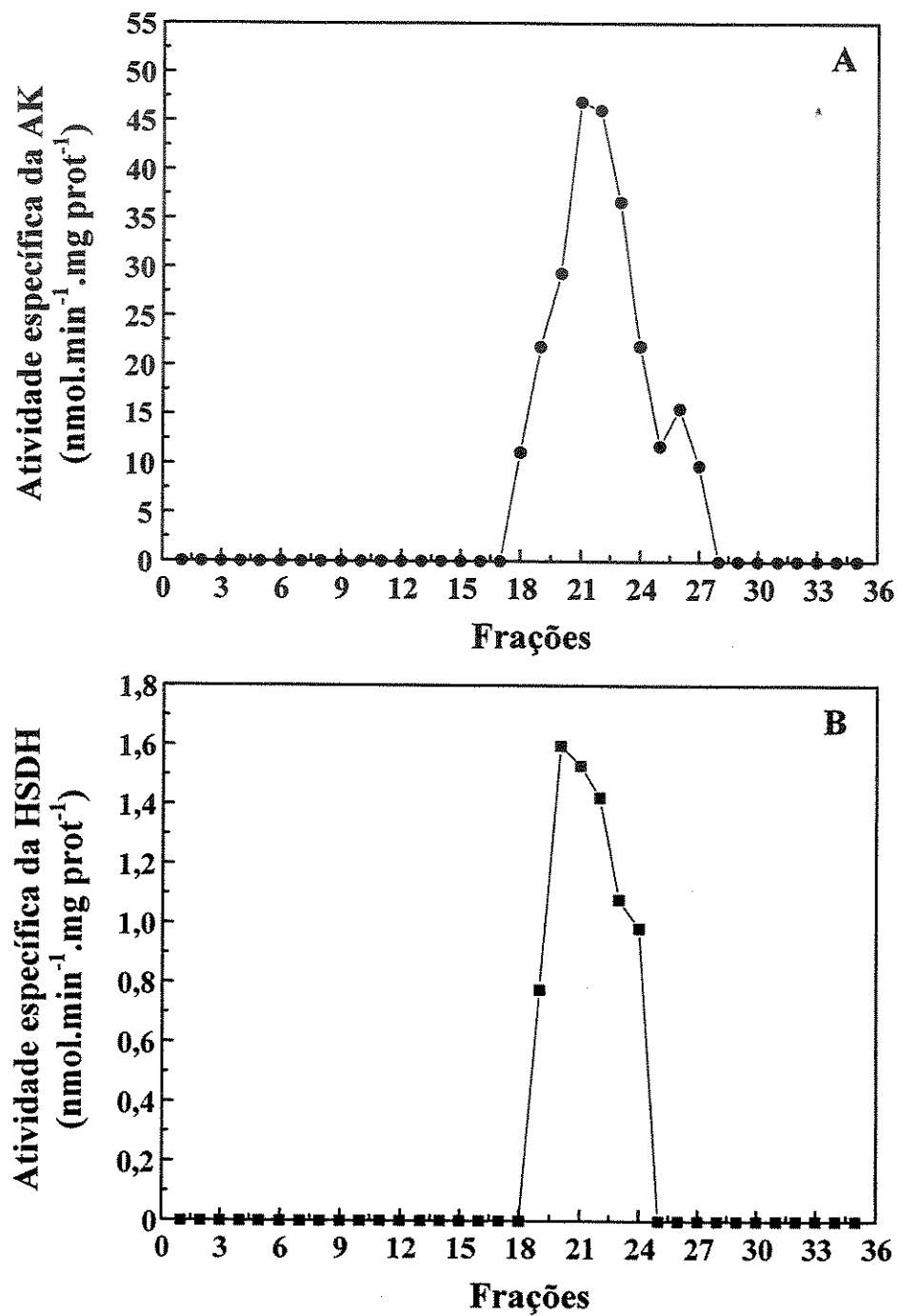


FIGURA 5. Atividades específicas da AK (A) e HSDH (B) em nmol.ml⁻¹.mg prot⁻¹ a partir das frações obtidas de cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12HR 10 / 30 em sistema FPLC.

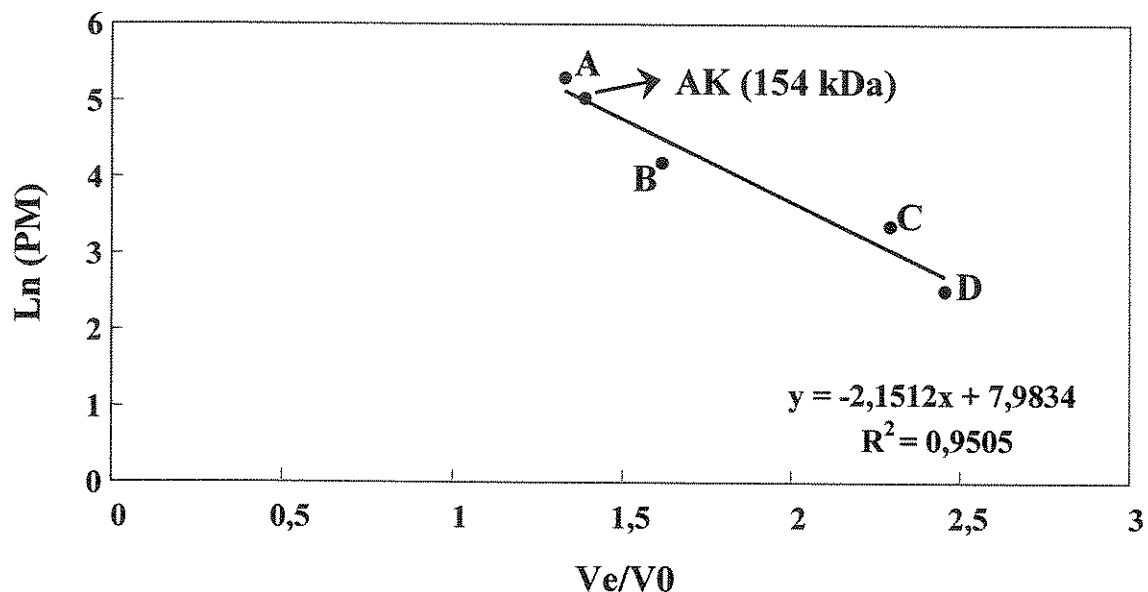


FIGURA 6. Massa molecular da AK determinada por cromatografia de filtração em gel (Superose 12HR 10 / 30), onde $\ln(PM)$: Log neperiano da massa molecular; V_e : volume de eluição da amostra; V_0 : volume vazio da coluna. Padrões: (A) β -amilase (200 kDa), (B) BSA (67 kDa), (C) Anidrase Carbônica (29 kDa) e (D) Citocromo c (12,4 kDa).

5.5. Cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200

O estudo de purificação das isoenzimas da AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo por cromatografia de filtração em gel em coluna preparativa de Sephacryl S-200, foi realizado devido à sua propriedade de separação de proteínas de 5 a 250 kDa e nos revelou alguns resultados importantes.

No caso da AK, foi observado claramente um pico de atividade inibido por treonina, o qual pode ser parte de um polipeptídeo bifuncional com atividade de AK-HSDH. Sugere-se também a presença de pelo menos uma isoenzima de AK inibida por lisina, a qual se apresenta intercalada ao primeiro pico discutido (Figura 7A).

Para a enzima HSDH, foi observado somente um pico de atividade eluído coincidentemente junto com o primeiro pico de AK encontrado. Esta isoenzima de HSDH apresenta características de inibição por treonina, reforçando a hipótese de que se trata da isoenzima AK-HSDH bifuncional e nenhum pico de atividade dessa enzima resistente a inibição por treonina foi observado (Figura 7B).

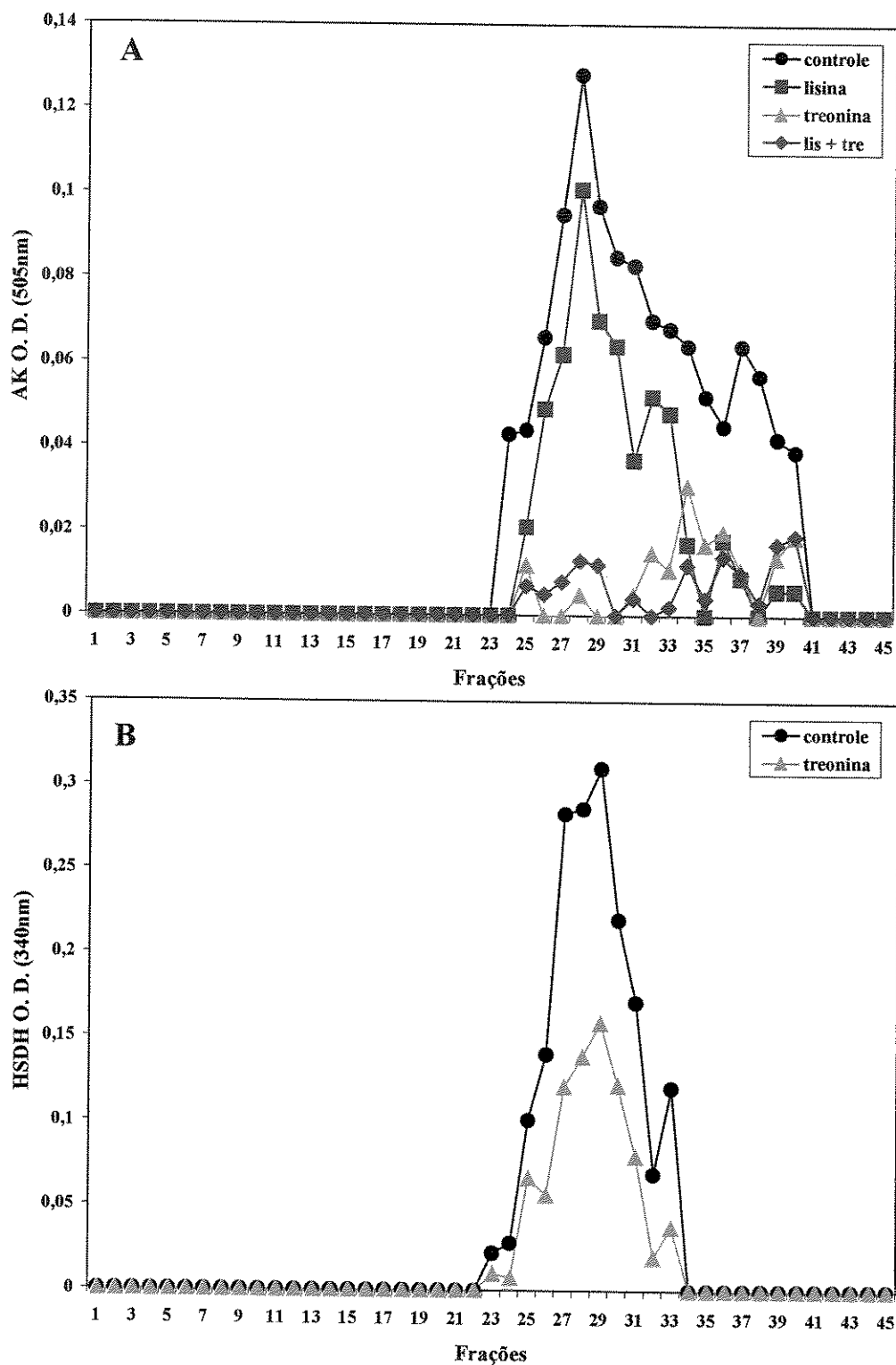


FIGURA 7. Absorbâncias relativas as atividades de AK (A) e HSDH (B) nas frações eluídas em cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200. Os tratamentos estão indicados na própria figura.

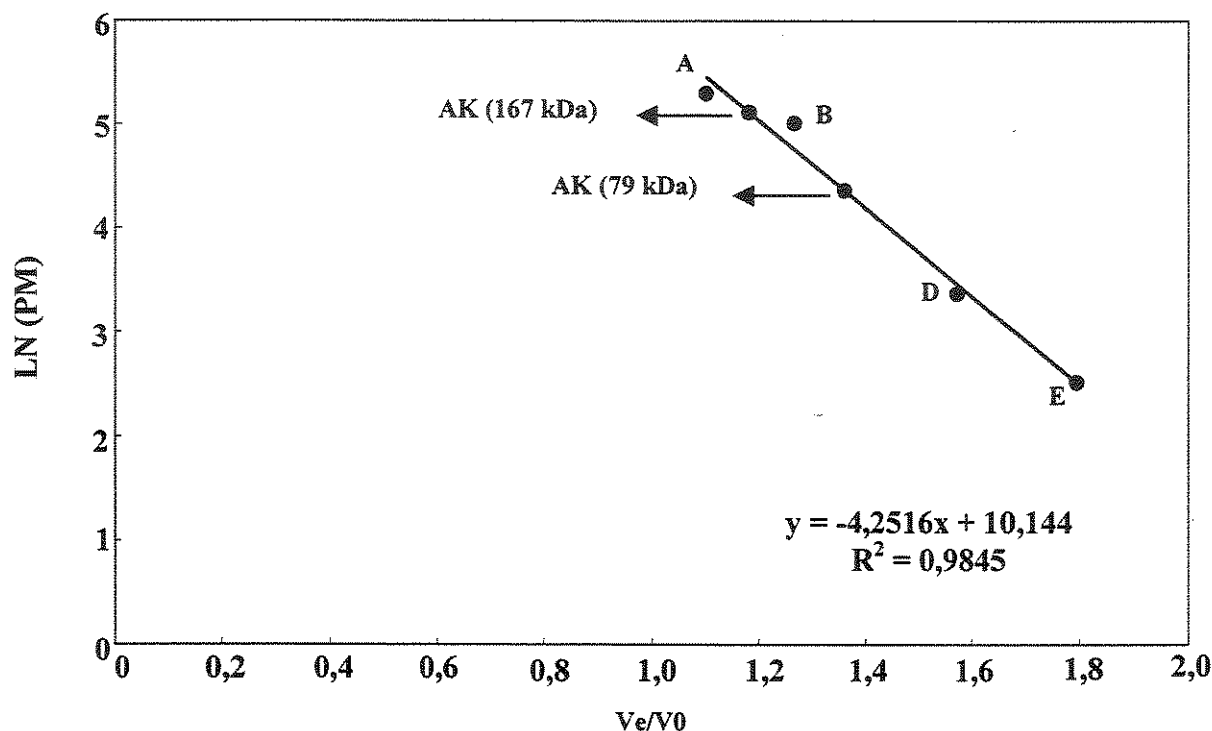


FIGURA 8. Massa molecular da AK determinada por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200), onde $\ln(PM)$: Log neperiano da massa molecular; V_e : volume de eluição da amostra; V_0 : volume vazio da coluna. Padrões: (A) β -amilase (200 kDa), (B) Álcool Desidrogenase (150 kDa), (C) Anidrase Carbônica (29 kDa) e (D) Citocromo c (12,4 kDa).

A massa molecular da AK de sementes imaturas de sorgo foi determinada através de cromatografia de filtração em gel S-200. A massa molecular associada ao primeiro pico de atividade da enzima foi estimada em aproximadamente 167 kDa, correspondendo, pelas características de inibição apresentadas, à isoenzima bifuncional AK-HSDH. Entretanto, foi observado também, um segundo pico de aproximadamente 79 kDa, o qual parece ser referente a uma isoforma de AK inibida por lisina. Porém, os padrões de inibição observados por esta técnica não deixam claras as características dessa isoenzima (Figura 8).

5.6. Tabela de Purificação

Os estudos relativos à purificação da enzima AK de sorgo revelaram um fator de purificação de aproximadamente 30 vezes, bem como uma recuperação final de 8% (Tabela 2).

Estes valores estão muito baixos quando comparados com trabalhos realizados com outras espécies de plantas, como o milho estudado por Azevedo et al. (1992a) e cenoura estudado por Relton et al. (1988). Similarmente, o grau de purificação da AK de sementes imaturas de arroz também foi baixo, aproximadamente 28 vezes, porém a recuperação da enzima foi consideravelmente alta quando comparada com trabalhos anteriores, em torno de 82% (Teixeira et al., 1998).

TABELA 2. Protocolo para purificação parcial da AK a partir de 200 g de sementes imaturas de sorgo (estágio 2). Passos sequenciais de purificação da AK a partir de um dos vários experimentos.

<i>PURIFICAÇÃO</i>	Proteína total (mg)	Atividade total (nmol)	Atividade específica (nmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	Recuperação (%)	Fator de Purificação (vezes)
<i>Extrato bruto</i>	1890,34	-	-	-	-
<i>Sulfato de amônio (20-60%)</i>	673,27	1131,28	1,68	100	-
<i>DEAE-Sephacel (100-500 mmol.L⁻¹ KCl)</i>	154,21	3379,08	21,91	298,70	13,04
<i>Superose 12HR 10/30</i>	1,85	92,91	50,18	8,21	29,87

5.7. Modulação da AK e HSDH

Em plantas superiores as atividades das enzimas AK e HSDH podem ser inibidas ou ativadas por alguns aminoácidos, análogos de aminoácidos e cofatores importantes para diversos passos metabólicos. No intuito de se estudar a influência de vários compostos no comportamento dessas enzimas em sementes imaturas de sorgo, foram determinadas as atividades de AK e HSDH em relação aos tratamentos com lisina, treonina, metionina, valina, AEC, cálcio, EGTA, calmodulina, componente 48/80, SAM e KCl (Figura 9A,B). Apesar de ainda não se terem sido isoladas as possíveis isoformas da AK em sorgo, nossos resultados revelaram um padrão de inibição da atividade desta enzima nos tratamentos com lisina, treonina e lisina + treonina nas concentrações de 1 e 5 mmol.L⁻¹, sendo que a inibição foi mais acentuada na maior concentração, além de se notar uma maior inibição da atividade da enzima por lisina do que por treonina e ambos aminoácidos juntos, inibiram quase que por completo, a atividade enzimática. Testes similares foram realizados em arroz por Lugli et al. (2000), revelando o mesmo padrão de

inibição, apesar deste estudo ter sido realizado testando-se as isoformas sensíveis à treonina e lisina, separadamente.

No entanto, AEC, análogo da lisina não foi tão efetivo para a inibição da enzima em sorgo, mesmo na maior concentração. Valina também não promoveu nenhuma alteração da atividade de AK, enquanto que metionina, na maior concentração, inibiu a atividade da enzima. Estes resultados obtidos são similares aos observados em sementes imaturas de arroz por Lugli et al. (2000).

É bem estabelecido que cálcio representa um importante papel na transdução de sinais em plantas. A ação regulatória do cálcio varia do controle do transporte de íons até a expressão gênica. Um rápido aumento na concentração do cálcio citossólico sob diferentes estímulos extracelulares é considerado como um evento primário na ativação de diferentes vias bioquímicas (Dey & Guha-Mukherjee, 1999). Alguns estudos realizados com a leguminosa grão-de-bico sugeriram, também, a existência de um possível fitocromo da enzima AK e que a ativação desta molécula é mediada por cálcio. Assim, existem evidências que a elevação dos níveis de cálcio intracelular em sementes imaturas ativa a AK (Dey & Guha-Mukherjee, 2000). Porém isto não pode ser afirmado para outras espécies de plantas estudadas até então. Isoenzimas da AK altamente purificadas de cenoura (Bonner et al., 1986), milho (Azevedo et al., 1992b) e arroz (Lugli et al., 2000) não foram afetadas por cálcio e EGTA (quelante de cálcio). Da mesma forma, os resultados obtidos neste estudo revelaram que, tanto cálcio como EGTA não promoveram alterações acentuadas na atividade da AK de sementes imaturas de sorgo (Figura 9A). Plantas estioladas de sorgo também não revelaram nenhuma atividade de AK, porém isto deve estar relacionado a interrupção de diversos processos metabólicos complexos dependentes primariamente de luz e não especificamente a presença de um possível fitocromo como sugerido e que é motivo de muitas controvérsias entre grupos de pesquisa desta área (Azevedo et al., 1997).

Similarmente, calmodulina e o componente 48/80, inibidor de calmodulina, bem como SAM e KCl não exibiram alterações importantes na atividade de AK. Sendo que SAM mais lisina e treonina inibiram a enzima devido à presença destes aminoácidos.

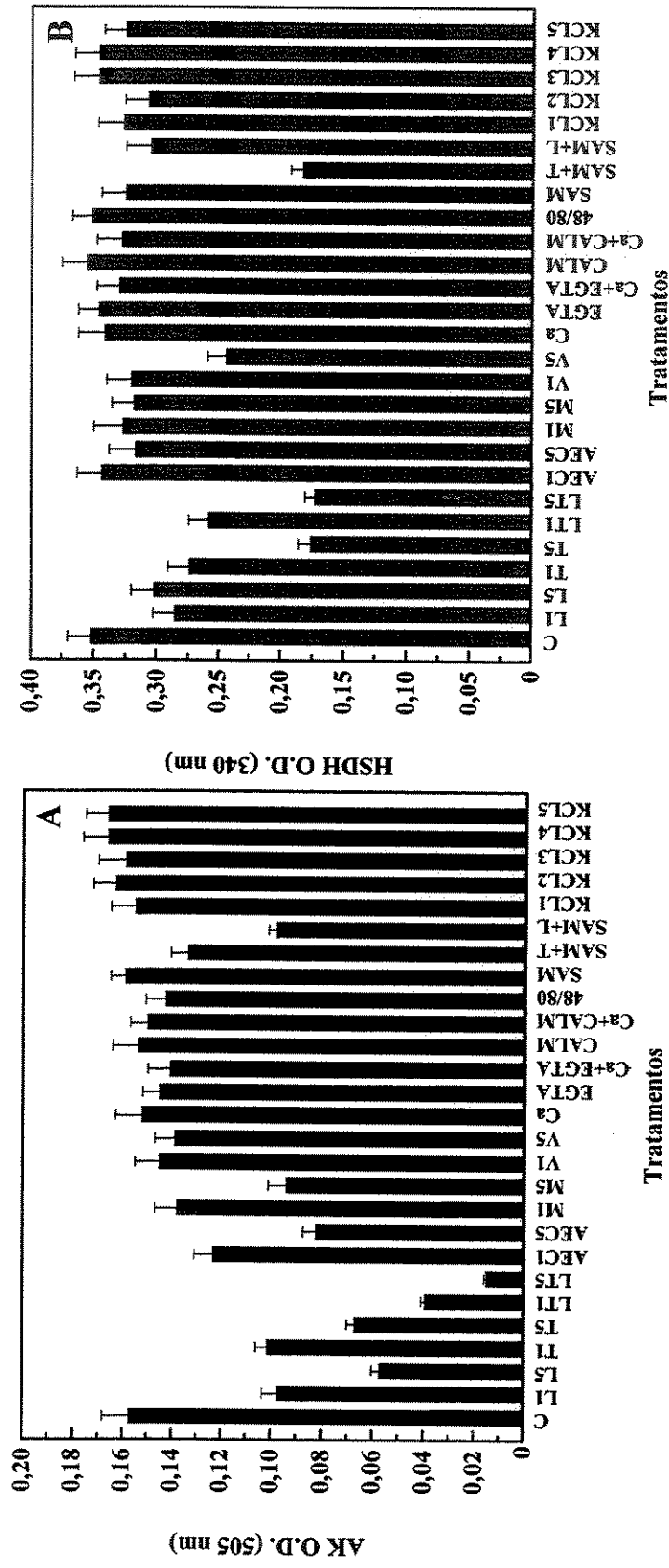


FIGURA 9. Atividades de AK (A) e HSDH (B) eluídas a partir cromatografia de troca aniônica do tipo gradiente linear (0-500 mmol.L⁻¹ KCl). C: controle; L1: 1 mmol.L⁻¹ lisina; L5: 5 mmol.L⁻¹ lisina; T1: 1 mmol.L⁻¹ treonina; T5: 5 mmol.L⁻¹ treonina; LT1: 1 mmol.L⁻¹ lisina + treonina; LT5: 5 mmol.L⁻¹ lisina + treonina; M1: 1 mmol.L⁻¹ metionina; M5: 5 mmol.L⁻¹ metionina; V1: 1 mmol.L⁻¹ valina; V5: 5 mmol.L⁻¹ valina; Ca: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂; EGTA: 1,6 mmol.L⁻¹ EGTA; Ca+EGTA: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ + EGTA; CALM: 10 µg/mL calmodulina; Ca+CALM: 1,6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ + 10 µg/mL calmodulina; 48/80: 50 µg/mL componente 48/80; SAM: 1 mmol.L⁻¹ SAM; SAM+T: 1 mmol.L⁻¹ SAM + 5 mmol.L⁻¹ treonina; SAM+L: 1 mmol.L⁻¹ SAM + 5 mmol.L⁻¹ lisina; KCL1: 100 mmol.L⁻¹ KCl; KCL2: 200 mmol.L⁻¹ KCl; KCL3: 300 mmol.L⁻¹ KCl; KCL4: 400 mmol.L⁻¹ KCl; KCL5: 500 mmol.L⁻¹ KCl.

No caso da HSDH, em plantas superiores são observadas duas isoenzimas com respostas diferenciadas à retroinibição por treonina, uma HSDH-R, que se refere a uma isoforma resistente à inibição por este aminoácido. No entanto, uma outra isoforma HDHD-S, sensível à retroinibição por treonina, também é observada em vegetais e faz parte de uma proteína bifuncional, com um domínio com atividade de AK e outro com atividade de HSDH. Esta isoenzima apresenta quase que 100% de inibição de atividade quando submetida a tratamentos com lisina e treonina sinergisticamente (Galili, 1995; Azevedo et al., 1997; Azevedo, 2002). No caso de sorgo, a atividade da HSDH apresentou uma acentuada inibição quando submetida aos tratamentos com treonina e lisina mais treonina, nas concentrações de 5 mmol.L⁻¹, o que está de acordo com as características desta enzima apresentadas na literatura para outras espécies de vegetais. Entretanto, 1 mmol.L⁻¹ SAM mais 5 mmol.L⁻¹ treonina, também foi efetivo na inibição da HSDH, certamente devido principalmente à presença do aminoácido treonina. Porém, claramente observou-se uma pequena inibição desta enzima pelo aminoácido lisina, resultante da utilização de amostras parcialmente purificadas e isoladas. Este fato resulta na interferência da lisina e seu análogo SAM sobre a atividade da HSDH.

Outro fato interessante observado foi uma inibição expressiva na atividade da HSDH submetida a 5 mmol.L⁻¹ de valina, fato diferenciado da literatura, pois não há relatos da interferência deste aminoácido sob a atividade desta enzima, diferentemente da AK sensível à lisina de arroz, que teve sua atividade estimulada pela atuação deste aminoácido, porém nenhum efeito foi notado com respeito a isoenzima AK sensível a inibição por treonina (Lugli et al., 2000), à qual poderia estar relacionada a HSDH-S, devido à bifuncionalidade já discutida. O efeito do K⁺ na atividade da HSDH de sementes imaturas de sorgo também foi investigado. Todas as concentrações de KCl utilizadas (100 – 500 mmol.L⁻¹) não revelaram efeitos significativos sobre a atividade desta enzima, sendo que resultados semelhantes foram encontrados para HSDH de sementes de milho, que também não sofreu influência de K⁺ sobre sua atividade (Bryan, 1990).

5.8. Transmitância de infravermelho-próximo

Como já apresentado na revisão de literatura, tanto o milho opaco-2 como o QPM, obtido a partir do primeiro, são caracterizados como de alta lisina. Assim, no intuito de se verificar a concentração deste aminoácido, utilizamos duas técnicas bastante distintas. Inicialmente,

utilizamos de transmitância de infravermelho-próximo em sementes de sorgo, tanto para o MASSA 03 como para os acessos ICRISAT. Foram utilizados como padrão para comparação tanto os milhos citados, como também dois híbridos normais, em relação a concentração de lisina, metionina, óleo e proteínas totais das sementes analisadas.

Em nossos resultados, foi possível observar que o híbrido de sorgo MASSA 03, material vegetal de nosso trabalho, apresentou uma concentração de lisina próxima das encontradas na maioria dos acessos ICRISAT alta lisina. Assim, a concentração deste aminoácido do sorgo MASSA 03 somente foi significativamente inferior em relação aos acessos IS16227 e IS16199, que apresentaram níveis os níveis mais elevados de lisina. Com relação ao aminoácido metionina, o sorgo MASSA 03 também apresentou concentrações similares às observadas nos acessos, sendo inferior somente à encontrada no milho opaco-2. Interessantemente, para o sorgo IS16199 não foi observada a presença de metionina nas sementes (Figura 10B).

Com relação à concentração de óleo nas sementes analisadas, o sorgo MASSA 03 apresentou uma concentração bem alta comparada às encontradas nos outros acessos ICRISAT alta lisina. Entretanto esta concentração de óleo foi inferior às concentrações observadas nos milhos QPMs, normal e Zeneca, superando apenas o opaco-2. Os sorgos IS16199 e IS16210 não apresentaram uma concentração detectável de óleo de acordo com o método utilizado. No caso da concentração de proteínas totais, observamos que o sorgo MASSA 03 apresentou uma alta quantidade protéica, superada apenas pelos milhos Zeneca e opaco-2 e pelo sorgo alta lisina, IS16227 (Figura 10A).

5.9. Proteínas de reserva de sorgo

Neste trabalho foram determinadas pelo método de Lowry (1951) as concentrações das frações das proteínas de reserva em diversos genótipos de sorgo classificados como mutantes alta lisina e um híbrido comercial MASSA 03 (Dow Agrosiences), utilizado como testemunha para fins comparativos. A seguir serão detalhados os resultados obtidos quanto às proteínas de reserva totais e especificamente das frações albumina, globulina, kafirina 1, kafirina 2 e glutelina, pois estão diretamente relacionados à qualidade das proteínas das sementes de sorgo. Os dados foram apresentados e discutidos em valores absolutos (mg.mL^{-1}).

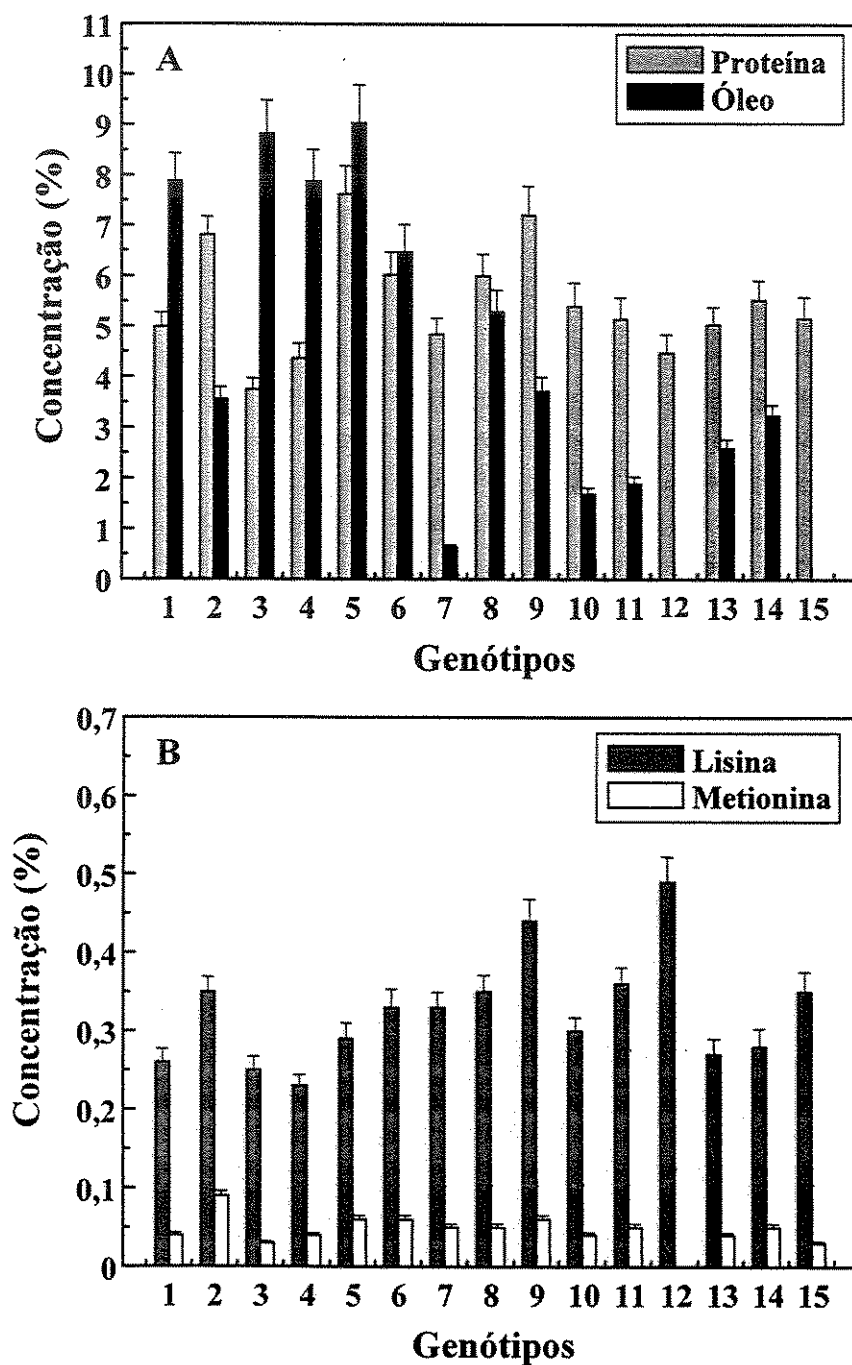


FIGURA 10. Concentração de proteínas totais e óleo (A), lisina e metionina (B) de sementes de milho e sorgo. 1 – milho normal; 2 – milho opaco-2; 3 – milho QPM BR451; 4 – milho QPM BR473; 5 – milho Zeneca 8392; 6 – sorgo MASSA 03; 7 – sorgo IS111676; 8 – sorgo IS22204; 9 – sorgo IS16227; 10 – sorgo IS10477; 11 – sorgo IS11758; 12 – sorgo IS16199; 13 – sorgo IS25792; 14 – sorgo IS5603; 15 – sorgo IS16210. Desvio padrão: média de 5 repetições com 23 sementes cada análise.

Mediante a utilização da Análise de Variância, pode-se observar na Tabela 3, que os resultados referentes às quantidades absolutas indicaram que houve diferenças altamente significativas entre os diferentes genótipos de sorgo em relação às frações protéicas totais analisadas (prob. > 0,0001).

TABELA 3. Análise de variância para médias de concentrações (mg.mL⁻¹) das frações das proteínas de reserva de diferentes genótipos de sorgo ($\alpha = 0,05$).

PROTEÍNAS	MÉDIA	C.V.	F	Prob > F
Albuminas	3,88	1,65	5546,19	0,0001
Globulinas	0,73	8,62	60,13	0,0001
Kafirinas 1	0,62	11,31	152,41	0,0001
Kafirinas 2	0,35	14,52	34,15	0,0001
Glutelinas	12,47	0,81	2590,88	0,0001
TOTAL	18,05	1,54	1122,58	0,0001

Uma vez constatada diferenças significativas, dando continuidade aos estudos, foram conduzidas análises de comparação de médias através do teste de Duncan, obtidas a partir da Tabela 4.

Em relação aos níveis totais de proteínas de reserva, evidencia-se na Tabela 4, ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas entre a maioria dos genótipos de sorgo analisados, excetuando IS16227, IS10477 e IS16210 que não diferiram estatisticamente entre si e o grupo constituído por IS11167 e IS5603. A maior concentração de proteínas de reserva totais foi apresentada pelo mutante IS16199 (33,35 mg.mL⁻¹) e em contrapartida, a concentração menor foi detectada no mutante IS25792 (11,31 mg.mL⁻¹). O sorgo MASSA 03 apresentou quantidades de proteínas de reserva totais elevadas, sendo superior à maioria dos mutantes, exceto quando comparado aos mutantes IS16199 e IS11758, com desempenho superior ao híbrido.

No que se refere aos níveis absolutos de albumina (Tabela 4), ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas foram encontradas entre todos os genótipos de sorgo analisados, excetuando-se os mutantes IS16227 e IS22204, que não diferiram entre si. A maior concentração de albumina foi observada no mutante IS16199 (11,72 mg.mL⁻¹), enquanto que o IS25792, apresentou a menor concentração desta fração protéica (0,53 mg.mL⁻¹).

TABELA 4. Média de 2 repetições de ensaios realizados a partir de 1 g sementes de cada genótipo, referentes as concentrações (mg.mL⁻¹) das frações das proteínas de reserva de sementes de sorgo, determinadas pelo método de Lowry. GEN: Genótipos; M 03: MASSA 03; Alb: Albuminas; Glb: Globulinas; Kf1: Kafirinas 1; Kf2: Kafirinas 2; Glt: Glutelinas; T: Total.

PROTEÍNAS DE RESERVA DE SORGO												
GEN	Alb 1%	GEN	Glb 1%	GEN	Kf1 1%	GEN	Kf2 1%	GEN	Glt 1%	GEN	T 1%	
IS16199	11,72 A	M 03	1,35 A	IS11758	2,21 A	IS11758	0,84 A	IS16199	20,05 A	IS16199	33,35 A	
IS11758	7,55 B	IS22204	1,03 B	IS11167	0,92 B	IS16199	0,50 B	IS22204	16,08 B	IS11758	24,01 B	
IS11167	4,30 C	IS11167	0,96 BC	IS25792	0,69 C	IS11167	0,42 BC	M 03	14,93 C	M 03	20,33 C	
IS5603	3,48 D	IS25792	0,82 C	IS16199	0,68 C	M 03	0,40 BC	IS11758	13,22 D	IS22204	19,34 D	
M 03	3,19 E	IS16210	0,81 C	M 03	0,45 D	IS25792	0,38 BCD	IS16227	12,00 E	IS11167	15,89 E	
IS10477	2,74 F	IS16227	0,76 C	IS10477	0,40 DE	IS10477	0,31 CDE	IS16210	10,69 F	IS16227	15,18 EF	
IS16227	1,98 G	IS5603	0,53 D	IS16210	0,28 DEF	IS16210	0,21 DEF	IS5603	10,04 G	IS5603	14,37 F	
IS22204	1,93 G	IS10477	0,44 D	IS16227	0,24 DEF	IS5603	0,20 EF	IS10477	9,49 H	IS10477	13,38 G	
IS16210	1,36 H	IS16199	0,39 D	IS22204	0,21 EF	IS16227	0,19 EF	IS11167	9,27 H	IS16210	13,36 G	
IS25792	0,53 I	IS11758	0,19 E	IS5603	0,11 F	IS22204	0,08 F	IS25792	8,88 I	IS25792	11,31 H	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Duncan.

No que diz respeito ao híbrido MASSA 03, foi observada uma concentração de albumina intermediária entre todos os mutantes ($3,19 \text{ mg.mL}^{-1}$). Os mutantes IS16199 e IS11758 tiveram destaque por apresentarem quantidades de albumina 3,5 e 2,3 vezes maiores, respectivamente, que o híbrido comercial.

Entretanto, em relação aos níveis absolutos de globulina (Tabela 4), ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas foram encontradas entre o híbrido MASSA 03 e o grupo de mutantes, sendo que o híbrido apresentou maior concentração desta fração protéica em sementes de sorgo. Entre os mutantes, o IS22204 apresentou valores muito próximos ao híbrido. Pode também ser observados grupos de genótipos com variações na quantidade de globulina. O mutante IS22204 difere estatisticamente de um grupo formado pelos mutantes IS11167, IS25792, IS16210 e IS16227, os quais não apresentaram diferenças entre si. E outro grupo formado pelos mutantes IS5603, IS10477 e IS16199, que também não diferiram entre si e com o mutante IS11758 de maior desempenho entre os mutantes.

Já para os níveis absolutos de kafirina 1 (Tabela 4), ao nível de 1% de probabilidade, o mutante IS11758 se destacou dos demais mutantes e do MASSA 03, apresentando a maior concentração absoluta desta fração protéica ($2,21 \text{ mg.mL}^{-1}$). Merece destaque também o IS11167, porém apresentando uma concentração de kafirina 1 cerca de 42% menor que o IS11758, porém superior ao híbrido. Com relação a concentrações intermediárias, foram detectadas nos mutantes IS25792 e IS16199, que não apresentaram diferenças entre si, entretanto também foram superiores ao MASSA 03. Foi observada concentrações mais baixas de kafirina 1 presentes em um grupo de genótipos formado pelo MASSA 03, IS10477, IS16210, IS16227, IS22204 e IS5603, que estatisticamente tiveram o mesmo desempenho. O mutante IS5603 apresentou a menor concentração absoluta observada desta fração protéica entre todos os genótipos ($0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Estudando-se também os níveis absolutos de kafirina 2 (Tabela 4), ao nível de 1% de probabilidade, o mutante IS11758 apresentou a maior concentração absoluta desta fração protéica com diferenças significativas em relação aos demais mutantes e ao MASSA 03. As variações observadas nas quantidades de kafirina 2 seguiram uma distribuição similar ao observado para kafirina 1 com IS11758 como destaque, entretanto os restantes dos mutantes e o MASSA 03 tiveram desempenhos similares do ponto de vista estatístico. Neste conjunto, um grupo formado pelos genótipos IS16199, IS11167, MASSA 03 e IS25792, apresentaram

concentrações intermediárias de kafirina 2, variando em valores absolutos de 0,50 mg.mL⁻¹ a 0,38 mg.mL⁻¹ e não apresentando diferenças significativas entre eles. Entretanto os mutantes IS10477 até IS22204 apresentaram os menores níveis desta fração proteica (0,31-0,08 mg.mL⁻¹).

Finalmente, no que se refere aos níveis absolutos de glutelina (Tabela 4), ao nível de 1% de probabilidade, o mutante IS16199 se destacou dos demais mutantes e foi superior ao MASSA 03, apresentando a maior concentração absoluta desta fração protéica (20,05 mg.mL⁻¹). Outro genótipo que merece destaque é o IS22204, ainda superior ao MASSA 03, que apresentou uma concentração de glutelina corresponde a cerca de 80% em relação ao mutante de maior valor. Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre todos os genótipos mutantes de sorgo. Porém, os mutantes IS10477 e IS11167, não diferiram entre si e o mutante IS25792 foi o genótipo de sorgo que apresentou a menor concentração absoluta observada desta fração protéica (8,88 mg.mL⁻¹).

5.10. Aminoácidos solúveis de sorgo

No presente trabalho foram determinados por HPLC os níveis de aminoácidos solúveis totais e os aminoácidos produtos da via metabólica do ácido aspártico em diversos genótipos de sorgo classificados como mutantes alta lisina e um híbrido comercial MASSA 03 (Dow Agrosiences). A seguir serão detalhados os resultados obtidos quanto aos aminoácidos solúveis totais e especificamente dos aminoácidos lisina, metionina e treonina, de maior interesse já que são limitantes em termos de quantidades e diretamente relacionados à qualidade das proteínas das sementes de sorgo para a alimentação animal e humana. Os dados foram apresentados e discutidos em valores absolutos (nmol.mL⁻¹).

Através da Análise de Variância, pode-se observar na Tabela 5, que os resultados referentes às quantidades absolutas indicaram que houve diferenças altamente significativas entre os diferentes genótipos de sorgo para os aminoácidos solúveis totais (prob. > 0,0001) bem como em relação às proporções dos aminoácidos lisina, treonina e metionina (prob. > 0,0001).

Depois de constatadas diferenças significativas, dando continuidade aos estudos, foram conduzidas análises de comparação de médias através do teste de Duncan, obtidas a partir da Tabela 6.

TABELA 5. Análise de variância para médias de concentrações (nmol.mL⁻¹) dos aminoácidos solúveis de diferentes genótipos de sorgo ($\alpha = 0,05$).

AMINOÁCIDOS	MÉDIA	C.V.	F	Prob > F
<i>Lys</i>	4,04	4,96	264,68	0,0001
<i>Thr</i>	12,74	2,08	1211,71	0,0001
<i>Asp</i>	1,35	8,4	48,78	0,0001
<i>Glu</i>	8,26	2,29	2634,12	0,0001
<i>Asn</i>	12,71	1,53	8702,99	0,0001
<i>Ser</i>	23,82	0,84	7738	0,0001
<i>Gli</i>	3,04	6,85	191,5	0,0001
<i>Arg</i>	9,04	1,16	6234,97	0,0001
<i>Ala</i>	22,16	0,63	20716,31	0,0001
<i>Tyr</i>	5,58	2,79	1117,62	0,0001
<i>Met</i>	11,35	1,17	4725,78	0,0001
<i>Val</i>	5,79	1,98	1022,67	0,0001
<i>Phe</i>	4,49	3,56	214,93	0,0001
<i>Ile</i>	6,24	2,51	636,98	0,0001
<i>Leu</i>	2,57	4,07	1053,02	0,0001
<i>Gln</i>	9,07	2,15	2656,47	0,0001
<i>His</i>	17,53	0,72	10678,6	0,0001
TOTAL	160,84	0,86	7205,33	0,0001

TABELA 6. Média das concentrações (nmol.mL⁻¹) dos aminoácidos solúveis lisina, treonina metionina e totais de sementes de sorgo.

GEN: Genótipos; Lys: Lisina; Thr: Treonina; Met: Metionina.

AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS DE SORGO									
GEN	Lys	1%	GEN	Thr	1%	GEN	Met	1%	TOTAL 1%
IS5603	8,29	A	IS16227	24,90	A	IS16227	22,74	A	IS16227 340,64 A
IS16227	7,37	B	IS11758	22,23	B	IS11758	20,71	B	IS11758 231,59 B
IS22204	4,67	C	IS11167	15,84	C	IS11167	13,94	C	IS16199 208,02 C
IS25792	4,47	C	IS16210	12,45	D	IS16210	11,25	D	IS11167 177,26 D
IS10477	4,05	CD	IS16199	12,22	D	IS25792	11,10	DE	IS25792 149,71 E
IS11758	3,58	D	IS25792	11,98	D	IS16199	10,76	E	IS16210 143,50 F
IS11167	2,63	E	IS22204	8,24	E	IS22204	8,67	F	IS22204 122,05 G
IS16199	2,23	EF	IS10477	6,94	F	IS5603	6,98	G	IS10477 95,46 H
MASSA 03	1,80	FG	IS5603	6,64	FG	IS10477	5,67	H	IS5603 79,02 I
IS16210	1,28	G	MASSA 03	5,99	G	MASSA 03	1,73	I	MASSA 03 61,13 J

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Duncan.

Em relação aos níveis de aminoácidos solúveis totais, evidencia-se na Tabela 6, ao nível de 1% de probabilidade, foram observadas diferenças significativas entre todos os mutantes de sorgo e o híbrido MASSA 03, utilizado como testemunha para fins comparativos. A maior concentração de aminoácidos totais foi apresentada pelo mutante IS16227 ($340,64 \text{ nmol.mL}^{-1}$) e em contrapartida, a concentração menor foi detectada no MASSA 03 ($61,13 \text{ nmol.mL}^{-1}$). Todos os mutantes classificados como alta lisina apresentaram concentrações maiores de aminoácidos quando comparados com o híbrido MASSA 03.

Referente aos níveis absolutos de lisina (Tabela 6), ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas foram observadas entre dois mutantes que merecem destaque, o IS5603, que apresentou um maior desempenho com relação a concentração absoluta deste aminoácido ($8,29 \text{ nmol.mL}^{-1}$) e IS16227 que apresentou cerca de 89% de concentração de lisina encontrada no IS5603.

Estes dois genótipos citados, também apresentaram diferenças significativas em relação a um grupo de genótipos entre os mutantes IS22204 e IS11758, que apresentaram concentrações intermediárias de lisina ($4,67 - 3,58 \text{ nmol.mL}^{-1}$), porém não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Entretanto, um último grupo, constituído pelos genótipos entre o IS11167 e IS16210, que também não exibiram diferenças estatísticas entre si, apresentaram os menores níveis absolutos de lisina ($2,63 - 1,28 \text{ nmol.mL}^{-1}$). O híbrido MASSA 03 está incluído neste grupo, apresentando uma concentração absoluta deste aminoácido muito inferior em relação aos genótipos que apresentaram maior desempenho ($1,80 \text{ nmol.mL}^{-1}$).

Dando continuidade, aos estudos referentes aos níveis absolutos de treonina (Tabela 6), ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas foram encontradas entre os mutantes de sorgo IS16227, IS11758 e IS11167. Estes três primeiros, também apresentaram diferenças com relação aos mutantes IS16210, IS16199 e IS25792, que formam um grupo estatisticamente semelhante. Entretanto, o mutante de sorgo IS22204 diferiu significativamente de todos os genótipos citados, como também em relação a um último grupo representado pelos mutantes IS10477, IS5603 e o híbrido MASSA 03, que não apresentaram diferenças entre si. Com relação à concentração de treonina solúvel, o mutante IS16227 apresentou o maior valor absoluto ($24,90 \text{ nmol.mL}^{-1}$) enquanto que o MASSA 03 apresentou o menor valor ($5,99 \text{ nmol.mL}^{-1}$). Porém, esta baixa concentração pode ser estendida a todos os genótipos que formam o último grupo referido devido à semelhança estatística observada.

Finalizando, referente aos níveis absolutos de metionina (Tabela 16), ao nível de 1% de probabilidade, diferenças contrastantes foram apresentadas entre os próprios mutantes IS16227, IS11758 e IS11167, como também destes em relação ao grupo formado pelos mutantes IS16210, IS25792 e IS16199, que não apresentaram diferenças entre si e entre os mutantes IS22204, IS5603, IS10477 e MASSA 03 que também exibiram diferenças significativas entre si. A maior concentração de metionina solúvel foi observada nas sementes do mutante IS16227 (22,74 nmol.mL⁻¹) enquanto que a menor concentração deste aminoácido foi obtida no híbrido comercial de sorgo MASSA 03 (1,73 nmol.mL⁻¹).

5.11. Considerações sobre proteínas de reserva e aminoácidos solúveis de sorgo

Todas as determinações protéicas foram realizadas com mutantes de sorgo alta lisina e o híbrido comercial MASSA 03, o qual acredita-se ser uma variedade normal, quando se refere a concentração de lisina solúvel.

Para o MASSA 03, nota-se uma concentração baixa de kafirinas 1 e 2, cerca de 2% do total das proteínas de reserva deste genótipo para ambas frações (Tabela 3), valor bem inferior ao encontrado na literatura, que aponta que as frações kafirinas de sorgo correspondem cerca de 50 a 60% (El Nour et al.,1998). Comparando-se com a mutação opaco-2 (o2) do milho, caracterizado como alta lisina devido à porção de zeína (prolamina do milho) ser baixa, este resultado sugere que este híbrido comercial pode ter níveis elevados de lisina solúvel. A mutação de milho opaco-2 descoberta em 1963, aumenta concentração do aminoácido lisina, visto que a fração de proteína zeína é pobre deste aminoácido e a mutação proporeciona uma diminuição na concentração desta fração no milho (Azevedo, 1988).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o sorgo MASSA 03 também apresenta uma baixa concentração de kafirinas dentro dos padrões encontrados nos mutantes estudados (Tabela 4). Entretanto, deve-se lembrar que o aumento da concentração de lisina em um determinado mutante, como também é o caso do milho opaco 2, pode ser devido ainda a fração solúvel de aminoácidos, ou seja, àqueles não incorporados nas proteínas de reserva, mas acumulados no endosperma, o que foi também confirmado pelo fato da concentração de lisina solúvel no sorgo MASSA 03 estar dentro dos parâmetros encontrados nos mutantes (Tabela 6).

Trabalhos anteriores do grupo parecem indicar que no caso de mutantes de milho para alta lisina, existe uma variabilidade para a concentração de lisina livre, de forma que alguns

apresentam os níveis mais elevados, como no caso do mutante o2. A variação na concentração de cada fração protéica é importante no sentido de indicar possíveis modificações nos níveis de lisina em relação aos tipos selvagens, ou ainda, permitindo indicar o efeito da mutação sobre a lisina, sobre as proteínas de reserva, seja como um efeito maior sobre o *pool* total, ou especificamente sobre um ou poucos polipeptídeos, ou mesmo sobre o metabolismo da lisina e outros aminoácidos.

Neste sentido, os mutantes de sorgo alta lisina devem ainda ser caracterizados para as enzimas que controlam tanto a biossíntese como a degradação de lisina no endosperma. A combinação dos dados para o metabolismo da lisina com mutantes de alta lisina de sorgo é fundamental para um maior entendimento do metabolismo de lisina e do padrão de acúmulo e distribuição do aminoácido e proteínas de reserva em sorgo, podendo até sugerir a indicação de um ou outro mutante para programas de melhoramento genético para uso comercial.

6. CONCLUSÕES

- As enzimas chaves da biossíntese de lisina, AK e HSDH pela primeira vez são caracterizadas em sorgo;
- As atividades da AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo são completamente recuperadas a partir da precipitação com sulfato de amônio na faixa de saturação de 20 a 60%;
- NADP é o substrato ideal para a determinação da atividade da enzima HSDH de sorgo;
- Em sementes imaturas de sorgo existem pelo menos três isoenzimas de AK, duas referentes as isoenzimas monofuncionais sensíveis à retroinibição por lisina e uma outra sensível à retroinibição por treonina, a qual se refere ao polipeptídeo bifuncional AK-HSDH;
- Duas isoenzimas de HSDH são existentes em sementes imaturas de sorgo, uma resistente à inibição por treonina e outra sensível à inibição por este aminoácido, sendo que esta última se refere ao polipeptídeo bifuncional AK-HSDH;
- Como na maioria das plantas superiores estudadas, as enzimas AK e HSDH de sementes imaturas de sorgo não apresentam regulação por cálcio;
- A massa molecular da isoenzima bifuncional AK-HSDH existente em sementes imaturas de sorgo é 167 kDa;
- O fator de purificação da AK foi somente 30 vezes e a recuperação da enzima muito baixa, cerca de 8%;
- O aminoácido metionina se mostrou inibidor da atividade de AK de sorgo;
- O aminoácido valina se mostrou inibidor da atividade de HSDH de sorgo;
- O sorgo MASSA 03 possui baixa concentração de kafirinas e alta concentração de glutelinas, similarmente aos valores encontrados nos genótipos mutantes alta lisina;

- O híbrido comercial MASSA 03 apresenta índices de aminoácidos solúveis compatíveis aos genótipos mutantes alta lisina;
- O mutante IS16227 é o genótipo mais viável para utilização em programas de melhoramento para alta lisina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNES, H.; ROGNES, S.E. Treonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, v.13, p.2717-2724, 1974.
- ARRUDA, P.; KEMPER, E.L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of Lysine catabolism in higher plants. **Trends Plant Sciences**, v.5, p.324-330, 2000.
- AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry**, v.31, p.3725-3730, 1992a.
- AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, v.31, p.3731-3734, 1992b.
- AZEVEDO, R.A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, v.22, p.217-230, 2002.
- AZEVEDO, R.A. Isolation, purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from maize. Lancaster, 1992c. 250p. Thesis (PhD) – University of Lancaster – UK.
- AZEVEDO, R.A. Mutantes da via metabólica do ácido aspártico em milho, obtidos através de cultura de tecidos. São Paulo, 1988. Dissertação (M.S.) - Universidade Estadual de Campinas.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, v.46, n.3, p.395-419, 1997.
- AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry**, v.31, p.3725-3730, 1992a.
- AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, v.20, p.261-279, 2001.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, v.31, p.3731-3734, 1992b.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry**, v.31, p.3735-3737, 1992c.
- BALCONI, C.; BERADO, N.; REALI, A.; MOTTO, M. Variation in protein fractions and nitrogen metabolism of developing normal and opaque endosperm mutants of maize. **Maydica**, v.43, p.195-203, 1998.

- BEAN, S.R.; LOOKHART, G.L. Electrophoresis of cereal storage proteins. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.23-26, 2000.
- BEAN, S.R.; LOOKHART, G.L.; BIETZ, J.A. Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) storage proteins. **Journal Agriculture Food Chemical**, v.48, p.318-327, 2000.
- BIELESKY, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278-293, 1966.
- BONNER, P.L.R.; HETHERINGTON, A.M.; LEA, P.J. Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin. **FEBS letters**, v.195, p.119-121, 1986.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-259, 1976.
- BRENNECKE, K.; SOUZA NETO, A. J.; LUGLI, J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants Ask1-LT19 and Opaque-2. **Phytochemistry**, v.41, p.707-712, 1996.
- BRIGHT, S.W.J.; KUEH, J.S.H.; FRANKLIN, J.; ROGNES, S.E.; MIFLIN, B.J. Two genes for threonine accumulation in barley seeds. **Nature**, v.299, p.278-279, 1982b.
- BRIGHT, S.W.J.; MIFLIN, B.J.; ROGNES, S.E. Threonine accumulation in the seed of a barley mutant with an altered aspartate kinase. **Biochemistry and Genetics**, v.20, p.229-243, 1982a.
- BRITO, G..Q. Características agronômicas, composição química, qualidade de consumo de silagens de duas variedades e três híbridos de sorgo forrageiro. Piracicaba, 1995. 69p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BRYAN, J.K. (1990). Advances in biochemistry of amino acid biosynthesis. *In*: Miflin, B.J.; Lea, P.J. (eds). **The biochemistry of plants**, v. 16. Academic Press, London, pp.161-195.
- CHANDRASHEKAR, A.; MAZHART, H. The biochemical bases and implications of grain strenght in sorghum and maize. **Journal of Cereal Science**, v.30, p.193-207, 1999.
- CHAVES, A.V. Avaliação de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) para produção de silagem. Viçosa, 1997. 35p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.

- CICERI, P.; GIANAZZA, E.; LAZZARINI, B.; LIPPOLI, G.; GENGA, A.; HOSCHEK, G.; SCHMIDT, R.J.; VIOTTI, A. Phosphorylation of opaque-2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. **Plant Cell**, v.9, p.97-108, 1997.
- COPELIN, J.L.; GASKINS, C.T.; TRIBBLE, L.F. Availability of tryptophan, lysine and threonine in sorghum for swine. **Journal of Animal Science**, v.46, p.133-142, 1978.
- DE FREITAS, F.A.; YUNES, J.A.; SILVA, M.J.; ARRUDA, P.; LEITE, A. Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. **Molecular Genes and Genetics**, v.245, p.177-186, 1994.
- DEY, M.; GUHA-MUKHERJEE, S. Aspartate metabolism in *Cicer* immature seeds requires Ca^{2+} , protein phosphorylation and dephosphorylation. **Plant Sciences**, v.150, p.85-91, 2000.
- DEY, M.; GUHA-MUKHERJEE, S. Phytochrome activation of aspartate kinase in etiolated chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.454-458, 1999.
- DOTSON, S.B.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell suspension cultures. **Plant Physiology**, v.91, p.1602-1608, 1989.
- DOW AGROSCIENCES. (2001). Sementes Dow Agrosiences – experiência e credibilidade. *In: Guia de híbridos*. pp.62-63.
- DUKE, J.A. (1981). **Handbook of legumes of world economic importance**. Plenum Press, New York.
- EL NOUR, I.N.A.; PERUFFO, A.D.B.; CURIONI, A. Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour. **Journal of Cereal Science**, v.28, p.197-207, 1998.
- ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays*). **Journal of Cereal Science**, v.5, p. 117-128, 1987.
- FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio-Technology**, v.13, p. 557-582, 1995.
- FORNAZIER, R.F.; AZEVEDO, R.A.; FERREIRA, R.R.; VARISI, V.A. Lysine catabolism: flow, metabolic role and regulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.1, p.9-18, 2003.
- FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. **Plant Physiology**, v.99, p.1285-1293, 1992.

- FRISCH, D.A.; TOMMEY, A.M.; GENGENBACH, B.G.; SOMMERS, D.A. Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia-coli* dap⁻auxotroph. **Molecular and General Genetics**, v.228, p.287-293, 1991.
- GALILI, G. Regulation of lysine and threonine synthesis. **The Plant Cell**, v.7, p.899-906, 1995.
- GALILI, G.; GALILI, S.; LEWINSOHN, E.; TADMOR, Y. Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, n.3, p.167-204, 2002.
- GARCIA, A.A.F.; SOUZA JR, C.L. Phenotypic recurrent selection to improve protein quality in non-opaque maize populations. **Scientia Agricola**, v.59, n.4, p.743-748, 2002.
- GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARÃES, P.E.O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1268-1275, 1999.
- GAZIOLA, S.A.; SODEK, L.; ARRUDA, P.; LEA, P.J.; 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**, v.110, p.164-171, 2000.
- GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H.; DATKO, A.H. Regulatory structure of the biosynthetic pathway for the aspartate family of amino acids in *Lemna paucicostata* Hegelm 6746, with special reference to the role of aspartatokinase. **Plant Physiology**, v.90, p.1584-1599, 1989.
- HAMAKER, B.R.; MAHAMED, A.A.; HABBEN, J.E.; HUANG, C.P.; LARKINS, B.A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemical**, v.72, p.583-588, 1995.
- HIBBERD, K.A.; GREEN, C.E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p.559-563, 1982.
- HU, C.A.; DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. A bifunctional enzyme (δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the 1st 2 steps in proline biosynthesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.19, p.9354-9358, 1992.

- KANEKO, T.; HASHIMOTO, T.; KUMPAISAL, R.; YAMADA, Y. Molecular-cloning of wheat dihydrodipicolinate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p. 17451-17455, 1990.
- KARCHI, H.; MIRON, D.; BEN-YAACOV, S.; GALILI, G. The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires Ca^{2+} and protein phosphorylation. **Plant Cell**, v.7, p.1963-1970, 1995.
- KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; PAPES, F.; MARTINEZ-MORAES, K.C.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, v.11, p.1981-1994, 1999.
- KIRIHARA, J.A.; HUSPERGER J.P.; MAHONEY, J.W. Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. **Molecular Genes and Genetics**, v.211, p.477-484, 1988.
- KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T.; TAMADA, Y. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension-cultures. **Plant Physiology**, v.85, p.145-151, 1987.
- LABER, B.; MAURER, W.; HANKE, C.; GRAFE, S.; EHLE, S.; MESSERSCHMIDT, A.; CLAUSEN, T. Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase. **European Journal of Biochemistry**, v.263, p.212-221, 1999.
- LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2003). Primary products: plant amino acids. In: Thomas, B.; Murphy, S.J.; Murray, B.G. (eds). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Elsevier, v.3, pp. 871-883.
- LEA, P.J.; MILLS, W.R.; MIFFLIN, B.J. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. **FEBS Letters**, v.98, p.165-168, 1979.
- LEFÈVRE, A.; CONSOLI, L. GAZIOLA, S.A., PELLEGRINO, A.P.; AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C. Dissecting the opaque-2 regulatory network using transcriptome and proteome approaches along with enzymes activity measurements. **Scientia Agricola**, v.59, p. 407-414, 2002.
- LEITE, A.; OTTOBONI, L.M.M.; TARGON, M.L.P.N.; SILVA, M.J.; ARRUDA, P. Phylogenetic relationships of zeins and coixins as determined by immunological cross-reactivity and Southern Blot analysis. **Plant Molecular Biology**, v.14, p.743-751, 1990.

- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of 'poor quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303, 1990.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n°1, p. 265-275, 1951.
- LUGLI, J.; CAMPBELL, A.; GAZIOLA, S.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Enzymes of lysine metabolism from *coix lacrima-jobi* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.25-32, 2002.
- LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; 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**, v.150, p.51-58, 2000.
- MACDONALD, P. (1991). **The biochemistry of silage**. Heighwoods Drive: Chalcombe Publications, 340p.
- MERCHEN, N.R.; TRIGEMEYER, E.C. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. **Journal of Animal Science**, v.70, 3238-3247, 1992.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. **Science**, v.145, p.279-280, 1964.
- MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, p.249-260, 1999.
- MOLINA, S.M.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Manipulating cereal crops for high lysine accumulation in seeds. **Scientia Agricola**, v.58, p.205-211, 2001.
- MUEHLBAUER, G.J.; SOMERS, D.A., MATTHEWS, B.F.; GENGENBACK, B.G. Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. **Plant Physiology**, v.106, p.1303-1312, 1994.
- MUNCK, L. (1992). The case of high-lysine barley breeding. In: Shewry, P.R. (ed). **Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. CAB International, Wallingford, pp.573-601.
- OSBORNE, T.B. **The proteins of the wheat kernel**. Carnegie Institute, Washington, DC, 1907.
- PARIS, S.; WESSEL, P.M.; DUMAS, R. Overproduction, purification, and characterization of recombinant bifunctional threonine-sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Protein Expression and Purification**, v.24, p.105-110, 2002.

- RELTON, J.M.; BONNER, P.L.R.; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension culture. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.953, p.48-60, 1988.
- ROGNES, S.E. (1990) Threonine biosynthesis. *In*: Dey, P.M.; Harborne, J.B.; Lea, P.J. (eds). **Methods in Plant Biochemistry, Enzymes of Primary Metabolism**, v.3, pp.315-325. Academic Press, San Diego, USA.
- ROGNES, S.E.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. S-adenosylmethionine - a novel regulation of aspartate kinase. **Nature**, v.287, p.357-359, 1980.
- RULQUIN, H.; VERITE, R. (1993). Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. *In*: Garnworthy, P.C.; Cole, D.J.A. (eds). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, pp.57-77.
- SHAUL, O.; GALILI, G. Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, v.23, p.759-768, 1993.
- SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplast. **Plant Journal**, v.2, p.203-209, 1992.
- SHAVER, J.M.; BITTEL, D.C.; SELLNER, J.M.; FRISCH, P.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.1962-1966, 1996.
- SHOTWELL, M.A.; LARKINS, B.A. (1989). The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. *In*: Marcus, A. (ed). **The Biochemistry of Plants**. Academic Press, San Diego, CA, pp.297-345.
- SILK, G.W.; MATTHEWS, B.F.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Cloning and expression of the soybean dapa gene encoding dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.989-993, 1994.
- SODEK, L.; WILSON, C.M. Incorporation of leucine-C¹⁴ into protein in the developing of normal and opaque-2 corn. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.140, p.29-38, 1970.

- TEIXEIRA, C.M.G.; GAZIOLA, A.S.; LUGLI, J.; AZEVEDO, R.A. Isolation, partial purification and characterization of aspartate kinase isoenzymes from rice seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.153, p.281-289, 1998.
- TYAGI, V.V.S.; HENKE, R.R.; FARKAS, W.R. Partial-purification and characterization of dihydrodipicolinic acid reductase from maize. **Plant Physiology**, v.73, p.687-691, 1983.
- VASAL, S.K. (1994). High quality protein corn. *In*: Hallawer, A.R. (ed.). **Specialty corns**. CRC Press, Boca Raton, pp. 79-120.
- VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. **Plant Molecular Biology**, v.39, p.695-708, 1999.
- WANG, X.; LARKINS, B.A. Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Physiology**, v.125, p.1766-1777, 2001.
- WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.F. Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartatokinase-homoserine dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.301-312, 1993.
- WILKINSON, J.M. (1978). The ensiling of forage maize: effects on composition and nutritive value. *In*: **Forage Maize**. London Agricultural Research Council, pp. 201-237.
- WILSON, B.J.; GRAY, A.C.; MATTHEWS, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartatokinase and homoserine dehydrogenase activities. **Plant physiology**, v.97, p.1323-1328, 1991.
- YEMN, E.M.; COCKING, E.C. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.
- YOUSSEF, A.M. Extractability, fractionation and nutritional value of low and high tannin sorghum proteins. **Food Chemistry**, v.63, n° 3, p.325-329, 1998.
- ZAGO, C. P. (1999). **Silagem de sorgo**. *In*: Anais do 7º simpósio sobre nutrição de bovinos - Alimentação Suplementar, 7. Piracicaba, FEALQ. pp.47-68.
- ZHU-SHIMONI, J.X.; GALILI, G. Expression of an *Arabidopsis* aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is metabolically regulated by photosynthesis-related signals but not by nitrogenous compounds. **Plant Physiology**, v.116, p.1023-1028, 1998.

ZHU-SHIMONI, J.X.; LEVYADUM, S.; MATTHEWS, B.; GALILI, G. Expression of an aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers, and developing seeds. **Plant Physiology**, v.113, p.695-706, 1997.