

BC/32469

IB/80187

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

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE
ISOENZIMAS DA ASPARTATO QUINASE (AK) E
HOMOSERINA DESIDROGENASE (HSDH) DE
SEMENTES DE ARROZ (*Oriza sativa*): EVIDÊNCIAS
PARA A EXISTÊNCIA DE UM POLIPEPTÍDEO
BIFUNCIONAL COM ATIVIDADES DE AK E HSDH.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP) para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração Genética de Plantas.

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Cristiana Morgado Guimarães
Ricardo Antunes de Azevedo
e aprovada pela Comissão Julgadora

[Handwritten signature]

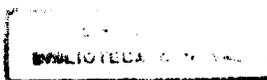
12/08/97

Cristiana Morgado dos Guimarães Teixeira Argüeso
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Campinas
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1997

T/UNICAMP

Ar32



UNIDADE	I.B
N.º CHAMADA:	
T.º	Unicamp
V.	Ex.
TOMBO BC/	32469
PROC.	23197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/12/97
N.º CPD	

CM.00104073-1 Ar32i

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Argueso, Cristiana Morgado dos Guimarães Teixeira

Identificação e purificação parcial de isoenzimas da aspartato quinase (AK) e homoserina desidrogenase (HSDH) de sementes de arroz (*Oriza sativa*): evidências para a existência de um polipeptídeo bifuncional com atividades de AK e HSDH /Cristiana Morgado dos Guimarães Teixeira Argueso. -- Campinas,SP:[s.n.], 1997.

150f: ilus.

Orientador: Ricardo Antunes de Azevedo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Arroz. 2. Biossíntese. 3. Aminoácidos. I. Azevedo, Ricardo Antunes de. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ISOENZIMAS DA
ASPARTATO QUINASE (AK) E HOMOSERINA DESIDROGENASE (HSDH) DE
SEMENTES DE ARROZ (*Oriza sativa*): EVIDÊNCIAS PARA A EXISTÊNCIA DE UM
POLIPEPTÍDEO BIFUNCIONAL COM ATIVIDADES DE AK E HSDH.

CRISTIANA MORGADO DOS GUIMARÃES TEIXEIRA ARGÜESO

Aprovado em 12/08/97

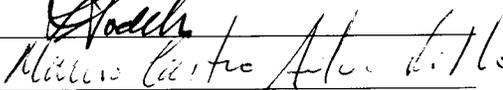
Comissão Julgadora:

Titulares:

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho



Profª Dra. Eliana Pereira Chagas



Suplente:

Prof. Dr. Paulo Arruda

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo
Orientador

AGRADECIMENTOS:

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pelo exemplo de pesquisador e amigo, por todas as horas de trabalho juntos, pelo apoio em todos os momentos, e pelos ensinamentos valiosos que guardarei comigo para o resto de minha carreira.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante o Mestrado e pela oportunidade de ir mais além no Doutorado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, CBMEG-UNICAMP, por aceitar a responsabilidade de presidir a banca de defesa na ausência do meu Orientador.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, Departamento de Fisiologia Vegetal UNICAMP, pela ajuda em seu laboratório nos experimentos de determinação dos pesos moleculares das enzimas, pela participação na banca de qualificação e na banca de defesa desta tese, e principalmente pelas preciosas dicas no trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, Departamento de Genética ESALQ-USP, pela participação na pré-banca e na banca de defesa desta tese.

À Dra. Eliana Chagas, pela imensa ajuda nos experimentos de determinação do peso molecular das enzimas, pelas valiosíssimas sugestões na pré-banca, pelo exemplo e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, Departamento de Fisiologia Vegetal UNICAMP, pela permissão para utilização da coluna de Sephacryl S300 e participação na pré-banca.

À Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato, CBMEG-UNICAMP, pela amizade e participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Pereira, Departamento de Genética e Evolução UNICAMP, pela presença na banca de qualificação, pela amizade, inspiração e apoio aos nossos sonhos.

Ao Prof. Dr. Flavio Tavares, Departamento de Genética ESALQ-USP, pela permissão em utilizar o espectrofotômetro e pela paciência em me aturar tanto tempo em seu laboratório. E também a todos do seu laboratório: Ana, Keila, Beto, Felipe, Tatá, Max, Conti, e Marília.

À Prof. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner e ao Prof. Dr. Carlos Labate, Departamento de Genética ESALQ-USP, pelo uso de recursos de seus laboratórios. Ao Prof. Dr. Akihiko Ando, Departamento de Genética ESALQ-USP, pelo material vegetal cedido.

Ao Amaral, pai do meu arroz no campo, pela ajuda, amizade e bom humor

Aos amigos do Departamento de Genética da ESALQ-USP, por toda a amizade que fizemos nesses anos juntos.

Aos amigos Beto e Keila por toda amizade e bons momentos juntos e pelo imenso favor de nos emprestar o computador. Ao Beto, conhecedor de todos os protocolos, obrigada por toda sua paciência e ajuda milhões e milhões de vezes.

Ao Juverlandi, Neto, Egly e Salete, amigos queridos e companheiros de Orientação, pelas purificações, tristezas, brigas e alegrias juntos. Salete, minha amiga maravilhosa, por todos estes anos juntas, pela imensa amizade, pelas brigas, por ler e reler a tese mil vezes, pela ajuda com o computador, enfim, por poder contar com você sempre.

À minha querida amiga Vera, pela doçura e amizade sempre, pela companhia maravilhosa e pelo exemplo que é para mim. (Te encontro na Filadélfia!!!)

Ao pessoal da Genética da UNICAMP, Tereza principalmente, pelos mil galhos quebrados tantas vezes e pela amizade fiel.

Aos amigos de graduação da UNICAMP, por tanto tempo de amizade e companhia em muitas coisas boas vividas.

À Paula, minha querida amiga e companheira, por todo amor e apoio sempre.

Aos amigos Cleuza e Sildo, por fazerem parte de nossas vidas e de nossas famílias.

Aos meus sogros queridos, Beatriz e Oscar, por todo o amor, apoio e confiança em nossos planos.

Aos meus pais, Uilma e Hernani, por toda a ajuda em todos esses anos, pelo amor, e pelo porto seguro de sempre.

Aos meus irmãos Adriana, Hernani e Júlia e ao meu sobrinho Guilherme, por vivermos tão longe e ao mesmo tempo tão perto...

Ao meu avô Clóvis, presença mais que constante na minha vida e nos meus ideais, por todo o amor, carinho e inspiração. À minha avó Dalila, pelo imenso amor que sempre me deu, por toda a doçura e pelo exemplo que sempre será para mim.

E especialmente ao meu amado marido *Juan Lucas*, muito mais que um grande amor, um companheiro de todas as horas e momentos, por todas as noites e finais de semana juntos trabalhando, pela companhia nos meus sonhos, e principalmente pela imensa felicidade que eu sinto em viver ao seu lado.

Muito Obrigada. Mesmo.

Dedicatória

*Aos meu amados avós, Clóvis e Dalila,
por todo amor e dedicação.*

*Em especial ao meu avô Clóvis, que embora
já tenha partido, sempre estará comigo, nos meus gestos e nos meus
pensamentos. Por tudo o que foi, é e sempre será para mim.*

*À vocês, com todo o meu
agradecimento e todo o amor deste mundo, hoje e sempre.*

ÍNDICE

	Página
Índice.....	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
Resumo	vi
Summary	viii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	11
3. Objetivos	37
4. Material e Métodos	38
5. Resultados	68
6. Discussão	120
7. Conclusão	136
8. Bibliografia	138

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Via metabólica do ácido aspártico.
- Figura 1.2. Regulação da via metabólica do ácido aspártico.
- Figura 4.1. Aspecto das plantas de arroz no campo.
- Figura 4.2. Estágios de desenvolvimento das panículas de arroz.
- Figura 5.1. Atividade específica da AK durante o desenvolvimento das sementes de arroz.
- Figura 5.2. Atividade específica da HSDH durante o desenvolvimento das sementes de arroz.
- Figura 5.3. Atividade específica da AK em diferentes tecidos de arroz.
- Figura 5.4. Atividade específica da HSDH em diferentes tecidos de arroz.
- Figura 5.5. Atividade específica da AK extraída de sementes de arroz no experimento de fracionamento com sulfato de amônio.
- Figura 5.6. Atividade específica da HSDH extraída de sementes de arroz no experimento de fracionamento com sulfato de amônio.
- Figura 5.7. Determinação do melhor tipo de Branco para utilização no ensaio da AK de arroz.
- Figura 5.8. Efeitos do tempo de incubação e concentração de aspartato utilizados no ensaio da AK de arroz.
- Figura 5.9. Interferência dos aminoácidos metionina, valina, treonina e lisina na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.10. Efeito do *pH* na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.11. Efeito da concentração de $MgSO_4$ (Mg^{++}) na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.12. Efeito da concentração de ATP na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.13. Efeito da proporção Mg^{++}/ATP na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.14. Efeito da concentração de hidroxilamina no ensaio da AK de arroz.
- Figura 5.15. Efeito da temperatura sobre a atividade da AK de arroz.
- Figura 5.16. Efeito da concentração de KCl na atividade da AK de arroz.
- Figura 5.17. Atividade da AK nas frações obtidas da eluição “Step-Wise” da coluna de troca iônica FFQ-Sepharose.

- Figura 5.18. Padrão de eluição de proteínas no “Step-Wise” da AK.
- Figura 5.19. Padrão de eluição por “Step-Wise” da HSDH em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose.
- Figura 5.20. A a E Padrão de eluição da AK de coluna de troca iônica em gradiente linear de KCl de 0 a 500mM.
- Figura 5.21. A a G Padrão de eluição da AK de coluna de troca iônica FFQ-Sepharose em gradiente linear de KCl de 100 a 350mM.
- Figura 5.22 A a G Eluição da AK em coluna de filtração em gel Sephacryl S200.
- Figura 5.23. Curva de calibração e determinação do peso molecular da coluna de filtração em gel Sephacryl S200.
- Figura 5.24. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK em um gradiente linear de 0 a 500mM de KCl em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose.
- Figura 5.25. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK em um gradiente linear de 100 a 350mM de KCl em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose.
- Figura 5.26. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK de coluna de filtração em gel Sephacryl S200.
- Figura 5.27. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas nos passos de purificação da AK.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1. Inibição da atividade da AK causada por lisina e treonina durante os desenvolvimento das sementes.
- Tabela 5.2. Inibição da atividade da HSDH causada por treonina durante os desenvolvimento das sementes.
- Tabela 5.3. Inibição da atividade da AK causada por lisina e treonina em sementes e folhas de arroz.
- Tabela 5.4. Inibição da atividade da HSDH causada por treonina em sementes e folhas de arroz.
- Tabela 5.5. Atividade da AK em faixas de saturação no fracionamento em sulfato de amônio.
- Tabela 5.6. Atividade da HSDH em faixas de saturação no fracionamento em sulfato de amônio.
- Tabela 5.7. Efeito da proporção Mg^{++}/ATP na atividade da AK de arroz.
- Tabela 5.8. Purificação parcial da AK de sementes imaturas de arroz.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	2-Aminoetil Cisteína
AK	Aspartato Quinase
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Soroalbumina Bovina
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DHDPS	Dipicolinato Sintase
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HK	Homoserina Quinase
HSDH	Homoserina Desidrogenase
LKR	Lisina Cetoglutarato Redutase
LYS	Lisina
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
SAM	S-Adenosil Metionina
SDH	Sacaropina Desidrogenase
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletlenodiamina
THD	Treonina Desidratase
TS	Treonina Sintase
Tris	Tris-(hidroximetil)-Aminometano

RESUMO

As enzimas Aspartato Quinase (AK) e Homoserina Desidrogenase (HSDH) foram estudadas em sementes, folhas e raízes de arroz (*Oriza sativa*) variedade IAC-165. Foi dada atenção especial às sementes, onde maiores atividades de ambas as enzimas foram encontradas. Foram detectadas duas isoenzimas da AK nas sementes e nas folhas, uma sensível à inibição por lisina e outra sensível à inibição por treonina. Para a HSDH, foram encontrados indícios da existência de uma isoenzima resistente e de uma isoenzima sensível à inibição por treonina, em folhas e sementes. Tanto para a AK quanto para a HSDH a atividade encontrada em raízes foi baixa, não sendo possível identificar isoformas destas enzimas. A proporção das isoenzimas não variou durante o desenvolvimento da semente. Por apresentarem um nível maior de atividade dentre os tecidos testados, as sementes foram escolhidas como material vegetal para a purificação parcial da AK, por precipitação com sulfato de amônio 20-50%, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. A purificação obtida com o uso desta metodologia foi de 28 vezes. Durante a purificação foi possível

confirmar a presença de duas isoenzimas da AK, representadas como dois picos de atividade distintos na cromatografia de troca iônica e na de filtração em gel. O primeiro pico em ordem de eluição foi identificado como a isoforma da AK sensível à treonina e o segundo pico como a isoforma sensível à lisina. Os pesos moleculares das isoformas foram estimados por filtração em gel em 163 kDa para a isoforma sensível à lisina e 186 kDa para a isoforma da AK sensível à treonina. Ensaio feitos com as frações obtidas durante a purificação da AK mostraram que após a eluição em coluna de troca iônica não foi possível detectar a atividade de uma isoforma da HSDH resistente à inibição por treonina, indicada em extratos menos purificados. A isoforma da AK sensível à treonina foi detectada durante toda a purificação. Esta isoforma co-eluiu durante todos os passos de purificação com a isoforma da AK sensível à treonina, indicando que em arroz, assim como nas demais plantas até então estudadas, estas enzimas fazem parte de um polipeptídeo bifuncional AK-HSDH.

SUMMARY

The Aspartate Kinase (AK) and Homoserine Dehydrogenase enzymes have been studied in rice (*Oriza sativa*) var. IAC-165 seeds, leaves and roots. It was given special attention to the seeds, where the highest activity levels were found. Two AK isoenzymes were detected in seeds and leaves, one sensitive to lysine inhibition and another sensitive to threonine inhibition. For HSDH, the presence of two isoenzymes was suggested, one sensitive and another resistant to threonine inhibition, in seeds and leaves. For both enzymes HSDH, the activity found in roots were too low, not allowing the identification of isoenzymes. The isoenzymes proportion was not altered during seed development. As the seed presented the highest levels of activity among the tissues tested, it was chosen as the material for the partial purification of AK, through ammonium sulphate precipitation 20-50%, ion exchange chromatography and gel filtration. A 28 fold purification was obtained with this procedure. During the purification, it was confirmed the presence of two distinct activity peaks in the ion exchange

chromatography, as well as in the gel filtration. The first peak in elution order was identified as the AK threonine sensitive form and the second peak as the AK lysine sensitive form. The molecular weight of these isoenzymes were estimated, by gel filtration chromatography, as 163 kDa for the lysine sensitive form and as 186 kDa for the threonine sensitive form. It was observed that after the ion exchange purification step it was not possible to detect the activity of a threonine resistant HSDH isoenzyme, indicated in less purified extracts. The threonine sensitive form was detected during all the purification. This enzyme co-eluted during all steps of purification with the AK threonine sensitive form, indicating that in rice, as well as in the other plants studied so far, these enzymes are presented as a bifunctional AK-HSDH polypeptide.

1. INTRODUÇÃO:

Com o crescimento da população mundial, a questão da alimentação e da fome no mundo tornou-se um grande problema para a humanidade. Embora pesquisas na área agronômica venham aprimorando as técnicas de produção de alimentos, estes esforços não têm sido suficientes para acabar com a fome e todas as consequências sociais que dela provêm. Como a população mundial continua a se expandir, há uma preocupação constante sobre o número estimado de pessoas que a produção mundial de alimentos pode suportar.

A alimentação do homem é baseada principalmente em cereais, por serem estes uma fonte de alimentação barata e de fácil obtenção. Dentre os cereais, o trigo, o arroz e o milho, nesta ordem, são os mais importantes. Mais de um terço do solo cultivável do planeta é utilizado para produzi-los. Em toda a América do Norte, Europa e norte da África, o trigo é predominante, enquanto o arroz predomina na Ásia e é o principal alimento de mais da metade da população mundial (Mantell et al., 1994).

Embora de tanta importância na alimentação humana, os cereais possuem baixo conteúdo protéico, cerca de 10% da massa seca (Earle et al., 1946). Apresentam deficiência em aminoácidos essenciais como lisina, treonina e triptofano (Mertz et al., 1958), tornando necessária a complementação da

alimentação com proteínas de outros vegetais ou de origem animal, para que se tenha uma dieta nutritivamente balanceada. Visto que grande parte da população subdesenvolvida não tem condições de acesso à proteína animal e quase sempre tem dieta baseada na monocultura de um cereal, torna-se grande a preocupação com a qualidade nutritiva que os cereais apresentam. Uma dieta baseada exclusivamente em cereais leva à deficiências protéicas graves, com efeitos muitas vezes irreversíveis para a saúde e o desenvolvimento, causados pela falta de certos aminoácidos essenciais.

A obtenção de cereais com alto valor nutritivo tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisa em todo o mundo, envolvendo diferentes estratégias, desde melhoramento genético clássico até as modernas técnicas de biologia molecular. O arroz, como os demais cereais, apresenta deficiências em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e treonina, porém pouco se sabe desta planta com relação ao metabolismo de aminoácidos essenciais.

O estudo do metabolismo de aminoácidos essenciais tem se mostrado extremamente importante e promissor para o desenvolvimento de estratégias que permitam aumentar a qualidade nutricional dos cereais, ao contribuir com informações sobre a regulação dos níveis de aminoácidos presentes. Os aminoácidos são fundamentais no metabolismo celular de plantas, não somente pelo papel primário de constituir as proteínas, mas por participarem em diversos outros processos importantes, como o transporte e armazenamento de nitrogênio e a síntese de compostos secundários e de fitohormônios, tornando ainda mais desejável a compreensão e manipulação da regulação de suas vias metabólicas. Apesar disso, o conhecimento até hoje obtido sobre genética, bioquímica e aspectos moleculares da regulação das vias metabólicas de aminoácidos essenciais em plantas ainda é muito pequeno se comparado aos

intensos estudos já realizados em microorganismos (Cohen e Saint Giron, 1990).

1.1. A via metabólica do ácido aspártico em plantas:

A via metabólica do ácido aspártico (Figura 1.1) tem recebido grande atenção de pesquisadores por ser a via de formação de aminoácidos importantes como lisina, treonina, metionina e isoleucina. Estes estão entre o grupo de aminoácidos essenciais, assim denominados por não serem sintetizados por animais não ruminantes. Entender como se comportam as enzimas de síntese e degradação desses aminoácidos é o primeiro passo para a manipulação da via e de seus produtos finais.

A via metabólica se inicia com o ácido aspártico ou aspartato, o primeiro composto estável com quatro carbonos, proveniente do Ciclo de Krebs, que será a base do esqueleto dos aminoácidos formados na via. A primeira reação enzimática ocorre pela fosforilação do aspartato formando o β -aspartil fosfato, reação catalisada pela enzima Aspartato Quinase (EC. 2.7.2.4.). Em seguida o β -aspartil fosfato é convertido a β -aspartil semialdeído, pela ação da enzima Aspartato Semialdeído Desidrogenase (EC.1.2.1.11). Até este ponto a via é comum para os quatro aminoácidos nela formados, e a partir daí se ramifica em dois caminhos. Um deles origina o aminoácido lisina e outro os aminoácidos treonina, isoleucina e metionina. Este último caminho por sua vez, se ramifica em outros dois, um que origina o aminoácido metionina e outro que origina os aminoácidos treonina e isoleucina.

Na ramificação da via que leva à síntese de lisina, o β -aspartil semialdeído é convertido a 2,3-dihidrodipicolinato pela enzima Dihidrodipicolinato Sintase (EC.4.2.1.52), e depois a piperidina-2,6-dicarboxilato pela Dihidrodipicolinato Redutase (EC.1.3.1.26). Após esta

etapa, ocorre a reação catalisada pela enzima Piperidina Dicarboxilase Acilase (EC.2.3.1.-), formando o N-acil-2-amino-6-oxopimelato. Seguem-se incorporações de nitrogênio ao esqueleto de carbono, pela enzima Acildiaminopimelato Aminotransferase (EC.2.6.1.17) e em seguida pela Acildiaminopimelato Deacilase (EC.3.5.1.18). Finalmente, modificações pelas ações das enzimas Diaminopimelato Epimerase (EC.5.1.1.7) e Diaminopimelato Descarboxilase (EC.4.1.1.20) originam o aminoácido lisina.

A partir do β -aspartil semialdeído a via se divide no ramo que origina os aminoácidos treonina e isoleucina. Primeiramente, este composto é reduzido a homoserina pela ação da enzima Homoserina Desidrogenase (EC.1.1.1.3) sendo depois fosforilado a O-fosfohomoserina pela enzima Homoserina Quinase (EC.2.7.1.39). A última reação, catalisada pela enzima Treonina Sintase (EC. 4.2.99.2), dá origem ao aminoácido treonina. A seguir, a treonina serve de substrato para a reação da enzima Treonina Desidratase (EC.4.2.1.16) sendo convertida a 2-oxobutirato. A enzima Acetolato Sintase (EC 4.1.3.18) forma então, o 2-acetohidroxibutirato que em seguida é convertido em 2,3-dihidroximetilvalerato pela ação da enzima Acetohidroxato Redutoisomerase (EC.1.1.1.86). Este composto é desidratado a 2-oxo-3-metilvalerato pela enzima Dihidroxato Desidratase (E.C.4.2.1.9). Finalmente, a ação da enzima Aminotransferase de cadeia ramificada (EC 2.6.1.42) dá origem ao aminoácido isoleucina.

Da síntese da O-fosfohomoserina, segue uma ramificação que leva à formação do aminoácido metionina. A primeira enzima envolvida exclusivamente na síntese de metionina é a Cistationina- γ -Sintase (E.C.4.2.99.9), formadora da cistationina. Esta é transformada na sequência em homocisteína pela enzima Cistationina- β -liase (E.C. 4.4.1.8) e em seguida em metionina pela enzima Metionina Sintase (E.C. 2.1.1.13). A metionina

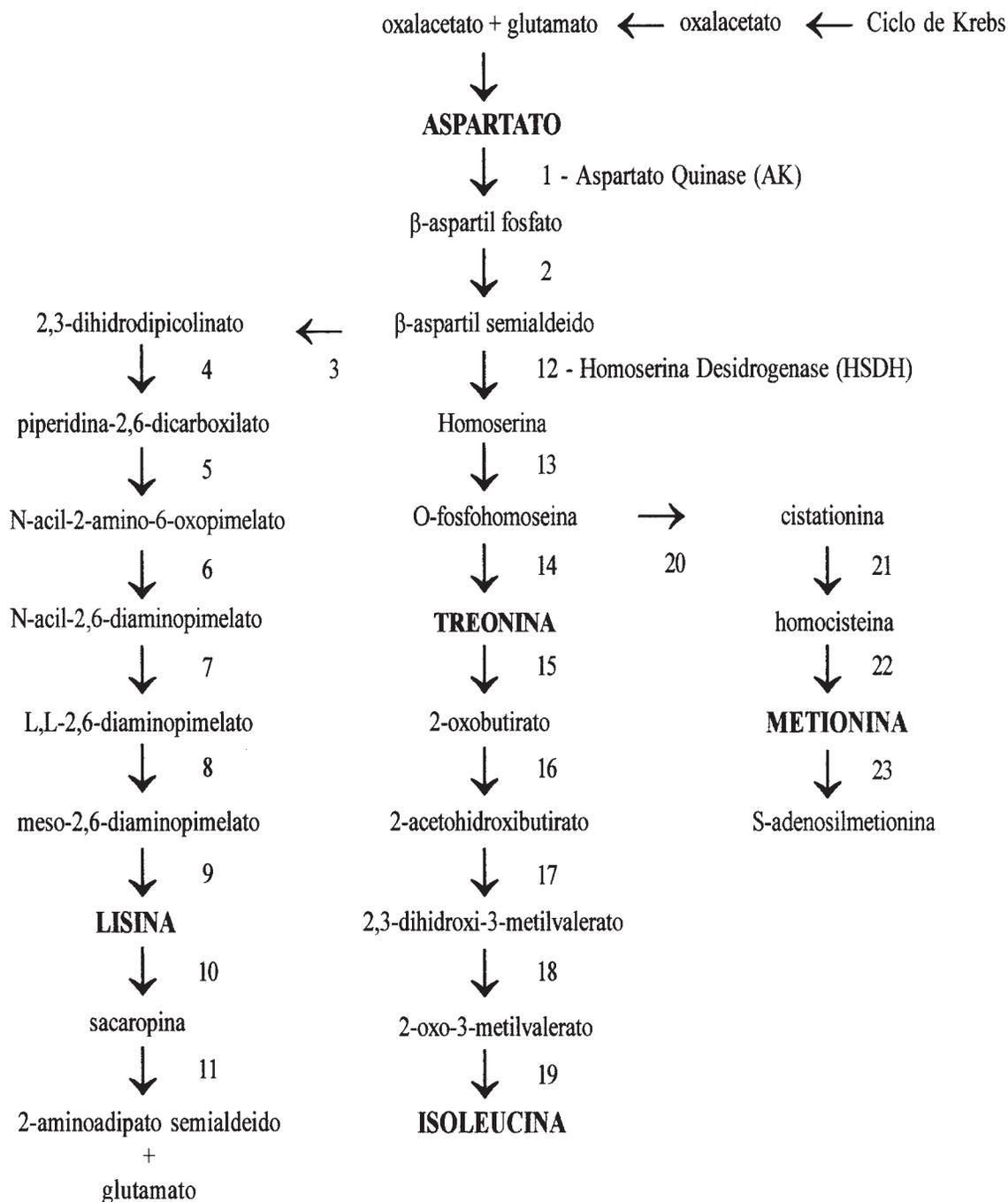


Figura 1.1: Via metabólica do ácido aspartico, adaptado de Bryan, J. K. 1990a.

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

origina o composto S-adenosilmetionina pela ação da enzima Metionina Adenosiltransferase (EC 2.5.1.6).

1.2. Regulação da via metabólica do ácido aspártico em plantas:

A regulação da via metabólica do ácido aspártico se faz em determinados pontos chave, através da regulação das atividades das enzimas que catalisam estes pontos. Em vias metabólicas multienzimáticas, onde o produto de uma enzima se torna o substrato da próxima, a primeira enzima da sequência normalmente atua como reguladora da velocidade de todo o sistema, sendo chamada de enzima regulatória.

A regulação de enzimas, de um modo geral, pode ser feita de duas maneiras: à nível gênico, através da regulação transcricional, traducional ou pós-traducional dos genes que as codificam, ou a nível enzimático, com a inibição/ativação das atividades pela presença ou ausência de determinados compostos, normalmente produtos finais formados na própria via metabólica da enzima em questão. O processo pelo qual os produtos finais (diretos ou indiretos) regulam a atividade de uma enzima é conhecido como “feedback”, ou inibição/ativação retroalimentadora. No caso do produto final levar à inibição da enzima, o processo é conhecido como “feedback” negativo (ou retroalimentação negativa) e quando o produto final leva à ativação da atividade enzimática o processo é conhecido como “feedback” positivo (ou retroalimentação positiva).

Na via metabólica do ácido aspártico, cinco enzimas possuem um papel importante na regulação da biossíntese dos aminoácidos lisina e treonina: a Aspartato Quinase (AK), a Homoserina Desidrogenase (HSDH), a Dihidrodipicolinato Sintase (DHDPS), a Lisina Cetogluturato Redutase (LKR) e a Sacaropina Desidrogenase (SDH). A Figura 1.2 representa os pontos chave

de regulação da via do ácido aspártico em plantas, as enzimas e os compostos participantes.

A AK, por ser a primeira enzima da via, tem papel fundamental na regulação do direcionamento do fluxo dos carbonos entre as três ramificações que dão origem aos aminoácidos lisina, treonina e isoleucina, e metionina. Várias isoenzimas da AK já foram identificadas, podendo estar sujeitas à inibição por “feedback” causada por determinados compostos formados na via como lisina, treonina e S-adenosilmetionina.

A DHDPS é a primeira enzima da ramificação que origina a lisina (Bryan et al., 1970, Cheschire e Mifflin, 1975) e também pode ser fortemente inibida por este aminoácido (Mazelis e Whatley, 1977; Gengenbach et al., 1978; Matthews e Widholm, 1978; Wallsgrove e Mazelis, 1981, Kumpaisal et al., 1987). Embora até agora não tenham sido verificadas diferentes isoenzimas para a DHDPS, esta enzima desempenha o papel mais importante na regulação da síntese de lisina.

A HSDH é a primeira enzima da ramificação que dá origem a treonina, isoleucina e metionina. Também para a HSDH, foram identificadas isoenzimas na maioria das plantas estudadas, classificadas de acordo com a susceptibilidade à inibição por treonina, denominadas HSDH-R (isoforma resistente à inibição por treonina) e HSDH-S (isoforma sensível à inibição por treonina) (Azevedo et al., 1997). Evidências obtidas em ervilha, cenoura e milho, sugerem que ambas as atividades da AK e HSDH sensíveis à inibição por treonina façam parte de um mesmo polipeptídeo bifuncional (Aarnes e Rognes, 1974; Wilson et al., 1991, Azevedo et al., 1992b).

S-adenosilmetionina (SAM) é um composto derivado do aminoácido metionina, que possui efeito regulatório em certos pontos da via do ácido aspártico. A AK pode ter sua atividade inibida pela presença de SAM

(Azevedo et. al, 1992a). Quando presente juntamente com lisina, SAM tem efeito intensificador na inibição causada por este aminoácido na atividade da AK (Rognes et al., 1980; Bryan, 1980, 1990b). Tem ainda efeito ativador sobre a enzima Treonina Sintase (Madison e Thompson, 1976) e juntamente com a metionina pode levar à supressão da síntese da enzima Cistationina- γ -Sintase em algumas plantas (Thompson et al., 1982).

As enzimas Lisina Cetogluturato Redutase (EC 1.5.1.8.) e Sacaropina Desidrogenase (EC 1.5.1.9) estão representadas na via metabólica do ácido aspártico por participarem da via de degradação da lisina. A degradação de lisina foi estudada em bactérias, fungos, plantas e animais e quatro vias catabólicas diferentes foram encontradas nos diferentes organismos estudados. Para mamíferos e plantas, foi determinado que a via de catabolismo mais importante envolve a formação do ácido α -aminoadípico (Nigan e Connel, 1963). A lisina é condensada juntamente com o α -cetogluturato para a formação de sacaropina, numa reação catalisada pela LKR. A sacaropina é então degradada a α -aminoadípico- γ -semialdeído e ácido glutâmico pela ação da SDH.

As enzimas LKR e SDH começaram a chamar a atenção dos pesquisadores quando descobriu-se que a taxa de degradação de lisina estava relacionada à quantidade deste aminoácido presente no endosperma de milhos Opaco-2, um mutante rico em lisina e em milhos de endosperma normal (Da Silva e Arruda, 1979). No endosperma de milho Opaco-2, as atividades detectadas das enzimas LKR e SDH foram mais baixas do que as detectadas em endosperma de milho normal, sugerindo que a degradação da lisina fosse um passo importante na regulação da quantidade de lisina final encontrada no endosperma. Em plantas, as enzimas LKR e SDH já foram estudadas em milho

(Da Silva e Arruda, 1979; Arruda et al., 1983; Broccheto-Braga et al., 1992 e Gonçalves-Brutuille et al., 1995), tabaco (Karchi et al., 1993, 1994) e arroz (Gaziola et al., 1997). Em milho, foi detectado que ambas as atividades de LKR e SDH co-eluíam durante a purificação e em géis corados para atividade, sugerindo a presença de um polipeptídeo bifuncional com ambas as atividades (Gonçalves-Brutuille *et al.*, 1995). O mesmo tipo de conclusão pôde ser tirada dos experimentos com arroz (Gaziola et al., 1997). Em tabaco, foi observado que o acúmulo de lisina na semente pode levar à estimulação da atividade da LKR, sendo este processo dependente de cálcio e fosforilação de proteínas (Karchi et al., 1995).

A regulação da via do ácido aspártico ainda é motivo de muito estudo e discussão. Estudos recentes indicam que a AK parece não ser a principal enzima reguladora da síntese de lisina como anteriormente se pensava, tendo sim um maior efeito na regulação geral do fluxo de carbono em toda a via e na síntese de treonina (Galili, 1995). O presente trabalho tem por finalidade a obtenção de informações sobre as enzimas AK e HSDH de arroz, contribuindo com informações sobre a regulação da biossíntese dos aminoácidos lisina e treonina neste cereal.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. As enzimas Aspartato Quinase e Homoserina Desidrogenase :

As enzimas AK e HSDH despertaram a atenção de pesquisadores por estarem envolvidas com a regulação da síntese de aminoácidos essenciais como lisina e treonina. Por esta razão, muito foi estudado sobre a purificação, caracterização bioquímica e regulação destas enzimas, principalmente em microrganismos, onde estes estudos foram iniciados. Hoje o estudo destas duas enzimas em plantas está mais desenvolvido, devido ao grande interesse na obtenção de plantas com maiores teores de lisina e treonina (Bryan, 1990b). As plantas que mais foram estudadas quanto à biossíntese de lisina e treonina foram o milho, a cenoura (principalmente células em suspensão) e a cevada.

2.1.1. A Aspartato Quinase em plantas:

A primeira sugestão de atividade da enzima AK em plantas foi feita por Dunham e Bryan (1969) em *Marchantia polymorpha*. Vários aminoácidos foram adicionados em diferentes concentrações ao meio de crescimento desta planta, sendo que lisina e treonina demonstraram um padrão de inibição do crescimento

semelhante ao encontrado em bactérias e associado às inibições da enzima AK, previamente caracterizada em microrganismos (Cohen e Saint-Giron, 1990).

A AK foi extraída de plantas pela primeira vez a partir de hipocótilos de plântulas de milho (Bryan et al., 1970). A atividade da enzima pôde ser detectada em extratos parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio, seguida de diálise e demonstrou ser inibida por lisina e ativada por alanina, valina e isoleucina.

Em 1973, continuando os estudos sobre esta enzima em plantas, a AK foi extraída de gérmen de trigo e da planta *Lemna minor* L. (Wong e Dennis, 1973a,b). A atividade da enzima extraída de ambas as plantas pôde ser inibida pela presença de lisina em baixas concentrações (0.6-2.0mM) e por treonina em concentrações maiores (3.0-8.0mM). Quando adicionados em conjunto, estes aminoácidos causaram uma redução maior na atividade da enzima, sugerindo uma regulação em conjunto por esses dois aminoácidos. Com a continuidade das pesquisas, a atividade da AK pôde ser detectada em diferentes plantas e em algas verdes e azuis (Aarnes, 1974). As plantas investigadas apresentaram uma atividade que podia ser inibida por lisina e treonina, sugerindo pela primeira vez na literatura a presença de duas isoenzimas diferentemente sensíveis à lisina e treonina, como já havia sido observado em microrganismos.

Em ervilha, isoformas da AK e da HSDH, sensíveis à inibição por treonina (5mM), foram extraídas e parcialmente purificadas em colunas de troca iônica e de filtração em gel (Aarnes e Rognes, 1974). A AK demonstrou ser ativada pela presença dos aminoácidos isoleucina, valina e alanina, conforme relatado para a isoforma sensível à lisina estudada anteriormente em milho (Bryan et al., 1970). A lisina não teve nenhum efeito na atividade da AK de ervilha, mesmo quando adicionada em conjunto com a treonina. Para a HSDH, dois picos de atividade foram encontrados na eluição em coluna de Sephadex G-200, sendo um sensível e

outro resistente à inibição por treonina, indicando a presença de duas isoformas dessa enzima em ervilha, com diferentes pesos moleculares, não determinados neste trabalho. Ambas as atividades de AK e HSDH sensíveis à treonina foram eluídas num só pico em colunas de troca iônica e filtração em gel, sendo este o primeiro indício de fazerem parte de um complexo bifuncional, como anteriormente constatado em *Escherichia coli* (Patte et al., 1967).

Cheschire e Mifflin (1975), encontraram em plântulas de milho uma inibição total da atividade da AK quando na presença de 0.5mM de lisina, e analisando também a enzima DHDPS encontraram uma inibição menor que aquela observada para a AK, mesmo com 1mM de lisina. Em cevada a atividade da AK mostrou-se sensível à inibição por lisina e também pela ação cooperativa de lisina e metionina (Shewry e Mifflin, 1977). Nenhum outro aminoácido testado foi capaz de exercer qualquer efeito sobre a atividade da AK.

Em células em suspensão de cenoura, a atividade da AK foi parcialmente purificada em coluna de troca iônica (Davies e Mifflin, 1977). Baixas concentrações de treonina (1mM) foram capazes de inibir a atividade enzimática, sendo também inibida por concentrações maiores de lisina (5mM). Em um trabalho subsequente, também com células em suspensão de cenoura, Davies e Mifflin (1978) conseguiram isolar por filtração em gel dois picos de atividade de AK, um sensível à inibição por lisina e outro sensível à inibição por treonina, sugerindo a existência de duas isoenzimas da AK independentemente reguladas. Em estudos posteriores, também utilizando células em suspensão de cenoura, foram identificadas duas isoformas da AK eluídas em picos distintos durante a purificação em cromatografia de troca iônica (Sakano e Komamine, 1978). Uma delas, sensível à inibição por treonina, demonstrou ser predominante, representando 70% da atividade total de AK. A outra, sensível à lisina, foi responsável por somente 30% da atividade total de AK. Nestes experimentos

também foi mostrado que ocorriam mudanças na proporção da atividade total da AK durante o desenvolvimento da cultura, evidenciando uma regulação da enzima durante o desenvolvimento de acordo com as necessidades de aminoácidos. A comparação dos níveis de atividade da AK e dos níveis de aminoácidos derivados do aspartato durante o crescimento de culturas de células de cenoura em suspensão não revelou nenhuma relação entre a atividade da AK e os níveis de aminoácidos derivados do aspartato (Bright, et al., 1979b), sugerindo que outros pontos da via também atuavam na regulação da biossíntese destes aminoácidos. O mesmo resultado foi encontrado em estudos feitos em trigo (Bright et al., 1978). Raízes de cenoura também foram usadas para a extração da atividade das enzimas AK e DHDPS, tendo sido encontrada uma susceptibilidade à inibição por lisina muito maior para a DHDPS do que para a AK (Matthews e Wildholm, 1978).

Em soja, a atividade da AK foi detectada em cotilédones, calos e cultura de células em suspensão (Matthews e Wildholm, 1979). A inibição por lisina ou treonina variou entre os diferentes tecidos analisados. Em cotilédones e calos, a inibição com 1mM de treonina chegou a 70% da atividade total, e com 1mM de lisina, a 30%, indicando a presença de duas isoformas diferentemente sensíveis à lisina e treonina nestes tecidos, sendo a sensível à treonina predominante. Já para cultura de células em suspensão, as duas isoformas da AK, lisina sensível e treonina sensível, foram inibidas em torno de 50% na presença dos respectivos aminoácidos, demonstrando não haver predominância de nenhuma delas neste tecido.

Lea et al., (1979), trabalhando com a AK de folhas de ervilha, demonstrou a presença de uma isoforma sensível à inibição por lisina na concentração de 5mM. Em 1980, trabalhando com cevada, o mesmo grupo identificou um novo modelo de regulação da AK, onde uma ação sinérgica da S-adenosilmetionina (SAM) com a lisina mostrou inibir a atividade enzimática (Rognes et al., 1980).

Na década de 80 foram publicados trabalhos sobre a regulação da biossíntese de lisina e treonina em cevada, assim como estudos sobre obtenção de mutantes ricos nestes aminoácidos (Bright et al., 1982a,b). O mesmo grupo de pesquisadores estudou a regulação da AK de dois mutantes de cevada com alto teor de lisina, identificando e separando por cromatografia de troca iônica duas diferentes isoenzimas da AK sensíveis a lisina, presentes nestes mutantes com menor sensibilidade à inibição (Arruda et al., 1984).

Trabalhando com folhas de ervilha e cevada, Wallsgrove et al., (1983) descobriram a localização intracelular de algumas enzimas da via metabólica do ácido aspártico. A extração das enzimas, seguida de centrifugação diferencial e gradiente de sacarose, demonstrou que as enzimas envolvidas na síntese de lisina (AK) e treonina (Homoserina Quinase e Treonina Sintase) se encontravam no cloroplasto, enquanto as enzimas envolvidas com a síntese de metionina se encontravam no citoplasma.

Experimentos iniciais de identificação da atividade e purificação da AK foram feitos também em arroz (Shaw e Ku, 1984), espinafre (Sane et al., 1984) e trigo (Yamada, 1986). Em arroz, a atividade de AK foi observada em folhas e plântulas, sendo que apenas inibição por lisina foi verificada, levando a uma diminuição de 46% na atividade quando na concentração de 10mM (Shaw e Ku, 1984).

A AK sensível à lisina foi purificada cerca de 1.000 vezes a partir de células em suspensão de cenoura, sendo determinadas algumas de suas características físicas e cinéticas (Relton et al., 1988). O peso molecular determinado por filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante foi de 250 kDa. A enzima teve a atividade inibida por 0,5mM de lisina em cerca de 80%. A adição de SAM potencializou este efeito de inibição. Isoladamente, a SAM não teve nenhum efeito sobre a atividade da AK.

Estudos sobre a atividade da AK de extrato bruto de plântulas de *Lemna paucicostata*, utilizando um ensaio baseado no uso de aspartato e aspartil-hidroxiato radioativos (^{14}C aspartato e ^3H aspartil-hidroxiato), revelaram a presença de duas isoenzimas da AK, uma sensível à treonina e outra sensível a lisina (Giovanelli et al., 1989a,b). De acordo com os resultados destes trabalhos, os autores sugeriram que a AK não se encontrava em quantidades limitantes nos tecidos da planta analisados, não tendo portanto função regulatória para a formação de lisina e treonina.

O estudo da regulação da AK em plantas teve um grande avanço quando duas isoformas sensíveis à inibição por lisina foram purificadas de culturas de células de milho em suspensão, cerca de 1.200 vezes cada uma (Dotson et al., 1989). Nenhuma isoforma sensível a treonina foi identificada. O peso molecular da enzima foi estabelecido por filtração em gel e eletroforese (não desnaturante e desnaturante) em 254 kDa, composta de duas subunidades de 49 kDa e duas de 60 kDa. Estudos cinéticos foram realizados para a AK de milho purificada (Dotson et al., 1990a).

A purificação até a homogeneidade da HSDH de células em suspensão de cenoura (Matthews et al., 1989) permitiu a análise da sequência de aminoácidos da enzima, o que demonstrou que ambas as atividades de AK e HSDH sensíveis à inibição por treonina se encontravam em um mesmo polipeptídeo (Wilson et al., 1991). Os resultados obtidos da sequência de aminoácidos foram confirmados pela co-eluição das atividades de ambas as enzimas em colunas de troca iônica e filtração em gel, assim como em géis de eletroforese não desnaturantes corados para a atividade.

Azevedo et al., (1992a), estudando a AK de células em suspensão de milho, identificaram três isoenzimas da AK diferentemente suscetíveis à inibição por lisina e treonina. Através de purificação utilizando cromatografia de troca

iônica, filtração em gel e eletroforese não desnaturante, a atividade total da AK pôde ser purificada cerca de 10.000 vezes. Ao contrário do observado por Dotson et al., (1989) também em células de milho em suspensão, uma isoenzima sensível à treonina foi identificada. Durante a purificação, dois picos de atividade da AK puderam ser detectados, o primeiro deles sensível à inibição por treonina (5mM) e o segundo sensível à inibição por lisina (5mM). Através de ensaios de atividade contendo lisina e SAM, o segundo pico pôde ser desmembrado em duas isoformas sensíveis à lisina, sendo uma delas também sensível à inibição por SAM isoladamente. O peso molecular das isoenzimas foi estabelecido por filtração em gel, sendo estimado o peso de 180 kDa para a isoforma sensível à treonina e 150 kDa para a isoforma sensível à lisina. Neste trabalho também foram identificadas duas isoformas da HSDH, uma sensível e outra resistente à inibição por treonina. A atividade da HSDH sensível à inibição por treonina co-eluiu com a AK também sensível à inibição por treonina durante todos os passos de purificação, indicando que em milho, assim como em cenoura (Wilson et al., 1991), ambas as enzimas estariam contidas em um polipeptídeo bifuncional (Azevedo et al., 1992b). Cálcio e calmodulina de espinafre não foram capazes de aumentar a atividade de nenhuma das isoformas da AK encontradas, assim como os antagonistas de cálcio utilizados não foram capazes de inibi-las (Azevedo et al., 1992c), indicando não haver regulação destas enzimas por nenhum destes dois compostos, como havia sido sugerido para a AK isolada de espinafre (Sane et al., 1984; Kocchar et al., 1986).

2.1.2. A HSDH em plantas:

A HSDH foi isolada de plantas pela primeira vez de plântulas de ervilha (Sasaoka, 1961). Este primeiro trabalho demonstrou a existência desta enzima em plantas, porém não enfocou características da enzima ou a regulação da mesma.

Em 1969, a HSDH foi extraída de raízes de milho (Bryan, 1969). A enzima foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio, tendo sua atividade inibida por treonina e também por serina, ácido aspártico e cisteína.

Nos estudos com ervilhas, Aarnes e Rognes (1974) demonstraram a presença de duas isoformas de HSDH, uma sensível e outra resistente à inibição por treonina. A isoforma sensível pareceu co-eluir com a AK também sensível à treonina detectada, sendo este o primeiro trabalho que sugeriu a presença de um complexo bifuncional envolvendo as duas enzimas em plantas.

Estudos posteriores (Matthews et al., 1975) demonstraram que a enzima HSDH sensível à treonina tornava-se dessensibilizada quanto à inibição causada por treonina durante o desenvolvimento de plântulas de milho, tornando-se progressivamente resistente, o que foi chamado de dessensibilização da enzima. Três formas da HSDH foram identificadas, denominadas I, II e III, diferindo entre si pelos padrões eletroforéticos encontrados em géis de poliacrilamida.

A relação existente entre estas formas moleculares da HSDH encontradas em milho foram estudadas posteriormente por DiCamelli e Bryan (1975). As isoformas tiveram seus pesos moleculares determinados por filtração em gel em aproximadamente 82 kDa para a isoforma I e 168 kDa para as isoformas II e III, sendo estas últimas diferentes apenas quanto à carga que apresentaram (isômeros diferentes em carga). As enzimas foram também analisadas quanto à distribuição temporal nas plântulas de milho, inibição por treonina e ativação por íons K^+ . As isoformas II e III apresentaram resultados semelhantes, sendo ativadas por K^+ e inibidas por treonina, o que não ocorreu para a isoforma I. Diferenças quanto ao padrão de inibição e ativação também foram encontradas de acordo com o tecido analisado. Os estudos de localização intracelular da enzima, baseados em gradientes de sacarose, demonstraram que em milho as isoformas da HSDH se encontravam localizadas nos cloroplastos (Bryan et al., 1977).

Em células em suspensão e em raízes de cenoura, apenas uma forma de HSDH foi encontrada, sensível à inibição por treonina (10mM). A presença de KCl no tampão aumentou em 185% a atividade da HSDH, intensificando também o efeito inibitório causado pela treonina (Matthews e Widholm, 1978). Os mesmos autores seguiram trabalhando com cotilédones, calos e células em suspensão de soja (Matthews e Widholm, 1979). Os estudos demonstraram que a atividade da HSDH de cotilédones e células em suspensão podia ser inibida em 67% na presença de 1mM de treonina, enquanto que em calos, a inibição encontrada nas mesmas condições foi de 77%. Quatro diferentes isoformas da HSDH foram detectadas por eletroforese em géis de poliacrilamida de extratos de cotilédones, sendo três sensíveis e uma resistente à inibição por treonina. Apenas as três isoformas sensíveis foram encontradas nos calos e nas células em suspensão (Matthews e Widholm, 1979).

Diferentemente das três isoformas observadas por Matthews et al., (1975), apenas duas isoenzimas da HSDH, uma resistente e uma sensível à inibição por treonina, foram separadas por cromatografia de afinidade, em milho (Walter et al., 1979). O peso molecular das isoformas foi determinado por filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, sendo aproximadamente 70 kDa para a isoforma resistente (duas subunidades de 39 kDa) e 190 kDa para a isoforma sensível, sendo duas subunidades, uma de 89 kDa e outra de 93 kDa.

Posteriormente, DiCamelli e Bryan (1980) estudaram o efeito da treonina em conjunto com os íons K^+ no processo de dessensibilização da enzima. As três isoformas detectadas por eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturantes variaram em relação ao peso molecular encontrado, dependendo da presença ou não de treonina no tampão, não tendo sido encontradas diferenças no peso molecular das demais proteínas do extrato não reguladas por treonina. Este processo de modificação de peso molecular entre as isoformas sensíveis à inibição

por treonina da classe II e III, provavelmente causado por diferenças na polimerização de subunidades, foi chamado de interconversão e demonstrou ser influenciado pela concentração de treonina e K^+ .

O estudo da distribuição das isoenzimas da HSDH de milho em diferentes tecidos da planta revelou que a quantidade presente de cada uma delas variava de acordo com o tecido estudado e também em relação ao crescimento da planta na presença ou ausência de luz (Bryan e Lochner, 1981a). Também foi observado que durante o amadurecimento das folhas, a proporção das isoenzimas sensíveis à treonina das classes II e III diminuiu, enquanto o nível da isoenzima resistente à treonina da classe I permaneceu constante. Em estudos posteriores, também em plântulas de milho, Bryan e Lochner (1981b) demonstraram que certas condições de extração da enzima podiam alterar a dessensibilização das isoenzimas sensíveis à inibição por treonina durante o amadurecimento dos tecidos.

Os estudos sobre o processo de interconversão das isoenzimas da HSDH sensíveis à inibição por treonina em milho, agora denominadas apenas de HSDH II, tiveram continuidade, utilizando diferentes concentrações de treonina e K^+ (Krishnaswamy e Bryan, 1983a). Através de uma cuidadosa análise cinética do mecanismo de reação da HSDH II em diferentes condições, demonstrou-se que a enzima podia sofrer uma série de rápidas ou lentas transições entre várias formas moleculares (estados) que possuíam diferentes propriedades catalíticas e regulatórias. Foi sugerido que esses estados poderiam responder pela variação de propriedades encontradas nesta enzima, assim como ter participação importante na regulação enzimática da biossíntese de treonina (Krishnaswamy e Bryan, 1983a,b). Em 1986, a obtenção de anticorpos monoclonais altamente específicos para a HSDH II permitiu a purificação desta enzima até a homogeneidade por cromatografia de imunoafinidade (Krishnaswamy e Bryan, 1986). O peso de 85 kDa para as subunidades da HSDH II foi confirmado.

Mais tarde, a purificação até a homogeneidade da HSDH de cenoura também foi obtida, pela utilização de cromatografia de troca iônica, filtração em gel e eletroforese (Matthews et al., 1989). Diferentemente do relatado para as outras espécies de plantas estudadas, além da interconversão da HSDH II para formas moleculares de alto peso e sua dessensibilização quanto à inibição por treonina, a HSDH I resistente também pôde ser convertida à uma forma sensível à inibição por treonina, sendo todos estes processos influenciados por K^+ e treonina. Formas moleculares de 180, 240 e 720 kDa foram encontradas, formadas por subunidades de 85 kDa.

A obtenção de anticorpos policlonais para a HSDH anteriormente purificada de cenoura comprovou a interconversão entre as formas sensível e resistente à inibição por treonina (Turano et al., 1990). Neste mesmo trabalho, foi proposto um modelo de regulação da interconversão e dessensibilização das isoformas da HSDH. De acordo com este modelo, a alta concentração de K^+ e a baixa concentração de treonina durante o período de luz permitiriam a conversão da HSDH para a forma resistente à treonina, favorecendo a síntese deste aminoácido. Colaborando para a viabilidade deste modelo estão o fato do *pH* do estroma dos cloroplastos aumentar para 8.0 durante os períodos de luz (sendo este o *pH* ótimo de atividade da HSDH de cenoura) e a produção de $NADP^+$ que ocorre durante a fotossíntese, tornando disponível este composto que é considerado um importante co-fator da HSDH. No escuro, ao final da fotossíntese, quando os cloroplastos não mais estariam sendo iluminados e a taxa de síntese de proteínas estivesse diminuída, os níveis de treonina aumentariam, os de K^+ diminuiriam, e a HSDH seria convertida para a isoforma sensível à inibição por treonina, terminando a síntese deste aminoácido até que as condições fisiológicas voltassem a necessitar de treonina livre novamente (Turano et al.,

1990). Um trabalho posterior feito com HSDH de milho estabeleceu um modelo semelhante para a regulação da HSDH nesta planta (Bryan, 1990a).

A purificação da HSDH de cenoura até a homogeneidade (Matthews et al., 1989) permitiu o sequenciamento da proteína e com isso a comprovação da existência de ambas as atividades de HSDH e AK sensíveis à inibição por treonina num mesmo polipeptídeo bifuncional (Wilson et al., 1991). Os trabalhos com isoenzimas da AK em milho indicaram que o mesmo pode ser observado em células de milho em suspensão (Azevedo et al., 1992b), sugerindo que a existência de um polipeptídeo bifuncional com ambas as atividades possa ser uma regra geral em plantas.

2.2. Genética molecular da Aspartato Quinase e Homoserina

Desidrogenase:

Um gene que codifica a enzima AK foi isolado pela primeira vez em *Escherichia coli* por Katinka et al., (1980). Este gene, denominado *thrA*, é o primeiro gene estrutural de um operon da síntese de treonina, caracterizado em *Escherichia coli* K12 (Theze e Saint-Girons, 1974), e codifica para a isoforma da AK sensível à treonina e bifuncional com a HSDH sensível à treonina (AKI-HSDHI), previamente caracterizada (Patte et al., 1967). Este gene contém 2460 pb e codifica um único polipeptídeo de 820 aminoácidos com atividades amino terminal de AK e carboxi-terminal de HSDH.

Em 1986, seguindo as pesquisas moleculares sobre essas duas enzimas, foi clonado o gene *lysC* de *Escherichia coli* que codifica a AKIII sensível à lisina (Cassan et al, 1986). Este gene codifica um polipeptídeo de 449 aminoácidos com um peso molecular deduzido de aproximadamente 48 kDa, que confirmou aquele peso molecular de 50 kDa estimado para enzima através de métodos bioquímicos (Richaud et al., 1973). Sua sequência deduzida de aminoácidos não apresenta

semelhanças com a sequências de HSDH, colaborando para idéia de que a AKIII seja uma enzima monofuncional para a atividade de AK, como já constatado em pesquisas bioquímicas.

Em *Bacillus subtilis*, a clonagem da porção AK do gene que codifica para a enzima AKII-HSDHII (Bondaryk e Paulus, 1985b) revelou que as subunidades α e β da enzima AK são codificadas por genes que se sobrepõem. A confirmação deste fato veio em 1993, com a clonagem e sequenciamento destes genes para as subunidades α e β , também em *Bacillus subtilis* (Chen et al., 1993), que confirmou através de experimentos de transcrição que as duas subunidades são transcritas independentemente em condições normais de crescimento.

Também em *Bacillus subtilis*, o gene *hom* que codifica para a HSDH foi clonado por Parsot e Cohen (1988). A sequência deste gene apresentou homologia com as sequências dos genes da AK-HSDH de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, principalmente na parte destes genes que codifica a atividade de HSDH. O gene *hom* foi então considerado como codificador da isoforma monofuncional da HSDH em *Bacillus subtilis* (Parsot e Cohen, 1988).

Na bactéria *Serratia marcescens*, o gene da isoforma bifuncional sensível à treonina (AKI-HSDHI) foi clonado e sequenciado juntamente com todos os outros componentes do operon de treonina (Omori et al., 1993). A sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos do gene revelou homologias deste com as sequências da enzima correspondente de *Escherichia coli* (Katinka et al., 1988). A dedução da sequência de aminoácidos também revelou que esta enzima em *Serratia marcescens* é, aparentemente, um tetrâmero composto de monômeros de 819 aminoácidos. Análises de deleção demonstraram que nesta enzima a atividade de AK é encontrada na porção amino terminal e a atividade de HSDH na porção carboxi-terminal, como ocorre em *Escherichia coli* (Katinka et al., 1988).

O gene da AK foi clonado por complementação em *Saccharomyces cerevisiae* (Rafalski e Falco, 1988). Denominado *hom3*, este gene codifica a única AK presente em leveduras, sensível à treonina e insensível à lisina ou metionina (Stadtman et al., 1961). A sequência de nucleotídeos revelou que este gene codifica um polipeptídeo de 414 aminoácidos e que apresenta homologia com as sequências determinadas das três isoformas da AK de *Escherichia coli*: AKI-HSDHI (Katinka et al., 1980), AKII-HSDHII (Zachin et al., 1983) e AKIII (Cassan et al., 1986), especialmente nas regiões amino terminal e central da molécula.

Em plantas, o primeiro clone de cDNA do gene da enzima AK-HSDH foi obtido em células em suspensão de cenoura (Weisemann e Matthews, 1993), através da hibridação de uma biblioteca de cDNA com sondas sintetizadas a partir de sequências da enzima purificada até aparente homogeneidade (Matthews et al., 1989). Dois clones sobrepostos foram selecionados e mostraram em conjunto codificar para um polipeptídeo de 921 aminoácidos, incluindo a proteína madura e um peptídeo sinal de cloroplastos. A sequência de aminoácidos deduzida apresentou grande homologia com as sequências das enzimas AKI-HSDHI e AKII-HSDHII de *Escherichia coli*, indicando que este clone também codifica uma proteína bifuncional com ambas as atividades de AK e HSDH, como já demonstrado em experimentos bioquímicos (Wilson et al., 1991). As similaridades entre as sequências foram maiores entre a AK-HSDH de cenoura e a AKI-HSDHI de *Escherichia coli*. Ambas podem ter suas atividades inibidas por treonina, o que não acontece com a AKII-HSDHII de *Escherichia coli*, sugerindo que esta similaridade maior entre as sequências pode estar relacionada ao mesmo mecanismo de regulação entre estas duas proteínas. A presença do peptídeo sinal típico de cloroplastos encontrado neste clone comprovou os experimentos de

localização intracelular desta enzima realizados anteriormente (Bryan et al., 1977; Lea et al., 1979; Sainis et al., 1981; Wallsgrove et al., 1983).

O primeiro clone genômico da AK em plantas foi obtido em *Arabidopsis thaliana* (Ghislain et al., 1994), utilizando-se o clone de cDNA de cenoura (Weisemann e Matthews, 1993) como sonda em uma biblioteca genômica. Comparações deste gene com as sequências do cDNA da AK-HSDH de cenoura e dos genes *thrA* e *metL* de *Escherichia coli* demonstraram 80,0%, 37,5% e 31,4% de similaridade, respectivamente, sugerindo que este gene seja o equivalente ao gene *thrA* em plantas. Este gene está presente em *Arabidopsis thaliana* em cópia única. Sua região codificante é interrompida por 15 íntrons, relativamente pequenos (78-134 pb), uma característica de genes de *Arabidopsis thaliana*.

Em milho, a hibridação do clone de cDNA de cenoura do gene da AK-HSDH com uma biblioteca da cDNA de folhas revelou três clones putativos (pAKHSDH 1, 2, 3) para subunidades desta enzima (Muehlbauer et al., 1994c). Estes clones demonstraram serem diferentes entre si na sequência de nucleotídeos e mapa de restrição, indicando que se tratam de genes diferentes. As sequências de aminoácidos deduzida dos clones 1 e 2 apresentaram homologia com as sequências de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Daucus carota* e *Arabidopsis thaliana*, indicando codificarem o mesmo gene da AK-HSDH. O clone 3 não foi muito estudado por ser bem menor que os outros dois. A sequência de aminoácidos deduzida também demonstrou que os clones pAKHSDH 1 e 2 codificam para um polipeptídeo de 822 aminoácidos com peptídeo sinal característico de cloroplastos, assim como já encontrado para os clones das outras espécies estudadas. O peso molecular do polipeptídeo, estimado de acordo com a sequência de aminoácidos deduzida, revelou ser semelhante ao obtido para a subunidade da enzima em experimentos de eletroforese em gel de

poliacrilamida desnaturante, entre 89 e 90 kDa (Walter et al., 1979; Krishnaswamy e Bryan, 1986).

Anticorpos produzidos contra polipeptídeos sintetizados com base na sequência de aminoácidos deduzida dos clones reagiram com a enzima parcialmente purificada contendo ambas as atividades em experimentos de “Western Blot”. Os clones se expressaram de forma igual nos diferentes tecidos estudados, indicando não haver tecido-especificidade. Análises da localização cromossômica por RFLP demonstraram que o clone pAKHSDH1 está localizado no cromossomo 4 braço curto e o pAKHSDH2 no cromossomo 2 braço longo. Juntos, estes resultados demonstraram que em milho existem pelo menos três genes expressando subunidades da enzima AK-HSDH, sugerindo haver uma família de genes envolvida na codificação desta enzima (Muehlbauer et al., 1994c).

Até o momento, com exceção do gene *lysC* de *Escherichia coli*, nenhum outro gene que codifica para a isoforma da AK sensível à lisina foi clonado. Experimentos utilizando este gene e outros clonados codificadores para a isoforma bifuncional AK-HSDH como sonda, assim como anticorpos obtidos contra a isoforma sensível à lisina purificada de várias espécies, falharam em isolar este gene.

2.2.1. Estrutura dos genes e mecanismos de regulação gênica :

Análises da sequência de nucleotídeos dos genes da AK clonados revelaram a presença de sequências conservadas e relacionadas à síntese de aminoácidos. A sequência de aminoácidos **KFGG** (lisina-fenilalanina-glicina-glicina) é usualmente encontrada no começo da sequência codificante para AK, logo após o peptídeo sinal. Esta sequência foi encontrada sempre na porção do

gene codificante para AK e se observa em todos os genes de AK-HSDH clonados até o momento.

A sequência de aminoácidos **DPR** (aspartato-prolina-arginina) é encontrada na metade da região codificante para AK. Altamente conservada entre as AKs, é provavelmente responsável pela atividade de quinase, pois apresenta grande homologia com o domínio de quinase do gene da δ -glutamil quinase de *Escherichia coli* (Deutch et al., 1984; Ghislain et al., 1994). Outra sequência de aminoácidos conservada é **GXGXXG**, associada ao domínio de ligação do NADPH à proteína (Weisemann e Matthews, 1993; Omori et al., 1993; Ghislain et al., 1994).

Análises da sequência de nucleotídeos da região promotora do gene da AK-HSDH de *Arabidopsis thaliana* (Ghislain et al., 1994) revelaram a presença de TATA e CAAT “boxes”, nas posições 1 e -87, respectivamente. Putativos elementos *cis* de ligação de fatores de transcrição também foram encontrados para este gene. A sequência TGACTC foi encontrada a -181pb do TATA “box”, sendo um possível sítio de ligação do fator de transcrição tipo GCN4, caracterizado em leveduras como um regulador positivo de várias enzimas relacionadas à biossíntese de aminoácidos (Hinnebusch, 1988). Esta sequência também foi encontrada no gene da AK-HSDH clonado na própria levedura (Rafalski e Falco, 1988).

A sequência **GATGACGTGG** foi encontrada em *Arabidopsis thaliana* a -744 pb do TATA “box” caracterizada como um possível sítio de ligação para o fator de transcrição opaco-2, conhecido regulador da síntese das prolaminas de milho zeínas de 22 kDa, coordenadamente sintetizadas com enzimas da biossíntese de aminoácidos (Brocchetto-Braga, et al., 1992). A presença destas sequências de ligação do opaco-2 sugere que a expressão da AK-HSDH de *Arabidopsis thaliana* também possa estar sob o controle deste fator de transcrição.

Recentemente, foi demonstrado que o fator de transcrição *opaco-2* é capaz de controlar a expressão da forma citosólica da enzima Ortofosfato diquinase 1 (Maddaloni et al., 1996), uma enzima importante na fotossíntese de plantas C_4 e envolvida na biossíntese de aminoácidos por fornecer fosfoenolpiruvato, consumido durante este processo.

Nos estudos moleculares realizados em milho (Muehlbauer et al., 1994b,c), foram encontradas no domínio da HSDH dos clones de AK-HSDH, sequências de aminoácidos homólogas a certas sequências de proteínas regulatórias participantes de um sistema de regulação por fosforilação denominado módulos de transmissão, detectado em alguns procariotos (Parkison e Kofoid, 1992). Este sistema consiste de duas proteínas com domínios específicos que são fosforilados durante uma resposta adaptativa a um estímulo ambiental. Embora característico de procariotos, já havia sido proposto que este sistema existisse em plantas, nas proteínas de resposta à etileno denominadas *Etr1*, de *Arabidopsis thaliana* (Chang et al., 1993). Análises posteriores das sequências dos genes de AK-HSDH anteriormente clonados demonstraram que estas sequências também se encontravam presentes nestes genes, o que colabora para a idéia de que este venha a ser um mecanismo de regulação da atividade das enzimas AK-HSDH.

As descobertas destas sequências putativas de ligação dos fatores de transcrição *opaco-2* e *GCN4* nos promotores e regiões regulatórias dos genes da AK-HSDH, assim como as sequências associadas aos módulos de transmissão de procariotos, levam à especulações sobre um mecanismo geral presente na regulação destas enzimas, respondendo a estímulos externos e atuante de uma forma muito mais complexa do que antes imaginado.

2.3. Mutantes e plantas transgênicas no estudo do metabolismo de aminoácidos da via do ácido aspártico:

2.3.1. Mutantes vegetais :

Os estudos sobre mutantes de plantas com alterações no conteúdo dos aminoácidos da via metabólica do ácido aspártico foram iniciados em 1974, quando estudos em culturas de tecidos indicaram que o crescimento de embriões de vários cereais podia ser inibido pela presença de lisina e treonina no meio de cultura (Green e Philips, 1974). A inibição do crescimento podia ser revertida com a adição de metionina ou homoserina, sugerindo uma atuação complexa de lisina e treonina na regulação da biossíntese destes aminoácidos.

Desde então, vários cereais cujas metodologias de crescimento e regeneração *in vitro* estavam estabelecidas, passaram a ser alvo de intensos estudos para fins de obtenção e caracterização de mutantes com altos níveis de lisina e/ou treonina, com o intuito de se obter plantas com melhor valor nutritivo e compreender melhor a regulação da biossíntese destes aminoácidos.

Em milho, calos derivados de cultura de tecidos foram selecionados em meio de cultura com adição de lisina e treonina, após mutagênese induzida por azida sódica. Alguns mutantes resistentes deram origem à plantas estáveis como o mutante Ask1, primeiramente denominado Ltr1 e atualmente tratado como Ask1LT19. Este mutante apresenta níveis de treonina no endosperma aumentados em 75-100 vezes em relação ao normal (Hibberd e Green, 1982).

A caracterização bioquímica dos mutantes Ask1 demonstrou que o gene se encontra localizado no braço curto do cromossomo 7 (Azevedo et al., 1990). Foram obtidos duplos mutantes dos cruzamentos de Ask1 com mutantes de endosperma como o mutante Opaco-2, que demonstraram que a presença do gene mutado *ask1* levava a uma intensificação de efeitos ocasionados pelo Opaco-2,

como o acúmulo de amino ácidos solúveis e a redução da síntese de zeínas de 22 kDa (Azevedo et al., 1990). Estudos subsequentes demonstraram que o gene *ask1* codifica a isoforma da AK sensível à lisina, que no mutante Ask1 se encontra insensível a este aminoácido por causa de uma mutação (Dotson et al., 1990b).

Em 1990, outro mutante derivado de cultura de tecidos de milho foi obtido por seleção na presença de lisina e treonina no meio de cultura (Diedrick et al., 1990), denominado Ask2. Foi caracterizado como mutante de um segundo gene codificador para a enzima AK, *ask2*.

Estudos realizados nas progênies dos mutantes obtidos de milho demonstraram que estes dois genes mutantes, *ask1* e *ask2*, são responsáveis pela resistência à lisina e à treonina e conseqüente superprodução de treonina (Diedrick et al., 1990). Foi demonstrado também que a enzima AK purificada do endosperma dos mutantes Ask1 e Ask2 é menos sensível à inibição por lisina que a enzima purificada de plantas normais (Dotson et al., 1990b), confirmando os resultados anteriores.

Mutantes resistentes à lisina e treonina também foram obtidos em cenoura (Cattoir-Reynerats et al., 1983) e cevada (Bright et al., 1982a,b), por metodologia semelhante à utilizada em milho. Em cevada, os mutantes demonstraram conter formas das isoenzimas da AK menos sensíveis ou totalmente insensíveis à lisina (Arruda et al., 1984). Também em *Nicotiana sylvestris*, mutantes resistentes à lisina e treonina apresentaram acúmulo de treonina nas folhas e sementes das plantas regeneradas, e isoformas da AK menos sensíveis à lisina (Frankard et al., 1991).

Seleção de mutantes obtidos em meios contendo análogos de lisina, como a S-aminoetil-cisteína (AEC), tem sido um método utilizado para a obtenção de plantas com níveis de lisina alterados. Este tipo de estratégia já foi aplicada com sucesso em plantas como o milho (Azevedo e Arruda, 1995), o arroz (Schaeffer e

Sharpe, 1987) e *Nicotiana sylvestris* (Negrutiu et al., 1984). Embora este tipo de pressão de seleção tenha levado à alterações nos níveis de lisina encontrados nas folhas e sementes de algumas espécies estudadas, em outras, estes níveis não parecem ser alterados, como no caso da batata (Jacobsen, 1986). Em outras plantas a lisina é somente acumulada em tecidos vegetativos, como em *Pennisetum americanum*, que apresenta um aumento de 5-7 vezes nos níveis de lisina no caule e nas folhas (Boyes e Vasil, 1987). Normalmente estas alterações no conteúdo de lisina estão associadas com o aparecimento de características agrônômicas indesejáveis, tais como alteração na coloração das folhas, reduzida atividade fotossintética, diminuição no tamanho da semente e redução da fertilidade.

A resistência apresentada por alguns mutantes selecionados em meio contendo o análogo de lisina AEC está relacionada, na verdade, à uma menor absorção deste análogo pela célula do que à uma menor sensibilidade de suas enzimas. Este é o caso de alguns mutantes obtidos de cevada (Bright et al., 1979a), trigo (Kumpaisal et al., 1988), milho (Miao et al., 1988) e *Arabidopsis thaliana* (Vernaillen et al., 1985).

Plantas de *Nicotiana sylvestris* resistentes à seleção em meios contendo AEC apresentam reduzida inibição da atividade da enzima Dihidrodipicolinato Sintase (DHDPS) quando na presença de lisina (Negrutiu et al., 1984). Este trabalho forneceu mais uma evidência de que a DHDPS, juntamente com a AK, controla a síntese de lisina.

As análises de duplos mutantes obtidos do cruzamento de mutantes de *Nicotiana sylvestris* selecionados em meio com lisina e treonina (Frankard et al., 1991) com mutantes selecionados em meio com AEC (Negrutiu et al., 1984), demonstraram que o nível de lisina encontrado nas folhas foi aumentado em 20 vezes em relação às plantas normais. Os níveis de treonina e metionina

encontrados foram iguais ou menores do que o de plantas normais e dos mutantes parentais. Análises das atividades das enzimas AK e DHDPS nos duplos mutantes demonstraram que na presença de lisina estas enzimas tinham inibição máxima de suas atividades em torno de 50%. Contudo, os duplos mutantes apresentaram fenótipo anormal, com redução da área foliar e encurtamento da haste floral (Frankard et al., 1991).

2.3.2. Plantas Transgênicas :

Estudos recentes têm demonstrado que os níveis dos aminoácidos lisina e treonina podem ser modificados com a obtenção de plantas transgênicas expressando formas das enzimas AK e DHDPS de bactérias insensíveis à inibição por lisina.

O gene *dapA*, que codifica a enzima DHDPS de *Escherichia coli* (Richaud et al., 1986), foi utilizado para transformar tabaco e obter plantas com níveis de lisina mais altos (Shaul e Galili; 1992a). Esta enzima em bactérias possui menor sensibilidade à inibição por lisina do que a enzima de plantas. Plantas de tabaco foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com duas construções diferentes, ambas contendo o gene *dapA* e o promotor constitutivo 35S, porém só uma delas contendo um peptídeo sinal para cloroplastos. Análises das plantas transgênicas demonstraram níveis de lisina aumentados em 40 vezes nas folhas das plantas transformadas com a construção contendo o peptídeo sinal para cloroplastos. Nenhum aumento nos níveis de lisina foi observado nas plantas cuja construção não continha o peptídeo sinal, confirmando a localização intracelular desta enzima previamente determinada (Wallsgrave et al., 1983).

Seguindo esta estratégia, o mesmo grupo utilizou o gene *lysC* mutante de *Escherichia coli*, que codifica para uma forma da AK sensível à lisina, para transformar plantas de tabaco (Shaul e Galili, 1992b). Plantas transformadas com

o peptídeo sinal de cloroplastos na construção demonstraram um aumento de 2-9 vezes na quantidade de treonina solúvel nas folhas e quando crescidas em casa de vegetação apresentaram também aumento nos níveis de isoleucina e lisina (5,5 e 20,0 vezes, respectivamente). Estas plantas apresentaram porém, alterações como diminuição da área foliar, esterilidade parcial e atraso no florescimento. Plantas que tiveram a proteína direcionada ao citoplasma tiveram apenas um ligeiro aumento no nível de treonina e não apresentaram alterações morfológicas ou fisiológicas.

Em experimentos subsequentes, o mesmo grupo obteve plantas de tabaco co-expressando as duas enzimas AK e DHDPS bacterianas (Shaul e Galili, 1993). Isto foi feito através do cruzamento das plantas transgênicas anteriormente obtidas, que expressavam separadamente cada uma das enzimas. As plantas co-expressando as duas enzimas demonstraram possuir um nível de lisina nas folhas muito maior do que as plantas que expressavam somente a DHDPS bacteriana, demonstrando que a AK também participa efetivamente do controle dos níveis de lisina. O conteúdo de treonina destas plantas foi menor do que o das plantas expressando somente a AK bacteriana, mas ainda 2,5 vezes maior do que o de plantas normais. Estas plantas, assim como as que expressavam somente a DHDPS bacteriana, apresentaram fenótipo anormal, como morfologia foliar alterada, perda parcial da dominância apical e esterilidade parcial.

Outros grupos de pesquisadores seguiram utilizando estas mesmas estratégias. Glassman, (1992), utilizou o mesmo tipo de construção para transformar plantas de tabaco. O gene *dapA* foi fusionado a um fragmento de DNA codificando o peptídeo sinal e colocado sob controle do promotor constitutivo 35S. As plantas transformadas apresentaram um aumento de 100 vezes nos níveis de lisina nas folhas em relação às plantas normais, porém

também apresentaram alterações morfológicas como clorose nas regiões intravenais e dominância apical reduzida.

O gene *dapA* de *Escherichia coli* também foi utilizado para transformar plantas de batata via *Agrobacterium tumefaciens*, produzindo plantas com maior atividade da DHDPS e maior conteúdo de lisina, principalmente nas folhas (Perl et al., 1992). O aumento no conteúdo de lisina nas folhas foi de 5 vezes em relação a plantas não transformadas e nos tubérculos e raízes foi ainda menor. A explicação proposta para esta diferença em relação aos melhores resultados obtidos anteriormente em tabaco foi uma maior participação da AK na regulação dos níveis de lisina em batata, limitando a atuação da DHDPS. As plantas não apresentaram fenótipos anormais.

Em experimentos posteriores, foi utilizada uma nova estratégia envolvendo promotores tecido-específicos. Karchi et al. (1993) transformaram plantas de tabaco utilizando o gene *lysC* de *Escherichia coli* ligado a uma construção contendo, além do peptídeo sinal de cloroplastos, um promotor específico de sementes obtido do gene codificador das proteínas faseolinas de feijão. Plantas assim obtidas apresentaram um aumento de 14-17 vezes na quantidade de treonina solúvel e de 3 vezes na quantidade de metionina solúvel nas sementes. Nenhum aumento nos níveis de lisina foi obtido, nem características morfológicas anormais foram observadas.

Plantas transformadas com estes genes também foram obtidas em canola e soja, utilizando-se estratégia semelhante (Falco et al., 1995). O gene *dapA* de *Corynebacterium glutamicum* e o gene *lysC* mutado de *Escherichia coli*, ligados ao promotor de faseolinas (Slightom et al., 1983) e o peptídeo sinal de cloroplastos do gene da subunidade menor da Rubisco de soja (Berry-Lowe et al., 1982) foram utilizado para transformar, via *Agrobacterium tumefaciens*, plantas de canola. As plantas transformadas com o gene da DHDPS apresentaram um

aumento no conteúdo de lisina livre nas sementes em torno de 100 vezes. A transformação com o gene *lysC* mutado da AK de *Escherichia coli* também levou a um aumento nos níveis de treonina. Plantas transformadas co-expressando os dois genes não tiveram um aumento muito maior nos níveis de lisina como antes demonstrado em tabaco (Shaul e Galili, 1993). Interessantemente, estas plantas com maiores níveis de lisina também acumularam ácido α -aminoadípico e sacaropina, compostos provenientes da degradação de lisina, sugerindo que o controle dos níveis de lisina também é realizado pela via de degradação. Soja transformada via bombardeamento de partículas com as mesmas construções apresentou resultados semelhantes (Falco et al., 1995). Nenhuma das plantas apresentou fenótipo anormal, mas em canola uma diminuição na germinação das sementes foi constatada.

O fenótipo anormal constatado em plantas transgênicas e nos mutantes selecionados que acumulam lisina pode ser comparado às alterações apresentadas por mutantes anteriormente obtidos como o *opaco-2* e *b-32* de milho. Estes dois mutantes apresentam níveis mais altos de lisina no endosperma do que os milhos normais, porém também apresentam características agrônômicas desfavoráveis como alteração da morfologia foliar, reduzida capacidade de produção e endosperma mole suscetível ao ataque de fungos durante a estocagem do grão.

De alguma maneira o acúmulo de lisina parece exercer efeitos negativos no desenvolvimento normal de algumas partes da planta, sendo este um efeito específico de lisina, já que o aumento nos níveis de treonina não leva a este tipo de alteração. Efeitos semelhantes foram observados em algumas plantas transformadas com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes* e regeneradas (Schmulling et al., 1988) e no mutante resistente à auxina *axr-1* de *Arabidopsis thaliana* (Estelle e Somerville, 1987), o que leva à sugestão de que o efeito do

acúmulo de lisina esteja relacionado a atuação de reguladores de crescimento de plantas (Glassman, 1992).

3. OBJETIVOS:

Este trabalho teve como objetivo:

- Detectar a atividade das enzimas Aspartato Quinase e Homoserina Desidrogenase em arroz.
- Identificar e purificar parcialmente as isoenzimas da Aspartato Quinase e Homoserina Desidrogenase presentes nas sementes de arroz.
- Estabelecer subsídios sobre a regulação da síntese dos aminoácidos lisina e treonina nas sementes de arroz.
- Verificar se ambas as atividades da isoenzima da Aspartato Quinase sensível à treonina e Homoserina Desidrogenase sensível à treonina residem num polipeptídeo bifuncional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS :

4.1. Material Vegetal :

O material vegetal utilizado nos experimentos foi o arroz (*Oriza sativa*), plantado no campo experimental do Departamento de Genética, ESALQ-USP, em Piracicaba. As sementes plantadas pertencem à Coleção de Arroz do Departamento de Genética da ESALQ-USP, gentilmente cedidas pelo Prof. Akihiko Ando. A variedade utilizada foi o arroz de sequeiro IAC-165.

As sementes foram plantadas no campo, no início do verão de cada ano, em linhas de 50 m separadas por 25 cm (Figura 4.1). As plantas cresceram no campo, com irrigação quando necessário, até o florescimento e produção de sementes.

Após o florescimento, foram coletadas sementes em diferentes estágios de maturação. Três estágios foram estabelecidos para a coleta, denominados estágios 1, 2 e 3, respectivamente 7, 14 e 21 dias após o aparecimento das anteras (Figura 4.2). As sementes foram coletadas manualmente e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, ainda no campo e depois estocadas em freezer -70°C até o momento de sua utilização.

No caso da utilização de folhas e raízes nas análises, estas foram obtidas pelo do cultivo de plantas em vasos mantidos em casa de vegetação. As sementes

foram plantadas em substrato comercial, cerca de 40 sementes por vaso e as plantas molhadas todos os dias por irrigação automática. Após 20 dias de plantio as folhas e raízes foram coletadas manualmente, separadas do substrato com a ajuda de jato de água, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer - 70°C até a utilização.

4.2. Experimentos Preliminares

4.2.1. Extração das enzimas Aspartato Quinase (AK) e Homoserina Desidrogenase (HSDH):

4.2.1.1. Obtenção de extratos celulares:

Para a obtenção dos extratos celulares, o material vegetal foi homogeneizado em tampão de extração específico para cada uma das enzimas, conforme composição demonstrada a seguir, na proporção de 2ml de tampão de extração para 1g de tecido, em almofariz (folhas e raízes) ou em liquidificador (sementes). Antes da homogeneização, foi adicionado ao tampão o inibidor de compostos fenólicos PVPP (polivinilpirrolidona), marca Sigma, na proporção de 1g de PVPP para 10g de material. O extrato foi então filtrado em camada dupla de gaze, e centrifugado em centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-MC, a 4°C, 10.000 rpm, por 30 minutos para a remoção completa de remanescentes celulares. Foi utilizado o rotor JA-20 para tubos de aproximadamente 40ml de capacidade para extrações de pequena escala (50-100g) e o rotor JA-14 para garrafas de capacidade de 250ml para extrações de larga escala. O precipitado formado foi desprezado e o sobrenadante, denominado extrato bruto, recolhido.



Figura 4.1: **A** Aspecto da plantação de arroz variedade IAC-165 no campo experimental do Departamento de Genética, ESALQ-USP. **B** Panícula de arroz variedade IAC-165 florescendo.



Figura 4.2: **A** Panículas de arroz variedade IAC-165 nos estágios 1 e 2. **B** Panículas de arroz variedade IAC-165 no estágio 3.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DA AK:

	Concentração (mM)	g/l
Tris	50	6,055
KCl	200	14,91
EDTA	0.1	0,037
DTT	1	0,154
PMSF*	0.1	0,017
L-Lisina	2	0,365
L-Treonina	2	0,238
Glicerol	10%	100ml

O *pH* foi ajustado para 7,4 com a adição de HCl 2N.

* Dissolvido em 1ml de isopropanol, adicionado logo antes da extração.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DA HSDH:

	Concentração (mM)	g/l
Tris	50	6,055
DTT	2	0,308
EDTA	1	0,37
L-Treonina	5	0,595
Glicerol	10%	100ml

O *pH* foi ajustado para 7,5 com a adição de HCl 2N.

4.2.1.2. Precipitação com sulfato de amônio:

O sobrenadante obtido na primeira centrifugação foi submetido a precipitação com sulfato de amônio, marca Reagen, para a saturação de 60%. A adição do sulfato de amônio foi feita aos poucos, com agitação lenta em agitador magnético e no gelo. Após a dissolução de todo o sulfato de amônio, o extrato foi

mantido em agitação lenta por mais 30 minutos, em gelo, sendo depois novamente centrifugado por 30 minutos, a 10.000rpm e 4°C. Os precipitados obtidos foram armazenados em freezer -20°C até a utilização.

4.2.1.3. Dessalinização das amostras:

Os precipitados obtidos da extração das enzimas foram ressuspensos em tampão de eluição específico, de composição descrita a seguir (página 42). A quantidade de tampão utilizada foi a menor possível, apenas suficiente para ressuspender completamente os precipitados ao ponto de poderem ser passados nas colunas de Sephadex G-50, onde foram dessalinizados em seguida. Cada coluna foi montada de acordo com a quantidade de amostra a ser dessalinizada, quantidade esta que não ultrapassava 25% do volume total da coluna. As colunas depois de montadas foram equilibradas com o tampão de eluição específico da enzima, na quantidade de 3 vezes o volume total da coluna.

As proteínas eluídas foram monitoradas utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad) em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Em 1 ml de reagente diluído de acordo com instruções do fabricante, foi adicionada uma gota que saiu da coluna, acompanhando-se a coloração obtida. A proteína em contato com o reagente torna a solução azulada. Quanto maior a concentração de proteína, mais intensa é a coloração. Quando o reagente de Bradford, por avaliação visual, indicava a saída de proteína da coluna, iniciava-se a coleta da amostra. Todo esse processo foi conduzido a 4°C, com reagentes previamente gelados e em banho de gelo, diminuindo perdas na atividade da enzima. A amostra dessalinizada foi mantida em gelo e imediatamente utilizada.

TAMPÃO DE ELUIÇÃO DA AK

	Concentração (mM)	g/l
Tris	25	3,027
DTT	1	0,154
L-Lisina	0.1	0,018
L-Treonina	0.1	0,012
Glicerol	10%	100ml

O *pH* foi ajustado para 7,4 com a adição de HCl 2N.

TAMPÃO DE ELUIÇÃO DA HSDH:

	Concentração (mM)	g/l
Tris	25	3,027
DTT	1	0,154
EDTA	1	0,37
L-Treonina	0.1	0,017
Glicerol	10%	100ml

O *pH* foi ajustado para 7,5 com a adição de HCl 2N.

4.2.2. Ensaio enzimáticos da enzimas AK e HSDH:

4.2.2.1. Ensaio enzimático da AK:

O ensaio utilizado para medir a atividade da enzima AK foi baseado no ensaio do hidroxamato (Pechere e Capony, 1969). Neste ensaio, a hidroxilamina presente é convertida a hidroxamato ao reagir com o acil-fosfato, formado pela reação da enzima na fosforilação do aspartato. O hidroxamato presente pode então ser medido por espectrofotometria a 505nm, fornecendo indiretamente a atividade da enzima.

Nos experimentos preliminares, foi utilizada a metodologia de ensaio da AK desenvolvida para células de milho em suspensão (Azevedo et al, 1992a). Após a otimização da metodologia de extração e ensaio da AK em arroz, alguns detalhes do ensaio foram modificados. Pela metodologia descrita para milho inicialmente utilizada, para cada fração da enzima analisada foram feitos um Branco, um Controle, e Tratamentos que incluem na solução de ensaio os aminoácidos L-lisina e L-treonina, juntos e separadamente, na concentração final de 5mM. A seguir estão demonstradas as concentrações finais e os volumes das soluções utilizadas nos ensaios:

Solução	Composição	Volume
AK1:	Tampão Tris 20mM, DTT 0.25mM, glicerol 20% <i>pH</i> 7,4	(100µl)
AK2:	Aspartato 50mM <i>pH</i> 7,4	(100µl)
AK3:	MgSO ₄ 12.5mM	(50µl)
AK4:	Hidroxilamina 4M <i>pH</i> 7,4	(50µl)
AK5:	ATP 20mM <i>pH</i> 7,4	(50µl)
Enzima:		(100µl)
Solução ácida de cloreto férrico:	FeCl ₃ 0.37M, HCl 0.67M, TCA 20%	(500µl)

Para o Branco, o aspartato foi substituído por água destilada. Aos Controles e Brancos foram adicionados 50µl de água destilada e aos tratamentos com aminoácidos, o mesmo volume da solução do aminoácido em questão para a concentração final de 5mM, tendo o ensaio um volume final de 500µl. A reação foi iniciada com a adição do ATP. As frações foram encubadas a 35°C por 1 hora, e a reação paralisada pela adição de 500µl de solução ácida de cloreto férrico. As leituras foram feitas em cubetas descartáveis de poliestireno da marca Sarstedt, em

espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 a 505nm. Os ensaios foram feitos em duplicata, e a média das absorbâncias foi utilizada para o cálculo da atividade da enzima.

4.2.2.2. Cálculo da atividade da AK:

A atividade da AK durante todos os experimentos foi calculada em nkatal, que representa a atividade necessária para converter um nmol do substrato aspartato por segundo. Para calcular a atividade, uma curva padrão de hidroxamato foi feita, e a partir dela foi possível calcular a quantidade de hidroxamato formada na reação baseada na absorbância obtida no ensaio. A curva padrão foi feita com as soluções de DL-aspartato- β -hidroxamato nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM, lidas em espectrofotômetro a 505nm. 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 nkatal foi obtida dividindo-se a quantidade de mM de hidroxamato formados pela quantidade de proteína da fração testada (determinada conforme explicado a seguir) e pelo tempo de ensaio em segundos.

4.2.2.3. Ensaio enzimático da HSDH:

A atividade da HSDH foi medida pela formação do NADPH na reação reversa da enzima. A enzima tem como substrato a homoserina, levando à formação do aspartato semialdeído, utilizando o NADP⁺ como co-fator. O ensaio foi baseado em Matthews et al. (1989), adaptado por Azevedo et al. (1992a). O ensaio é composto das seguintes soluções, nas seguintes concentrações finais e num volume final de 1ml:

Solução	Composição	Volume
HSDH1:	Tris-HCl [100mM], KCl [150mM], EDTA [0,5mM], DTT [1mM] <i>pH</i> 9,0;	700µl
HSDH2:	NADP ⁺ [0,48mM]	100µl
HSDH3:	Homoserina [20mM]	100µl
Enzima:		100µl
Treonina [5mM]:		10µl

Para cada fração da enzima analisada foi feito um ensaio contendo um Branco, um Controle, e também um Tratamento com o aminoácido L-treonina na concentração final de 5mM. Para o Controle, foram utilizados 700µl de HSDH1, 100µl de HSDH2, 100µl HSDH3 e 100µl da enzima, colocados diretamente em cubetas descartáveis de poliestireno. Para o Tratamento, as mesmas soluções e quantidades foram utilizadas, porém foram acrescentados 10µl da solução estoque de L-treonina, para uma concentração final de 5mM. Para o Branco seguiu-se o mesmo padrão, porém a homoserina foi substituída por 100µl de água destilada.

A reação foi iniciada com a adição do NADP⁺. As leituras de absorbância foram feitas logo a seguir em espectrofotômetro Beckman modelo DU-640, no comprimento de onda de 340nm. Depois de zerar o equipamento com o Branco, o Controle e o Tratamento foram medidos (Tempo 0) e logo após todos foram encubados em banho-maria a 32°C por 30 minutos. Depois deste tempo, o Branco foi novamente utilizado para zerar o espectrofotômetro e em seguida os Controles e Tratamentos (Tempo final) foram medidos.

4.2.2.4. Cálculo da atividade da HSDH :

Para calcular a atividade da HSDH foi levada em conta a diferença entre a absorbância obtida no Tempo inicial (Ti) e no Tempo final (Tf) de incubação. Para cada fração o ensaio foi feito em duplicata e a média das absorbâncias obtidas foi usada para calcular a atividade. Cada nmol de NADPH formado significa um aumento de 0.00622 na absorbância a 340nm. O número de nmoles 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 nmoles de NADPH formados por minuto. Este valor foi dividido pela quantidade de proteína da amostra, previamente determinada como explicado a seguir, obtendo-se a atividade específica em $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$.

4.2.2.5. Determinação da quantidade de proteína presente na amostra:

A quantidade de proteína foi calculada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar a quantidade de proteína das frações, 20 μl das mesmas foram adicionados a 1ml do reagente diluído de acordo com a especificação do fabricante. Para o Branco, foram adicionados 20 μl de tampão de eluição da enzima em questão a 1ml do reagente. Cubetas de poliestireno descartáveis foram utilizadas para a leitura da absorbância, em espectrofotômetro, a 595nm. Para cada reagente preparado (diluído) uma curva padrão foi feita usando-se a proteína Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão e a partir dela calculou-se a concentração de proteínas das amostras.

Para a obtenção da curva padrão, uma solução estoque de BSA na concentração de 1mg/ml foi usada para a preparação de soluções 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8mg/ml de BSA. Estas soluções, assim como a solução estoque (1mg/ml), foram medidas pelo método de Bradford. Os resultados foram plotados em gráfico mg/ml

x absorvância, a regressão linear foi calculada, e a reta traçada. Estes valores foram então utilizados como referência para determinar a quantidade de proteína.

Para cada fração a ser analisada quanto a quantidade de proteína foram feitas duas medidas conforme explicado, sendo a média das absorvâncias utilizada para calcular a quantidade de proteína de acordo com a curva padrão. Para uma melhor adequação dos valores de absorvância à curva padrão traçada, as amostras foram diluídas na proporção necessária para que os valores de absorvância ficassem entre 0,15-0,35 e esta diluição foi levada em conta na determinação da quantidade de miligramas de proteína por mililitros de fração.

4.2.3. Determinação da atividade das enzimas AK e HSDH em diferentes tecidos de arroz:

Para conhecer a distribuição das enzimas AK e HSDH na planta de arroz, foram feitas extrações destas enzimas utilizando sementes (50g), raízes (30g) e folhas (50g), obtidos conforme explicado anteriormente. Para este experimento, o estágio de desenvolvimento do endosperma escolhido foi o estágio intermediário 2, e as raízes e folhas de plantas de 20 dias. A extração e o ensaio seguiram a metodologia anteriormente apresentada.

4.2.4. Determinação da atividade da AK e HSDH em diferentes estágios de maturação da semente de arroz:

Amostras de sementes dos três estágios foram usadas para a extração das enzimas AK e HSDH, seguida de ensaio para atividade, conforme descrito anteriormente, com o fim de se determinar o estágio com melhor atividade para ser utilizado nos experimentos seguintes. Para a extração, 30g de sementes de cada estágio foram utilizados para cada enzima. A extração e o ensaio seguiram a metodologia proposta para milho, anteriormente apresentada.

4.2.5. Otimização da metodologia de extração das enzimas AK e HSDH:

4.2.5.1. Fracionamento em sulfato de amônio:

Para determinar qual a faixa de saturação de sulfato de amônio em que as duas enzimas podiam ter suas atividades recuperadas, um experimento de fracionamento com sulfato de amônio foi realizado para cada uma delas separadamente.

Neste experimento, foram utilizados 100g de sementes imaturas de arroz no estágio 2, para a extração de cada uma das enzimas. A obtenção dos extratos celulares foi feita como anteriormente descrito. Após a obtenção do extrato bruto de cada enzima, estes foram divididos em duas partes iguais, que foram precipitadas em diferentes faixas de saturação com sulfato de amônio. Uma delas foi precipitada entre as faixas de saturação de 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% de sulfato de amônio. A outra parte foi precipitada entre as faixas de saturação de 0-30%, 30-50% e 50-70%. Cada precipitado obtido em cada faixa de saturação foi dessalinizado em colunas de Sephadex G-50 e a atividade foi determinada como descrito anteriormente.

4.2.6. Otimização da metodologia de ensaio da AK:

Para determinar as condições ideais para o ensaio da atividade da enzima AK em arroz, testes foram realizados variando-se as condições de ensaio estabelecidas para milho, até ficarem estabelecidas as melhores para arroz. A fração de enzima utilizada nos experimentos de otimização foi obtida em uma extração de 50g de sementes imaturas de arroz do estágio 2, precipitada para uma saturação de 60% de sulfato de amônio e dessalinizada em coluna de Sephadex G-50.

4.2.6.1. Determinação do melhor tipo de Branco no ensaio:

Para que a atividade da enzima seja medida por espectrofotometria, é necessário que um Branco seja estabelecido, para que possa ser interpretado pelo espectrofotômetro como a absorvância zero a partir da qual devem ser feitas as medidas. Para tal, foram testados cinco tipos de Brancos, como descrito a seguir:

1) **Branco sem aspartato:** Este Branco foi feito de acordo com o estabelecido para o ensaio de milho. A ele não foi adicionado o substrato da enzima, o aspartato. Todos os demais componentes do ensaio foram adicionados conforme o ensaio padrão para milho.

2) **Branco sem ATP:** A este Branco não foi adicionado o ATP. Todos os demais componentes do ensaio foram adicionados conforme o ensaio padrão para milho.

3) **Branco T0 para enzima:** A este Branco a enzima só foi adicionada após o tempo de incubação, imediatamente antes da adição do cloreto férrico, não permitindo que houvesse tempo para a reação da enzima. Todos os demais componentes do ensaio foram adicionados conforme o ensaio padrão para milho.

4) **Branco T0 para ATP:** A este Branco o ATP só foi adicionado depois do tempo de incubação, imediatamente antes da adição do cloreto férrico, não permitindo que houvesse tempo para a reação da enzima. Todos os demais componentes do ensaio foram adicionados conforme o ensaio padrão para milho.

5) **Branco T0 para aspartato:** A este Branco o aspartato só foi adicionado depois do tempo de incubação, imediatamente antes da adição do cloreto férrico, não

permitindo que houvesse tempo para a reação da enzima. Todos os demais componentes do ensaio foram adicionados conforme o ensaio padrão para milho.

Um ensaio Controle utilizando as condições estabelecidas para milho foi realizado. Esse Controle foi medido utilizando os diferentes Brancos para a constatação das diferenças obtidas com cada um.

4.2.6.2. Determinação da melhor concentração de substrato e tempo de ensaio:

A concentração de aspartato no ensaio é fator crítico na atividade da enzima. Para que seja obtido o máximo de atividade possível, o aspartato deve estar em concentração saturante para que possa ser utilizado sem restrições. Por outro lado, um excesso de aspartato no ensaio pode ocasionar uma reação deste com o hidroxamato independente da atividade da enzima, levando à uma absorbância que não reflete a verdadeira atividade catalítica. Para testar a melhor concentração de aspartato a ser utilizada, ensaios de atividade da AK foram encubados por diferentes intervalos de tempo e com diferentes concentrações de aspartato.

Foram testadas as concentrações finais no ensaio de 50mM, 100mM e 250mM de aspartato e os ensaios foram encubados durante 1h e 30 minutos, a 35°C, e lidos em espectrofotômetro a 505nm em intervalos de 30 em 30 minutos. Foram feitos três Controles e três Brancos, referentes a cada concentração de aspartato testada, um para cada tempo. Os Controles tiveram suas atividades medidas de acordo com o Branco da concentração correspondente, com o fim de eliminar um possível efeito de altas concentrações de aspartato na absorbância.

4.2.6.3. Determinação da interferência de aminoácidos sobre a atividade da AK:

Foram realizados ensaios de atividade da AK incluindo Tratamentos com a presença de aminoácidos em diversas concentrações, para se determinar a interferência destes aminoácidos na atividade da enzima. Os aminoácidos testados foram: L-lisina, L-treonina, L-metionina, L-valina e L-lisina + L-treonina, nas concentrações finais de 1mM, 2mM, 5mM e 10mM. O ensaio foi conduzido a 35°C, durante 30 minutos. Para eliminar interferências causadas pelos próprios aminoácidos na absorvância, cada tratamento teve o seu Branco com a adição do aminoácido correspondente na maior concentração (10mM). Os ensaios foram feitos em duplicata e a média das absorvâncias foi utilizada para calcular a atividade da enzima.

4.2.6.4. Determinação da melhor faixa de *pH* para a atividade da AK de arroz:

Com o intuito de determinar qual a melhor faixa de *pH* a ser utilizada nos ensaios enzimáticos, o ensaio Controle padrão estabelecido para milho foi realizado em diferentes *pH*: 6,8; 7,1; 7,4; 7,7; e 8,0. Para estes ensaios, as soluções do tampão (AK1), de ATP (AK4), de aspartato (AK2) e de hidroxilamina (AK5), tiveram o *pH* ajustado para cada um dos valores de *pH*. As concentrações dos componentes do ensaio permaneceram inalteradas. Os ensaios foram feitos em duplicata e encubados por 60 minutos a 35°C, sendo depois lidos a 505nm. O Branco utilizado foi feito de acordo com o padrão do ensaio de milho (*pH* 7,4). As médias das absorvâncias foram usadas como resultado final.

4.2.6.5. Determinação da melhor concentração de ATP e Mg^{++} a ser utilizada nos ensaios enzimáticos:

As concentrações de magnésio ($MgSO_4$) e ATP do ensaio da AK foram variadas com o intuito de determinar qual a melhor proporção Mg^{++}/ATP para a realização dos ensaios enzimáticos. As concentrações finais no ensaio de 0; 2,0; 6,25; 12,5 e 25,0mM de Mg^{++} e de 0; 5; 10; 20 e 40mM de ATP foram testadas separadamente e em combinações entre si. Os demais componentes do ensaio permaneceram inalterados. Os ensaios Controles foram feitos em duplicata, encubados a 35°C durante 60 minutos e lidos em espectrofotômetro a 505nm. O Branco foi feito de acordo com o ensaio padrão de milho (12,5mM Mg^{++} e 20mM ATP). As médias das absorvâncias foram utilizadas para a obtenção dos resultados finais.

4.2.6.6. Determinação da melhor concentração de hidroxilamina a ser utilizada nos ensaios enzimáticos:

Para a determinação da melhor concentração de hidroxilamina a ser utilizada nos ensaios enzimáticos, foram realizados ensaios Controle para a atividade da AK variando-se a concentração de hidroxilamina presente. As seguintes concentrações finais no ensaio foram testadas: 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600mM. Os ensaios foram feitos em duplicata, encubados a 35°C e lidos a 505nm em espectrofotômetro. O Branco foi feito de acordo com o ensaio padrão para milho, com uma concentração final no ensaio de 400mM de hidroxilamina. As médias das absorvâncias obtidas para cada concentração foram utilizadas para a obtenção do resultado final.

4.2.6.7. Determinação da melhor temperatura de ensaio:

Para determinar qual a melhor temperatura de incubação para a atividade da AK de arroz, ensaios Controles foram feitos e incubados nas temperaturas de 25, 30, 35, 45 e 55°C, por 60 minutos e depois lidos a 505nm. Para cada temperatura foram feitos dois ensaios Controle e um Branco e as médias das absorbâncias foram utilizadas como resultado final.

4.2.6.8. Determinação do efeito da concentração de KCl na atividade da AK de arroz:

Devido à necessidade de utilização de tampões com altas concentrações de KCl em experimentos com resinas de troca iônica, a possível interferência dos íons K^+ na atividade da AK foi verificada. Para isso, o tampão AK1, componente do ensaio e normalmente sem KCl, foi substituído em ensaios controle por tampões das seguintes concentrações de KCl: 0, 100, 200, 300, 400 e 500mM. Os demais componentes do ensaio permaneceram inalterados. Os ensaios foram feitos em duplicata, incubados a 35°C por 60 minutos e lidos a 505nm. O Branco foi feito com tampão sem KCl.

4.2.7. Cromatografia de troca iônica:

Para proceder à purificação da AK, foi realizada a cromatografia de troca iônica com colunas de resina de troca aniônica FFQ-Sepharose, da marca Sigma. Esta resina é fornecida em solução 20% de etanol e antes de ser utilizada foi lavada em água deionizada por várias vezes, com o fim de retirar todo o etanol remanescente.

Depois de lavada, a resina de FFQ foi empacotada em coluna de vidro com auxílio de bomba peristáltica em fluxo de 2ml/minuto. Após completo

empacotamento da resina, esta foi equilibrada com tampão de eluição da AK e então mantida em geladeira até o momento do uso.

4.2.7.1. Eluição do tipo “Step-Wise” da enzima AK:

Na eluição do tipo “Step-Wise”, foram utilizadas amostras da enzima AK provenientes de extrações de 250g de sementes imaturas no estágio 2, precipitadas com sulfato de amônio para uma saturação de 60% e dessalinizadas em colunas de Sephadex G-50.

A amostra foi aplicada à coluna de troca iônica FFQ Sepharose de 2,5 x 8 cm, equilibrada com tampão de eluição sem KCl, com o auxílio de bomba peristáltica em fluxo de 2ml/minuto. Após a aplicação de toda a amostra, a coluna foi lavada com 3 volumes do mesmo tampão de eluição sem KCl com o qual foi equilibrada (3 vezes o volume da coluna), com o fim de retirar da coluna todo o material que não tenha se ligado, denominado fração não ligante. A fração não ligante foi coletada em tubo mantido em gelo, e uma alíquota foi congelada em freezer para análise posterior. Todas as eluições utilizando colunas de troca iônica foram realizadas a 4-10°C, com auxílio do equipamento de cromatografia de baixa pressão Econo-System da Bio-Rad, constituído por bomba peristáltica digital de fluxo programável, monitor detetor de absorbância a 280 nm e registrador ligado ao monitor, que permite um acompanhamento da saída de proteínas da coluna. Todo o processo de aplicação e lavagem da fração não ligante da coluna foi acompanhado pelo monitor de absorbância a 280nm. Pelo monitor é possível determinar em que momento, desde a aplicação da amostra, o excesso de proteína ou fração não ligante começa a sair, determinando assim o volume interno da coluna.

Depois da proteína estar ligada à coluna e toda a fração não ligante ter sido removida, foi iniciada a eluição “Step-Wise”. Ao tampão de eluição normalmente utilizado foi adicionado KCl para a obtenção dos tampões nas seguintes

concentrações crescentes de KCl: 100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 500mM e 1M. Estes tampões foram aplicados um de cada vez à coluna, na ordem crescente de concentração e as frações de cada uma destas aplicações coletadas e mantidas em gelo. As eluições foram feitas com um fluxo de 2ml/minuto e as amostras foram retiradas a cada 2 minutos, num total de 4ml por amostra. Foram aplicados 40 ml de cada tampão, num total de 10 amostras coletadas para cada tampão aplicado, sendo 60 amostras coletadas.

As frações foram testadas para atividade Controle de AK e HSDH. Frações com atividade Controle de HSDH foram testadas para o Tratamentos com L-treonina (5mM). Os ensaios seguiram a metodologia anteriormente descrita.

A absorbância a 280nm de todas as frações foi medida em cubeta de quartzo, utilizando como branco o tampão de eluição da enzima sem KCl.

4.2.7.2. Eluição do tipo Gradiente Linear de KCl da enzima AK:

A AK foi extraída a partir de 250g de sementes imaturas de arroz, com precipitação com sulfato de amônio para a saturação de 60% e dessalinizadas em colunas de Sephadex G50. A coluna de FFQ foi montada com 2,5 x 12 cm, e equilibrada com tampão de eluição sem KCl. A aplicação da amostra e lavagem da fração não ligante foram feitas como descrito anteriormente.

Após a saída de toda a fração não ligante, o gradiente foi iniciado empregando-se um sistema de dois reservatórios interligados (“gradiente maker”), um contendo 150ml de tampão de eluição sem KCl e outro contendo 150ml de tampão 500mM de KCl. O fluxo de eluição foi de 2ml/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 de tampão correspondente ao volume interno da coluna, num total de 75 frações de 4ml cada, coletadas e mantidas em gelo.

As frações foram testadas para a atividade Controle de AK. Frações com atividade foram testadas para atividade de AK Controle e Tratamentos com L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina na concentração final no ensaio de 5mM. Todas as frações também foram testadas para a atividade da HSDH Controle e Tratamento treonina 5mM. Os ensaios foram feitos de acordo com a metodologia anteriormente descrita.

4.3. Protocolo final de purificação parcial da AK:

Após a otimização da metodologia de extração e ensaio, foi possível elaborar o protocolo final visando a purificação parcial da enzima.

4.3.1. Extração da enzima:

O tecido vegetal utilizado nas análises foi a semente de arroz no estágio 1 de desenvolvimento. Para a extração da enzima, sementes congeladas de arroz foram homogeneizadas com tampão de extração em liquidificador doméstico, em geladeira. A quantidade de sementes e o volume de tampão utilizados foram padronizados para 500g e 1000ml, respectivamente. Após homogeneização rápida no liquidificador, suficiente para a quebra do endosperma e o contato do material de reserva com o tampão, o extrato foi filtrado em camada dupla de gaze em peneira para um becker mantido em gelo, com ajuda de pistilo para ajudar a extração do material de reserva.

Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado em centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-MC, rotor JA-14, 10.000 rpm, por 30 minutos a 4°C. Os precipitados foram desprezados e o sobrenadante, ou extrato bruto, mantido em gelo. Uma alíquota de 1ml do extrato bruto foi congelada em freezer -20°C para análises posteriores.

Para a separação das proteínas do sobrenadante, utilizou-se a precipitação de proteínas com sulfato de amônio para uma saturação na faixa de 20-50%. Ao sobrenadante mantido em gelo, foi adicionado vagorosamente sulfato de amônio, para saturação a 20%, com agitação lenta. Após completa solubilização do sulfato de amônio, o sobrenadante foi mantido nesta agitação por mais 30 minutos e depois novamente centrifugado, durante 30 minutos, 10.000 rpm e a 4°C. Os precipitados obtidos foram desprezados e o sobrenadante já saturado a 20% foi utilizado para saturação até 50%. O volume de sobrenadante obtido foi medido e utilizado para calcular a quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para uma saturação a 50%. A adição do sulfato de amônio ao sobrenadante foi feita da mesma maneira. Após completa solubilização e mais 30 minutos de agitação lenta foi feita uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante obtido foi desprezado e os precipitados contendo as proteínas congelados em freezer -20°C até a utilização.

4.3.2. Dessalinização em coluna de filtração em gel Sephadex G-50 :

Para a remoção do sulfato de amônio usado para a precipitação, a proteína obtida foi passada em coluna de filtração em gel, Sephadex G-50 20x2,5cm.

As colunas foram equilibradas com 300 ml do tampão de eluição cada uma e mantidas a 4°C. Cada precipitado obtido da extração foi ressuspenso em 6 ml de tampão de eluição aplicado nas colunas. A eluição da proteína foi monitorada usando o reagente de Bradford (Bio-Rad) em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, a 4°C. A amostra dessalinizada foi mantida em gelo até a utilização, logo a seguir.

4.3.3. Cromatografia de troca iônica :

O passo seguinte na purificação da enzima AK foi a cromatografia de troca iônica, em resina de troca aniônica FFQ-Sepharose. Uma coluna de 12x2,5cm foi empacotada e equilibrada com o tampão de eluição da enzima sem KCl. Toda a eluição utilizando colunas de troca iônica foi realizada com auxílio do equipamento de cromatografia de baixa pressão Econo-System da Bio-Rad. Todo o processo foi realizado em geladeira a 4-10°C.

Após a aplicação da amostra, foi feita a eluição da fração não ligante, como descrito anteriormente. Após a remoção desta fração a coluna foi lavada com 200ml de tampão de eluição adicionado de KCl para uma concentração de 100mM, com o fim de retirar todas as proteínas da coluna que podiam ser eluídas com até 100mM de KCl. Em seguida foi realizado um gradiente linear de 100-350mM de KCl, conforme anteriormente explicado. O fluxo utilizado também foi de 2ml/min e 75 frações, de 4ml cada uma, foram coletadas. Estas frações foram testadas para a atividade de AK Controle e de HSDH Controle. As frações com atividade de AK foram testadas também para os Tratamentos L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina na concentração final de 5mM. As que apresentaram atividade de HSDH também foram testadas para o Tratamento com L-treonina na concentração final de 5mM. Os ensaios da AK foram realizados a 35°C, por 30 minutos, com 100mM de aspartato e utilizando o Branco T0 para enzima. Os ensaios da HSDH foram feitos como anteriormente mencionado.

A absorbância a 280nm de todas as frações foi medida em cubeta de quartzo, utilizando como branco o tampão de eluição da enzima sem KCl.

4.3.4. Filtração em gel em coluna de Sephacryl S200 para purificação e determinação de peso molecular :

As amostras que apresentaram alta atividade do gradiente 100-350mM KCl foram utilizadas em experimentos em coluna de cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Sephacryl S200 da marca Pharmacia. As amostras com atividade de AK da etapa anterior foram precipitadas com sulfato de amônio a 70% de saturação e centrifugadas, rotor JA-20, a 10.000 rpm, a 4°C, por 30 minutos, para precipitação das proteínas contidas no extrato.

O precipitado foi ressuspendido em tampão de eluição até o volume de 3,5ml e aplicado em colunas de Sephadex G-50, de volume total de 15ml. Dos 7ml resultantes da dessalinização, 2ml foram alíquotados para análise posterior e guardados em freezer -20°C. Os outros 5ml foram aplicados em uma coluna de filtração em gel Sephacryl S200 de 2,5 x 83,2cm, previamente equilibrada com o mesmo tampão de eluição. As proteínas foram eluídas da coluna com auxílio de bomba peristáltica usando um fluxo de 0,7ml/minuto. Foram coletadas 60 frações de 3,7ml com auxílio de coletor de frações.

Todo o processo de eluição foi feito com a coluna em geladeira expositora à temperatura média de 5°C. A coluna foi previamente calibrada exatamente nestas mesmas condições, com tampão Tris-HCl *pH* 8,0 contendo 50mM de KCl, 10% de glicerol e 1mM de DTT. A coluna foi calibrada com o seguinte conjunto de marcadores de peso molecular: Azul de Dextrano (2000 kDa), Catalase (232 kDa), Soroalbumina Bovina (67 kDa), Quimiotripsina A (25 kDa) e Ribonuclease A (13,7 kDa).

As frações foram mantidas em gelo, e as atividades enzimáticas ensaiadas em seguida. Para as frações com atividade, foram realizados além do Controle, ensaios com os tratamentos com L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina,

conforme descrito anteriormente. O ensaio foi realizado a 35°C, por 1 hora, usando-se 100µl de enzima e 100mM de aspartato. As frações também foram testadas para a atividade da enzima HSDH Controle e Tratamento L-treonina.

Os valores dos pesos moleculares das enzimas foram obtidos pela inferência do volume de eluição da enzima em relação aos volumes obtidos pelos padrões através de regressão linear.

4.3.5. Tabela de purificação parcial da AK de endospermas de arroz:

As frações obtidas durante o processo de purificação parcial da AK foram testadas para a atividade Controle e Tratamentos das duas enzimas, AK e HSDH. Todos os volumes de cada passo da purificação foram anotados. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford, conforme anteriormente, descrito para a determinação da atividade específica obtida em cada passo. Estes valores foram utilizados para montar a tabela de purificação da enzima AK.

4.4. Eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturantes :

4.4.1. Eletroforese das frações resultantes da purificação:

As frações obtidas durante o processo de purificação parcial da enzima AK foram submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturantes. Foram feitos quatro géis contendo as seguintes amostras cada um:

- 1) Frações representando o gradiente 0-500 mM KCl
- 2) Frações representando o gradiente 100-300mM KCl
- 3) Frações representando Sephacryl S200
- 4) Frações extrato bruto, Sephadex G50, frações com atividade combinadas da FFQ e frações com atividade combinadas da Sephacryl S200.

O sistema utilizado foi o de eletroforese vertical da Bio Rad, modelo Protean II xi cell (20 x 20cm) tendo o gel 0,75cm de espessura. Os géis foram preparados de acordo com o sistema de eletroforese descontínua estabelecido por Laemmli (1970). O gel de resolução teve concentração de 10% de acrilamida e o gel de empacotamento teve concentração de 4% acrilamida. As soluções estoque para o preparo dos géis estão apresentadas a seguir.

SOLUÇÕES ESTOQUE PARA O PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA NÃO-DENATURANTES

SOLUÇÃO A

Tampão do gel de resolução (Gel inferior):

36,3g Tris, marca Gibco-BRL

ajustado para o *pH* 8,9 com HCl

Água destilada q.s.p. 100ml

SOLUÇÃO B

Tampão do gel de empacotamento (Gel Superior):

6g Tris, marca Gibco-BRL

ajustado para *pH* 6,7 com HCl

Água destilada q.s.p. 100ml

Tampão de amostra:

1ml do tampão do gel de empacotamento

1ml de Glicerol, marca Synth

1ml de solução de azul de bromofenol, marca Sigma
preparada diariamente

Tampão de corrida (5x concentrado):

15,2g Tris marca, Gibco-BRL

72,0g Glicina, marca Sigma

ajustado para *pH* 8,3 com HCl 1M

Água destilada q.s.p. 1l

SOLUÇÃO C

38,9g acrilamida, marca Sigma

1,1g bis-acrilamida, marca Sigma

Água destilada q.s.p. 100ml

Persulfato de amônio :

100mg persulfato de amônio, marca Sigma

Água destilada q.s.p 1ml

preparado diariamente

Todo o material utilizado, como placas de vidro, pentes e espaçadores, foi cuidadosamente lavado e limpo com etanol antes da montagem dos géis. Para a montagem do gel inferior (resolução), as soluções estoque foram pipetadas nas quantidades apresentadas a seguir (página 70) e cuidadosamente misturadas para evitar a formação de bolhas. O gel foi aplicado nas placas já montadas. Em seguida foi colocada uma fina camada de isopropanol sobre a solução do gel montado, ainda não polimerizado. Após a polimerização, o isopropanol foi retirado com a ajuda de papel de filtro, e o gel lavado com água destilada. O gel superior (empilhamento) foi montado de maneira semelhante ao gel de resolução. O número de canaletas do pente utilizado dependeu do número de amostras a serem analisadas por gel.

Gel Inferior:

12,5ml Solução A
12,5ml Solução C
25,0ml água destilada
95 μ l TEMED
125 μ l Persulfato de amônio

Gel Superior:

5,0ml Solução B
2,0ml Solução C
11,0ml água destilada
40 μ l TEMED
75 μ l Persulfato de amônio

Após a completa polimerização do gel superior o pente foi retirado e a aplicação das amostras foi feita com auxílio de microponteiras da marca Bio-Rad. Foram aplicados em cada canaleta 60 μ l de amostra já misturada ao tampão de amostra na proporção de 1:1. Os marcadores de peso molecular, quando utilizados, foram comprados da Sigma, kit MW-ND-500, diluídos em tampão de amostra na proporção de 1:1. Foram eles: Urease (272 kDa o trímero e 545 kDa o hexâmero), Soroalbumina bovina (66 kDa o monômero e 132 kDa o dímero) e Ovoalbumina (45 kDa). Foram aplicados 20 μ l da solução de marcadores de peso molecular em cada gel.

A corrida do gel foi realizada a corrente constante de 30mA por gel, em geladeira, utilizando-se uma fonte Bio-Rad modelo 1000/500 até que o azul de

bromofenol chegasse ao final do gel. Neste momento os géis foram retirados das placas com ajuda de espátula e a coloração pelo método desejado iniciada.

4.4.2. Coloração dos géis de poliacrilamida não desnaturantes:

Os géis foram corados pelo método de prata de acordo com a metodologia descrita por Gomes (1995). As soluções utilizadas estão apresentadas a seguir. Após a corrida, cada gel foi transferido para uma bandeja plástica contendo a solução fixadora e mantido à temperatura ambiente por 12 horas. Passadas 12 horas na solução fixadora, o gel foi transferido para a solução incubadora e deixado por 15 minutos. O gel foi então lavado por três vezes em 250ml de água deionizada por 10 minutos, com agitação constante. Procedidas as lavagens, o gel foi transferido para 250ml da solução de prata por 20 minutos e então transferido para 250ml da solução reveladora até a revelação das bandas. A reação foi paralisada pela adição de 250ml da solução fixadora final, seguindo-se a lavagem do gel em água corrente por 2 horas. O gel foi mantido em solução de glicerol 10% em água.

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A COLORAÇÃO DE GÉIS PELO MÉTODO DE PRATA (para a coloração de um gel de até 1mm de espessura):

Solução fixadora:

100 ml Etanol, marca Merck

25ml Ácido acético, marca Synth

Água deionizada q.s.p. 250ml

Solução incubadora:

17,0g Acetato de sódio, marca Synth

75,0ml de Etanol, marca Merck

1,0g de Tiosulfato de sódio, marca Merck
1,3ml de Glutaraldeído 25%, marca Sigma, adicionado logo antes do uso
Água deionizada q.s.p. 250ml

Solução de Prata:

0,25g de Nitrato de prata, marca Synth
50µl de Formaldeído 50%, marca Merck, adicionados somente na hora do uso
Água deionizada q.s.p. 250ml

Solução reveladora:

6,25g de Carbonato de Sódio, marca Synth
25µl de Formaldeído 50% marca Merck, adicionados somente na hora do uso.
Água deionizada q.s.p. 250ml

Solução fixadora final:

3,65g de Sódio EDTA.2H₂O marca Merck
Água deionizada q.s.p. 250ml.

5. RESULTADOS:

Os resultados apresentados neste capítulo referem-se aos experimentos explicados no capítulo anterior. Estão apresentados na forma de gráficos, Figuras e tabelas, na ordem em que foram mencionados anteriormente. A discussão dos resultados obtidos está apresentada no próximo capítulo.

A variação encontrada nas absorvâncias das repetições de ensaios da AK de uma mesma fração foi muito pequena, e esta boa repetibilidade é uma característica do ensaio do hidroxamato. Para a HSDH, embora as absorvâncias obtidas variassem, a diferença de absorvância entre o tempo inicial e o tempo final de ensaio de uma mesma fração ensaiada nas mesmas condições também foi pequena. Os desvios padrão dos resultados de otimização de extração e ensaio, assim como os dos experimentos iniciais de tecido-especificidade e do desenvolvimento da semente, não foram apresentados porque não foram considerados significativos dentre a pouca variação apresentada nos ensaios. Portanto, estão apresentadas as médias das absorvâncias ou a atividade específica de uma fração baseada na médias das absorvâncias dos ensaios realizados. Nos experimentos de eluição em coluna de troca iônica e filtração em gel, os resultados apresentados foram escolhidos dentre as diversas eluições realizadas, tendo sido escolhidos os mais representativos do padrão usualmente encontrado.

5.1. Determinação da atividade da AK e HSDH em diferentes estágios de desenvolvimento da semente:

O resultado deste experimento mostrou que a atividade da AK pôde ser detectada durante todo o desenvolvimento da semente, sendo o estágio com maior atividade o estágio 1 (Figura 5.1). O padrão detectado mostra que a atividade desta enzima diminuiu conforme o amadurecimento da semente.

Os resultados dos ensaios com os Tratamentos lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5mM demonstraram que estes aminoácidos causaram a inibição da atividade da AK nos três estágios, sugerindo a presença de isoformas da AK sensível a cada um destes dois aminoácidos durante todo o desenvolvimento da semente. O padrão de inibição encontrado mostra que em todos os estágios a lisina foi capaz de inibir mais fortemente a atividade total da AK do que a treonina, indicando uma predominância da isoforma sensível à lisina nos três estágios de desenvolvimento da semente (Tabela 5.1). Em todos os estágios a inibição causada pela presença dos dois aminoácidos juntos foi praticamente igual à soma da inibição causada por cada um deles separadamente (Tabela 5.1).

Os resultados obtidos para a HSDH indicaram que esta enzima também pôde ser detectada em todos os estágios do desenvolvimento da semente e que, semelhante ao encontrado para a AK, o estágio de maior atividade também foi o estágio 1 (Figura 5.2). Em todos os estágios foi detectada inibição pela presença de 5mM de treonina, sendo esta inibição mais forte no estágio 1 (Tabela 5.2). Estes resultados sugerem a presença de uma isoforma sensível à treonina com predominância no início do desenvolvimento da semente.

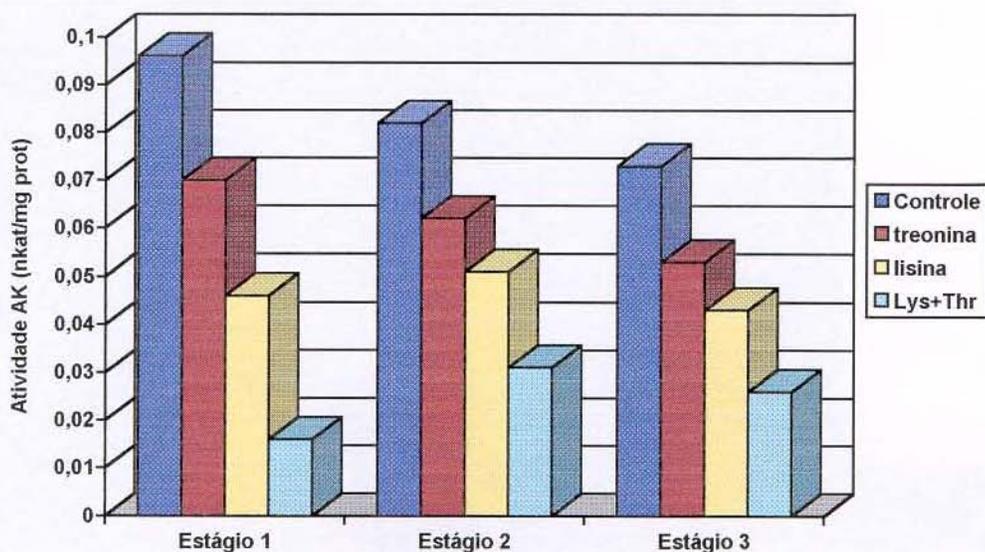


Figura 5.1: Atividade específica da AK durante o desenvolvimento da semente de arroz. Os tratamentos feitos incluem a presença dos respectivos aminoácidos no ensaio na concentração final de 5mM (Lys + Thr = lisina+treonina).

Estágios	1	2	3
Inibição (%)			
lisina	54%	37%	41%
treonina	27%	24%	27%
Lys+Thr	81%	68%	65%

Tabela 5.1: Inibição causada pela presença dos aminoácidos lisina, treonina e lisina + treonina (Lys + Thr), na concentração final de 5mM, na atividade da AK durante o desenvolvimento da semente.

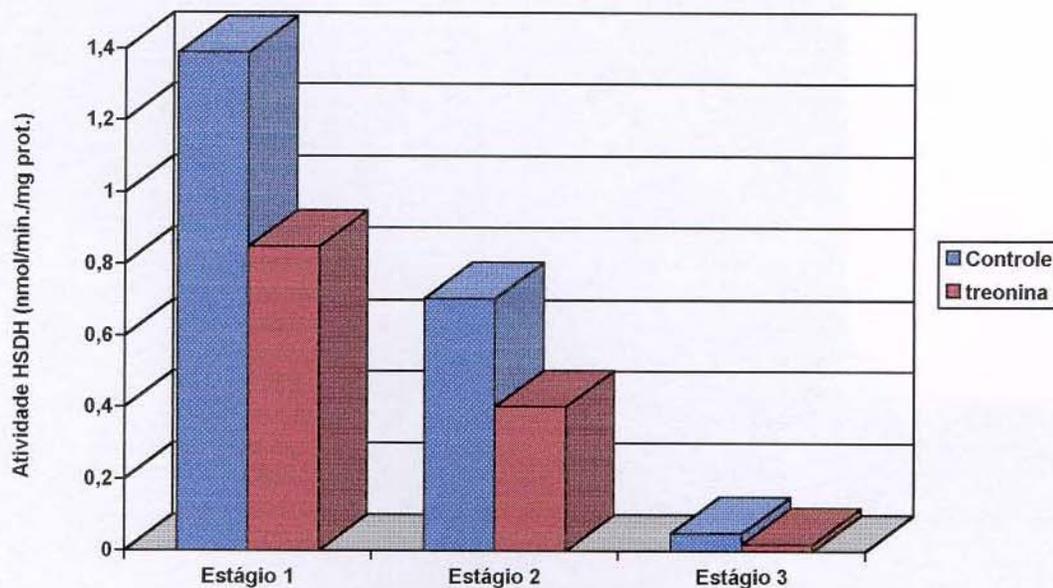


Figura 5.2: Atividade específica da HSDH durante o desenvolvimento da semente de arroz. O tratamento com treonina inclui a presença deste aminoácido no ensaio na concentração final de 5mM.

Estágios	1	2	3
% Inibição			
treonina	61%	57%	40%

Tabela 5.2 Inibição causada pela presença do aminoácido treonina, na concentração final de 5mM, na atividade da HSDH durante o desenvolvimento da semente.

5.2 Determinação da atividade da AK e HSDH em diferentes tecidos de arroz:

Os resultados dos experimentos de tecido especificidade da enzima AK mostraram que esta enzima pôde ser detectada nos três tecidos analisados (folhas, sementes e raízes), sendo que a atividade mais alta foi encontrada nas sementes (Figura 5.3). Nas sementes e nas folhas pôde ser detectada a influência dos aminoácidos lisina e treonina, quando presentes no ensaio, inibindo a atividade da enzima.

Tanto em sementes como em folhas a inibição da atividade da AK causada por lisina foi mais forte do que a causada por treonina (Tabela 5.3). A atividade da AK detectada em raízes foi baixa, e a presença dos aminoácidos lisina e treonina inibiu totalmente a atividade encontrada. Por causa da baixa atividade encontrada neste tecido não foi possível determinar a porcentagem de inibição causada pela presença de lisina e treonina.

No experimento de tecido especificidade da HSDH foi detectada a predominância da atividade da enzima em sementes e folhas, não sendo encontrada atividade em raízes (Figura 5.4 e Tabela 5.4). Tanto em sementes como em folhas a presença de treonina (5mM) no ensaio levou a uma inibição da atividade da enzima, demonstrando a existência de uma isoforma sensível à inibição por treonina nestes dois tecidos.

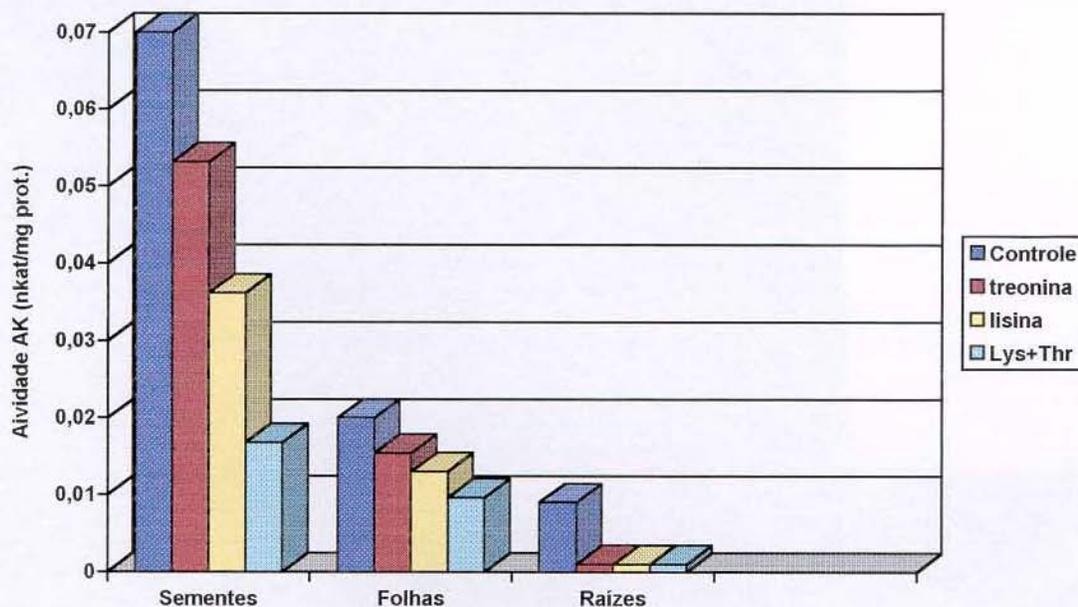


Figura 5.3: Atividade específica da AK em diferentes tecidos de arroz. Os tratamentos feitos incluem a presença dos respectivos aminoácidos no ensaio na concentração final de 5mM (Lys + Thr = lisina + treonina).

Tecidos	Sementes	Folhas
% Inibição		
lisina	48%	35%
treonina	24%	23%
Lys+Thr	76%	52%

Tabela 5.3: Inibição causada pela presença dos aminoácidos lisina, treonina e lisina + treonina (Lys + Thr), na concentração final de 5mM, na atividade da AK em sementes e folhas de arroz.

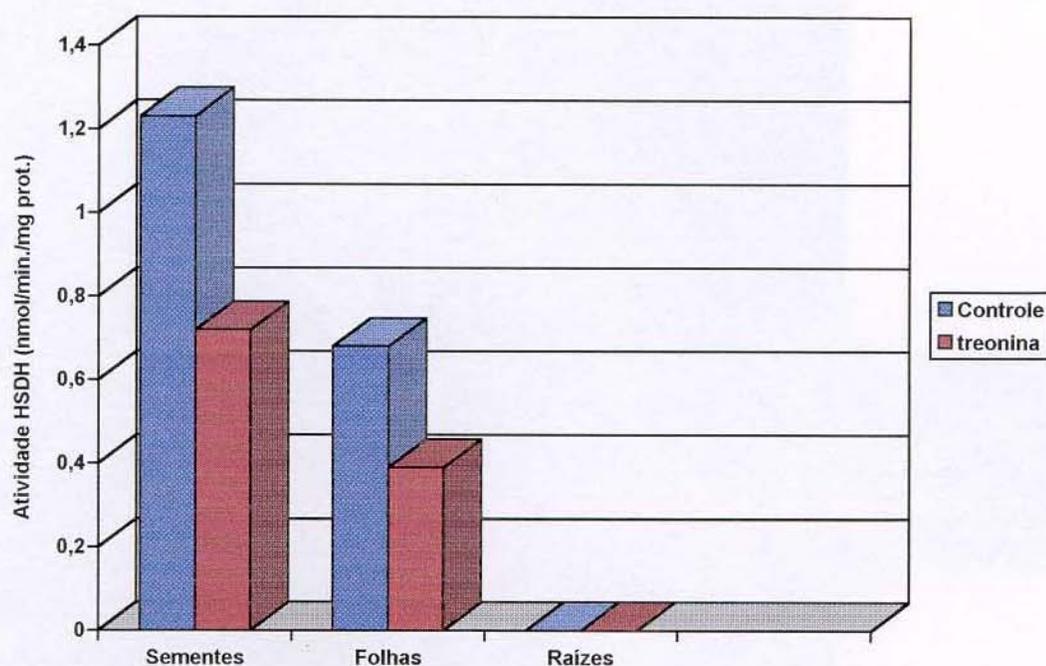


Figura 5.4: Atividade específica da HSDH em diferentes tecidos de arroz. O tratamento com treonina inclui a presença deste aminoácido no ensaio na concentração final de 5mM.

Tecidos	Sementes	Folhas
% Inibição		
treonina	41,5%	42,6%

Tabela 5.4: Inibição causada pela presença do aminoácido treonina, na concentração final de 5mM, na atividade da HSDH em sementes e folhas de arroz.

5.3. Otimização da metodologia de extração das enzimas AK e HSDH de sementes de arroz:

5.3.1. Fracionamento em sulfato de amônio:

O resultado do experimento de fracionamento com sulfato de amônio para a enzima AK está apresentado na Figura 5.5. A realização do fracionamento utilizando duas séries diferentes de faixas de saturação permitiu uma melhor definição da faixa de concentração da atividade da enzima. Como pode ser observado neste gráfico, a atividade da enzima AK se concentra principalmente entre as faixas de saturação com sulfato de amônio acima de 20% e abaixo de 50%. Os ensaios feitos com as frações obtidas do fracionamento realizado com as faixas de saturação de 0-20, 20-40, 40-60 e 60-80% indicaram que 54,3% da atividade total da enzima obtida neste fracionamento pôde ser detectada entre 20-40,0% e que 45,7% pôde ser detectado entre 40-60% de saturação. Para o fracionamento feito com as faixas de 0-30, 30-50 e 50-70%, os resultados mostraram que a faixa de 0-30% apresentou 20,8% da atividade total, a faixa de 30-50% apresentou 67,8% e a faixa de 50-70% apresentou 11,4% (atividades apresentadas na Tabela 5.5). Deste modo, uma modificação no primeiro passo de purificação da enzima foi introduzida, substituindo-se a precipitação com sulfato de amônio de 0 a 60% de saturação por uma precipitação em duas etapas, a primeira de 0 a 20% e a segunda de 20 a 50% de saturação, eliminando uma quantidade maior de proteínas presentes no extrato.

Os Tratamentos com os aminoácidos lisina e treonina, realizados com as frações obtidas do fracionamento da AK, revelaram que o padrão de inibição causado pela presença destes aminoácidos foi o mesmo em todas as faixas de saturação que apresentaram atividade da enzima AK, indicando que as possíveis

isoenzimas sensíveis a estes aminoácidos estavam presentes na mesma faixa de saturação.

Os ensaios feitos com as frações obtidas do fracionamento com sulfato de amônio realizado para HSDH, utilizando as faixas de 0-20, 20-40, 40-60 e 60-80% de saturação, demonstraram que 67,4% da atividade total da enzima pôde ser detectada entre 20-40% e que 32,6% pôde ser detectada entre 40-60% de saturação. Os ensaios do fracionamento utilizando as faixas de saturação de 0-30, 30-50 e 50-70% revelaram que 35,9% da atividade total da enzima pôde ser detectada entre 0-30% e 64,1% entre 30-50%. Estes resultados indicaram que a atividade desta enzima pôde ser melhor recuperada com precipitações com sulfato de amônio acima de 20% e abaixo de 50% de saturação com sulfato de amônio.

Os ensaios feitos para a HSDH, utilizando o aminoácido treonina na concentração final de 5mM, mostraram que em todas as faixas de saturação com atividade de HSDH a inibição causada pela treonina foi encontrada, indicando que em todas as faixas a isoenzima da HSDH sensível à inibição por treonina estava presente.

A partir destes dois experimentos, ficou determinado que ambas as enzimas (AK e HSDH) poderiam ser parcialmente purificadas utilizando a precipitação com sulfato de amônio nas mesmas faixas de saturação.

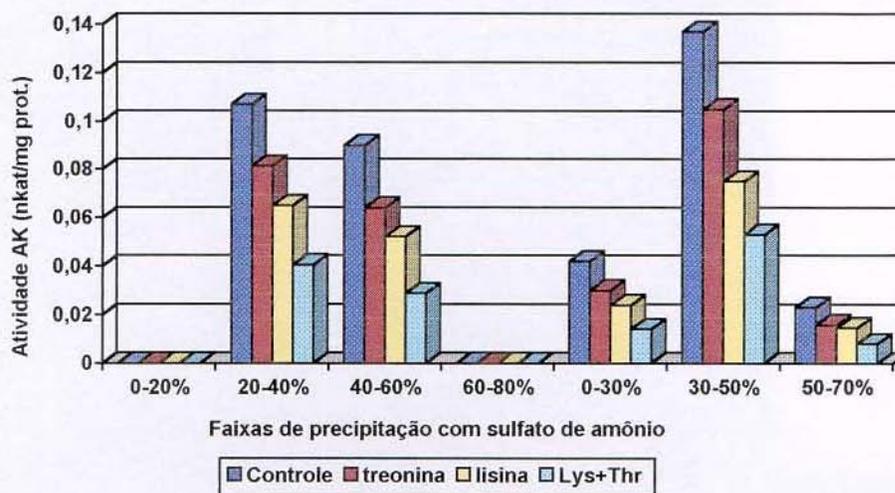


Figura 5.5: Atividade específica da AK extraída de sementes de arroz no experimento de fracionamento com sulfato de amônio. Os tratamentos feitos incluem a presença dos respectivos aminoácidos no ensaio na concentração final de 5mM (Lys + Thr = lisina + treonina).

ATIVIDADE / FAIXA DE PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	0-30%	30-50%	50-70%
controle	0	0,107	0,09	0	0,042	0,137	0,023
treonina	0	0,081	0,064	0	0,030	0,105	0,016
lisina	0	0,065	0,052	0	0,024	0,075	0,015
Lys+Thr	0	0,040	0,029	0	0,014	0,053	0,008

Tabela 5.5: Atividade da AK em nkat/mg prot. em cada faixa de saturação utilizada no experimento de fracionamento com sulfato de amônio. Os Tratamentos incluem a presença no ensaio dos aminoácidos na concentração final de 5mM (Lys + Thr = lisina + treonina).

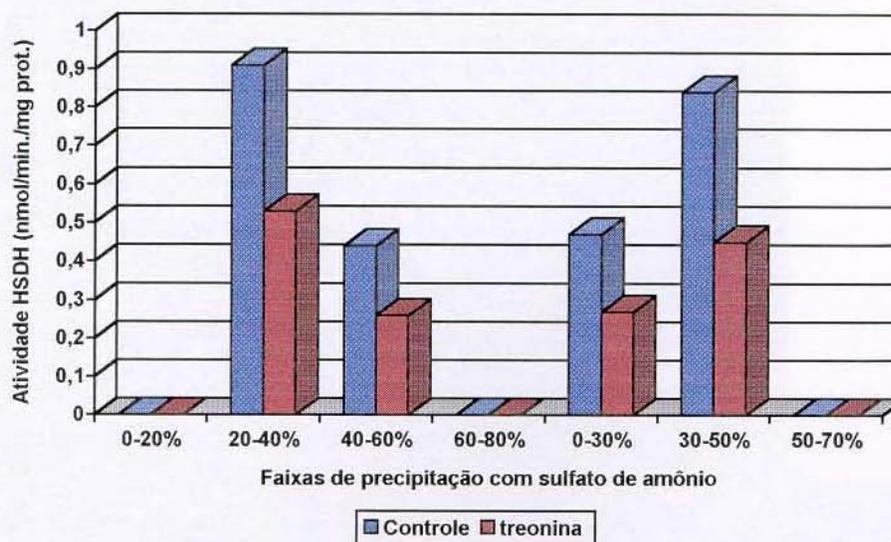


Figura 5.6: Atividade específica da HSDH extraída de sementes de arroz no experimento de fracionamento com sulfato de amônio. Os tratamentos incluem a presença do aminoácido treonina na concentração final de 5mM.

ATIVIDADE / FAIXA DE SATURAÇÃO COM SULFATO AMÔNIO

	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	0-30%	30-50%	50-70%
controle	0	0,91	0,44	0	0,47	0,84	0
treonina	0	0,53	0,26	0	0,27	0,45	0

Tabela 5.6: Atividade da HSDH em nmol/min./mg prot. em cada faixa de saturação utilizada no experimento de fracionamento com sulfato de amônio. O Tratamento com treonina inclui a presença deste aminoácido no ensaio na concentração final de 5mM.

5.4. Otimização da metodologia de ensaio da AK:

5.4.1 Determinação do melhor tipo de Branco no ensaio:

Os resultados do experimento para a determinação do melhor tipo de Branco a ser utilizado no ensaio estão apresentados na Figura 5.7. Este experimento revelou que a maior absorvância a 505nm é obtida com a utilização do Branco T0 (tempo zero) para a enzima, que foi adotado como Branco neste trabalho.

5.4.2. Determinação da melhor concentração de substrato e tempo de ensaio:

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 5.8 e na Tabela 5.8. Neste experimento observou-se que com o aumento da concentração de aspartato houve um aumento na absorvância obtida, o que indicou que na concentração de 50mM de aspartato a enzima poderia não estar saturada com o substrato aspartato. A concentração de 250mM apresentou maior absorvância que a de 100mM, porém como altas concentrações de aspartato no ensaio poderiam levar a um aumento na absorvância que poderia não refletir necessariamente a atividade da enzima, a concentração de 100mM de aspartato foi escolhida como padrão para o ensaio da enzima AK de arroz.

Quanto ao tempo de ensaio, uma reação linear não foi observada mesmo variando-se a concentração de aspartato, visto que a absorvância obtida com o tempo de 30 minutos não chegou a dobrar aos 60 minutos e a triplicar aos 90 minutos de reação. Sendo assim, com 30 minutos de reação é possível obter da enzima uma absorvância mais alta, levando a uma maior atividade específica e economizando tempo de ensaio. O tempo de 30 minutos de reação foi escolhido como padrão para os ensaios da AK em arroz.

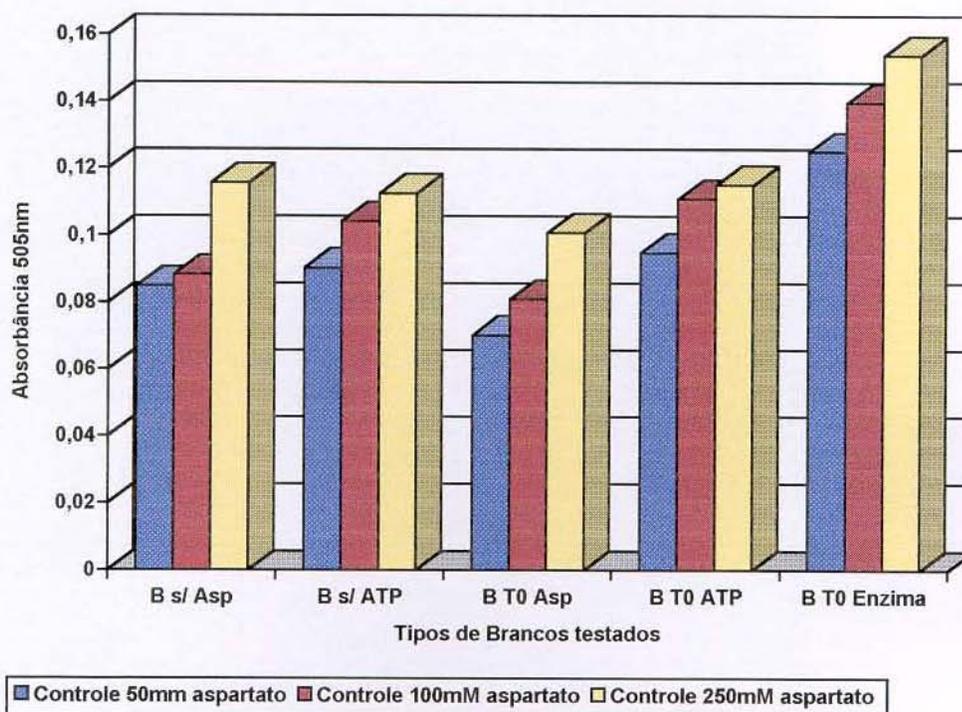


Figura 5.7: Determinação do melhor tipo de Branco a ser utilizado no ensaio da AK extraída de sementes de arroz. A absorbância de ensaios Controle com 50, 100 e 250mM de aspartato foi medida com cada um dos tipos de Brancos testados.

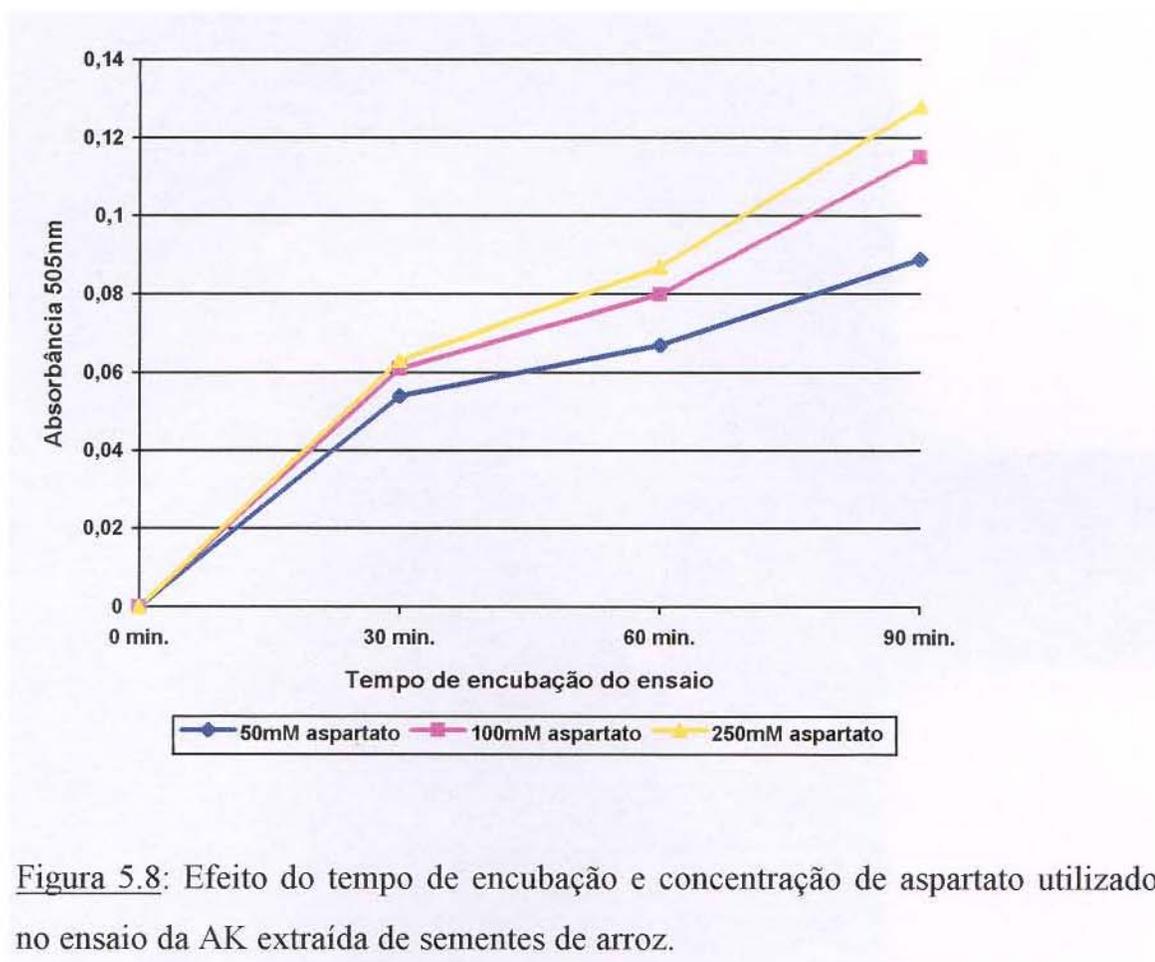


Figura 5.8: Efeito do tempo de encubação e concentração de aspartato utilizado no ensaio da AK extraída de sementes de arroz.

5.4.3. Determinação da interferência de aminoácidos na atividade da AK:

Este experimento demonstrou que dentre os aminoácidos testados, treonina e principalmente lisina foram capazes de produzir efeitos inibitórios sobre a atividade da AK de arroz. Tanto para lisina como para treonina a concentração de 1mM já foi capaz de inibir a enzima, e maiores concentrações (5 e 10mM) não provocaram uma inibição maior (Figura 5.9). Apesar disso, a concentração de 5mM de lisina e treonina foi escolhida para ser utilizada nos Tratamentos, por já ter sido largamente utilizada nos experimentos descritos na literatura.

Valina e metionina não demonstraram capacidade de inibir a atividade da AK, ao contrário, em concentrações maiores (5 e 10mM) provocaram um aumento na atividade.

5.4.4. Determinação da melhor faixa de *pH* para a atividade da AK de arroz:

O tampão utilizado e o *pH* mantido no ensaio são muito importantes para a atividade da enzima. A Figura 5.10 apresenta o resultado do experimento de determinação do melhor *pH* para a atividade da AK de sementes de arroz utilizando tampão Tris. Como pode ser observado neste gráfico, dentre os *pH* testados, a AK apresentou maior absorvância no *pH* de 7,4. Portanto este *pH* foi mantido no ensaio da AK de arroz.

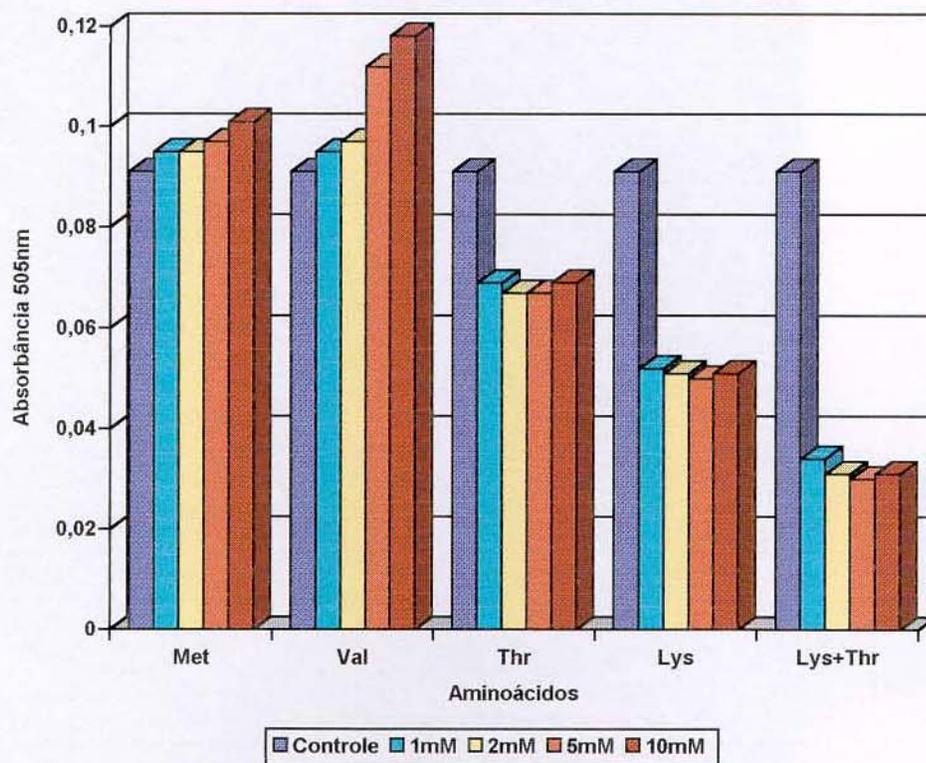


Figura 5.9: Interferência dos aminoácidos metionina (Met), valina (Val), treonina (Thr), lisina (Lys) e lisina + treonina (Lys + Thr) na atividade da AK extraída de sementes de arroz. Os tratamentos incluem a presença destes aminoácidos nos ensaios nas concentrações finais de 1, 2, 5 e 10mM.

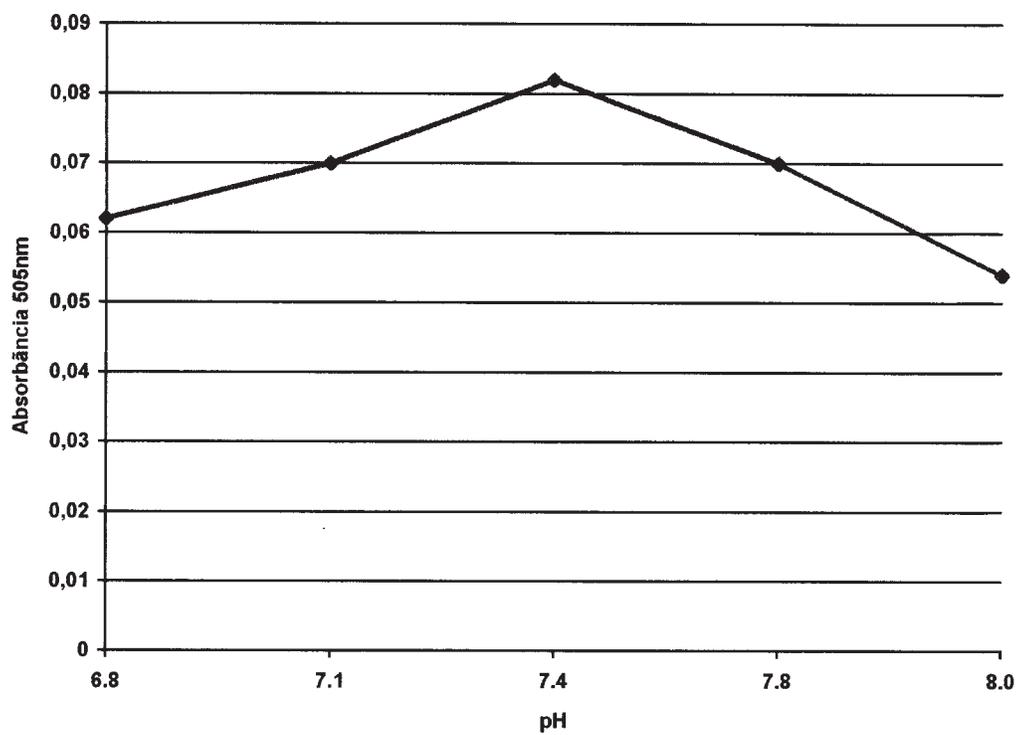


Figura 5.10: Efeito do *pH* na atividade da AK extraída de sementes de arroz.

5.4.5. Determinação da melhor concentração de ATP e Magnésio (MgSO₄) a ser utilizada nos ensaios enzimáticos:

A concentração de Magnésio e ATP presentes no ensaio têm grande influência na atividade da enzima e para a obtenção da melhor atividade possível se torna necessário o estabelecimento da melhor proporção destes dois elementos no ensaio. A Figura 5.11 mostra o efeito da concentração de Mg⁺⁺ (MgSO₄) no ensaio da AK. Como pode ser observado, mantendo-se a concentração de ATP em 20mM, a melhor absorvância no ensaio é obtida com a concentração de Mg⁺⁺ de 12,5mM, sendo que o aumento do Mg⁺⁺ para 25mM leva a uma queda significativa da absorvância nestas condições. Na Figura 5.12 é possível observar que mantendo-se a concentração de Mg⁺⁺ em 12,5mM e variando-se a de ATP obtém-se a melhor absorvância com 20mM de ATP e uma ligeira queda na absorvância é obtida com o aumento da concentração de ATP para 40mM. Ensaios feitos variando-se a concentração tanto de Mg⁺⁺ quanto de ATP (Figura 5.13 e Tabela 5.7) demonstraram que a maior absorvância é mesmo obtida com a combinação de 12.5mM Mg⁺⁺ e 20mM de ATP, sendo portanto mantidas estas condições no ensaio da AK de arroz.

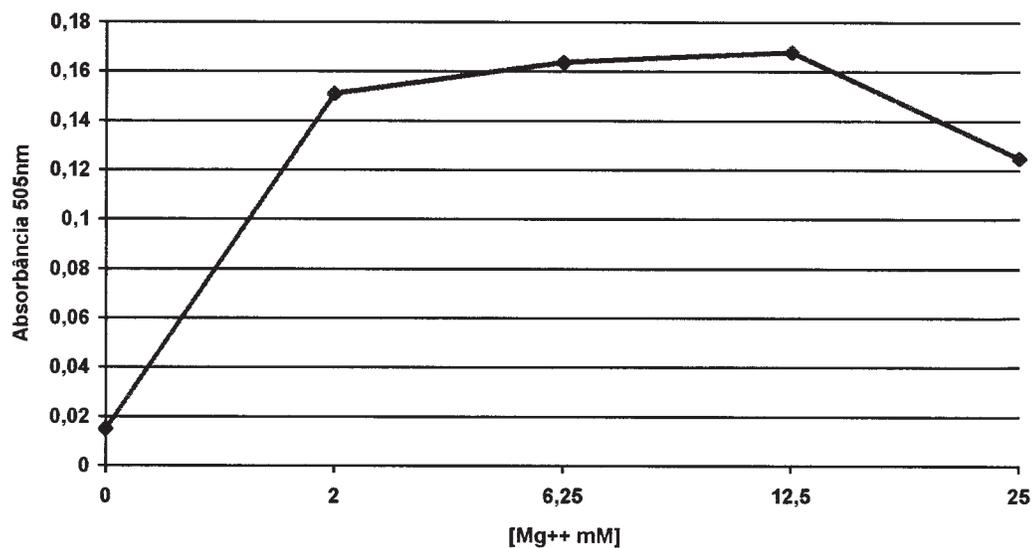


Figura 5.11: Efeito da concentração de MgSO₄ (Mg⁺⁺) na atividade da AK extraída de sementes de arroz, com concentração de ATP constante em 20mM.

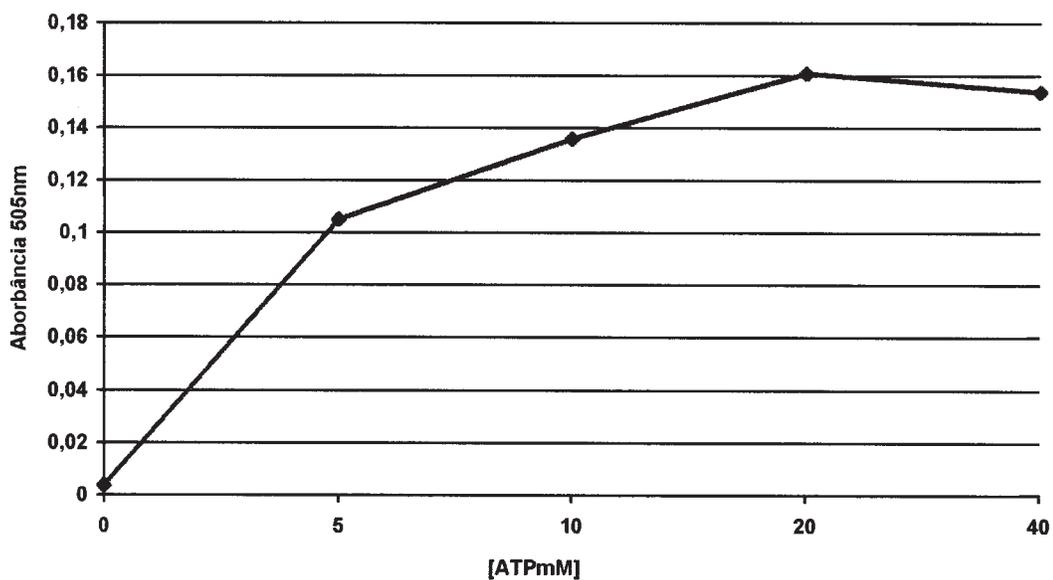


Figura 5.12 : Efeito da concentração de ATP na atividade da AK extraída de sementes de arroz, com concentração de Mg⁺⁺ constante em 12,5mM.

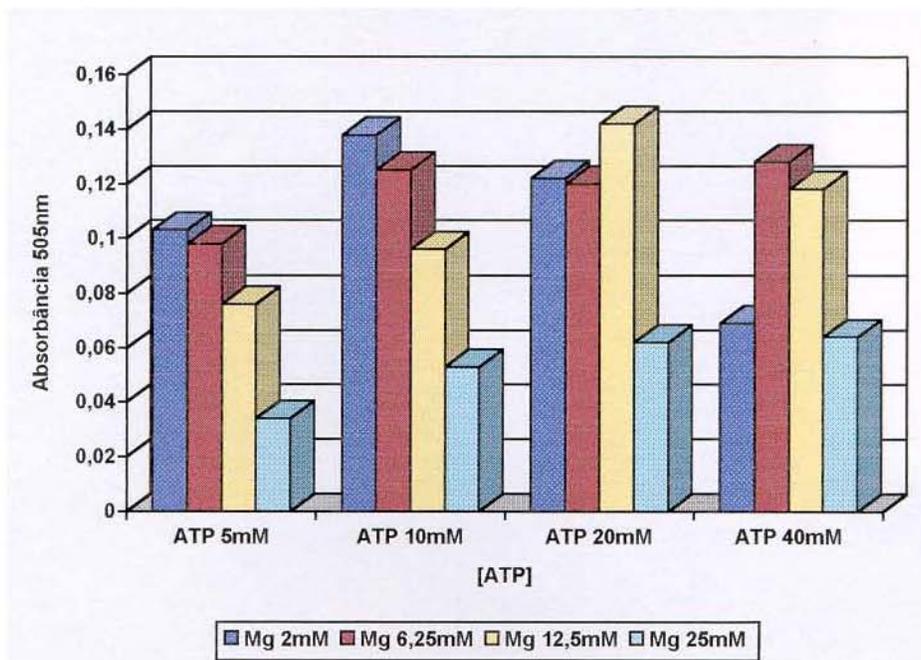


Figura 5.13: Efeito da proporção Mg^{++}/ATP na atividade da AK extraída de sementes de arroz.

ATP (mM)	5	10	20	40
MgSO₄ (mM)				
2	0,103	0,138	0,122	0,069
6.25	0,098	0,125	0,120	0,128
12.5	0,076	0,096	0,142	0,118
25	0,034	0,053	0,062	0,064

Absorbância 505nm.

Tabela 5.7: Efeito da proporção Mg^{++}/ATP na atividade da AK extraída de sementes de arroz.

5.4.6. Determinação da melhor concentração de hidroxilamina a ser utilizada no ensaio da AK:

A concentração de hidroxilamina presente no ensaio precisa ser alta o suficiente para garantir a conversão do β -aspartil fosfato, formado pela AK, em β -aspartil hidroxamato, numa velocidade muito mais rápida do que sua hidrólise para aspartato. Como demonstrado na Figura 5.14, as concentrações de 400, 500 e 600mM de hidroxilamina foram as que propiciaram a maior absorbância dentre as concentrações testadas. Embora concentrações maiores que 400mM de hidroxilamina não causem redução na absorbância obtida, elas foram descartadas por poderem causar instabilidade nas absorbâncias obtidas em ensaios de frações protéicas com alta concentração de KCl (Davies, 1977a), e a concentração de 400mM escolhida como padrão nos ensaios.

5.4.7. Determinação da melhor temperatura de ensaio:

Em todos os trabalhos publicados envolvendo o ensaio de atividade da AK de plantas foi utilizada a temperatura padrão de 30°C, exceto em um trabalho preliminar com arroz (Shaw e Ku, 1984) e em milho (Azevedo et. al, 1992a), onde a temperatura padrão foi otimizada para 35°C. O efeito da temperatura na atividade da AK de arroz investigado neste trabalho está demonstrado na Figura 5.15, na qual pode ser observado que para arroz a temperatura ótima de ensaio para a atividade da AK também é de 35°C. Abaixo de 35°C, a absorbância obtida foi menor, indicando que a enzima não seria tão eficiente em temperaturas menores que 35°C. A incubação em 45°C causou uma drástica diminuição na absorbância encontrada, embora não tenha causado a desativação completa da enzima, como relatado para arroz por Shaw e Ku (1984), o que ocorreu neste trabalho somente a 55°C.

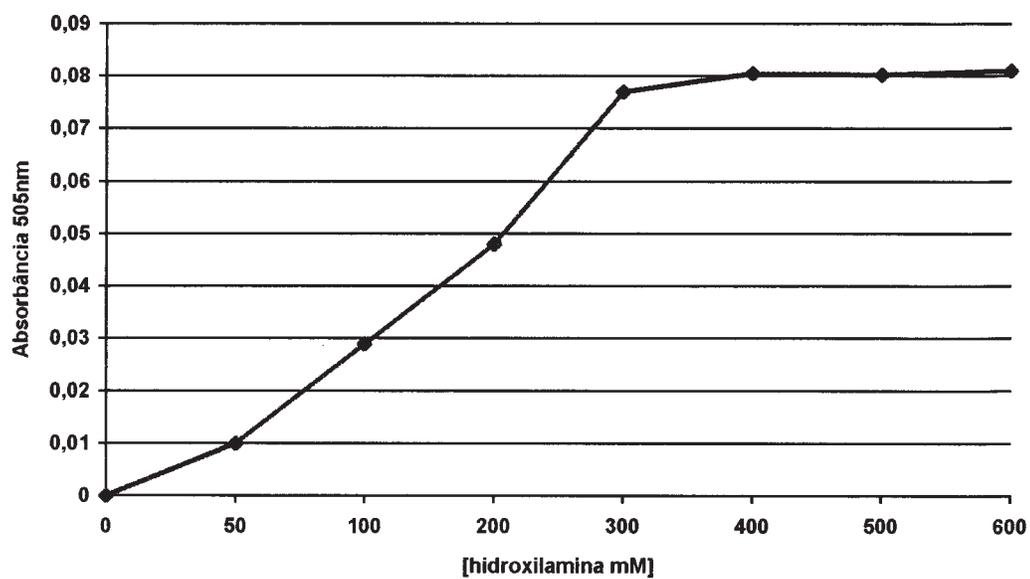


Figura 5.14: Efeito da concentração de hidroxilamina no ensaio da AK extraída de sementes de arroz.

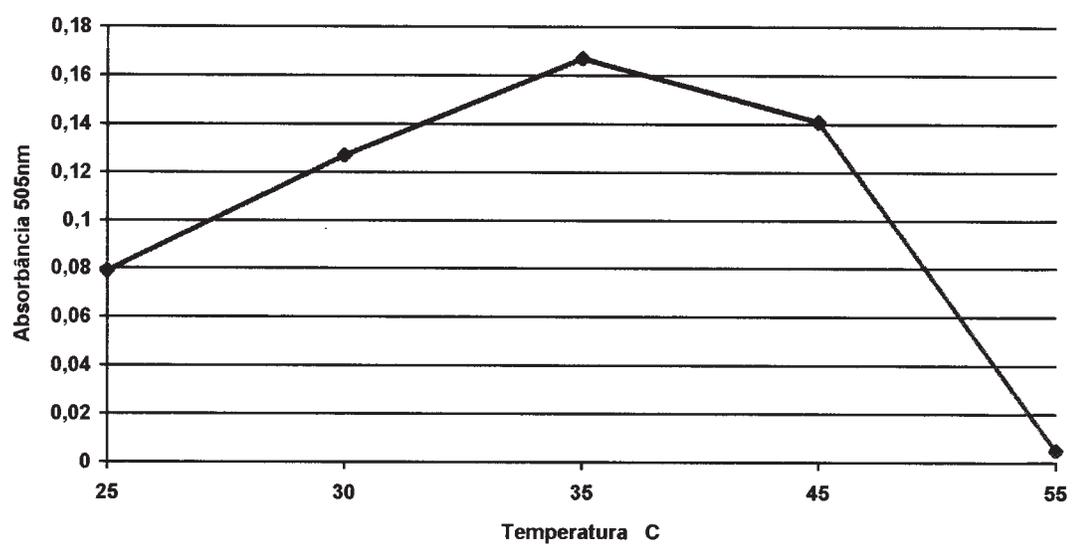


Figura 5.15: Efeito da temperatura sobre a atividade da AK extraída de sementes de arroz.

5.4.8. Determinação do efeito da concentração de KCl na atividade da AK de arroz:

Devido à utilização de tampões com alta concentração de KCl durante os passos de purificação da AK e ao fato dos íons de K^+ afetarem a atividade da HSDH em plantas (Bryan et al., 1990), um experimento foi feito para estabelecer as possíveis interferências dos íons K^+ na atividade da AK. A Figura 5.16 representa os resultados obtidos neste experimento. Como pode ser visto neste gráfico, a presença de altas concentrações de KCl no tampão do ensaio da AK não teve nenhuma interferência na absorbância encontrada, o que fez com que tampões com KCl fossem usados normalmente em experimentos de colunas de troca iônica.

5.5. Cromatografia de troca iônica:

5.5.1. Eluição do tipo “Step-Wise” da enzima AK:

Os resultados destes experimentos estão apresentados nas Figuras 5.17 e 5.18. A resina FFQ-Sepharose foi escolhida por já ter sido largamente utilizada em trabalhos com a AK (Relton et al., 1988, Dotson et al., 1989 e Azevedo et al., 1992a) e por apresentar uma boa resolução na eluição das proteínas à ela ligadas, suportando um fluxo de eluição alto (2-5ml/min) sem perda da definição de eluição.

Como pode ser visto na Figura 5.17, os ensaios realizados com as frações obtidas neste experimento mostraram que toda a atividade da AK pôde ser eluída da coluna numa concentração em torno de 300mM de KCl (frações 21-30), sendo a maior atividade encontrada na fração 25. Nenhuma atividade de AK foi encontrada nas frações de proteínas eluídas (Figura 5.18) nas concentrações de

100 (frações 1-10), 200 (frações 11-20), 400 (frações 31-40) e 500mM (frações 41-50) de KCl. A lavagem final com tampão 1M de KCl (frações 51-60) retirou todas as proteínas remanescentes na coluna e novamente, nenhuma atividade de AK foi encontrada nesta fração, mostrando que nenhuma proteína com atividade desta enzima havia ficado ligada à coluna, confirmando que toda a atividade de AK se encontrava no pico de 300mM de KCl. Similarmente, a fração não ligante também não apresentou nenhuma atividade de AK.

As frações obtidas também foram testadas para atividade de HSDH. A Figura 5.19 apresenta os resultados obtidos. Assim como para a AK, a HSDH pôde ser totalmente eluída da coluna de troca iônica com o tampão contendo 300mM de KCl (frações 21-30), sendo a fração 25 a de maior atividade. As frações correspondentes aos picos de 100mM (frações 1-10), 200mM (11-20), 400mM (31-40) e 500mM de KCl (41-50) não apresentaram atividade de HSDH, assim como as frações obtidas da lavagem final com o tampão contendo 1M de KCl (frações 51-60) e a fração não ligante. Os ensaios feitos com as frações que apresentaram atividade de HSDH mostraram que todas apresentaram inibição da atividade na presença de treonina 5mM (Tratamento treonina).

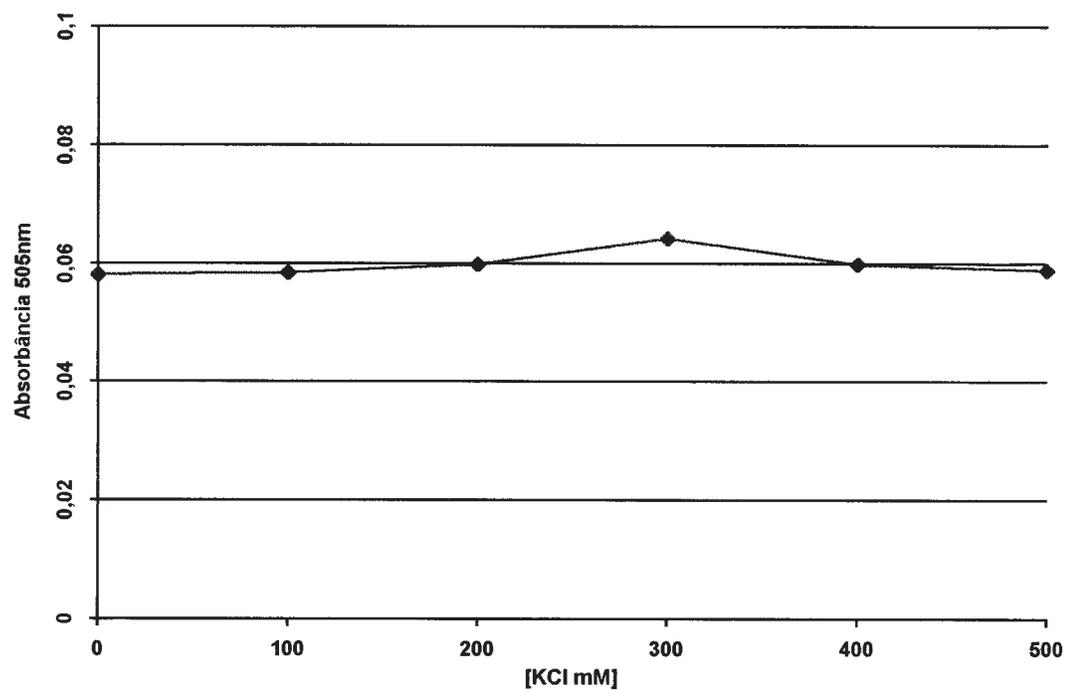


Figura 5.16: Efeito do KCl na atividade da AK extraída de sementes de arroz.

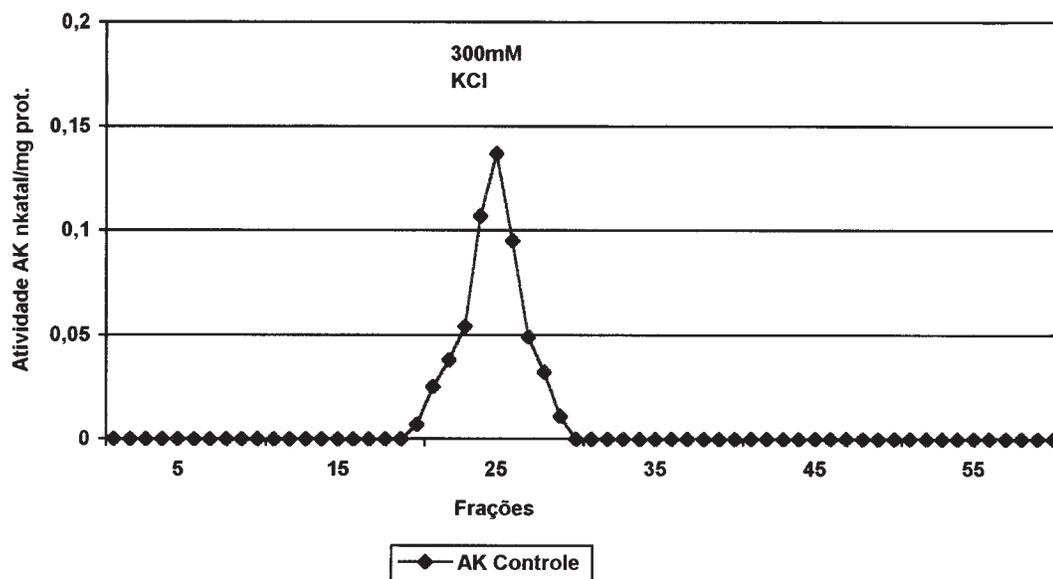


Figura 5.17: Atividade da AK nas frações obtidas da eluição tipo “Step-Wise” de coluna de troca iônica FFQ-Sepharose.

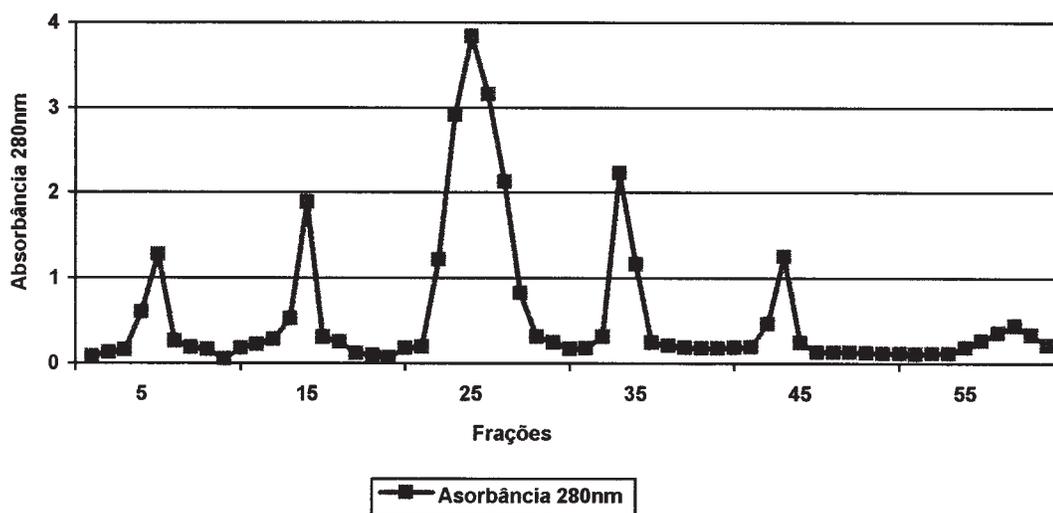


Figura 5.18: Padrão de eluição de proteínas na eluição tipo “Step-Wise” da AK, detectadas pela absorbância a 280nm.

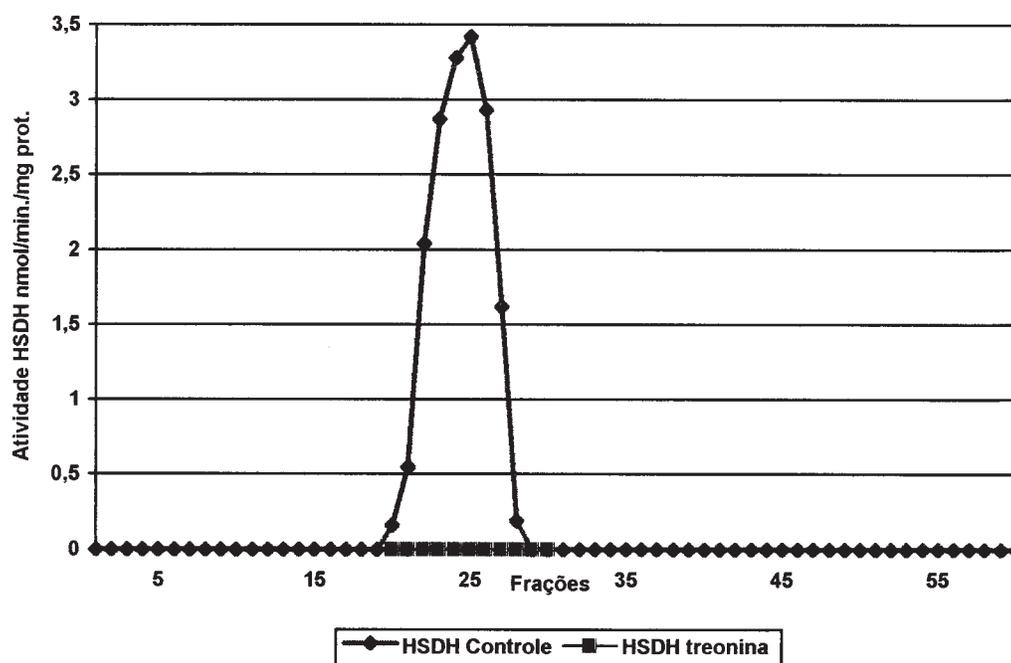


Figura 5.19: Padrão de eluição tipo “Step-Wise” da enzima HSDH em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose. O tratamento com treonina corresponde a presença deste aminoácido na concentração de 5mM.

5.5.2. Eluição da AK de Gradiente Linear de 0-500mM de KCl:

As Figuras 5.20A-F representam os resultados obtidos da eluição da AK de arroz de um gradiente linear de 0-500mM de KCl, em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose. Os ensaios feitos com as frações provenientes do gradiente mostraram que a AK foi completamente eluída da coluna entre as concentrações de 200mM e 350mM de KCl (frações 30-53), sendo o pico de atividade encontrado em torno de 290mM de KCl (fração 43, Gráfico 5.20A).

Embora apenas um pico de atividade AK Controle tenha sido encontrado, os Tratamentos feitos com lisina e treonina indicaram a presença de duas isoformas da AK, uma predominante e sensível à inibição por lisina (frações 39-53, Figuras 5.20A, B) e outra sensível à inibição por treonina (frações 30-38, Figuras 5.20A, C). O pico de atividade da isoforma sensível à lisina foi encontrado em torno de 290mM, semelhantemente ao pico Controle. O pico de atividade da isoforma sensível à inibição por treonina foi encontrado em torno de 225mM de KCl. Na ausência de dois picos de atividade Controle que demonstrassem claramente a presença das isoformas, a determinação da fração pico de cada isoforma foi feita pelo cálculo da porcentagem de inibição causada pelo Tratamento em questão, nas frações suscetíveis à inibição, tendo sido considerada a fração pico aquela que apresentou maior atividade Controle (dentre as suscetíveis à inibição) e maior porcentagem de inibição (Figuras 5.20A, B e C).

O Tratamento incluindo lisina e treonina juntas teve drástico efeito inibitório sobre as frações com atividade da AK, levando a uma inibição total das frações, com exceção das frações pico (39-45), onde embora a inibição tenha sido encontrada, não chegou a ser total como nas demais frações (Figura 5.20D). Para a maioria das frações, a soma da atividade obtida com o Tratamento lisina e da atividade obtida com o Tratamento treonina resultou, aproximadamente, na atividade Controle obtida para esta fração, demonstrando que a atividade total

obtida foi o resultado da soma das atividades de cada uma das isoformas encontradas.

Ensaio para HSDH feitos com as frações obtidas neste gradiente mostraram que a atividade de HSDH pôde ser detectada somente nas frações 28-36, sendo todas suscetíveis à inibição por treonina (inibição total da atividade). O pico de atividade da HSDH foi encontrado na fração 34 (226mM KCl, Figura 5.20E). Baseado nas informações obtidas neste experimento um novo gradiente foi estabelecido utilizando as concentrações de 100-350mM de KCl.

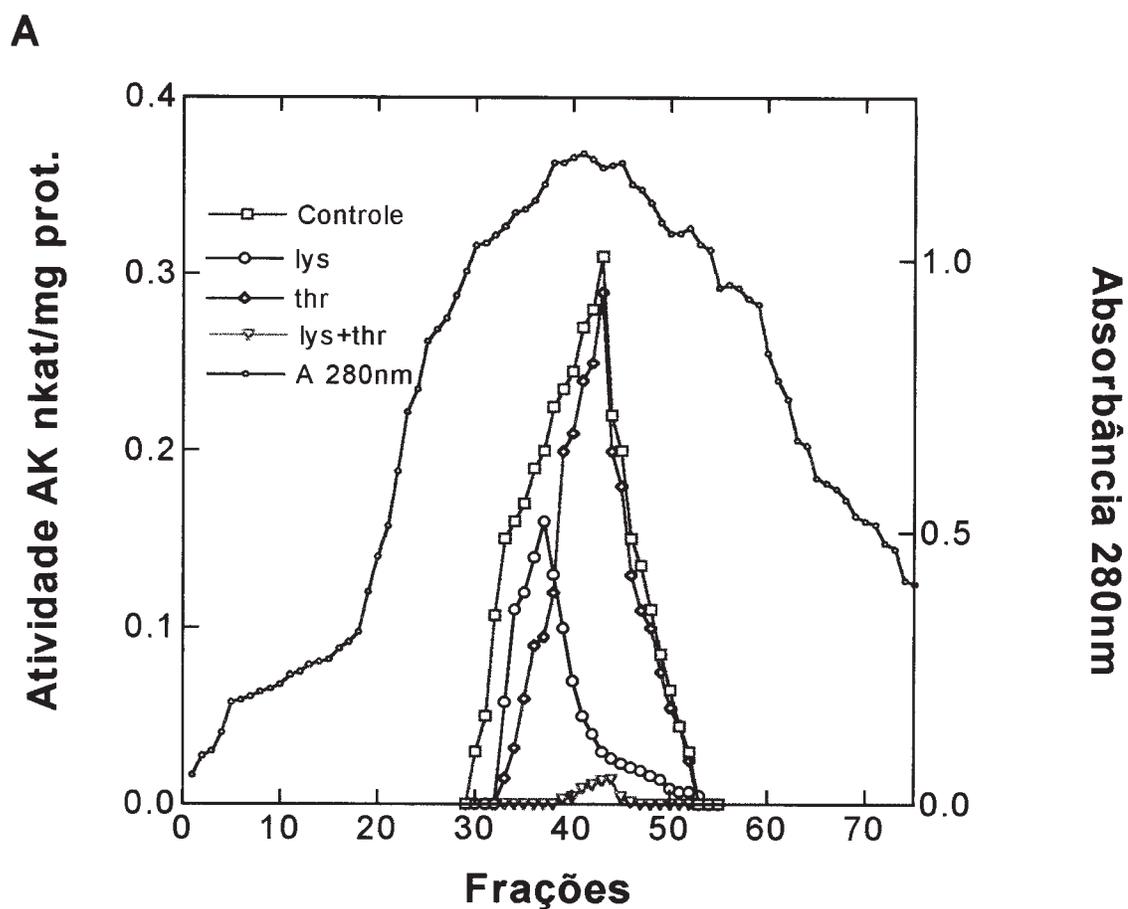
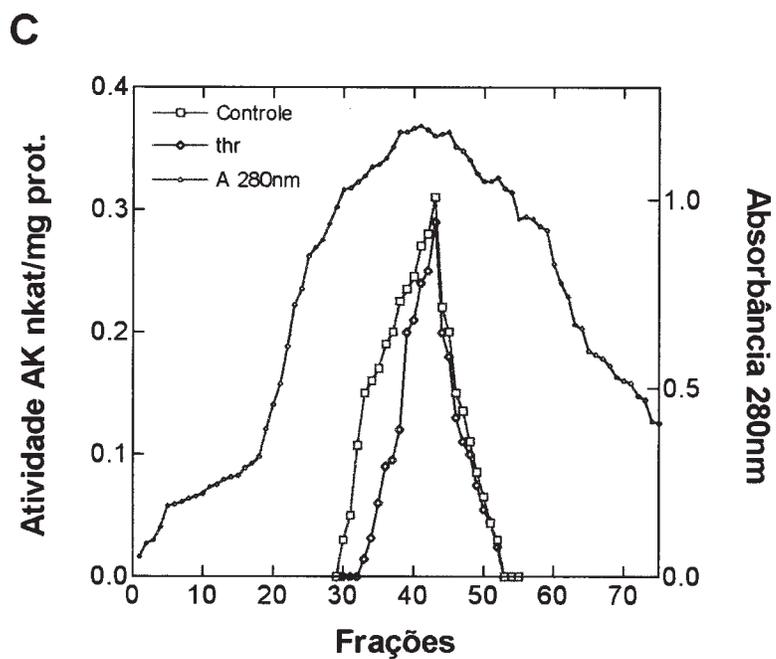
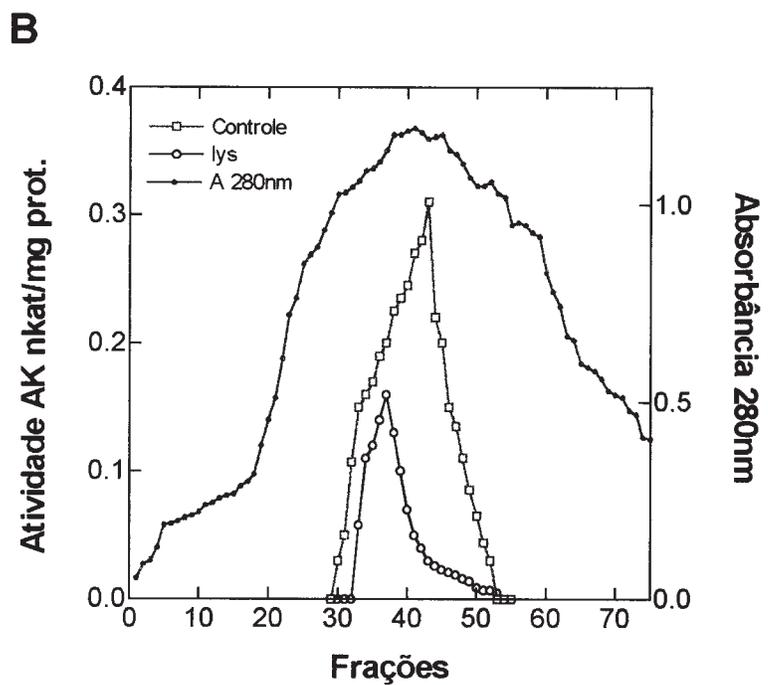
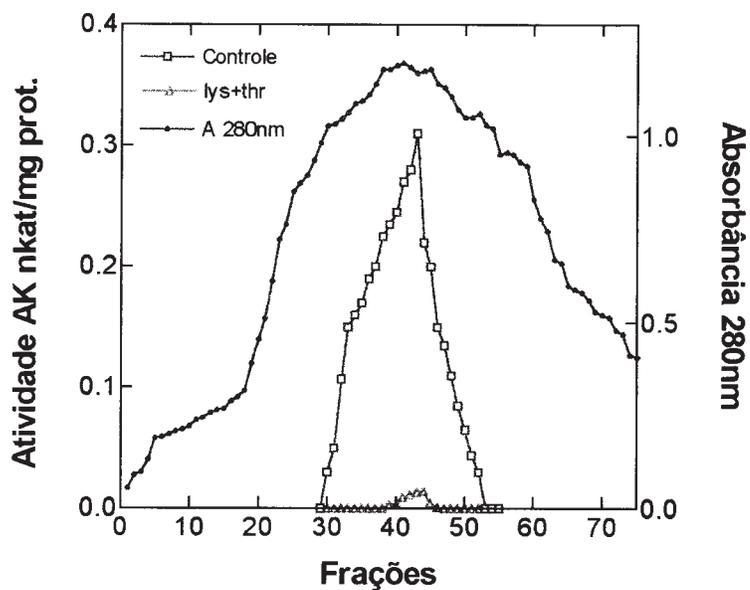
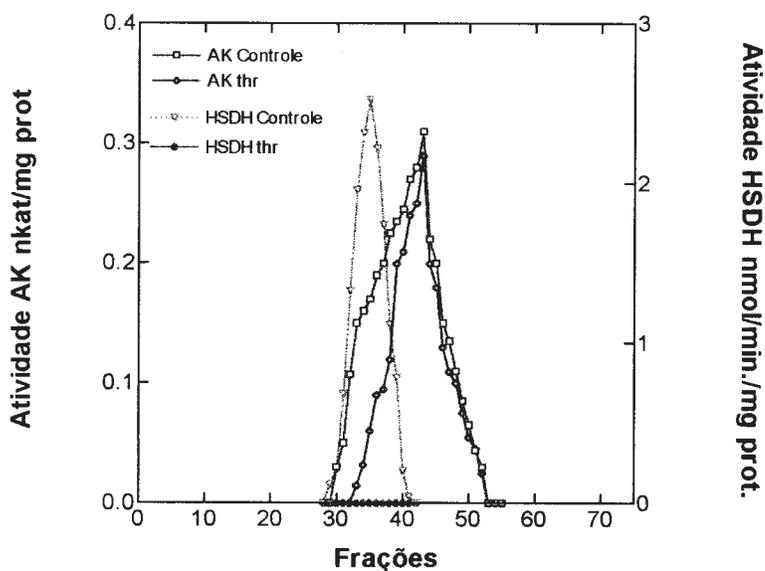


Figura 5.20A: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 0-500mM de KCl. Os tratamentos feitos incluem a presença dos respectivos aminoácidos no ensaio na concentração final de 5mM.



Figuras 5.20B e 5.20C: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 0-500mM de KCl. (B) AK Controle e Tratamento lisina 5mM; (C) AK Controle e Tratamento treonina 5mM.

D**E**

Figuras 5.20D e 5.20E: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 0-500mM de KCl. (D) AK Controle e Tratamento lys + thr (lisina + treonina) 5mM; (E) AK Controle, AK Tratamento treonina 5mM, HSDH Controle e HSDH Tratamento treonina 5mM.

5.5.3. Eluição da AK em Gradiente Linear de 100-350mM de KCl:

Os resultados obtidos do gradiente linear de 100-350mM de KCl estão apresentados nas Figuras 5.21A-G. Neste gradiente, assim como no anterior (0-500mM KCl), a atividade Controle da AK pôde ser totalmente eluída entre as concentrações de 200 a 330mM de KCl (Figura 5.21A). Devido à melhor separação obtida neste gradiente (250mM em 75 frações), foi possível identificar dois picos de atividade de AK Controle, ao invés de somente um como encontrado no gradiente anterior. Os Tratamentos com lisina e treonina indicaram a presença de duas isoformas da AK, uma sensível à inibição por lisina e correspondente ao segundo pico Controle em ordem de eluição encontrado (Figuras 5.21A e 5.21B), e outra sensível à inibição por treonina e correspondente ao primeiro pico Controle em ordem de eluição (Figuras 5.21A e 5.21C). Assim como no gradiente anterior, o pico de atividade da isoforma sensível à lisina foi detectado com cerca de 285mM de KCl (fração 56) e o pico da isoforma sensível à treonina com cerca de 230mM (fração 39). O tratamento incluindo lisina e treonina levou à inibição total de quase todas as frações, com exceção daquelas pertencentes aos picos de atividade Controle, onde embora a inibição não tenha sido total, foi bastante forte (Figura 5.21D).

As frações obtidas neste gradiente também foram testadas para a atividade de HSDH Controle, tendo sido detectada atividade somente nas frações de 33-52, sendo o pico de atividade encontrado a 236mM (fração 41), coincidindo com o pico de atividade da AK sensível a inibição por treonina. Todas as frações com atividade de HSDH foram totalmente inibidas com o Tratamento treonina 5mM (Figuras 5.22E, G).

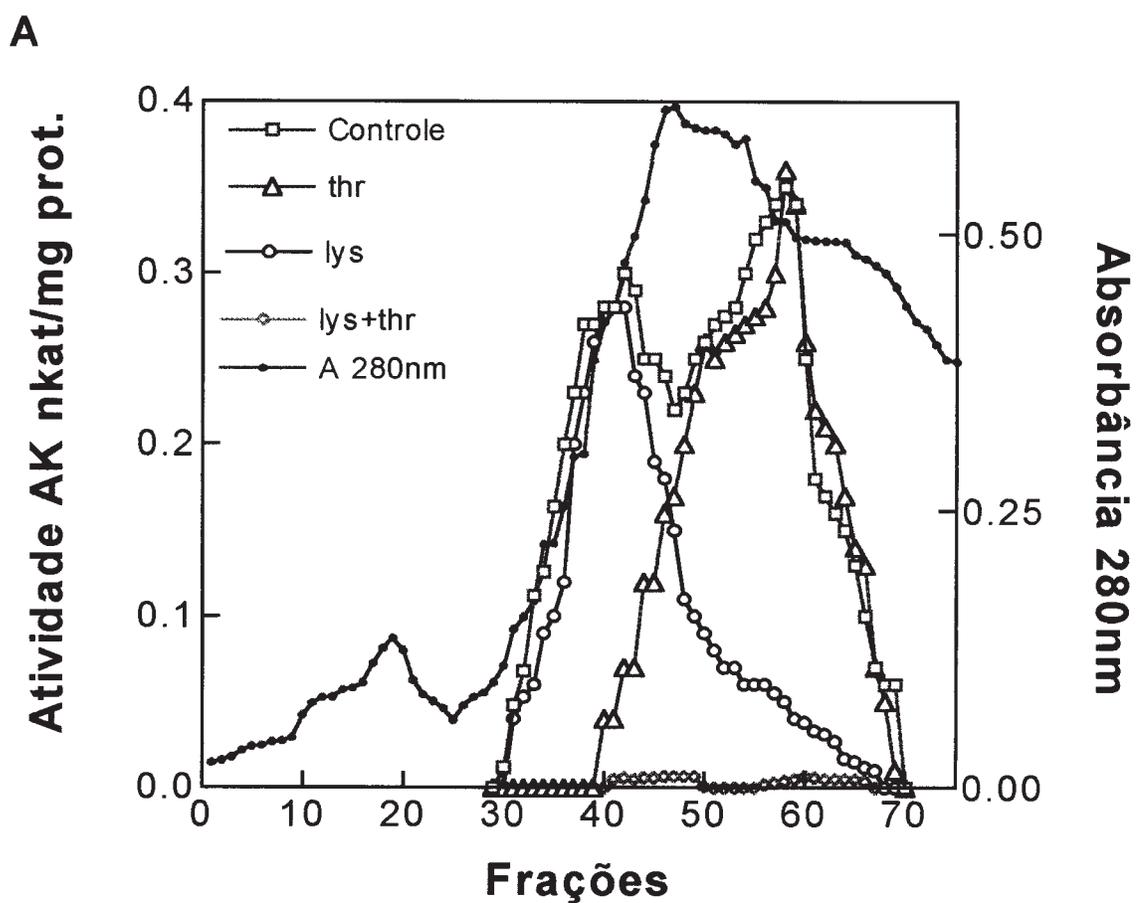
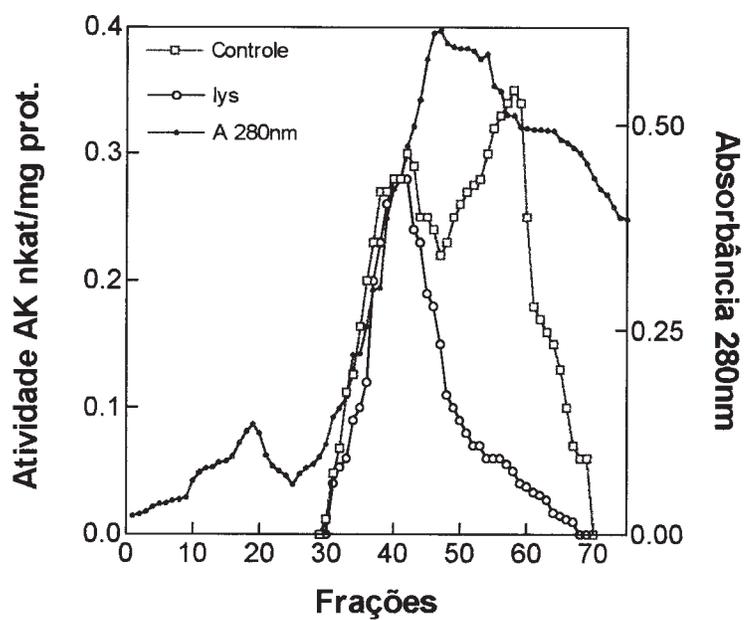
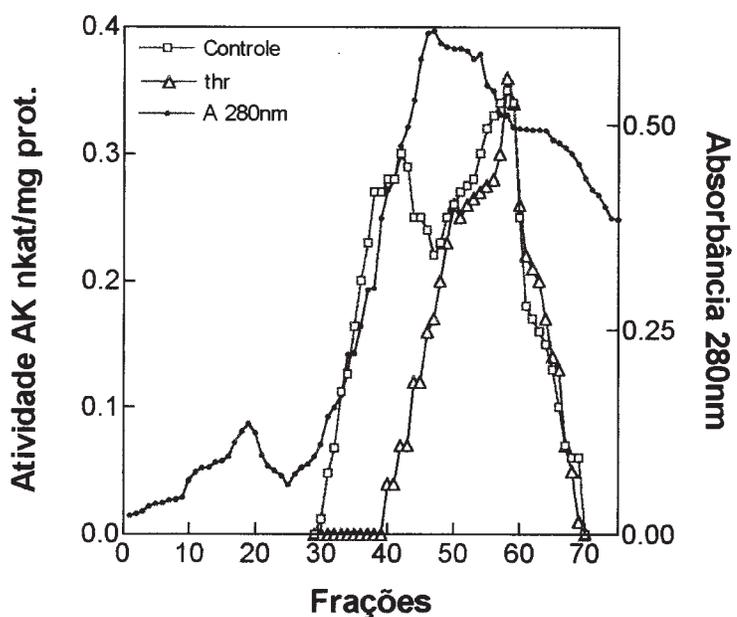
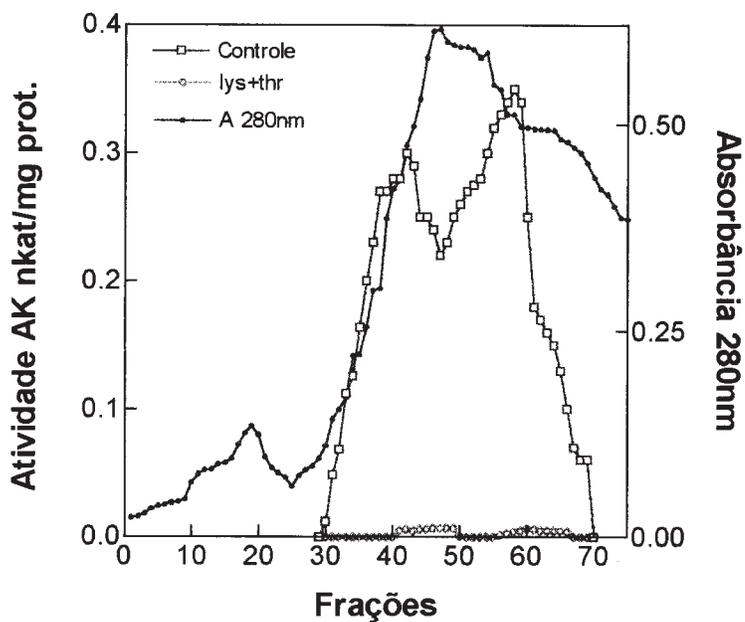
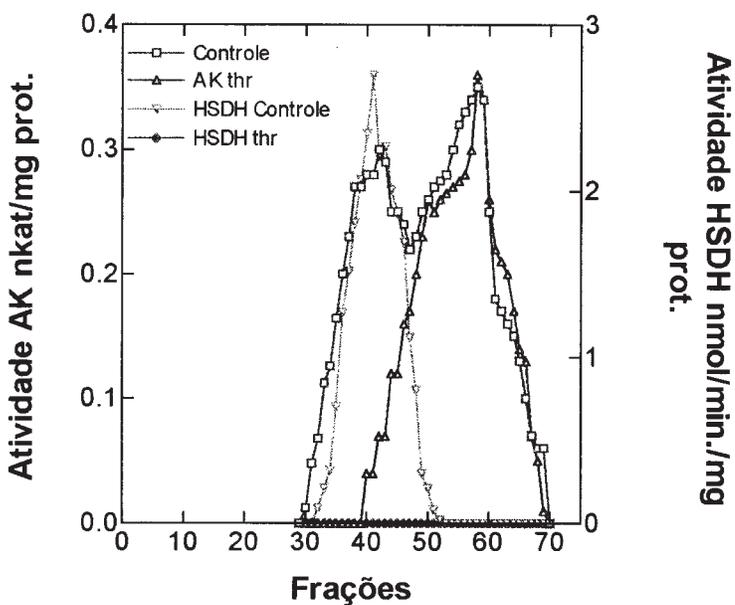


Figura 5.21A: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 100-350mM de KCl. Os tratamentos feitos incluem a presença dos respectivos aminoácidos no ensaio na concentração final de 5mM.

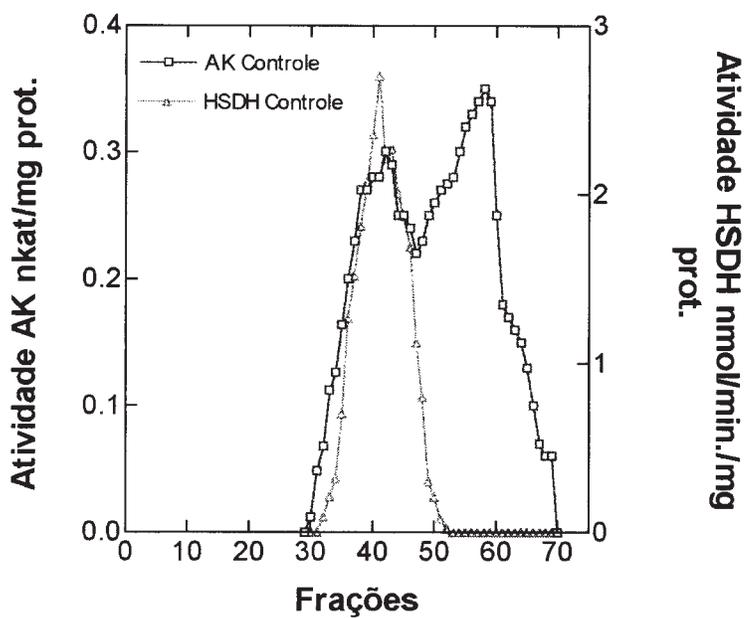
B**C**

Figuras 5.21B e 5.21C: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 100-350mM de KCl. (B) AK Controle e Tratamento lisina 5mM; (C) AK Controle e Tratamento treonina 5mM.

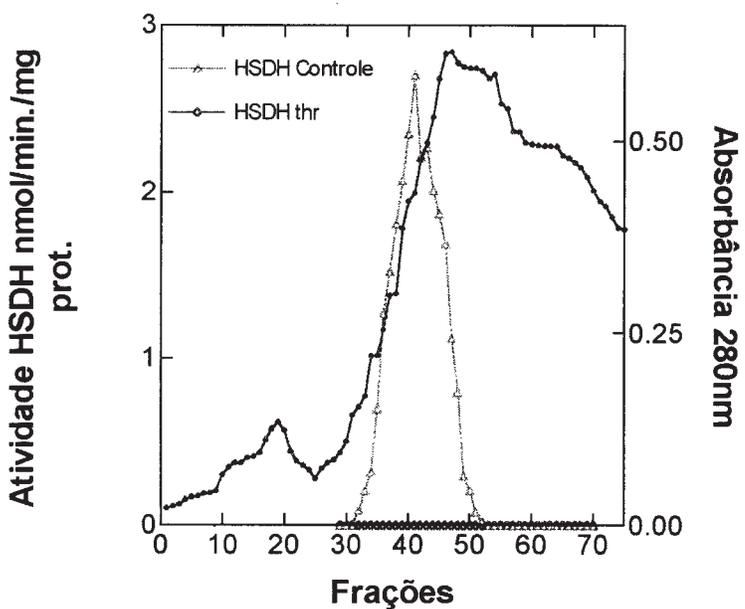
D**E**

Figuras 5.21D e 5.21E: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 100-350mM de KCl de KCl. (D) AK Controle e Tratamento treonina 5mM; (E) AK Controle, Tratamento treonina 5mM, HSDH Controle e Tratamento treonina 5mM.

F



G



Figuras 5.21F e 5.21G: Padrão de eluição em coluna de troca iônica da AK parcialmente purificada de sementes de arroz, em um gradiente linear de 100-350mM de KCl(F), AK Controle e HSDH Controle; (G) HSDH Controle e Tratamento treonina 5mM.

5.6. Filtração em gel em coluna de Sephacryl S200 para purificação e determinação de peso molecular:

Os resultados obtidos dos ensaios realizados com as frações provenientes da eluição da AK na coluna de filtração em gel Sephacryl S200 revelaram somente um pico de atividade de AK composto por 10 frações (19-28) (Figura 5.22A). Os tratamentos realizados com os aminoácidos lisina e treonina separadamente demonstraram que a atividade das primeiras 5 frações do pico de atividade Controle puderam ser inibidas na presença de treonina e menos por lisina (Figuras 5.22A, B e C). As últimas cinco frações do pico tiveram o comportamento contrário, tendo suas atividades fortemente inibidas por lisina e pouco por treonina. Esses tratamentos permitiram identificar as frações correspondentes às isoformas sensível à lisina (24-28) e a sensível à treonina (19-23). O tratamento com os dois aminoácidos, lisina e treonina juntos, mostrou que a atividade Controle observada no pico equivale a soma das atividades das duas isoenzimas separadamente, apresentando uma inibição quase total de todas as frações. Estes tratamentos permitiram determinar qual a fração que continha maior atividade de cada uma das isoenzimas, determinando quais as frações pico de cada uma delas.

A fração 25 representa o pico de atividade Controle da AK pois apresenta a maior atividade de todas as frações. O pico de atividade da isoforma sensível a inibição por lisina também se encontra na fração 25, pois é a fração de maior atividade com a maior inibição por lisina (Figura 5.22B). Os pesos moleculares foram estimados utilizando-se a curva de calibração da coluna utilizada (Figura 5.23), a partir de equação de regressão linear, calculada pelos volumes de eluição de padrões apropriados.

Para a isoforma sensível à inibição por lisina (Figura 5.22A, frações 24-28) o peso molecular foi estimado em 163 kDa e no caso da isoforma sensível à inibição por treonina (Figura 5.22A, frações 19-23) em 186 kDa.

As frações obtidas desta eluição também foram testadas para a atividade da HSDH. Os resultados, apresentados nas Figuras 5.22 E, F e G, mostram que a atividade de HSDH foi encontrada somente na frações de 18-26, sendo o pico de atividade na fração 23. Todas as frações tiveram suas atividades totalmente inibidas pela adição de 5mM de treonina (Tratamento treonina). Apesar de apresentar-se como um pico mais amplo em número de frações, o pico de atividade da HSDH coincidiu com o pico de AK sensível à treonina, sugerindo um peso molecular similar ao desta AK (186 kDa).

A

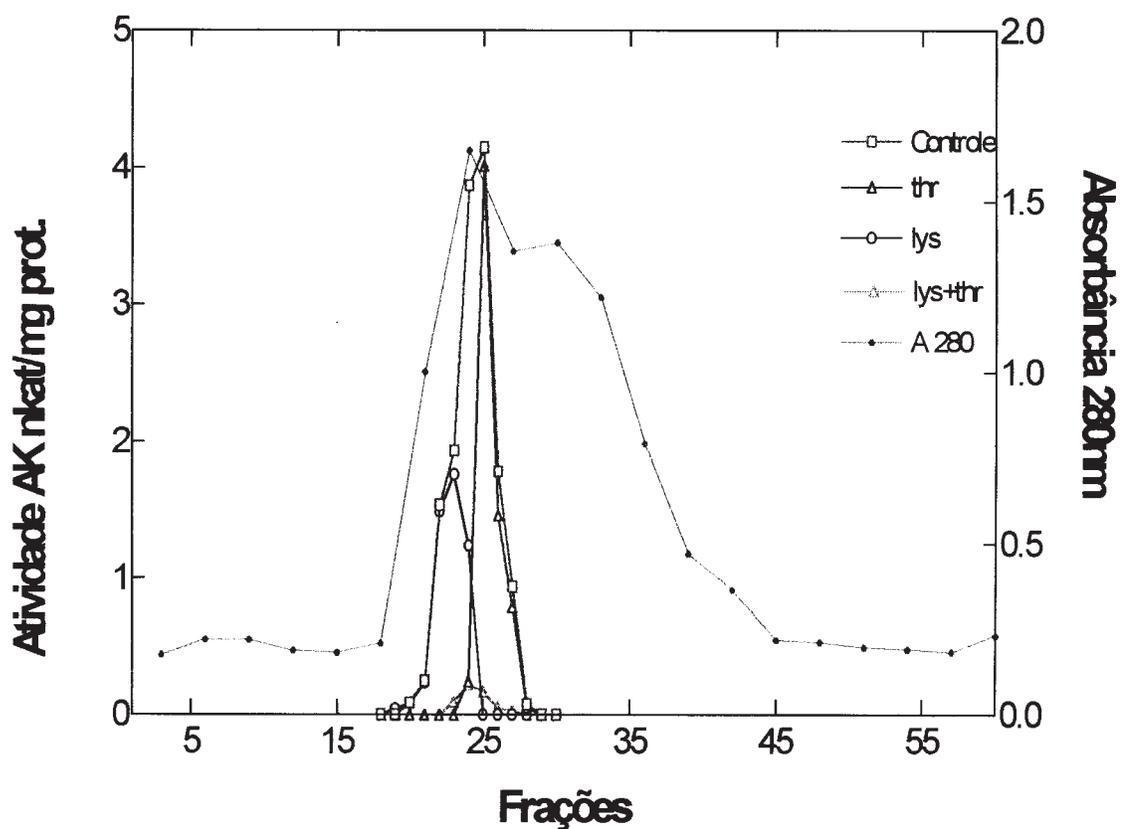
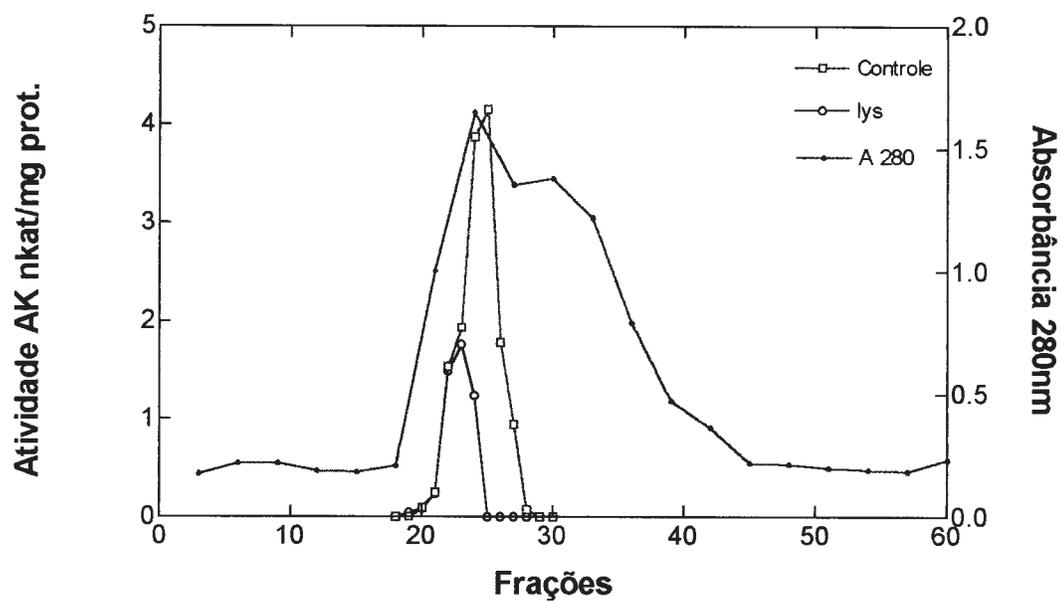
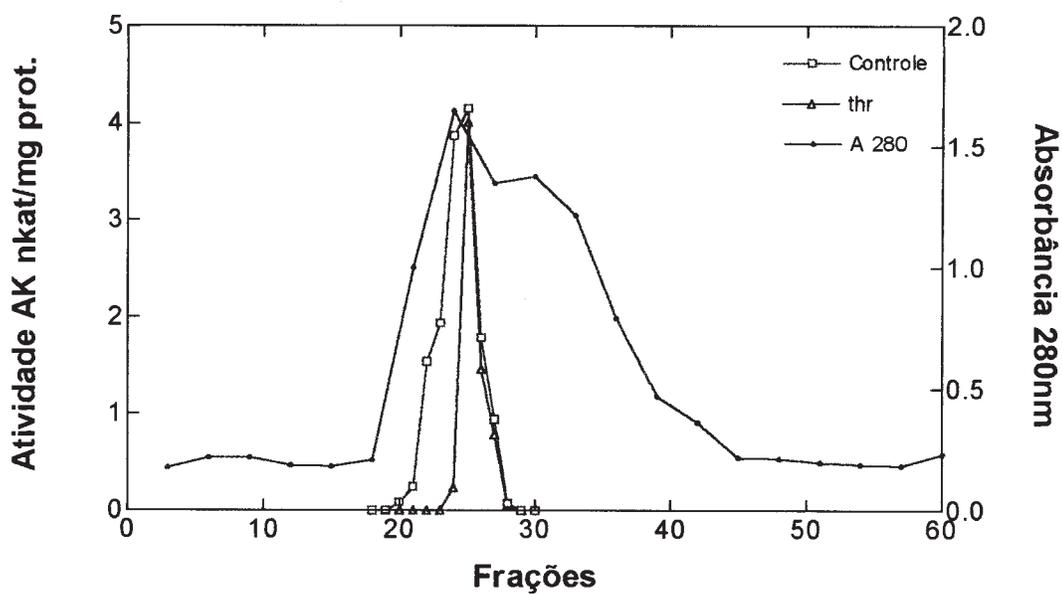
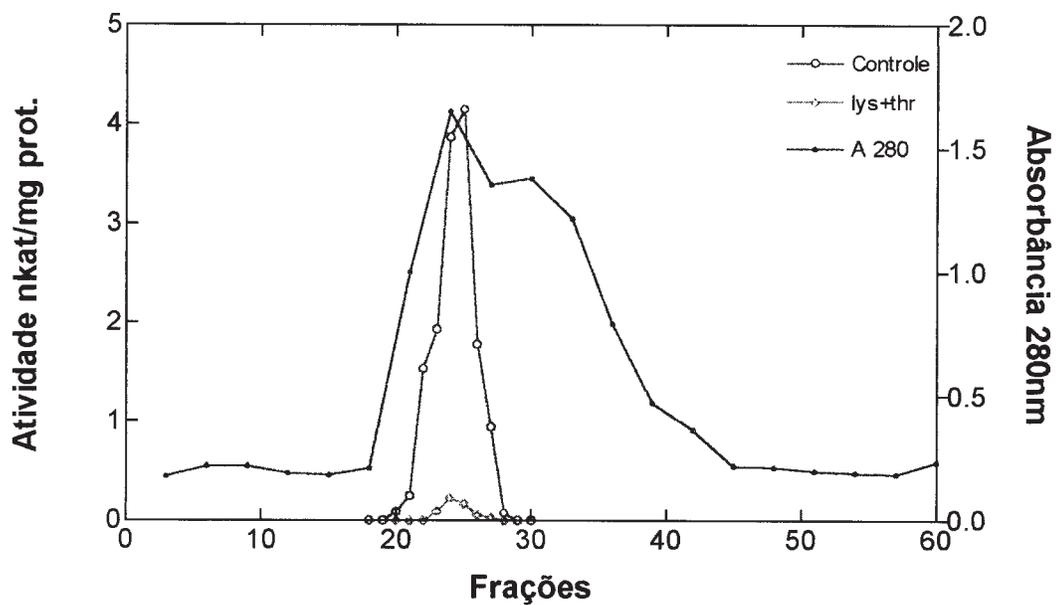


Figura 5.22A: Eluição da AK parcialmente purificada de sementes de arroz em coluna de filtração em gel Sephacryl S200. Os tratamentos incluem a presença dos respectivos aminoácidos na concentração final de 10mM.

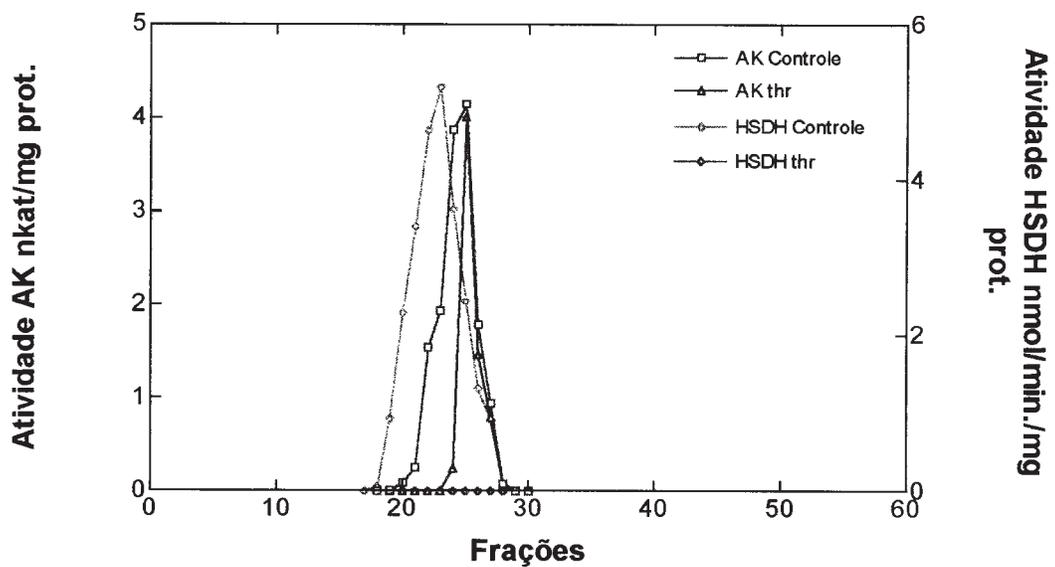
B**C**

Figuras 5.22B e 5.22C: Eluição da AK parcialmente purificada de sementes de arroz em coluna de filtração em gel Sephacryl S200 (B) AK Controle e Tratamento lisina. (C) AK Controle e Tratamento treonina.

D

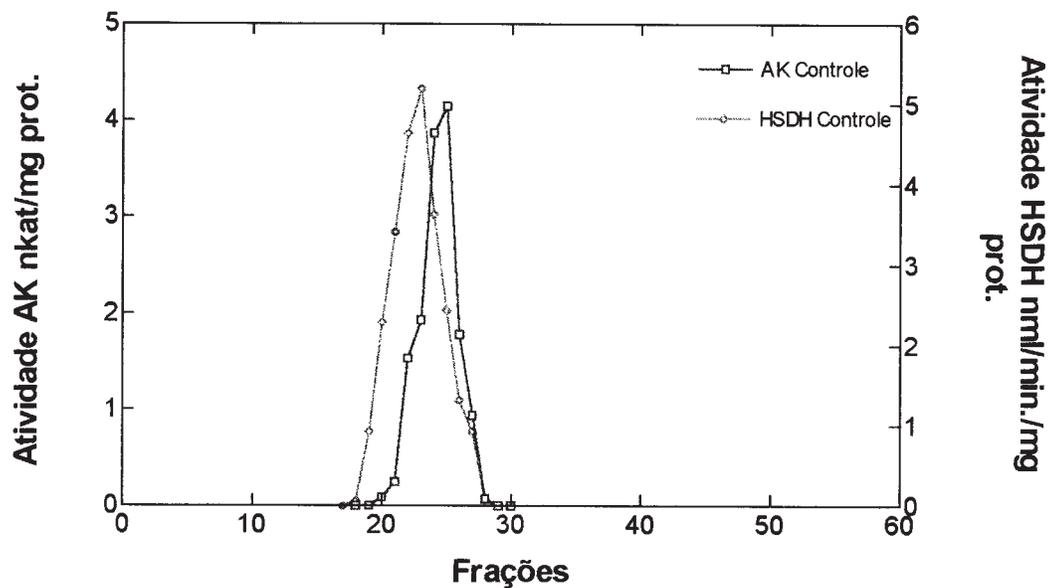


E

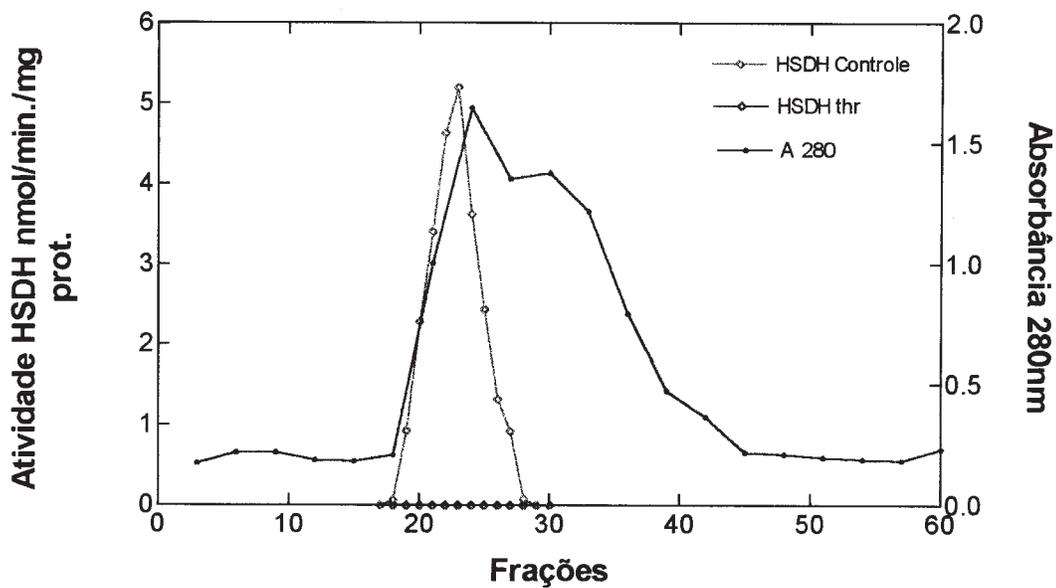


Figuras 5.22D e 5.22E: Eluição da AK parcialmente purificada de sementes de arroz em coluna de filtração em gel Sephacryl S200 (D) AK Controle e Tratamento lys+thr. (E) AK Controle e Tratamento treonina, HSDH Controle e Tratamento treonina.

F



G



Figuras 5.22F e 5.22G: Eluição da AK parcialmente purificada de sementes de arroz em coluna de filtração em gel Sephacryl S200. (F) AK Controle e HSDH Controle. (G) HSDH Controle e Tratamento treonina.

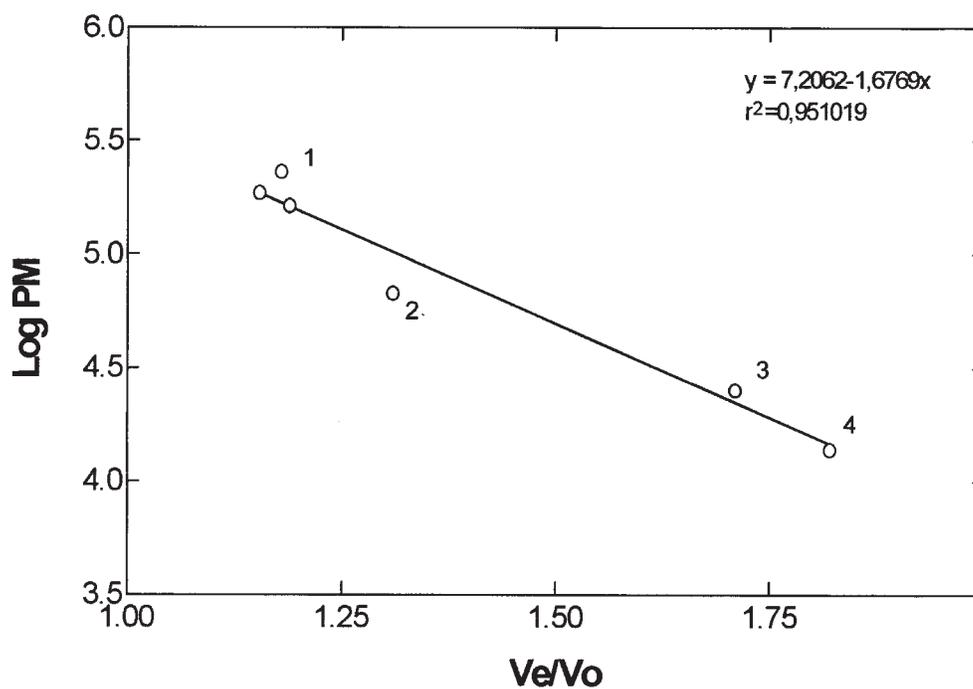


Figura 5.23: Curva de calibração e determinação de peso molecular da coluna de filtração em gel Sephacryl S200: 1 Catalase (232 kDa), 2 Soroalbumina Bovina (67 kDa), 3 Quimiotripsina A (25 kDa) e 4 Ribonuclease A (13,7 kDa), AK sensível a treonina, AK sensível a lisina.

5.7. Tabela de Purificação da AK de sementes imaturas de arroz:

A Tabela 5.8 apresenta o resultado da purificação da AK. Esta tabela foi feita com o resultado de uma purificação realizada de acordo com o protocolo final de purificação parcial estabelecido. Foi escolhida dentre várias outras tabelas calculadas com base nas purificações parciais realizadas, por representar bem o padrão encontrado nas demais tabelas.

Como pode ser observado, até o final dos passos de purificação utilizados a atividade da AK foi purificada cerca de 28 vezes. A primeira alíquota de purificação, o extrato bruto, não pôde ser considerado como o início da purificação por apresentar atividade de outras enzimas que não a AK, detectadas por não apresentarem inibição quando feitos ensaios com a presença de lisina e/ou treonina. Portanto, a purificação obtida da fração do extrato bruto até a fração depois do fracionamento com sulfato de amônio não pode ser levada em conta para o cálculo da purificação final. A maior eliminação de proteínas ocorreu no passo de precipitação com sulfato de amônio, diminuindo a quantidade de proteína de cerca de 11200mg/ml presente no extrato bruto para cerca de 840mg/ml. O passo de maior eficácia na purificação foi a filtração em gel em coluna Sephacryl S200, que também foi o passo que apresentou o pico mais definido, com menor número de frações.

Para a HSDH, a purificação obtida com a metodologia empregada foi semelhante à obtida para a AK. Porém, diferente do encontrado para a AK, a atividade da HSDH no extrato bruto pôde ser levado em conta na purificação total, o que demonstra que os passos de purificação posteriores ao extrato bruto foram menos eficientes na purificação desta enzima do que na purificação da AK. O passo de maior purificação também foi a eluição em coluna de filtração em gel Sephacryl S200.

Passos de purificação	Volume (ml)	Proteína total (mg/ml)	Atividade total		Atividade específica		Rendimento (%) [*]		Purificação (vezes)	
			AK [♣]	HSDH [♣]	AK [♣]	HSDH [♣]	AK	HSDH	AK	HSDH
Extrato bruto	730,0	11.278	-----	2.255,6	-----	0,2	-----	100,0	-----	-----
20-50% (NH ₄) ₂ SO ₄	86,0	841,0	50,4	682,9	0,06	0,8	100,0	30,3	-----	4,0
FFQ-Sepharose ^{**}	71,0	114,3	24,2	379,5	0,212	3,3	48,0	16,8	3,5	16,5
Sephaeryl S200	20,0	24,6	41,8	154,2	1,7	6,3	82,8	31,3	28,3	31,30

Tabela 5.8: Tabela de purificação parcial da AK de sementes imaturas de arroz.

♣ AK: Atividade total expressa em nkat; atividade específica expressa em nkat/mg prot.

♣ HSDH: Atividade total expressa em nmol/min.; atividade específica expressa em nmol/min./mg prot. * relativo à atividade inicial

** Gradiente 100-350mM de KCl

5.8. Eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturantes:

5.8.1. Eletroforese das frações resultantes da purificação:

As Figuras 5.24 e 5.25 correspondem, respectivamente, aos géis de poliacrilamida não desnaturantes feitos com as frações provenientes dos gradientes 0-500mM de KCl e 100-350mM de KCl. Nestes géis não foi possível identificar quais bandas representam as isoenzimas da AK. Porém, pôde-se notar que o gel do gradiente 100-350mM apresentou uma quantidade menor de bandas do que o gel do gradiente 0-500, já que neste gradiente houve a eliminação de proteínas eluídas com menos de 100mM e mais de 350mM, indicando uma purificação obtida com a adoção do gradiente 100-350mM de KCl no protocolo de purificação.

A Figura 5.26 corresponde ao gel de poliacrilamida não desnaturante das frações obtidas da eluição em coluna de filtração em gel Sephacryl S200. Como pode ser visto neste gel, as primeiras frações contém as bandas mais pesadas e as frações seguintes contém gradualmente as bandas mais leves, correspondendo portanto ao padrão de eluição esperado numa coluna de filtração em gel. Novamente, não foi possível identificar quais as bandas correspondentes às duas isoenzimas da AK identificadas nos gradientes. A purificação obtida neste passo em relação ao anterior (gradiente 100-350) pode ser percebida na concentração das bandas em um menor número de frações, inclusive revelando bandas mais leves não visíveis anteriormente, que mais concentradas tornaram-se visíveis.

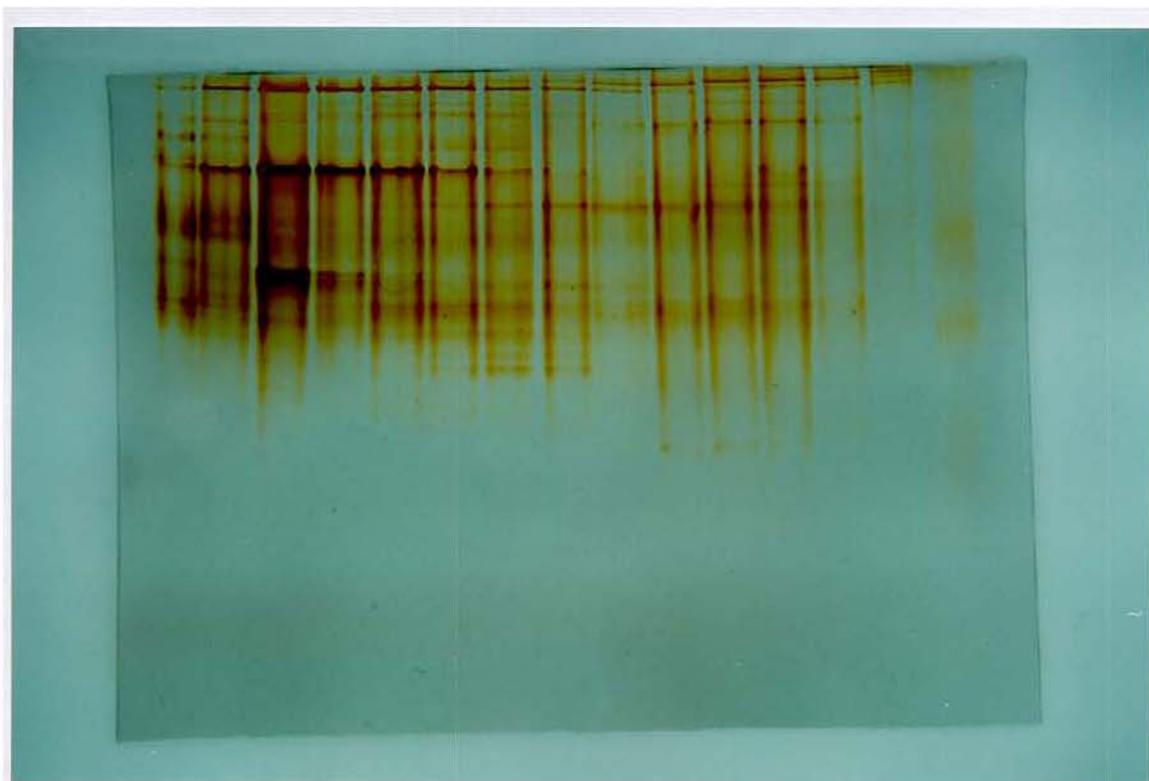


Figura 5.24: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK em um gradiente linear de 0-500mM de KCl, em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose. As quinze canaletas contêm as seguintes frações nesta ordem: 1-30, 2-32, 3-34, 4-36, 5-37, 6-40, 7-43, 8-44, 9-46, 10-48, 11-50, 12- 55, 13-60, 14-65 e 15-marcadores de peso molecular. Para este gradiente, o pico de atividade da AK Controle e da AK sensível à lisina foi detectado na fração 43 e o da AK sensível à treonina na fração 37.

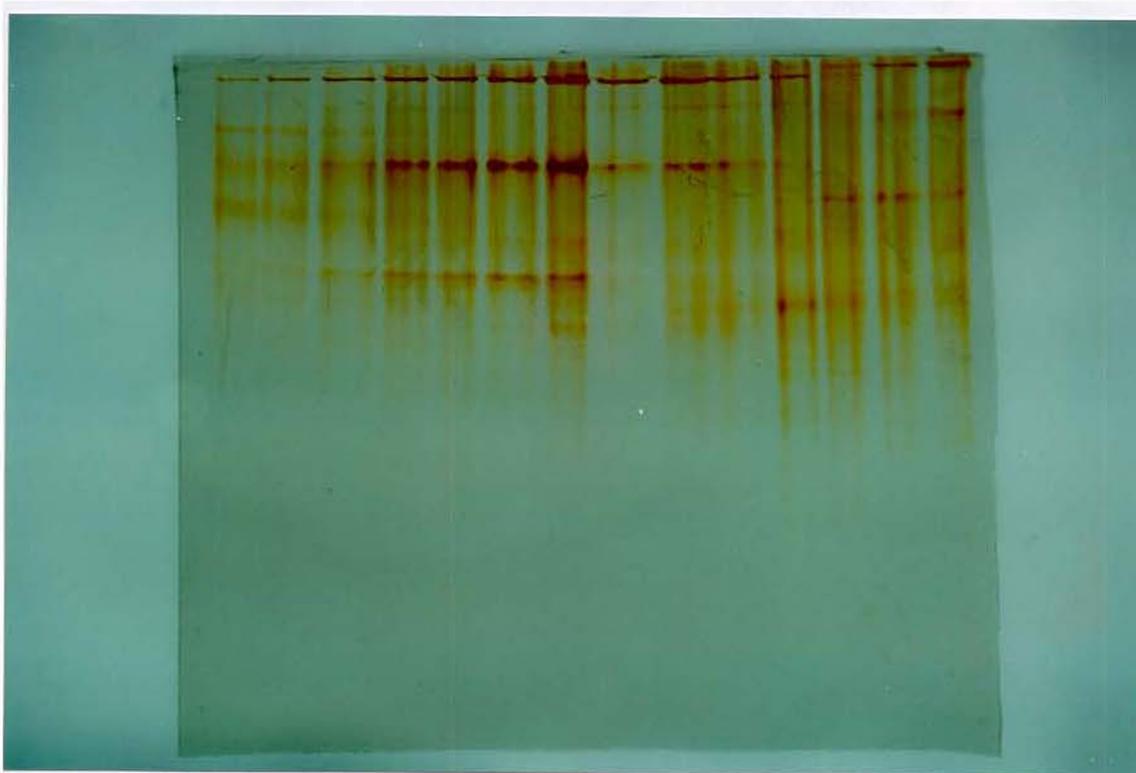


Figura 5.25: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK em um gradiente linear de 100-350mM de KCl, em coluna de troca iônica FFQ-Sepharose. As quinze canaletas contém as seguintes frações nesta ordem: 1-30, 2-33, 3-36, 4-39, 5-42, 6-45, 7-48, 8-51,9- 54, 10-58,11-60, 12-63, 13-66, 14-69 e 15-75. Para este gradiente, o primeiro pico de atividade da AK Controle e da AK sensível à treonina foi detectado na fração 42, e o segundo pico de atividade Controle e da AK sensível à lisina foi detectado na fração 58.

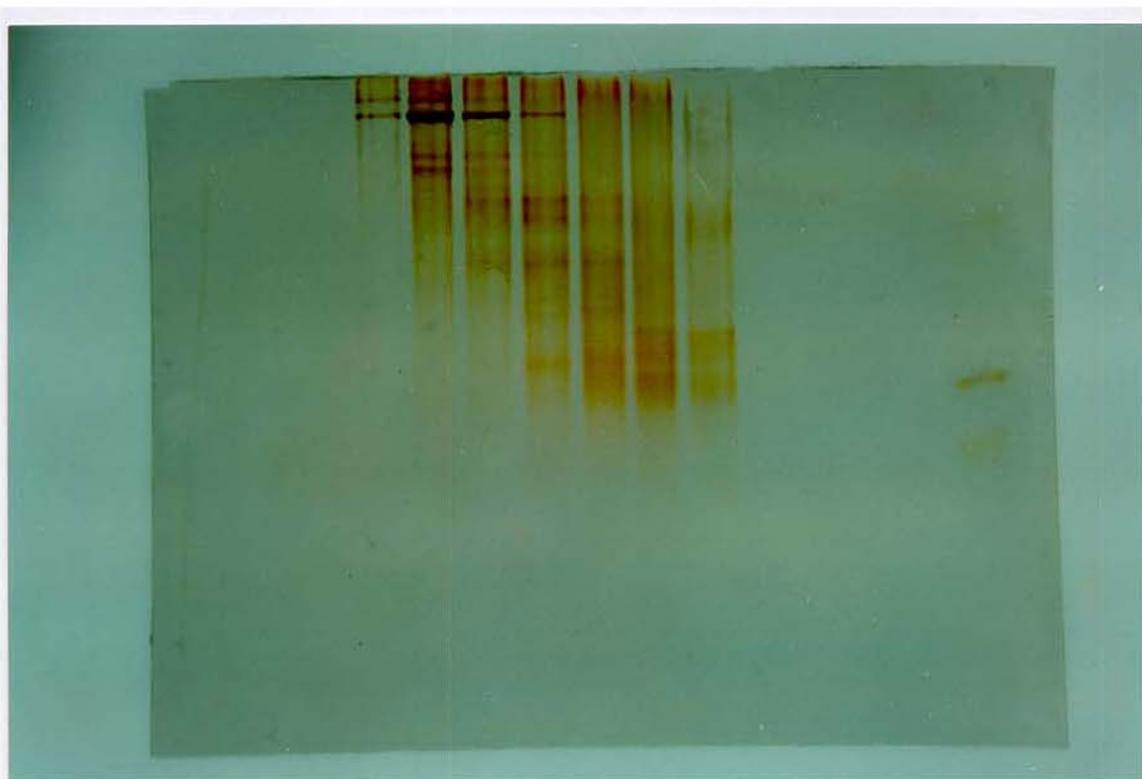


Figura 5.26: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas da eluição da AK de coluna de filtração em gel Sephacryl S200. As quinze canaletas do gel correspondem as seguintes frações nesta ordem: 1-5, 2-10, 3-15, 4-20, 5-23, 6-25,7-28, 8-30,9-32, 10-34, 11-40, 12-45, 13-50, 14-55 e 15-marcadores de peso molecular. Nesta eluição o pico de AK Controle e o pico da isoforma sensível à lisina foi detectado na fração 25, sendo o pico da isoforma sensível à treonina na fração 23. A primeira canaleta com proteínas visíveis no gel corresponde a fração 20. Na última canaleta está o marcador de peso molecular.

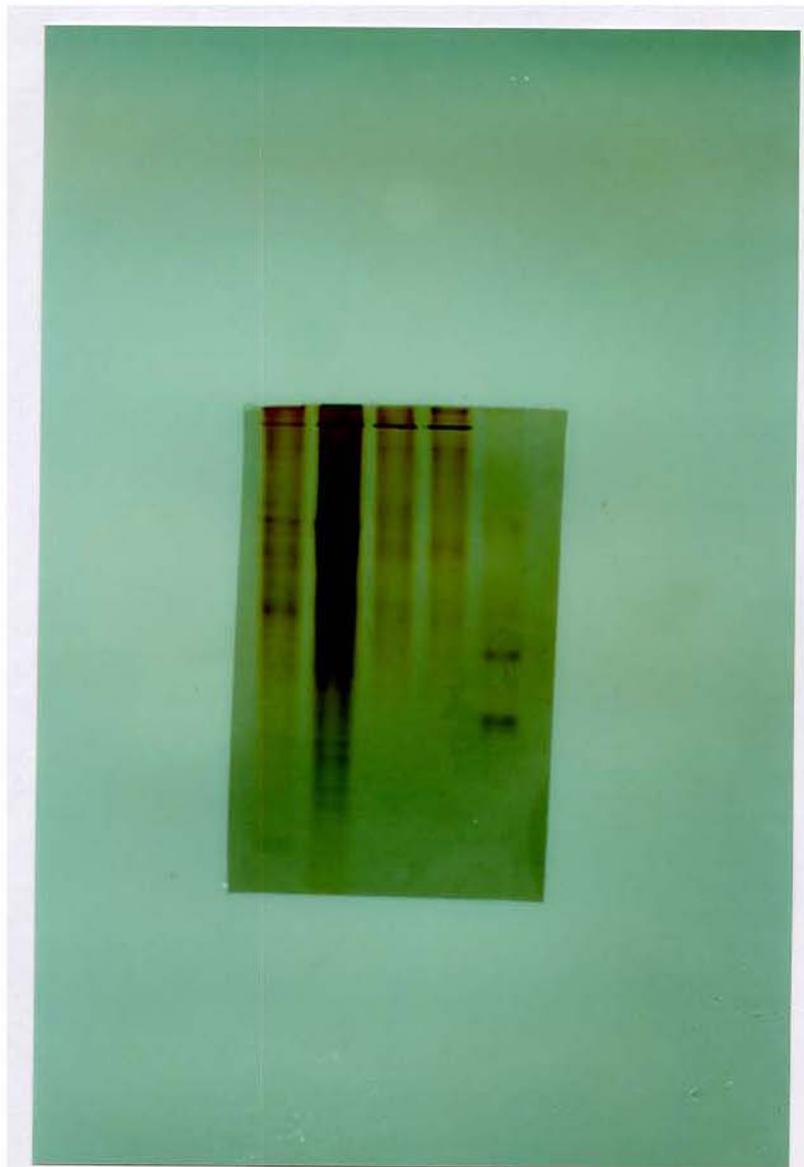


Figura 5.27: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com prata das frações obtidas nas etapas de purificação da AK. As canaletas do gel correspondem as seguintes frações nesta ordem: 1-extrato bruto, 2-após precipitação 20-50% sulfato de amônio, 3-frações com atividade de AK reunidas do gradiente 100-350mM, 4-frações com atividade de AK reunidas da Sephacryl S200 e 5-marcadores de peso molecular.

6. DISCUSSÃO:

Para o início dos experimentos deste trabalho, o primeiro passo foi a identificação da presença das atividades das enzimas AK e HSDH na planta de arroz. Como até então apenas um trabalho preliminar havia sido feito sobre a atividade da AK em arroz (Shaw e Ku, 1984), utilizando plântulas da variedade Shingchu 56, foi necessário identificar em quais tecidos a atividade de ambas as enzimas poderia ser melhor detectadas na variedade IAC-165.

Os resultados obtidos no experimento de tecido especificidade mostraram que dentre os tecidos analisados, as atividades das enzimas AK e HSDH de arroz podiam ser melhor detectadas em sementes. Folhas, raízes e sementes, assim como plântulas e células em suspensão, são tecidos que já foram extensivamente utilizados como material biológico nas pesquisas anteriores sobre a atividade das enzimas AK e HSDH em plantas. Tendo sido detectada a localização intracelular das duas enzimas nos cloroplastos (Bryan et al., 1977b e Wallsgrove et al., 1983), poderia se esperar que a atividade encontrada em folhas fosse maior do que a atividade encontrada em sementes e raízes. A alta oxidação dos extratos obtidos de folhas durante o processo de extração, mesmo com o uso de inibidores de compostos fenólicos como o PVPP, deve ter diminuído a atividade encontrada

para ambas as enzimas neste tecido. Além disto, todos os trabalhos anteriores utilizando AK extraída de folhas foram caracterizados por baixas atividades.

Embora o primeiro isolamento da atividade da enzima HSDH em plantas tenha sido feito utilizando raízes de milho como material biológico (Bryan, 1969), não foi possível encontrar atividade de HSDH nos extratos obtidos de raízes de arroz. Para AK, embora tenha sido detectada atividade em raízes de arroz, esta foi muito baixa se comparada à atividade encontrada em sementes e folhas. A baixa quantidade de proteína presente nos extratos de raízes (dados não demonstrados) pode ter sido um fator que contribuiu para que os níveis de atividade de ambas as enzimas tenham sido baixos neste tecido.

Pelos resultados obtidos, as sementes demonstraram ser o melhor material biológico para a detecção da atividade e purificação de ambas as enzimas. A análise da atividade da AK em sementes já havia sido feita em trigo (Wong e Dennis, 1973a) e soja (Matthews e Widholm, 1979). Sendo a semente um órgão de armazenamento de nutrientes, inclusive proteínas e aminoácidos, parece natural que este seja um tecido com alta atividade das enzimas responsáveis pela regulação da síntese de lisina e treonina. Além disso, os principais aminoácidos translocados para as sementes são asparagina e glutamina, tornando então necessária a existência de toda a “maquinaria” enzimática para a conversão destes nos demais necessários à semente.

Estudos sobre a síntese de lisina e seu transporte na planta de milho, mostraram que este aminoácido incorporado nas proteínas de reserva da semente podia ser sintetizado no próprio endosperma (Sodek, 1976) ou translocado de outras partes da planta (em quantidades menores) através do floema (Lawrence e Grant, 1964; Da Silva e Arruda, 1979). Características da semente de arroz no estágio utilizado para as análises não permitiram que o endosperma fosse separado do embrião, o que poderia fornecer uma análise mais detalhada sobre

qual destes tecidos estaria contribuindo mais com a atividade das enzimas, visto que em milho a atividade específica é maior no embrião (Brennecke et al., 1996).

Em relação à atividade da AK, os tratamentos feitos com lisina e treonina indicaram a presença de duas isoenzimas independentemente reguladas por cada um destes aminoácidos nas sementes e nas folhas. A maior inibição causada pela lisina nestes dois tecidos indicou uma predominância de uma isoforma regulada por este aminoácido em relação a uma isoforma regulada por treonina, principalmente em sementes.

A maioria das plantas estudadas até o momento apresenta duas isoformas da HSDH: uma sensível e outra resistente à inibição por treonina. Em milho, a isoforma resistente é responsável por cerca de 20% da atividade total da HSDH encontrada nas plântulas e em folhas isoladas, sendo o restante da atividade atribuída à isoforma sensível (DiCameli e Bryan, 1975). De modo geral, a maioria da atividade de HSDH detectada nas diversas plantas e tecidos analisados pode ser atribuída a isoforma sensível à treonina. Para a HSDH de arroz, o padrão de inibição obtido em folhas e sementes indica a existência de uma isoenzima sensível à inibição por treonina, capaz de inibir cerca de 40-60% da atividade. O restante da atividade não inibida pela treonina pode ser atribuída à uma isoforma resistente.

Tendo sido detectada a maior atividade de ambas as enzimas nas sementes, buscou-se determinar possíveis diferenças em suas atividades durante o desenvolvimento deste órgão. Ambas as enzimas apresentaram maior atividade no início do desenvolvimento da semente. Sendo o início do desenvolvimento o período de maior crescimento das sementes em geral, com a produção das proteínas de reserva, seria de se esperar que a atividade das enzimas de regulação da síntese de lisina e treonina fosse também maior neste período.

A proporção de inibição causada pelos aminoácidos lisina e treonina na atividade da AK manteve-se semelhante durante o desenvolvimento da semente, com a lisina inibindo mais fortemente a atividade da AK do que a treonina. Em experimentos anteriores realizados com a AK em plantas, foram observadas modificações em relação às isoformas predominantes durante o desenvolvimento de culturas de células de cenoura (Davies e Miflin, 1978; Sakano e Komamine, 1978) e soja (Matthews e Widholm, 1979). Em arroz, estas modificações de predominância não foram encontradas durante o desenvolvimento da semente. Esta diferença em relação às culturas de células de cenoura e soja pode-se dever às características da própria planta de arroz, ou de diferenças na regulação da biossíntese de lisina e treonina nas células submetidas ao cultivo *in vitro*.

Para a HSDH, foi detectada a diminuição da proporção da isoforma sensível à inibição por treonina durante o desenvolvimento, ao longo dos três estágios, assim como diminuição da própria atividade da HSDH. Esta diminuição na proporção da forma sensível também foi encontrada nos estudos com plântulas de milho (DiCamelli e Bryan, 1975; Matthews et al., 1975). Como já mencionado, o início do desenvolvimento da semente é a fase em que a semente mais se desenvolve e as proteínas de reserva são formadas. Sendo assim, a diminuição da atividade poderia ser explicada por uma menor necessidade de treonina na semente mais desenvolvida. Nos experimentos de purificação das enzimas, discutidos mais adiante, não foi possível detectar uma isoforma da HSDH resistente à treonina. A presença de KCl no tampão HSDH1 que compõe o ensaio da enzima, assim como de treonina nos tampões de extração e eluição, pode ter contribuído para o aumento da inibição causada pela treonina, como já relatado para milho (DiCamelli e Bryan, 1975). Estudos mais detalhados sobre o efeito do KCl seriam necessários para se determinar até que ponto o K^+ não estaria sensibilizando formas resistentes, como já relatado para a HSDH de

células de suspensão de cenoura (Matthews et al., 1989). Pela inexistência de dados anteriores sobre a atividade e regulação da HSDH em arroz, torna-se difícil estabelecer se essas diferenças são próprias da cultura de arroz ou se foram detectadas apenas nas condições utilizadas neste trabalho.

Através do experimento de fracionamento com sulfato de amônio realizado para ambas as enzimas foi determinado que a melhor faixa de saturação com sulfato de amônio para recuperar a atividade da enzima é a de 20-50%. Este é um dado interessante, visto que todas as demais plantas estudadas a faixa otimizada e utilizada foi de 35-60% (Aarnes e Rognes, 1974; Relton et al., 1988; Dotson et al., 1989; Azevedo et al., 1992a).

A medida da atividade da AK neste trabalho foi baseada no ensaio do hidroxamato, utilizado pela primeira vez para medir a atividade da AK por Pechere e Capony (1968). Este ensaio foi escolhido, ao invés dos ensaios acoplados da Piruvato Quinase-Lactato Desidrogenase (Cheschire e Miflin, 1975) ou da Aspartato Semialdeído Desidrogenase de levedura (Dotson et al., 1990a), por sua praticidade, principalmente quando um grande número de frações precisa ser analisado, o que é comum em experimentos de purificação. A maior desvantagem do ensaio do hidroxamato para medir a atividade da AK é o fato da hidroxilamina, na presença de ATP e Mg^{++} , poder ser convertida a hidroxamato pela atividade de duas outras enzimas comumente encontradas em plantas: a Asparagina Sintetase (EC 6.3.1.1) e a Aspartil-tRNA Sintetase (EC 6.1.1.12). A inclusão de Tratamentos com lisina e treonina leva à inibição somente a atividade da AK, podendo então ser usada como uma maneira de verificar se a absorvância obtida no ensaio é ou não derivada somente da AK. Neste trabalho, foram verificadas absorvâncias inespecíficas da AK somente na fração do extrato bruto, não sendo detectadas nos passos de purificação seguintes, provavelmente porque

estas enzimas (Asparagina Sintetase e Aspartil-tRNA Sintetase) sejam precipitadas numa faixa de saturação de sulfato de amônio diferente da AK.

O ensaio utilizado nos experimentos iniciais foi o otimizado para milho (Azevedo et al., 1992a), e neste trabalho foi otimizado para a AK de arroz. A otimização do ensaio visou determinar as melhores condições para obtenção de absorbâncias altas que refletissem diretamente e especificamente a atividade da AK. Este fato é particularmente importante devido aos baixíssimos níveis de atividade que esta enzima apresentou nos organismos nos quais foi estudada até então.

Pela variação da concentração do aspartato no ensaio, foi observado um aumento na absorbância que indicou que a enzima não estaria saturada com o substrato. Este resultado, contudo, é bastante curioso, pois em trabalhos anteriores que utilizaram concentrações de até 100mM de aspartato, não foram observadas limitações de substrato, nem mesmo quando frações altamente purificadas e concentradas foram usadas. Portanto, optou-se pela concentração de 100mM de aspartato no ensaio, que não demonstrou ser insuficiente durante o desenvolvimento deste trabalho, visto que amostras com as mais variadas concentrações de AK foram utilizadas sem qualquer indício das mesmas estarem subestimadas.

Como observado na figura 5.8, o ensaio não produziu reação perfeitamente linear ao longo de 90 minutos, mesmo variando-se a concentração de aspartato. Após 30 minutos de reação ocorreu uma sensível modificação na inclinação da reta, que no caso da concentração de 100mM de aspartato indicou que a atividade da AK poderia estar sendo subestimada em aproximadamente 50%. Esta não linearidade tem sido observada em trabalhos anteriores com este método de ensaio da AK (Davies, 1977a e Azevedo et al., 1992a). É possível que o próprio tempo de 30 minutos de reação também não esteja representando a velocidade

inicial de reação, pois a absorvância não foi medida em tempos inferiores a 30 minutos. Contudo, adotar tempos de ensaio inferiores a 30 minutos significaria estar trabalhando com absorvâncias baixas.

Pela análise da interferência de aminoácidos na atividade da AK, foi verificado que dentre os aminoácidos testados, somente lisina e treonina possuem efeito inibitório sobre a atividade da AK, mesmo nas concentrações mais baixas de 1 e 2mM. Estudos cinéticos feitos para a isoforma sensível à lisina de células em suspensão de milho purificada até a homogeneidade (Dotson et al., 1990a) demonstraram que esta enzima possui um sítio de ligação específico para a lisina, e que outros aminoácidos básicos não foram capazes de causar o mesmo efeito inibitório. A purificação até a homogeneidade da isoenzima da AK sensível à treonina também permitiu a identificação de um sítio específico de ligação para treonina (Matthews et al., 1989). As inibições causadas por lisina e treonina são indícios da presença de duas isoenzimas da AK, uma sensível à lisina e outra sensível à treonina.

Valina e metionina não tiveram nenhum efeito inibitório sobre a AK, ao contrário, induziram o aumento da atividade quando presentes nas concentrações de 5 e 10mM. O efeito de ativação da atividade da AK pela presença de valina foi relatado anteriormente em outras plantas (Aarnes e Rognes, 1974; Davies e Mifflin, 1977). O aumento da atividade constatada, principalmente nas concentrações de 5 e 10mM, poderia levantar suspeitas sobre ser este um real efeito de ativação, ou apenas um efeito de aumento da absorvância causado por maiores concentrações destes aminoácidos no ensaio. Porém, o fato de ter sido feito um Branco para cada Tratamento adicionado do aminoácido na maior concentração (10mM) diminui esta suspeita, levando à possibilidade de que uma ativação real da AK por estes dois aminoácidos seja feita somente em concentrações mais altas. Uma explicação para este fato seria a inexistência na

enzima de um sítio catalítico específico para estes aminoácidos, tornando necessária a existência dos mesmos em maiores concentrações para que o efeito fosse atingido. Outro aspecto importante a ser ressaltado é o fato da metionina ser um aminoácido formado na própria via regulada pela AK, sendo mais provável que levasse à inibição da enzima, e não à ativação. A S-adenosilmetinina, derivada da metionina, demonstrou ser capaz de inibir a atividade da AK de arroz, e mais ainda em conjunto com a lisina (dados preliminares não apresentados neste trabalho), assim como demonstrado em outras plantas (Rognes et al., 1980; Relton et al., 1988, Azevedo et al., 1992a). A metionina não apresentou o mesmo comportamento.

O *pH* ótimo determinado para a atividade da AK nos experimentos de otimização do ensaio foi de 7,4. Tendo sido a AK localizada nos cloroplastos (Wallsgrave et al., 1983), seria esperado encontrar um *pH* ótimo de atividade perto do determinado para os cloroplastos, que no estroma varia de 8.0 durante o dia a 7.3-7.5 durante a noite (Lea e Leegood, 1993). Porém, a elevação do *pH* do ensaio para 8.0 levou a uma diminuição de 34% na atividade da AK. É possível que nas condições de ensaio determinadas *in vitro* o *pH* ótimo de atividade da AK seja diferente de seu *pH* ótimo *in vivo*.

A concentração dos co-fatores Mg^{++} e ATP influenciam diretamente os níveis de atividade da enzima. A proporção de Mg^{++} /ATP utilizada nos ensaios de atividade da AK de arroz foi otimizada em 12,5mM de Mg^{++} e 20mM de ATP. A quantidade de ATP presente no ensaio pode ser fortemente limitante, principalmente pela possibilidade da presença de ATPases no extrato, que competiriam com a AK pelo ATP. Sendo assim, o ATP precisa estar presente em excesso para garantir a saturação necessária para a atividade total da AK. A presença de ATPases em trabalhos sobre a AK utilizando extratos de plantas foi detectada em cenoura (Relton et al., 1988) e milho (Azevedo et al., 1992a). Em

ambas as espécies, bandas de ATPases foram observadas em géis corados para atividade de frações de AK já purificadas. A concentração de Mg^{++} normalmente presente no cloroplasto é de 3-6mM (Lea e Leegood, 1993), menor do que a utilizada nos ensaios. Porém, na condição de 20mM de ATP, a concentração de 12.5mM de Mg^{++} foi a que forneceu a melhor proporção Mg^{++}/ATP para a atividade da enzima.

A temperatura de encubação do ensaio da AK foi otimizada em 35°C, a mesma temperatura ótima obtida anteriormente para a AK de arroz (Shaw e Ku, 1984) e milho (Azevedo et al., 1992a). Assim como no trabalho de milho, mas diferentemente do obtido no trabalho de arroz, na temperatura de 45°C não foi detectada a inativação total da enzima, o que só ocorreu a 55°C. Esta diferença em relação ao trabalho anterior de arroz pode ser devido ao fato de que a variedade de arroz utilizada neste trabalho, assim como a linhagem de milho da qual se obteve a cultura de células em suspensão (Azevedo et al., 1992a), são derivadas de um ambiente tropical quente. Sendo assim, pode-se imaginar que as enzimas das plantas provenientes de uma clima mais quente estejam aptas a suportar temperaturas mais elevadas. Com excessão dos trabalhos de arroz e milho, a temperatura de ensaio da AK sempre foi mantida em 30°C, sem que houvesse sido feita nenhuma otimização neste sentido. Portanto, fica difícil estabelecer se a temperatura ótima encontrada, assim como a temperatura de inativação, são características gerais nas plantas ou se diferem em relação à espécie/variedade.

Com relação à concentração de KCl e sua interferência na atividade da AK, nenhum efeito foi observado. Este aspecto é importante dada a variação na concentração de KCl nas frações obtidas durante a purificação em coluna de troca iônica. Além disso, já foi constatado que a concentração iônica pode afetar a

atividade enzimática de enzimas, como observado para a enzima LKR de milho (Cordeiro-Neto et al., 1997).

Durante os experimentos de purificação utilizando coluna de troca iônica, identificou-se inicialmente um pico de atividade da AK e um pico de HSDH por eluição do tipo “Step-Wise”, e posteriormente nos experimentos de eluição do tipo gradiente linear dois picos de atividade de AK e um de atividade de HSDH foram identificados. A eluição do tipo “Step-Wise” foi conduzida inicialmente para verificar a viabilidade deste tipo de resina na separação de proteínas e obter informações sobre as faixas de concentrações de KCl capazes de eluir as enzimas AK e HSDH, assim como, se possível, identificar as possíveis isoenzimas.

Posteriormente, com a adoção da eluição das isoenzimas AK e HSDH em gradientes lineares de concentração de KCl (0-500mM e 100-350mM), foi possível obter uma melhor purificação e identificar as isoenzimas. A utilização de um gradiente linear de 0-500mM de KCl identificou dois picos de atividade para a AK, que foram melhor separados com a utilização de um gradiente linear nas concentrações de 100-350mM de KCl, o primeiro sensível à inibição por treonina e insensível à inibição por lisina, e o segundo pico sensível à inibição por lisina e insensível à inibição por treonina. Estes dois picos de atividade da AK foram então considerados como duas isoenzimas da AK, diferentemente sensíveis à inibição por lisina e treonina. O primeiro pico em ordem de eluição, detectado com 225mM KCl, foi identificado como a isoforma sensível à treonina e o segundo pico, detectado com 285mM KCl, foi identificado como sendo a isoforma sensível à lisina. A atividade total encontrada foi considerada como a soma das atividades das duas isoenzimas presentes. Os tratamentos efetuados com as frações obtidas dos gradientes demonstraram a especificidade da inibição causada pelos dois aminoácidos em cada pico, indicando que a diminuição quase

total da atividade obtida nos ensaios com lisina e treonina juntos (lys+thr) devia-se à inibição de cada uma das isoformas separadamente.

Os dados obtidos neste trabalho e nos trabalhos anteriores com AK de plantas sugerem que a presença de pelos menos duas isoenzimas da AK, uma sensível à treonina e outra sensível à lisina, deva ser uma característica normal da regulação da biossíntese de lisina e treonina em plantas, assim como já determinado para microorganismos. Estas duas isoenzimas já foram detectadas e purificadas em ervilha (Aarnes e Rognes, 1974), cenoura (Relton et al., 1988; Matthews et al., 1989) e milho (Azevedo et al., 1992). Em outro trabalho com milho (Dotson et al., 1989), duas isoformas sensíveis à lisina foram identificadas, enquanto que a isoforma sensível à treonina não foi encontrada. Estudos feitos em milho (Dotson et al., 1989; Azevedo et al., 1992a), cenoura (Relton et al., 1988) e cevada (Bright et al., 1982a), indicaram a existência de duas isoformas sensíveis a lisina, sendo que uma delas também seria sensível à inibição por S-adenosilmetionina (Rognes et al., 1980; Relton et al., 1988, Dotson et al., 1989 e Azevedo et al., 1992a). Dados não apresentados neste trabalho indicaram a presença desta isoforma também em arroz, sendo que estudos mais detalhados serão conduzidos posteriormente.

A análise das frações obtidas nos gradientes em coluna de troca iônica da AK permitiram identificar a atividade de uma isoforma da HSDH sensível à inibição por treonina co-eluindo juntamente com a isoforma da AK sensível à inibição por treonina. A existência de uma isoforma da HSDH resistente à inibição por treonina já foi relatada em outras plantas estudadas quanto a atividade da HSDH. Esta isoforma parece estar presente em arroz nas frações provenientes da precipitação entre 20-50% com sulfato de amônio. Neste passo de purificação, nem toda a atividade da HSDH pôde ser inibida pela presença de treonina, indicando que o restante da atividade não inibida poderia de dever à uma

isoforma resistente. Porém esta isoforma não pôde ser detectada durante os experimentos com troca iônica e filtração em gel em Sephacryl S200. A incapacidade de detectar esta enzima após a coluna de troca iônica poderia ser devida à pouca afinidade desta enzima pela resina de FFQ-Sepharose, não se ligando completamente à coluna e portanto não tendo sua atividade detectada nas frações obtidas no gradiente. Contudo, ensaios feitos com a fração não ligante retirada da coluna de troca iônica após a aplicação da amostra não detectaram a atividade da enzima nesta fração, indicando que a mesma não estaria entre as proteínas que não se ligaram à coluna. Além disso, este tipo de resina foi utilizada com sucesso em experimentos com AK de milho (Azevedo et al., 1992b) onde a isoenzima da HSDH resistente à treonina foi identificada.

Outra explicação para a não indentificação de uma isoforma da HSDH resistente a treonina seria a dessensibilização da isoforma resistente em sensível, como já detectado em células de cenoura em suspensão (Matthews et al., 1989). Neste trabalho com HSDH de cenoura, a diálise da enzima feita em tampão com 5mM de treonina levou ao aparecimento somente da isoforma sensível à treonina, enquanto a diálise feita em tampão sem treonina e com K^+ levou à detecção das isoformas resistente e sensível à inibição por treonina. No caso das enzimas de arroz, as extrações da enzima AK utilizada nos experimentos de troca iônica (com cujas frações foram feitos os ensaios para a determinação da presença da HSDH) foram feitas em tampão Tris com 200mM de KCl e 2mM de treonina e as eluições feitas em tampão Tris 0-500mM de KCl com 0.1mM de treonina. Sendo assim, a presença de 2mM de treonina no tampão de extração poderia ter levado à interconversão da forma resistente, que não teria sido dessensibilizada nos demais procedimentos da purificação posteriormente. A confirmação desta possibilidade precisaria de mais experimentos sobre o efeito do K^+ e da treonina na atividade da HSDH de arroz, o que será realizado posteriormente. A utilização destas mesmas

condições de extração, eluição e ensaio nos experimentos com a HSDH de milho, onde uma isoforma resistente à inibição por treonina foi encontrada (Azevedo et al., 1992b), aliada às informações obtidas anteriormente, onde em todas as plantas estudadas foi possível detectar uma isoforma resistente, torna provável que em arroz realmente exista uma isoforma resistente à inibição por treonina, como observado nas frações de extrato bruto e após precipitação com sulfato de amônio, mas que não foi possível purificar posteriormente.

O peso molecular determinado por filtração em gel para as isoenzimas da AK em arroz foi de 163 kDa para a isoenzima sensível à lisina e 186 kDa para a isoenzima sensível à treonina. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em milho, onde os pesos de 150 kDa e 180 kDa foram encontrados para as isoenzimas sensíveis à lisina e treonina, respectivamente (Azevedo et al., 1992a). No entanto, estes resultados são diferentes dos pesos moleculares determinados por filtração em gel e eletroforese não desnaturante para as isoformas sensíveis à lisina de milho (Dotson et al., 1990a) e cenoura (Relton et al., 1988), ambos em torno de 250 kDa. Porém, a obtenção de clones de cDNA do gene da AK-HSDH de cenoura (Weisseman e Matthews, 1993) e milho (Muehlbauer et al., 1994b,c) indicou um peso molecular estimado para as subunidades da enzima de 90 kDa, que formando um dímero de 180 kDa teria um peso molecular semelhante ao encontrado para as isoenzimas da AK sensíveis à treonina (e possivelmente bifuncionais com atividade de HSDH) de milho (Azevedo et al., 1992a,b) e arroz (este trabalho).

O resultado de co-eluição das isoenzimas da AK e HSDH sensíveis a treonina também foi encontrado na eluição em coluna de filtração em gel Sephacryl S200. A co-eluição destas duas enzimas nestas duas colunas durante o processo de purificação da AK sugere que em arroz ambas as enzimas façam parte de um polipeptídeo bifuncional, assim como sugerido inicialmente em

ervilha (Arnes e Rognes, 1974), já comprovado em cenoura (Wilson et al., 1991) e em milho (Azevedo et al., 1992b). Embora a evidência final da bifuncionalidade destas enzimas em arroz só possa obtida com a purificação da enzima até a homogeneidade e a subsequente demonstração de que ambas as atividades estão contidas do mesmo polipeptídeo, os dados de co-eluição aliados aos dados obtidos nas outras plantas estudadas, levam à sugestão da existência de um polipeptídeo bifuncional também em arroz.

A existência de polipeptídeos bifuncionais é um fato conhecido em plantas, assim como em bactérias, leveduras e animais. Na bactéria *Escherichia coli* já foi comprovado que a atividade da AK sensível à treonina está contida no mesmo polipeptídeo que a atividade da HSDH sensível à treonina (Patte et al., 1967). Também na via do ácido aspártico, as enzimas LKR e SDH fazem parte de um mesmo polipeptídeo bifuncional, assim como constatado em milho (Gonçalves-Brutuille, 1995) e arroz (Gaziola et al., 1997). Em humanos, as atividades das enzimas 6-Fosfofruto-2-Quinase e Frutose-2-6-Bifosfatase estão contidas num mesmo polipeptídeo bifuncional, com atividade de formação e degradação de um potente regulador do metabolismo da glicose, a frutose-2,6-bifosfato (Meacei, et al., 1996).

Polipeptídeos bifuncionais apresentam algumas vantagens em relação a polipeptídeos monofuncionais. Uma delas é o fato de, no caso do polipeptídeo apresentar atividades de enzimas em sequência na via metabólica, permitir que os produtos/substratos sejam direcionados à próxima enzima sem que ocorra nenhum desvio destes para outra parte da via. Este é o caso das enzimas LKR e SDH, que catalisam, respectivamente, o primeiro e o segundo passo de degradação da lisina em plantas. Também permitem uma melhor compartimentalização do processo. No caso da AK-HSDH de plantas, sendo estas enzimas produtos de genes nucleares com atividades localizadas nos cloroplastos, a existência de um

polipeptídeo bifuncional torna necessária a importação de apenas um polipeptídeo para o cloroplasto, ao invés de dois. Uma outra vantagem dos polipeptídeos bifuncionais é a versatilidade de regulação que proporcionam. As duas atividades são submetidas aos mesmos mecanismos de controle gênico, como por exemplo em processos de amplificação gênica, onde as duas atividades podem ser superproduzidas, ao invés de apenas uma, modificando os níveis de ambas as atividades na célula (Wahl et al., 1979). No caso de plantas, a versatilidade de regulação de sistemas enzimáticos se torna muito importante, visto que não possuem, como os animais, a capacidade de mudar de ambiente quando as condições se tornam desfavoráveis, precisando ter mecanismos flexíveis que as permitam enfrentar as mais diversas situações ambientais.

Várias evidências sugerem a ocorrência de uma fusão de genes durante a evolução criando a molécula bifuncional AK-HSDH (Cohen e Saint-Giron, 1990). Na bactéria *Escherichia coli*, a análise da sequência do gene AKI-HSDHI mostra que o códon ATG que codifica a metionina 249 é precedido pela sequência TTG TTG AAG TCG. Cada um desses “triplets” poderia ter sido um códon de terminação âmbar que uma simples mutação de base transformaria num códon normal, levando à fusão de ambos os genes pela abolição de dois códons de terminação comumente encontrados no final dos genes. Esta fusão deve ter ocorrido após o advento das *Enterobacteriaceae* (Robert-Gero et al., 1970). Um controle coordenado das duas atividades à nível transcricional e traducional, assim como um controle por treonina comum em ambas as atividades, poderiam ser as vantagens evolucionárias de uma proteína bifuncional.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para um melhor entendimento da regulação da via de biossíntese dos aminoácidos essenciais lisina e treonina, tanto em arroz, onde este é o único estudo em detalhe sobre aspectos de regulação da via, como em plantas de um modo geral. Pelos resultados

apresentados neste e em outros trabalhos podemos concluir que esta via metabólica em plantas está sujeita a um complexo controle à nível gênico e enzimático e que muitos estudos ainda são necessários para a completa compreensão dos mecanismos de controle envolvidos.

7. CONCLUSÕES:

1. As enzimas AK e HSDH podem ser encontradas em folhas e sementes de arroz da variedade IAC-165. Em raízes, somente a atividade da AK pôde ser detectada:
2. Em sementes e folhas foram detectadas as atividades de duas isoenzimas da AK, uma sensível à inibição por lisina e outra sensível à inibição por treonina, sendo a isoenzima sensível a lisina predominante. Nestes tecidos também foram obtidos indícios para a existência de duas isoenzimas da HSDH, uma sensível e outra resistente à inibição por treonina.
3. Durante o desenvolvimento do endosperma a atividades específica de ambas as enzimas diminuiu. Para a AK, a proporção das isoenzimas encontradas não se alterou, enquanto para a HSDH a proporção da isoenzima sensível à treonina diminuiu.
4. O processo de purificação parcial da enzima AK de sementes imaturas de arroz apresentado permite a separação de dois picos de atividade representando as duas

isoenzimas da AK identificadas. A isoenzima sensível a lisina pode ser eluída ao redor de 285mM de KCl e a sensível a treonina ao redor de 225mM de KCl.

5. Os pesos moleculares das isoenzimas da AK foram estimados em 163 kDa para a isoforma sensível à lisina e de 186 kDa para a isoforma sensível à treonina. A isoforma da HSDH também teve o seu peso molecular estimado em 186 kDa.

6. As atividades das isoenzimas da AK e da HSDH sensíveis a treonina co-eluem durante os passos de purificação adotados, o que leva à sugestão da existência de um polipeptídeo bifuncional com atividades de ambas as enzimas, assim como detectado em outras plantas e microrganismos.

8. BIBLIOGRAFIA:

AARNES, H. Aspartate kinase from some higher plants and algae. **Physiologia Plantarum** 32: 400-402. 1974.

AARNES, H. e ROGNES, S.E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry** 13: 2717-2724. 1974.

AARNES, H. A lysine-sensitive aspartate kinase and two molecular forms of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. **Plant Science Letters** 9: 137-145. 1977.

ARRUDA, P. e DA SILVA, W.J. Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. **Phytochemistry** 22: 2687-2689. 1983.

ARRUDA, P.; BRIGHT, S.J.W.; KUEH, J.S.H.; LEA, P.J. e ROGNES, S.E. Regulation of aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to

- lysine plus threonine: construction and analysis of combinations of *Lt1a*, *Lt1b* and *Lt2* mutant genes. **Plant Physiology** 76: 426-442. 1984.
- AZEVEDO, R.A.; ARANA, J.L. e ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*1* with Opaque-2 maize mutant. **Plant Science** 70: 81-90. 1990.
- AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J. e LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry** 31 (11): 3725-3730. 1992a.
- AZEVEDO, R.A., SMITH R.J. e LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry** 31 (11): 3731-3734. 1992b.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J. e LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: Regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry** 31(11): 3735-3737. 1992c.
- AZEVEDO, R.A. e ARRUDA, P. Dominant and recessive mutations conferring resistance to S-2-aminoethyl-L-cysteine in maize. **Journal of Plant Physiology** 145: 321-326. 1995.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W. e LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry** (no prelo). 1997.

- BONDARYK, R.P. e PAULUS, H. Cloning and structure of the gene for the subunits of aspartokinase II from *Bacillus subtilis*. **The Journal of Biological Chemistry** 260: 585-591. 1985a.
- BONDARYK, R.P. e PAULUS, H. Expression of the gene of *Bacillus subtilis* aspartokinase II in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry** 260: 592-597. 1985b.
- BOYES, C.J. e VASIL, I.K. *In vitro* selection for tolerance to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine and overproduction of lysine by embryogenic calli and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. **Plant Science** 50: 195-203. 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.
- BRENNECKE, K.; SOUZA NETO, A .J.; LUGLI, J.; LEA, P.J. e AZEVEDO R.A. Aspartate kinase in the maize mutants Ask1LT19 and Opaque-2. **Phytochemistry** 41: 707-712. 1995.
- BRIGHT, S.W.J.; FEATHERSTONE, L.C. e MIFLIN, B.J. Lysine metabolism in a barley mutant resistant to S(2-aminethyl) cysteine. **Planta** 146: 629-633. 1979a .
- BRIGHT, S.J.W.; LEGGAT, M.M. e MIFLIN, B.J. Amino acids levels in carrot cell suspension cultures: No correlation with aspartate kinase isoenzyme levels. **Plant Physiology** 63: 586-588. 1979b.

- BRIGHT, S.W.J.; MIFLIN, B.J. e ROGNES, S.R. Threonine accumulation in the seed of a barley mutant with an altered aspartate kinase. **Biochemical Genetics** 20: 229-243. 1982a
- BRIGHT, S.W.J.; KUEH, J.S.H.; FRANKLIN, J.; ROGNES, S.E. e MIFLIN, B.J. Two genes for threonine accumulation in barley seeds. **Nature** 299: 278-279. 1982b .
- BROCHETTO-BRAGA, M.; LEITE, A. e ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant Physiology** 98: 1139-1147. 1992.
- BRYAN, J.K. Studies on the catalytic and regulatory properties of homoserine dehydrogenase of *Zea mays* roots. **Biochimica et Biophysica Acta** 171: 205-216. 1969.
- BRYAN, J.K.; LISSIK, E.A. e MATTHEWS, B.F. Changes in enzyme regulation during growth of Maize.III. Intracellular localization of homoserine dehydrogenase in chloroplasts. **Plant Physiology** 59: 673-679. 1977.
- BRYAN, J.K. Synthesis of aspartate family and branched-chain amino acids. *In: The Biochemistry of Plants*. 1sted. Miflin, B.J. Ed. Academic Press - New York. pp. 403-452. 1980.

- BRYAN, J.K. e LOCHNER, N.R. Effect of plant age and extraction conditions on the properties of homoserine dehydrogenase isolated from maize seedlings. **Plant Physiology** 68: 1396-1399. 1981a.
- BRYAN, J.K. e LOCHNER, N.R. Quantitative estimates of the distribution of homoserine dehydrogenase isozymes in maize tissues. **Plant Physiology** 68: 1400-1405. 1981b.
- BRYAN, J.K. Differential regulation of maize homoserine dehydrogenase under physiological conditions. **Plant Physiology** 92: 785-791. 1990a.
- BRYAN, J.K. Advances in the biochemistry of amino acids biosynthesis. *In* The Biochemistry of Plants. 16thed. Mifflin, B. e Lea, P.J. Eds. Academic Press - New York. pp 161-196. 1990b.
- BRYAN, P.A.; CAWLEY, R.D.; BRUNNER, C.E. e BRYAN, J.K. Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 41 (5): 1211-1217. 1970.
- CASSAN, M.; PARSOT, C.; COHEN, G.N. e PATTE, J. Nucleotide sequence of *LysC* gene encoding the lysine-sensitive aspartokinase III of *Escherichia coli* K12. **The Journal of Biological Chemistry** 261(3): 1052-1057. 1986.
- CATTOIR-REYNEARTS, A.; DEGRYSE, E.; VERBRUGGEN, I. e JACOBS, M. Selection and characterization of carrot (*Daucus carota* cultivar Berlicum)

- embryoid cultures resistant to inhibition by lysine plus threonine. **Biochem. Physiol. Pflanzen** 178: 81-90. 1983.
- CHEN, N.; JIANG, S.; KLEIN, D. e PAULUS, H. Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. **The Journal of Biological Chemistry** 268 (13): 9448-9465. 1993.
- CHEN, N.; HU, F. e PAULUS, H. Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. **The Journal of Biological Chemistry** 262(18): 8787-8798. 1987.
- CHESCHIRE, R.M. e MIFLIN, B.J. The control of lysine biosynthesis in maize. **Phytochemistry** 14: 695-698. 1975.
- COHEN, G.N. e SAINT-GIRONS, I. Biosynthesis of threonine, lysine and methionine. *In: Escherichia coli and Salmonella typhimurion: Cellular and Molecular Biology*. 1sted. Neidhardt, F.C. Ed. American Society for Microbiology -Washington, D.C.. pp 429-444. 1990.
- DA SILVA, W.J. e ARRUDA, P. Evidence for the genetic control of lysine catabolism of maize endosperm. **Phytochemistry** 18: 1803-1805. 1979.
- DAVIES, H.M. Regulation of amino acid biosynthesis in carrot tissue cultures. Ph.D. Thesis, University of London, UK. 1977a

- DAVIES, H.M. e MIFLIN, B.J. Aspartate kinase from carrot cell suspension culture. **Plant Science Letters** 9: 323-332. 1977b.
- DAVIES, H.M. e MIFLIN, B.J. Regulatory isoenzymes of aspartate kinase and the control of lysine and threonine biosynthesis in carrot cell suspension culture. **Plant Physiology** 62: 536-542. 1978.
- DiCAMELLI, C.A. e BRYAN, J.K. Changes in enzyme regulation during growth of maize: II. Relationships among multiple forms of homoserine dehydrogenase. **Plant Physiology** 55: 999-1005. 1975.
- DiCAMELLI, C.A. e BRYAN, J.K. Comparison of sensitive and desensitized forms of maize homoserine dehydrogenase. **Plant Physiology** 65: 176-183. 1980.
- DIEDRICK, T.J.; FRISCH, D.A. e GENGENBACH, B.G. Tissue culture isolation of a second mutant locus for increased threonine accumulation in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 75: 209-215. 1990.
- DOTSON, S.B.; SOMERS, D.A. e GENGENBACH, B.G. Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell suspension cultures. **Plant Physiology** 91: 1602-1608. 1989.
- DOTSON, S.B.; SOMERS, D.A. e GENGENBACH, B.G. Kinetic studies of lysine-sensitive aspartate kinase purified from maize suspension cultures. **Plant Physiology** 93: 98-104. 1990a.

- DOTSON, S.B.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A. e GENGENBACH, B.G. Lysine-insensitive aspartate kinase in two threonine-overproducing mutants of maize. **Planta** 182: 546-552. 1990b.
- DUNHAM, V.L. e BRYAN, J.K. Synergistic effects of metabolic related amino acids on the growth of a multicellular plant. **Plant Physiology** 44: 1601-1608. 1969.
- EARLE, F.R.; CURTIS, J.J. e HUBBARD, J.E. Composition of the component parts of the corn kernel. **Cereal Chemistry** 23: 504-511. 1946.
- ESTELLE, M.A. e SOMERVILLE, C. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. **Molecular General Genetics** 206: 200-206. 1987.
- FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T. e WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio Technology** 13: 6-582. 1995.
- FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; NEGRUTIU, I. e JACOBS, M. High threonine producer mutant of *Nicotiana sylvestris* (Spegg. and Comes). **Theoretical and Applied Genetics** 82: 273-282. 1991.
- FRANKARD, V.; GHISLAIN, M. e JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. **Plant Physiology** 99: 1285-1293. 1992.

- FRISCH, D.A.; TOMMEY, A.M.; GENGENBACH, B.G. e SOMERS, D.A.
Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydropicolinate synthase in
an *Escherichia coli* *dap⁻* auxotroph. **Molecular General Genetics** 228: 287-
293. 1991.
- GALILI, G. Regulation of lysine and threonine synthesis. **The Plant Cell** 7: 899-
906. 1995.
- GAZIOLA, S.A.; TEIXEIRA, C.M.G.; LUGLI, J.; SODEK, L. e AZEVEDO,
R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds: Isolation,
characterization and regulatory properties of lysine 2-oxoglutarate
reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European
Journal of Biochemistry** (no prelo) 1997.
- GENGENBACH, B.G.; WALTER, T.J.; GREEN, C.E. e HIBBERD, K.A.
Feedback regulation of lysine, threonine, and methionine biosynthetic
enzymes in corn. **Crop Science** 18: 472-476. 1978.
- GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; VANDENBOSSCHE, D.; MATTHEWS, B.F.
e JACOBS, M. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine
dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology** 24:
835-851. 1994.
- GIOVANNELI, J.; MUDD, S.H. e DATKO, A.H. Aspartokinase of *Lemna
paucicostata* Hegelm. 6746. **Plant Physiology** 90: 1577-1583. 1989a.

- GIOVANNELLI, J.; MUDD, S.H. e 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 aspartokinase. **Plant Physiology** 90: 1584-1599. 1989b.
- GLASSMAM, K.F. A molecular approach to elevating the free lysine in plants. *In: Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*. Eds: Singh, B.K.; Flores, H.E. e Shanon, J.C. American Society for Plant Physiologists pp. 217-228. 1992
- GOMES, L.H. Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras . ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado. 89pp. 1995.
- GONÇALVES-BRUTUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A. e ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology** 110:765-771. 1995.
- GREEN, C.E. e PHILIPS, R.L. Potential selection systems for mutants with increased lysine, threonine and methionine in cereal crops. **Crop Science** 14: 827-830. 1974.
- HIBBERD, K.A. e GREEN, C.E. Inheretance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 79: 559-563. 1982.

- HINNEBUSCH, A.G. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews** 52(2): 248-273. 1988.
- JACOBSEN, M. Isolation, characterization and regeneration of an S-(2-aminoethyl) cysteine resistant cell line of dihaploid potato. **Journal of Plant Physiology** 123: 307-315. 1986.
- KARCHI, H.; SHAUL, O. e GALILI, G. Seed specific expression of a bacterial desintetized aspartate kinase increases the procuction of seed threonine and methionine in transgenic tobacco. **Plant Journal** 3:721-727. 1993.
- KARCHI, H.; SHAUL, O. e GALILI, G. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 91: 2577-2581. 1994.
- KARCHI, H.; MIRON, D.; BEN-YAACOV, S. e GALILI, G. The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein phosphorylation. **Plant Cell** 7: 1963-1970. 1995.
- KATINKA, M.; COSSART, P.; SIBILLI, L.; SAINT-GIRONS, I.; CHALVIGNAC, M.A.; LE BRAS, G.; COHEN, G.N. e YANIV, M. Nucleotide sequence of the *trhA* gene of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 77(10): 5730-5733. 1980.
- KOCHHAR, S.; KOCHHAR, V.K. e SANE, P.V. Isolation, characterization and regulation of isoenzymes of aspartate kinase differentially sensitive to

calmodulin from spinach leaves. **Biochimica et Biophysica Acta** 880: 220-225. 1986.

KRISHNASWAMY, S. e BRYAN, J.K. Ligand-induced interconversions of maize homoserine dehydrogenase among different states. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 222: 449-463. 1983a.

KRISHNASWAMY, S. e BRYAN, J.K. Characterization of ligand-induced states of maize homoserine dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 227: 210-224. 1983b.

KRISHNASWAMY, S. e BRYAN, J.K. Use of monoclonal antibodies for the purification and characterization of threonine-sensitive isozyme of maize homoserine dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 246(1): 250-262. 1986.

KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T. e YAMADA, Y. Purification and characterization of dihydridipicolinate synthase from wheat suspension cultures. **Plant Physiology** 85: 145-151. 1987.

KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T. e YAMADA, Y. Selection and characterization of a S-(2-aminoethyl) cysteine-resistant wheat cell culture. **Journal of Plant Physiology** 133: 608-614. 1988.

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

- LAWRENCE, J.M. e GRANT, D.R. Incorporation of lysine-¹⁴C into the developing grain of wheat. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 104: 73-78. 1964.
- LEA, P.J.; MILLS, W.R. e MIFLIN, B.J. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. **FEBS Letters** 98: 165-168. 1979.
- LEA, P.J. e LEEGOOD, R.C. Plant biochemistry and molecular biology. 1sted. John Wiley & Sons - New York. pp 1-315. 1993.
- LEA, P.J. e FORDE, B.G. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. **Plant Cell and Environment** 17: 541-556. 1994.
- MADISON, J.T. e THOMPSON, J.F. Threonine synthase from higher plants: Stimulation by S-adenosylmethionine and inhibition by cysteine. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 71:684-691. 1976.
- MADDALONI, M.; DONINI, G.; BALCONI, C.; RIZZI, E.; GALLUSCI, P.; FORLANI, F.; LOHMER, S.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F. e MOTTO, M. The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms.. **Molecular General Genetics** 250: 647-654. 1996.

- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; and McKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética de plantas. 1sted. Sociedade Brasileira de Genética pp 1-344. 1994.
- MATTHEWS, B.F.; GURMAN, A.W. e BRYAN, J.K. Changes in enzyme regulation during growth of maize I. Progressive desinsetization of homoserine dehydrogenase during seedling growth. **Plant Physiology** 55: 991-998. 1975.
- MATTHEWS, B.F. e WIDHOLM, J.K. Regulation of lysine and threonine suspension in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. **Planta** 141: 315-321. 1978.
- MATTHEWS, B.F. e WIDHOLM, J.K. Enzyme expression in soybean cotyledon, callus, and cell suspension culture. **Canadian Journal of Botany** 57(4): 299-304. 1979.
- MATTHEWS, B.F.; FARRAR, M.J. e GRAY, A.C. Purification and interconversion of homoserine dehydrogenase from *Daucus carota* cell suspension cultures. **Plant Physiology** 91: 1569-1574. 1989.
- MAZELIS, M. e WHATLEY, F.R. The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. **FEBS Letters** 84: 236-240. 1977.

- MUEHLBAUER, G.J.; GENGENBACH, B.G. e SOMERS, D.A. Threonine-overproducing, lysine-insensitive aspartate kinase (*Ask2*) map location. **Maize Genetics Cooperation Newsletter** 68: 92. 1994a.
- MUEHLBAUER, G.J.; GENGENBACH, B.G.; SOMERS, D.A. e DONOVAN, C.M. Genetic and amino-acid analysis of two maize threonine-overproducing, lysine-insensitive aspartate kinase mutants. **Theoretical and Applied Genetics** 89: 766-774. 1994b.
- MUEHLBAUER, G.J.; SOMERS, D.A.; MATTHEWS, B.F. e GENGENBACH, B.G. Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. **Plant Physiology** 106: 1303-1312. 1994c.
- NEGRUTIU, I.; CATTOIR-REYNEARTS, A.; VERBRUGGEN, I. e JACOBS, M. Lysine overproducer mutant with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris* (Spegazzini and Comes). **Theoretical and Applied Genetics** 68: 11-20. 1984.
- OMORI, K.; IMAI, Y.; SUZUKI, S. e KOMATSUBARA, S. Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* threonine operon and analysis of the threonine operon mutations which alter feedback inhibition of both aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I. **Journal of Bacteriology** 175(3): 785-794. 1993.
- PARKINSON, J.S. e KOFOID, E.C. Communication modules in bacterial signalling proteins. **Annual Review of Genetics** 26: 71-112. 1992.

- PARSOT, C. e COHEN, G.N. Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis hom* gene coding for homoserine dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry** 263 (29): 14654-14660. 1988.
- PATTE, J.; LE BRAS, G. e COHEN, G.N. Regulation by methionine of the synthesis of a third aspartate kinase and of a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. **Biochimica et Biophysica Acta** 136: 245-247. 1967.
- PECHERE, J.F. e CAPONY, J.P. On the colorimetric determination of acyl phosphates. **Analytical Biochemistry** 22: 536-539. 1968.
- PERL, A.; SHAUL, O. e GALILI, G. Regulation of lysine synthesis in transgenic potato plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Molecular Biology** 19: 815-823. 1992.
- RAFALSKI, J.A. e FALCO, S.C. Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartokinase. **The Journal of Biological Chemistry** 263(5): 2146-2151. 1988.
- RELTON, J.M.; BONNER, P.L.R.; WALLSGROVE, R.M. e LEA, P.J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension cultures. **Biochimica et Biophysica Acta** 953: 48-60. 1988.
- RICHAUD, C.; MAZAT, J.P.; GROS, C. e PATTE, J.C. Subunit structure of aspartokinase III of *Escherichia coli* K12. **European Journal of Biochemistry** 40: 619-629. 1973.

- ROGNES, S.E.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. S-adenosylmethionine: A novel regulator of aspartate kinase (EC.2.7.2.4). **Nature** 287: 357-359. 1980.
- ROBERT-GERO, M.; POIRET, M. e COHEN, G.N. The aspartate kinase pf *Pseudomonas putida*: regulation of synthesis and activity. **Biochemistry Biophysics Acta** 206:17-30. 1970.
- SAINIS, J.K.; MAYNE, R.G.; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. Localization and characterization of homoserine dehydrogenase isolated from barley and peas leaves. **Planta** 152: 491-496. 1981.
- SAKANO, K. e KOMAMINE, A. Change in the proportion of two aspartokinases in carrot root tissue in response to *in vitro* culture. **Plant Physiology** 61: 115-118. 1978.
- SANE, P.V.; KOCHHAR, S.; KUMAR, N. e KOCHHAR, V.K. Activation of plant aspartate kinase by calcium and calmodulin-like factor from plants. **FEBS Letters** 175: 238-242. 1984.
- SASAOKA, K. Aspartate semialdehyde dehydrogenase and homoserine dehydrogenase from pea seedlings. **Plant Cell Physiology** 2: 231 1961.
- SCHAEFFER, G.W. e SHARPE, F.T. Increased lysine and seed storage protein in rice plants recovered from calli selected with inhibitory levels of lysine plus threonine and S-(2-Aminoethyl) cysteine. **Plant Physiology** 84: 509-515. 1987.

- SHAUL, O. e GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desintetized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology** 100: 1157-1163. 1992a.
- SHAUL, O. e GALILI, G. Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Physiology** 100:1157-1163. 1992b.
- SHAUL, O. e GALILI, G. Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing a feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology** 23: 759-768. 1993.
- SCHMULLING, T.; SCHELL, J. e SPENA, A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. **EMBO Journal** 7 (9):2621-2629. 1988.
- SHAW, J.F. e KU, C.Y. Regulation and properties of rice (*Oriza sativa* cultivar Shingshu) aspartokinase. **Botanical Bulletin of Academy Sinica** 25: 45-58. 1984.
- SHEWRY, P.R. e MIFLIN, B.J. Properties and regulation of aspartate kinase from barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology** 59: 69-73. 1977.
- SODEK, L. Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. **Phytochemistry** 15: 1903-1906. 1976.

- STADTMAN, E.R.; COHEN, G.N.; LE BRAS, G. e SZULMAJSTER-ROBICHON, H. Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry** 236 (7): 2033-2038. 1961.
- THEZE, J. e SAINT-GIRONS, I. Threonine locus of *Escherichia coli* K12: Genetic structure and evidence for an operon. **Journal of Bacteriology** 118: 990-998. 1974.
- THOMPSON, G.A.; DATKO, A.H.; MUDD, S.H. e GIOVANNELI, J. Methionine biosynthesis in *Lemna*: studies on the regulation of cystationine synthase. **Plant Physiology** 69: 1077-1080. 1982.
- TURANO, F.J.; JORDAN, R.L. e MATTHEWS, B.F. Immunological characterization of *in vitro* forms of the homoserine dehydrogenase from carrot suspension cultures. **Plant Physiology** 92: 395-400. 1990.
- VERNAILLEN, S.; VAN GHELVE, M.; VERBRUGGEN, I. e JACOBS, M. Characterization of mutants of *Arabidopsis thaliana* resistant to analogues and inhibitory concentrations of amino acids derived from aspartate. **Arabidopsis Information Service** 13-22. 1985.
- WAHL, G.M.; PADGETT, R.A. e STARK, G.R. Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistente hamster cells. **The Journal of Biological Chemistry** 265: 14742-14747. 1979.

- WALLSGROVE, R.M. e MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. **Phytochemistry** 20: 2651-2655. 1981.
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. Intracellular localization of aspartate kinase (EC 2.7.2.4) and the enzymes of the threonine and methionine biosynthesis in green leaves. **Plant Physiology** 71: 780-784. 1983.
- WALTER, T.J.; CONNELLY, J.A.; GENGENBACH, B.G. e WOLD, F. Isolation and characterization of two homoserine dehydrogenase from maize suspension cultures. **The Journal of Biological Chemistry** 254 (4): 1349-1355. 1979.
- WEISEMANN, J.M. e MATTHEWS, B.F. Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase. **Plant Molecular Biology** 22: 301-312. 1993.
- WILSON, B.J.; GRAY, A.C. e MATTHEWS, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. **Plant Physiology** 97: 1323-1328. 1991.
- WONG, K.F. e DENNIS, D.T. Aspartokinase from wheat germ. **Plant Physiology** 51: 322-326. 1973.

WONG, K.F. e DENNIS, D.T. Aspartokinase in *Lemna minor* L. **Plant Physiology** 51: 327-331. 1973.

YAMADA, Y.; KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T.; SUGIMOTO, Y. e SUZUKI, A. Growth and aspartate kinase activity in wheat cell suspension culture: effects of lysine analogs and aspartate derived amino acids. **Plant Cell Physiology** 27: 607-617. 1986.

ZAKIN, M.M.; DUCHANGE, N.; FERRARA, P. e COHEN, G.N. Nucleotide sequence of the *metI* gene of *Escherichia coli* : Its product, the bifunctional aspartokinase II (EC 2.7.2.4) - homoserine dehydrogenase II (EC 1.1.1.3) and the bifunctional product of the *thrA* gene, aspartokinase I - homoserine dehydrogenase I, derive from a common ancestor. **The Journal of Biological Chemistry** 258: 3028-3031. 1983.