

52009

G

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

Lisina cetoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase são atividades de um polipeptídeo bifuncional em endosperma de milho (*Zea mays* L.) em desenvolvimento

Este exemplar corresponde à redação final da tese do(a) candidato(a)
Marymar Gonçalves - Butruille
e aprovada pela Comissão Julgadora.

nt

Marymar Gonçalves-Butruille
Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

1994

Arruda
28/11/94

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

1994

UNIDADE	IG	
N.º CHAMADA:		
	J Unicamp	
	98L	
V.	El.	
TOMADA	27/03/93	
PROC.	433/95	
C	D	X
PEDIDO	R\$ 11,00	
DATA	23/02/95	
N.º CPO		

cm 00065552-8

***Ao Senhor que criou o céu
e a terra pois a Ele pertence
toda honra e toda glória ...***

Abreviações

AK	aspartato quinase
αKG	α-cetoglutarato
ASADH	aspartato semialdeído desidrogenase
CAD	aspartato transcarbamilase
DAP	dias após polinização
DHDS	dihidrodipicolinato sintetase
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
HSDH	homoserina desidrogenase
K_m	constante de Michaelis
LKR	lisina cetoglutarato redutase
NAD	Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo, forma reduzida
NADP	Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
PALA	fosfonacetil aspartato
PEG	polietileno glicol
R_f	migração relativa
SDH	sacaropina desidrogenase de mamíferos e plantas
SDS	dodecil sulfato de sódio
TLC	cromatografia em camada delgada
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UMP	uracil monofosfato
UV	luz ultra-violeta

Índices de Figuras e Tabelas

Figura 1	-Via metabólica do ácido aspático	6
Figura 2	-Via de biossíntese de lisina em fungos e leveduras	12
Figura 3	-Vias de catabolismo de lisina em fungos e leveduras	17
Figura 4	-Vias de catabolismo de lisina em bactérias aeróbicas	19
Figura 5	-Via de catabolismo de lisina em <i>Rhizoctonia leguminicola</i>	20
Figura 6	-Via de catabolismo de lisina em mamíferos e plantas	24
Figura 7	-Cromatografia em DEAE-Sephacel	48
Figura 8	-Revelação da atividade de LKR e SDH em gel	51
Figura 9	-Identificação dos produtos de reação da LKR e SDH	54
Figura 10	-Efeito do pH e de cofatores na atividade da LKR e SDH	56
Figura 11	-Gráfico de Hanes para determinação do Km da SDH para sacaropina de NAD	57
Figura 12	-Cromatografia em DEAE usando HPLC	61
Figura 13	-Recromatografia em DEAE usando HPLC	62
Figura 14	-Cromatografia em Superdex usando HPLC	63
Figura 15	-Recromatografia em Superdex usando HPLC	64
Figura 16	-Curva para determinação de peso molecular	65
Figura 17	-Gel denaturante das frações da purificação segundo Markovitz et al. (1984)	67
Tabela I	-Purificação da SDH e LKR segundo Brochetto-Braga et al. (1992)	49
Tabela II	-Tecido especificidade da LKR e SDH em milho	53
Tabela III	-Purificação da LKR e SDH segundo Markovitz et al. (1984)	59
Tabela IV	-Propiedades da LKR e SDH de diferentes organismos	70

ÍNDICE GERAL

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUÇÃO	3
3.1 METABOLISMO DE LISINA	4
3.2 SÍNTESE DE LISINA	5
3.2.1 Síntese de lisina via ácido diaminopimélico	
3.2.2 Síntese de lisina via ácido α -aminoadípico	10
3.3 DEGRADAÇÃO DE LISINA	
3.3.1 Degradação de lisina em organismos inferiores	16
3.3.2 Degradação de lisina em organismos superiores	22
4. OBJETIVOS	32
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
6. RESULTADOS	47
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES	77
9. BIBLIOGRAFIA	78

1. RESUMO

A lisina cetoglutarato redutase (LKR) e a sacaropina desidrogenase (SDH) são enzimas que catalisam os dois primeiros passos de degradação de lisina pela via da sacaropina. Utilizando-se duas metodologias, uma das quais descrita anteriormente por Brochetto-Braga et al. (1992) para purificação da LKR de milho, observou-se que a LKR e a SDH de endosperma de milho em desenvolvimento copurificaram em todas as etapas. A fração correspondente à purificação em DEAE-Sephacel foi utilizada para caracterizar vários parâmetros cinéticos e físicos das enzimas. As atividades comigraram em gel de poliacrilamida não-desnaturante e apresentaram um mesmo peso molecular de 140000. Foi determinado o produto final de cada atividade mostrando que a LKR condensa lisina e α -cetoglutarato em sacaropina usando NADPH como cofator enquanto que a SDH hidrolisa a sacaropina em ácido glutâmico e α -aminoadípico- δ -semialdeído usando NAD^+ ou NADP^+ como cofator. Para SDH, os valores de K_m para NAD^+ e sacaropina foram determinados como sendo 0,33 e 0,23 mM respectivamente. O pH ótimo para atividade da LKR foi 7,0 e para SDH foi acima de 9,0. As atividades de LKR e SDH só foram encontradas em endosperma de milho em desenvolvimento não tendo sido encontradas em coleóptilo e raiz de plântulas e nem em embriões de sementes em desenvolvimento. Tendo sido encontradas várias evidências de que as duas atividades enzimáticas estavam contidas no mesmo polipeptídeo foi utilizada a metodologia descrita por Markovitz et al. (1984) que purificaram o mesmo polipeptídeo bifuncional em mamíferos. Frações altamente purificadas contendo as duas atividades mostraram que ambas estão contidas num único polipeptídeo com peso molecular de 120000. A enzima nativa apresentou um peso molecular próximo de 260000 sugerindo uma estrutura dimérica.

2. ABSTRACT

The lysine ketoglutarate reductase (LKR) and saccharopine dehydrogenase (SDH) catalyzes the first two sequential steps in lysine degradation in the major saccharopine pathway. By using two methodologies one of which described previously by Brochetto-Braga et al. (1992) for LKR purification from maize developing endosperm, we observed that both activities co-purified in all steps. The fraction corresponding to DEAE-Sephacel was used to determine kinetic properties of LKR and SDH. Non-denaturing gel electrophoresis stained for the enzymes showed single bands of activity with identical Rfs corresponding to a Mr 140000. The study of the reaction products demonstrated that LKR condenses lysine and α -ketoglutarate into saccharopine, using NADPH as cofactor, while SDH converts saccharopine into glutamic acid and α -aminoadipic- δ -semialdehyde, using NAD⁺ or NADP⁺ as cofactor. The initial velocity studies of SDH showed true Km for saccharopine and NAD⁺ of 0.23 mM and 0.33 mM, respectively. Optimum activity was found at pH 7.0 for LKR and over pH 9.0 for SDH. LKR and SDH activities shared tissue-specificity for the endosperm and could not be found in coleoptile or roots of seedlings neither in embryos of developing seeds. Since the two enzymes have proved inseparable so far, another purification was performed using a methodology described for the same enzymes isolated from mammalian tissues by Markovitz et al. (1984). The activities co-purified again in all the steps. A highly purified fraction with reductase and dehydrogenase activities showed that both activities reside in a single polypeptide of Mr 120000. An apparent Mr 260000 obtained for the native enzyme from developing maize endosperm suggests a dimeric structure.

3. INTRODUÇÃO

Os cereais são excelentes fontes de carboidratos, principalmente pelo alto teor em amido, porém são relativamente deficientes em proteínas, cerca de 10% do peso seco (Earle et al., 1946). Além disso, o valor nutricional dessas proteínas é muito baixo devido a baixos teores em aminoácidos essenciais, principalmente lisina (Mertz et al., 1958; Baudet et al., 1966). Apesar disto, os cereais são alimentos essenciais e grande parte de toda a proteína utilizada provém diretamente deste grupo (Kent, 1993).

Desta maneira, é importante conhecer os fatores ligados a entrada de N amino e sua conversão em compostos nitrogenados durante o desenvolvimento das sementes dos cereais. Isto inclui desvendar os mecanismos que afetam a quantidade e qualidade das prolaminas, principal fração protéica de reserva dos cereais, e a disponibilidade dos aminoácidos necessários para sua síntese. O fato da lisina não ser um aminoácido utilizado para a síntese das prolaminas implica na necessidade de algum mecanismo que o mantenha em baixos níveis durante o desenvolvimento do endosperma devido a seus efeitos regulatórios no metabolismo de vários aminoácidos (Da Silva e Arruda, 1979).

A caracterização de uma enzima de degradação de lisina em milho, a lisina cetoglutarato redutase (LKR) (Arruda et al. 1982; Arruda e Da Silva, 1983), deu início ao esclarecimento desta questão. Recentemente demonstrou-se que a regulação da lisina cetoglutarato redutase (LKR) ocorre coordenadamente com a regulação da síntese das zeínas, que são as prolaminas de milho (Brochetto-Braga et al., 1992), bem como da própria síntese de lisina (Karchi et al., 1994).

Para que possamos ter uma visão mais ampla dos complexos passos envolvidos na regulação dos níveis de lisina em plantas é necessário uma breve revisão das vias envolvidas na síntese e degradação de lisina em vários organismos.

3.1 METABOLISMO DE LISINA

Existem duas vias de biossíntese de lisina na natureza. A via do ácido diaminopimélico que é encontrada em bactérias, alguns fungos inferiores, algas e plantas superiores (Vogel et al., 1964) e a via do ácido α -aminoadípico, encontrada nos demais grupos de fungos e leveduras (Vogel et al., 1964; Wade et al., 1980).

Por sua vez, foram encontradas pelo menos 4 vias catabólicas para lisina em bactérias, fungos, plantas e animais. O catabolismo de lisina em *Pseudomonas* e *Sacharomycopsis liipolytica* pode ocorrer via δ -aminovalerato (Takeda e Hayaishi, 1966; e Gaillardin et al., 1979) enquanto que em alguns clostrídios e em *Fusobacterium nucleatum* o 3,5 diaminohexanoato aparece como intermediário (Jackin e Barker 1951; Stadtman, 1963; Bray e Stadtman, 1968). Outros compostos, derivados diretos do catabolismo de lisina, tais como intermediários acetilados, norleucina-leucina, e 4-aminobutirato também foram encontrados em *Candida maltosa* (Schmidt et al., 1988) e *Candida guilliermondii* (Garabedian e Vermeersch, 1989). O primeiro catabólito de lisina identificado em mamíferos foi o ácido α -aminoadípico (Borsook et al., 1948 e Dubnoff e Borsook, 1948). Em seguida, o ácido pipecólico foi descoberto em plantas (Zacharius et al., 1952) e em ratos (Rothstein e Miller, 1954). Mais tarde, a via do ácido α -aminoadípico foi caracterizada como sendo a mais importante em mamíferos e em plantas (Nigan e Connel, 1962).

3.2 SÍNTESE DE LISINA

3.2.1 Síntese de lisina via ácido diaminopimélico

O ácido diaminopimélico é o último intermediário na ramificação da via de formação de lisina a partir do aspartato (Figura 1). O aspartato é o ponto inicial de uma sequência metabólica que levará à formação de treonina, lisina, isoleucina e metionina (Abelson et al., 1952; Cohen e Hirsch, 1954; Kalan e Ceithaml, 1954; Strassman e Weinhouse, 1953). Muito já se conhece sobre as enzimas, os intermediários e a regulação desta via.

Em plantas, a síntese de lisina a partir do aspartato, foi inicialmente estudada através do acompanhamento da distribuição de precursores marcados com ^{14}C . Experimentos com vários precursores, incluindo ácido aspártico e ácido diaminopimélico, injetados em plântulas de cevada (Moller, 1974), endospermas de milho em desenvolvimento (Sodek, 1976) e cloroplastos isolados de ervilha (Mills et al 1980), revelaram que a via do ácido diaminopimélico é a principal via de biossíntese de lisina em plantas. Entretanto, em *Acacia* foi encontrada uma pequena incorporação de ^{14}C derivado de ácido α -aminoadípico em lisina (Fowden, 1960). Porém, essa via, que envolve a produção de ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído e sacaropina, é encontrada apenas em alguns microorganismos (Vogel et al., 1964). Assim, o simples fato da planta ter habilidade de converter ácido α -aminoadípico em lisina não prova que essa via seja utilizada, pois a planta pode não ter habilidade de sintetizar o ácido α -aminoadípico a partir de precursores simples. A baixa incorporação de ^{14}C derivado de acetato e a ausência de incorporação de ^{14}C derivado de sacaropina em lisina, comprovou que em plantas esse aminoácido não é sintetizado via ácido α -aminoadípico (Moller, 1974).

A via metabólica do ácido aspártico em plantas tem sido objeto de muitos estudos aos níveis bioquímico, genético e molecular. Esses estudos tem revelado que essa via é ramificada e envolve a participação de uma

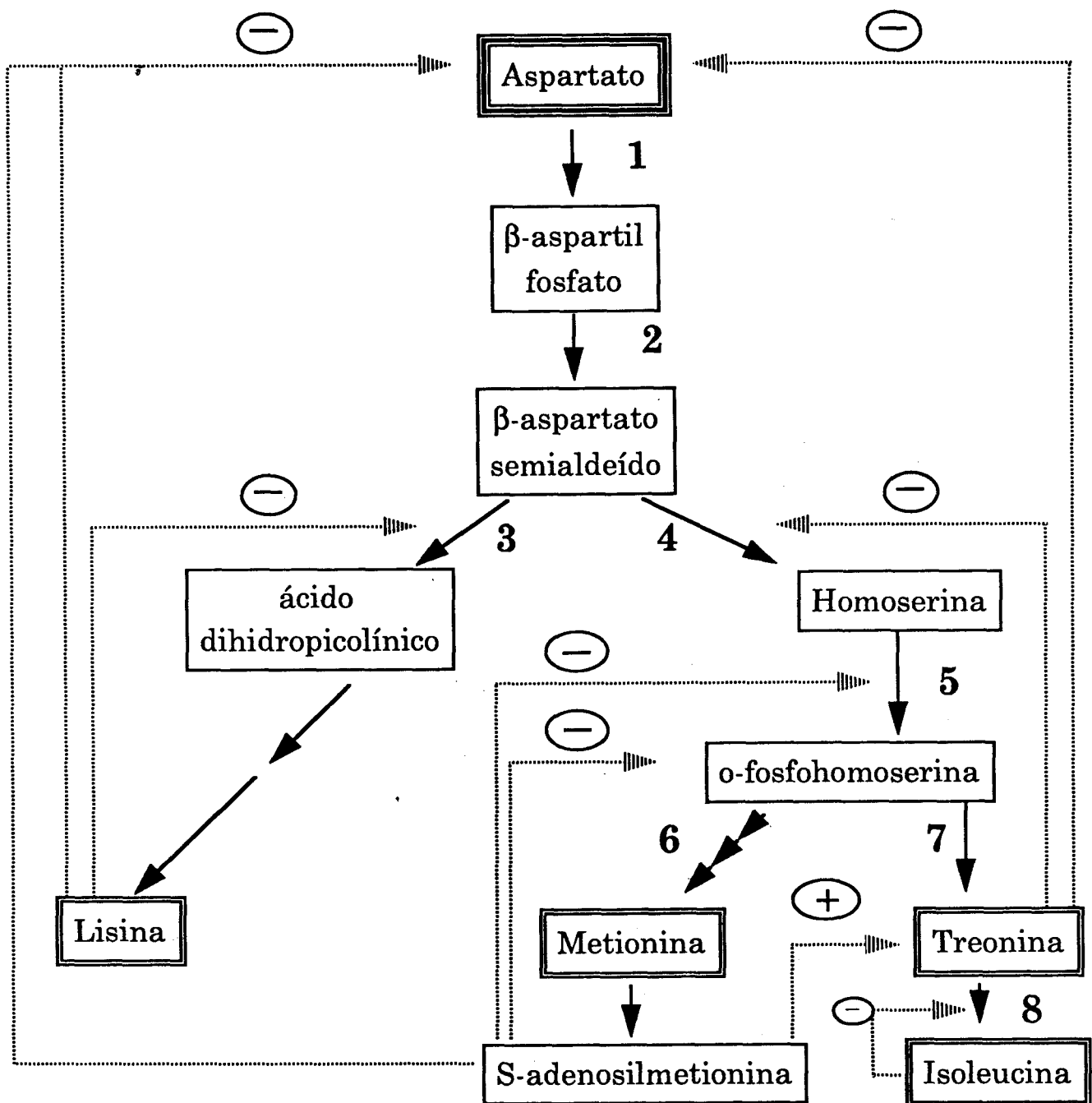


Figura 1. Via metabólica do ácido aspártico. Os pontos de regulação estão indicados com setas: (-) retroinibição (+) ativação enzimática. 1, aspartato quinase; 2, aspartato semialdeído desidrogenase; 3, dihidropicolinato sintetase; 4, homoserina desidrogenase; 5, homoserina quinase; 6, cistationa-γ-sintetase; 7, treonina sintetase; 8, treonina desidratase (para revisão ver Lea et al., 1992).

série de enzimas reguladas alostericamente (Figura 1). O ponto inicial da via envolve a fosforilação do aspartato em β -aspartil fosfato pela aspartato quinase (E.C.2.7.2.4) (AK) (Datta e Gest, 1964; Patte et al., 1966; Henke e Wahnbaeck, 1977). O β -aspartil fosfato é transformado pela aspartato semialdeído desidrogenase (E.C.1.2.1.11) (ASADH) em β -aspartil semialdeído (Gengenbach et al., 1978), o qual serve como substrato para duas outras enzimas, a dihidrodipicolinato sintetase (E.C.1.3.1.26) (DHPS) e a homoserina desidrogenase (E.C.1.1.1.3) (HSDH) (Datta e Gest 1964, Patte et al., 1966; Matthews e Widholm, 1978; Azevedo et al., 1992b). O dihidrodipicolinato formado pela condensação do β -aspartil semialdeído e piruvato é o primeiro composto na ramificação da via que leva a formação da lisina (Mills et al., 1980). Já a homoserina pode ser utilizada por duas outras enzimas, a homoserina aciltransferase que dará origem a o-acilhomoserina e pela homoserina quinase que originará a fosfohomoserina. A treonina é formada pela ação da treonina sintetase sobre a fosfohomoserina e pode ser convertida em isoleucina pela treonina desidratase. A cistationa pode originar-se de dois passos distintos, ou pela ação da cistationa β -liase sobre a o-acilhomoserina ou pela ação da cistationa δ -sintetase sobre a fosfohomoserina. A cistationa dará origem, após mais alguns passos, a metionina. A metionina por sua vez pode ser convertida em s-adenosilmetionina (Mills et al., 1980).

Existem dois pontos principais na via metabólica do aspartato que merecem consideração quando se trata da síntese de lisina. Esses pontos referem-se a retroinibição efetuada pela lisina e treonina na atividade da AK, e pela lisina na atividade da DHPS. Em plantas, existem três isoenzimas da AK, duas das quais majoritárias, são retroinibidas pela lisina e uma que é retroinibida pela treonina (Aarnes, 1977; Davis e Mifflin, 1977 e 1978; Shewry e Mifflin, 1977; Henke e Wahnbaeck, 1977; Gengenbach et al., 1978; Matthews e Widholm, 1978 e 1979; Sakano e Komamine, 1978; Bright et al., 1978 a,b; Henke e Wahnbaeck-Spencer, 1979; Yamada et al., 1986; Dotson et al., 1989; Ramos et al., 1991; Azevedo et al., 1992 a,b). A DHPS parece ser representada por uma única forma que é retroinibida

pela lisina (Aarnes, 1977; Gengenbach et al., 1978; Matthews e Widholm, 1979; Kumpaisal et al., 1987; Ghislain et al., 1990).

O papel dessas duas enzimas no fluxo dos metabólitos intermediários que levam a formação de lisina, tem sido estudado através do efeito da adição de lisina e treonina no crescimento de plântulas. Em trigo, a lisina e a treonina adicionadas isoladamente ao meio de crescimento tem pouco efeito no desenvolvimento das plântulas, ao passo que adições conjuntas de concentrações equimolares de lisina e treonina inibem completamente o desenvolvimento da plântula (Bright et al., 1978a). Essa inibição pode ser revertida completamente pela metionina e seus precursores, a homoserina e homocisteína, indicando que o excesso de lisina e treonina inibe a AK causando escassez dos intermediários da via e consequentemente de metionina (Figura 1) (Yamada et al., 1986). Duas isoformas da AK foram purificadas parcialmente de cultura de células de milho em suspensão (Dotson et al., 1989). Ambas foram sensíveis a lisina e não foi encontrada nenhuma forma sensível a treonina. A enzima é um tetrâmero com peso molecular de 254000. Mais tarde, três isoformas da AK foram purificadas até próximo da homogeneidade a partir de cultura de células de milho em suspensão. Duas delas foram sensíveis a lisina, sendo que uma delas foi também sensível a S-adenosilmetionina e uma terceira forma foi sensível a treonina. As formas sensíveis a lisina tiveram peso molecular próximo a 150000. A forma sensível a treonina teve peso molecular estimado em 180000 e copurificou com a isoenzima da HSDH sensível a treonina, mostrando a possibilidade de ambas pertencerem a um mesmo polipeptídeo bifuncional (Azevedo et al., 1992a,b).

A DHPS é outra enzima de grande importância na via de biossíntese de lisina tanto em bactérias (Datta, 1969) como em plantas superiores (Bryan et al., 1970; Cheshire e Mifflin, 1975). A DHPS faz a condensação do β -aspartil semialdeído e do piruvato em dihidrodipicolinato. A DHPS de várias espécies de plantas é retroinibida por concentrações muito baixas de lisina (Mazelis et al., 1977; Matthews e Widholm, 1978). A enzima apresenta uma única forma em plantas com peso molecular de 123000

(Kumpaisal et al., 1987). A DHPS purificada de *Nicotiana sylvestris* mostrou-se composta de 4 subunidades idênticas (Ghislain et al., 1990) como já havia sido determinado para a mesma enzima em bactérias (Hallig e Stahly., 1976).

3.2.2 Síntese de lisina via ácido α -aminoadípico

A participação do ácido α -aminoadípico na biossíntese de lisina em alguns fungos e leveduras foi sugerido após a observação de vários mutantes capazes de utilizar tanto lisina como ácido α -aminoadípico para seu crescimento (Mitchael e Houlaham, 1948; Bergsrom e Rottenberg, 1950). Observou-se a ocorrência desta via em *Aspergillus nidulans* e *Euglena gracilis*, sendo que nestes organismos o ácido piperídico mostrou poder participar como intermediário (Aspen e Meister, 1962; Rothstein e Saffran, 1963).

A conversão de L- α -aminoadípico em lisina foi demonstrada em vários tipos de leveduras através da incubação com ^{14}C - α -aminoadípico. Após 30 minutos de incubação, 90% da radioatividade da célula foi localizada numa substância denominada componente B e 10% na L-lisina. Em 180 minutos, a radioatividade do componente B diminuiu 40% com concomitante incremento na radioatividade da L-lisina para 60%. Assim, concluiu-se que o L- α -aminoadípico foi convertido no componente B que por sua vez foi utilizado na formação de lisina (Kuo et al., 1964). O componente B já havia sido identificado como sacaropina [-N-(L-glutaril-2)-L-lisina] (Kjaer e Larsen, 1961, Kuo et al., 1964). A sacaropina havia sido isolada de extrato de levedura (Darling e Larsen, 1961) indicando que este metabólito seria então o intermediário único para introdução de grupos ϵ -amino na lisina. Entretanto, alguns autores sugeriram que em levedura a biossíntese de sacaropina poderia ser resultado tanto da condensação de lisina e α -cetogutarato (α KG) quanto de α -aminoadípico- δ -semialdeído e glutâmico (Kjaer e Larsen, 1961). Isso colocaria a possibilidade da sacaropina não ser um intermediário na biossíntese de lisina, mas sim um produto do catabolismo deste aminoácido nestes organismos. Trupin e Boquist (1965) verificaram que mutantes de *Neurospora crassa* com bloqueios metabólicos nos passos envolvidos na conversão de sacaropina para lisina apresentaram acúmulo de sacaropina durante o crescimento. Nestes mutantes, a sacaropina formada tornou-se marcada quando ^{14}C - α -

aminoadípico foi adicionado ao meio de cultura, mas não quando a ^{14}C -lisina foi administrada. Porém, o simples acúmulo de um componente por um mutante auxotrófico não era prova suficiente de que aquele metabólito fosse um intermediário daquela rota bioquímica bloqueada. Foi necessário mostrar que o evento mutacional causador da auxotrofia resultou na perda ou diminuição da atividade de uma enzima da via em questão.

Estudos usando então mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Jones e Broquist, 1965) evidenciaram a presença de atividades enzimáticas alteradas na síntese dos intermediários da biossíntese de lisina. Foram caracterizadas as enzimas sacaropina redutase e sacaropina desidrogenase (E.C.1.5.1.7) (Figura 2). A primeira catalizou a condensação de α -aminoadípico- δ -semialdeído e ácido glutâmico em sacaropina enquanto que a segunda catalizou a hidrólise de sacaropina produzindo lisina e ácido α KG. Dois mutantes, lys-9 e lys-1 mostraram-se úteis no estudo dos detalhes da biossíntese de lisina a partir do ácido α -aminoadípico. O mutante lys-9, deficiente na enzima sacaropina redutase, apresentava acúmulo de α -aminoadípico- δ -semialdeído enquanto que o mutante lys-1, deficiente na enzima sacaropina desidrogenase, apresentava acúmulo de sacaropina (Jones e Broquist, 1965). A introdução de altas concentrações de lisina no meio de cultura dos mutantes lys-9 e lys-1 não diminuiu a quantidade de α -aminoadípico- δ -semialdeído e sacaropina formados (Jones e Broquist, 1965). Assim, não se observou um sistema de inibição pelo produto final, ao contrário do que ocorreu com *Neurospora crassa* (Trupin e Broquist, 1965).

Trabalhos mais recentes mostraram que pelo menos 6 enzimas desta via são reprimidas por lisina (Urrestarazu et al., 1985). Em outro trabalho com leveduras os níveis das enzimas da via do α -aminoadípico demonstraram estar sob controle de um sistema complexo de regulação (Galardin et al., 1979). A análise de mutantes deficientes revelou que em alguns casos é necessário mais de um gene para a expressão de uma única enzima (Maragoudakis et al., 1967; Gallardin, 1979 e Ramos et al., 1988).

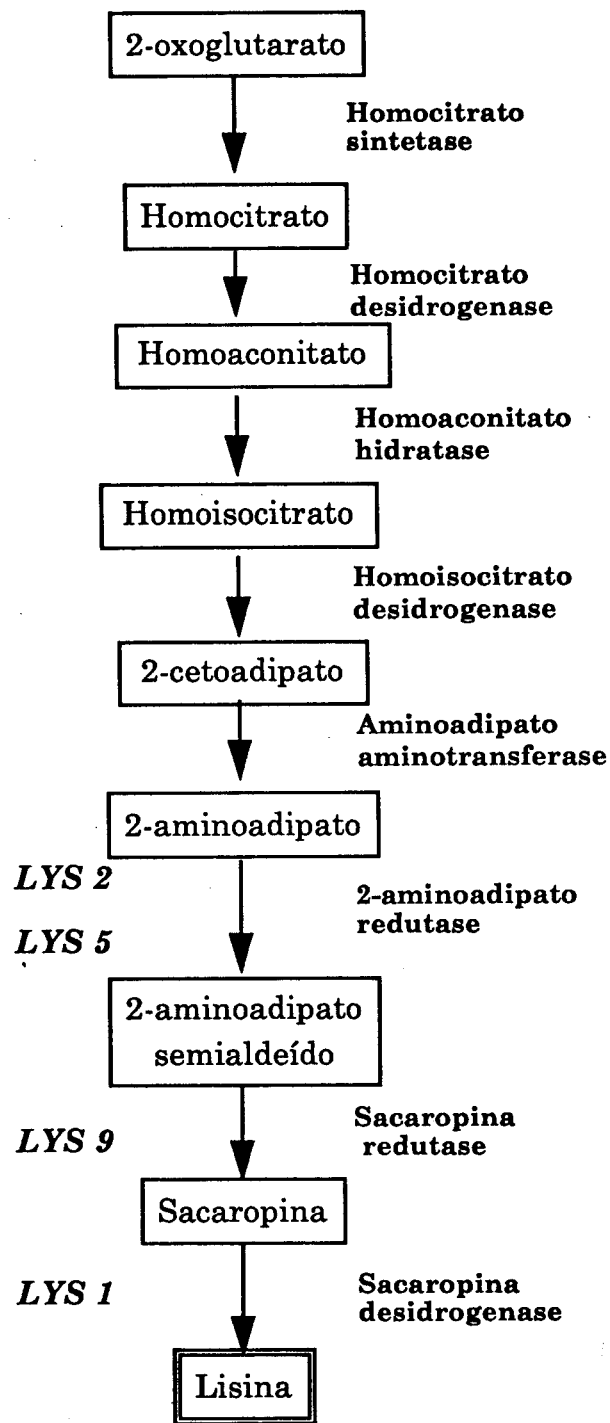


Figura 2. Via de biossíntese de lisina em fungos e leveduras. Relação dos genes *LYS* (Ramos et al., 1988; Schmidt et al., 1989).

A enzima 2-aminoadipato semialdeído desidrogenase (E.C.1.2.1.31), comumente conhecida como α -aminoadipato redutase, catalisa, na presença de ATP, Mg^{2+} e NADPH, a conversão de α -aminoadipato em α -aminoadipato- δ -semialdeído (Sagisaka e Shimura, 1962; Larson et al., 1963) (Figura 2). Em *Saccharomyces cerevisiae* essa enzima é codificada por 2 genes, *LYS5* e *LYS2*. A análise de mutantes revelou que os produtos gênicos tanto de *LYS2* quanto de *LYS5* contribuem para a atividade da enzima sugerindo que esses dois genes codificam diferentes subunidades da enzima (Storts e Bhattacharjee., 1989).

Rajnarayan et al. (1992) isolaram um clone contendo o gene *LYS5*, o qual foi subclonado num plasmídeo denominado pSR7. Quando o plasmídeo foi utilizado para a transformação de mutantes, estes produziram quantidades de α -aminoadípico redutase semelhantes àsquelas obtidas no tipo selvagem. O tamanho do produto gênico proveniente do gene *LYS2* foi calculado em 155000 tanto pela análise da sequência de DNA do gene clonado como pela análise dos transcritos. Os 2 genes, *LYS2* e *LYS5*, contribuíram para a atividade da α -aminoadípico redutase. Concluiu-se então que o gene *LYS5* codifica um transcrito de pequeno tamanho provavelmente não superior a 1,65 Kb e o gene *LYS2* codifica um grande transcrito compondo ambos uma enzima heteropolimérica (Morris e Robertson 1991).

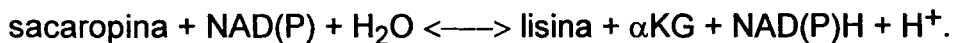
A sacaropina redutase, catalisa a condensação de ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído e glutamato em sacaropina (Figura 2) (Jones e Broquist 1965). As propriedades da enzima bem como seu peso molecular parecem bastante variáveis entre diferentes organismos. Em leveduras a enzima apresenta um peso molecular nativo entre 69000 e 73000 enquanto que em eletroforese em gel desnaturante foi encontrado um peso molecular de 50000. O pH ótimo da reação reversa foi de 9,5 e o K_m aparente para sacaropina e NAD foi de 2,32 mM e 0,054 mM respectivamente (Jones e Broquist 1966, Storts e Bhattacharjee, 1987). Já em *Pichia guilliermondii* o pH ótimo da reação reversa foi determinado

como sendo 8,8 e o peso molecular da enzima nativa foi de 90000. Os Kms obtidos para sacaropina e NADP foram de 1,25 mM e 0,17 mM respectivamente (Schmidt et al., 1989b).

Em *Candida maltosa*, outra levedura, a enzima também apresentou um peso molecular de 90000, pH ótimo de 8,5 e Kms de 0,55 mM para sacaropina e 0,13 mM para o NADP (Schmidt et al., 1985).

Em leveduras, estudos realizados com mutantes auxotróficos para determinar os locus gênicos requeridos para a biossíntese da sacaropina redutase, mostraram que os mutantes apresentavam bloqueios depois da síntese do ácido α -aminoadípico. Os mutantes Lys14 e Lys9 acumularam ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído e tiveram reduzida atividade de sacaropina redutase. Concluiu-se portanto que dois genes distintos, o *LYS9* e o *LYS14*, foram requeridos para a biossíntese da enzima (Borrel et al. 1984). Verificou-se posteriormente que o gene *LYS9* codificava a enzima enquanto que o produto do gene *LYS14* era requerido para a expressão do gene *LYS9*. Além disto, mostrou-se que o α -aminoadípico- δ -semialdeído também foi um indutor do gene estrutural da enzima. A *Saccharomyces ssp* é normalmente incapaz de crescer utilizando lisina como fonte de carbono devido em grande parte a repressão causada às enzimas da via. Assim, cogitou-se que a regulação promovida pelo α -aminoadípico- δ -semialdeído deveria ser um vestígio de que, em etapas evolutivas anteriores, a mesma via era usada tanto para síntese como para degradação de lisina, de acordo com o conteúdo de lisina no ambiente (Ramos et al., 1988).

A sacaropina desidrogenase catalisa o último passo na via de biossíntese de lisina a partir do ácido α -aminoadípico (Figura 2). A enzima catalisa a seguinte reação:



A sacaropina desidrogenase requer NAD preferencialmente ao NADP como coenzima (Fujioka, 1970). Em leveduras a sacaropina desidrogenase nativa apresenta um peso molecular entre 39000 e 49000. Os valores de Km obtidos para lisina, α KG e NADH foram 12 mM, 0,44 mM e 0,066 mM

respectivamente. A reação direta (formadora de lisina) apresentou pH ótimo próximo da neutralidade, enquanto que a reação reversa ocorreu num pH próximo de 10,0 (Saunders e Broquist, 1966, Ogawa e Fujioka, 1978). Na direção de formação da lisina, a enzima foi inibida por altas concentrações de α -cetoglutarato e lisina, mas na direção inversa não ocorreu inibição nem por sacaropina e nem por NAD. Outros análogos estruturais de lisina como a ornitina, norleucina e leucina foram potentes inibidores competitivos para a reação reversa e não produziram nenhuma inibição na reação direta (Fujioka, 1975). A enzima foi também inibida por uma variedade de reagentes sulfidrílicos que reagiram com os resíduos de cisteína da molécula (Ogawa et al., 1979).

Os estudos cinéticos realizados com a sacaropina desidrogenase de alguns fungos e leveduras revelaram que na reação reversa a enzima apresenta K_m s para NAD e sacaropina de 0,8 mM e 0,6 mM respectivamente (Gaillardin et al., 1979). Na reação direta, foram observados K_m s em torno de 1,45 mM para lisina; 0,65 mM para α KG e 0,11 mM para o NADH (Gaillardin et al., 1979, Schmidt et al., 1985, Schmidt et al., 1989b).

Um gene clonado de *Candida albicans*, *LYS1*, foi capaz de complementar a atividade da sacaropina desidrogenase em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Os tipos transformados *Lys1*⁺ mostraram uma atividade de sacaropina desidrogenase bastante significativa em comparação com os mutantes não transformados (Garrad e Battacharjee, 1992).

3.3 DEGRADAÇÃO DE LISINA

3.3.1 Degradação de lisina em organismos inferiores

Como discutido anteriormente, as duas últimas enzimas da via de biossíntese de lisina em leveduras foram capazes de realizar *in vitro* as mesmas reações no sentido inverso. Esta propriedade permitiria então que estas enzimas pudessem participar também do catabolismo de lisina. Foi obtido, no entanto, uma K_m de 12 mM para lisina na reação reversa da sacaropina desidrogenase. Este valor tão alto sugeriu que o equilíbrio da reação favorece a formação de lisina (Saunders e Broquist, 1966). Além disto, foram identificadas outras vias através das quais a lisina é degradada nestes organismos.

Em diferentes espécies de levedura foram observadas pelo menos 3 reações enzimáticas envolvidas em duas vias de catabolismo da lisina. Como mostra a Figura 3, a lisina pode ser catabolizada via α -aminoadípico- δ -semialdeído por ação da L-lisina-6-aminotransferase (E.C.2.6.1.36) ou da L-lisina-6-desidrogenase (E.C.1.4.1.18) ou então pode ser convertida a acetillisina pela acetil:CoA:L-lisina N6-acetil transferase na via do δ -aminovalerato (Hammer et al., 1991b; Schmidt et al., 1988).

Em *Candida guilhermondii*, uma levedura, observou-se que a lisina induziu três transaminases: a L-norleucina-leucina aminotransferase, a 4-aminobutirato aminotransferase e a δ -aminovalerato aminotransferase (Der Garabedian e Vermeersch, 1989). Essas enzimas estão envolvidas na transaminação da L-norleucina, do 4-aminobutirato e do δ -aminovalerato respectivamente. Sua forte indução, em resposta ao crescimento da levedura em meio contendo lisina, sugere a existência de uma outra via de catabolismo de lisina em leveduras onde o substrato de cada transaminase pode ser um metabólito intermediário desta via. Em *C. maltosa* e *C. albicans* foram caracterizadas outras

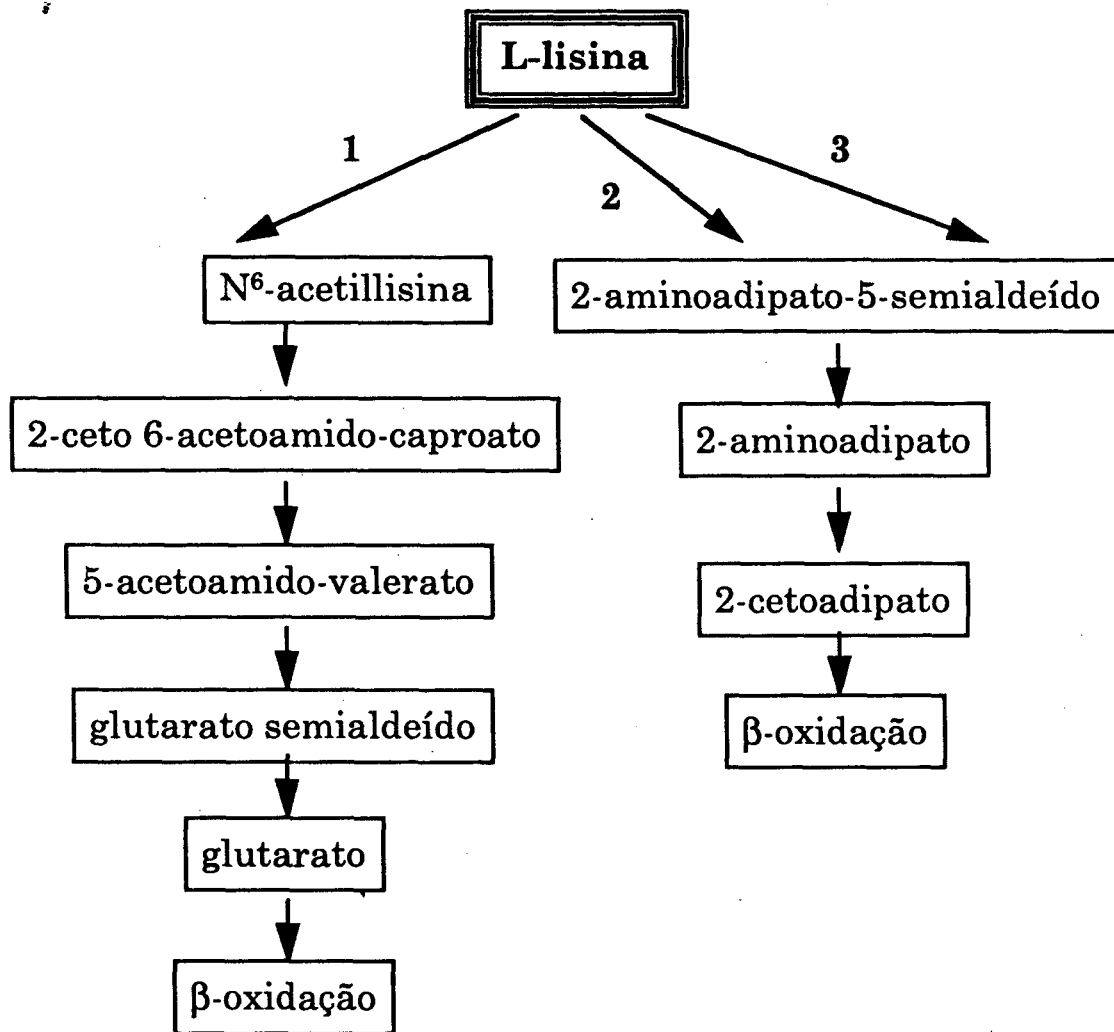


Figura 3. Vias postuladas de catabolismo de lisina em leveduras. 1, acetyl-CoA : L - lisina N6-acetiltransferase; 2, L-lisina : 2-oxoglutarato 6 - aminotransferase; 3, L-lisina : NAD(P)⁺ 6 - desidrogenase (Schmidt e Bode, 1992).

enzimas envolvidas no catabolismo de lisina pela via do δ -aminovalerato (Hammer et al., 1991a; Schmidt e Bode, 1992). A enzima L-lisina- ϵ -desidrogenase foi fortemente induzida em células de *C. albicans* crescidas em meio contendo lisina como única fonte de carbono (Hammer et al., 1991a).

Pseudomonas spp., bactérias aeróbicas, também possuem pelo menos três alternativas para o catabolismo de L-lisina. Esta pode ser descarboxilada formando o δ -aminovalerato, pode sofrer deaminação por uma transaminase formando um intermediário cíclico, ou pode ser primeiramente convertida em D-lisina e então seguir a via do L-pipecolato (Figura 4). De 23 estirpes diferentes de *Pseudomonas aeruginosa*, 17 foram capazes de usar a lisina como fonte de carbono, apesar de terem um crescimento reduzido. Nesta bactéria a lisina foi primeiro descarboxilada em cadaverina e posteriormente degradada pela via do δ -aminovalerato (Forthergill e Guest, 1977).

Em *Pyricularia oryzae*, um fungo imperfeito, a via do ácido α -aminoadípico funciona tanto na degradação de lisina como na sua síntese. Foi feita a incorporação *in vivo* de α -aminoadípico e este foi prontamente incorporado em sacaropina, lisina livre e lisina ligada a proteína. O micélio foi também capaz de converter L-lisina marcada em sacaropina. Porém, as evidências encontradas indicaram que esta via é mais importante para o catabolismo do que para a síntese de lisina neste fungo (Wade et al., 1980).

Em *Rhizoctonia leguminicola*, outro fungo, a síntese de lisina através do α -aminoadípico é importante quando ele cresce em meio pobre em lisina. Porém, quando o fungo cresce em seu habitat natural, isto é, como patógeno de leguminosas ou em meio contendo 0,1% de extrato de levedura, ele tem grande quantidade de lisina para crescer. Nesta via o α -NH₂ da lisina é incorporado ao ácido pipecólico via sacaropina. Para isto a sacaropina oxidase, cliva a sacaropina em ácido Δ 1,6-piperideína carboxílico que é então convertido em ácido L-pipecólico (Figura 5) (Wickwire et al., 1990a). A partir do ácido L-pipecólico, pode

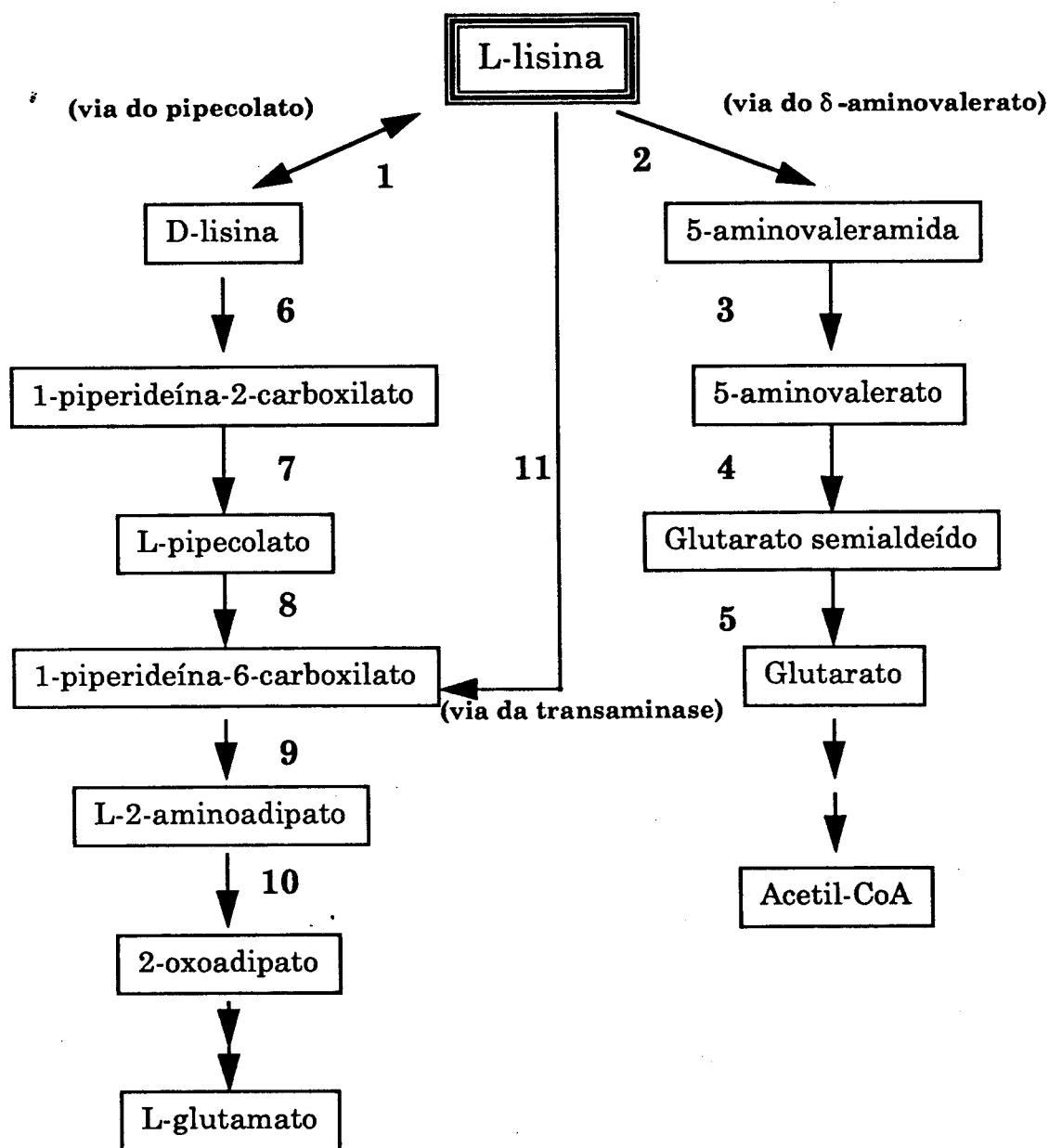


Figura 4. Vias de catabolismo de lisina em bactérias aeróbicas. 1, lisina racemase; 2, L-lisina 2-monooxigenase; 3, 5-aminovaleramida amidase; 4, 5-aminovalerato transferase; 5, glutarato semialdeído desidrogenase; 6, reação pressuposta; 7, 1-piperideína-2-carboxilato redutase; 8, L-pipecolato desidrogenase; 9, 1-piperideína-6-carboxilato desidrogenase; 10, L-2-aminoadipato aminotransferase; 11, L-lisina 6-aminotransferase (para revisão ver Fothergill e Guest, 1977).

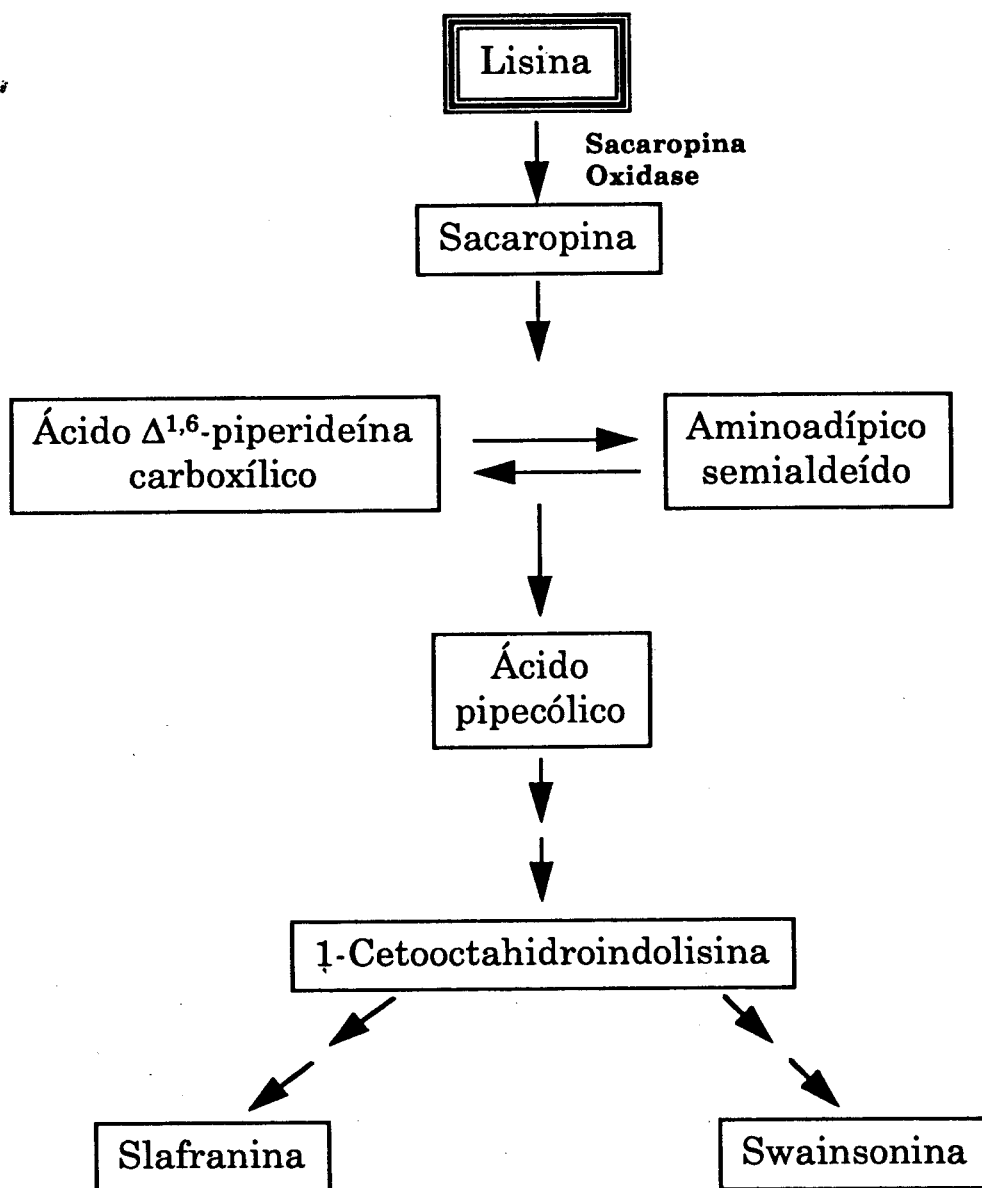


Figura 5. Via de catabolismo de lisina em *Rhizoctonia leguminicola* com formação de alcalóides como produtos secundários (Wickwire et al., 1990a,b).

haver formação de substâncias secundárias. Neste fungo, além de ser um componente do metabolismo de lisina, a sacaropina também pode levar a formação de 2 alcalóides de interesse fisiológico a slafranina e a swainsonina (Wickwire et al., 1990a,b).

3.3.2 Degradação de lisina em organismos superiores

Mamíferos

O estudo de pacientes que apresentavam altas concentrações de sacaropina e lisina na urina e no sangue incentivou a pesquisa da via de degradação de lisina no homem. Inicialmente as doenças associadas a estes defeitos metabólicos foram designadas por sacaropinúria (Carson et al., 1968), hiperlisinemia e hiperlisinúria (Woody, 1964; Ghadimi et al., 1965; Armstrong et al., 1967; Ghadimi et al., 1967).

Vários casos de hiperlisinemia e hiperlisinúria foram associados a quadros clínicos de retardamento mental e físico (Woody, 1964; Ghadimi et al., 1965; Armstrong et al., 1967; Ghadimi et al., 1967). Woody (1964) sugeriu que este defeito metabólico causa as complicações fisiológicas e que os pacientes seriam incapazes de incorporar lisina em proteína, daí seu excesso no organismo. Ghadimi et al. (1965) também associaram a hipotonicidade muscular em pacientes hiperlisêmicos e o distúrbio no metabolismo da lisina pois a miosina é particularmente rica em lisina. No entanto, a descoberta do excesso de lisina nos flúidos de outros familiares sadios mostrou que o excesso de lisina podia ser compatível com um desenvolvimento normal. Além disto, não se encontraram maiores evidências ligando o excesso de lisina e os demais distúrbios. Assim, a hiperlisinemia familiar foi diagnosticada como coincidente aos sintomas de retardamento e não como sua causadora (Woody et al., 1966; Woody et al., 1967; Ghadimi et al., 1967; Armstrong et al., 1967, Ozalp et al., 1981).

A administração de ^{14}C -L-lisina para indivíduos normais e pacientes hiperlisêmicos mostrou que havia um bloqueio metabólico logo no início da via de catabolismo de lisina nos indivíduos afetados (Woody et al., 1967).

Os primeiros trabalhos sobre catabolismo de lisina em organismos superiores foram realizados em ratos. As primeiras evidências sugeriram que a lisina em ratos era degradada via ácido pipecólico (Rothstein e Miller, 1954; Meister et al., 1957). Porém, os trabalhos de Higashino et al.

(1965, 1967) sugeriram que em ratos a via de degradação da lisina devia funcionar como a reação reversa para síntese de lisina em leveduras. A sacaropina também foi identificada em fígado humano (Higashino et al., 1965) e em ratos (Grove e Henderson, 1968). Em seguida Higashino et al. (1971) verificaram o aparecimento de sacaropina e α -aminoadípico marcados após a incorporação de ^{14}C -L-lisina em fígado de rato.

Duas atividades enzimáticas foram identificadas como sendo responsáveis pela degradação de lisina em mamíferos, a lisina cetoglutarato redutase (LKR) (EC 1.5.1.8) (Hutzler e Dancis, 1968; Fjellstedt e Robinson, 1975a; Noda e Ichiara, 1978) e a sacaropina desidrogenase (SDH) (EC1.5.1.9) (Hutzler e Dancis, 1970; Fjellstedt e Robinson, 1975b). A LKR condensa lisina e αKG em sacaropina na presença de NADPH enquanto que a SDH hidrolisa a sacaropina em α -aminoadípico- δ -semialdeído e ácido glutâmico na presença de NAD ou NADP (Figura 6). Convém ressaltar que a sacaropina desidrogenase aqui não é a mesma já citada em leveduras. A Comissão de Nomenclatura Bioquímica da União Internacional de Bioquímica em 1972 determinou que todas as enzimas responsáveis pela formação e degradação de sacaropina fossem designadas por sacaropina desidrogenases. Porém estes nomes não foram adotados em todos os trabalhos com as enzimas, não havendo consenso entre eles. Assim, nós adotaremos os nomes clássicos para as enzimas em leveduras, como citado até agora, e usaremos siglas para designar as enzimas de catabolismo de lisina em mamíferos e plantas. Posteriormente será feita uma correlação funcional e estrutural entre elas (Tabela V).

Dancis et al. (1969), utilizando cultura de células fibroblásticas de indivíduos normais e hiperlisêmicos, observaram que a atividade da

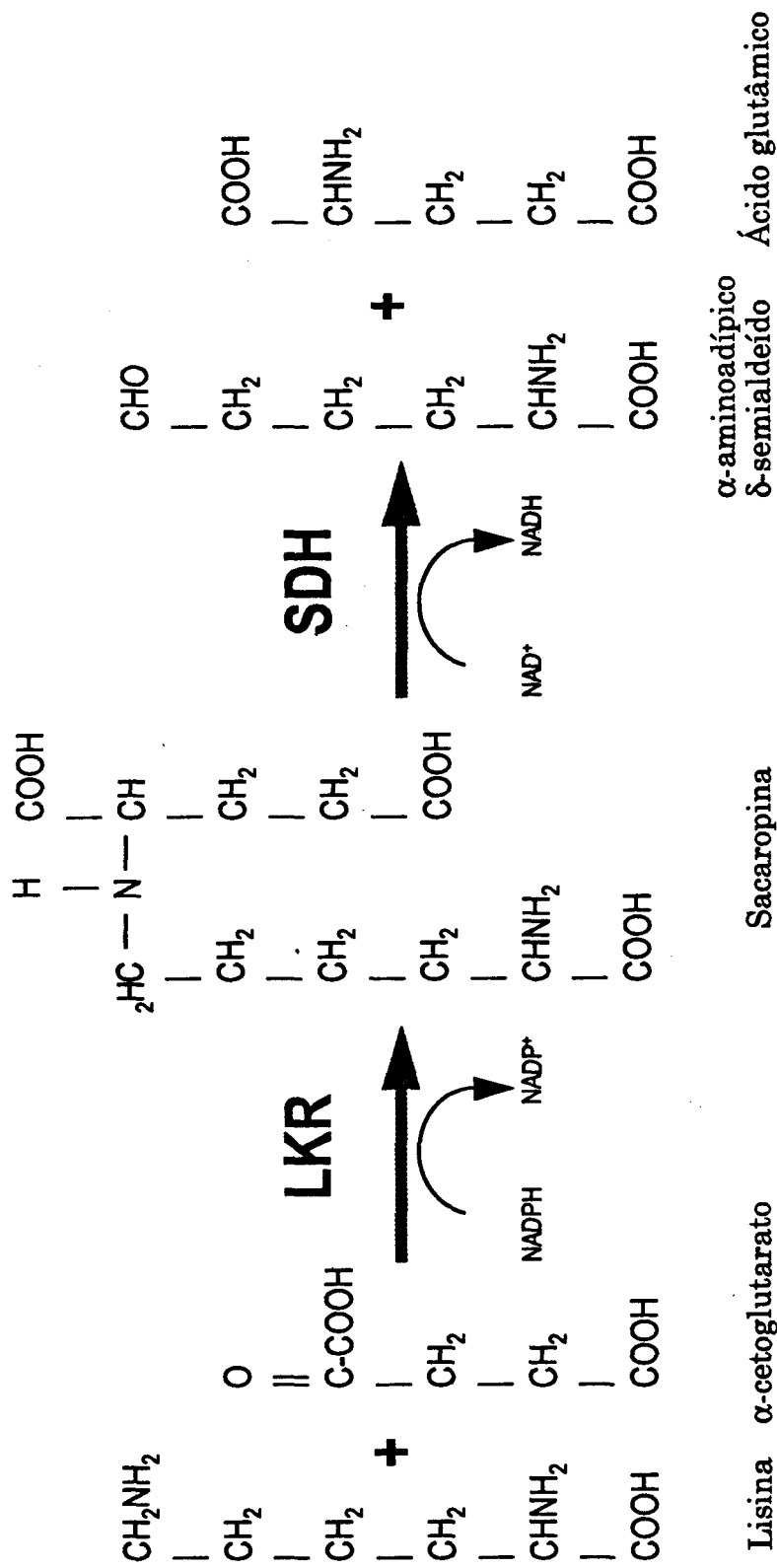


Figura 6. Via de catabolismo de lisina em mamíferos e plantas superiores. LKR: lisina cetoglutarato redutase; SDH: sacaropina desidrogenase (Hutzler e Dancis, 1968 e 1970 ; Fjellstedt e Robinson, 1975a,b; Brochetto-Braga, 1992; esta tese).

LKR foi consideravelmente reduzida em fibroblastos de indivíduos doentes. A detecção da LKR nas células normais permitiu confirmar a via da sacaropina como a principal rota degradativa para a lisina em células humanas.

A LKR de fígado de ratos apresentou peso molecular de 52000 em SDS e de 230000 em filtração em gel sugerindo que a enzima ativa era um tetrâmero. Os valores de K_m para L-lisina, α KG e NADPH foram de 2,2 mM; 1,4 mM e 0,078 mM respectivamente (Noda e Ichiara, 1978).

A SDH também foi caracterizada em fígado humano (Hutzler e Dancis, 1970). O pH ótimo para a atividade da enzima variou entre 8,8 e 9,0. Os valores de K_m obtidos para sacaropina e NAD foram de 0,5 mM e 0,4 mM respectivamente.

A SDH e a LKR também foram caracterizadas e copurificadas em placenta humana. Obteve-se um peso molecular de 480000 para ambas através de filtração em gel. Encontrou-se que a sacaropina foi um inibidor competitivo em relação ao α KG e não competitivo em relação a lisina na atividade de LKR (Fjellsted e Robinson, 1975a). A SDH de placenta humana teve seu pH ótimo determinado em 8,5. Os valores de K_m para sacaropina e NAD foram 1,15 mM e 0,0645 mM respectivamente. A enzima utilizou estritamente o NAD como cofator. A L-lisina *P*-nitroanelida foi um inibidor da atividade de LKR mas não inibiu a atividade de SDH (Fjellsted e Robinson, 1975b). Como as atividades foram copurificadas em todas as etapas experimentais sugeriu-se que elas poderiam pertencer a um mesmo polipeptídeo bifuncional (Fjellsted e Robinson, 1975a). Porém, o estudo anterior onde se obteve a inibição diferencial das atividades colocou dúvidas quanto a esta possibilidade (Fjellsted e Robinson, 1975b).

Após a caracterização das enzimas da via de catálise de lisina redenominaaram-se as doenças associadas aos excessos de lisina no sangue e de lisina e sacaropina na urina. O termo "hiperlisinemia familiar tipo I" designou os pacientes com defeitos nas atividades de LKR e SDH. O termo "hiperlisinemia familiar tipo II" designou os pacientes em que somente a atividade de LKR estava conservada (Dancis et al., 1979).

Finalmente Markovitz et al. (1984) purificou as atividades de LKR e SDH de fígado de boi e babuíno até a homogeneidade aparente. Seus resultados trouxeram evidências diretas da existência de uma única proteína com ambas as atividades em humanos. A enzima, purificada até homogeneidade eletroforética, apresentou-se como um polipeptídeo único com peso molecular de 115000 em gel desnaturante. A enzima nativa teve um peso molecular aparente de 468000 sugerindo ser um tetrâmero com subunidades idênticas. Desde então, sugeriu-se a red denominação desta enzima multifuncional para aminoadipato semialdeído sintetase.

Markovitz et al. (1987) submeteram o polipeptídeo purificado de 115000 a uma proteólise limitada e obteve a separação de 2 fragmentos com pesos moleculares de 62700 e 49200 respectivamente. O fragmento de 62700 conservou atividade de LKR e o fragmento de 49200 de SDH. Pela manutenção da atividade de cada fragmento, concluiu-se que os dois domínios estão separados e funcionam independentemente. Desta maneira, a lisina e o α KG são condensados formando a sacaropina pela ação do fragmento de 62700 e em seguida a sacaropina é hidrolisada pelo fragmento de 49200 em α -aminoadípico- δ -semialdeído e ácido glutâmico. Esta hipótese é amparada pelo fato da lisina *P*-nitroanelida inibir seletivamente a atividade da redutase não tendo efeito sobre a atividade da desidrogenase em placenta humana (Fjellstedt e Robinson, 1975b). Isto solucionou as controvérsias anteriores e proporcionou uma base molecular para as aparentes deficiências multienzimáticas que foram observadas na hiperlisinemia familiar do tipo I. Assim, na hiperlisinemia familiar tipo II o domínio da desidrogenase deve estar prejudicado enquanto que o domínio da redutase continua, mesmo que parcialmente, operante.

A uracil monofosfato (UMP) sintetase ou "complexo U" é outro exemplo de proteína bifuncional contendo dois sítios enzimáticos independentes. Este complexo catalisa as duas últimas etapas da biossíntese de pirimidina em mamíferos (Kasbekar et al., 1964; Shoaf e Jones, 1973). Em leveduras, estas duas atividades estão separadas em duas proteínas distintas (Umezue et al., 1971). As atividades do "complexo

U" em mamíferos também foram separadas por digestão proteolítica (Reyes e Gubanig, 1975).

Traut e Jones (1977), estudando a cinética de cada uma das duas atividades do "complexo U" concluíram que a ligação covalente dos domínios protéicos facilita a montagem de um complexo multienzimático no qual os intermediários ligados à enzima são encaminhados sequencialmente entre seus componentes. Isto proporcionaria uma proteção contra a diluição dos componentes bem como sua participação em reações competitivas com a reação principal. Markovitz et al. (1987) sugeriram que estas mesmas vantagens foram adquiridas pelo complexo LKR-SDH, redenominado então para aminoadipato semialdeído sintetase, durante o catabolismo de lisina mas que outros experimentos seriam necessárias para responder corretamente a questão.

Outra vantagem da presença de várias atividades enzimáticas numa única cadeia protéica é a regulação de sua síntese em quantidades equimolares através da amplificação do gene que a codifica (Wahl et al., 1979; Kanalas e Suttle, 1984).

Plantas

Em plantas superiores a via de degradação de lisina é muito semelhante àquela observada em mamíferos. O ácido α -aminoadípico foi encontrado primeiramente em *Lunaria anna* (Larsen, 1965) e posteriormente tanto o ácido α -aminoadípico como a sacaropina foram encontrados em várias espécies como *Fagopirum esculentum* (Nabeta et al., 1973), *Hordeum vulgare* (Moller, 1976a); *Reseda odorata* (Sorensen, 1976) e mais 10 plantas de 8 espécies diferentes (Nawaz e Sorensen, 1977).

Inicialmente considerou-se que o ácido pipecólico seria um dos intermediários na degradação de lisina via α -aminoadípico. Havia dúvida sobre a diversidade de vias para degradação de lisina nas plantas superiores. Alguns trabalhos mostraram evidências de que o ácido

pipecólico estava sendo formado a partir de lisina em feijão e em trigo (Grobbelaar e Steward, 1953 e 1954; Nigan e Mc Connel, 1963; Gupta e Spenser, 1969). Em *Acacia phyllodes*, quando ^{14}C -lisina foi injetada, o ácido α -aminoadípico apareceu como o produto mais fortemente marcado, mas também encontrou-se ácido pipecólico marcado. Por outro lado, lisina foi formada a partir de ^{14}C -ácido pipecólico injetado em plântulas. Foi interpretado então que poderia haver uma interconversão dos intermediários da degradação de lisina em ácido pipecólico (Fowden, 1960).

O que aconteceu nestes experimentos entretanto foi que a ^{14}C -lisina utilizada era uma mistura contendo os enantiômeros D e L-lisina. Para se definir se haveriam diferenças na degradação de cada um deles era necessário empregá-los separadamente. Os estudos, realizados com 2 espécies de *Sedum* e em *Nicotiana glauca*, mostraram que o ácido pipecólico encontrado como produto de degradação de lisina derivava somente da D-lisina (Leistner et al., 1973). Resultados semelhantes foram obtidos em *Neurospora crassa*. Além disto, mostrou-se que o ácido pipecólico participou de uma via irreversível de conversão de D-lisina em L-lisina neste organismo (Müller e Leistner, 1975).

Buscou verificar-se o α -aminoadípico e a sacaropina presentes nos extratos de plantas não derivavam de contaminação com fungos ou mesmo devido a ocorrência da via de síntese de lisina através destes intermediários. Para isto, ácido α -aminoadípico e a sacaropina marcados foram administrados a plantas de cevada. Mostrou-se que não havia formação de lisina derivada destes compostos. Além disto, a injeção de ^{14}C -ácido aspártico e ^{14}C -ácido diaminopimélico mostrou que a síntese de lisina via ácido aspártico é a principal via para as plantas superiores (Moller, 1974; Moller, 1976b).

Foi então estabelecido que a principal via de catabolismo de lisina em plantas era através do ácido α -aminoadípico. Buscou-se ainda elucidar a magnitude de sua ocorrência no endosperma de cereais devido ao

interesse no aumento do nível de concentração deste aminoácido em várias espécies cultivadas.

A lisina incorporada nas proteínas de reserva da semente pode ser sintetizada no próprio endosperma (Sodek, 1976), mas é translocada em proporções consideráveis de outras partes da planta através do floema (Lawrence e Grant, 1964; Da Silva e Arruda, 1979).

Sodek e Wilson (1970), estudando o metabolismo de ^{14}C -lisina e ^{14}C -leucina em endosperma em desenvolvimento de milho normal e opaco2, observaram que a ^{14}C -leucina foi recuperada como tal tanto em milho normal como em mutantes opaco2. No entanto, o mesmo não aconteceu com a ^{14}C -lisina. No endosperma normal, grande parte da ^{14}C -lisina injetada foi recuperada como ácido glutâmico e prolina, mas quase não houve conversão no endosperma opaco2. A proporção de lisina injetada que foi convertida aumentou com o desenvolvimento da semente. A marcação no embrião das espigas normais foi em grande parte na própria lisina, sugerindo então que o endosperma foi um sítio de conversão de lisina.

O catabolismo de L-lisina foi comparativamente observado entre endosperma de milho normal e sugary-opaco2. O endosperma mutante sugary-opaco2 e o endosperma normal receberam uma quantidade igual de lisina preformada. No entanto, os padrões de acumulação nos dois genótipos foram bastante diferentes. Estas diferenças iniciaram-se a partir de 14 dias após a polinização. O endosperma normal mostrou redução na concentração de lisina durante sua maturação enquanto que o endosperma mutante tendeu a manter um nível constante de lisina. No endosperma normal, o conteúdo de lisina observado foi 2,5 vezes inferior àquele estimado a partir do fluxo de entrada na espiga. Já no endosperma mutante o conteúdo estimado e encontrado foram semelhantes. Verificou-se então que o catabolismo de lisina foi maior no endosperma normal que no duplo mutante. Isto demonstrou que a taxa de conversão da lisina pode ser um mecanismo fundamental para o controle do nível de lisina no endosperma (Da Silva e Arruda, 1979).

As enzimas envolvidas no catabolismo de lisina já haviam sido estudadas em humanos e animais. A LKR foi caracterizada em endosperma de milho em desenvolvimento (Arruda et al., 1982). A enzima mostrou especificidade para lisina, α KG e NADPH. A formação de sacaropina foi demonstrada e o pH ótimo para sua atividade foi próximo a 7,0. Os valores de Km encontrados para lisina e α KG foram de 5,2 mM e 1,8 mM respectivamente. A observação da presença da enzima reforçou a hipótese da via do ácido α -aminoadípico no catabolismo de lisina em plantas. Observou-se que a atividade da LKR aumentou durante o desenvolvimento do endosperma atingindo um pico aos 20 dias após a polinização, sendo que a atividade coincidiu com o período de máximo acúmulo de nitrogênio e zeínas (Arruda e Da Silva, 1983). Como a quantidade de lisina encontrada na seiva da espiga foi mais de duas vezes superior àquela necessária para sua incorporação nas proteínas do endosperma sugeriu-se que a atividade da LKR estava associada a reciclagem dos grupos amino da lisina durante o desenvolvimento da semente. Desta maneira a LKR impediria que lisina livre fosse acumulada no endosperma.

A LKR de milho exibiu um peso molecular de 140000 em gel desnaturante. Estudos cinéticos demonstraram que a sacaropina foi um inibidor não-competitivo com relação ao α KG e competitivo com relação a lisina. A LKR extraída de mutantes opaco2 teve características essencialmente semelhantes àsquelas do endosperma normal. Porém, sua atividade foi grandemente reduzida neste mutante. Além disto, a enzima foi produzida de maneira coordenada com os níveis de zeína durante o desenvolvimento do endosperma. Foi sugerido então que o gene opaco2, que é um transativador das zeínas de 22000, pode estar envolvido na regulação do gene da LKR no endosperma de milho (Brochetto-Braga et al., 1992).

Karchi et al. (1994) expressou enzimas bacterianas para síntese de lisina em sementes em desenvolvimento de tabaco. Foi observada a

síntese e a catálise de lisina nas várias plantas transformadas e a modificação do acúmulo de lisina e treonina nas sementes destes mutantes. Foram expressas a AK e a DHPS de *Escherichia coli* que são insensíveis à retroinibição por lisina. As enzimas foram expressas em altos níveis mas houve somente um pequeno incremento de lisina livre em alguns estádios do desenvolvimento da semente. Entretanto foi observado um aumento elevado da atividade da LKR nas plantas transgênicas em relação aos controles sugerindo a presença de um mecanismo de controle do metabolismo de lisina durante o desenvolvimento das sementes de tabaco exercido pela própria lisina.

4. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- purificar e caracterizar as atividades da LKR e SDH envolvidas nos dois primeiros passos de degradação de lisina em endosperma de milho em desenvolvimento,
- mostrar que ambas as atividades residem num polipeptídeo bifuncional.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 Obtenção do Material Biológico

Sementes imaturas com aproximadamente 18-20 dias após polinização (DAP) produzidas pelo híbrido simples Agrocere F-35 foram coletadas e armazenadas em congelador -20 °C ou -70 °C.

Para os ensaios de tecido especificidade foram utilizadas plântulas do mesmo material.

5.2 Ensaio Enzimáticos:

5.2.1 LKR

Os ensaios para a atividade da LKR foram feitos como descrito por Brochetto-Braga et al. (1992). Foram feitas as seguintes modificações: a solução de ensaio teve, num volume final de 0,3 ml, 20 mM de lisina, 10 mM de α KG, 0,112 mM de NADPH, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e 0,03 a 0,1 mg de proteína. Nos controles foi medida a atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica de NADPH sem adição do substrato lisina.

A atividade da LKR foi detectada pela queda de absorbância em 340 nm utilizando-se um espectrofotômetro Beckman DU65. Foi considerado para cálculo que a absorbância de uma solução com 0,1 mM de NADPH a 340 nm equivale a 0,622. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade, em mg de enzima, requerida para oxidar 1 μ M de NADPH em 1 minuto.

Para medida da atividade foram utilizadas cubetas de quartzo e a leitura foi feita após misturar a enzima à solução de reação, deixando-se pré-incubar por 1 min dentro do aparelho aquecido a 30°C. Depois deste período, fez-se o monitoramento da atividade a 340 nm durante 5 min

utilizando-se um trocador automático de cubetas. Os ensaios foram feitos em duplicatas e o resultado final foi conseguido pela média dos valores das repetições diminuído do valor do controle.

A quantidade de proteína foi dosada utilizando-se o kit da Biorad, baseado no método de Bradford (Bradford, 1976) e usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão .

5.2.2 SDH

Os ensaios para atividade da SDH foram feitos num volume final de 0,3 ml contendo 1 ou 2 mM de NAD, 1 ou 2 mM de sacaropina, tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 e 0,03 a 0,1 mg de proteína. No ensaio controle foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NAD sem adição do substrato sacaropina.

A medida da atividade da SDH foi feita como para LKR, a atividade de SDH foi detectada pelo aumento da absorbância em 340 nm. Considerou-se para cálculo que a absorbância de uma solução de 0,1 mM de NAD em 340 nm equivale a 0,622. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade, em mg de enzima, requerida para reduzir 1 μ M de NAD em 1 minuto .

5.3 Purificação da LKR e SDH de acordo com Brochetto-Braga et al. (1992).

5.3.1 Preparação dos extratos celulares, fracionamento com sulfato de amônio

O extrato bruto foi preparado conforme descrito por Brochetto-Braga et al. (1992) com as seguintes modificações: as espigas com 20 DAP foram retiradas do congelador -70°C e colocadas sobre papel alumínio em caixa isotérmica contendo gelo. As sementes foram dissecadas com auxílio de uma pinça. Descartou-se o pericarpo e o embrião dos grãos ficando somente o endosperma para ser utilizado. Acrescentou-se tampão A

(fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 1 mM EDTA; 1mM DTT e 15% glicerol) na proporção de 1 ml para cada endosperma. A homogeneização, centrifugação e fracionamento 35-60% em sulfato de amônio do extrato ocorreram como descrito no trabalho citado.

O precipitado 35-60%, depois de ressuspendido num volume mínimo de tampão A, foi dessalinizado por duas passagem consecutivas em colunas de Sephadex G25 ou G50.

5.3.2 Ultracentrifugação

O extrato dessalinizado proveniente do fracionamento com sulfato de amônio 35-60% foi ultracentrifugado por 1 h a 4°C numa ultracentrífuga Beckman a 118000xg.

5.3.3 Cromatografia de troca iônica

Para cromatografia de troca iônica foi utilizada uma coluna preparativa de DEAE-Sephacel de 1,8 X 23 cm equilibrada em tampão A num fluxo de 1ml/min. O extrato ultracentrifugado foi diluído 1,5 vezes em Tampão A e aplicado na coluna. A coluna foi eluída com Tampão A até uma absorbância, em 280 nm, menor que 0,05. As proteínas foram eluídas da coluna em um gradiente linear de 0-0,5 M de cloreto de potássio (KCl) preparado num volume total de 500 ml de Tampão A. As frações foram coletadas num volume de 5 ml. Foram retiradas alíquotas das frações para dosar as atividades da LKR e SDH. Os ensaios para cada uma das atividades foram realizados adicionando-se 40 µl das frações na solução de ensaio. Outros 300 µl foram utilizados para estimar a quantidade de proteína eluída pela medida da absorbância em 280 nm.

As frações contendo as atividade da LKR e SDH foram reunidas e precipitadas em sulfato de amônio 70%. Esta fração foi centrifugada 15 min a 20000xg num rotor Beckman a 4°C. O precipitado foi ressuspendido

num volume mínimo de Tampão A e dessalinizado usando-se "spun columns" de Sephadex G25 ou G50

5.3.4 Deterninação de peso molecular

Detecção das atividades da LKR e SDH em géis de poliacrilamida não desnaturantes

Confecção dos géis de poliacrilamida não-desnaturantes

As eletroforeses em sistemas de tampões descontínuos e não-desnaturantes foram realizadas em meio neutro. Foi utilizado o sistema BioRad com géis de tamanho 20 x 20 cm.

O gel gradiente 5-20% não-desnaturante foi preparado conforme a metodologia descrita por Brochetto-Braga et al. (1992).

Para determinação do peso molecular das proteínas utilizou-se 2,5 µg de proteína dos padrões de peso molecular conhecido. As proteínas padrão para géis não-desnaturantes foram: ferritina (440000), catalase (232000), lactato desidrogenase (140000) e soroalbumina bovina (67000). O segmento de gel revelado para proteínas foi corado com "Comassie blue".

Para determinação da atividade das enzimas utilizou-se 40µg proteína da fração DEAE-Sepacel em quatro canaletas do gel.

A corrida foi feita em voltagem constante de 80 volts. Após a corrida, o gel foi cortado e as canaletas contendo as frações enzimáticas e os padrões foram separadas.

A mobilidade relativa (Rf) das bandas correspondentes a cada um dos padrões de peso molecular foi calculada dividindo-se a distância de migração das bandas pela distância da frente de corrida no gel, visualizado pelo azul de Bromofenol. Estes valores foram usados para construção de uma curva hipérbole com auxílio de um programa de computador denominado Eletroforese de autoria de Adilson Leite.

Revelação da atividade de LKR em gel

O gel foi condicionado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 por 20 min a 4°C. O tampão foi descartado e repetiu-se o processo mais duas vezes proporcionando o pH ótimo para atividade da LKR. O gel foi colocado numa solução com os seguintes substratos: 20 mM de lisina; 10 mM de α KG; 0,3 mM de NADPH em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0. A revelação foi feita sob agitação suave, no escuro, por 30 min a 30°C. Para visualização da atividade de LKR, o gel foi colocado sobre um transiluminador de luz ultra-violeta (UV) e rapidamente fotografado com uma câmera fotográfica polaroide. O ensaio controle foi feito com outro seguimento de gel porém omitindo a lisina da solução de revelação.

Revelação da atividade de SDH em gel

O gel foi condicionado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 por 20 min a 4°C. O tampão foi descartado e repetiu-se o processo mais duas vezes proporcionando o pH ótimo para atividade da SDH. O gel foi colocado numa solução com os seguintes substratos: 4 mM de sacaropina; 2 mM de NAD; 0,5% de "nitroblue tetrazolium"; 0,1 mM de fenazina metassulfato em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5. A revelação foi feita sob agitação suave, no escuro, por 30 min a 30°C. A visualização da atividade da SDH se deveu à reação do NADH, formado durante a atividade da enzima, com os sais de tetrazólio originando a formazona que é azul-avermelhada e se acumula sobre a banda. O ensaio controle foi feito com outro segmento de gel porém omitindo a sacaropina da solução de revelação.

5.3.5 Cromatografia em camada delgada para identificação dos produtos de reação da LKR e SDH

Os produtos de reação da LKR e SDH foram detectados por cromatografia em camada delgada (TLC) com "background" fluorescente. Foram usadas placas da Sigma de sílica-gel sobre vidro 20x20 cm. As reações foram preparadas com a fração da purificação em DEAE-Sephacel.

Para detecção dos produtos da atividade da LKR foi realizado um ensaio num volume inicial de 0,3 ml com 20 mM de lisina; 10 mM de α KG; 1 mM de NADPH; 20 μ g de proteína e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0. O ensaio foi conduzido por 2 horas a 30°C, 1 mM de NADPH foi acrescentado a cada 20 min.

A reação foi interrompida por fervura durante 5 min e colocação imediata no gelo. O volume final foi liofilizado, ressuscitado em álcool 70% para precipitação das proteínas presentes e centrifugado a 15000xg por 5 min. O sobrenadante foi retirado e liofilizado. Fez-se nova ressuspensão em 10 μ l de água. Esta amostra foi aplicada numa placa de TLC.

Para detecção dos produtos finais da atividade da SDH foram procedidos três ensaios. Os ensaios tiveram, num volume inicial de 0,3 ml: 4 mM de NAD; 4 mM de sacaropina; 20 μ g de proteína e 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8,5. Dois ensaios foram conduzidos por 2 horas a 30°C e 4 mM de NAD foi acrescentado a cada 20 min. O terceiro ensaio, ou controle, foi mantido no gelo para evitar a ação da enzima sobre o substrato.

Um ensaio com 2 h foi tratado da mesma maneira que o da LKR para aplicação na placa de TLC. O segundo ensaio e o controle foram reservados para detecção do α -aminoadípico- δ -semialdeído usando o-aminobenzaldeído.

Na mesma placa de TLC onde foram aplicados os ensaios para LKR e SDH foram aplicados também 2 µl de uma solução 10 mM de αKG e de cada um dos aminoácidos: lisina, sacaropina, ácido glutâmico e ácido α-aminoadípico. Após a aplicação das amostras a placa foi seca usando-se um secador de cabelos manual. Em seguida a placa foi colocada numa cuba vertical contendo o seguinte sistema de solventes: butanol, acetona, dietilamina, trietilamina e água na proporção de 10:10:1:1:5, respectivamente.

A placa permaneceu na cuba até a frente de corrida atingir, por capilaridade, 2 cm da borda superior. Foi então retirada da cuba e seca. Em seguida, procedeu-se à visualização do αKG com auxílio de luz UV e sua posição na placa foi assinalada. Foram aguardados mais 3 dias de secagem no ambiente. Fez-se então a revelação borrifando-se uma solução 0,2% de ninidrina em acetona e colocando-se a placa a 80°C por 15 min. Foi observado o aparecimento de manchas azul-avermelhadas na posição de cada um dos aminoácidos.

Para detectar a presença do α-aminoadípico-δ-semialdeído no ensaio para SDH utilizou-se a metodologia descrita por Basso et al. (1962). Observou-se a reação do α-aminoadípico-δ-semialdeído com o-aminobenzaldeído pois ele não reage com a ninidrina não podendo ser visualizado na placa de TLC.

Alíquotas de 0,2 ml do ensaio com 2 horas e do controle foram adicionadas a 0,1 ml de solução de o-aminobenzaldeído e deixadas a temperatura ambiente por 10 min. O espectro de absorção da reação foi medido num espectrofotômetro Beckman DU65. Após leitura do ensaio completo e do controle, foi construída a curva do espectro de absorção correspondente à formação do ácido α-aminoadípico-δ-semialdeído nas 2 horas de reação.

5.3.6 Efeito de cofatores e pH nas atividades de LKR e SDH

Determinou-se o efeito dos cofatores e do pH sobre as atividades da LKR e SDH em 2 tampões diferentes: o tampão fosfato 100 mM com pHs variando de 5,5 a 8,5 e o tampão Tris-HCl 100 mM com pHs variando de 7,0 a 10,0. Utilizou-se a fração protéica da purificação em DEAE-Sephacel.

Os ensaios para atividade da LKR foram feitos num volume final de 0,3 ml contendo 20 mM de lisina; 10 mM de α KG 0,112 mM de NADPH e 36 μ g de proteína.

Os ensaios para atividade da SDH foram feitos num volume final de 0,3 ml contendo 1 mM de sacaropina, 1 mM de NAD e 36 μ g de proteína.

Foram também realizados ensaios usando o NADP como cofator para a atividade de SDH. Para isto foram feitas reações idênticas às aquelas descritas acima para atividade da SDH, substituindo o NAD pelo NADP na mesma concentração.

As atividades enzimáticas foram monitoradas em espectrofotômetro como descrito anteriormente.

5.3.7 Determinação da tecido especificidade da LKR e SDH

Foram preparados, extratos de endosperma e embrião de sementes com 20 DAP e coleóptilo e raiz de plântulas após 3 dias de germinação. Foram utilizados em média 12g de cada um dos tecidos para iniciar a extração.

Logo após coleóptilos e raízes serem cortados das plântulas, foram pesados separadamente e colocados em Tampão A (fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 1 mM de DTT; 1 mM de EDTA e 15 % de glicerol) a 4°C na proporção de 1 g para 5 ml de tampão. Embriões e endospermas de sementes com 20 DAP também foram separados, pesados e colocados em Tampão A na mesma proporção. Os materiais foram então homogeneizados separadamente em um triturador Superohm. Filtrou-se cada suspensão em 8 camadas de gaze. Centrifugou-se cada fração de

tecido por 25 min a 20000xg num rotor Beckman. Os sobrenadantes de cada tecido foram fracionados em sulfato de amônio 35-60% e novamente ressuspensos em Tampão A, como descrito por Brochetto-Braga et al. (1992). As frações foram dessalinizadas em "spun columns" montadas com Sephadex G50 em seringas de 5 ml. As seringas foram preparadas centrifugando-se a resina ressuspensa em Tampão A a 153xg por 5 min no mesmo rotor.

Para dosagem das atividades foram utilizadas aproximadamente 100 µg de proteína dos extratos de cada tecido. As atividades da LKR e SDH foram determinadas em duplicata para cada um dos tecidos.

5.3.8 Parâmetros enzimáticos da SDH

Determinação do Km para sacaropina e NAD

Os estudos de velocidade inicial da reação para a atividade da SDH foram feitos variando-se a concentração de NAD em três concentrações fixas de sacaropina e variando-se a concentração de sacaropina em três concentrações fixas de NAD. Os ensaios foram realizados num volume final de 0,3 ml em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 e contiveram 51 µg de proteína proveniente da fração DEAE-Sephacel.

Os gráficos foram expressos em concentração do substrato (S) sobre velocidade da enzima (V) com atividade específica (nmoles de cofator/min/mg de proteína) versus concentração do substrato (S), ou seja, $S/V \times S$. Os valores de Km foram calculados com ajuda do programa ENZIFITER (Leatherbarrow, 1987).

Estudo de Inibição para SDH

Verificou-se a possibilidade de inibição da atividade da SDH por seus produtos finais e pelos substratos da LKR. O ensaio completo conteve 30 µg de proteína da fração de DEAE-Sephacel; 1 mM de sacaropina, 1 mM de NAD em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8,5.

Para testar a inibição da atividade da SDH por seus produtos finais acrescentou-se em um ensaio completo 0,5 mM de ácido glutâmico, em outro 0,5 mM de α -aminoadípico e num terceiro 0,5 mM de ambos os compostos. Para testar a inibição da atividade da SDH pelos substratos da LKR acrescentou-se em um ensaio completo 10 mM de lisina, em outro 5 mM de α KG e num terceiro 10 mM de lisina e 5 mM de α KG. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

5.4 Purificação da LKR e SDH de acordo com Markovitz et al. (1984)

5.4.1 Preparação dos extratos celulares, fracionamento em PEG-8000 (polietilenoglicol)

Foi feita uma adaptação da metodologia descrita por Markovitz et al. (1984) para purificação da aminoadipato semialdeído sintetase de mamíferos. Esta proteína possui 2 domínios protéicos contendo as atividades da LKR e SDH.

Espigas de milho com 18 DAP foram debulhadas e os grãos foram armazenados a -70°C. Homogenizou-se 1100 g grãos inteiros em 1 litro de tampão de extração Tampão D (fosfato de sódio 25 mM pH 7,4; 1 mM de DTT; 1 mM de EDTA) com auxílio de um triturador Superhon. Após sua lise, o extrato foi filtrado em 8 camadas de gase. Fez-se a primeira centrifugação a 20000xg por 10 min numa centrífuga Sorval. Foi medido o volume do sobrenadante e retirou-se uma alíquota de 1 ml deste extrato bruto (EB) para dosagem de proteína e atividade enzimática. O pH do extrato foi então abaixado pela adição de uma solução NaH_2PO_4 2,5 M até o pH 5,5. O sobrenadante foi fracionado progressivamente usando uma solução de polietileno glicol (PEG) 8000 50% (p/v) em água. Todo o procedimento foi realizado a 4°C.

Tabela contendo os volumes utilizados de PEG para precipitação das proteínas:

Fração pH 5,5	5%	7,5%	15%
volume	[volume PEG (50%)]		
2180ml	218 ml	109 ml	327 ml

Adicionou-se solução de PEG 50% ao EB, pH 5,5; até atingir uma concentração final de 5%. Esta solução foi deixada no gelo para precipitação das proteínas durante 30 min. Em seguida o extrato foi centrifugado a 20000xg por 10 min. O sobrenadante foi ajustado para uma concentração de PEG de 7,5%, as proteínas foram precipitadas e sedimentas da mesma maneira. O sobrenadante, obtido após centrifugação a 20000xg por 10 min, foi ajustado finalmente para uma concentração de PEG 15%. O precipitado obtido após esta centrifugação, foi ressuspensionado em 85 ml do tampão E (Tris-HCl 50 mM pH 8,4; 2mM DTT; 1,5 mM EDTA). Em seguida o extrato foi dessalinizado através de diálise em 2 litros de Tampão A por uma noite. Após a diálise, a fração PEG 15% foi centrifugada por 5 minutos a 400xg. As atividades de LKR e SDH foram determinadas previamente nos sobrenadantes e precipitados de cada passo utilizado no fracionamento com PEG. As duas atividades predominaram na fração precipitada com 15% PEG.

5.4.2 Cromatografia de troca iônica usando equipamento para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Usando um HPLC condicionou-se uma coluna de DEAE (Protein Pak DEAE 8HR 1000 a 8 μ m 10x100 mm) em Tampão E num fluxo de 1,5 ml/min. Injetou-se a fração de PEG 15% na coluna, 14 ml de cada vez. Em seguida eluiu-se com Tampão E, durante 30 minutos, retirando-se as proteínas que não aderiram na resina. Fez-se então a eluição das enzimas num gradiente 0-0,5 M de NaCl em Tampão E por 2 horas e meia. Foram recolhidas frações de 1,25 ml e as atividades da LKR e SDH foram dosadas. Em seguida aumentou-se a concentração do tampão até 1,5 M de NaCl retirando-se proteínas que estavam fortemente ligadas na resina. A coluna foi condicionada novamente em Tampão E e fez-se nova aplicação do extrato de PEG 15%. Foram feitas 6 aplicações para injetar os 85 ml provenientes do fracionamento com PEG 15%.

As frações eluídas da cromatografia em DEAE foram reunidas e precipitadas em sulfato de amônio 70%. A fração foi sedimentada a 20000xg, 10 min, numa centrífuga Sorval. O "pelete" foi ressuscitado num volume mínimo de Tampão E e procedeu-se à diálise no mesmo tampão. O volume final da fração, após cromatografia em DEAE e dessalinização, foi de 7,5 ml. Esta fração foi recromatografada na mesma coluna em condições semelhantes porém usando um gradiente mais restrito para incrementar sua resolução.

A recromatografia dos 7,5 ml provenientes da DEAE foi realizada injetando-se este volume em duas etapas na coluna de DEAE. A diferença foi que, após a injeção, fez-se a eluição da coluna com 0,075 M de NaCl em Tampão E. O gradiente foi iniciado nos 0,075 M e conduzido até 0,5 M de NaCl em Tampão E. Da mesma forma, as frações contendo as atividades da LKR e SDH foram precipitadas em sulfato de amônio 70% e centrifugadas a 20000xg, 10 min, numa centrífuga Sorval. A fração final da recromatografia em DEAE foi ressuscitada num volume de 0,8 ml de

Tampão G (100 mM de fosfato de potássio pH 7,0; 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 300 mM de NaCl).

5.4.3 Filtração em gel usando HPLC

Usando o equipamento de HPLC preparou-se uma coluna de Superdex (Protein Pak Superdex 200 HR 10x300 mm) em Tampão G num fluxo de 0,5 ml/min. Foram aplicadas alíquotas de 0,2 ml do extrato da recromatografia em DEAE a cada injeção na coluna de Superdex. Eluiu-se a coluna com Tampão G durante 60 min, coletando-se frações de 0,25 ml. As frações que continham as atividades da LKR e SDH foram reunidas num volume total de 1,58 ml e mantidas neste Tampão G a 0°C.

A fração resultante da primeira filtração em gel foi precipitada em sulfato de amônio 70% e ressuspensa em 0,15 ml de Tampão G. Após duas semanas de estocagem a 0°C, a fração obtida na filtração em gel foi recromatografada para melhor separar a LKR e a SDH das proteínas de peso molecular próximo. A coluna de Superdex foi condicionada da mesma maneira em Tampão G e a recromatografia foi feita em duas aplicações. Foram coletadas frações de 0,15 ml e dosadas as atividades da LKR e SDH.

Para determinação da curva de peso molecular foi injetada uma solução padrão de peso molecular conhecido contendo as seguintes proteínas: ovoalbumina (43000), soro albumina bovina (67000), aldolase (158000), catalase (232000), ferritina (440000) e também "Blue dextran" para medir a frente de corrida. As proteínas foram monitoradas por absorbância a 280 nm. Construiu-se uma curva com a transformação dos valores de tempo de saída de cada proteína padrão e estimou-se assim o peso molecular da proteína com atividade da LKR e SDH.

5.4.4 Eletroforese das frações resultantes da purificação

Para confecção dos géis de poliacrilamida foi utilizada a metodologia descrita por Brochetto-Braga et al. (1992). Porém, foi usado o sistema para mini-géis da BioRad e procedeu-se a coloração com prata como será descrito.

Foram aplicadas no gel as seguintes quantidades de proteína de cada uma das frações: extrato bruto 0,82 µg; fracionamento com PEG 15% 0,89 µg; DEAE recromatografia 0,73 µg; Superdex recromatografia 0,35 µg. Para determinação dos padrões de peso molecular foi utilizado 0,5 µg de uma solução contendo miosina (200000), fosforilase B (97000), soroalbumina bovina (68000), ovoalbumina (43000), anidrase carbônica (29000), β-lactoglobulina (18400) e lisozima (14300).

Coloração com Prata:

Fixou-se o gel em duas etapas, primeiro colocando-se por 1 hora na solução fixadora I (Etanol 50%, ácido acético 12%, 0,5 ml/l de formaldeído 37%) em seguida transferindo-se para o fixador II (etanol 50%) por 20 minutos. Retirou-se o fixador II e repetiu-se esta etapa mais uma vez.

Após fixação, foi feito um pré-tratamento do gel por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02%. O gel foi lavado 3 vezes por 20 segundos com água ultrafiltrada. Depois da lavagem colocou-se o gel 10 min na solução de impregnação (nitrato de prata 0,3%, 0,75ml/l de formaldeído 37%) sob agitação suave no escuro. Lavou-se novamente da mesma maneira. As proteínas foram reveladas colocando-se o gel na solução reveladora (carbonato de sódio 0,4%; 0,5ml/l de formaldeído 37%) até o aparecimento das bandas. Finalizou-se a revelação com uma solução de bloqueio (metanol 50%, ácido acético 12%).

O gel foi fotografado e depois colocado para secar entre 2 papéis celofanes sobre uma placa de vidro a temperatura ambiente.

6. RESULTADOS

6.1 Purificação da LKR e SDH pela metodologia descrita por Brochetto-Braga et al. (1992) e determinação dos parâmetros enzimáticos

6.1.1 Cromatografia em DEAE-Sephacel

A SDH foi parcialmente purificada de endospermas imaturos de milho utilizando-se tampões e condições similares às aquelas descritas para purificação da LKR do mesmo tecido (Brochetto-Braga et al., 1992). A sequência de passos para obtenção e o grau de purificação da enzima podem ser vistos na Tabela 1. O grau de purificação foi calculado sempre em relação ao extrato fracionado com sulfato de amônio. Antes dos ensaios, as frações obtidas em cada passo foram dessalinizadas em colunas de Sephadex G25 ou G50. Depois do fracionamento em sulfato de amônio e da ultracentrifugação, a preparação foi aplicada a uma coluna de DEAE-Sephacel e foi eluída com um gradiente de cloreto de potássio em Tampão A como mostra a Figura 7. Um único pico contendo a atividade da SDH foi eluído entre 0,2 e 0,3 M de cloreto de potássio. A atividade específica da fração de DEAE foi cerca de 19,1 vezes maior em relação ao passo anterior.

As frações da cromatografia em DEAE-Sephacel foram também testadas para atividade da LKR. O pico da atividade da enzima foi detectado nas mesmas frações observadas para SDH (Figura 7).

A preparação obtida neste passo de purificação foi utilizada para análise de várias características de ambas as enzimas tais como: atividades da LKR e SDH em gel não-desnaturante e determinação do peso molecular, tecido especificidade, produtos das reações, pH ótimo, Km dos substratos da SDH, inibição da atividade da SDH.

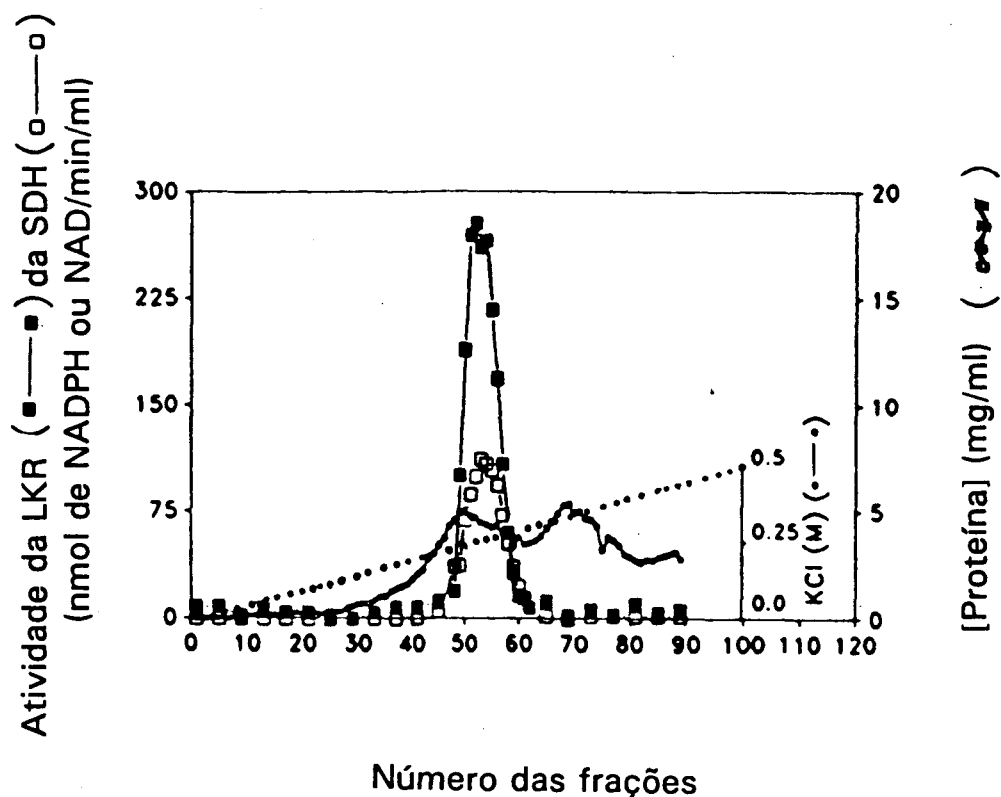


Figura 7. Padrão de eluição das atividades de LKR e SDH em uma coluna de DEAE-Sephacel. Foi aplicada a proteína proveniente do fracionamento em sulfato de amônio 35-60%. A coluna foi eluída usando-se um gradiente de 0 - 0,5 M de KCl em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 1 mM de EDTA; 1 mM de DTT; 15% de glicerol. As atividades foram determinadas usando-se 40 μ l das frações eluídas da coluna. As atividades foram eluídas nas mesmas frações numa faixa de gradiente entre 0,2 e 0,3 M de KCl.

Tabela I. Purificação da SDH e LKR de endospermas imaturos de milho, segundo metodologia de Brochetto-Braga et al. (1992).

	Proteína Total	SDH				LKR	
		Atividade Total	Atividade Específica	Purificação	Recuperação	Atividade Específica	
	mg	*	**	(vezes)	%	**	
Extrato Bruto^a	6167	13882	2,3	-	-	-	
Precipitação 35-60% S.A	1571	38900	24,8	1,0	100	-	
Ultracentrifugação	1235	33978	27,5	1,1	87	-	
DEAE-Sephacel	22,8	10815	474	19,1	28	1085,5	

^a A purificação e recuperação da atividade de SDH foram calculadas em relação a fração de precipitação em 35-60% S.A. porque os dados correspondentes ao extrato bruto contém alta atividade inespecífica o que gera imprecisão na estimativa da atividade de SDH desta fração.

*nmol NAD/min

**nmol NAD ou NADPH/min/mg proteína

6.1.2 Atividade em gel de poliacrilamida e peso molecular

A preparação enzimática obtida após cromatografia de troca iônica foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante num gradiente de 5-20%. Após a corrida, o gel foi cortado em 5 tiras longitudinais, 4 delas contendo uma alíquota da enzima e uma quinta contendo os padrões de peso molecular. Duas foram utilizadas para revelar a atividade da LKR: ensaio completo e controle; as outras duas para revelar a atividade da SDH: ensaio completo e controle e a última, contendo os padrões de peso molecular, foi corada com "Coomassie blue".

O gel revelado para atividade da LKR mostrou uma banda formada pelo consumo do NADPH ao ser exposto a luz UV (figura 8, canaleta 2). O NADPH impregna o gel tornando-o fluorescente. Onde a enzima está atuando forma-se uma mancha escura pela falta de fluorescência. No ensaio sem lisina o gel apareceu completamente claro, ou seja, não demonstrou nenhum consumo inespecífico do NADPH (Figura 8, canaleta 1).

O gel revelado para atividade da SDH mostrou uma banda azul-avermelhada formada pelo acúmulo de formazona (Figura 8, canaleta 4). Isto deveu-se ao consumo do NAD neste local. A enzima atua formando o NADH que reage com os sais de tetrazólio presentes produzindo a formazona. O controle, sem sacaropina, não apresentou formação de bandas, não havendo então consumo inespecífico do NAD (Figura 8, canaleta 3).

As bandas da LKR e SDH apresentaram migrações idênticas. O peso molecular das atividades foi estimado em aproximadamente 140000 para ambas as enzimas utilizando-se a curva construída apartir dos valores de R_f dos padrões de peso molecular no gel não-desnaturante (Figura 8). Este mesmo valor já havia sido encontrado para a LKR de milho (Brochetto-Braga et al., 1992).

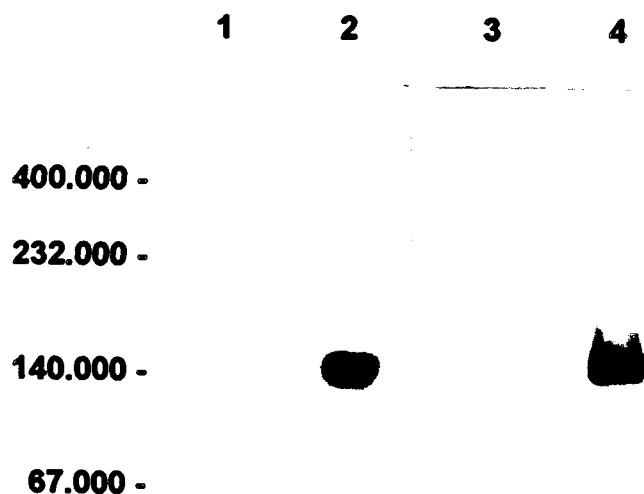


Figura 8. Revelação da atividade da LKR e SDH em gel de poliacrilamida não-desnaturante. Foram utilizadas 64 μ g de proteína da fração purificada em DEAE-Sephacel em cada canal do gel. Os segmentos de gel foram lavados 3 vezes no tampão de cada uma das enzimas a 4°C. A revelação foi feita a 30°C. O controle e o ensaio para LKR foi fotografado em luz UV. (1) Controle para LKR, 10 mM de α -cetoglutarato em 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (2) Ensaio para LKR, igual anterior mais 20 mM de lisina; (3) Controle para SDH, 2 mM de NAD; 0,1 mM de fenazina metassulfato; 0,5% de nitroblue tetrazólium em 0,1 M de tampão Tris-HCl pH 8,5; (4) Ensaio para SDH, igual anterior mais 4 mM de sacaropina. Os números indicados à esquerda indicam os seguintes marcadores de peso molecular: 440000, ferritina; 232000, catalase; 140000, lactato desidrogenase; 67000, albumina.

6.1.3 Tecido especificidade

Os extratos preparados de endosperma, embrião, coleóptilo e raiz foram fracionados em sulfato de amônio 35-60%, dessalinizados em Sephadex G-50 e testados para atividade da LKR e SDH (Tabela II).

O extrato proveniente do embrião apresentou uma alta atividade inespecífica de desidrogenases pois houve um grande consumo de NAD tanto no ensaio da SDH contendo sacaropina como no ensaio em branco. A resultante porém foi nula, ou seja, não se observou a existência da atividade da SDH neste tecido.

No extrato de raiz e no extrato de coleóptilo não foi detectada atividade de nenhuma das duas enzimas. Tanto a atividade da LKR como SDH só foram encontradas no extrato de endosperma com 20 DAP.

6.1.4 Produtos da reação

A identidade dos produtos das reações catalizadas pelas atividades da LKR e SDH foi determinada por cromatografia em camada delgada e análise do espectro de absorção (Figura 9A e B).

A reação com lisina, α KG e NADPH permitiu a formação de um composto que comigrou com o padrão da sacaropina presente na placa (Linha 3 e 7 da Figura 9A). O α KG em excesso na reação mostrou-se fluorescente sob luz UV. A lisina e a sacaropina reagiram com ninidrina formando uma mancha azul-avermelhada. Isto demonstrou que a ação da LKR, presente no extrato, foi responsável pela formação da sacaropina.

A reação com sacaropina e NAD permitiu a formação de um produto que comigrou com o ácido glutâmico (Linha 5 e 6, Figura 9A). O ácido glutâmico apareceu na placa corado por ninidrina. A reação também produziu um composto que reagiu com o o-aminobenzaldeído. A reação foi confirmada pelo aparecimento de cor alaranjada com pico máximo de absorção em 470 nm (Figura 9B). Esta reação é indicadora

Tabela II. Tecido especificidade da LKR e SDH em milho.

	LKR				SDH			
	Sem lisina	Ensaio completo	Atividade ^a	Recup.	Sem sacaropina	Ensaio completo	Atividade ^b	Recup.
	**	**	**	%	***	***	***	%
Endosperma	1,6	86,2	84,6	100	66,4	126,9	60,5	100
Coleóptilo	3,9	3,9	0	0	0,4	0,3	0	0
Embrião	4,3	8,5	0	0	218	209	0	0
Raiz	9,0	5,4	0	0	0,2	0	0	0

^a Ensaio completo menos o controle sem lisina

^b Ensaio completo menos o controle sem sacaropina

***nmol NADPH/min/mg de proteína

***nmolINAD/min/mg de proteína

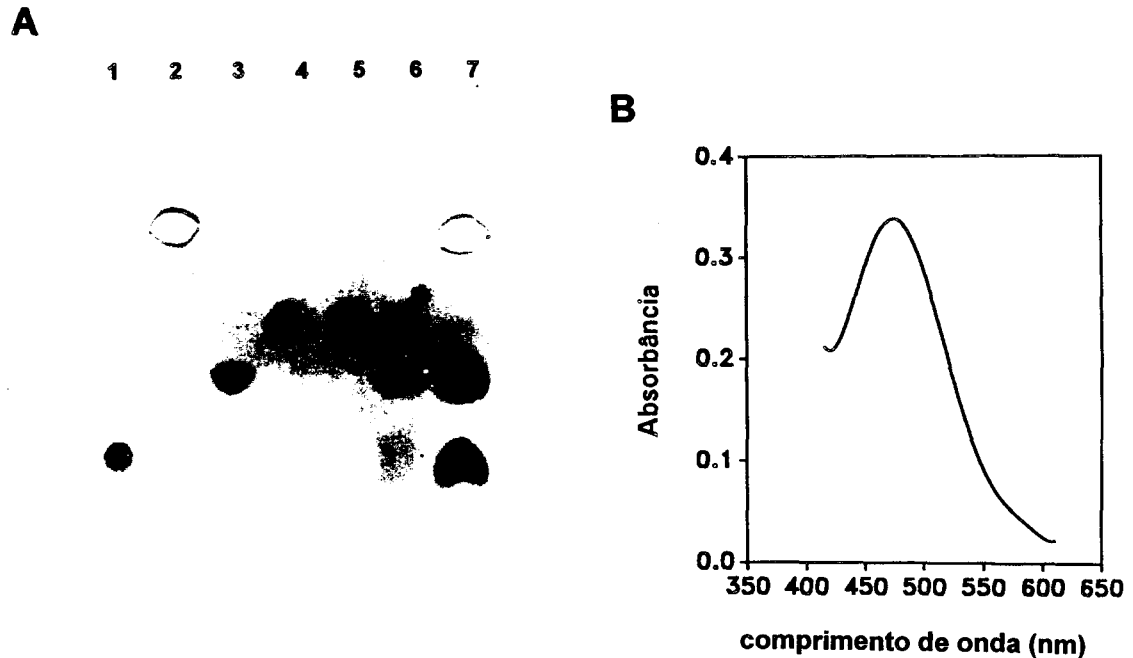


Figura 9. Identificação dos produtos de reação das atividades de LKR e SDH. A reação para SDH teve inicialmente, em 0,3 ml: 4mM de NAD, 4 mM de sacaropina e 20 μ g de proteína da cromatografia em DEAE-Sephacel em 0,1 M de tampão Tris-HCl pH 8,5. A cada 20 min, 4 mM de NAD foram adicionados. A reação durou 2 h. A mistura de reação para LKR conteve, num volume inicial de 0,3 ml: 20 mM de lisina, 10 mM de α -cetoglutarato, 1 mM de NADPH e 20 μ g de proteína da cromatografia em DEAE-Sephacel em 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 7,0. A cada 20 min, 1 mM de NADPH foi adicionado. A reação durou 2 h. As reações foram fervidas 5 min, as proteínas foram precipitadas com álcool 70% e separadas. A mistura foi liofilizada, ressuspensa em 10 μ l de água e foi aplicada numa placa de sílica para TLC com fluorescência. Foram aplicados também 2 μ l de soluções 10 mM dos seguintes compostos: **Figura 9A (1)** lisina; **(2)** α -cetoglutarato; **(3)** sacaropina; **(4)** ácido α -aminoadípico; **(5)** ácido glutâmico. **(6)** ensaio para SDH; **(7)** ensaio para LKR. **Figura 9B** Identificação do α -aminoadípico- δ -semialdeído pela reação com o o-aminobenzaldeído. Alíquotas de 200 μ l do ensaio de sacaropina com 2h de reação e do controle foram reagidas com 100 μ l de uma solução de o-aminobenzaldeído durante 10 min. O espectro de absorção da reação foi medido em um espectrofotômetro Beckman.

da presença do α -aminoadípico- δ -semialdeído na mistura de reação (Basso et al., 1962). Deste modo, confirmou-se que a SDH atuou sobre a sacaropina levando a formação de ácido glutâmico e α -aminoadípico- δ -semialdeído.

A equação de reação, confirmada pela presença dos produtos finais de ambas as atividades enzimáticas, está descrita na Figura 6.

6.1.5 pH ótimo

A atividade máxima da LKR foi observada a pH 7,0 (Figura 10A). O NADH não substituiu o NADPH em nenhum dos pH testados. A atividade de SDH aumentou em meios mais básicos mostrando uma curva sigmóide a partir do pH 6,0 e atingindo valores máximos nos pHs acima de 9,0 (Figura 10B). Já com relação ao requerimento de cofator a SDH apresentou cerca de 10% da atividade testada em todos os pHs quando o NADP substituiu o NAD na reação (Figura 10B).

6.1.5 Estudos cinéticos

Os estudos cinéticos para a atividade da SDH foram feitos variando-se a concentração de NAD em três concentrações fixas de sacaropina e variando-se a concentração de sacaropina em três concentrações fixas de NAD (Figura 11A).

A interseção observada na figura 11A demonstra uma pequena variação no valor calculado para a K_m de sacaropina. O mesmo aconteceu para a SDH de placenta humana (Fjellsted e Robinson, 1975b) e este fato foi indicativo de que o valor de K_m para sacaropina é dependente da concentração de NAD.

Por sua vez, o valor de K_m para NAD independe da concentração de sacaropina. Os valores de K_m estimados foram 0,23 e 0,33 mM para a sacaropina e o NAD respectivamente (Figura 11B).

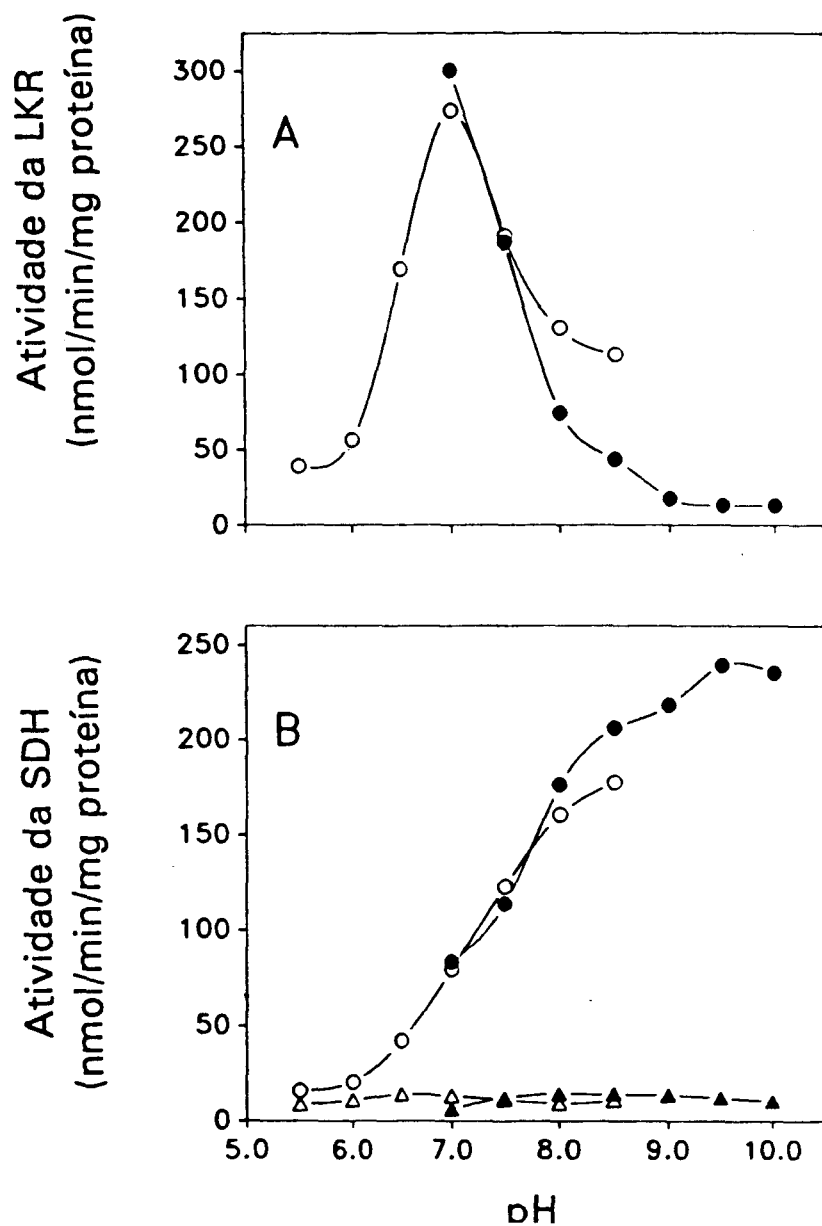


Figura 10. Efeito do pH e de cofatores nas atividades de LKR (A) e de SDH (B). A atividade de LKR foi determinada em 0,3 ml de uma solução contendo 0,1 mM de tampão fosfato de potássio (pH 5,5 - 8,5) ou 0,1 M de tampão Tris-HCl (pH 7,0-10,0); 20 mM de lisina; 10 mM de α -cetoglutarato; 0,112 mM de NADPH e 36 μ g de proteína da fração DEAE-Sephacel. A atividade de SDH foi determinada em 0,3 ml de reação contendo 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 5,5-8,5) ou 0,1 M de tampão Tris-HCl (pH 7,0 - 10,0); 1 mM de sacaropina; 1 mM de NAD (●, ○) ou NADP (▲, △) e 36 μ g de proteína da fração DEAE-Sephacel.

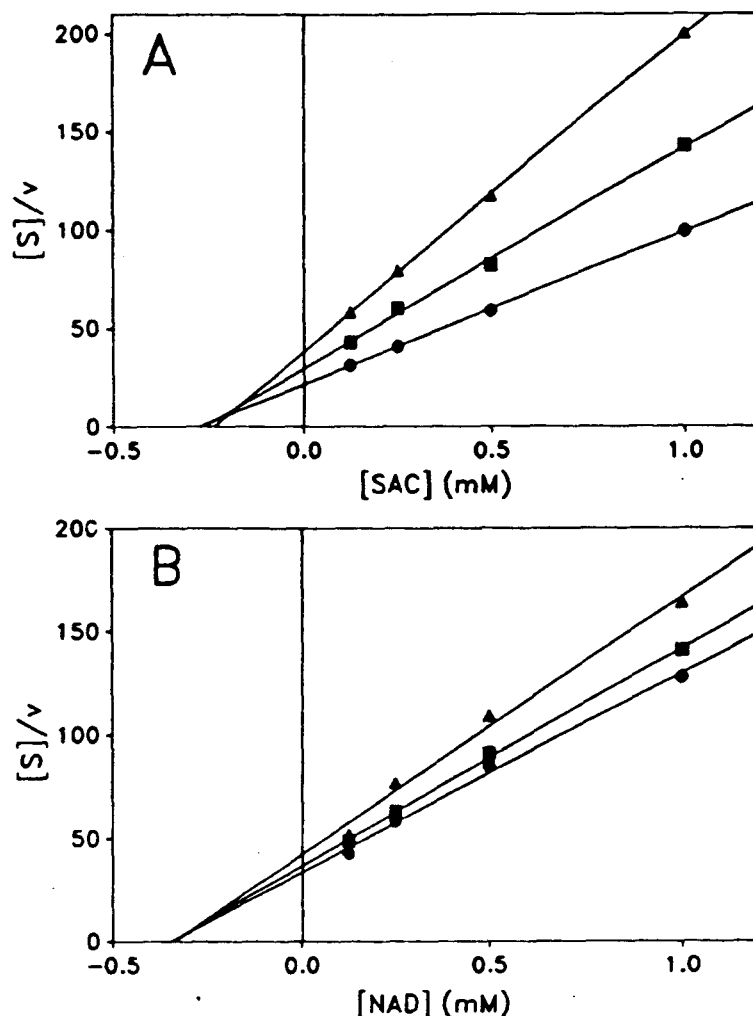


Figura 11. (A) Gráfico de Hanes para determinação do valor de K_m para sacaropina na atividade da SDH. O valor de K_m para sacaropina foi determinado usando sacaropina como substrato variável e três concentrações fixas de NAD. O ensaio conteve 51 μg de proteína da fração DEAE-Sephacel; sacaropina numa faixa de 0 - 1,0 mM e NAD nas concentrações fixas de 0,25 ($\blacktriangle$), 0,5 ($\blacksquare$) e 1 mM ($\bullet$) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH num volume final de 0,3 ml. **(B)** Gráfico de Hanes para determinação do valor de K_m para NAD na atividade da SDH. O valor de K_m para NAD foi determinado usando NAD como substrato variável e três concentrações fixas de sacaropina. O ensaio conteve 51 μg de proteína da mesma fração, NAD numa faixa de 0 - 1,0 mM e sacaropina nas concentrações fixas de 0,25 ($\blacktriangle$); 0,5 ($\blacksquare$) e 1,0 mM ($\bullet$) no mesmo tampão.

6.1.6 Inibição da atividade da SDH

A atividade da SDH não foi inibida pelo ácido glutâmico ou pelo ácido α -aminoadípico quando foram adicionados em ensaios separados nem no mesmo ensaio na concentração de 0,5 mM cada um. Da mesma maneira, a SDH não foi inibida pelos substratos da LKR, lisina e α KG na concentração de 5 e 10 mM respectivamente, quando foram acrescentados em ensaios separados nem no mesmo ensaio (resultados não apresentados).

6.2 Purificação da LKR e SDH pela metodologia descrita por Markovitz et al. (1984)

Um extrato bruto das proteínas de endospermas imaturos com 18 DAP foi fracionado com PEG 8000 depois de condicioná-lo em pH 5,5. A LKR e a SDH precipitaram quando a concentração de PEG atingiu 15%. As etapas de precipitação a 5 e 7,5% de PEG aumentaram a pureza do extrato, antes que as enzimas precipitassem a 15%. Após o fracionamento a LKR e SDH foram purificadas através de HPLC em cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Um resumo dos resultados da precipitação pode ser visto na Tabela III.

A LKR e a SDH copurificaram em todos os passos e tiveram rendimentos similares após cada um deles, com exceção do último, a recromatografia em Superdex. A LKR teve sempre uma atividade maior do que a SDH, em média 3,5 vezes com exceção do último passo quando esta relação caiu para 1.

Após a primeira cromatografia na coluna de DEAE, a atividade total das enzimas decresceu em média 16 vezes para ambas as atividades contra um incremento na purificação de cerca de 7 vezes (dados não mostrados). Nesta coluna as proteínas são submetidas a um incremento gradual da força iônica durante sua eluição. A filtração em gel aumentou em quase 10 vezes

Tabela III. Purificação de LKR e SDH de endospermas imaturos de milho segundo metodologia de Markovitz et al. (1984).

	LKR					SDH				
	Proteína Total	Atividade Total	Atividade Específica	Purif Total	Rend %	Atividade Total	Atividade Específica	Purif	Rend	
	mg	*	**	(vezes)	%	*	**	(vezes)	%	
Extrato Bruto	4916	42430	9	1,0	100	11860	2,4	1,0	100	
Precipitação 15% PEG	1516	29160	19	2,1	69	13070	8,6	3,6	111	
Recromatografia DEAE	13,7	2330	159	17,7	5,5	670	46	19,2	5,7	
Recromatografia Superdex	0,112	242	2162	240,2	0,6	240	2142	892,5	2,0	

* nmol NAD ou NADPH/min

** nmol NAD ou NADPH/min/mg de proteína

a pureza do extrato em relação ao passo anterior, com uma perda mínima de ambas as atividades. Ou seja, o rendimento não foi muito diferente do obtido no passo anterior porém quase não houve perda do conteúdo enzimático da fração entre estes dois passos. Convém observar que nesta coluna as proteínas não estão sujeitas a diferenças na força iônica pois não há mudança na concentração salina do tampão durante a eluição das proteínas.

Entretanto houve redução na recuperação das atividades de ambas as enzimas após a recromatografia nesta mesma coluna, principalmente da atividade da LKR. Esta queda levou a uma taxa de purificação bastante diferente entre elas. Talvez isto não se deva a uma purificação diferencial das duas atividades, mas sim a uma perda exclusiva da atividade da LKR neste passo de purificação. Acredita-se que esta redução ocorreu durante a estocagem e não durante a segunda passagem pela coluna de Superdex. A enzima permaneceu duas semanas a 0°C, antes da recromatografia em Superdex, em Tampão G, que contém 300 mM de NaCl.

As figuras 12 e 13 mostram respectivamente a cromatografia e a recromatografia na coluna de DEAE. A Figura 14 e 15 mostram respectivamente a cromatografia e a recromatografia na coluna de Superdex. Nestes quatro passos apresentados observa-se que os picos das atividades da LKR e SDH estão contidos nas mesmas frações. O peso molecular das enzimas, estimados a partir do perfil obtido da coluna de filtração em gel, foi de 260000 (Figura 16).

Outro fato interessante, observado nos perfis cromatográficos da coluna de Superdex (Figuras 14 e 15), foi a variação provocada na curva de força iônica por proteínas de baixo peso molecular eluídas no final da cromatografia. Estas proteínas apresentaram peso molecular de cerca de 19000. As frações provenientes da filtração em gel não deveriam conter proteínas de baixo peso molecular pois o peso estimado para as enzimas foi de 260000. Mesmo assim, durante a recromatografia destas frações, apareceu novamente um pico de baixo

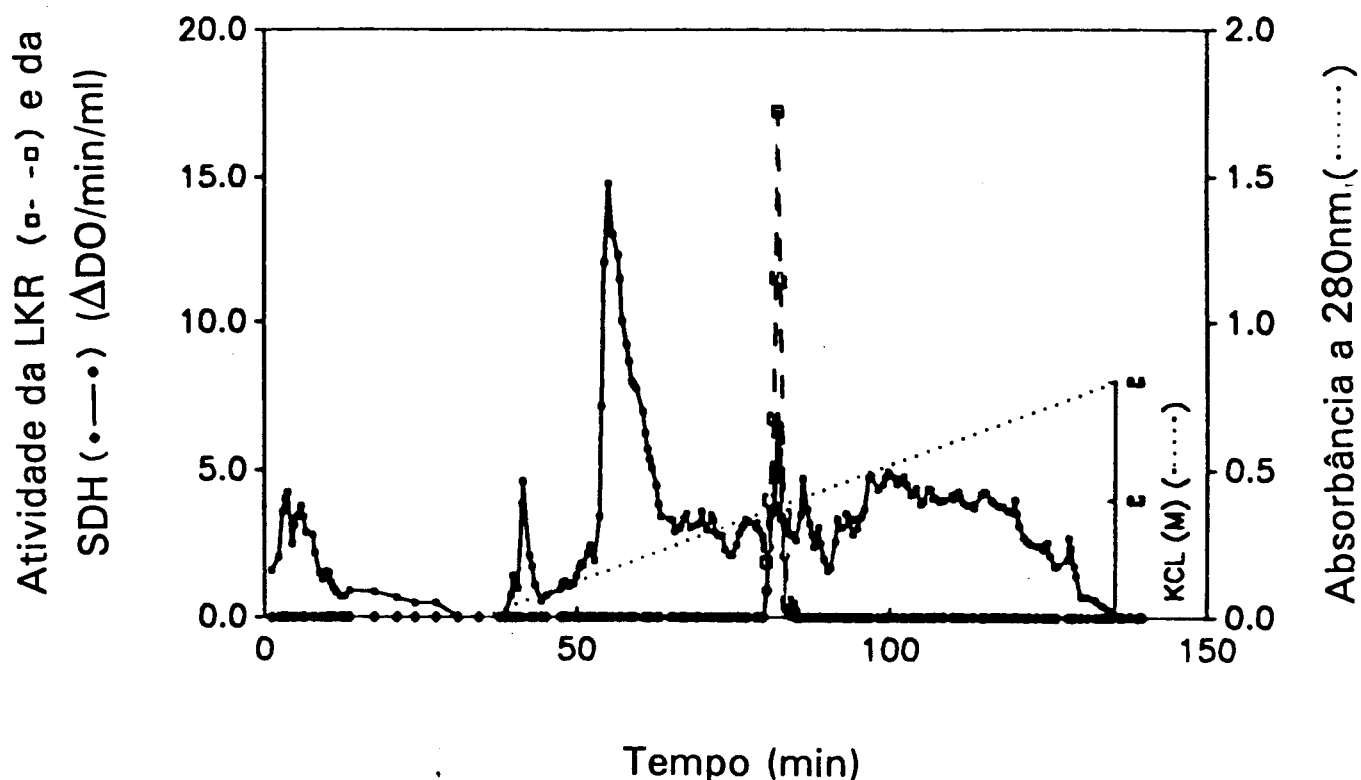


Figura 12. Padrão de eluição das atividade de LKR e SDH na cromatografia em DEAE usando HPLC. Foi aplicada uma fração do fracionamento em 15% de PEG. A coluna foi eluída usando-se um gradiente de 0 - 0,5 M de NaCl em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 8,4; 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA. As atividades de LKR e SDH foram ensaiadas usando 20 μl das frações eluídas da coluna. As enzimas foram eluídas nas mesmas frações numa faixa próxima a 0,2 M de NaCl. Após o gradiente, a coluna foi lavada no mesmo tampão aumentando-se a concentração de NaCl até 1,5 M.

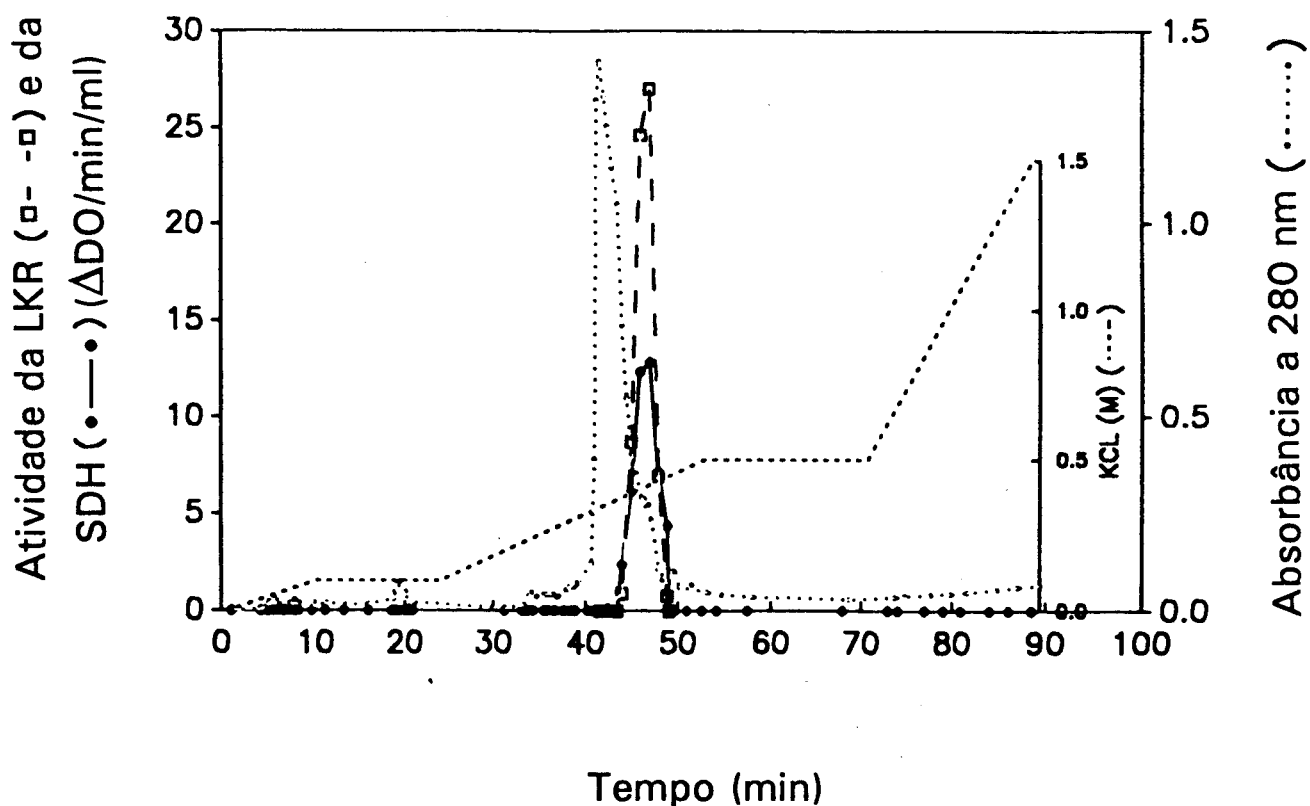


Figura 13. Padrão de eluição das atividade de LKR e SDH na recromatografia em DEAE usando HPLC. Foi aplicada uma fração da cromatografia na mesma coluna. A coluna foi lavada com 0,075 M de NaCl em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 8,4; 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA. Foi eluída usando-se um gradiente de 0,075 - 0,5 M de NaCl no mesmo tampão. As atividades foram ensaiadas usando 20 µl das frações eluídas da coluna. As enzimas foram eluídas nas mesmas frações numa faixa próxima a 0,2 M de NaCl. Após o gradiente a coluna foi lavada aumentando-se o gradiente de NaCl até 1,5 M.

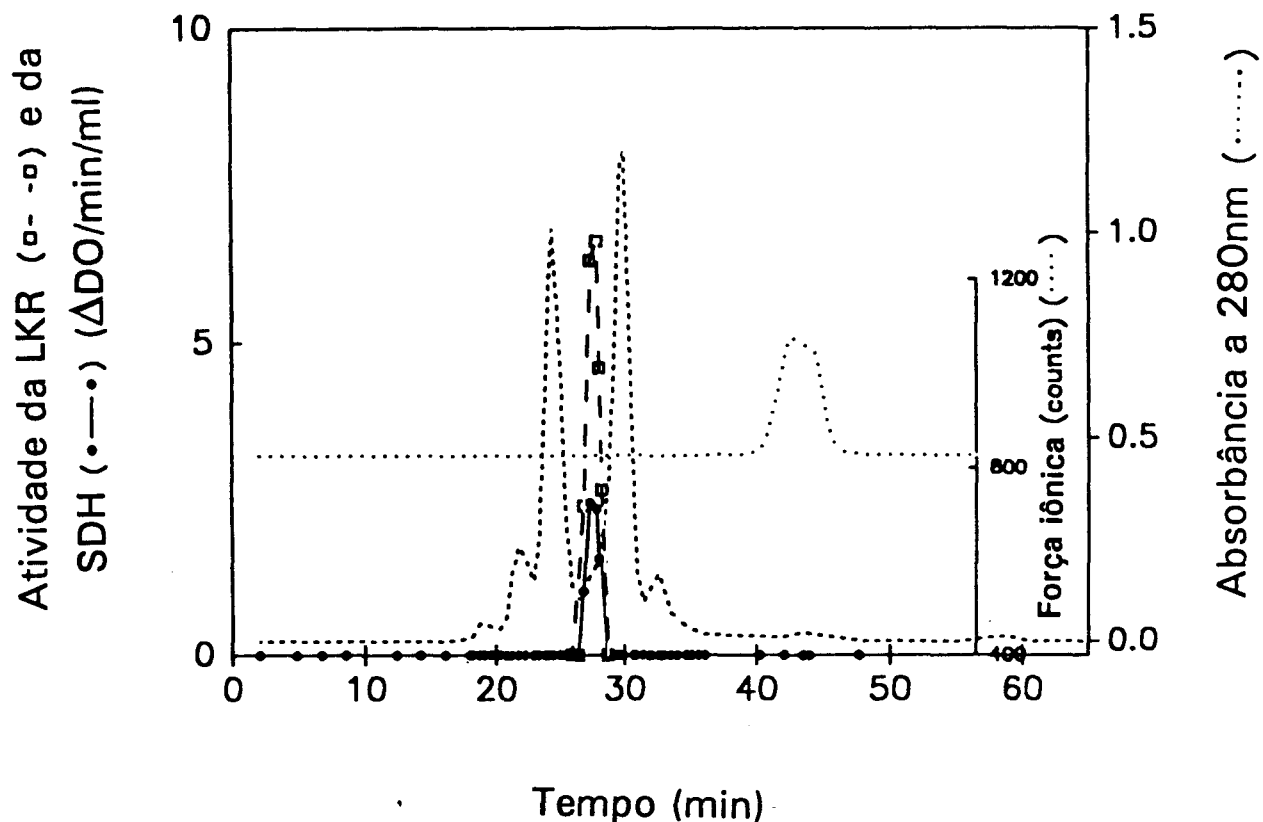


Figura 14. Padrão de eluição das atividades de LKR e SDH na cromatografia em Superdex usando HPLC. Foi aplicada uma fração da recromatografia em DEAE. A coluna foi eluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 300 mM de NaCl. As atividades foram ensaiadas usando 20 μ l das frações eluídas da coluna. As enzimas foram eluídas nas mesmas frações.

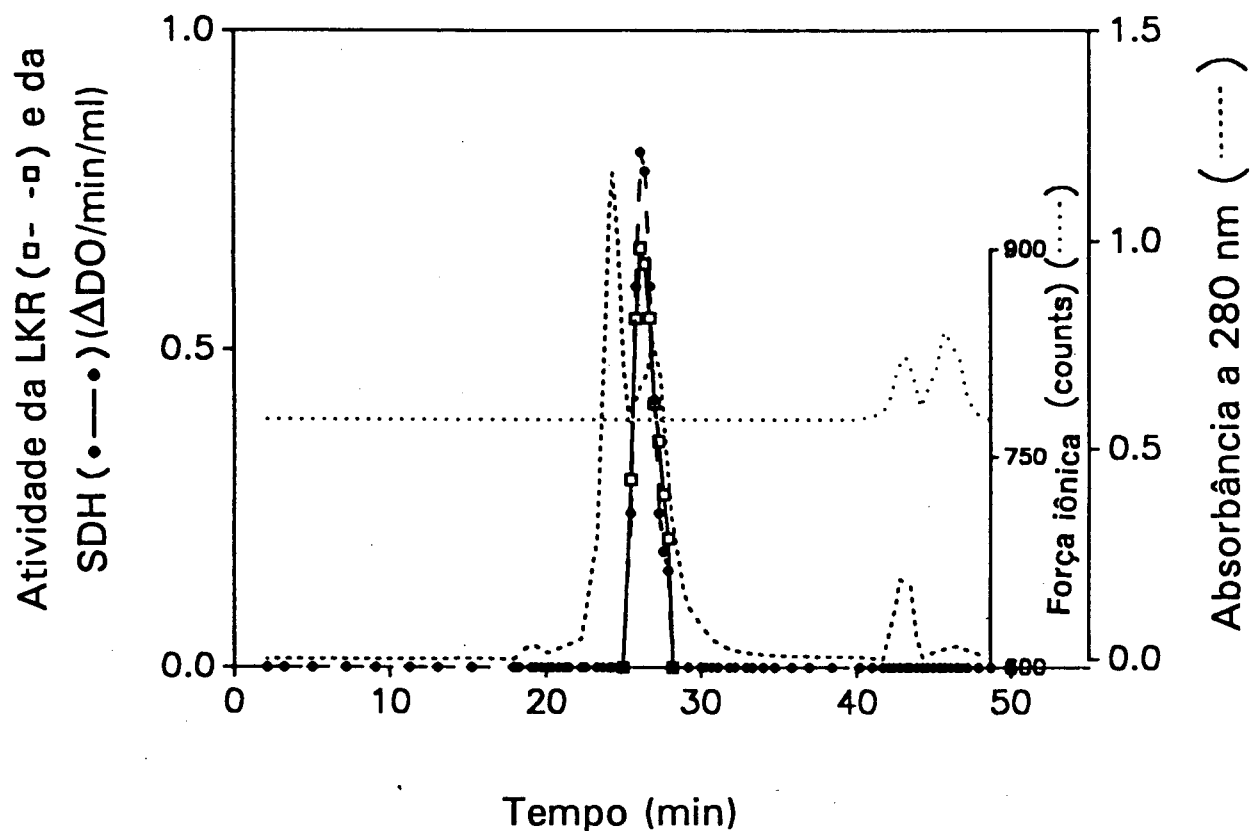


Figura 15. Padrão de eluição das atividades de LKR e SDH na recromatografia em Superdex usando HPLC. Foi aplicada uma fração da cromatografia em Superdex. A coluna foi eluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 300 mM de NaCl. As atividades foram determinadas usando 20 μ l das frações eluídas da coluna. As enzimas foram eluídas nas mesmas frações.

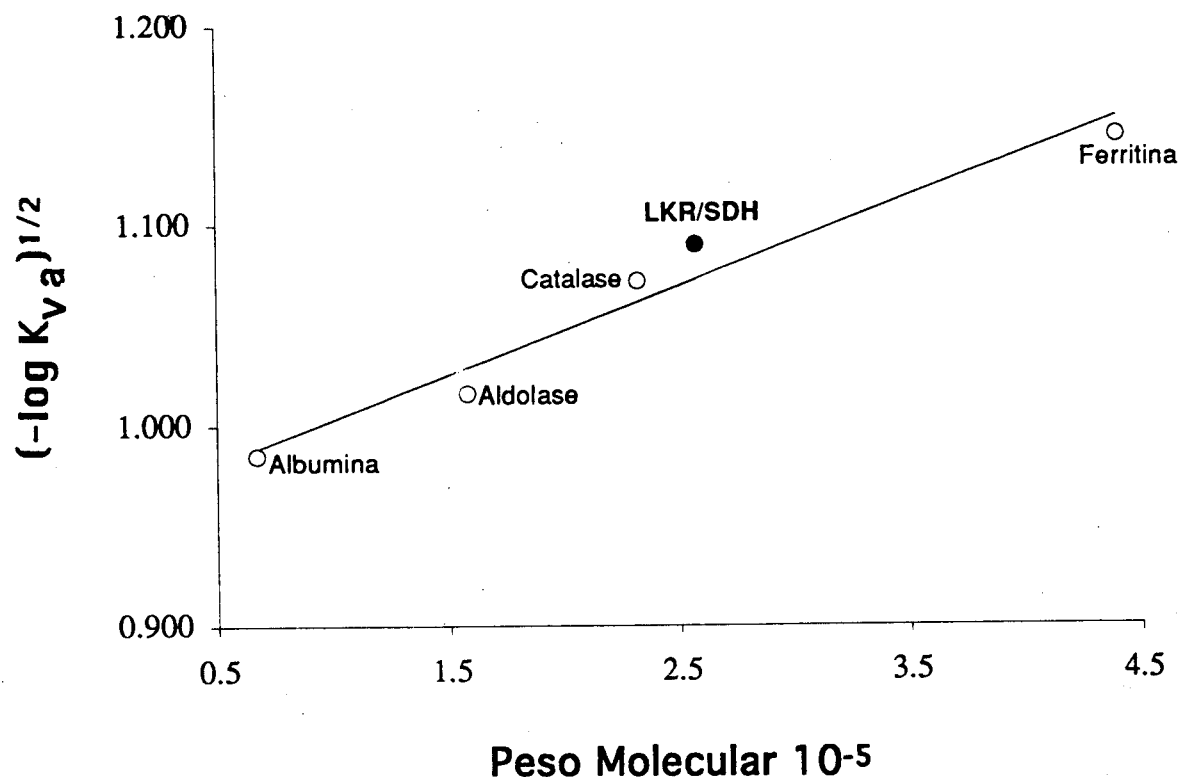


Figura 16. Determinação do peso molecular da proteína contendo as atividades de LKR e SDH em coluna de Superdex usando HPLC. A proteína com atividades de LKR e SDH proveniente da cromatografia em DEAE foi aplicada na coluna de Superdex e eluída no tampão G (ver materiais e métodos). Foram utilizados os seguintes marcadores de peso molecular: ovoalbumina (43000), soro albumina bovina (67000), aldolase (158000), catalase (232000), ferritina (440000). A eluição dos padrões foi monitorada pela absorbância a 280 nm. O padrão de eluição das enzimas foi acompanhado pela medida de cada uma das atividades. A equação de $K_{va} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ foi calculada, onde V_e = volume correspondente à eluição da proteína, V_o = volume interno da resina (2,256 ml como determinado com blue dextran 2000), e V_t = volume da coluna (24 ml). O peso molecular da enzima contendo as atividades de LKR e SDH foi determinado usando a função linear de $(-\log K_{va})^{1/2}$ versus peso molecular (Siegel e Monty, 1966).

peso molecular provocando uma mudança na força iônica. Este fato indicou a possibilidade da ocorrência de dissociação de alguma proteína ligada a LKR/SDH. A grande perda de atividade da LKR em relação a SDH após a recromatografia sugere que algum fator estimulador da atividade da enzima, principalmente da LKR, se dissocia durante a purificação.

7 Eletroforese em gel de poliacrilamida dos passos da purificação

Em gel desnaturante, contendo as frações da purificação (metologia de Markovitz et al., 1984) observou-se que a banda correspondente as enzimas purificadas tem peso molecular de 120000 (Figura 17) que é muito similar àquele observado para a enzima em humanos (Markovitz et al., 1984 e 1987). Este valor também é próximo ao encontrado para as atividades enzimáticas no gel não-desnaturante e por Brochetto-Braga et al. (1992). Nota-se, pela Figura 17, a intensificação gradual da banda correspondente à enzima durante os passos da purificação.

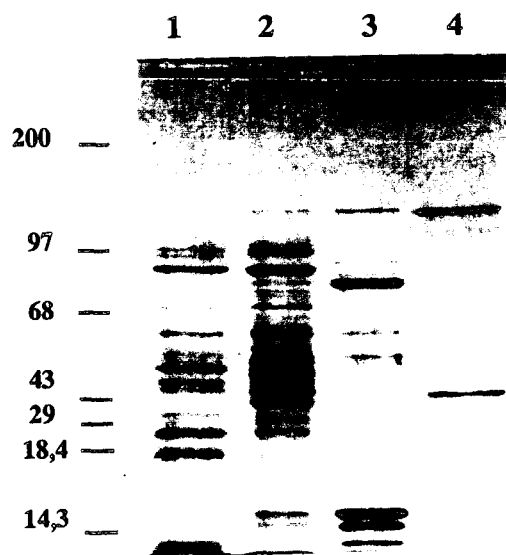


Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante das frações da purificação enzimática de LKR e SDH por metodologia de Markovitz et al. (1984). O gel foi corado com prata (ver materiais e métodos). Foram aplicadas no gel as seguintes quantidades de cada uma das frações: **(1)** extrato bruto 0,82 μg ; **(2)** fracionamento em 15% de PEG 0,89 μg ; **(3)** DEAE recromatografia 0,73 μg ; **(4)** Superdex recromatografia 0,35 μg . Para determinação dos padrões de peso molecular foi utilizado 0,5 μg de uma solução contendo miosina (200000), fosforilase B (97000), BSA (68000), ovoalbumina (43000), anidrase carbônica (29000), β -lactoglobulina (18400) e lisozima (14300).

7. DISCUSSÃO

A degradação de lisina em mamíferos é semelhante à via reversa de sua biossíntese em fungos e leveduras (Kuo e Saunders, 1964; Saunders e Broquist, 1966). As enzimas de degradação em mamíferos foram caracterizadas como sendo a LKR e a SDH (Hutzler e Dancis, 1968; Hutzler e Dancis, 1970; Fjellstedt e Robinson, 1975a,b). As atividades da LKR e SDH foram caracterizadas em mamíferos como componentes de um polipeptídeo bifuncional (Markovitz et al., 1984 e 1987). Foram iniciados estudos sobre a LKR de milho (Arruda et al., 1982; Arruda e Da Silva, 1983; Brochetto-Braga, 1992), porém nada se conhecia sobre a atividade da SDH em plantas. Nossos estudos relacionaram-se a caracterização de ambas as atividades enzimáticas da LKR e SDH em endosperma de milho em desenvolvimento, mostrando que, como em mamíferos, estas atividades estão contidas numa única proteína.

Foi feita a cromatografia em camada delgada dos produtos de reação das atividades da LKR e SDH de endosperma de milho em desenvolvimento (Figura 9). Comprovou-se a presença das enzimas no extrato protéico e que sua equação de reação se dá como descrito na Figura 6. Nesta reação o grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ da lisina é transferido para o carbono α do αKG formando ácido glutâmico e o resíduo da lisina origina o ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído. A sacaropina é o intermediário estável desta reação de transaminação.

As atividades enzimáticas que correspondem às duas últimas reações da síntese de lisina em eucariotos inferiores são reversíveis podendo realizar a catálise de lisina em determinadas condições (Jones e Broquist, 1966; Saunders e Broquist, 1966). A enzima de leveduras correspondente à LKR é a sacaropina desidrogenase e a enzima correspondente à SDH é a sacaropina redutase. Foi feita uma comparação entre as características das enzimas de plantas, mamíferos e leveduras

que possuem atividades análogas. Um resumo destas características encontra-se na Tabela IV.

Como pode ser visto, os pHs ótimos utilizados para as atividades da LKR e SDH em humanos são semelhantes àqueles observados para as duas últimas enzimas da via de síntese de lisina em leveduras quando elas estão realizando a reação em seu sentido contrário. A sacaropina desidrogenase faz sua reação reversa em pH 7,0 (Saunders e Broquist, 1966) e a LKR de mamíferos também tem atividade máxima neste mesmo pH (Hutzler e Dancis, 1968). A sacaropina redutase tem pH ótimo para reação reversa, em torno de 9,0 (Jones e Broquist, 1966) como acontece para a SDH de mamíferos. Em placenta humana a SDH mostrou uma curva de pH bastante característica com atividade ótima no pH 8,5 (Fjellstedt e Robinson, 1975b). Não se obteve uma curva característica de pH para a SDH de milho, mas os valores ótimos de pH foram acima de 9,0. Outra similaridade da SDH de milho com a enzima em humanos foi a capacidade de utilização do NADP como cofator, além do NAD (Fjellstedt e Robinson, 1975b). Assim, a LKR e a SDH de milho, à exemplo das enzimas em humanos, demonstraram ter os mesmos requerimentos de pH que as enzimas de leveduras.

Outros dados, como o valor de K_m encontrado para os substratos de cada uma das enzimas estão também contidos na Tabela IV. Na atividade da SDH de endosperma de milho o valor de K_m para sacaropina mostrou ser dependente da concentração de NAD (Figura 11A) como acontece para a SDH de placenta humana (Fjellstedt e Robinson, 1975). Além disto, não houve grande variação do valor de K_m para sacaropina entre as diferentes espécies citadas. É importante observar que o fato desta proteína em plantas e humanos ser bifuncional pode complicar a estimativa dos valores de K_m para a LKR e a SDH. Este fato não foi considerado à priori nestes experimentos.

Tabela IV. Propriedades da LKR e SDH de diferentes organismos.

Fonte	Enzima	PM nativo	PM subunidade	pH	Km (Lys) mM	Km (α -KG) mM	Km (Sac) mM	Cofator	Natureza	Referências
Mamíferos	LKR	486000	115000	7,0	1,5	1,0	-	NADPH	Bifuncional	37, 62, 81, 82
	SDH	486000	115000	8,8	-	-	0,5	NAD+ NADP+	Bifuncional	38, 81, 82
Plantas	LKR	260000	120000	7,0	5,2	1,8	-	NADPH	Bifuncional	4, 19, esta tese
	SDH	260000	120000	9,0	-	-	0,23	NAD+ NADP+	Bifuncional	Esta tese
Leveduras	Sacaropina desidrogenase (funcionando como LKR)	49000 -		7,0	12	0,44	-	NADH	Monofuncional	113
	Sacaropina redutase (funcionando como SDH)	73000 -		9,5	-	-	0,92	NAD+ NADP+	Monofuncional	64

O peso molecular encontrado para as enzimas em leveduras foi de aproximadamente 49000 para a sacaropina desidrogenase (Saunders e Broquist 1966), (correspondente a LKR de plantas e mamíferos), e de 73000 para a sacaropina redutase (Jones e Broquist, 1966), (correspondente a SDH de plantas e mamíferos). Em humanos o polipeptídeo bifuncional apresentou um peso molecular de 115000 e a enzima nativa foi um tetrâmero de 468000 (Markovitz et al., 1984). O fragmento responsável pela atividade da LKR teve peso molecular de 62700 e o responsável pela atividade da SDH, 49200 (Markovitz et al., 1987). Assim não é possível estabelecer uma correlação entre os pesos moleculares para os domínios enzimáticos entre mamíferos e leveduras. O polipeptídeo bifuncional em milho teve peso molecular estimado próximo de 120000 em gel desnaturante (Figura 17) bastante próximo daquele encontrado em mamíferos.

O interesse pela degradação de lisina em humanos se deve ao estudo de distúrbios associados a altas concentrações de lisina e sacaropina no sangue e na urina (Ghadimi et al., 1967; Armstrong et al., 1967; Carson et al., 1968). Estes distúrbios metabólicos estão associados a alterações na via de degradação de lisina e com a perda das atividades da LKR e SDH (Dancis et al., 1969). Em alguns casos, os indivíduos afetados possuíam defeitos para ambas as atividades (Dancis et al., 1976). Isto sugeriu que as enzimas poderiam estar associadas de alguma forma permitindo que uma mutação afetasse as duas atividades enzimáticas. Durante algum tempo não se conseguiu separar as atividades destas enzimas durante os processos de purificação (Fjellsted e Robinson, 1975a). Comprovou-se porém uma inibição diferenciada para ambas as atividades (Fjellsted e Robinson, 1975b). Somente após a purificação da proteína até a homogeneidade, constatou-se que a LKR e a SDH faziam parte do mesmo polipeptídeo (Markovitz et al., 1984). Novas evidências surgiram quando a proteólise parcial deste polipeptídeo demonstrou que cada atividade estava separada em um domínio protéico (Markovitz et al.,

1987). Desta maneira, pôde-se explicar, a exemplo de outras doenças em humanos, como uma única mutação foi responsável pelo aparecimento de doenças associadas a mais de uma enzima.

No nosso estudo, ambas as atividades da LKR e SDH de endosperma de milho em desenvolvimento copurificaram até a última etapa da purificação (Tabela I e III; Figuras 7, 12-17). Ambas as atividades apresentaram um mesmo peso molecular na coluna de filtração em gel correspondente a 260000 (Figura 16). Quando as atividades da LKR e SDH foram reveladas em gel não-desnaturante, as bandas de cada enzima apresentaram migração idêntica (Figura 8). Desta maneira, sugerimos que, como em mamíferos, as atividades da LKR e SDH de endospermas de milho em desenvolvimento estão contidas num polipetídeo bifuncional. A estimativa do peso molecular de 120000 em gel desnaturante e de 260000 para a enzima nativa sugere que a proteína ocorra como um dímero.

A existência de outras proteínas contendo dois diferentes domínios enzimáticos responsáveis por reações em cadeia vem corroborar estes achados. A UMP sintetase ("complexo U"), que catalisa as 2 últimas reações da síntese *de novo* de pirimidina em mamíferos, é um bom exemplo (Umezue et al., 1971; Shoaf e Jones, 1973). As enzimas deste complexo também foram copurificadas e só puderam ser separadas por proteólise parcial (Reyes e Guganic, 1975). O mesmo ocorreu com a α -aminiadípico- δ -semialdeído sintetase em humanos (Markovitz et al., 1987). Considera-se que este arranjo protéico dos dois domínios enzimáticos possibilita o encaminhamento sequencial dos substratos da via metabólica evitando que eles sejam diluídos (Traut e Jones, 1977).

Outra vantagem destas enzimas estarem num mesmo polipetídeo e não simplesmente complexadas é a regulação conjunta de sua síntese. Foi observado em células mutantes de rato, resistentes a pirazofurina, a superexpressão da UMP sintetase. Uma das causas da superexpressão deveu-se à amplificação gênica (Kanalas e Suttle, 1984). Existe ainda outra proteína nesta mesma via, a aspartato transcarbamilase (CAD), que

cataliza os 3 primeiros passos da síntese *de novo* de UMP (Shoaf e Jones, 1973). Da mesma maneira, foram encontradas células mutantes resistentes ao fosfonacetil aspartato (PALA) que superexpressaram esta proteína multifuncional devido à amplificação gênica (Wahl et al., 1979). Desta forma, a ocorrência de várias proteínas multifuncionais numa mesma via permite que poucas mutações causem a superprodução dos seus produtos finais. Se considerarmos o metabolismo de lisina no endosperma de milho, incluindo sua síntese e seu catabolismo, observa-se a presença de duas proteínas bifuncionais, a AK/HSDH (Azevedo et al., 1992b) e a LKR/SDH.

A atividade da LKR é regulada coordenadamente com a taxa de acumulação de zeínas (Brochetto-Braga et al., 1992). Isto tem duas implicações fisiológicas importantes. Primeiro porque as zeínas, que são as proteínas que mais acumulam no endosperma, não têm lisina na sua constituição (Dalby e Tsai, 1975). Segundo porque, embora alguma lisina seja sintetizada no endosperma (Sodek e Wilson, 1970), uma grande proporção do conteúdo encontrado no endosperma, é translocado para a semente durante seu desenvolvimento (Lawrence e Grant, 1964; Da Silva e Arruda, 1979). Desta forma, deve ocorrer catabolismo de lisina nas sementes normais para evitar seu acúmulo. A alta atividade da LKR durante o desenvolvimento do endosperma previne este acúmulo de lisina.

Sabe-se que o catabolismo de lisina é mais intenso no endosperma de milho normal do que no endosperma mutante *opaco2* (Sodek e Wilson, 1970). O endosperma *opaco2* possui menor conteúdo de zeínas contrabalanceado por um maior teor de glutelinas e globulinas, que são mais ricas em lisina (Misra et al, 1972). Observou-se que a atividade da LKR foi bastante reduzida no endosperma *opaco2* em todos os estádios do desenvolvimento (Brochetto-Braga et al., 1992), sendo que não se encontrou diferença nas características da LKR de endosperma normal e *opaco2*. O padrão da redução de sua síntese no endosperma *opaco2* foi similar ao encontrado para as zeínas. Isto indicou a ocorrência de

regulação da síntese da LKR pelo gene *opaco2* igualmente às zeínas. Nós observamos que as atividades de LKR e SDH de milho são encontradas especificamente no endosperma em desenvolvimento não sendo encontradas no embrião das sementes com 20 DAP nem nas raízes e coleóptilos das plântulas (Tabela II). Isto confirma a hipótese de que o endosperma é, por excelência, o local de reciclagem dos grupos amino da lisina. A atividade da SDH vem complementar a catálise de lisina iniciada pela LKR.

É provável que a atividade da SDH acompanhe o mesmo padrão de regulação que a LKR e esteja assim sujeita a regulação pelo *opaco2*. O fato delas estarem presentes no mesmo polipeptídeo facilita sua síntese e regulação.

Karchi et al. (1994) observaram que o metabolismo de lisina, síntese e catálise, foi regulado de maneira coordenada durante o desenvolvimento de sementes de tabaco. A atividade da LKR foi incrementada quando houve um aumento do suprimento de lisina livre causado pela injeção deste aminoácido nos frutos em desenvolvimento ou pela expressão de uma DHPS bacteriana. Este aumento foi coordenado com o da expressão da DHPS sugerindo que os altos níveis de lisina estimularam a síntese da LKR. Observou-se que a lisina que permanece na semente, após o decréscimo da atividade da LKR, não é acumulada devendo existir ainda outro tipo de controle para o seu acúmulo além de sua degradação pela LKR.

Os dados da tabela de purificação das enzimas (Tabela III) mostram que elas foram bastante sensíveis aos tratamentos que incluíram incremento na concentração de sal dos tampões, principalmente a atividade da LKR. Durante a manipulação das enzimas purificadas segundo Brochetto-Braga et al. (1992), observou-se que a fração após a DEAE manteve a atividade da SDH e principalmente da LKR estável por muito mais tempo do que a mesma fração purificada segundo Markovitz et al. (1984) (dados não apresentados). Acredita-se que o tratamento com

NaH_2PO_4 , para abaixar o pH antes da precipitação com PEG, pode ser um dos fatores responsáveis. Este tratamento pode alterar a estrutura da proteína, particularmente quanto a atividade de LKR, que pode conter, a exemplo da enzima de mesma função em leveduras, resíduos de cisteína relacionados com sua atividade (Ogawa et al., 1979). Outra possibilidade talvez mais provável é de que alguma proteína, especialmente associada com a atividade da LKR, se dissocia da enzima durante o processo de purificação. A detecção de uma proteína de baixo peso molecular após a recromatografia em Superdex sugeriu essa hipótese. Esperariam-se encontrar, no perfil da recromatografia, somente proteínas de peso molecular próximo ao da enzima, 260000. Observou-se na verdade um pico com peso molecular aproximado de 240000 pouco antes das frações com atividade de LKR/SDH, mas apareceu um pico de proteínas de baixo peso molecular (Figura 15), como já havia ocorrido na cromatografia na mesma coluna (Figura 14). Isto suporta então nossa teoria de serem elas provenientes de uma dissociação da enzima, pois calculando-se a diminuição do seu peso, estimado em 19000, do peso do dímero da enzima, 260000, obtêm-se 240000, como encontrado. Outros experimentos seriam necessários para comprovar a relação entre estas três proteínas e poderiam levar a novos dados sobre a regulação destas enzimas.

Sabe-se que várias enzimas em animais são reguladas por uma proteína denominada calmodulina e vem se buscando descobrir mais sobre sua atuação em enzimas de plantas (para revisão ver Roberts e Harmon, 1992). Uma calmodulina de milho foi isolada e sequenciada recentemente e apresentou uma alta homologia com calmodulinas de plantas e de outros organismos (Griess et al., 1994). Seu peso molecular foi estimado em 16812 e ela possui 4 sítios para a ligação de cálcio, tendo um pI estimado de 3,81. Uma proteína com estas características seria capaz de causar o deslocamento da força iônica como o observado nas cromatografias em Superdex (Figuras 14 e 15). Além disto, o tipo de

ligação que ela teria com a enzima e sua própria constituição devem ser bastantes sensíveis a variação da força iônica do meio. Isto e seu peso molecular sugerem que a proteína de 19000 seja uma calmodulina.

A atividade da LKR foi sempre mais sensível aos diferentes tratamentos a que a enzima foi submetida. Por outro lado, em todas as frações da purificação a atividade da LKR foi superior, cerca de 3,5 vezes, à da SDH. Elas só se igualaram no último estágio quando ambas as atividades já haviam sido bastante reduzidas. Uma hipótese interessante seria a regulação da LKR/SDH, principalmente da LKR, por cálcio-calmodulina. Mostrou-se recentemente que ao contrário das suspeitas anteriores, nenhuma das três isozimas da AK de milho estão sob regulação de cálcio e calmodulina (Azevedo et al., 1993c). Resultados preliminares, não apresentados nesta tese, mostraram que a LKR, mas não a SDH, é sensível a EGTA, e é ativada por cálcio e por cálcio-calmodulina.

7. CONCLUSÕES

1. As atividades de LKR e SDH são responsáveis pelos dois primeiros passos da catálise de lisina no endosperma de milho em desenvolvimento.

2. A LKR atua condensando a lisina e o α KG em sacaropina. Seu pH ótimo de atuação é 7,0 e ela utiliza exclusivamente o NADPH como cofator.

3. A SDH atua hidrolizando a sacaropina, formada pela ação da LKR, em ácido glutâmico e α -aminoadípico- δ -semialdeído. Tem pH ótimo acima de 9,0 em tampão Tris-HCl. A enzima utiliza preferencialmente o NAD como cofator podendo também utilizar o NADP.

4. A SDH não é retroinibida por seus produtos finais, ácido glutâmico e α -aminoadípico- δ -semialdeído, nem pelos substratos da LKR, lisina e α KG.

5. As atividades de LKR e SDH em endosperma de milho em desenvolvimento fazem parte de um polipeptídeo bifuncional.

6. Este polipeptídeo bifuncional contendo as atividades de LKR e SDH é endosperma específico, não ocorrendo no embrião de sementes em desenvolvimento, nem nas raízes e no coleóptilo de plântulas.

7. O polipeptídeo contendo as atividades de LKR e SDH possui peso molecular de 120000 em gel desnaturante e 280000 em filtração em gel, devendo ser um dímero.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aarnes H (1977) A lysine-sensitive aspartate kinase and two molecular forms of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. *Plant Science Letters* (9) 137-145.
2. Abelson PH, Bolton ET e Aldous E (1952) Utilization of carbon dioxide in the synthesis of proteins by *Escherichia coli* II. *J. Biol. Chem.* (198) 173-178.
3. Armstrong MD, Robinow M e Andrews IM (1967) A hyperlysinemia: biochemical and clinical observations. *Pediatrics* (39) 546-554.
4. Arruda P, Sodek L e Silva WJ da (1982) Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* (69) 988-989.
5. Arruda P e Da Silva WJ (1979) Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochem.* (18) 409-410.
6. Arruda P e Da Silva WJ (1983) LKR activity in maize: its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochem.* (22) 2687-2689.
7. Aspen AJ, Meister A (1962) Conversion of α -amino adipic acid to pipercolic acid by *Aspergillus nidulans*. *Biochem.* (1) 606-612.
8. Azevedo RA, Blackwell RD, Smith RJ e Lea PJ (1992a) Three aspartate kinase isoenzymes from maize. *Phytochem.* 31(11) 3725-3730.
9. Azevedo RA, Smith RJ e Lea PJ (1992b) Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochem.* 31(11) 3731-3734.
10. Azevedo RA, Smith RJ e Lea PJ (1992c) Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. *Phytochem.* 31(11) 3735-3737.
11. Baudet J, Mossé J; Landry J e Moureaux T (1966) Étude sur les protéines du maïs. *Ann. Physiol. Végét.* (8) 321-329.
12. Bergsron S e Rottenberg M (1950) Utilization of α -ketoadipic acid by lysineless *Ophiostoma* mutants. *Acta Chem. Scand.* (4) 553.

13. Borell CW, Urrestarazu LA e Bhattacharjee JK (1984) Two unlinked lysine genes (*LYS9* and *LYS14*) are required for the synthesis of saccharopine reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. (159) 429-432.
14. Borssok HB, Deasy CL, Haagen-Smit AJ, Keighley G e Lowy PH (1948) The degradation of L-lysine in guinea pig liver homogenate: formation of α -aminoadipic acid. J. Biol. Chem. (176) 1383-1393.
15. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem (72) 248-254.
16. Bray RC e Stadtman TC (1968) Anaerobic degradation of lysine. III ^{15}N studies on the conversion of lysine to 3,5-diaminohexanoate. J. Biol. Chem. (243) 381-385.
17. Bright SWJ, Shewry PR, Miflin BJ (1978b) Aspartate kinase and the synthesis of aspartate-derived amino acid in wheat. Planta (139) 119-125.
18. Bright SWJ, Wood EA e Miflin BJ (1978a) The effect of aspartate derived amino acids (lysine, threonine, methionine) of the growth of excised embryos of wheat and barley. Planta (139) 113-117.
19. Brochetto-Braga M, Leite A e Arruda P (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. Plant. Physiol. (98) 1139-1147.
20. Bryan PA, Cawley RD, Brunner CE, Bryan JK (1970) Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartatokinase from a multicellular plant. Biochem. Biophys. Res. Commun. (41) 1211-1217.
21. Carson NAJ, Saally BG, Neill DW e Carré JJ (1968) Saccharopinuria: a new inborn error of lysine metabolism. Nature (218) 679.
22. Cheshire RM e Miflin BJ (1975) The control of lysine biosynthesis in maize. Phytochem. (14) 695-698.
23. Cohen GN e Hirsch ML (1954) Threonine synthase, a system synthesizing L-threonine from L-homoserine. J. Bacteriol. (67) 182-190.
24. Da Silva WJ da e Arruda P (1979) Evidencie for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. Phytochem (18) 1803-1805.

25. Dancis J, Hutzler J e Cox RP (1979) Familial hiperlysinemia: enzyme studies, diagnostic methods, comments on terminology. Am. J. Hum. Genet. (31) 290-299.
26. Dancis J, Hutzler J, Cox RP e Woody NC (1969) Familial hyperlysinemia with lysine-ketoglutarate reductase insufficiency. J. of Clinical Investigation (48) 1447-1452.
27. Dancis J, Hutzler J, Woody NC e Cox RP (1976) Multiple enzyme defects in familial hyperlysinemia. Pediat. Res. (10) 686-691.
28. Darling S e Larsen PO (1961) Saccharopine, a new amminoacid in barker's and brewer's yeast. I. Isolation and properties. Acta Chem. Scand. (15) 743-749.
29. Datta P (1969) Regulation of branched biosynthetic pathways in bacteria. Science (165) 556-562.
30. Datta P e Gest H (1964) Alternative patterns of end product control in biosynthesis of amino-acids of the aspartic family. Nature (203) 1259-1261.
31. Davis HM e Mifflin BJ (1977) Aspartate kinase from carrot suspension culture. Plant Science Letters (9) 323-332.
32. Davis HM e Mifflin BJ (1978) Regulatory isozymes of aspartate kinase d the control of lysine and threonine biosynthesis in carrot cell spension culture. Plant Physiol (62) 536-541.
33. Der Garabedian PA e Vermeersch J (1989) Lysine degradation in *Candida*. Characterization and probable role of L-norleucine-leucine, 4-aminobutyrate and d-aminovalerate:2-oxoglutarate aminotransferases. Biochimie (71) 497-503.
34. Dotson SB, Somers DA and Gengenback BG (1989) Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from cell cultures. Plant Physiol. (91) 1602-1608.
35. Dubnoff JW e Borsook H (1948) Alpha-aminoadipic acid in arginine formation. J. Biol. Chem. (173) 425.
36. Earle FR, Curtis JJ e Hubbard JE (1946) Composition of the component parts of the corn kernel. Cereal Chem. (23) 504-511.

37. Fjellstedt TA e Robinson JC (1975a) Properties of partially purified saccharopine dehydrogenase from placenta. Arch. of Biochem. and Biophys. (171) 191-196.
38. Fjellstedt TA e Robinson JC (1975b) Purification and properties of L-lysine- α -ketoglutarate reductase from placenta. Arch. of Biochem. and Biophys. (168) 536-548.
39. Fottergill JC e Guest JR (1977) Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Gener. Microbiol. (99) 139-155.
40. Fowden L (1960) The metabolism of labeled lysine and pipecolic acid by *Acacia phyllodes*. J. Exp. Bot. (11) 302-315.
41. Fujioka M (1975) Saccharopine dehydrogenase . J. Biochem. Chem. (250) 8986-8989.
42. Gaillardin G, Poirier L, Ribet AM e Heslot H (1979) General and lysine specific control of saccharopine dehydrogenase level in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Biochimie (61) 473-482.
43. Garrad R e Bhattacharjee JK (1992) Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned LYS1 gene of *Candida albicans*. J. of Bacteriol. (174) 7379-7384.
44. Gengenbach BG, Walter TJ, Green LE, Hibberd KA (1978) Feedback regulation of lysine, threonine, and methionine biosynthetic enzyme in corn. Crop Science (18) 472-476.
45. Ghadimi H, Binnington VI e Pecora P (1965) Hyperlysinemia associated with retardation. The New England J. of Medicine (273) 723-729.
46. Ghadimi H, Zischka R e Binnington VI (1967) Further studies on hyperlysinemia associated with retardation. Amer. J. Dis. Child. (113) 146-151.
47. Ghislain M, Frankard V, Jacobs M (1990) Dihydrodipicolinate sintase of *Nicotiana sylvestris* a chloroplast-localized enzyme of the lysine pathway. Planta (180) 480-486.
48. Griess EA, Igloi GL e Feix G (1994) Isolation and sequence comparison of a maize calmodulin cDNA. Plant Physiol. (104) 1467-1468.

49. Grobbelaar N; Steward FC (1953) Pipecolic acid in *Phaseolus vulgaris*: evidence on its derivation from lysine. J. Am. Chem. Soc. (75) 4341-4343.
50. Grobbelaar N; Zacharius RM e Steward FC (1954) The bulk isolation of L(-) pipecolic acid from *Phaseolus vulgaris* and its quantitative determination. J. Am. Chem. Soc. (76) 2912-2915.
51. Grove J e Henderson LM (1968) The metabolism of D and L-lysine in the intact rat, perfused liver and liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta (165) 113-120.
52. Gupta RN e Spenser ID (1969) Biosynthesis of the piperidine nucleus. J. Biol. Chem. (244) 88-94.
53. Halling SM e Stahly DP (1976) Dihydrodipicolinic acid synthase of *Bacillus licheniformis*. Biochim. Biophys. Acta (452) 580-596.
54. Hammer T, Bode R e Birnbaun D (1991a) Occurrence of a novel yeast enzyme, L-lysine ϵ -dehydrogenase, which catalyses the first step of lysine catabolism in *Candida albicans*. J. Gener. Microbiol. (137) 711-715.
55. Hammer T, Bode R, Schmidt H e Birnbaun D (1991b) Distribution of three lysine-catabolizing enzymes in various yeast species. J. Basic Microbiol. (31) 43-49.
56. Henke RR, Wahnbaeck R (1977) β -Aspartokinase from developing endosperm of maize. Biochem. Biophys. Res. Commun. (79) 38-45.
57. Henke RR e Wahnbaeck-Spencer R (1979) Variation in β -aspartokinase activity during the development of maize endosperm. FEBS Letters (99) 113-116.
58. Higashino K, Fujioka M e Yamamura Y (1971) The conversion of L-lysine to saccharopine and α -amino adipate in mouse. Arch. of Biochem. and Biophys. (142) 606-614.
59. Higashino K, Tsukada K e Lieberman I (1965) Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. (20) 285-290.
60. Higashino K, Fujioka M, Aoki T e Yamamura Y (1967). Metabolism of lysine in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. (29) 95-100.

61. Hutzler J e Dancis J (1968) Conversion of lysine to saccharopine by human tissue. *Biochim. Biophys. Acta* (158) 62-69.
62. Hutzler J e Dancis J (1970) Saccharopine cleavage by a dehydrogenase of human liver. *Biochim. Biophys. Acta* (206) 205-214.
63. Jackins HC e Barker HA (1951) Fermentative of the fusiforme bacteria. *J. Bacteriol.* (61) 101-114.
64. Jones EE e Broquist HP (1965) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis II: Studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* (240) 2531-2536.
65. Jones EF e Broquist HP (1966) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis III: Aminoadipic semialdehyde-glutamate reductase. *J. Biol. Chem.* (241) 3430-3434.
66. Kalan EB e Ceithaml J (1954) Methionine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (68) 293-298
67. Kanalas JJ e Suttle DP (1984) Amplification of the UMP synthase gene and enzyme overproduction in pyrazofurin-resistant rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* (259) 1848-1853.
68. Karchi H, Orit S e Galili G (1994) Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. *Proc. Natl. Acad.* (91) 2577-2581.
69. Kasbekar DK, Nagabhushanam A e Greenberg DM (1964) Purification and properties of orotic acid-decarboxylating enzymes from calf thymus. *J. Biol. Chem.* (239) 4245-4249.
70. Kent NL (1993) *Technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture*/NL Kent and Evers. (4th ed). Elsevier Science Ltd.
71. Kjaer A e Larsen PO (1961) Saccharopine, a new aminoacid in barker's e brewer's yeast II. Structure and synthesis. *Acta Chem. Scand.* (15) 750-759.
72. Kumpaisal R, Hashimoto T e Yamada Y (1987) Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension cultures. *Plant Physiol.* (85) 145-151.

73. Kuo MH, Saunders PP, Broquist HP (1964) Lysine biosynthesis in yeast: A new metabolite of α -amino adipic acid. J. Biol. Chem. (239) 508-515.
74. Larsen PO (1965) Amino acids and γ -glutamyl derivatives in seeds of *Lunaria annua*. part II. Acta Chem. Scand. (19) 1071-1078.
75. Larson RL, Sandine WD e Broquist HP (1963) Enzymatic reduction of α -amino adipic acid: Relation to lysine biosynthesis. J. Biol. Chem. (238) 275-282.
76. Lawrence JM e Grant DR (1964) Incorporation of lysine- ^{14}C into the developing grain of wheat. Arch. Biochem. and Biophys. (104) 73-78.
77. Lea PJ, Blackwell RD, Azevedo RA (1992) Analysis of barley metabolism using mutant genes. In: Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. PR Shewry (ed.) pp 181-207. CAB international. Wallingford.
78. Leatherbarrow RJ (1987) Enzfiter. A non-linear regression data analysis program for the IBMPC. Biosoft.
79. Leistner E, Gupta RN e Spenser ID (1973) A general method for the determination of precursor configuration in biosynthetic precursor-product relationships: derivation of pipercolic acid from D-lysine, and piperidine alkaloids from L-lysine. J. Amer. Chem. Soc. (95) 4040-4047.
80. Maragoudakis ME, Holmes H e Strassman M (1967) Control of lysine biosynthesis in yeast by a feedback mechanism. J. Bacteriol. (93) 1677-1680.
81. Markovitz DJ e Chuang DT (1987) The bifunctional amino adipic semialdehyde synthetase in lysine degradation. J. Biol. Chem. (262) 9353-9358.
82. Markovitz P, Chuang DT e Cox RP (1984) Familial hyperlysinemias: Purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde synthetase with LKR and SDH activities. J. Biol. Chem. (259) 11643-11646.
83. Matthews BF, Widholm JM (1978) Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. Planta (141) 315-321.

84. Matthews BF e Widholm JM (1979) Enzyme expression in soybeans cotyledon, callus an cell suspension culture. *Canad. J. of Bot.* (57) 299-302.
85. Mazelis M, Whatley FR, Whatley (1977) The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. *FEBS Letters* (84) 236-240.
86. Meister A, Radhakrishnan AN e Buckley SD (1957) Enzymatic synthesis of L-pipecolic acid and L-proline. *J. Biol. Chem.* (229) 789-800.
87. Mertz ET, Lloyd NE e Bressani R (1958) Studies on corn proteins. *Cereal Chem.* (35) 146-155.
88. Mills WR, Lea PJ and Miflin BJ (1980) Photosynthetic formation of the aspartate family of amino acids in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* (65) 1166-1172.
89. Misra PS, Jambunathan R, Mertz ET, Glover DV, Barbosa HM, McWhirter KS (1972) Endosperm protein synthesis in maize mutant with increased lysine content. *Science* (176) 1425-1427.
90. Mitcheal HK e Houlahan BM (1948) An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* (174) 883-887.
91. Moller BL (1974) Lysine biosynthesis in barley (*Hordeum vulgare* L). *Plant Physiol.* (54) 638-643.
92. Moller BL (1976a) Conversion of saccharopine to lysine in barley. *Phytochem.* (15) 695-996.
93. Moller BL (1976b) Lysine catabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Physiol.* (57) 687-692.
94. Morris ME e Jinks-Robertson (1991) Nucleotide sequence of the *LYS 2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: homology to *Bacillus brevis* tyrocidine synthase I. *Gene* (98) 141-145.
95. Müller WU e Leistner E (1975) Conversion of D-lysine to L-lysine via L-pipecolic acid in *Neurospora crassa*. *Z. Naturforsch.* (30c) 253-262.
96. Nabeta K, Koyama M e Sakamura S (1973) Identification of saccharopine and its lactam in buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Agric. Biol. Chem.* (37) 1401-1406.

97. Nawaz R e Sorensen H (1977) Distribution of saccharopine and α -amino adipic acid in higher plants. *Phytochem.* (16) 599-600.
98. Nigam SN e McConnel WB (1963) Studies on wheat plants using carbon-14 compounds. *Canad. J. of Biochem. and Physiol.* (41) 1367-1371.
99. Noda C e Ichihara A (1978) Purification and properties of L-lysine α -ketoglutarate reductase from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* (525) 307-313.
100. Ogawa H, Okamoto M e Fujioka M (1979) Chemical modification of the active site sulphhydryl group of saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming). *J. Biol. Chem.* (254) 7030-7035.
101. Ogawa H e Fujioka M (1978) Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* (253) 3666-3670.
102. Ozalp I, Hasanoglu A, Tunçbilek E e Yalaz K (1981) Hyperlissinemia without clinical findings. *Acta Paediatr. Scand.* (70) 951-953.
103. Patte JC, Bachi PT e Cohen GN (1966) The treonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartatekinase activities of *Escherichia col.* *Biochim. Biophys. Acta* (128) 426-439.
104. Rajnarayan S, Vaughn JC, Bhattacharjee JB (1992) Physical and biochemical characterization of the cloned *LYS5* gene required for α -amino adipic reductase activity in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* (21) 13-16.
105. Ramos C, Delgado MA, Calderon J (1991) Inhibition by different amino acids of the aspartatekinase and homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 278, 123-126.
106. Ramos F, Dubois E e Piérard A (1988) Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* evidence for a regulatory role of gene *LYS 14*. *Eur. J. Biochem.* (171) 171-176.
107. Reyes P e Guganic ME (1975) Studies on a pyrimidine phosphoribosyltransferase from murine leukemia P1534J. *J. Biol. Chem.* (250) 5097-5108.

108. Roberts D e Harmon AC (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* (43) 375-414.
109. Rothstein M e Miller LL (1954) The conversion of lysine to pipercolic acid in the rat. *J. Biol. Chem.* (211) 851-858.
110. Rothstein M e Saffran EM (1963) Lysine biosynthesis in algae. *Archi. of Biochem. and Biophys.* (101) 373-377.
111. Sagisaka S e Shimura K (1962) Studies in lysine biosynthesis. *J. Biochem.* (51) 398-404.
112. Sakano K e Komamine A (1978) Change in the proportion of two aspartokinases in carrot root tissue in response to *in vitro* culture. *Plant Physiol.* (61) 115-118.
113. Saunders PP e Broquist HP (1966) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis IV: Saccharopine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* (241) 3435-3440.
114. Schmidt H, Bode R e Birnbaum D (1989) Regulation of the lysine biosynthesis in *Pichia guilliermondii*. *Antonie von Leeuwenhoek* (56) 337-347.
115. Schmidt H, Bode R, e Birnbaum D (1988) A novel enzyme, L-lysine :pyruvate aminotransferase, catalyses the first step of lysine catabolism in *Pichia guilliermondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* (49) 203-206.
116. Schmidt H, Bode R, Lindener M e Birnbaum D (1985) Lysine biosynthesis in the yeast *Candida maltosa* properties of some enzymes and regulation of the biosynthetic pathway. *J. Basic. Microbiol.* (25) 675-681.
117. Schmidt H e Bode R (1992) Characterization of a novel enzyme, N6-acetyl-L-lysine:2-oxoglutarate aminotransferase, which catalyses the second step of lysine catabolism in *Candida maltosa*. *Antonie von Leewwenhoek* (62) 285-290.
118. Shewry PR and Mifflin BJ (1977) Properties and regulation of aspartate kinase from barley seedlings (*Hordeum vulgare* L). *Plant Physiol.* (59) 69-73.

119. Shoaf WT e Jones M E (1973) Uridylic acid synthesis in ehrlich ascites carcinoma: properties, subcellular distribution, and nature of enzyme complexes of the six biosynthetic enzymes. *Biochem.* (12) 4039-4051.
120. Siegel LM e Monty K (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta* (112) 346-362.
121. Sodek L (1976) Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochem.* (15) 1903-1906.
122. Sodek L e Wilson CM (1970) Incorporation of leucine ^{14}C and lysine ^{14}C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch. Biochem. Biophys.* (140) 29-38.
123. Sorensen H (1976) Saccharopine and 2-amino adipic acid in *Reseta odorata*. *Phytochem.* (15) 1527-1529.
124. Stadtman TC (1963) Anaerobic degradation of lysine: II cofactor requirements and properties of the soluble enzyme system. *J. Biol. Chem.* (238) 2766-2773.
125. Stors DR e Bhattacharjee JK (1989) Properties of revertants of *LYS2* and *LYS5* mutants as well as α -amino adipate-semialdehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (161) 182-186.
126. Storts DR e Bhattacharjee JK (1987) Purification and properties of saccharopine dehydrogenase (glutamate forming) in the *Saccharomyces cerevisiae* lysine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* (169) 416-418.
127. Strassman M, Weinhouse S (1953) Biosynthetic Pathways III. The biosynthesis of lysine by *Torulopsis utilis*. *J. Am. Chem. Soc.* (75) 1680-1684.
128. Takeda e Hayaishi (1966) Crystalline L-lysine oxygenase. *J. Biol. Chem.* (241) 2733-2736.
129. Traut TW e Jones ME (1977) Kinetic and conformational studies of the orotate phosphoribosyltransferase: orotate-5'-phosphate decarboxylase

- enzyme complex from mouse ehrlich ascites cells. J. Biol. Chem. (252) 8374-8381.
130. Trupin JS e Broquist HP (1965) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis I: Studies in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. (240) 2524-2530.
 131. Umezaki K, Amaya T, Yoshimoto A e Tomita K (1971) Purification and Properties of orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase. J. Biochem. (70) 249-262.
 132. Urrestarazu LA, Borel CW e Bhattacharjee JW (1985) General and specific control of lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. (9) 341-344.
 133. Vogel HJ (1964) Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. The Amer. Natur. (98) 435-446.
 134. Wade M, Thomson DM e Mifflin BJ (1980) Saccharopine: an intermediate of L-lysine biosynthesis and degradation in *Pyricularia oryzae*. J. Gener. Microbiol. (120) 11-20.
 135. Wahl GM, Padgett RA e Stark GR (1979) Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistant hamster cells. J. Biol. Chem. (254) 8679-8689.
 136. Wickiwire BM, Harris CM, Harris TM e Broquist HP (1990a) Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia Leguminicola*. J. Biol. Chem. (265) 14742-14747.
 137. Wickiwire BM, Wagner C e Broquist HP (1990b) Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia Leguminicola* II: Saccharopine oxidase: a unique flavin enzyme involved in a pipecolic acid biosynthesis. J. Biol. Chem. (265) 14748-14753.
 138. Woody NC, Hutzler J e Dancis J (1966) Further studies of hyperlysinemia. Amer. J. Dis. Child (112) 577-580.
 139. Woody NC, Ong EB e Pupene M (1967) Paths of lysine degradation in the patients with hyperlysinemia. Pediatrics (40) 986-992.
 140. Woody NC (1964) Hyperlysinemia. Amer. J. Dis. Child (108) 543-553.

141. Yamada Y, Kumpaisal R, Hashimoto T, Sugimoto Y e Suzuki A (1986) Growth and aspartate kinase activity in wheat cell suspension culture: effects fo lysine analogs and aspartate-derived amino acids. *Plant Cell Physiol.* (27) 607-617.
142. Zaccharius RM, Thompson JF e Steward FC (1952) The detection, isolation and identification of pipecolic acid as a constituent of plants. *J. Am. Chem. Soc.* (74) 2949.