

BC/33033

IB/80564



UNICAMP

T/UNICAMP

D235_c

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

**Clonagem, caracterização e estudo da expressão do gene *DapA* que
codifica a enzima dihidrodipicolinato sintase de *Coix lacryma-jobi* L.**

Este exemplar correspondente à redação final
da tese de Ricardo Augusto Dante
é aprovada por Comissão de leitura
01/12/97 + Arruda

Ricardo Augusto Dante

Orientador: Dr. Paulo Arruda

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.

1997



UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	L2250		
V.	Ex.		
TOMBO DE	33033		
PROC.	395198		
C	☐	D	☒
PREÇO	R\$ 18,00		
DATA	10/03/98		
N.º CPD	2400.106425-6		

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

Dante, Ricardo Augusto

D235c Clonagem, caracaterização e estudo da expressão do gene DapA que codifica a enzima dihidrodipicolinato sintase de *Coix lacryma-jobi* L./Ricardo Augusto Dante. -- Campinas,SP:[s.n.], 1997.
63f. illus.

Orientador: Paulo Arruda
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

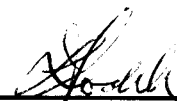
1. Clonagem. 2. Coix. 3. Enzima. 4. Milho. I. Arruda, Paulo.
II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data: Campinas, 01 de dezembro de 1997.

Banca examinadora:

Titulares:

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Assinatura

Profa. Dra. Yoko B. Rosato



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda (Orientador)



Assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni



Assinatura

APROVADA

Meus especiais agradecimentos:

aos meus pais, Deise e Eduardo, pelo imenso amor, pela minha educação e pelo apoio total e irrestrito, sempre;

à vó Tita, pelo amor e pela demonstração de fé, para com tudo e todos; à minha irmã Betina e à tia Denise, minhas amigas, à todos os meus familiares, em especial à tia Ide e ao tio Ari;

à Pan, minha maior amiga, pelo seu amor, paciência e por sempre me motivar, ainda mais agora, apesar e graças à distância.

Este trabalho é especialmente dedicado ao vô Nereo, pelo carinho e companheirismo que só os avós podem proporcionar aos netos e por poder presenciar sua silenciosa e honesta existência.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
Lisina é um dos aminoácidos essenciais mais limitantes em vegetais	1
Biossíntese de lisina	1
Biossíntese de lisina em plantas: a via do diaminopimelato	2
Aspartato quinase	4
Dihidrodipicolinato sintase	5
Mutantes e plantas transgênicas que expressam enzimas da via do aspartato menos sensíveis a retroinibição pela lisina	6
Localização intracelular das enzimas da via da família do aspartato	9
Degradação de lisina em plantas	
Lisina é translocada para o endosperma de milho em desenvolvimento	9
Proteínas de reserva de sementes são fonte de aminoácidos	11
Regulação coordenada do metabolismo da lisina e da síntese de proteínas de reserva	13
OBJETIVOS E TRABALHO	16
DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	51
CONCLUSÕES	54
BIBLIOGRAFIA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica dos aminoácidos da família do aspartato.	3
Figura 2. "Southern blot" dos clones genômicos do gene <i>DapA</i> de <i>Coix</i> , mapa parcial de restrição do clone genômico gCXDHPS-1, estratégia para seu sequenciamento e representação esquemática de sua estrutura.	19

Figuras do Trabalho

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the <i>Coix</i> DHPS genomic clone gCXDHPS-1.	45
Figure 2. Alignment of the amino acid sequences of plant DHPS proteins.	46
Figure 3. Structure of the <i>DapA</i> gene in <i>Coix</i> , maize and sorghum.	47
Figure 4. RNA gel blot analysis of the DHPS expression in <i>Coix</i> and maize tissues and effect of exposure to light and dark.	48
Figure 5. RNA gel blot analysis of the DHPS expression in <i>Coix</i> embryos and endosperms during seed development.	49
Figure 6. RNA gel blot analysis of the DHPS expression in maize embryos and endosperms during development of normal and <i>opaque2</i> kernels.	50

ABREVIATÖES

AEC	S-(2-aminoetil)L-cisteína
AK	aspartato quinase
cDNA	DNA complementar ao mRNA
cpm	cintilações por minuto
DAP	dias após a polinização
DHPS	dihidrodipicolinato sintase
HSD	homoserina desidrogenase
kb	kilopares de base
LKR	lisina ceto-glutarato redutase
Mops	[3-(N-morfolino) ácido propanosulfônico]
O2	proteína Opaco2
ORF	“open reading frame”
pb	pares de base
SDH	sacaropina desidrogenase
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Nas sementes de cereais, lisina é o aminoácido mais limitante para a nutrição humana e animal. Em plantas superiores, lisina, assim como treonina, metionina e isoleucina, é sintetizada através da via de biossíntese dos aminoácidos da família do aspartato. A aspartato quinase (AK) e a dihidrodipicolinato sintase (DHPS) são as principais enzimas dessa via. A DHPS é a primeira enzima da ramificação específica para a síntese de lisina e a mais importante para o controle da síntese deste aminoácido. A despeito de seu papel fundamental na síntese de lisina, apenas clones de cDNA e genômicos incompletos codificando a DHPS de plantas foram isolados e poucos estudos tratam da sua expressão. Neste trabalho, descrevemos a clonagem e a caracterização de um clone genômico do gene *DapA* que codifica a DHPS de *Coix lacryma-jobi*. A sequência do clone revelou uma "open reading frame" (ORF) interrompida por dois introns de aproximadamente 1 e 0,8 kb, que codifica um polipeptídeo de 377 aminoácidos. Neste polipeptídeo foram identificados um peptídeo sinal para plastídeos na extremidade amino terminal e uma proteína madura contendo 326 amino ácidos que é 95% idêntica à DHPS de milho. Na região flanqueadora 5' foi encontrada, a 372 pb do códon de início de tradução, uma sequência de nucleotídeos similar àquela do sítio de ligação do fator de transcrição GCN4 de levedura. Esse elemento é largamente encontrado em promotores de genes de plantas e controla a transcrição de diversos genes de proteínas de reserva de sementes. Análise por "Southern blot" indicou que a estrutura do gene é bastante conservada e que existem cópias únicas deste em *Coix* e milho e múltiplas cópias em sorgo. Transcritos da DHPS foram detectados em diversos tecidos como coleoptiles, lâminas foliares, raízes, embriões e endospermas de *Coix* e milho. Maior expressão da DHPS foi verificada em coleoptiles, embriões e endospermas imaturos. Análise da expressão do gene no endosperma de milho *opaco2* mostrou pequena diminuição da expressão. A proteína Opaco2, capaz de interagir com elementos "GCN4-like" em outros genes, não ligou-se a tal elemento do promotor do gene *DapA* de *Coix*, o que é consistente com a expressão relativamente normal deste gene no endosperma *opaco2*.

ABSTRACT

Lysine is the most limiting amino acid for animal nutrition in cereal seeds. In higher plants, lysine, as well as threonine, methionine and isoleucine, is synthesized through the aspartate family biosynthetic pathway. Aspartate kinase (AK) and dihydrodipicolinate synthase (DHPS) are the main enzymes of the pathway. DHPS is the first and the most important enzyme of a specific branch of the aspartate pathway committed to lysine biosynthesis in higher plants. Despite its crucial importance for lysine synthesis, only cDNA and incomplete genomic clones encoding DHPS from plants have been isolated so far and few studies on its expression are available. In this report, we described the cloning and sequencing of a DHPS encoding *DapA* gene from *Coix lacryma-jobi*. The sequence of the clone revealed an open reading frame (ORF) interrupted by two introns of approximately 1 and 0.8 kb. This ORF encodes a polypeptide of 377 amino acids in which an amino-terminal putative chloroplast transit peptide and a mature protein of 326 amino acids which is 95% similar to the maize DHPS protein. Analysis of 5' flanking region of the gene revealed a GCN4-like *cis*-element located at 372 pb upstream the translation start codon. This element is largely found in promoters of plant genes and controls the transcription of several genes encoding seed storage proteins. Southern blot analysis revealed that the structure of the gene is conserved in monocot and that there is a single copy in *Coix* and maize. In sorghum, however, there are probably multiple copies. DHPS transcripts were detected in coleoptiles, blade leaves, embryos, endosperms and roots. Higher expression was found in coleoptiles and immature embryos and endosperms. Analysis of *DapA* expression showed a slight decrease in the endosperm of the maize mutant *opaque2* when compared to its normal counterpart. Opaque2 protein, which is able to interact with GCN4-like elements in other genes, did not bind to the *Coix DapA* gene, in agreement with its nearly normal expression in *opaque2* endosperms.

INTRODUÇÃO

Lisina é um dos aminoácidos essenciais mais limitantes em vegetais

Dentre os 20 aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, somente 11 podem ser sintetizados por mamíferos adultos. Os 9 restantes, denominados “essenciais”, devem ser providos pela dieta. As plantas e maioria das bactérias e fungos tem a capacidade de sintetizar todos os 20 aminoácidos.

As sementes de cereais constituem a maior fonte de proteína para a nutrição animal e humana, apesar de suas frações protéicas não constituírem mais que 15% do peso seco da semente (Payne, 1983). Notadamente, o milho responde por 25% do consumo direto e indireto de alimentos pelo homem (FAO, 1988) e no Brasil, a produção deste cereal corresponde a mais de 30% do total de grãos (Pinazza, 1993).

Estas observações tornam-se importantes quando constata-se que sementes de plantas apresentam deficiências específicas quanto ao conteúdo de aminoácidos essenciais. De maneira geral, as sementes de leguminosas apresentam baixos conteúdos dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina, enquanto que os cereais são deficientes principalmente em lisina e triptofano (Payne, 1983). Portanto, a compreensão dos mecanismos que determinam o teor de lisina em plantas bem como a obtenção de variedades de plantas com maior teor deste aminoácido é de grande interesse.

O acúmulo de qualquer aminoácido em tecidos vegetais é regulado por mecanismos complexos que envolvem basicamente quatro processos: síntese, degradação, translocação de outros tecidos e incorporação em proteínas. Assim, é o balanço entre esses componentes que determina o teor de um dado aminoácido num tecido.

Biossíntese de lisina

Duas vias de síntese de lisina são encontradas na natureza: a via do α -aminoadipato, presente em diversos grupos de fungos e leveduras e a via do diaminopimelato, um braço específico da via da família do aspartato, encontrada em bactérias, fungos inferiores, algas e plantas superiores (Umbarger, 1978). A maioria, senão todas as plantas superiores, utilizam exclusivamente a via do diaminopimelato

para sintetizar lisina (Bryan, 1980).

Biossíntese de lisina em plantas: a via do diaminopimelato

Diaminopimelato é o último intermediário que precede imediatamente a lisina e que batiza uma ramificação específica da via metabólica dos aminoácidos da família do aspartato (Fig. 1). O aspartato é o precursor inicial para a produção de lisina, além de metionina e treonina, através de outras ramificações da via (Fig. 1; Bryan, 1980; Galili, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). A treonina, por sua vez, é precursora da isoleucina, através da via de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada que também origina leucina e valina (Bryan, 1980; Singh e Shaner, 1995; Azevedo *et al.*, 1997).

A via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato tem sido amplamente revisada (Galili, 1995; Singh e Shaner, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). Ela é extremamente ramificada, compreendendo uma série de enzimas cujas atividades são alostericamente retroinibidas pelos aminoácidos produzidos pelas respectivas ramificações da via. A atividade da aspartato quinase (AK), a primeira enzima da via, é inibida por lisina e treonina. Adicionalmente, lisina também inibe a atividade da dihidrodipicolinato sintase (DHPS), enquanto que a treonina inibe a atividade da homoserina desidrogenase (HSD). Ou seja, lisina e treonina regulam a sua própria síntese por inibição da atividade da primeira enzima que leva exclusivamente a sua produção e também por inibição da atividade da primeira enzima da via (Fig. 1).

A AK e sobretudo a DHPS têm sido consideradas as principais enzimas da via do aspartato para a biossíntese de lisina, principalmente em decorrência da severa inibição exercida pela lisina em suas atividades (Galili, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). Dos restantes 6 passos enzimáticos posteriores ao catalizado pela DHPS e necessários para a síntese de lisina (Fig. 1), até o momento apenas duas outras enzimas foram também estudadas em plantas: dihidrodipicolinato redutase (EC 1.3.1.26), que converte o dihidrodipicolinato à piperidina dicarboxilato e diaminopimelato decarboxilase (EC 4.1.1.20), que cataliza a decarboxilação de *meso*-diaminopimelato em lisina (revisado por Azevedo *et al.*, 1997).

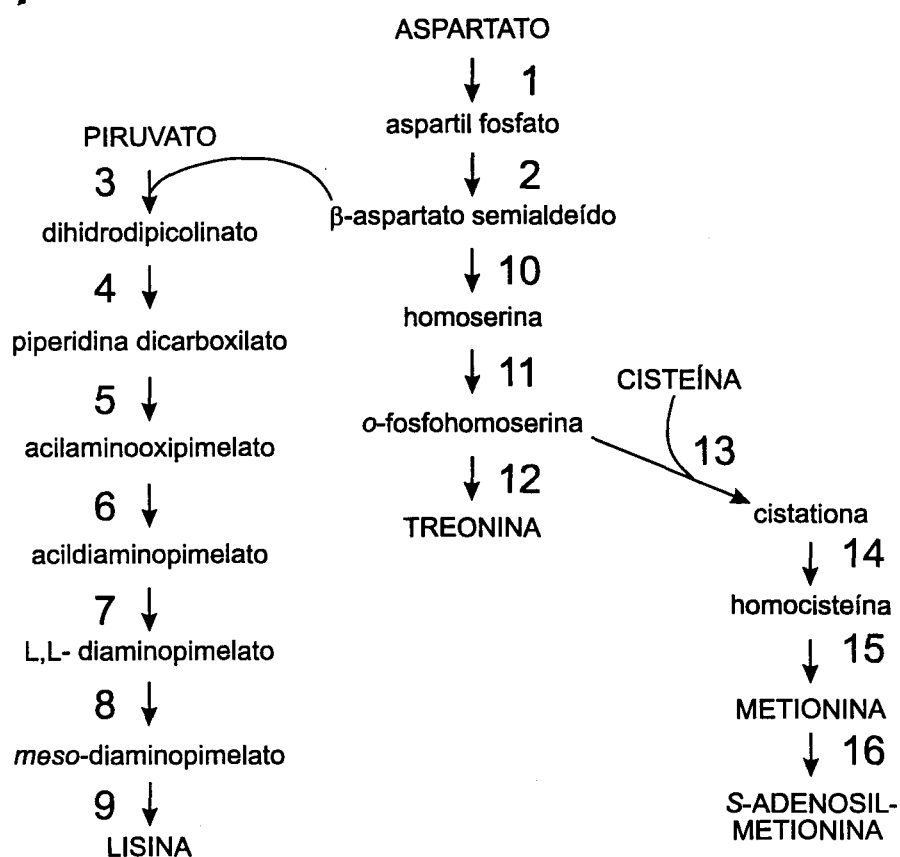


Figura 1. Via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato. Os números especificam as atividades enzimáticas: 1, aspartato quinase; 2, aspartato semialdeído desidrogenase; 3, dihidrodipicolinato sintase; 4, dihidrodipicolinato redutase; 5, piperidina dicarboxilato acilase; 6, acildiaminopimelato aminotransferase; 7, acildiaminopimelato deacilase; 8, diaminopimelato epimerase; 9, diaminopimelato decarboxilase; 10, homoserina desidrogenase; 11, homoserina quinase; 12, treonina sintase; 13, cistationa γ -sintase; 14, cistationa β -liase; 15, metionina sintase; 16, S-adenosil-metionina sintetase (adaptado a partir de Azevedo *et al.*, 1997).

Aspartato quinase

A AK (EC 2.7.2.4), primeira enzima da via do aspartato, cataliza a fosforilação do aspartato produzindo β -aspartil fosfato (Bryan, 1980; Fig. 1). Sua atividade, portanto, é fundamental para a síntese de todos os aminoácidos da família do aspartato. De maneira geral, é a enzima da via mais detalhadamente estudada a nível bioquímico e genético em diversas espécies de plantas agronomicamente importantes como milho, cevada, cenoura, ervilha e soja (revisado por Azevedo *et al.*, 1997).

Diversos polipeptídeos com atividade AK vêm sendo caracterizados em função de seus diversos graus de retroinibição pelos diferentes produtos da via. Assim, algumas isozimas são retroinibidas por lisina, outras por treonina ou sinergicamente por lisina e S-adenosil-metionina (Galili, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). Clones genômicos e de cDNA que codificam AK sensíveis a retroinibição por treonina já foram isolados de cenoura, milho e *Arabidopsis* (Weisemann e Matthews, 1993; Ghislain *et al.*, 1994; Muehlbauer *et al.*, 1995). Mais recentemente, cDNAs de AK presumivelmente codificadores de isoformas sensíveis a retroinibição por lisina foram clonados (Frankard *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1997).

Notavelmente, alguns polipeptídeos contendo atividade de AK também possuem atividade de HSD (EC 1.1.1.3; Wilson *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992; Weisemann e Matthews, 1993; Ghislain *et al.*, 1994; Muehlbauer *et al.*, 1995). HSD é a primeira enzima que leva, a partir do β -aspartato semialdeído, à síntese de treonina e isoleucina e à de metionina a partir de o-fosfohomoserina (Figura 1; revisado por Bryan, 1980 e Azevedo *et al.*, 1997).

O aspartil-fosfato produzido pela AK é posteriormente reduzido a β -aspartato semialdeído pela atividade da aspartato semialdeído desidrogenase (EC 1.2.1.11), cuja atividade é menos sensível a retroinibição pelos aminoácidos produzidos pela via (Gegenbach *et al.*, 1978). O compartilhamento do β -aspartato semialdeído, último precursor comum de todos os aminoácidos da via do aspartato (Fig. 1), pela HSD e a DHPS e suas consequências serão discutidos adiante.

Dihidrodipicolinato sintase

A DHPS (EC 4.2.1.52) cataliza a primeira reação da ramificação da via que leva exclusivamente a formação de lisina, condensando o piruvato e o β -aspartato semialdeído para formar o 2,3-dihidrodipicolinato. Dentre as enzimas da via, a DHPS é a enzima mais sensível a inibição pela lisina em plantas ($I_{0,5}$ entre 10 e 50 μ M), diferentemente de bactérias, nas quais é muito menos sensível ($I_{0,5}$ aproximadamente 1 mM; Galili *et al.*, 1995).

O mecanismo de reação da DHPS foi caracterizado em *Escherichia coli* (Shedlarsky e Gilvarg, 1970) e posteriormente verificado em plantas: a enzima cataliza a condensação de aspartato semialdeído e piruvato através de um mecanismo de “ping-pong”, no qual piruvato primeiramente liga-se à enzima, formando uma base de Schiff com um resíduo de lisina e liberando H₂O. Em seguida ocorre a ligação do aspartato semialdeído ao complexo piruvato-enzima ativada, a condensação e a liberação de H₂O e dihidrodipicolinato. Lisina e alguns de seus análogos são inibidores competitivos em relação ao aspartato semialdeído mas também, controversamente, em relação ao piruvato (Shedlarsky, 1971; Kumpaisal *et al.*, 1987; Frisch *et al.*, 1991b; Dereppe *et al.*, 1992).

A DHPS têm sido isolada, purificada e caracterizada a partir de várias espécies de plantas. Em sua maioria, as enzimas apresentam-se como tetrâmeros cujos pesos moleculares aproximados variam pouco entre si. A proteína nativa de espinafre tem 155.000, a de trigo 123.000 (Kumpaisal *et al.*, 1987), a de milho 130.000 (Frisch *et al.*, 1990a), a de tabaco 164.000 (Ghislain *et al.*, 1990) e a de ervilha 127.000 com, excepcionalmente, três subunidades de 43.000 (Dereppe *et al.*, 1992).

A DHPS é codificada por um gene denominado *DapA*, caracterizado em tabaco como sendo nuclear (Negrutiu *et al.*, 1984). Vários cDNAs de DHPS de plantas já foram clonados e caracterizados. Kaneko *et al.* (1990) pioneiramente clonaram cDNAs com sondas de oligonucleotídeos baseadas nas sequências de aminoácidos amino-terminais de enzimas purificadas a partir de culturas de células de trigo. Posteriormente, Frisch *et al.* (1991b) e Vauterin e Jacobs (1994) clonaram cDNAs de milho e *Populus*, respectivamente, através da complementação de mutantes *dapA*⁻ de *E. coli* desprovidos da atividade da enzima. Através de hibridização com sondas de dicotiledôneas, cDNAs

de soja (Silk *et al.*, 1994), tabaco (Ghislain *et al.*, 1995) e *Arabidopsis thaliana* (Vauterin e Jacobs, 1994) foram clonados. Apenas clones genômicos incompletos de soja (Silk *et al.*, 1994) e tabaco (Ghislain *et al.*, 1995) foram isolados. Todos os clones caracterizados codificam proteínas maduras de 326 aminoácidos, exceção feita à de *Populus*, que apresenta 327 (Vauterin e Jacobs, 1994). Identities de aproximadamente 89% foram encontradas entre as proteínas de monocotiledôneas, 81% entre as de dicotiledôneas e 76% entre as dos dois grupos (Vauterin e Jacobs, 1994). As DHPS de plantas, como um todo, apresentam aproximadamente 33% de identidade com as dos procariotos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium glutamicum* (Vauterin e Jacobs, 1994). Os polipeptídeos deduzidos revelam a existência de sequências de aminoácidos amino-terminais de tamanho e composição característicos de peptídeos de trânsito para plastídeos e/ou cloroplastos, contudo sem grande conservação de sequência (Kaneko *et al.*, 1990; Frisch *et al.*, 1991b; Vauterin e Jacobs, 1994; Ghislain *et al.*, 1995; este trabalho).

Plantas mutantes e transgênicas que expressam enzimas da via do aspartato menos sensíveis a retroinibição pela lisina

Grande quantidade de informação vem sendo acrescentada à compreensão do metabolismo dos aminoácidos da via do aspartato graças à obtenção e análise de plantas mutantes e transgênicas que expressam formas de enzimas desta via menos sensíveis à retroinibição (Lea e Forde, 1994; Galili *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 1997).

Mutantes resistentes a aminoácidos produzidos pela via ou alguns de seus análogos foram obtidos em várias espécies como tabaco, trigo, milho, cevada, *Arabidopsis*, batata e milheto (revisado por Azevedo *et al.*, 1997). Contudo, a resistência nem sempre está associada a alterações específicas das enzimas e ao aumento do conteúdo de um ou mais aminoácidos da via (Azevedo *et al.*, 1997).

Dentre os casos analisados mais detalhadamente, mutantes de cevada resistentes a lisina mais treonina acumulam treonina (Bright *et al.*, 1982), enquanto que mutantes de milho igualmente resistentes a lisina mais treonina superproduzem treonina e serina em suas sementes (Hibberb e Green, 1982). Nos mutantes das duas espécies foram caracterizadas formas de AK insensíveis ou menos sensíveis a retroinibição pela lisina, porém não foram verificados aumentos dos níveis de lisina.

Mutantes RLT (resistentes a lisina mais treonina) de *Arabidopsis* que acumulam 4 a 8 vezes mais treonina e contém atividade de AK apenas parcialmente insensível à lisina foram também caracterizados (Heremans e Jacobs, 1994; 1995). Mutantes RLT de *Nicotiana sylvestris* contém mais treonina solúvel em suas folhas e sementes na ordem de 45 e 70 vezes, respectivamente. A AK extraída destes mutantes mostrou-se totalmente insensível à retroinibição pela lisina (Frankard *et al.*, 1982). Destes exemplos pode-se concluir que a insensibilização da AK não leva ao aumento dos níveis de lisina, mas principalmente dos de treonina. Porém, a análise de alguns mutantes foi muito elucidativa do ponto de vista de regulação da síntese de lisina. O mutante RAEC-1 (resistente a S-(2-aminoetil)L-cisteína) de *Nicotiana sylvestris*, regenerado a partir de cultura de protoplastos, demonstrou um aumento de 28 vezes nos níveis de lisina solúvel nas folhas, associado à insensibilização da DHPS e não da AK (Negrutiu *et al.*, 1984).

Informações importantes foram obtidas com o cruzamento dos mutantes de tabaco RLT 70 e RAEC-1 (Frankard *et al.*, 1992). Os duplos mutantes apresentaram níveis mais altos de lisina solúvel nas folhas (1785 nmol g^{-1}) que o mutante simples de DHPS RAEC-1 (1380 nmol g^{-1}). Surpreendentemente, o nível de treonina nos duplos mutantes (51 nmol g^{-1}) foram muito menores que nos mutantes parentais de AK RLT 70 ($18779 \text{ nmol g}^{-1}$) e ainda menores que nas plantas selvagens (335 nmol g^{-1}). Também, os níveis de isoleucina e metionina também foram diminuídos. Estes resultados levam a conclusão de que a DHPS drena o β -aspartato semialdeído, sobretudo quando a AK está desregulada, para a ramificação da via do diaminopimelato, levando a maior síntese de lisina em detrimento da síntese dos outros aminoácidos produzidos pela via (Frankard *et al.*, 1992).

Resultados semelhantes àqueles obtidos pela análise de plantas mutantes foram observados na análise de plantas transgênicas expressando enzimas da via do aspartato codificadas por genes bacterianos, caracteristicamente muito menos sensíveis a retroinibição por lisina que suas homólogas vegetais (Galili, 1995). Para criá-las, as regiões codificadoras dos genes bacterianos de AK e DHPS foram colocadas sob controle de promotores constitutivos, como o 35S do vírus do mosaico da couve-flor, ou tecido específicos, como o da β -faseolina, altamente ativo em

sementes de dicotiledôneas.

A expressão da AK bacteriana em diferentes plantas levou a uma significativa superprodução de treonina e metionina, enquanto que a da DHPS levou a superprodução de lisina (Glassman, 1992; Karchi *et al.*, 1993; Perl *et al.*, 1992; Shaul e Galili, 1992a; 1992b; Shaul e Galili, 1993; Brinch-Pedersen *et al.*, 1996; Tzchori *et al.*, 1996), resultados semelhantes àqueles observados nas plantas mutantes para AK e DHPS. É também notável que em alguns casos, as atividades e/ou as quantidades dos polipeptídeos de AK e DHPS bacterianas estão positivamente correlacionados com o acúmulo de treonina e lisina, respectivamente (Perl *et al.*, 1992; Shaul e Galili, 1992a; 1992b; Falco *et al.*, 1995; Galili, 1995). Portanto, conclui-se que não somente a retroinibição é importante para a síntese, mas também a quantidade das enzimas (Perl *et al.*, 1992; Shaul e Galili, 1992a; Galili, 1995).

Assim, tanto plantas mutantes como plantas transgênicas contendo formas da AK e/ou DHPS menos sensíveis à retroinibição pela lisina permitiram várias considerações gerais e importantes a respeito da regulação da síntese de lisina: *(i)* a atividade da DHPS muito provavelmente é o ponto regulatório fundamental para a síntese de lisina uma vez que, na maioria dos casos, o acúmulo de lisina está associado à perda da capacidade de retroinibição da DHPS e não da AK. A alteração somente da DHPS, e não a de outras enzimas da via, é suficiente para maior síntese do aminoácido; *(ii)* a AK parece estar principalmente associada à síntese de treonina e menos à de lisina, porém ela controla os níveis do precursor de todos os aminoácidos produzidos pela via, o β -aspartato semialdeído, daí o maior efeito no acúmulo de lisina quando ambas enzimas estão insensibilizadas; *(iii)* a DHPS e a AK competem pelo β -aspartato semialdeído, com vantagem para a DHPS e, conseqüentemente, em detrimento da síntese de treonina, sobretudo em condições de perda de sensibilidade à retroinibição de ambas enzimas.

Localização intracelular das enzimas da via da família do aspartato

A via do aspartato é operante em diversos órgãos, conforme bioquicamente evidenciado, indicando que a síntese dos aminoácidos da via ocorre em uma ampla gama de tipos celulares, com organização e função diferentes (Gegenbach *et al.*, 1978; Azevedo *et al.*, 1997). Muitas enzimas da via da família do aspartato são localizadas em

plastídeos (Bryan *et al.*, 1977; Wallsgrove and Mazelis, 1980; Ghislain *et al.*, 1990), o que é corroborado pela análise de sequências de DNA clonadas que revelam que as enzimas da via possuem peptídeos sinais para plastídeos e/ou cloroplastos (Kaneko *et al.*, 1990; Frisch *et al.*, 1991b; Weisemann e Matthews, 1992; Ghislain *et al.*, 1994; Ghislain *et al.*, 1995; Vauterin e Jacobs, 1994; Muehlbauer *et al.*, 1995; Frankard *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1997b). A análise de plantas transgênicas também vem trazendo informações relativas a compartimentalização intracelular das enzimas da via do aspartato. Estes estudos basearam-se na obtenção de plantas transgênicas com genes quiméricos, nos quais as sequências dos genes bacterianos que codificam a AK e a DHPS foram fundidos com sequências que codificam peptídeos sinais para plastídeos na extremidade amino-terminal dos polipeptídeos das enzimas, direcionando-as para a organela. Assim, observou-se que a localização da DHPS em plastídeos é crucial para a síntese de lisina, enquanto que a localização da AK dentro da organela não é essencial para a produção de treonina (Shaul e Galili, 1992a; 1992b; Galili, 1995).

Lisina é translocada para o endosperma de milho em desenvolvimento

A síntese de proteínas no endosperma de milho depende primariamente da disponibilidade do nitrogênio translocado para a semente ao longo do desenvolvimento (Tsai *et al.*, 1980; Singletary and Below, 1990; Singletary *et al.*, 1990; Balconi *et al.*, 1993). Os aminoácidos são a principal forma de transporte de nitrogênio para a espiga (Arruda e da Silva, 1979a) e são oriundos da mobilização de nitrogênio a partir de proteínas de partes vegetativas da planta como lâminas foliares e caule (Cliquet *et al.*, 1990).

Embora haja síntese de lisina através da via do diaminopimelato no endosperma de milho (Sodek, 1976), a lisina é translocada para o endosperma de milho em quantidades razoáveis, constituindo aproximadamente 4,5% do nitrogênio total presente na seiva do pedúnculo da espiga durante o desenvolvimento (Arruda e da Silva, 1979a; 1979b; 1983). Comparativamente, glutamina é a forma predominante de nitrogênio translocada ao longo do desenvolvimento (de 18 a 31%), enquanto que metionina é pouco translocada (de 0,8 a 1,7%) e prolina e cisteína não são detectadas, o que implica na obrigatoriedade de sua síntese *in loco* (Arruda e da Silva, 1979a).

Degradação de lisina em plantas

Ao longo de todo o desenvolvimento da semente de milho, a quantidade de lisina encontrada na seiva vascular do pedúnculo da espiga e na região pedicelo-placento-chalazal são superiores à encontrada no endosperma (Arruda e da Silva, 1983; Lyznik *et al.*, 1982; 1985). A quantidade de lisina translocada é aproximadamente duas a três vezes maior que a necessária para a síntese de proteínas (Arruda e da Silva, 1983), o que implica que a lisina é extensivamente degradada no endosperma.

Assim como em mamíferos, a degradação de lisina no endosperma de milho é realizada pela enzima lisina ceto-glutarato redutase (LKR; Arruda *et al.*, 1982). A enzima cataliza a condensação de lisina com α -ceto glutarato, originando sacaropina. Esta, por sua vez, é convertida pela sacaropina desidrogenase (SDH) em α -aminoadípico semialdeído e glutamato. LKR e SDH em plantas e mamíferos são atividades contidas num único polipeptídeo bifuncional (Markovitz e Chuang, 1987; Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996). A LKR/SDH de plantas tem sido encontrada no endosperma em desenvolvimento de milho (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996) e seu mRNA mais abundantemente em órgãos florais, endospermas e embriões de *Arabidopsis* (Tang *et al.*, 1997a).

A análise de plantas transgênicas de tabaco que expressam a DHPS de *E. coli* nas sementes revelou que a ausência de acúmulo de lisina estava correlacionada com o aumento da atividade de LKR (Karchi *et al.*, 1994). Similarmente, indução de atividade LKR foi obtida com a injeção de lisina exógena em sementes em desenvolvimento de tabaco (Karchi *et al.*, 1994).

Falco *et al.* (1995) obtiveram plantas transgênicas de soja e canola expressando em suas sementes os genes de *Corynebacterium glutamicum* da AK e da DHPS insensíveis à retroinibição pela lisina. Diferentemente dos resultados obtidos em tabaco (Karchi *et al.*, 1994), estas plantas mostraram acúmulo de lisina nas sementes, contudo foram também encontrados em quantidades significativas produtos de sua degradação como o α -aminoadípico semialdeído em canola e a sacaropina em soja.

Assim, o acúmulo de lisina livre em tecidos que não os da semente parece estar vinculado à ausência de degradação da mesma (Azevedo *et al.*, 1997). Portanto, a sua atividade parece desempenhar importante papel no controle dos níveis de lisina,

sobretudo no endosperma de milho, como será discutido posteriormente.

Proteínas de reserva de sementes são fonte de aminoácidos

A semente contém uma ampla variedade de proteínas pouco abundantes que são essenciais para a manutenção do metabolismo celular e uma categoria composta por um número relativamente pequeno de proteínas armazenadas em grandes quantidades, cuja função é fornecer nitrogênio e aminoácidos à plântula durante a germinação, denominadas proteínas de reserva (Higgins, 1984).

As proteínas das sementes são normalmente classificadas, em função de sua solubilidade em diversas soluções, em quatro grupos: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções alcoólicas) e glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas; Osborne e Mendel, 1914; Laudry e Moureaux, 1980).

Nos cereais, com exceção da aveia, na qual 80% das proteínas de reserva são globulinas e do arroz, no qual 85% são glutelinas, as prolaminas e glutelinas representam 50% e 40% das proteínas de reserva, respectivamente (Larkins, 1981). Em dicotiledôneas, as proteínas de reserva são predominantemente globulinas (Payne, 1983).

Tradicionalmente, as prolaminas são batizadas de maneira a indicar a planta de origem. Assim, as prolaminas de milho (*Zea mays*) são denominadas zeínas, as de cevada (*Hordeum vulgare*) hordeínas e as de *Coix lacryma-jobi*, coixinas. Esen (1986), baseado em solubilidade diferencial, classificou as zeínas em três classes, α -, β - e γ -zeínas. Posteriormente, foi adotada a mesma classificação para as coixinas (Ottoboni *et al.*, 1990; Leite *et al.*, 1992).

Sendo o principal componente da fração protéica de semente, a composição de aminoácidos das proteínas de reserva influencia fortemente o balanço total de aminoácidos do grão. De maneira geral, as proteínas de reserva são ricas em asparagina, glutamina e arginina ou prolina, mas deficientes em lisina, treonina e triptofano em cereais e em cisteína, metionina e triptofano em leguminosas (Payne, 1983). Assim, o baixo conteúdo de determinados aminoácidos nas sementes de diferentes espécies decorre da escassez dos mesmos em suas principais proteínas de reserva.

Uma vez que são expressas em grandes quantidades, de maneira temporal e tecido-específica e sua taxa de síntese é altamente controlada transcricionalmente (Higgins, 1984), a regulação dos genes de proteínas de reserva de sementes é motivo de grande interesse e vem sendo largamente estudada, principalmente em cereais. Mutações que alteram frações específicas de proteínas de reservas têm despertado grande interesse, uma vez que essas alterações frequentemente acarretam em modificações na composição de aminoácidos da semente. Por exemplo, alterações que levam à diminuição do conteúdo de prolaminas, que são pobres em lisina, levam a um maior conteúdo de proteínas ricas em lisina, com vantagens óbvias do ponto de vista nutricional. Ao mesmo tempo, a caracterização molecular dessas mutações vem sendo elucidativa quanto a aspectos da regulação da expressão dos genes que codificam prolaminas.

Dentre os exemplos mais estudados está a mutação *opaco2* de milho, que proporciona maior teor de lisina no tecido (Mertz *et al.*, 1964). Verificou-se que a síntese de grande parte das α -zeínas encontrava-se altamente reduzida nas sementes *opaco2* (Burr e Burr, 1982), em grande parte devido a um decréscimo de seus mRNAs (Kodrzycki, 1989). O aumento absoluto dos níveis de lisina (Habben *et al.*, 1993) é decorrente do aumento da fração de albuminas, globulinas e glutelinas, que possuem caracteristicamente maior conteúdo do aminoácido (Murphy e Dalby, 1971). A clonagem e caracterização do *locus Opaco2* mostrou que o gene codifica um fator de transcrição, pertencente à classe “basic domain/leucine zipper” (bZIP) e denominada proteína Opaco2 (O2), que controla positivamente a transcrição de genes de prolaminas (Schmidt *et al.*, 1987; Motto *et al.*, 1988; Hartings *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1990). Portanto, mutantes homozigotos *opaco2* têm diminuição no conteúdo de prolaminas em decorrência da ausência da O2.

Coix e sorgo apresentam grande semelhança com milho na composição de prolaminas e na estrutura e regulação de seus genes (De Rose *et al.*, 1989; Shull e Kirleis, 1989; Leite *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 1991; Ottoboni *et al.*, 1990; 1993; Targon *et al.*, 1992; Leite *et al.*, 1992; de Freitas, 1994; Yunes *et al.*, 1994, Cord Neto *et al.*, 1995). Desta maneira, não surpreendentemente, genes homólogos ao *Opaco2* foram estrutural e funcionalmente caracterizados em sorgo (Pirovano *et al.*,

1994) e Coix (Vettore *et al.*, 1997), sugerindo grande conservação evolutiva dos mecanismos de regulação dos genes das prolaminas.

Regulação coordenada do metabolismo de lisina e da síntese de proteínas de reserva

Sodek e Wilson (1970) demonstraram que no endosperma *opaco2* ocorre menor degradação de lisina quando comparado ao endosperma normal. Posteriormente, verificou-se que o perfil da atividade de LKR ao longo do desenvolvimento está correlacionado positivamente com a deposição das prolaminas e com a assimilação de nitrogênio pelo endosperma de milho (Arruda e da Silva, 1983). Brochetto-Braga *et al.* (1992) verificaram que a atividade de LKR em endospermas *opaco2* é de 2 a 3 vezes menor quando comparada a dos endospermas normais. Ainda, a diminuição é creditada a um menor número de moléculas da enzima (Brochetto-Braga *et al.*, 1992). Sendo as zeínas desprovidas de lisina (Shewry e Tatham, 1990), a maior atividade de LKR nos endospermas normais pode ser explicada pela necessidade de degradação da lisina livre em função das excessivas quantidades do aminoácido que são sintetizadas e translocadas para o grão em desenvolvimento, como destacado anteriormente. Caso contrário, a maior quantidade de lisina livre no endosperma normal poderia inibir a atividade da AK, comprometendo principalmente a síntese de metionina (Brochetto-Braga *et al.*, 1992). No endosperma *opaco2*, o aumento da quantidade de proteínas ricas em lisina leva a uma menor necessidade de degradação desta. Portanto, foi sugerido que a degradação de lisina através da atividade de LKR e a síntese de prolaminas no endosperma de milho estão sob o controle de um mesmo mecanismo de regulação transcricional, exercido pela O₂ (Brochetto-Braga *et al.*, 1992).

Não somente o catabolismo de lisina apresenta-se correlacionado com a síntese de proteínas de reserva e sob influência dos mecanismos que controlam sua síntese. O padrão temporal de síntese de lisina e treonina em plantas transgênicas de tabaco expressando AK e DHPS bacterianas, bem como a conversão de asparagina a aspartato e posteriormente a outros aminoácidos da família do aspartato ocorrem concomitantemente com a expressão de genes de proteínas de reserva (Karchi *et al.*, 1994; Falco *et al.* 1995). Similarmente, a atividade dos promotores dos genes que codificam a AK/HSD de *Arabidopsis* (Zhu-Shimoni *et al.*, 1997) e a asparaginase de

Lupinus, que converte asparagina em aspartato (Grant e Bevan, 1993), em plantas transgênicas de tabaco também apresentam-se correlacionados com a síntese de proteínas de reserva de semente. Existem também evidências de que a mutação *opaco2* influencia a via do aspartato. Em milho, o gene *Ltr*1* que codifica uma forma de AK insensível a retroinibição por lisina gera um aumento do conteúdo de treonina ainda maior que em endospermas normais quando em *background opaco2* (Azevedo *et al.*, 1990).

Previamente caracterizado como um regulador exclusivo da síntese das α -zeínas de 22 kDa, o fator de transcrição Opaco2 parece, entretanto, ser capaz de, em maior ou menor intensidade, regular a transcrição de genes que codificam uma série de proteínas no endosperma de milho e de outros cereais como *Coix* e trigo. Entre estes genes estão aqueles que codificam α -coixinas (Yunes *et al.*, 1994), β -zeínas e β -coixinas (Cord Neto *et al.*, 1995), a proteína inativadora de ribossomo b-32 (Lohmer *et al.*, 1992), a chaperonina b-70 (Marocco *et al.*, 1991), a forma citosólica de piruvato ortofosfato diquinase (Gallusci *et al.*, 1996; Maddaloni *et al.*, 1996) e uma glutenina de baixo peso molecular (Holdsworth *et al.*, 1995). Desta maneira, um papel mais geral no desenvolvimento do endosperma foi proposto para a O2 (Cord Neto *et al.*, 1995).

Outra evidência que levou a um redimensionamento do papel da O2 foi obtida a partir de estudos de sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. A produção de lisina e muitos outros aminoácidos nesta levedura é coordenadamente regulada em resposta às condições nutritivas do meio através do sistema GCN (Hinnebush, 1988). A bZIP GCN4 é considerada um dos principais controladores do sistema GCN por regular transcricionalmente diversos genes que codificam enzimas e proteínas regulatórias. Para tanto, GCN4 reconhece sequências de nucleotídeos com núcleo TGACTC presentes nos promotores desses genes (Hinnebush, 1988). A O2 é estruturalmente similar à GCN4 (Hartings *et al.*, 1989) e o gene *Opaco2* mostrou-se capaz de complementar mutantes de levedura desprovidos da atividade de GCN4 (Mauri *et al.*, 1993). Isto é devido a capacidade da O2 ligar-se às mesmas sequências TGACTC que GCN4 normalmente reconhece (Mauri *et al.*, 1993). Portanto, além de estruturalmente similares, O2 e GCN4 são funcionalmente relacionadas.

É interessante que muitos promotores de genes de plantas que codificam

proteínas de reserva de semente, bem como enzimas do metabolismo primário de nitrogênio e de aminoácidos, contém sequências similares à sequência consenso de ligação de GCN4 (Müller e Knudsen, 1993). Desta maneira, a existência de proteínas semelhantes à GCN4 foi sugerida para a regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio em plantas (Müller e Knudsen, 1993).

OBJETIVOS E TRABALHO

Como destacado anteriormente, existem várias evidências que apontam a DHPS como a principal enzima biossintética de lisina em plantas. Portanto, nosso objetivo principal era caracterizar a estrutura e estudar a regulação da expressão do gene *DapA* que codifica a DHPS. Ademais, diante da emergente concepção de regulação coordenada da expressão de genes que codificam proteínas de reserva e enzimas de metabolismo de nitrogênio, pretendíamos também investigar se o seu padrão de expressão está associado às alterações na síntese de proteínas de reserva, para tanto fazendo uso do mutante de endosperma de milho *opaco2*.

Desta forma, foram cumpridas as seguintes etapas:

(i) isolamento e sequenciamento de um clone genômico de DHPS de *Coix lacryma-jobi*;

(ii) análise da região flanqueadora 5' do gene em busca de possíveis elementos *in cis* responsáveis pelo controle da regulação do gene;

(iii) detecção do mRNA de DHPS e determinação do padrão de expressão do gene em diversos tecidos e durante o desenvolvimento de sementes de *Coix* e milho normais e *opaco2*;

(iv) comparação da sequência de aminoácidos deduzida de DHPS de *Coix* com as de DHPS clonadas a partir de outras espécies vegetais.

(v) análise da estrutura do gene *DapA* de *Coix*, milho e sorgo.

O corpo desta tese está constituído de um trabalho submetido a publicação. Como introdução ao manuscrito, descreveremos mais detalhadamente o processo de isolamento, subclonagem e sequenciamento do clone genômico de DHPS de *Coix*.

Isolamento de clones genômicos de DHPS de *Coix lacryma-jobi*

Sementes de *Coix lacryma-jobi* variedade Adlay foram obtidas da coleção do Departamento de Genética do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Os métodos de biologia molecular como manipulação de DNA, sua transferência a membranas, hibridização e construção e “screening” de biblioteca genômica foram

realizados de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Enzimas e kits foram utilizadas segundo as especificações dos fabricantes.

O clone do gene *DapA* que codifica a DHPS de *Coix* havia sido isolado de uma biblioteca genômica previamente construída (Cord Neto *et al.*, 1995). Para tanto, DNA total foi extraído de plântulas de *Coix*, conforme descrito por Rivin *et al.* (1982), parcialmente digerido com *Mbol* e os fragmentos separados em gradiente de sacarose. Frações contendo fragmentos de 9 a 22 kb foram coletadas e clonadas no sítio *Bam*HI no bacteriófago λ Dash (Stratagene). Depois do empacotamento *in vitro* com extrato Gigapack II (Stratagene), os fagos foram plaqueados em *E. coli* DL538. Cerca de 1×10^6 fagos foram submetidos à hibridização com o fragmento *Eco*RI de 1,4 kb do clone de cDNA de DHPS de milho pZM DHPS5 (Frisch *et al.*, 1991b; cedido pelo Dr. David A. Frisch, University of Minnesota, USA) marcado radioativamente pelo método de “random primer” com o kit Megaprime (Amersham). Foram isolados oito clones positivos, dos quais dois, designados gCXDHPS-1 e gCXDHPS-2, foram escolhidos para análise.

Análise dos clones

Sete μ g de DNA dos dois clones selecionados foram digeridos com *Eco*RI, *Not*I, *Xba*I e *Sa*II. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos alcalinamente para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham). Esta foi hibridizada com a sonda de cDNA de DHPS marcada radioativamente. A membrana foi lavada duas vezes por 20 minutos em 1x SSC (NaCl 150 mM, citrato de sódio 15 mM), 0,1% SDS (p/v), à temperatura ambiente, duas vezes por 20 minutos em 0,1x SSC, 0,1% SDS a 65°C, embalada em saco plástico e exposta a filme autoradiográfico Hyperfilm-MP (Amersham) por aproximadamente 3 horas.

Os clones gCXDHPS-1 e gCXDHPS-2 apresentaram perfis de restrição similares, diferindo no tamanho do fragmento de DNA genômico clonado (Fig. 2A). gCXDHPS-1 e gCXDHPS-2 continham insertos de aproximadamente 16 e 19 kb, respectivamente, conforme verificado na digestão com *Not*I, que liberou todo o fragmento de DNA genômico clonado (Fig. 2A). Baseando-se no tamanho do fragmento e no número de bandas que hibridizavam com o clone de cDNA de milho (Fig. 2A), o

clone gCXDHPS-1 foi escolhido para caracterização e sequenciamento. Dentre os diversos fragmentos de restrição obtidos do clone gCXDHPS-1, hibridizaram com a sonda de cDNA os de 3,1 e 3,7kb *EcoRI*, 19 kb *NotI*, 6,1 kb *SaII* e 1,2, 4,1 e 5,0 kb *XbaI* (Fig. 2A).

Os fragmentos *EcoRI* foram subclonados em pBluescript KS+ (Stratagene). O fragmento de 3.1 kb hibridizou muito mais fortemente com a sonda de cDNA que o fragmento de 3.7 kb, indicando que deveria conter a maior parte do gene da DHPS (Fig. 2A). Para determinação da distribuição do gene dentro destes dois fragmentos, foi gerada uma sonda *XbaI/EcoRI* de 0,21 kb do clone de cDNA pZM DHPS5, correspondente a extremidade 5' do cDNA de DHPS de milho. O subclone de 3,7 kb foi o único que hibridizou com esta sonda, indicando que continha a região 5' do gene (Fig. 2A).

Os dois subclones *EcoRI* foram analisados por digestão com diversas enzimas de restrição. Após a obtenção do mapa (Fig. 2B), foram gerados novos subclones que foram sequenciados pelo método de Sanger *et al.* (1977), com o kit T7 Sequencing (Pharmacia). A obtenção do mapa possibilitou também determinar a orientação correta dos dois subclones *EcoRI* de 3,1 e 3,7 kb através do sequenciamento da região de conexão entre ambos (Fig. 2B).

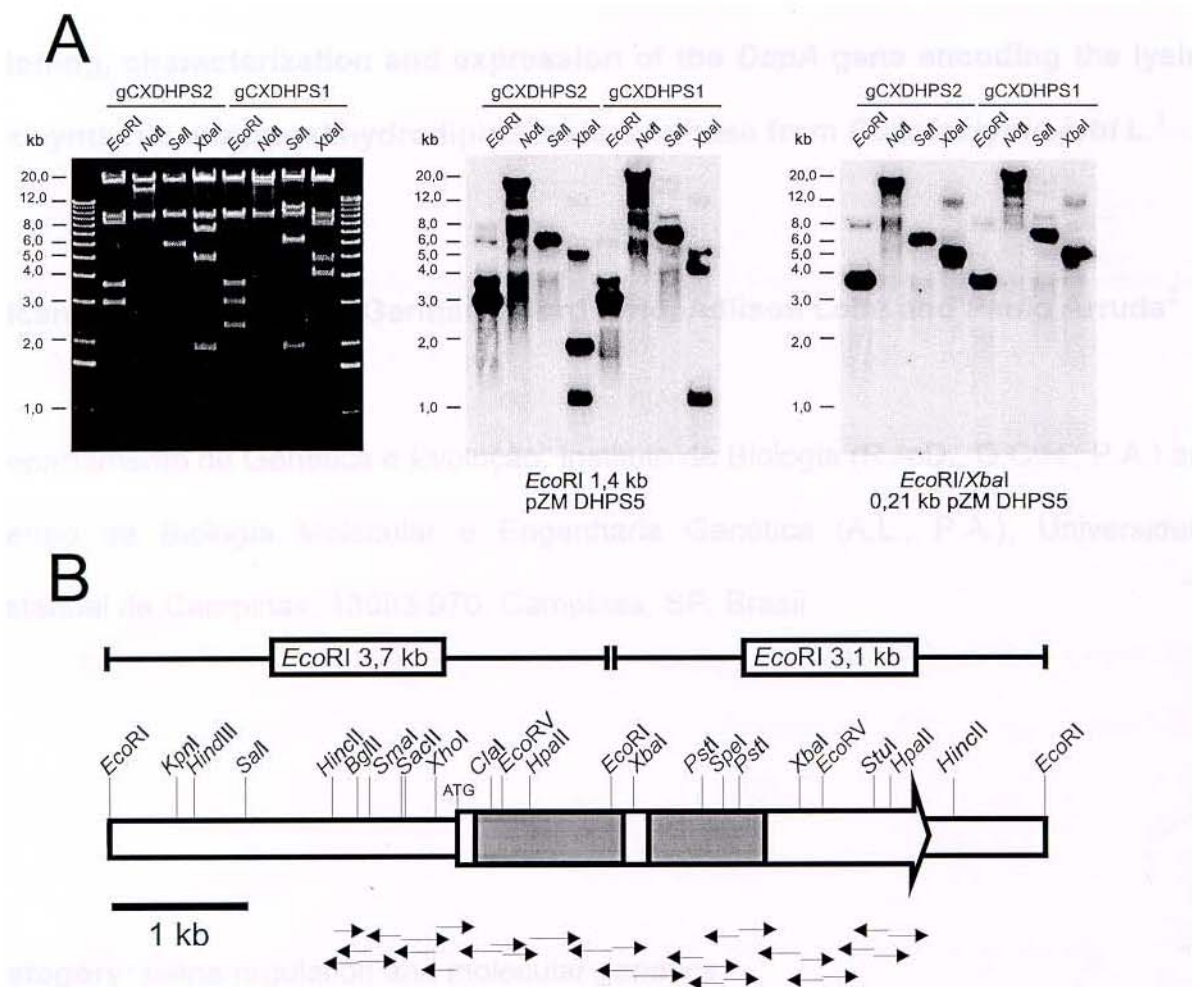


Figura 2. A. "Southern blot" dos clones genômicos de *DapA* de *Coix*. O DNA dos clones isolados foram digeridos com as enzimas indicadas, separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados contra sondas derivadas do clone de cDNA de DHPS de milho pZM DHPS5 (*EcoRI* 1,4 kb, cDNA inteiro; *EcoRI/XbaI* 0,21 kb, porção 5'). Os números apresentados à esquerda representam os marcadores de peso molecular, em kb. **B.** Mapa parcial de restrição do clone genômico gCXDHPS-1, estratégia para seu sequenciamento e representação esquemática de sua estrutura. Está representada apenas a região compreendida pelos subclones *EcoRI* de 3,7 e 3,1 kb empregados na caracterização e constam somente os sítios de restrição empregados na estratégia de subclonagem. As setas pequenas representam as regiões sequenciadas. A seta grande representa a "open reading frame" que codifica a DHPS de *Coix*. Dentro desta, as caixas escuras representam os dois introns encontrados.

Cloning, characterization and expression of the *DapA* gene encoding the lysine biosynthetic enzyme dihydrodipicolinate synthase from *Coix lacryma-jobi* L.¹

Ricardo Augusto Dante, Germano Cord Neto, Adilson Leite and Paulo Arruda²

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia (R.A.D., G.C.N., P.A.) and Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (A.L., P.A.), Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

Category: Gene regulation and molecular genetics

Footnotes:

¹This work was supported in part by grants to P.A. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). P.A. and A.L. received research fellowships from CNPq. R.A.D. and G.C.N. received postgraduate fellowships from CNPq and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), respectively. This research is part of a M.Sc. thesis by R.A.D.

²Corresponding author: Paulo Arruda, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: parruda@turing.unicamp.br

Abbreviations: **AK**, aspartate kinase; **DAP**, days after pollination; **DHPS**, dihydrodipicolinate synthase; **HSD**, homoserine dehydrogenase; **O2**, Opaque2 protein.

The nucleotide sequence data reported herein will appear in the EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Database under the accession number U61730.

ABSTRACT

Dihydrodipicolinate synthase (DHPS) is the main enzyme of a specific branch of the aspartate pathway leading to lysine biosynthesis in higher plants. We have now cloned and sequenced the DHPS-encoding *DapA* gene from *Coix lacryma-jobi*. The coding region for this enzyme is interrupted by two introns and encodes a polypeptide of 377 amino acids corresponding to the *Coix* DHPS apoprotein. A N-terminal putative chloroplast transit peptide is followed by a mature protein of 326 amino acids which shows 95% similarity to the maize DHPS protein. DNA gel blot analysis using region-specific probes suggested the existence of a single copy *DapA* gene in both *Coix* and maize, and multiple copies in sorghum. RNA gel blot analysis showed that the *DapA* gene is expressed in coleoptiles, embryos, endosperms and roots but is almost undetectable in leaves of both *Coix* and maize. Analysis of the 5' flanking region of the *DapA* gene revealed a TGACTC GCN4-like element, located at -372 pb upstream from the translation start codon. Transient expression analysis using the *DapA* 5' flanking region/GUS fusions and selective binding using the Opaque2 protein (O2) showed that this GCN4-like element is not an O2 binding site. In addition, there was no significant difference in *DapA* expression in normal and *opaque2* endosperms, suggesting that the gene is not under the control of Opaque2.

INTRODUCTION

In many bacteria and in higher plants, lysine, threonine, methionine and isoleucine are synthesized by the aspartate family biosynthetic pathway (Galili, 1995; Azevedo et al., 1997). Two enzymes of the pathway, aspartate kinase (AK) and dihydrodipicolinate synthase (DHPS) are feedback inhibited by lysine. DHPS is the first enzyme of the branch that leads exclusively to lysine biosynthesis (Bryan, 1990). Various reports have demonstrated that DHPS activity is the key regulatory step for lysine biosynthesis in plants (Galili, 1995; Azevedo et al., 1997). The enzyme is particularly sensitive to lysine feedback inhibition ($I_{0.5}$ of 10-50 μ M, in contrast to 100-700 μ M for AK; Galili, 1995). Mutant and transgenic plants expressing forms of DHPS less sensitive to lysine feedback inhibition accumulate free lysine (Negrutiu et al., 1984; Glasmann, 1992; Shaul and Galili, 1992; Perl et al., 1992; Falco et al., 1995; Brinch-Pedersen et al., 1996; Tzchori et al., 1996). Moreover, expression of both insensitive DHPS and AK leads to higher lysine accumulation at expenses of threonine (Frankard et al., 1992; Shaul and Galili, 1993). Furthermore, the positive correlations seen between DHPS activity or DHPS protein level and free lysine content suggests that the amount of the enzyme may influence lysine accumulation (Perl et al., 1992; Shaul and Galili, 1992; Falco et al., 1995).

In plants, the DHPS is encoded by the nuclear *DapA* gene and imported into plastids which are believed to be the sole and crucial location of DHPS activity (Wallsgrave and Mazelis, 1980; Ghislain et al., 1990; Shaul and Galili, 1992). DHPS cDNAs have been cloned from wheat (Kaneko et al., 1990), maize (Frisch et al., 1991), *Arabidopsis* and poplar (Vauterin and Jacobs, 1994), soybean (Silk et al.,

1994), and tobacco (Ghislain et al., 1995). However, only incomplete *DapA* genomic clones are available (Silk et al., 1994; Ghislain et al., 1995). Among the main enzymes involved in lysine biosynthesis, so far the only one to be studied at gene level is a bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase (AK/HSD) from *A. thaliana* (Ghislain et al., 1994; Zhu-Shimoni et al., 1997).

This work describes the cloning and expression analysis of a gene encoding the DHPS protein from the maize-related grass *Coix lacryma-jobi*. This is the first description of a complete *DapA* genomic clone encoding DHPS from plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Coix lacryma-jobi cv Adlay and *Sorghum vulgare* cv INRA 450 were obtained from the collection of the Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brazil). Normal and *opaque2* maize seeds were obtained from an F352 background (Sementes Agrocere, São Paulo, Brazil) after successive backcrosses using the Oh43 *opaque2* null mutant as a plant source.

Isolation and sequencing of the *Coix* DHPS gene

About 1×10^6 phages of a λ Dash (Stratagene) *Coix* genomic library (Cord Neto et al., 1995) were screened with the 1.4 kb *EcoRI* fragment of the maize DHPS cDNA clone pZM DHPS5 (Frisch et al., 1991). Two positive clones were isolated and the clone gCXDHPS-1, which contained a ~19 kb insert, was further characterized.

gCXDHPS-1 DNA was digested with *EcoRI* and hybridizing fragments of 3.1 and 3.7 kb were subcloned into the pBluescript KS+ (Stratagene) and sequenced on both strands using the T7 DNA sequencing kit (Pharmacia). The sequence data were analyzed using DNASIS (Pharmacia) and protein alignments were performed on CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Identification of potential regulatory sequences in the 5' flanking region was performed with MatInspector software (Quandt et al., 1995) using matrices for regulatory elements in eukaryotic promoters (Bucher, 1990).

DNA gel blot analysis

Genomic DNA was extracted from *Coix*, sorghum and maize seedlings as described by Rivin et al. (1982). Ten micrograms of DNA were digested with *EcoRI* and *EcoRV*, separated on a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond-N, Amersham), according to standard procedures (Sambrook et al., 1989). The blot was hybridized for 16 h at 42°C in 50% deionized formamide, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5X SSC, 1% SDS, 5X Denhardt's solution, 5% dextran sulphate, 100 µg of salmon sperm DNA/mL and random primed ³²P-labeled probes with specific activities of 10⁸-10⁹ cpm µg⁻¹. The probes used were the 1.4 kb *EcoRI* fragment from the maize DHPS cDNA clone pZM DHPS5 and the 0.36 kb *XhoI/ClaI* and 0.39 kb *EcoRV/HpaII* fragments from the *Coix DapA gCXDHPS-1* genomic clone, corresponding respectively to specific 5' and 3' flanking region probes (Fig. 3A). Final moderate-stringency washes were performed twice in 1x SSC containing 0.1% SDS at 55°C for 20 min. The membrane was subsequently exposed to autoradiography film (Hyperfilm-MP, Amersham) for five days at -70°C. Probes were stripped off with boiling 0.1% SDS, and the membrane was successively hybridized with the other probes.

RNA gel blot analysis

Analysis of *DapA* expression in endosperms and embryos was performed using seeds harvested at 10, 15, 20, 28 and 35 DAP for *Coix* and at 10, 15, 20, 25 and 30 DAP for normal and *opaque2* maize. *Coix* and maize embryos and endosperms were dissected manually, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. *DapA* expression in vegetative organs were analyzed using *Coix* and maize seedlings germinated in distilled water-irrigated vermiculite at 25±2°C either under white light (30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16-h-d/8-h-night) or in the dark. Two to three cm-long coleoptiles, blades (the first 5-8 cm of emerging leaves) and primary and secondary roots were harvested and total RNA were extracted according to Prescott and Martin (1987). Twenty micrograms of total RNA were separated on 20 mM Mops, 0.66 M formaldehyde, agarose gels and transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham) according to Fournery et al. (1987). Hybridizations were performed as described above for the DNA gel blot analysis, using the maize DHPS cDNA clone as a probe. Final high-stringency washes were performed twice in 0.1 x SSC containing 0.1% SDS at 60°C for 20 min. The membranes were exposed to autoradiography film (Hyperfilm-MP, Amersham) for 2-5 days at -70°C. For normalization of the amount of RNA loaded, probes were stripped with boiling 0.1% SDS and membranes rehybridized using the maize 28S rRNA clone pZM28S-19 as the probe.

RESULTS

Nucleotide sequence and structure of the *Coix DapA* gene

Two *Eco*RI fragments (3.1 and 3.7 kb) of the gCXDHPS-1 clone hybridized with the maize DHPS cDNA probe (data not shown). A 4.2 kb region spanning these two fragments contained the coding region and the 5' and 3' flanking regions of the *Coix DapA* gene.

The coding unit of the *Coix DapA* gene (Fig. 1) was identified by comparing the sequences of the gCXDHPS-1 clone with the maize cDNA clone pZM DHPS5. The 3,062 pb coding unit consisted of three exons and two introns whose boundaries fitted the consensus sequences for plant intron splice sites (Hanley and Schuler, 1988). The first intron interrupted the codon for Gly⁴⁴ of the apoprotein and was 1,072 pb long. The second intron was 859 pb long and interrupted the codon for Arg⁶⁹ (Fig.1). A putative consensus polyadenylation signal AATAAA (Joshi, 1987) was found in the 3' end, 19 pb downstream from the termination codon UAG (Fig. 1). Analysis of the 5' flanking region revealed a putative TATA box, cap site and a TGACTC GCN4-like element, located at -138, -177 and -372 pb upstream from the translation start codon, respectively (Fig. 1).

The *Coix* DHPS protein

The deduced amino acid sequence from the gCXDHPS-1 clone revealed a polypeptide of 377 amino acids (Fig. 1) which included a putative 51-amino acid long N-terminal chloroplast transit peptide and a mature DHPS protein of 326 residues with a deduced M_r of 35,993 (Fig. 2). Sequence alignment with other mature DHPS proteins from plants revealed high amino acid identity (Fig. 2). *Coix* DHPS showed

95% identity with the maize protein and had an average identity of about 89% with the wheat proteins and 75% with the dicot proteins.

Structure of the *DapA* gene in *Coix*, maize and sorghum genomes

To study the structure of the *DapA* gene, 5' and 3' fragments of the gCXDHPS-1 genomic clone were used as region-specific probes (Fig. 1A). These were designed to produce single bands when hybridized to *EcoRI* and *EcoRV* digested *Coix* genomic DNA, assuming that the *DapA* gene exists as a single copy in *Coix*. Either the maize full-length cDNA or the gCXDHPS-1 region-specific probes hybridized to 3.1 kb and 3.7 kb bands of *EcoRI* digested *Coix* DNA (Fig. 3B), which correspond to the sequenced gCXDHPS-1 subclones. This observation suggested the occurrence of a single *DapA* gene in *Coix*. Hybridization of DNAs from *Coix*, maize and sorghum using these region-specific probes revealed similar *DapA* structures in these plants (Fig. 3B and C). Different bands were distinguished in each enzyme/probe combination in a reasonable mutually exclusive pattern, thus reflecting that each probe recognized specific restriction fragments. However, while *Coix* and maize showed strong single band patterns consistent with the existence of a single copy of the *DapA* gene, duplicated intense bands suggesting more than one gene were found in sorghum (Fig. 3B and C).

Spatial expression of the *DapA* gene in maize and *Coix*

Transcripts of approximately 1.4 kb, corresponding in size to the DHPS mRNA, were detected in nearly all maize and *Coix* tissues following RNA gel blot analysis (Fig. 4). Generally, the DHPS transcripts had a low abundance since large amounts of total RNA and long exposure times were required for their detection. Similar expression

patterns were found in both *Coix* and maize. DHPS transcripts were more abundant in coleoptiles, immature embryos, early immature endosperms and roots and were nearly absent in 5-8 cm-long blade leaves (Fig. 4). Expression in vegetative organs was only slightly altered when plants were grown in the dark (Fig. 4).

Developmental expression of *DapA* in *Coix* and maize seeds

DHPS expression in *Coix* and maize embryos and more clearly in endosperms was higher at the beginning of development and decreased as the seeds matured (Figs. 5 and 6). In both species, embryos usually exhibited a higher DHPS expression than endosperms during seed maturation. However, more evident differences were found between maize and *Coix* endosperms. Whereas DHPS expression in *Coix* endosperm decreased abruptly after 10 DAP (Fig. 5), in maize it was nearly constant along the development (Fig. 6). In *Coix* embryos, expression decreased after 10 DAP and remained almost constant up to 35 DAP (Fig. 5), whereas in maize embryos expression was constant throughout seed development (Fig. 6).

Since the maize *opaque2* mutant contains high levels of lysine in the endosperm and the *DapA* gene possesses GCN4-like element in its promoter, similar to those recognized by the Opaque2 protein (Lohmer et al., 1991; Mauri et al., 1993; de Pater et al., 1994; Yunes et al., 1994b; Holdsworth et al., 1995; Maddaloni et al., 1996), we examined whether the *DapA* gene expression would be under the control of O2. The expression of DHPS in the endosperm of the maize *opaque2* mutant differed only slightly from that of normal endosperm (Fig. 6). Considering the overall seed development, a premature decrease in DHPS transcription occurred in both endosperm and embryo of *opaque2* kernels when compared to their normal

counterparts (Fig. 6). Since O2 is not expressed in embryos, such difference indicates that the decreased *DapA* gene transcription in *opaque2* kernels is not related to the O2 factor. We also investigated whether the GCN4-like element of the *DapA* gene was involved in the regulation of its transcription. Transient expression assays of the *DapA* 5' flanking region/GUS fusions bearing either normal or mutated GCN4-like elements indicated no influence of O2 (data not shown). In addition, a selective binding assay using a *DapA* promoter fragment containing the GCN4-like element showed that O2 did not bind to the *DapA* promoter (data not shown).

DISCUSSION

Structure of the *Coix DapA* gene

The sequenced 4.2 kb region of the gCXDHPS-1 clone contained the entire coding unit of the *Coix DapA* gene in addition to its 5' and 3' flanking regions. The first ATG of the predicted open reading frame probably corresponds to the correct translation start, since no other in frame ATG was found upstream. Interestingly, the second intron interrupting the open reading frame was located at the codon for the residue Arg⁶⁹ of the apoprotein, conserved in all plant DHPS except for the poplar protein (Fig. 2). Introns were also found to interrupt this codon in the incomplete *DapA* genomic clones of soybean (Silk et al., 1994) and tobacco (Ghislain et al., 1995). This finding constitutes evidence that the structure of *DapA* genes in monocots and dicots has been conserved during evolution.

The gCXDHPS-1 clone encoded the *Coix* DHPS protein, which showed 95% similarity to the maize DHPS protein. Notably, the maize and *Coix* DHPS amino acid

sequence identity was higher than that observed between the DHPS sequences deduced from cDNA clones isolated from wheat (Kaneko et al., 1990). The high similarity between the *Coix* and maize DHPS proteins was also seen in their chloroplast transit peptides (Fig. 2), an uncommon feature among other plant DHPS signal peptides. In contrast to other plant DHPS (Kaneko et al., 1990; Frisch et al., 1991; Vauterin and Jacobs, 1994; Ghislain et al., 1995), the *Coix* protein lacked an Ala residue at the transit peptide cleavage site (Fig. 2).

The mature *Coix* DHPS protein possessed several conserved amino acids associated with the enzymatic properties of DHPS. These included Lys¹⁸³, which binds pyruvate in the *E. coli* enzyme (Fig. 2; Laber et al., 1992) and Ser¹⁰⁴, Glu¹⁰⁹ and Ala¹¹³, which are related to feedback inhibition by lysine and S-2-aminoethyl-L-cysteine (Fig. 2; Ghislain et al., 1995; Shaver et al., 1996; Silk and Matthews, 1997).

***DapA* exists as a single gene in *Coix* and maize but not in sorghum genomes**

For each enzyme/probe combination used in the DNA gel blot analysis of the *Coix*, maize and sorghum genomes, a specific pattern of hybridizing bands was observed, thus indicating a similar structure of the *DapA* gene in these monocots. Our data also suggest that *DapA* is a single copy gene in maize and *Coix* (Fig. 3). The absence of several prominent bands in each enzyme/probe combination does not agree with a multiple copy status. On the other hand, sorghum exhibited more complex profiles of duplicated, strongly hybridizing bands, reflecting the probable existence of multiple *DapA* genes. The number of genes encoding DHPS in plants is still controversial. Multiple copies have been suggested on the basis of multiple bands observed in Southern blot analysis of maize (Frisch et al., 1991) and in different cDNA

clones of wheat (Kaneko et al., 1990). However, except for wheat (Kaneko et al., 1990), the biochemical data indicate the existence of a single form of DHPS in plants. A single-copy status has also been suggested for *Nicotiana sylvestris* (Ghislain et al., 1995). The different isoforms/cDNAs characterized in *Triticum aestivum* (Kaneko et al., 1990) and the nucleotide sequence divergence between the cDNA and the incomplete genomic clones in *Nicotiana tabacum* (Ghislain et al., 1995) have been attributed to their respective allotetraploid and allohexaploid natures. Since *Sorghum vulgare* is not polyploid, the reason for the duplicated bands observed here is unknown.

DHPS is expressed in vegetative tissues of Coix and maize

DHPS is under developmental and organ-specific regulation at the transcriptional level, as evidenced by the RNA gel blot analysis of several tissues (Fig. 4). In agreement with their constitutive role, i.e., supplying amino acids to developing tissues, the expression of genes encoding the enzymes of the aspartate family has been found to be particularly active in rapidly growing tissues (Samach et al., 1991; Grant and Bevan, 1994; Galili, 1995; Singh and Shaner, 1995; Samach et al., 1995; Zhu-Shimoni et al., 1997). Unexpectedly for such a young and fast growing organ, we detected extremely low levels of DHPS transcripts in the 5-8 cm-long leaf blades from *Coix* and maize (Fig. 4). DHPS expression in leaves may be restricted to specific regions, so that its detection may be difficult when RNA of the entire leaf blade is analyzed. DHPS expression was also reduced in roots (Fig. 4). The *A. thaliana* AK/HSD gene also seems to be expressed to a lesser extent in the roots of transgenic tobacco plants when compared to other tissues (Zhu-Shimoni et al., 1997). This suggests that the operation of the aspartate pathway may not be essential in roots.

The aspartate pathway has been shown to be located in chloroplasts and probably in the plastids of non-green tissues (Wallsgrave and Mazelis, 1980). We found that DHPS gene transcription was not significantly reduced when *Coix* and maize seedlings were deprived of light (Fig. 4). This observation is in agreement with the transcriptional activity of the DHPS gene and lysine biosynthesis occurrence in several non-green tissues, suggesting that the enzyme is located predominantly in plastids rather than in chloroplasts.

Developmental expression of DHPS in *Coix* and maize seeds

In maize seeds, DHPS expression was consistently higher in embryos than in endosperms, as previously reported by Frisch et al. (1991). It is interesting that in maize, and more so in *Coix* endosperms, DHPS expression was higher at the beginning of seed development and decreased as maturation proceeded. This suggests that DHPS may be important at the onset of endosperm development, when the rate of lysine incorporation into lysine-containing proteins is maximal (Arruda and da Silva, 1983). However, lysine is also required at intermediate stages of endosperm development, when protein synthesis is maximal (Arruda and da Silva, 1983). Although most of the proteins synthesized in the endosperm are prolamins, which are devoid of lysine (Shewry and Tatham, 1990), it would be reasonable to expect higher DHPS expression at intermediate stages of endosperm development in order to supply the lysine demand for the synthesis of lysine-containing proteins. Such situation was not observed either for maize or *Coix* (Figs. 5 and 6). It is possible that lysine may be supplied to the endosperm from the embryo since the DHPS expression in embryos is maintained at relatively high levels throughout seed maturation (Figs. 5 and 6).

Another possibility is that the amount of lysine translocated to the developing kernel may be enough to supply more than twice the requirement for protein synthesis (Arruda and da Silva, 1983). The translocated lysine could accumulate, at least transiently, until degraded by lysine-ketoglutarate reductase (Arruda e da Silva, 1983). Such an accumulation could repress transcription of the DHPS gene in endosperm cells. Consequently, the higher levels of free lysine resulting from the lower activity of lysine keto-glutarate reductase in *opaque2* endosperms (Brochetto-Braga et al., 1992) may contribute to the slight reduction in DHPS expression seen in the latter compared to their normal counterparts (Fig. 6).

Regulation of DHPS gene expression

The 5' flanking region of the *Coix DapA* gene contains a sequence that strongly resembles the *S. cerevisiae* GCN4 DNA-binding element. In yeast, the GCN4 basic domain/leucine zipper (bZIP) transcription factor regulates the expression of genes encoding the enzymes of amino acid metabolism in response to amino acid starvation (Hinnebusch, 1988). Interestingly, a GCN4-like element is present in the *Arabidopsis* AK/HSD gene (Ghislain et al., 1994), and its deletion severely decreased the activity of the AK/HSD promoter in transgenic tobacco plants (Zhu-Shimoni et al., 1997). O₂ binds to GCN4-like elements in the promoters of genes encoding several proteins (Lohmer et al., 1991; de Pater et al., 1994; Yunes et al., 1994; Holdsworth et al., 1995; Maddaloni et al., 1996). However, the *Coix DapA* gene, despite bearing a GCN4-like element in its 5' flanking region, is probably not directly regulated by O₂, since the RNA gel blot analysis revealed that its transcription in *opaque2* endosperms was reduced compared to that in normal endosperms (Fig. 6), but not to the same extent

as observed for genes regulated by O₂.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. David A. Frisch (University of Minnesota, St. Paul, USA) and Dr. Brian A. Larkins (University of Arizona, Tucson, USA) for kindly supplying the maize DHPS cDNA clone pZM DHPS5 and 28S rRNA clone pZM28S-19, respectively. We also thank Dr. José A. Yunes for critical reading of the manuscript and Berenice Rosa and Pedro Maurício for their excellent technical assistance.

Received ; **accepted** .

LITERATURE CITED

- Arruda P, da Silva WJ** (1983) Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize: its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* **22**: 2687-2689
- Azevedo RA, Arruda, P, Turner, WL, Lea, PJ** (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**: 395-419
- Brinch-Pedersen H, Galili G, Knudsen S, Holm PB** (1996) Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **32**: 611-620
- Brochetto-Braga MR, Leite A, Arruda P** (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate in normal and *opaque-2* maize endosperms. *Plant Physiol* **98**:1139-1147
- Bryan JK** (1990) Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. *In* BJ Mifflin, PJ Lea, eds, *The Biochemistry of Plants*, Vol 16. Academic Press, London, pp 161-195
- Bucher P** (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* **212**: 563-578
- Cord Neto G, Yunes JA, Silva MJ da, Vettore AL, Arruda P, Leite A** (1995) The involvement of Opaque 2 on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol Biol* **27**:

1015-1029

- de Pater S, Katagiri F, Kijne J, Chua N-H** (1994) bZIP proteins bind to a palindromic sequence without an ACGT core located in a seed specific element of the pea lectin promoter. *Plant J* **6**: 133-140
- Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P** (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology* **13**: 577-582
- Fourney RM, Miyakoshi J, Day III RS, Paterson MC** (1987) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* **10**: 5-7
- Frankard V, Ghislain M, Jacobs M** (1992) Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* **99**: 1285-1293
- Frisch DA, Tommey AM, Gegenbach BG, Somers DA** (1991) Direct selection of a maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia coli DapA* auxotroph. *Mol Gen Genet* **228**: 287-293
- Galili G** (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* **7**: 899-906
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs M** (1990) Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris*, a chloroplast-localized enzyme of the lysine pathway. *Planta* **180**: 480-486
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs M** (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* **8**: 733-743
- Ghislain M, Frankard V, Vandenbosche D, Matthews BJ, Jacobs M** (1994) Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene

from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol **24**: 835-851

Glassmann KF (1992) A molecular approach to elevating free lysine in plants. In BK Singh, HE Flores, JC Shannon, eds, Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 217-228

Grant M, Bevan MW (1994) Asparaginase gene expression is regulated in complex spatial and temporal patterns of nitrogen-sink tissues. Plant J **5**: 695-704

Hanley BA, Schuler MA (1988) Plant intron sequences: evidence for distinct groups of introns. Nucleic Acids Res **16**: 7159-7176

Hinnebusch AG (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev **52**: 248-273

Holdsworth M, Munõz-Blanco J, Hammond-Kosack MC, Colot V, Schuch W, Bevan MW (1995) The maize transcription factor Opaque-2 activates a wheat glutenin promoter in plant and yeast cells. Plant Mol Biol **29**: 711-720

Joshi CP (1987) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. Nucleic Acids Res **15**: 9627-9649

Kaneko T, Hashimoto T, Kumpaisal R, Yamada Y (1990) Molecular cloning of wheat dihydrodipicolinate synthase. J Biol Chem **265**: 17451-17355

Laber B, Gomis-Rüth FX, Romao MJ, Huber R (1992) *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase. Identification of the active site and crystallization. Biochem J **288**: 691-695

Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Di Fonzo N, Hartings H, Salamini F, Thompson

- RD** (1991) The maize regulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the *b-32* gene. *EMBO J* **10**: 617-624
- Maddaloni M, Donini G, Balccni C, Rizzi E, Gallusci P, Forlani F, Lohmer S, Thompson R, Salamini F, Motto M** (1996) The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Mol Gen Genet* **250**: 647-654
- Mauri I, Maddaloni M, Lohmer S, Motto M, Salamini F, Thompson RD, Martegani E** (1993) Functional expression of the transcriptional activator *Opaque-2* of *Zea mays* in transformed yeast. *Mol Gen Genet* **241**: 319-326
- Negrutiu I, Cattoir-Reynearts A, Verbruggen I, Jacobs M** (1984) Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris* (Spegazzini and Comes). *Theor Appl Genet* **68**: 11-20
- Perl A, Shaul O, Galili G** (1992) Regulation of lysine synthesis in transgenic potato plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant Mol Biol* **19**: 815-823
- Prescott A, Martin C** (1987) Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Mol Biol Rep* **4**: 219-224
- Quandt K, Frech K, Karas HY, Wingender E, Werner T** (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**: 4878-4884
- Rivin CJ, Zimmer EA, Walbot V** (1982) Isolation of DNA and DNA recombinants from maize. *In* Sheridan WF, ed, *Maize for Biological Research*. University Press,

Grand Forks, pp 161-164

- Samach A, Broday L, Hareven D, Lifschitz E** (1995) Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *Plant J* **8**: 391-406
- Samach A, Hareven D, Gutfinger T, Ken-Dror S, Lifschitz E** (1991) Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure and upregulation in floral organs. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2678-2682
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Shaul O, Galili G** (1992) Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant J* **2**: 203-209
- Shaul O, Galili G** (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **23**: 759-768
- Shaver JM, Bittel DC, Sellner JM, Frisch DA, Somers DA, Gegenbach, BG** (1996) Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1962-1966
- Shewry PR, Tatham AS** (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J* **267**: 1-12
- Silk GW, Matthews BF** (1997) Soybean *DapA* mutations encoding lysine-insensitive dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **33**: 931-933
- Silk GW, Matthews BF, Somers DA, Gegenbach BG** (1994) Cloning and expression

of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **26**: 989-993

Singh BK, Shaner DL (1995) Biosynthesis of branched chain amino acids: from the test tube to field. *Plant Cell* **7**: 935-944

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting: positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680

Tzchori IB-T, Perl A, Galili G (1996) Lysine and threonine metabolism are subject to complex patterns of regulation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **32**: 727-734.

Vauterin M, Jacobs M (1994) Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Mol Biol* **25**: 545-550

Wallsgrrove RM, Mazelis M (1980) The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. *FEBS Lett* **116**: 189-192

Yunes JA, Cord Neto G, Silva MJ, Leite A, Ottoboni LMM, Arruda P (1994). The transcriptional activator Opaque2 recognizes two different target sequences in the 22kDa-prolamin genes. *Plant Cell* **6**: 237-249

Zhu-Shimoni JD, Lev-Yadun S, Matthews B, Galili, G (1997) Expression of an aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers and developing seeds. *Plant Physiol* **113**: 695-706

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Coix* DHPS genomic clone gCXDHPS-1. 5' and 3' flanking regions and introns are represented in lower case letters and exons in uppercase letters. Deduced amino acids are in bold uppercase letters and are aligned with the second nucleotide of their respective codons. Numbering is based on the DNA sequence and the first nucleotide of the translation start codon is considered to be position 1. A putative TATA box, cap site and a GCN4-like responsive element at the positions -138, -177 and -372, respectively, in the 5' flanking region, and a polyadenylation signal in the 3' flanking region are boxed.

Figure 2. Alignment of the amino acid sequences of plant DHPS proteins. The sequences were deduced from the *Coix* genomic clone gCXDHPS-1 (this paper) and from the cDNA clones of maize pZM DHPS5 (Frisch et al., 1991), wheat pDA17 and pDA26 (wheat-17 and wheat-26, respectively, from Kaneko et al., 1990), *Arabidopsis* (Vauterin and Jacobs, 1994), tobacco NT (Ghislain et al., 1995), poplar (Vauterin and Jacobs, 1994) and soybean pUC18DS (Silk et al., 1994). The sequences were aligned using CLUSTAL W and applying Dayhoff's PAM 250 matrix (Thompson et al., 1994). The sequence alignment and numbering are limited to the mature DHPS proteins, which start at the Ala residues marked with a vertical arrow. Only minor manual alignment were made in the chloroplast transit peptide sequences. Identical and similar amino acids are indicated by asterisks and dots, respectively. The region delimited by the horizontal arrows indicates the feedback inhibition site (FIS) and the K

residue marked with a vertical arrow indicates the pyruvate binding site (PBS).

Figure 3. Structure of the *DapA* gene in *Coix*, maize and sorghum. **A**, representation of the gCXDHPS-1 clone structure, partial restriction map and region-specific probes. The arrow represents the open reading frame encoding DHPS and the gray boxes represent the introns. Only the restriction sites used for genomic DNA digestion and for obtaining 5' and 3' region-specific probes are shown. The blank bar corresponds to 1 Kb and black bars to the 5' and 3' region-specific probes. Ten micrograms of *Coix* (C), maize (M) and sorghum (S) genomic DNA were digested with *EcoRI* (**B**) and *EcoRV* (**C**), electrophoresed, blotted and probed successively with the full-length maize DHPS cDNA (cDNA) and the probes derived from the gCXDHPS-1 clone specific for the 5' and 3' regions shown in **A**. kb, molecular weight standard, in kilobase pairs.

Figure 4. RNA gel blot analysis of DHPS expression in the tissues of *Coix* and maize plants grown in the light or in the dark. Twenty micrograms of total RNA from *Coix* and maize tissues were independently electrophoresed, blotted and hybridized with the fragment corresponding to the maize DHPS cDNA (DHPS). After autoradiography, the membranes were stripped and probed with a maize 28S rRNA clone (rRNA). End, endosperm (20 DAP in *Coix* and 25 DAP in maize); Emb, embryo (20 DAP in *Coix* and 25 DAP in maize).

Figure 5. RNA gel blot analysis of DHPS expression in *Coix* embryos and endosperms during seed development. Total RNA was analyzed as described in Figure 4. End,

endosperm; Emb, embryo. Numbers indicate DAP.

Figure 6. RNA gel blot analysis of DHPS expression in maize embryos and endosperms during the development of normal and *opaque2* kernels. Total RNA from both genotypes were analyzed simultaneously as described in Figure 4. Seed, whole kernel; End, endosperm; Emb, embryo. Numbers indicate DAP.

gggaagtcaaccagtagtttatctgttttttttagagcagtaaggaaatggaagcgggattatgtgaagcataataaacacatcgcc -885
acactgggggaagtcaaccaaattgtttatctgttttttttagagaccagcttagaacgcgcgcacacataacctcttaga -800
agttatgagcacctccaaaaaccagagttggacaacaaactcttgagattgacgaataaccacatagatctacgaaatgcgaa -715
cactcggttcagctcagggagcttaaacccgggttttggcattatctaccacaaaggaagctaacaggctgagctacgcttaagttggg -630
gtgagagcatctccaaacggttttgcataaacctttgctattctgtttttgccaaaaagcttaaaacttaccatcaacggttt -545
ggcaaatgagcttggcatttttagcaacttggcaaaactctgggtgatatttgcataatgccaagccgcggttgcgttgcattg -460
ccttgcgtgctactcccgccgggtattttacctctgcgcgcacaaatttttagttttgccaagctctaaatgcaaaaccattggag -375
attgactgctttttacctttgccataataatttgagagttggcaataaccattatttggccaacaaaattgcaaaaccggttggag -290
ttgctctgagaaaacaattatctccgtcggtataatgttgcgggaaaccagtagtttaagagagaagatggccggggctcaaattctc -205
gattgagctgggaatgacggaagaagggccggagggaataagaccccaagctgacgctctgagggcccaagggcccgactagta -129
tccctcaaaagtctcgaaacgaacctagccgcgcgtacacagcgccgagagcattgtctagctgaactcctgtctaccagccagc -35
cgaccacgcccctctccgtgctccggccattccccATGATTCCCCCGGATGACGACGAATCTCCTCCGGCTCGGACGATCTCC 5
M I S P R M T T N L L P A R T I S
CTTGTCTCAAATGGCGGCGCAGCGACGGCGAGCCCTCTTCTCCCTCGGTGGCCGACGGCCACGGCGACCCTCTTCAGGgtatg 136
L V S N G G A A T A S P S S P S V A A R P R R P S S G
tatacctacacgggtctcgttcccatctactcttttccgtaatcgggctcttctatcggttacctcgtgttcttgcgaattat 221
cgattggattctctaccatctatgatattcttagtcgtgtcaaatttgtcgtgctttttgttcagtcaaatatggtcaaaccca 306
tggcgacagctacattttcttcttcttggaaagatactattttcgaaagcttggattgggtgaccgaagatacatgaattcaggac 391
taattgggcagtggtggacctaggattttatcacaggatattgcggacaattttttatataaagtcgataaaatcatattccgat 476
ttggtataaacacgctgctataaataaacatggttaaaactttaaattcaaaagttaagctcggcgcaaaaacgcatataaa 561
agtttaaaataaaataaagtgtggaaataaaccaataaaataaaaggaagatattatatttgcattctaaatttttagaag 646
acacaagaaaatgaatttttaagatgggtttctatattgctattataaagtataataaaatgaataccaaaatttatatcatatat 731
atagtttataatatttgagaggggatacaaaaataaaataaaactactgcacaacagtggaataatggaaaataaagaattcaaa 816
ctactcggaaaacgtggaaaagaaaaataaagaataagaatacaaaaatagcacaacactgagaatggaaacttgcaatctattgc 901
ttactaattcaaaaggcttttaaccttctgggaagagagctgatagtatgagtgcaactttttttatcgaagggaaaaataata 986
aagtgttaagtacacgactgcggcacaagatattgttggacacgcctactctgtgggtgcggctctaaagtggggaga 1071
attcattgtgtccatctcttcttcagtatctctgtacttgcgtcacaatttttgcaggaggtggcatgaatttttattctactta 1156
ccattctgcaatcatctcttgcctccaaactatttggtacttgtgcagGACTGGCAGAGGGAAGGTTCTTGCCATCACTCTAGATG 1241
T G R G K V S A I T L D
ATTATCTTCCAATGCGAAGTACTGAAGTGAAGAACCGGtaacttgttatttctaaaagacgctgacaataatttatctgtatt 1326
D Y L P M R S T E V K N R
tttggtagtgaaacccggtactgttttttcttaaaagaacgctgacaataatttatctgtatttttggtagcatttttaact 1411
ttatgccactgaacaagatgtgagttttgttgatcgctgtgtgactcttagattgactgaactaactaaacttttttttctt 1496
attctagccctcaatttttgcgaattgttataaaatttaatacacactgggaaaaaaactccatttagacagcctctcgttggat 1581
attggagccagcctttcccatattccaaattcctttagcaacagatgtaattgatccttgttgccttagataagccttgggtgaaga 1666
catagctagcttgaatgatttaaatggctcgttttaggcttagatagctcagacagctcaggccttagtggaagttaagcttgg 1751
cgtggaagaatcatttactcaatagagttaacataatagctgtttatttcgttaagctacgttggaaacttccctaattatgtt 1836
aaatcagaattttgttctaggtattacaaacacccgagctgacgaaaaaactagtcagaagaagttaaaatgtgaattcgttctatg 1921
gataagaatattgataaaatattgcttgggttttataaagacacttgtagtctatttgaagtttggcttcttctaagcaagcatcc 2006
tgtacattctttggtaactgcagttggttagctcagtagtcaagtgcatcttactgtttctcacaagattttgaaggttttgatt 2091
gagttatctctcgtcgttggctcgtacttccctctgtctgagatacagAACATCAACAGATGACATCAACAGTCTGAGATTATTC 2176
T S T D D I T S L R L I T
AGCTGTCAAACCCCTTATTGCGCTGATGGAGAAATTCGATCTGGAAGCAATGATTTCTCTATAAACTGCAGATAGAGGGTGGT 2261
A V K T P Y P L D G R F D L E A Y D S L I N M Q I E G
GCTGAAGGTGTAATAGTTGGAGGAACAACAGGAGAGGGTCACTGATGAGCTGGGATGAACATCATGCTCATTGGGCATACTG 2346
A E G V I V G G T T G T E G H L M S W D E H I M L I G H T
TGAAGCTGCTTGGCTCTAGAATTAAAGTGATAGGCAACAGGAAGTAACCTCAACGAGAGAAGCTGTCACGCAACAGAGCAGGG 2431
V N C F G S R I K V I G N T G T S N S T R E A V H A T E Q G
ATTTGCTGTTGGCATGCATGCAGCTCTCCACATCAATCCTTACTATTGGGAAGACCTCAACTGAGGAATGATTCTCATTTGAG 2516
F A V G M H A A L H I N P Y Y G K T S T E G M I S H F E
TCTGTCTCTCCAATGGGTCCGACCATCATACAACTGCCATCGCAGGATGCCAGGATATCCCTCCTGAGGTTATTGTAGCAA 2601
S V L P M G P T I I Y N V P S R S A Q D I P P E V I V A
TTTCAGGCTATATAAACATGGCAGGTGTCAAGGAATGCATTGGGCACGAGAGGATCAAGCACTATGCTGACAAAGGTATAACAAT 2686
I S G Y I N M A G V K E C I G H E R I K H Y A D K G I T I
TTGGAGCGGTAAAGCAGCAATGCCATGATTCTAGGTGGAAATATGGTGCTACTGGAGTAATTTCTGTACTGACCAACTGTGT 2771
W S G N D D E C H D S R W K Y G A T G V I S V T S N L V
CCTGGGCTCATGCACGCCCTCATGTACAAAGGCGGAGAACCGGGTGCTGAAAGAGAAGCTGCTGCCCTGATGAAATGGTTGTCT 2856
P G L M H S L L M Y K G E N A V L K E K L L P L M K W L F
GCCAACCAAAATCCGATTGCTCTCAACACTGCTCTGGCTCAGCTCGGCGGTGGCAAGGCGTCTTTCAGACTGCCATATGTTCCACT 2941
C Q P N P I A L N T A L A Q L G V A R P V F R L P Y V P L
TCCTCTTGAAAAGAGGGCCGAGTTCGTCCGGATTGTTGAGGCTATTGGACGGGAGAATTTTGTGGGACGAAAAGAGACCCGAGTT 3026
P L E K R A E F V R I V E A I G R E N F V G Q K E T R V
CTCGATGATGACGATTTCTGTTTGTATCAGTAGGTATAGGaaagtgtgtattttgggtgaataaactgtagtttgcatttcggt 3111
L D D D D F V L I S R Y -
tacaagcttctgtcttcttctcgtcgttttttctacctataaaataaatggccctagcctgcattgtataatgtatttatcgt 3196
ttatagttttagactcattgaattgacctaggtgacatgaaaaataaatt 3243

↓

Coix	---MISPRMTTNLLPARTISLVNNGGAATASPSPPSVAAR---PRRPSSG---TGRGKVS---AITLDDYLPMRSTEVKNRTSTDD	23
maize	---MISP---TNLLPARKITPVSNNGGAATASPSPPSVAAR---PRRLPSGLQSVTGRGKVSAAITLDDYLPMRSTEVKNRTSTDD	
wheat-17	MPYLQPPRPHPHPHPTSRLSRASPPSPFFPPFAGTSRSGRLQVPVPSGHSASRVSKGFVAVAVTLDDYLPMRSTEVKNRTSTDG	
wheat-26	-----MMAAQPTANPGVRLGWKAPGALASPPRLALSRS---AAAPLASH---RVGRGKFSAAAITDDYLPMRSTEVKNRTSVDG	
Arabidopsis	-----MSALKNYGLISIDSLHFPNQLQS-----YKR-NAKVVSPIAAVPNFHLPMRSLDKNRTNTDD	
tobacco	-----MSSSIIGR---CHEVADSIIEAAGT-----KRRTRWRSPRAAVIPSFHLPMSRNEVKNRTFADD	
poplar	-----MAAMKSYMCSRESLDLHFFHNCDVN-----YKRRSGKWRPPQAQVKNLHLPMSRFEVKNMTSAED	
soybean	-----AVKPNFHLPMRSEFELKNRTSPED	

*

→ FIS

Coix	ITSLRLITAVKTPYLPDGRFDLEAYDSLINMQIEGGAEGVIVGGTTGEGHLSWDEHIMLIGHTVNCFGSRIKVI GNTGSNSTRE	108
maize	ITRLRLITAVKTPYLPDGRFDLEAYDSLINMQIEGGAEGVIVGGTTGEGHLSWDEHIMLIGHTVNCFGSRIKVI GNTGSNSTRE	
wheat-17	IKSLRLITAVKTPYLPDGRFDLEAYDSLINTQINGGAEGVIVGGTTGEGHLSWDEHIMLIGHTVNCFGANIKVI GNTGSNSTRE	
wheat-26	IKSLRLITAVKTPYLPDGRFDLEAYDSLINTQINGGAEGVIVGGTTGEGHLSWDEHIMLIGHTVNCFGTNIKVI GNTGSNSTRE	
Arabidopsis	IRSLRVITAIKTPYLPDGRFDLQAYDDLVTNQTENGAEVIVGGTTGEGQLMSWDEHIMLIGHTVNCFGRIKVI GNTGSNSTRE	
tobacco	IKALRLITAIKTPYLPDGRFDLEAYDTLVNLQIENGAEVIVGGTTGEGQLMSWDEHIMLIGHTVNCFGGSIKVI GNTGSNSTRE	
poplar	MKSLRLITAIKTPYLPDGRFDLEAYDALVNMQIANGAEVIVGGTTGEGQLMSRDEHIMLIGHTVNCFGSSI KVI GNTGSNSTRE	
soybean	IKALRLITAIKTPYLPDGRFDLEAYDDLVMNQIQGAEGVIVGGTTGEGQLMSWEEHILIAHTVNCFGGKI KVI GNTGSNSTRE	

*

←

↓PBS

Coix	AVHATEQGFVGMHAALHINPYGKTSTEGMISHFESVLPMPGPTIIYNVPSRSAQDIPPEVIVAISGYINMAGVKECIGHERIKH	193
maize	AVHATEQGFVGMHAALHINPYGKTSAGMISHFEAVLPMGPTIIYNVPSRSAQDIPPEVILAISGYTNMAGVKECVGHERVKH	
wheat-17	AVHATEQGFVGMHAALHVNPNPYGKTSTEGLSHFKEVLPMPGPTIIYNVPSRTSQDIPPPVIEALSSYNMAGVKECVGHERVKC	
wheat-26	AIHASEQGFVGMHAALHVNPNPYGKTSTAGLSHFDEVLPMPGPTIIYNVPSRTGQDIPPAVIEALSTYPNMAGVKECVGHERVKC	
Arabidopsis	AIHATEQGFAMGMHAGLHINPYGKTSIEGMAHNFQTVLHMGPPTIIYNVPGRTQDIPPPQVIFKLSQNPNMAGVKECVGNRRVEE	
tobacco	AIHATEQGFVGMHAALHINPYGKTSLEGLISHFESVLPMPGPTIIYNVPSRTGQDIPPRVIQTMAKSPNLAGVKECVGNDRVEQ	
poplar	AIHATEQGFVGMHAALHINPYGKTSVEGMVSHFDSVLPMPGPTIIYNVPGRTGQDIPPRVIHTIAQSPNLAGVKECAGNDRVEQ	
soybean	AIHATEQGFVGMHAALHINPYGKTSLDGMVAHFRSVLSMGPTIIYNVPARTGQDIPPHVIQTLAESVNLAVGKECVGNDRIRKQ	

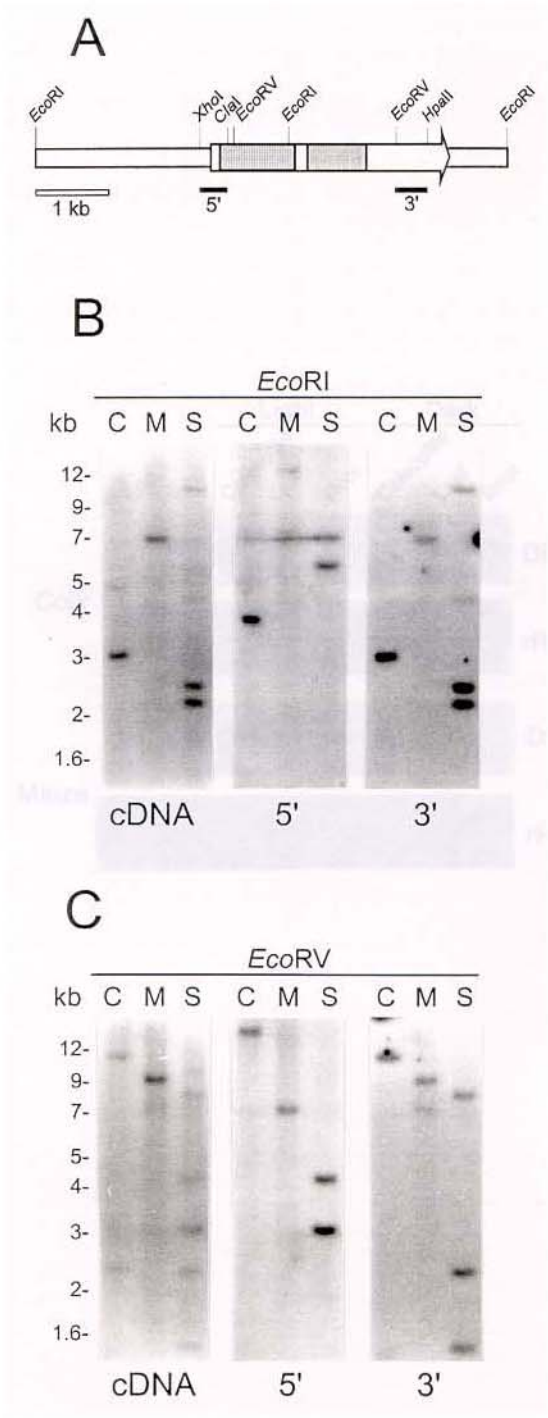
*

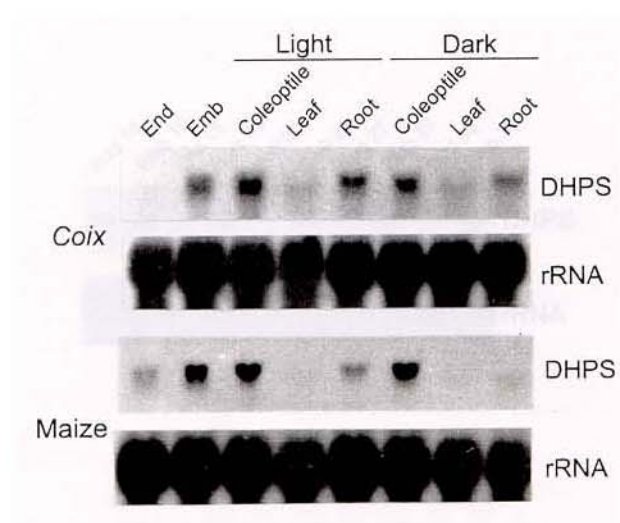
Coix	YADKGITIWSGNDDECHDSRWKYGATGVISVTSNLVPLGLMHSMLYKGENAVLKEKLLPLMKWLFQCPNPIALNTALAQLGVARPV	278
maize	YADKGITIWSGNDDECHDSKWKHGATGVISVTSNLVPLGLMHSMLYKGENATLNEKLSPLMKWLFQCPNPIALNTALAQLGVARPV	
wheat-17	YTDKGITISGNDDECHDSRWKYGATGVISVASNLVPLGLMHSMLFEGENAAALNEKLLPLMKWLFCEPNPIGLNTALAQLGVVRPV	
wheat-26	YTDKGITISGNDDECHDSRWKYGATGVISVTSNLVPLGLMHSMLFEGENAAALNEKLLPLMKWLFSEPNPIGLNTALAQLGVVRPV	
Arabidopsis	YTEKGIVVWSGNDQCHDSRDWHDGATGVISVTSNLVPLGLMRLMFEGRNSALNEKLLPLMDWLFQEPNPPIGNVNTALAQLGVARPV	
tobacco	YTDGIVVWSGNDDECHVSRWYDYGATGVISVTSNLVPLGLMRLMFGGKNPALNSKLMPLMEWLFHEPNPIALNTALAQLGVVRPV	
poplar	YTDKGIVVWSGNDQCHDARWNHGATGVVSVTSNLVPLGLMRLMFEGRNTELSKLLPLIDWLFQDRNPPIALNTALAQLGVVRPV	
soybean	YTDGIVVWSGNDQCHDARWYGATGVVSVASNLVPLGLMRLMFGGVNPTLNSKLLPLIDWLFHMPNPPIGLNTALAQLGVIRPV	

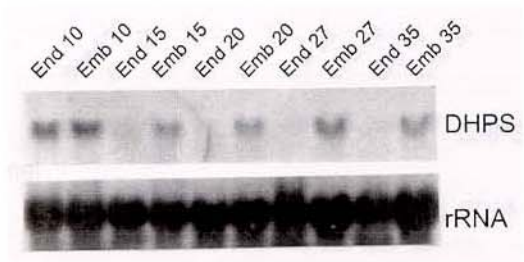
*

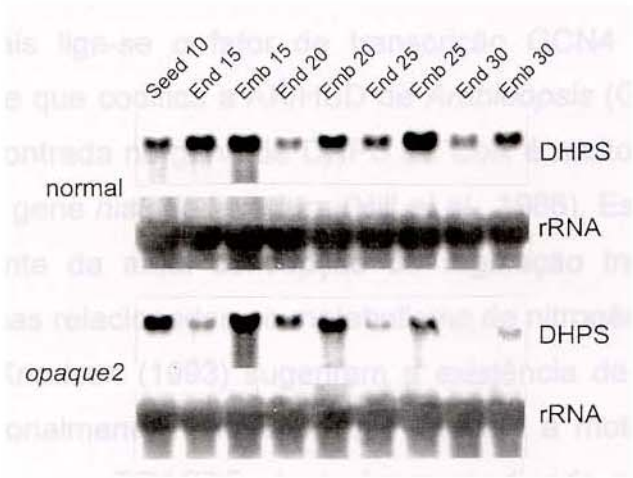
Coix	FRLPYVPLPLEKRAEFVRIVEAIGRENFVGQKETRVLDLDDDFVLISRY-	327
maize	FRLPYVPLPLEKRAEFVRIVESIGRENFVGQKEAQVLDLDDDFVLISRY-	
wheat-17	FRLPYTLPLEKRVFVRIVEAIGRENFVGQKESRVLDLDDDFVLISRY-	
wheat-26	FRRPYAPLSLEKRTFVRIVEAIGRENFVGQKEVRVLDLDDDFVLISRY-	
Arabidopsis	FRLPYVPLPLSKRIEFVKLVKEIGREHFVGDRDQVLDLDDDFILIGRY-	
tobacco	FRLPYVPLTKAKREEFVKIVKEIGRENFIGERDVQILDNDFILVGRY-	
poplar	FRLPYVPLPSAQRVEFVNLVKKIGRENFVGEEDVQVLEDDDFILIRLC	
soybean	FRLPFVPLPVDKRIEFANLVKEIGREHFVGKNVVEVLDLDDDFVLISRY-	

*









DISCUSSÃO* E PERSPECTIVAS

A comparação das sequências de aminoácidos deduzidas de DHPS de plantas revelou que as proteínas de milho e *Coix* apresentaram a maior identidade entre todas, o que não surpreende tendo em vista a maior proximidade filogenética entre as duas espécies (Clayton, 1973; 1983; Jain e Benerjee, 1974). Esta alta identidade refletiu-se consistentemente na estrutura do *locus DapA* e na abundância e padrão de distribuição dos transcritos que codificam a enzima.

O sequenciamento do gene da DHPS de *Coix* revelou a existência no seu promotor de uma sequência de DNA semelhante àquela encontrada em genes de levedura as quais liga-se o fator de transcrição GCN4 e também encontrada no promotor do gene que codifica a AK/HSD de *Arabidopsis* (Ghislain *et al.*, 1994). Ainda, a sequência encontrada no gene de DHPS de *Coix* é muito similar a sequência a qual GCN4 liga-se no gene *his3* de levedura (Hill *et al.*, 1986). Estas constatações são muito convidativas diante da atual concepção de regulação transcricional de genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio em plantas.

Müller e Knudsen (1993) sugeriram a existência de uma família de fatores de transcrição funcionalmente homólogos que ligariam a motivos "GCN4-like", contendo sequências similares a TGACTC, desta forma mediando a resposta ao nitrogênio em plantas. Foi constatada que uma relação extensa de genes de plantas possuem tais elementos, em diversos graus de similaridade e muitos com comprovada atividade no controle da expressão gênica (Müller e Knudsen, 1993).

Um candidato pertencente a esta família é a proteína Opaco2 de milho, que liga-se a um elemento TGACTC em levedura (Mauri *et al.*, 1993) e é capaz de regular diversos genes de plantas através de elementos "GCN4-like". Entre estes genes constam aqueles que codificam uma α -coixina (Yunes *et al.*, 1994), uma glutenina de baixo peso molecular (Holsworth *et al.*, 1995), a ortofosfato diquinase citosólica (Maddaloni *et al.*, 1996) e uma lectina de ervilha (de Pater *et al.*, 1994).

*Uma vez que os resultados experimentais estão discutidos na seção pertinente do manuscrito, aqui são abordados aspectos mais gerais

Diante disto e do maior teor de lisina do mutante *opaco2* (Mertz *et al.*, 1964), levantamos como hipótese a possibilidade do mutante *opaco2* apresentar significativas alterações na expressão do gene da DHPS e da sequência “GCN4-like” presente no promotor deste ser funcional em relação à proteína Opaco2. Contudo, os resultados indicam que nenhuma das suposições é verdadeira, uma vez que observamos apenas uma pequena diminuição da transcrição do gene em endospermas *opaco2* e a ausência de ligação da O2 à sequência TGACTC do gene *DapA* de *Coix*.

Estas observações sugerem que um dos fatores fundamentais para o maior teor de lisina no mutante *opaco2* parece ser o seu diminuído catabolismo deste aminoácido, como já previamente caracterizado (Sodek e Wilson, 1970; Arruda e da Silva, 1979b; 1983; Brochetto-Braga *et al.*, 1992), ao invés de maior síntese.

Recentemente, Müller *et al.* (1997) demonstraram que os genes das α -zeínas de 22 kD e b-32 respondem positivamente a estímulos hormonais e de nutrição nitrogenada em cultura de endosperma *opaco2 in vitro*. Além disso, a resposta positiva do promotor da α -zeína de 22 kD à suplementação com aminoácidos é mediada por elementos *in cis* reconhecidos pela O2 no endosperma normal. Portanto, presumivelmente, um fator adicional com propriedades similares àsquelas observadas em O2 é responsável por tais respostas, o que explica o aumento da transcrição em resposta ao nitrogênio, mesmo no endosperma mutante, de genes normalmente regulados pela O2.

Apesar do sítio “GCN4-like” no gene *DapA* de *Coix* não ter sua funcionalidade comprovada, é possível que no endosperma de milho outros fatores de regulação transcricional, como os aventados acima, possam fazê-lo. Também os genes que codificam as enzimas biossintéticas da família do aspartato são expressos de maneira muito variável, porém quase constitutiva, em diversos tecidos de plantas (Samach *et al.*, 1991; 1995; Zhu-Shimoni *et al.*, 1997; este estudo). Portanto, fatores de transcrição diversos presentes nestes vários tecidos, mas possivelmente relacionados estruturalmente e regulados por estímulos comuns, devem ter papel importante na regulação de tais genes.

Com a disponibilidade de um clone genômico codificando DHPS de plantas, abre-se a possibilidade da dissecação dos mecanismos que controlam a sua regulação

a nível transcricional, abordagem ainda incipiente em se tratando da via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato. De fato, dentre as principais enzimas relacionadas a biossíntese de lisina, somente um gene que codifica a AK/HSD foi caracterizado e funcionalmente analisado em dicotiledôneas (Ghislain *et al.*, 1994; Zhu-Shimoni *et al.*, 1997). Contudo, esta análise realizada até o presente não definiu os elementos *in cis* relacionados ao controle de sua expressão, tampouco ativadores transcricionais que interagiriam com estes. Ademais, permanecem ainda por ser caracterizados estímulos ambientais envolvidos com a expressão destes genes, bem como o padrão de localização *in situ* de seus mRNAs e proteínas, o que deve acontecer nos próximos anos.

CONCLUSÕES

(i) Foram sequenciados 4,2 kb de um clone genômico do gene *DapA* que codifica a enzima DHPS de *Coix lacryma-jobi*, constituindo a primeira caracterização de um clone genômico deste gene em plantas. Esta sequência contém toda a região estrutural do gene além de 969 e 183 pb das regiões flanqueadoras 5' e 3', respectivamente. A região estrutural do gene contém 3.062 pb e é interrompida por dois introns de 1.072 e 859 pb.

(ii) A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene revela uma alta identidade com sequências deduzidas de DHPS de outras plantas, em especial as de trigo e milho.

(iii) Na região flanqueadora 5' do gene *DapA* de *Coix* foram identificados possíveis sinal "cap", TATA "box" e um elemento similar ao sítio de ligação do fator de transcrição de levedura GCN4, respectivamente a 138, 177 e 372 pb do início de tradução. Este último está presente também no gene que codifica a enzima AK/HSD de *Arabidopsis* e atua na regulação da transcrição de diversos genes de plantas. Na região flanqueadora 3', um possível sinal de poliadenilação é encontrado a 19 pb do codon de terminação.

(iv) A estrutura do gene *DapA* parece ser bastante conservada em monocotiledôneas. Além disso, o gene parece estar presente em cópias únicas em *Coix* e milho mas não em sorgo.

(v) O padrão de expressão do gene *DapA* é similar em *Coix* e milho. O gene é transcricionalmente mais ativo em coleoptiles, embriões e endospermas imaturos e raízes, em ordem decrescente. Sua atividade é muito reduzida em lâminas de folhas jovens. Nos tecidos vegetativos, sua expressão não é muito reduzida na ausência de luz.

(vi) No mutante de endosperma de milho *opaco2*, rico em lisina, a expressão do gene é apenas⁷ levemente diminuída. A proteína Opaco2 muito provavelmente não é responsável direta pela regulação da expressão do gene *DapA* de Coix.

BIBLIOGRAFIA

- Arruda P, da Silva WJ** (1979a) Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry* **18**: 409-410
- Arruda P, da Silva WJ** (1979b) Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochemistry* **18**: 1803-1805
- Arruda P, da Silva WJ** (1983) Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize: its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* **22**: 2687-2689
- Arruda P, Sodek L, da Silva WJ** (1982) Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol* **69**: 988-989
- Azevedo RA, Arana JL, Arruda P** (1990) Biochemical genetics of the interactions of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*1* with opaque-s maize mutant. *Plant Sci* **70**: 81-90
- Azevedo RA, Arruda P, Turner WL, Lea PJ** (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**: 395-419
- Azevedo RA, Smith RJ, Lea, PJ** (1992) Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* **31**: 3371-3374
- Balconi C, Rizzi E, Motto M, Salamini F, Thompson RD** (1993) The accumulation of zein polypeptides and zein mRNA in cultured endosperms of maize is modulated by nitrogen supply. *Plant J* **3**: 325-334
- Barros EG, Takasaki K, Kirleis AW, Larkins BA** (1991) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding γ -kafirin protein from *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol* **97**: 1606-1607
- Bright SWJ, Mifflin BJ, Rognes SE** (1982) Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. *Biochem Genet* **20**: 229-243
- Brinch-Pedersen H, Galili G, Knudsen S, Holm PB** (1996) Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **32**: 611-620
- Brochetto-Braga MR, Leite A, Arruda P** (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate in normal and opaque-2 maize endosperms. *Plant Physiol* **98**: 1139-1147
- Bryan JK** (1980) Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In BJ Mifflin, ed, *The Biochemistry of Plants*, Vol 5. Academic Press, New York, pp 403-452

- Bryan JK, Lissik EA, Matthews BF** (1977) Changes in enzyme regulation during growth of maize. III. Intracellular localization of homoserine dehydrogenase in chloroplasts. *Plant Physiol* **59**: 673-670
- Clayton WD** (1973). The awnless species of Andropogoneae. *Kew Bull* **28**: 49-58
- Clayton WD** (1983). Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae). *Kew Bull* **35**: 813-818
- Cliquet J-B, Deléens E, Mariotti A** (1990) C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by ^{13}C and ^{15}N tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiol* **94**:1547-1553
- Cord Neto G; Yunes JA; Silva MJ da, Vettore AL, Arruda P, Leite A** (1995) The involvement of Opaque 2 on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol Biol* **27**: 1015-1029
- Dalby A, Tsai Y** (1975) Comparison of lysine and zein and non-zein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop Sci* **15**: 513-515
- de Freitas FA, Yunes JA, da Silva MJ, Arruda P, Leite A** (1994) Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafrin gene from sorghum. *Mol Gen Genet* **245**: 177-186
- de Pater S, Katagiri F, Kijne J, Chua N-H** (1994) bZIP proteins binds to a palindromic sequence without a ACGT core located in a seed specific element of the pea lectin promoter. *Plant J* **6**: 133-140
- De Rose RT, Ma DP, Kwon IS, Hasnain SE, Klassy RC, Hall TC** (1989) Characterization of the kafirin gene family from sorghum reveals extensive homology with zein from maize. *Plant Mol Biol* **12**: 245-256
- Dereppe C, Bold G, Ghisalba O, Eber E, Schär H-P** (1992) Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. *Plant Physiol* **98**: 813-821
- Di Fonzo N, Mandocchi L, Salamini F, Soave C** (1986) Purification and properties of a endospermic protein of maize associated with the *opaque-2* and *opaque-6* genes. *Planta* **167**: 587-594
- Esen A** (1986) Separation of alcohol-soluble protein (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol* **80**: 623-627
- Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P** (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biootechnology* **13**: 577-582
- Food and Agriculture Organization** (1988) Production, v 42, FAO, Rome
- Fourney RM, Miyakoshi J, Day III RS, Paterson MC** (1987) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* **10**: 5-7
- Frankard V, Ghislain M, Jacobs M** (1992) Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* **99**: 1285-1293

- Frankard V, Vauterin M, Jacobs M** (1997) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartat kinase. *Plant Mol Biol* **34**: 233-242
- Frisch DA, Gegenbach BG, Tommey AM, Sellner JM, Myers DE, Somers DA** (1991a) Isolation and chararacterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. *Plant Physiol* **96**: 144-452.
- Frisch DA, Tommey AM, Gegenbach BG, Somers DA** (1991b) Direct selection of a maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia coli* *DapA*⁻ auxotroph. *Mol Gen Genet* **228**: 287-293
- Galili G** (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* **7**: 899-906
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs, M** (1990) Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris*, a chloroplast enzyme of the lysine pathway. *Planta* **180**: 480-486
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs, M** (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* **8**: 733-743
- Ghislain M, Frankard V, Vandenbosche D, Matthews BJ, Jacobs M** (1994) Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **24**: 835-851
- Glassmann KF** (1992) A molecular approach to elevating free lysine in plants. In BK Singh, HE Flores, JC Shannon, eds, *Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 217-228
- Grant M, Bevan MW** (1994) Asparaginase gene expression is regulated in complex spatial and temporal pattern of nitrogen-sink tissues. *Plant J* **5**: 695-704
- Habben JE, Kirleis AW, Larkins BA** (1993) The origin of lysine-containing proteins in opaque-2 maize endosperms. *Plant Mol Biol* **23**: 825-838
- Hartings H, Maddaloni M, Lazzaroni N, Di Fonzo M, Salamini F, Thompson R** (1989) The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to trancriptional activators. *EMBO J* **8**: 2795-2801
- Hill DE, Hope IA, Macke JP, Struhl K** (1986) Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* **234**: 451-457
- Hinnebusch AG** (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**: 248-273
- Holdsworth M, Munõz-Blanco J, Hammond-Kosack MC, Colot V, Schuch W, Bevan MW** (1995) The maize trancription factor Opaque-2 activates a wheat glutenin promotor in plant and yeast cells. *Plant Mol Biol* **29**: 711-720

- Jain SK, Benerjee DK** (1974). Preliminary observations on the ethnobotany of the genus *Coix*. *Econ Bot* **28**: 38-42
- Kaneko T, Hashimoto T, Kumpaisal R, Yamada Y** (1990) Molecular cloning of wheat dihydrodipicolinate synthase. *J Biol Chem* **265**: 17451-17355
- Kumpaisal R, Hashimoto T, Yamada Y** (1987) Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspensions cultures. *Plant Physiol* **85**: 145-151.
- Laber B, Gomis-Rüth FX, Romao MJ, Huber R** (1992) *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase. Identification of the active site and crystallization. *Biochem J* **288**: 691-695
- Landry J, Moureaux TH** (1980) Distribution and amino acid composition of protein groups located in different parts of maize grain. *J Agric Food Chem* **28**: 1186
- Larkins BA** (1980) Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. *Biochemistry of Plants* **6**: 449-489
- Lea PJ, Forde BG** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell Envir* **17**: 541-556
- Leite A, Freitas FA, Yunes JA, Arruda P** (1991) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding γ -coixin from *Coix lacryma-jobi* seeds. *Plant Physiol* **97**: 1604-1605
- Leite A, Ottoboni LMM, Targon MLPN, Silva MJ, Turcinelli SR, Arruda P** (1990). Phylogenetic relationship of zeins and coixins as determined by immunological cross-reactivity and Southern blot analysis. *Plant Mol Biol* **14**: 743-751
- Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Di Fonzo N, Hartings H, Salamini F, Thompson RD** (1991) The maize regulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the *b-32* gene. *EMBO J* **10**: 617-624
- Lyznik L, Rafalski A, Raczynska-Bojanowska, K** (1985) Amino acid metabolism in the pedicel-placental-chalazal region of the developing maize kernel. *Phytochemistry* **24**: 425-430
- Lyznik L, Zdrojewski W, Neumann M, Macewicz J, Raczynska-Bojanowska, K** (1982) A possible role of pedicel-placental-chalazal tissues in the amino acid supply to the developing maize kernel. *Maydica* **27**: 191-198
- Maddaloni M, Donini G, Balconi C, Rizzi E, Gallusci P, Forlani F, Lohmer S, Thompson R, Salamini F, Motto M** (1996) The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Mol Gen Genet* **250**: 647-654
- Markovitz PJ, Chuang DT** (1987) The bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase in lysine degradation. *J Biol Chem* **262**: 9353-9358

- Mauri I, Maddaloni M, Lohmer S, Motto M, Salamini F, Thompson RD, Martegani E** (1993) Functional expression of the transcriptional activator Opaque-2 of *Zea mays* in transformed yeast. *Mol Gen Genet* **241**: 319-326
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE** (1964) Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* **145**: 279-280
- Motto M, Maddaloni M, Ponziani G, Brembilla M, Marotta M, Di Fonzo N, Soave C, Thompson R, Salamini F** (1988) Molecular cloning of the *o2-m5* allele of *Zea mays* using transposon marking. *Mol Gen Genet* **212**: 488-494
- Muehlbauer GJ, Somers DA, Matthews BF, Gegenbach BG** (1995) Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. *Plant Physiol* **106**: 1303-1312
- Müller M, Dues G, Balconi C, Salamini F, Thompson RD** (1997) Nitrogen and hormonal responsiveness of the 22 kDa α -zein and b-32 genes in maize endosperm is displayed in the absence of the transcriptional regulator Opaque-2. *Plant J* **12**: 281-291
- Müller M, Knudsen S** (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J* **4**: 343-355
- Murphy JJ, Dalby A** (1971) Changes in the proteins fractions of developing normal and *opaque-2* maize endosperm. *Cereal Chem* **48**: 336-348
- Negrutiu I, Cattoir-Reynearts A, Verbruggen I, Jacobs M** (1984) Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris* (Spegazzini and Comes). *Theor Appl Genet* **68**: 11-20
- Osborne TB, Mendel LB** (1914) Nutritive properties of proteins of maize kernel. *J Biol Chem* **18**: 1-6
- Ottoboni LMM, Leite A, Targon MLPN, Crozier A, Arruda P** (1990) Characterization of the storage protein in seeds of *Coix lacryma-jobi* var. Adlay. *J Agric Food Chem* **38**: 631-635
- Ottoboni LMM, Leite A, Yunes JA, Targon MLPN, Souza Filho GA, Arruda P** (1993) Sequence analysis of 22 kDa-like α -coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol Biol* **21**: 765-778
- Payne PI** (1983) Breeding for protein quantity and protein quality in seed crops. In J Daussant, J Mossé, J Vaughan, eds, *Seed Proteins*. London: Academic Press, pp. 223-253
- Perl A, Shaul O, Galili G** (1992) Regulation of lysine synthesis in transgenic potato plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant Mol Biol* **19**: 815-823
- Pernollet JC** (1985) Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. *Physiol Vég* **23**: 45-59

- Pinazza LA** (1993) Perspectivas da cultura do milho e sorgo no Brasil. *In* L.T. Büll, H. Cantarella, eds, Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Potafos, Piracicaba, pp. 1-10
- Pirovano L, Lanzini S, Hartings h, Iazzarini N, Rossi V, Joshi R, Thompson RD, Salamini F, Motto M** (1994) Structural and functional analysis of an Opaque-2-related gene from sorghum. *Plant Mol Biol* **24**: 515-523
- Rivin CJ, Zimmer EA, Walbot V** (1982) Isolation of DNA and DNA recombinants from maize. *In* Sheridan WF, ed, Maize for Biological Research. University Press, Grand Forks, pp 161-164
- Samach A, Broday L, Hareven D, Lifschitz E** (1995) Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *Plant J* **8**: 391-406
- Samach A, Hareven D, Gutfinger T, Ken-Dror S, Lifschitz E** (1991) Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure and upregulation in floral organs. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2678-2682
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Schmidt RJ, Ketudat M, Aukerman MJ, Hoschek G** (1992), Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* **4**: 689-700
- Shaul O, Galili G** (1992a) Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant J* **2**: 203-209
- Shaul O, Galili G** (1992b) Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. *Plant Physiol* **100**: 1157-1163
- Shaul O, Galili G** (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **23**: 759-768
- Shedlarsky JC, Gilvarg C** (1970) The pyruvate aspartic semialdehyde condensing enzyme of *E. coli*. *J Biol Chem* **245**: 1362-1373
- Shull JM, Kirleis AW** (1989) Localization of alfa and beta-kafirins in *Sorghum bicolor*. *Cereal Foods World* **34**:784
- Silk GW, Matthews BF, Somers DA, Gegenbach BG** (1994) Cloning and expression of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol Biol* **26**: 989-993
- Singh BK, Shaner DL** (1995) Biosynthesis of branched chains amino acids: from the test tube to field. *Plant Cell* **7**: 935-944

- Singleton GW, Below FE** (1990) Growth and composition of maize kernels cultured in vitro with varying supplies of carbon and nitrogen. *Plant Physiol* **89**: 341-346
- Singleton GW, Doeblert DC, Wilson CM, Muhitch MJ, Below FE** (1990) Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. *Plant Physiol* **94**: 858-864
- Sodek L** (1976) Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry* **15**: 1903-1907
- Sodek L, Wilson CM** (1970) Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in the developing endosperm of normal and *opaque-2* corn. *Arch Biochem Biophys* **86**: 29-30
- Tang G, Miron D, Zhu-Shimoni JX, Galili G** (1997a) Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1305-1316
- Tang G, Zhu-Shimoni JX, Amir R, Zchori IB-T, Galili G** (1997b) Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* **34**: 287-294
- Targon MLN, Ottoboni LMM, Leite A, Ludevid D, Puigdomènèch P, Arruda P** (1992) Synthesis and deposition of coixin in seeds of *Coix lacryma-jobi*. *Plant Sci* **83**: 169-180
- Tsai CY, Huber DM, Warren HL** (1980) A proposed role of zein and glutelin as N sinks in maize. *Plant Physiol* **66**: 330-333
- Tzchori IB-T, Perl A, Galili G** (1996) Lysine and threonine metabolism are subject to complex patterns of regulation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **32**: 727-734.
- Umbarger HE** (1980) Amino acids biosynthesis and its regulation. *Ann Rev Biochem* **47**: 533-606
- Vauterin M, Jacobs M** (1994) Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Mol Biol* **25**: 545-550
- Vettore AL, Yunes JA, Cord Neto G, da Silva M, Arruda P, Leite A** (1997) The molecular characterization of an *Opaque2* homologue gene from *Coix* and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Mol Biol in press*
- Wallsgrrove RM, Mazelis M** (1980) The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. Complete localization of the regulatory enzyme dihydrodipicolinate synthase in the chloroplast of spinach leaves. *FEBS Lett* **116**: 189-192
- Weisemann JM, Matthews BF** (1993). Identification and expression of a cDNA encoding a bifunctional aspartate kinase-homoserine dehydrogenase. *Plant Mol Biol* **22**: 301-312
- Wilson BJ, Gray AA, Matthews BF** (1991). Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Plant Physiol* **97**: 1323-1328

- Yunes JA, Cord Neto G, Silva MJ, Leite A, Ottoboni LMM, Arruda P (1994).** The transcriptional activator Opaque2 recognize two different target sequences in the 22kDa-prolamin genes. *Plant Cell* **6**: 237-249
- Zhu-Shimoni JD, Lev-Yadun S, Matthews B, Galili, G (1997)** Expression of an aspartate kinase homoserine dehydrogenase gene is subject to specific spatial and temporal regulation in vegetative tissues, flowers and developing seeds. *Plant Physiol* **113**: 695-706