

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Departamento de Fisiologia Vegetal**

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA  
LISINA CETOGLUTARATO REDUTASE (LKR) /  
SACAROPINA DESIDROGENASE (SDH)  
ESTUDADA EM *Phaseolus vulgaris*.**

**Tese apresentada ao  
Instituto de Biologia  
para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências  
na área de Biologia  
Vegetal**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro  
Co-orientador : Prof. Dr. Paulo Arruda**

**1999**

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

**Lima, Suzana Telles da Cunha**

**L628e** Caracterização da enzima lisina cetoglutarato redutase (LKR)/sacaropina desidrogenase (SDH) estudada em *Phaseolus vulgaris*/Suzana Telles da Cunha Lima. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.  
99f.:ilus.

Orientador: Luiz Gonzaga Santoro

Co-Orientador: Paulo Arruda

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Aminoácidos. 2. Enzimas. 3. Feijão. I. Santoro, Luiz Gonzaga. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## SUZANA TELLES DA CUNHA LIMA

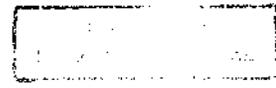
### CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LISINA CETOGLUTARATO REDUTASE (LKR) / SACAROPINA DESIDROGENASE (SDH) ESTUDADA EM *Phaseolus vulgaris*.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)	<i>Suzana Telles da Cunha Lima</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.	<i>[Signature]</i>
	<i>28/09/99</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Biologia Vegetal

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro**  
**Co-orientador : Prof. Dr. Paulo Arruda**

1999



Data de defesa: 28/9/99

**Banca Examinadora**

**Titulares:**

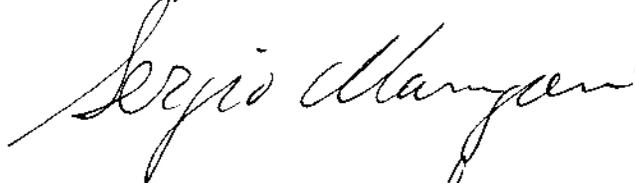
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro



Prof. Dr. Ladaslav Sodek



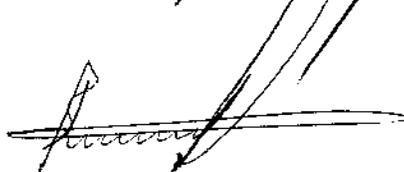
Prof. Dr. Sergio Marangoni



Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo



Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



**Suplentes:**

Prof. Dr. Jorge Vega

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Valio

Ao meu companheiro, por todos os momentos de ajuda nas horas em que mais precisei e sem os quais nada seria possível.

À minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo estímulo e apoio dado ao longo deste trabalho e da vida inteira.

Fôssemos infinitos  
Tudo mudaria  
Como somos finitos  
Muito permanece

**BRECHT**

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Luiz Gonzaga Santoro, pela prestimosa orientação ao longo deste estudo, por sua dedicação e amizade.
- Ao Prof. Paulo Arruda pela co-orientação, pela acolhida em seu laboratório e total auxílio prestado em todas as fases deste trabalho.
- À CAPES pela bolsa de pós-graduação nível doutorado concedida.
- Ao amigo Edson Luis Kemper pela ajuda dada inúmeras vezes nos meus primeiros passos com enzimologia, e posteriormente, na execução deste estudo.
- Ao Prof. Adilson Leite e aos amigos: Karen, Fabio, Germano, Márcio, Silvia, Alba, Adriana, Eneida, Daniela, De Lucca, Felipe, André, Ivan, Celso, Rodrigo, Cíntia e outros do CBMEG que me receberam tão bem e dos quais sempre guardarei boas lembranças .
- Ao Prof. Ladaslav Sodek e Prof. Ivani Marques Valio pelos auxílios prestados.
- À Sebastiana, Denise, ao João, Domingos e a todos os técnicos que me auxiliaram.
- Aos colegas da Fisiologia Vegetal, que sempre me ajudaram e tornaram os momentos mais alegres.
- Ao Setor de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelas sementes de feijão cedidas.

## **ÍNDICE**

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>1</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>2 - 23</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>25 - 40</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>41 - 74</b>
<b>Discussões e Conclusões.....</b>	<b>75 - 82</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>83 - 91</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>LKR</b>	<b>lysine ketoglutarate reductase</b>
<b>SDH</b>	<b>saccharopine dehydrogenase</b>
<b>DTT</b>	<b>dithiothreitol</b>
<b>PMSF</b>	<b>phenylmethylsulfonyl fluoride</b>
<b>PEG</b>	<b>polyethylene glycol</b>
<b>BSA</b>	<b>bovine serum albumin</b>
<b>CSPD</b>	<b>disodium3-{4-methoxyspiro[1,2-dioxethane-3,2'-(5'chloro)tricyclo decan]-4-yl} phenyl phosphate</b>
<b>HPLC</b>	<b>high performance liquid chromatography</b>
<b>TRIS</b>	<b>hidroximetil amino metano</b>
<b>Kav</b>	<b>volume da fração estacionária do gel acessível à proteína (available volume coefficient)</b>
<b>MM</b>	<b>massa molecular</b>
<b>PAGE</b>	<b>polyacrylamide gel electrophoresis</b>
<b>SDS</b>	<b>sodium dodecyl sulphate</b>

## RESUMO

A via de degradação da lisina em plantas é catalizada pela enzima bifuncional lisina cetoglutarato redutase (LKR) / sacaropina desidrogenase (SDH). A LKR condensa lisina e  $\alpha$ -cetoglutarato em sacaropina usando NADPH como cofator e a SDH converte a sacaropina em  $\alpha$ -aminoadipato- $\delta$ -semialdeído e ácido glutâmico, usando  $\text{NAD}^+$  como cofator. No presente trabalho foi demonstrado, em *Phaseolus vulgaris*, a participação desta enzima no catabolismo de lisina. A atividade foi medida em diferentes tecidos desta espécie. O hipocótilo apresentou maior atividade específica em plantas estioladas, seguidas pela folha, vagem e raiz, com valores muito inferiores. Sementes e cotilédones não demonstraram presença mensurável da enzima. A LKR/SDH também foi encontrada em plântulas de feijão carioca 80 crescidas *in vitro* a partir de sementes cujo cotilédone foi retirado previamente. Usando o sistema *in vitro*, a resposta enzimática à adição de lisina no meio de crescimento foi testada, demonstrando que o substrato não causa alterações na atividade. A precipitação de proteínas do tecido de hipocótilo em concentrações crescentes de PEG 8000 revelou dois platôs de atividade, levantando a hipótese de haver duas isoformas da enzima. Essa possibilidade foi reforçada posteriormente devido à respostas diferentes à inibidores de fosfatase, os quais revelaram que a LKR/SDH em feijão é uma fosfoproteína, assim como já foi observado em outras plantas. A enzima do hipocótilo foi isolada por métodos cromatográficos, indicando ser um polipeptídeo bifuncional. No entanto, dependendo do procedimento de purificação, a enzima pode eluir como um monômero de 94kDa, contendo apenas a atividade da SDH, ou como um dímero de 190kDa, com ambas atividades eluindo conjuntamente. As condições de iluminação durante o crescimento da planta revelaram exercer influência na atividade da LKR/SDH.

## SUMMARY

The pathway of lysine catabolism in plants is catalyzed by the bifunctional enzyme lysine ketoglutarate reductase (LKR) / saccharopine dehydrogenase (SDH). LKR condenses lysine and  $\alpha$ -ketoglutarate into saccharopine, using NADPH as a cofactor and SDH converts saccharopine into  $\alpha$ -aminoadipate  $\delta$ -semialdehyde and glutamic acid, using  $\text{NAD}^+$  as a cofactor. In the present work it was demonstrated, in *Phaseolus vulgaris*, the participation of this enzyme in lysine catabolism. The activity was measured in different tissues from this species. The hypocotyl presented the highest specific activity in etiolated plants, followed by the leaf, pod and root, with much lower values. Seeds and cotyledons did not present any measurable activity. LKR/SDH was also found in carioca 80 seedlings grown, *in vitro*, from seeds whose cotyledon was previously removed. Using the *in vitro* system, the response to lysine in the growing medium was tested revealing that the substrate didn't result in any change in enzyme activity. The precipitation of proteins from hypocotyl tissue with increasing concentrations of PEG 8000 revealed two *platos* of enzyme activity, raising the hypothesis that two isoforms of this enzyme are present. This possibility was subsequently reinforced due to different responses to phosphatase inhibitors, which revealed that LKR/SDH in *P. vulagris* is a phosphoprotein, as observed with other plants. The hypocotyl enzyme was isolated by chromatographic methods, showing it to be a bifunctional polypeptide. However, depending on the purification procedure, it may elute as a monomer of 94 kDa containing only SDH activity, or as a dimer of 190 kDa where both activities elute together. Light conditions during plant growth were shown to influence the activity of LKR/SDH.

## I. INTRODUÇÃO

Nas leguminosas, 70% do conteúdo em proteína das sementes são globulinas e estão armazenadas em corpúsculos protéicos, localizados nos cotilédones. Existem dois tipos principais de globulinas: a legumina e a vicilina, as proteínas restantes (albuminas) encontram-se em baixas concentrações, somadas a traços de proteínas estruturais que se comportam como glutelinas (PHILLIPS, 1993). No entanto, ao considerarmos a importância nutricional das proteínas; é necessário frisar que os animais não tem necessidade delas "per se", e sim pelos aminoácidos essenciais.

Dos vinte aminoácidos normalmente incorporados nas proteínas, apenas onze podem ser sintetizados por animais adultos. Os outros nove são denominados essenciais, pois não podem estar ausentes na dieta alimentar. Em contrapartida, as plantas, bactérias e fungos tem a capacidade de sintetizar todos os vinte aminoácidos .

A maioria das fontes vegetais de proteína vem de sementes de cereais e legumes, porém, os cereais são deficientes em lisina e treonina e as leguminosas, deficientes em metionina. Esse fato faz com que a associação de ambos seja favorável na alimentação, no entanto que, individualmente, as sementes sejam deficientes em termos nutricionais.

Muitos estudos vem sendo realizados sobre a síntese e catobilismo destes aminoácidos em vegetais, mamíferos, fungos e leveduras na tentativa de se

conhecer as vias metabólicas envolvidas e manipulá-las, de forma a melhorar a qualidade nutricional de legumes e cereais .

O baixo conteúdo de lisina encontrado nas proteínas de sementes de cereais é o resultado de uma complexa interação entre o metabolismo deste aminoácido e a biossíntese das proteínas de reserva deste tecido. Existem evidências de que uma alta concentração de lisina nas células seja limitante para a síntese de proteínas ricas neste aminoácido, devido a um mecanismo de retroinibição (AZEVEDO *et al*, 1997). Esse processo terminaria por afetar a outros aminoácidos sintetizados pela mesma via metabólica.

Por muito tempo, acreditou-se que este mecanismo de retroinibição fosse o ponto crítico para o controle da concentração de lisina na célula. Entretanto, estudos realizados neste laboratório, e recentemente em outros (GONÇALVES-BUTRUILLE, 1996; BROCHETTO-BRAGA, 1992; MARKOVITZ E CHUANG, 1987), indicam que o catabolismo também é um fator importante na concentração deste aminoácido.

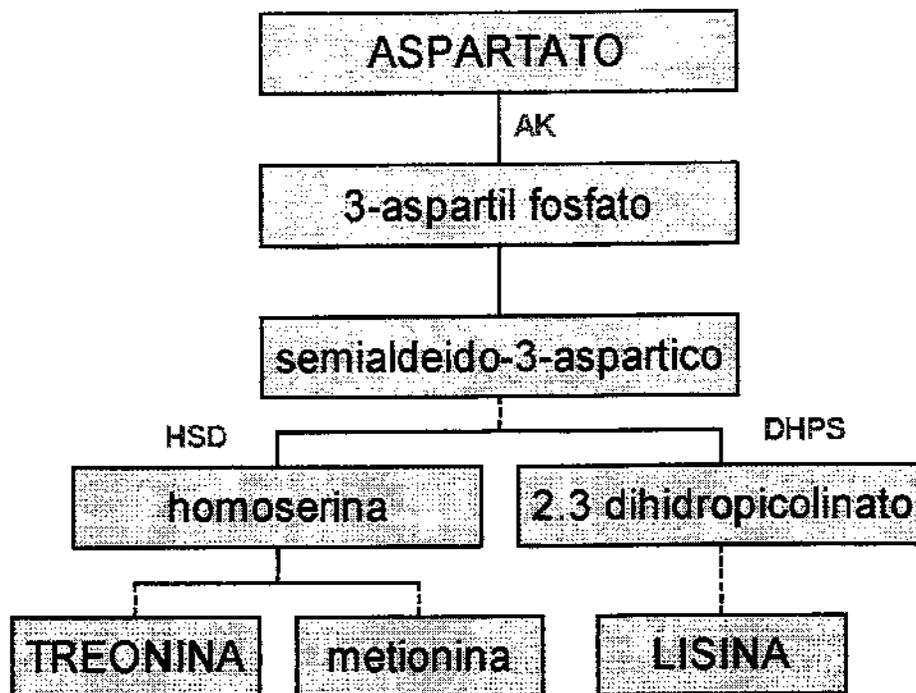
Os mecanismos que regulam a expressão dos genes de proteínas de reserva são temas relativamente recentes de pesquisa, porém, uma importante observação é que estes genes são controlados à nível de transcrição (HIGGINS, 1984; KODRZYCKI, *et al* (1989). O locus *opaco-2* foi o primeiro locus identificado em milho afetando a síntese de proteínas de reserva da semente. O gene *opaco-2* codifica uma proteína ativadora da transcrição que possui o chamado domínio básico/zíper de leucinas (bZIP) para ligação com o DNA. Uma mutação deletéria na proteína *opaco-2* causa uma redução drástica nos níveis da principal fração de proteínas de reserva do endosperma de milho, as zeínas (ESEN, 1986; SHEWRY e

TATHAM, 1990), na qual a lisina está praticamente ausente (SODEK e WILSON 1971). A classe de  $\alpha$ -zeína, de 22 kDa é a mais afetada no mutante, (KORDRZYCKI *et al*, 1989; CORD NETO *et al*; 1995), diminuindo severamente sua concentração. Após a descoberta do mutante *opaco-2* (MERTZ *et al*, 1964), um interesse considerável tem sido observado nas mudanças bioquímicas envolvendo o aumento na concentração de lisina. Desta forma, tanto as vias de síntese quanto de catabolismo tem sido abordadas.

A baixa concentração de lisina no endosperma de plantas normais pode ser explicada, à nível fisiológico, devido a demanda reduzida deste aminoácido pelos tecidos de reserva da semente (BROCHETTO, *et al*, 1992) e, por consequência, do embrião. A diferença no conteúdo de nitrogênio total entre o mutante (menor, em valores absolutos) e a planta normal ocorre também devido à variações no conteúdo de zeína (ARRUDA e SILVA, 1982; SILVA e ARRUDA, 1979), que funciona como dreno de N em sementes de milho. As zeínas são amplamente relacionadas ao conteúdo de outras proteínas do endosperma, como a albumina, globulina e aminoácidos livres, ou seja, quando a concentração de uma proteína é alterada, as outras também demonstram sofrer variação (ARRUDA e SILVA, 1982). A leucina é o principal aminoácido sintetizado neste tecido, em concentração aproximadamente 2.5 vezes maior nas plantas normais, do que nos mutantes *opaco-2*.

Os aminoácidos essenciais lisina e treonina são sintetizados em plantas superiores por ramos diferentes da mesma via metabólica (GONÇALVES-BUTRUILLE *et al*, 1996). A via do aspartato é primeiramente regulada por tres enzimas chaves, a aspartato kinase (AK), a dihidrodipicolinato sintase (DHPS) e a

homoserina desidrogenase (HSD), como vemos no diagrama abaixo, modificado de SHAUL e GALILI, 1993 (as linhas pontilhadas indicam a presença de alguns passos intermediários na via).



A primeira enzima direcionada a biossíntese específica de lisina (DHPS) e a última enzima desta via metabólica (a diaminopimelato decarboxilase) demonstraram estar localizadas no cloroplasto de folhas verdes, como observado em espinafre (WALLSGROVE e MAZELIS, 1980) e outras plantas (*Pisum sativum* e *Vicia faba*). Apesar das enzimas intermediárias não terem sido demonstradas, a habilidade de cloroplastos isolados em sintetizar lisina indica que elas também estão presentes nesta organela. Vale citar que o cloroplasto também tem a habilidade de

sintetizar outros aminoácidos, como a leucina e aminoácidos aromáticos. Pesquisas adicionais com tecidos estiolados (crescidos na ausência da luz) tem sido necessárias para elucidar o papel dos plastídeos nestes tecidos, assim como estudos gênicos para revelar se essas enzimas são codificadas pelo genoma da organela (WALLSGROVE e MAZELIS, 1980).

Existe, em alguns organismos, como o *Bacillus esphaericus*, uma outra via paralela de biosíntese de lisina, denominada via da desidrogenase-meso-diaminopimelato (meso-DAP-desidrogenase); esta enzima pode catalizar diretamente a reação de tetrahidrodipicolinato em m-DAP abreviando a necessidade de 4 enzimas intermediárias que não estão presentes em *Bacillus esphaericus* (MISONO *et al*, 1976). Porém, o número limitado de espécies de bactérias nas quais a m-DAP foi encontrada levanta a questão de se a via abreviada da desidrogenase (na biossíntese de lisina) representa uma aquisição evolutiva recente, ou a sobrevivência do que foi, originalmente, uma forma ancestral mais simples de produzir este aminoácido.

Neste aspecto, WENKO *et al* (1985) registraram a existência desta enzima em soja (*Glycine max*). Porém, há controvérsias quanto a existência desta via já que CHATTERJEE *et al*, num trabalho mais recente (1994), afirmam ter encontrado, as enzimas: sintase ácido dihidropicolínica (DHD), redutase DHD, diaminopimelato (DAP) epimerase e DAP decarboxilase em extratos de algas *Chlamidomonas*, *Zea mays*, *Glicine max* e *Nicotiana tabacum*. No entanto, a m-DAP desidrogenase não foi encontrada em nenhuma das espécies avaliadas (nem na soja, como citado anteriormente), indicando que essa via abreviada de síntese de lisina não é

operativa em plantas. Ao nível evolutivo, isto era de se esperar, já que a origem dos cloroplastos ocorre à partir de um processo de endosimbiose (MARGULIS, 1981) envolvendo uma cianobactéria e uma alga unicelular (há mais de 700 milhões de anos), ambas sintetizando lisina pela mesma via metabólica.

A síntese de lisina à partir do aspartato já foi demonstrada previamente nos tecidos do endosperma de milho (SODEK, 1976), porém, esta não é a única fonte deste aminoácido. Em semente, a lisina é translocada em concentrações relativamente altas de outros tecidos para o endosperma em desenvolvimento (aproximadamente 5% do total de aminoácidos livres) (ARRUDA e SILVA, 1979). A glutamina e o ácido aspártico demonstraram ser os principais aminoácidos translocados para este tecido em milho.

Como a demanda do endosperma pela lisina é baixa, poderia-se esperar um acúmulo de lisina no endosperma em desenvolvimento. Isso não ocorre, sendo o total deste aminoácido mantido em torno de 1,5% durante o desenvolvimento (ARRUDA e SILVA, 1982). É necessário que a concentração de lisina seja mantida em níveis baixos porque concentrações elevadas inibem a atividade das enzimas AK e DHPS (SHAUL e GALILI, 1993). A inibição da AK resultaria na falta de substratos intermediários para a síntese de metionina (ver pag. 9). Este fato poderia limitar a síntese de proteínas e ter efeitos adversos no endosperma em desenvolvimento, já que o nível de metionina translocado para a semente seria insuficiente para manter a síntese de proteínas nos padrões adequados (ARRUDA e SILVA, 1979).

Curiosamente, mutantes de cevada e milho, com AK insensível a retroinibição pela lisina não a acumularam no endosperma, mas sim o aminoácido

treonina. (BRIGHT, 1982; HIBBERD e GREEN, 1982). Plantas transgênicas de tabaco expressando genes bacterianos que codificam formas de AK e DHPS insensíveis a retroinibição pela lisina, também não a acumularam significativamente em sementes, apesar de terem acumulado treonina (KARCHI *et al*, 1994). Como o nível de treonina livre foi muito maior nas sementes maduras de plantas transgênicas, foi sugerido que o acúmulo de treonina é regulado primeiramente pela sua própria síntese. Apesar da lisina e da treonina serem sintetizadas numa via metabólica comum, o mesmo não pode ser dito em relação à lisina, onde o mecanismo de feedback negativo é apenas uma das formas de controle do conteúdo deste aminoácido. Mutantes de tabaco expressando apenas DHPS de bactéria (insensível à retroinibição), no entanto, apresentaram concentrações de lisina aumentadas significativamente (GALILI, 1994,1995), indicando que o acúmulo deste aminoácido está mais relacionado a atividade da DHPS nesta espécie.

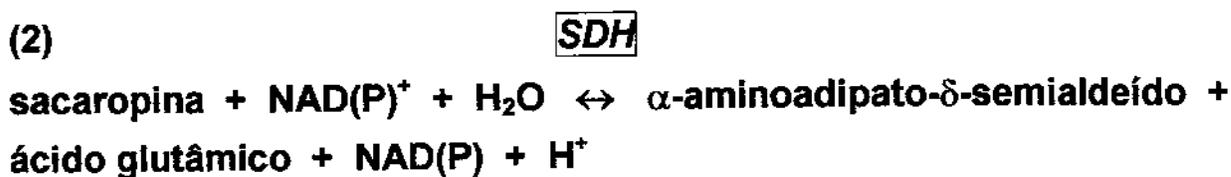
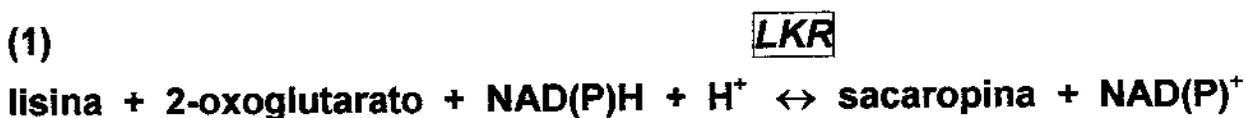
PERL *et al* (1992), utilizando batatas transgênicas com o gen quimérico contendo a sequência de DNA do gen *dapA* de *Escherichia coli*, que codifica DHPS menos sensível a retroinibição por lisina, expressaram esse gen em cloroplastos. A atividade da DHPS em folhas, raízes e tubérculos das plantas transgênicas foi consideravelmente maior e mais resistente à inibição pela lisina do que as plantas controles, não transformadas. Além disso, a atividade da enzima foi acompanhada pelo acúmulo de lisina nos três tecidos estudados, apesar do grau de acúmulo de lisina em folhas ter sido muito inferior do que o relatado para tabaco (SHAUL e GALILI, 1992), expressando o mesmo gen. O fato da lisina ter acumulado em menores proporções do que em outras plantas transgênicas que expressam DHPS

de bactéria sugere que, em batata, a aspartato kinase (AK) também pode atuar num papel regulatório da biosíntese de lisina, revelando que a regulação desta via é mais complexa do que em tabaco.

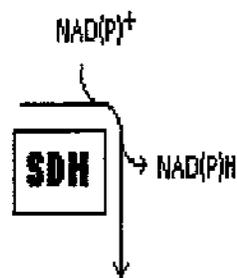
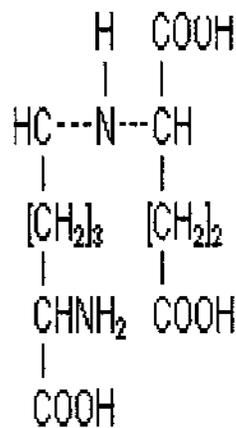
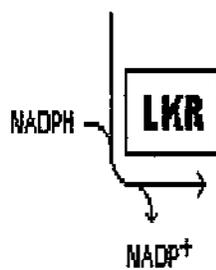
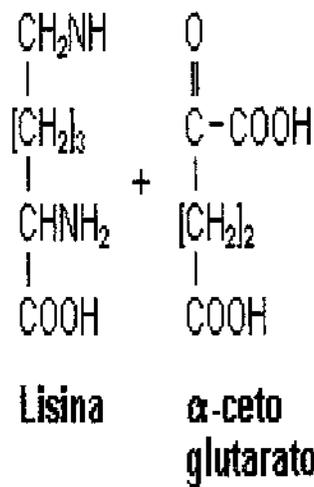
Outra planta transformada com DHPS e AK de bactéria foi a *Arabidopsis thaliana*, que também acumulou lisina nos tecidos da semente. Porém, os níveis do aminoácido variaram consideravelmente entre os genótipos transgênicos, de forma que não foi possível fazer nenhuma relação entre o acúmulo de lisina e a atividade da DHPS (TZCHORI *et al*, 1996). As plantas de *Arabidopsis* que acumularam lisina também apresentaram alterações fenotípicas, detectadas nos estágios iniciais de desenvolvimento. As espécies selvagens apresentaram altos níveis de treonina livre, indicando que, em *Arabidopsis*, a regulação da aspartato kinase é menos acentuada que em outras plantas. Isso também se confirma pelo fato da expressão da AK bacteriana não ter causado nenhum aumento neste aminoácido.

Os fatores envolvidos no acúmulo de lisina livre em plantas ainda são desconhecidos, entretanto, muitas linhas sugerem que o catabolismo de lisina desempenha um papel importante, prevenindo o acúmulo deste aminoácido. O catabolismo da lisina em plantas foi demonstrado primeiramente com experimentos utilizando  $^{14}\text{C}$ -lisina em trigo, cevada e milho. Nestes ensaios a radioatividade foi incorporada em ácido  $\alpha$ -amino adípico e ácido glutâmico, indicando que a lisina é catabolisada via sacaropina (SODEK e WILSON, 1971). Plantas normais de milho também foram as primeiras a demonstrarem que esse catabolismo está sujeito à controle genético (SILVA e ARRUDA, 1979).

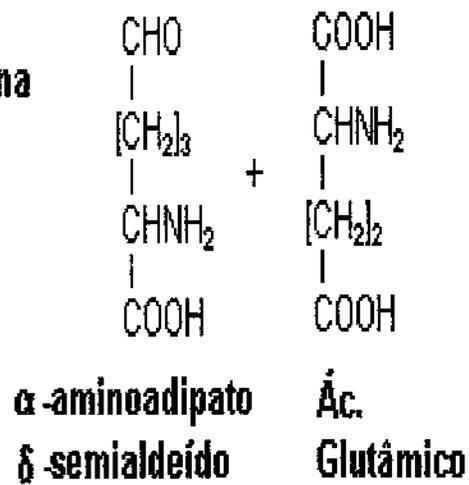
O primeiro passo na degradação de lisina, em animais e plantas, é a condensação de lisina e  $\alpha$ -cetoglutarato em sacaropina pela atividade da LKR. O passo subsequente de degradação envolve a hidrólise da sacaropina em ácido  $\alpha$ -aminoadípico- $\delta$ -semialdeído e ácido glutâmico, pela SDH. A conversão do aminoácido em  $\alpha$ -cetoglutarato (ou oxoglutarato) e sacaropina pela LKR requer NADPH como cofator e a hidrólise da sacaropina requer  $\text{NAD}^+$ , como cofator (GONÇALVES-BUTRUILLE *et al* , 1996). Em milho, 10% da segunda reação pode ocorrer tendo  $\text{NADP}^+$  como cofator da SDH. O diagrama abaixo representando o catabolismo de lisina, encontrado em plantas e animais inclui as duas reações consecutivas (1 e 2).



As fórmulas estruturais das moléculas envolvidas na via, permitem observar a transferência do grupo amino entre as moléculas, como vemos no diagrama à seguir (extraído de GONÇALVES-BUTRUILLE, et al, 1996).



**Sacaropina**



De fato, foi demonstrado que a LKR e a SDH, envolvidas na degradação de lisina via sacaropina, possuem alta atividade no endosperma de milho em desenvolvimento e são constituídas por dois monômeros de 125kDa (ARRUDA, 1982 e 1983., GONÇALVES-BUTRUILLE, 1996). A catálise de lisina já foi observada além do milho normal, também no mutante *Opaco-2* (BROCHETTO-BRAGA, *et al*, 1992), onde ocorre com menor intensidade, possivelmente devido a maior incorporação da lisina livre nas proteínas de reserva.

Em animais, o estudo de desordens hereditárias no metabolismo de lisina contribuiu para a elucidação da via degradativa deste aminoácido. Pacientes com altas concentrações de lisina na urina e no sangue evidenciaram deficiência na atividade da enzima LKR (HIGASHINO, 1965 e MARKOVITZ, 1984) e a sacaropinúria, presença anormal de sacaropina nos fluidos fisiológicos humanos (FELLOWS e CARSON, 1974), decorre da ausência da SDH. Ambas enzimas foram isoladas posteriormente por HUTZLER e DANCIS (1968, 1975).

As enzimas envolvidas no catabolismo de lisina foram encontradas em culturas *in vitro* de células de fígado humano, de ratos, porcos, cachorros, gatos, boi e ovelha. A atividade específica da SDH, encontrada em todas as espécies de animais, foi maior que a da LKR (FELLOWS e LEWIS, 1973) e demonstrou estar relacionada aos níveis de lisina ingeridos na dieta alimentar. Em mitocôndrias de fígado de ratos alimentados com uma dieta contendo concentração muito alta de lisina, a atividade da LKR foi aumentada (FOSTER *et al*, 1993), porém o autor sugere testes adicionais para uma demonstração inequívoca da indução pelo

substrato. Dois hormônios também já revelaram efeito positivo na atividade da LKR neste mesmo tecido, o glucagon e glicocorticóides, porém em tecido de rim, a indução pela lisina não ocorreu (SHINNO *et al*, 1980), indicando que a resposta da LKR é tecido - específica em animais.

A enzima LKR/SDH nativa de mamíferos é um tetrâmero de 460kDa composto de quatro subunidades de 115kDa (MARKOVITZ e CHUANG (1987). Em cada uma estão localizados, em domínios adjacentes, os dois sítios ativos da LKR e SDH, caracterizando o peptídeo bifuncional . Em fígado de ratos (BLEMINGS *et al* 1994) , a LKR/SDH foi encontrada na matriz mitocondrial e foi sugerido que essa localização subcelular requer a entrada na matriz como pre-requisito para a degradação de lisina no fígado. RAO, *et al* (1992) estudaram aspectos desta enzima no desenvolvimento de fígado e cérebros de ratos, concluindo que no primeiro tecido a atividade enzimática aumentava ao longo do desenvolvimento, enquanto que no segundo ocorria o inverso. As maiores atividades nos tecidos do fígado de ratos ocorreram na maturidade estabelecendo que a via da sacaropina é uma das mais importantes que ocorre neste tecido.

FJELLSTEDT e ROBINSON (1975) caracterizaram a LKR/SDH em placenta humana, estimando um massa molecular de 480kDa, obtido por filtração em gel. Não houve nenhuma indicação de separação das atividades ao longo do processo de purificação. Na grande maioria dos animais e plantas, as atividades da LKR e SDH residem em um único polipeptídeo (MARKOVITZ *et al*, 1984, GONÇALVES-BUTRUILLE *et al.*, 1996). A existência de dois domínios ligados covalentemente num polipeptídeo catalizando passos consecutivos de uma reação tem muitas

vantagens fisiológicas, como por exemplo a produção em valores equimolares dos produtos da tradução. O tunelamento do substrato também permite que o produto do primeiro passo da reação possa ser direcionado mais rapidamente para o segundo domínio catalítico, evitando que seja liberado no meio.

Ao contrário do citado acima, em leveduras e fungos (NODA e ICHIHARA, 1978) as enzimas LKR e SDH estão em polipeptídeos separados e equivalem a monômeros de 49kDa e 73kDa. Suas atividades correspondem aos dois últimos passos de uma via de biossíntese de lisina (JONES e BROQUIST, 1966; SAUNDERS e BROQUIST, 1966) . É interessante citar que a soma do tamanho dos monômeros nestes organismos corresponde ao tamanho do polipeptídeo bifuncional, em mamíferos e plantas . LKR e SDH também foram encontradas em polipeptídeos separados em mitocôndria de fígado de ratos (NODA e ICHIHARA, 1978).

A LKR e SDH de plantas e animais possuem algumas propriedades similares como meio neutro para atividade de LKR e básico para a atividade de SDH (GONSALVES-BUTRUILLE, 1996; SAUNDERS e BROQUIST, 1966; ARRUDA *et al.*, 1982; FJELLSTEDT e ROBINSON, 1975) . Apesar da LKR e da SDH aparentemente controlarem processos importantes em todos os organismos, a sua função celular e modulação variam entre espécies. Os aspectos estruturais e regulatórios da LKR e SDH em plantas aparentam ser muito mais complexos do que tem sido elucidado previamente para bactérias e mamíferos (TANG *et al.* , 1997).

Em milho, a enzima LKR/SDH foi purificada (GONÇALVES-BUTRUILLE *et al.*, 1996) e demonstrou-se que as atividades de redutase e desidrogenase são

ótimas num pH de 7.0 e 8.5, respectivamente (valores ótimos também para sementes de soja e arroz) . Em SDS -PAGE revelou-se a existência de uma banda de 125kDa, enquanto que a forma nativa aparentou ser um dímero de 260kDa, após cromatografia de filtração. Os padrões de eluição revelaram que os picos de LKR e SDH se sobrepuseram, indicando que ambos sítios ativos estavam localizados em um único polipeptídeo. Também pode ser observado que a atividade da LKR chegou a ser 3.5 vezes maior que a da SDH, ao contrário do encontrado em animais (FELLOWS e LEWIS, 1973).

A modulação desta enzima ainda é pouco conhecida , porém, uma avaliação mais profunda neste aspecto foi feita com plantas normais de milho. O sítio ativo da LKR na enzima bifuncional LKR/SDH do endosperma demonstrou ser ativado por  $Ca^{2+}$  , alta concentração salina, solventes orgânicos e  $Mg^{+2}$  .O aumento na atividade da LKR dependente de  $Ca^{+2}$  foi inibido por antagonistas de calmodulina N-(6)-aminohexyl-(5)-cloro-naftalenosulfonamida (W7) e calmidazolium. O efeito da concentração de sal do tampão na atividade da LKR pode ser devido, em parte, a uma queda na atividade da água no meio de ensaio, o que poderia causar mudanças conformacionais no domínio LKR da enzima (KEMPER *et al*, 1998).

Para elucidar os mecanismos de ativação por  $Ca^{+2}$  e força iônica, os domínios de LKR e SDH foram separados (KEMPER *et al*, 1998) por proteólise (com elastase), indicando a presença de sítios sensíveis a elastase entre os dois sítios ativos, assim como observado anteriormente em fígado bovino (MARKOVITZ e CHUANG, 1987). Porém, após a digestão em milho, a atividade da LKR foi reduzida significativamente, não tendo sido observado efeito inibitório na atividade da SDH.

Em animais, após proteólise (MARKOVITZ e CHUANG,1987) com elastase, quimotripsina e papaína a enzima pôde ser separada em dois domínios de 62.7 kDa (LKR) e 49.2 kDa (SDH), sem nenhuma perda de atividade posterior a digestão.

Em milho (KEMPER *et al*, 1998), a atividade da LKR foi parcialmente recuperada na presença de  $Ca^{2+}$  porém não mais respondeu ao aumento da força iônica, sugerindo a existência de diferentes mecanismos para a modulação desta atividade. Como a SDH não foi afetada pela hidrólise, levantou-se algumas hipóteses para esse fato. Uma possibilidade é que este domínio não necessita de dimerização como a LKR, para ser ativo; ou ainda, que o polipeptídeo SDH contenha um domínio protéico que inibe a atividade da LKR.

Alguns dados (KEMPER *et al*, 1998) revelaram que a última hipótese era verdadeira. Após hidrólise enzimática, o perfil de eluição em coluna de troca iônica revela três picos de LKR (I, II e III) e dois picos de SDH (I e II), sendo a LKR III e a SDH I as frações com maior atividade. Quando frações isoladas de LKR III são ensaiadas na presença de SDH I e II, a atividade da LKR é quase que completamente inibida, indicando a presença de um domínio inibidor situado na SDH.

No mutante de milho *Opaco-2*, o catabolismo de lisina é alterado de forma que esta é degradada em menores proporções no endosperma da semente, comparado à planta normal. A atividade enzimática da LKR chega a ser duas a tres vezes menor no mutante do que no endosperma normal (BROCHETTO-BRAGA, *et al*, 1992). Como o gen *Opaco-2* codifica uma proteína que se liga ao DNA (bZIP), o

qual regula a transcrição de diversos gens de zeínas, é possível que o gen da LKR também possa estar sob controle deste fator de transcrição (AZEVEDO *et al*, 1997).

Outra planta onde o mecanismo de indução da LKR foi avaliado, apresentando resposta positiva ao  $\text{Ca}^{+2}$  foi a *Nicotiana tabacum* (KARCHI, 1995). A semente desta planta apresenta atividade enzimática, porém na folha, onde ocorre alta concentração de lisina, nenhuma atividade é observada. Plantas transgênicas desta espécie (que expressam DHPS de bactéria) e plantas nativas, quando foram inoculadas com lisina e  $\text{Ca}^{+2}$  na semente, responderam aumentando a atividade da LKR. Já na presença do quelante de  $\text{Ca}^{+2}$ , EGTA, sofreram diminuição na atividade enzimática (efeito que foi revertido ao adicionar-se  $\text{Ca}^{+2}$  novamente). Esses resultados sugeriram que a estimulação da LKR pela lisina requer a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  dos compartimentos de reserva celular. Isso foi testado injetando-se ionomicina nas sementes de plantas nativas de tabaco, substância responsável por transportar o  $\text{Ca}^{+2}$  através de membranas e, por consequência, aumentar a concentração intracelular do íon (LIU e HERMANN, 1978). Observou-se, desta forma, aumento progressivo na atividade da LKR a medida que foi aumentada a concentração de ionomicina. Ainda não se sabe exatamente de que forma o íon se liga ao domínio LKR da enzima, porém é possível que seja através de sequências homólogas à "EF hands", a exemplo da proteína quinase, dependente de cálcio (ROBERTS e HARMON, 1992; MUTO, 1992).

As modificações pós-traducionais de proteínas por fosforilação são mecanismos universais para a regulação de diversas funções biológicas. Muitas proteínas celulares são reversivelmente fosforiladas em resposta a estímulo externo

ou à sinais intracelulares, o que tem gerado grande interesse em identificar e caracterizar kinases e fosfatases vegetais que modulam o estado de fosforilação da proteínas. A enzima LKR/SDH de plantas já demonstrou que além de ser regulada por íons específicos, responde também ao seu estado de fosforilação (MIRON *et al*, 1997).

Existem três classes principais de fosfatases que foram identificadas em plantas (SMITH e WALKER, 1996) e são homólogas às de mamíferos, denominadas proteínas fosfatases (PPases) serina-treonina tipo 1 e 2A e 2C ( PP1A, PP2A e PP2C). 97% da fosforilação em células eucarióticas ocorre nos resíduos serina e treonina e, em proporções menores, nos resíduos de tirosina.

Em plantas e animais, o fato de diversas proteínas cinases responderem diretamente ao  $Ca^{+2}$ , levantou a idéia de que as cinases são primeiramente responsáveis por regular o estado de fosforilação das proteínas e que as fosfatases apenas reverteriam o efeito destas, entretanto, poucas proteínas cinases vegetais foram caracterizadas. As cinases de plantas são inativadas por PPases que atuam sobre resíduos de serina-treonina (MACKINTOSH, *et al*, 1992) desfosforilando-os.

Um maior número de trabalhos sobre as PP1A e PP2A vem do fato destas proteínas serem semelhantes às de mamíferos, além de diversos estudos bioquímicos e genéticos em plantas indicarem que a PP1A e PP2A tem papel na transdução de sinais, regulação hormonal, mitose e metabolismo do carbono e nitrogênio. As PP são inibidas por uma série de toxinas naturais como o ácido okadáico, toxina marinha potente inibidora do tipo 2A (sem nenhum efeito inibidor contra 2C) e a ciclosporina A, de ambos 1A e 2A (CICIRELLI, 1992). As PP2A foram

encontradas em diversas espécies de plantas e na maioria dos tecidos; assim como as PP1A, situam-se em diversas frações celulares, como o núcleo, citossol e associada à membranas.

KARCHI *et al* (1995), avaliaram a resposta da LKR quando sementes de tabaco são inoculadas com ácido okadaico, na inibição de fosfatases do tipo PP1 e PP2A. Um aumento (na ordem de nmol) desta enzima causou estímulo progressivo na atividade da LKR, revelando que essa enzima também é uma fosfoproteína, que depende do seu estado de fosforilação para tornar-se ativa.

O estudo com inibidores também confirma a presença em plantas e animais de proteínas fosfatases que não pertencem a família das PP1A nem PP2A. As proteínas fosfatases 2C (PP2C) são as menos caracterizadas dentre as proteínas serina-treonina. Elas não respondem ao ácido okadaico e tem sua localização mais restrita na planta, demonstrando ser citosólica em células de cenoura, em inflorescência de couve-flor e em folhas de ervilha e trigo (MACKINTOSH, 1991 e 1992). Essa PPase tem um sítio de ligação com ácido abscísico e também se liga ao  $Ca^{+2}$ .

Outra fosfatase de proteína encontrada é a PPase mitocondrial do complexo piruvato desidrogenase (PDC), que é regulado, em parte, pela fosforilação reversível de uma de suas sub-unidades, a piruvato desidrogenase E1 $\alpha$  (MIERNYK *et al*, 1985). A fosforilação por uma cinase específica inativa a PDH na luz e a desfosforilação do PDH no escuro por uma fosfatase (serina-treonina dependente de  $Mg^{2+}$ ) ativaria o complexo.

Algumas proteínas fosfatases de cloroplastos também já foram identificadas. Essas proteínas são fosforiladas, na sua maioria, em resíduos serina-treonina. Nos tilacóides a fosforilação ocorre através de cinases dependentes da luz, enquanto que a desfosforilação, no escuro, é catalizada por fosfatases de proteína ligadas à membrana, que são sensíveis à fluoreto de sódio e íons molibdatos (BENNET, 1980; CHENG, 1989; SILVERSTAIN, 1993; SUN, 1989).

Em soja, foi demonstrado que a desfosforilação 'in vitro' do polipeptídeo bifuncional LKR/SDH (100 e 123kDa em SDS-PAGE) com fosfatase alcalina inibiu significativamente a atividade da LKR (MIRON *et al*, 1997), mas não a atividade da SDH. Esta atividade pôde ser recuperada em até 10 vezes na presença do inibidor de fosfatase  $\beta$ - glicerol fosfato, sugerindo que a LKR também pode ser inativada por uma fosfatase endógena. Apesar dos sítios ativos LKR e SDH da enzima da semente estarem localizados num mesmo polipeptídeo bifuncional, ocorrem respostas diferentes entre eles, possivelmente devido à modificações pós-traducionais da enzima. Os mesmos autores observaram que a ligação de lisina à enzima é essencial para que ocorra desfosforilação por uma fosfatase alcalina, possivelmente porque esta ligação alteraria a conformação enzimática, expondo o resíduo de fosfato em sua superfície e tomando-o acessível a remoção pela fosfatase.

Desta forma a modulação da atividade da LKR em soja é sujeita a uma regulação conjunta com lisina; de um lado o excesso deste aminoácido estimula a atividade da LKR, possivelmente via ativação mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  de uma cinase

protéica que fosforila o peptídeo LKR/SDH, e por outro, a ligação de lisina ao sítio ativo da LKR pode expõe o resíduo de fosfato, facilitando sua retirada.

Outra dicotiledônea avaliada quanto a LKR /SDH foi a *Arabidopsis thaliana* (TANG, G. *et al*, 1997). Neste estudo foi descrita a clonagem do cDNA de *Arabidopsis* que codifica este polipeptídeo bifuncional, contendo ambas as atividades. Num *northern blot* , duas bandas de mRNA foram identificadas, uma maior (3.5Kb), contendo as sequências de LKR e SDH e outra menor (1.5Kb), contendo apenas a sequência de SDH. No entanto, sugeriu-se que as duas populações de mRNA são codificadas pelo mesmo gen. Para testar se ambos os mRNA eram funcionais em traduzir uma LKR/SDH bifuncional e uma isoenzima SDH monofuncional, extratos protéicos de culturas de células de *Arabidopsis* foram fracionados por cromatografia de troca iônica. Este fracionamento revelou dois picos separados, um contendo ambas atividades e o outro, apenas com a de SDH. Um teste de hibridização *in situ* (TANG, G. *et al*, 1997), revelou que ambos mRNAs estavam presentes em maior concentração, no ovário da flor e nos tecidos vasculares da antera. Nas sementes maduras em desenvolvimento, foram encontrados em maior abundância no embrião e nas camadas mais externas do endosperma. Esses dados indicam que a expressão de ambos os genes SDH e LKR/SDH é regulada de maneira tecido-específica durante o desenvolvimento da planta. Os autores citam (dados não publicados) que as células vegetais também contém uma enzima monofuncional, de 53kD, apenas com a a atividade da SDH. As duas isoenzimas LKR/SDH e SDH são traduzidas de diferentes RNAs, porém, de um mesmo gen. No alinhamento da sequência de aminoácidos da LKR/SDH de

*Arabidopsis* com as enzimas monofuncionais LKR e SDH de levedura, revelou-se que a enzima bifuncional de plantas possui uma região entre os dois domínios da enzima que não está presente em nenhuma das duas enzimas de levedura. O papel funcional desta região intermediária ainda não é conhecido, no entanto, o fato de os domínios LKR e SDH da enzima bifuncional poderem ser separados mantendo a atividade individualmente, sugere que a região possa permitir o *fold*ing independente dos domínios (TANG, G. *et al*, 1997). Como a atividade da SDH na enzima monofuncional encontrada após a purificação foi muito maior que a da própria encontrada na enzima bifuncional, foi sugerido que a SDH pudesse regular negativamente o seu domínio, assim como mostrado para milho (KEMPER, 1998).

Uma espécie recentemente avaliada quanto ao catabolismo de lisina foi a *Oriza sativa* (GAZIOLA, *et al*, 1997). A LKR/SDH desta planta tem aproximadamente metade da atividade enzimática encontrada em milho após purificação envolvendo precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cromatografia de troca aniônica e de filtração em gel. As atividades de ambos os domínios estão localizadas num mesmo polipeptídeo, com massa molecular de 202kDa, determinada por filtração em gel e por PAGE. Neste caso, uma segunda banda de 396kDa, com ambas as atividades de LKR e SDH, em gel nativo, indicam a presença de uma estrutura multimérica.

A concentração de lisina na semente de feijão é bastante alta, de forma que o mecanismo de síntese e degradação do aminoácido nesta planta deve ser elucidado para que se compreenda a maneira como a lisina é acumulada neste tecido. Até o presente momento, nenhum estudo havia sido feito sobre a atividade da LKR /SDH em *Phaseolus vulgaris* e poucos trabalhos abordaram o catabolismo

deste aminoácido em leguminosas (TANG *et al.* 1997 e MIRON *et al.* , 1997). No entanto, estas investigações poderão corroborar com as já existentes, no sentido de elucidar as causas que levam a uma menor concentração de lisina em cereais, quando comparada à planta em estudo.

Os vegetais são modelos muito atrativos para pesquisas envolvendo a regulação de biossíntese e catabolismo de lisina, não apenas devido a importância nutricional deste aminoácido, mas também porque seu acúmulo está sujeito a uma complexa regulação que aparenta ser tecido e planta - específicos.

## II. OBJETIVOS

1. Determinação da atividade da LKR/SDH em diferentes tecidos de *P. vulgaris*.
2. Avaliação *in vitro* da resposta enzimática à presença de lisina no meio de crescimento.
3. Caracterização da enzima do hipocótilo (perfil de precipitação protéica, resposta à inibidores de protease e a inibidores de fosfatase).
4. Isolamento e purificação da LKR/SDH

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Cultivo e coleta de plantas

As sementes de *Phaseolus vulgaris*, variedade carioca, foram tratadas com hipoclorito de sódio (25%), por 10min. À seguir foram transferidas para etanol 70% (3 min.), lavadas com água milli-Q e colocadas para germinar em vermiculita autoclavada, na câmara escura de crescimento (20°C) do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP. O processo de esterelização (das bandejas de plantio e das sementes) foi desenvolvido em capela e as plantas foram regadas com água estéril devido à contaminação por fungos, muito comum em plantas estioladas de feijão. A germinação das sementes e crescimento das plântulas usadas em todos os ensaios procedeu-se da forma descrita, salvo exceções, citadas individualmente ao longo da metodologia.

Dez dias após a germinação, ou logo após a emergência da folha cotiledonar, as plantas foram coletadas em nitrogênio líquido no escuro, separando-se folhas verdadeiras, raízes, hipocótilos e cotilédones, os quais foram armazenados à  $-70^{\circ}\text{C}$ . As vagens e sementes foram extraídas de plantas adultas, cultivadas em campo, coletadas e armazenadas da mesma maneira. Todos os dados foram obtidos da variedade carioca de *Phaseolus vulgaris*, com algumas exceções, citadas no decorrer deste capítulo.

### **Isolamento enzimático de diferentes tecidos**

Neste ensaio a LKR/SDH foi isolada de diferentes tecidos de feijão - carioca e do endosperma de milho, como descrito por MARKOVITZ e CHUANG (1987), com pequenas modificações. Outros tipos de *Phaseolus vulgaris* denominados de feijão-preto e feijão-branco (adquiridos em mercado local, crescidos em câmara escura, coletados e armazenados da mesma forma que a variedade carioca) foram usados como parâmetros de comparação neste ensaio. As plantas de milho foram crescidas em campo no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, autopolinizadas, coletadas em nitrogênio líquido no 18<sup>o</sup> dia após a polinização (DAP) e armazenadas à - 70<sup>o</sup>C. Os passos seguintes foram executados à 4<sup>o</sup>C. Os tecidos (15g de cada tipo) foram homogeneizados (3:5 p/v) em tampão A, constituído de fosfato de sódio 50mM (pH7.4), contendo DTT 1mM, EDTA 1mM e Benzamidina 15mM, em homogeneizador SUPERHOM. Após filtragem em 3 camadas de gaze, seguiu-se centrifugação do material à 20000g por 10 min. e nova filtragem do sobrenadante. Foi retirada uma alíquota para medida da atividade enzimática do extrato bruto (EB), abaixou-se o pH para 5.5 com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e adicionou-se PEG 8000 até uma concentração final de 15,0%. As amostras foram centrifugadas à 20000g por 10min. e o material em sedimento, contendo atividade da LKR e da SDH, foi ressuspensão em tampão B, constituído de Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, contendo EDTA 1mM e DTT 1mM.

### **Determinação Protéica**

A concentração de proteínas (ug/mL) presente nas diferentes amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), com o kit *Bio-Rad protein assay*. A albumina de soro bovina (BSA) foi usada como padrão.

### **Ensaio enzimáticos**

A atividade da LKR foi medida espectrofotometricamente, a 340nm, na direção de NADPH para NADP<sup>+</sup>, a 30<sup>o</sup>C, como descrito por BROCHETTO-BRAGA *et al* (1992) com pequenas modificações. Os reagentes somaram um volume final de 0.8mL, contendo lisina 20mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 10mM (neutralizado a pH 7.0 com KOH), NADPH 0.1mM, Tris-HCL 15mM (pH7.4) e H<sub>2</sub>O Milli-Q (q.s.p.800ul). Os controles foram feitos procedendo-se ao ensaio enzimático como descrito acima, na ausência de lisina. A atividade da SDH também foi medida espectrofotometricamente, à 340nm, seguindo a redução de NAD<sup>+</sup> para NADH, em reação cujo volume final foi de 0.8mL, contendo sacaropina 1mM, NAD<sup>+</sup> 0.4mM, Tris-HCL 100mM (pH8.5) e H<sub>2</sub>O qsp 800ul. Os controles foram realizados como descrito, na ausência de sacaropina. Diferentes volumes de extratos enzimáticos foram utilizados para medida de atividade da LKR e SDH, de acordo com o tecido e a etapa de isolamento.

Os dados obtidos da curva de absorbância foram transformados em unidades enzimáticas totais (ou por g de tecido) e em atividade específica (unidade por mg de proteína). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a reação necessária para oxidar 1 nmol de NADPH (LKR) ou reduzir 1nmol de  $\text{NAD}^+$  (SDH) , por minuto, à 30°C.

### **Análise estatística**

Os resultados de cada experimento são apresentados como a média aritmética entre três (ou mais) repetições, acrescidas de erro ou desvio padrão.

### **Fracionamento com PEG 8000**

O Polietileno Glicol age diminuindo a solubilidade protéica e causando sua precipitação por um mecanismo de exclusão, onde as proteínas ficam confinadas ao espaço inter-polímeros. Ao contrário dos sais como o sulfato de amônio (também usado para precipitação protéica), essa queda na solubilidade independe da força iônica do meio e sim do tamanho da proteína e do polímero (INGHAM,K.C., 1990).

60 gramas de tecido do hipocótilo de feijão foram homogeneizados (1:2 p/v) em tampão A , filtrados e centrifugados à 20000g. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante para medida da atividade de LKR/SDH no extrato bruto. O pH foi abaixado para 5.5 com  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e as proteínas foram

precipitadas com PEG 8000 por 30 min. Para obtenção do perfil de precipitação protéica procedeu-se da seguinte maneira: o extrato foi dividido em frações de igual volume e foram adicionadas porcentagens crescentes de PEG-8000, partindo sempre do extrato bruto (0% de PEG) e aumentando 1.5% na concentração a cada amostra (0, 1.5, 3.0, 4.5...até 19.5%). Decorridos 30 min., o material foi centrifugado à 20000g por 10 min. e o sedimento contendo a atividade enzimática foi ressuspenso em tampão B. 50 ul do extrato enzimático foram utilizados para a leitura da LKR e 100ul para a SDH.

## **FATORES QUE PODEM AFETAR A ATIVIDADE DA LKR/SDH**

### **Disponibilidade de lisina no meio de cultivo**

300 sementes de *Phaseolus vulgaris* foram tratadas (como citado anteriormente) e germinadas em papel de filtro autoclavado sobre bandejas estéreis no escuro. Após emissão da radícula os eixos embrionários foram retirados das sementes, transferidos para meio de cultura contendo micro e macronutrientes (*Murashige and Skoog Basal Salt Mixture 50%-Sigma*), pH 5.4, acrescidos de *Phytigel Plant / Gellan Gum agar substitute 50%-Sigma*.

Metade das plantas cresceram em meio contendo lisina numa concentração de 10 mM e a outra metade em meio sem lisina. Após 72 horas de crescimento sob irradiância constante de  $50\text{umol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , as plântulas foram

coletadas (uma média de 13 gramas por tratamento) e sujeitas a ensaio para medida de atividade enzimática. Todos os tecidos foram homogeneizados conjuntamente, não havendo separação entre os órgãos. A extração e o isolamento da enzima seguiram como descrito anteriormente. Foram determinadas as atividades enzimáticas do extrato bruto e das duas frações protéicas, precipitadas com 7.5% e 7.5-17.0% de PEG8000. A medida de atividade da LKR/SDH foi realizada com 80 ul do EB e 30ul do extrato enzimático de ambas as frações protéicas .

#### Inibidores de protease

Quatro amostras de 30 g de hipocótilo de feijão foram homogeneizadas (3:5p/v) em SUPERHOM. A primeira foi extraída com tampão fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50mM, contendo DTT 1mM, EDTA 2mM e Benzamidina 15mM ; a segunda no mesmo tampão contendo os inibidores de protease Aprotinina 50uM , Leupeptina 100uM e PMSF 0.5mM; a terceira e a última com tampão A contendo os mesmos inibidores de protease acrescidos de NaF 1mM e 25mM, respectivamente. Após homogeneização o material foi filtrado em 3 folhas de gaze e centrifugado a 20000g por 10min a 4°C. Abaixou-se o pH das amostras para 5.5 com  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e as proteínas foram precipitadas com PEG 8000 na concentração de 15%. O material sedimentado foi ressuspenso em tampão B em todos os tratamentos. Nos ensaios enzimáticos foram utilizados 25uL do extrato enzimático, tanto para determinação da LKR quanto da SDH.

### Inibidores de Fosfatase

Para todos os ensaios descritos abaixo foram utilizados 15g de tecido, os quais foram homogeneizados em tampão A (3:5p/v). As variações referentes aos componentes deste tampão de extração e do tampão B são descritas a seguir. Todos, inclusive os do controle, foram acrescidos de 2% BSA e 0.5mM do inibidor de protease PMSF.

Os inibidores de fosfatase foram adicionados ao tampão A e B em concentrações crescentes nos quatro tratamentos efetuados, excetuando-se o controle. Quatro tipos foram estudados: molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), fluoreto de sódio (NaF), vanadato ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) e o EDTA, que pode atuar como inibidor de fosfatases que se ligam à resíduos de tirosina e de serina (PROMEGA, 1996). As concentrações destes inibidores encontram-se nas legendas das figuras, no capítulo de resultados.

Além do EB, duas frações protéicas precipitadas com 7.5% e 7.5-15.0% de PEG 8000 tiveram atividade enzimática determinadas usando-se, tanto para LKR quanto para SDH, 60 $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. A atividade da LKR foi medida espectrofotometricamente, a 340nm, na direção de NADPH para  $\text{NADP}^+$ , a 30 $^\circ\text{C}$ , como descrito por BROCHETTO-BRAGA *et al* (1992) com pequenas modificações. Os reagentes somaram um volume final de 0.8mL, contendo lisina 20mM,  $\alpha$ -cetogluturato 10mM (neutralizado a pH 7.0 com KOH), NADPH 0.1mM, Tris-HCL 175mM (pH7.4) e  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q (q.s.p.800 $\mu\text{l}$ ). O controle foi feito procedendo-se ao ensaio enzimático como

descrito, porém, na ausência de lisina. A atividade da SDH também foi medida espectrofotometricamente à 340nm, seguindo a redução de NAD<sup>+</sup> para NADH em reação cujo volume final foi de 0.8mL, contendo sacaropina 1mM, NAD<sup>+</sup> 0.4mM, Tris -HCL 100mM (pH8.5) e H<sub>2</sub>O qsp 800ul. O controle foi feito na ausência de sacaropina, como descrito acima.

### **BSA**

30g de tecido de hipocótilo foram extraídos em tampão A (3:5p/v) contendo 2%BSA e 30g no mesmo tampão sem BSA . Retirou-se uma alíquota dos extratos brutos para medida da atividade enzimática. Após precipitação com 7.5% de PEG 8000, o material sedimentado foi ressuspenso em tampão B contendo 2%BSA (ou sem BSA, no controle). Os sobrenadantes seguiram precipitação com PEG 8000 (7.5 - 15.0%) por 30 min. e foram centrifugados a 20000g por 10min. a 4<sup>o</sup>C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado foi ressuspenso em tampão B contendo, ou não (controle) 2%BSA. Para determinação da atividade da LKR e da SDH foram utilizados 60uL do extrato enzimático .

### **Decaimento da atividade enzimática *in vitro***

O material vegetal usado neste ensaio foi o hipocótilo de plântulas estioladas de três tipos de *Phaseolus vulgaris* (a variedade carioca, o feijão-branco e o feijão-preto ) e o endosperma de plantas selvagens de *Zea mays* .

Os passos seguintes sucederam-se à 4°C. Foram homogeneizadas 15g de tecido em tampão A (3:5 p/v) contendo BSA na concentração de 2% e PMSF 0.5mM. Após centrifugação a 20000g por 10min. e filtragem do sobrenadante, abaixou-se o pH para 5.5 com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e precipitou-se as proteínas com PEG 8000 na concentração de 15%. O material sedimentado foi ressuspenso em tampão B e a atividade enzimática da LKR e da SDH foi estimada a intervalos regulares, durante um período de 50 horas (o extrato foi mantido em geladeira à 4°C entre os ensaios). O mesmo procedimento foi feito com o extrato enzimático do endosperma de milho .

Esse experimento teve como objetivo comparar o grau de estabilidade do sistema LKR/SDH do material em estudo com o de milho, reconhecidamente estável dentro do período de tempo investigado. Para tal, foi plotada uma curva de atividade enzimática X tempo para cada planta, as quais foram ajustadas para uma regressão linear . A partir da equação da reta foi possível determinar o tempo que a enzima leva para perder metade da atividade máxima ( $t_{1/2}$ ), dado que reflete uma estabilidade aproximada da proteína em estudo.

### **Variações na irradiância durante o desenvolvimento vegetal**

As sementes foram tratadas e germinadas em vermiculita autoclavada, como descrito previamente. Três condições de irradiância foram aplicadas durante o crescimento vegetal: câmara escura (irradiância = 0); câmara clara (do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP) com

irradiância constante de  $44.6 \text{ umol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e casa de vegetação (do mesmo Departamento), com 72% da irradiância total (100% = exposição direta ao sol). Os valores foram obtidos com o sensor de irradiância LI-190SA-LI-COR acoplado ao Dataloffer LI-1000.

Após 10 dias as plantas foram coletadas, os tecidos referentes aos diferentes órgãos foram separados e congelados em nitrogênio líquido. A medida da atividade enzimática seguiu como nos ensaios anteriores.

## **PURIFICAÇÃO DA LKR/SDH**

### **Método 1**

A LKR/SDH do hipocótilo foi purificada de maneira semelhante à utilizada por GONÇALVES-BUTRUILLE, *et al* (1996) na purificação da enzima do endosperma de milho. Os passos seguintes foram executados à  $4^{\circ}\text{C}$ .

400g de tecido foram homogeneizados em tampão A (para maior estabilidade enzimática foram acrescentados os inibidores de protease PMSF 0.5mM, Aprotinina 50uM e Leupeptina 100uM), filtrados e centrifugados à 20000g por 10 min. Após retirada de alíquota para medida da atividade do extrato bruto, o pH foi abaixado para 5.5 com  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e adicionado PEG 8000 até uma concentração final de 7.5%. As amostras foram centrifugadas à 20000g por 10min., e o material sedimentado contendo atividade da LKR e da SDH foi ressuspensado em tampão B. O sobrenadante foi precipitado com PEG

8000 na concentração de 7.5%-15.0% e o sedimento, após centrifugação à 20000g por 10min., foi ressuspensão em tampão B .

Dialisou-se o material em tampão B durante 12 horas seguindo centrifugação por 10min. à 20000g e inoculação em coluna cromatográfica DEAE – Sephacel. Após eluição, num gradiente de 0-500mM NaCl, as frações contendo atividade de LKR/SDH foram reunidas e precipitadas com 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durante 30 minutos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos à 20000g, dialisada em tampão B por 12 horas e inoculada em coluna de troca iônica Protein Pak Q 8HR (Waters), num gradiente de 0-500mM NaCl, em HPLC. As frações que demonstraram atividade para LKR/SDH foram reunidas e as proteínas foram precipitadas com 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  seguindo diálise contra o tampão B por 12 horas. Após centrifugação à 20000g por 10min. o material foi aplicado em HPLC na coluna de filtração Superdex 200HR 10/30 (Pharmacia) em tampão B (contendo 300mM NaCl). As frações coletadas tiveram sua atividade enzimática dosadas segundo ensaio enzimático descrito anteriormente. Foram usados volumes variados de enzima, de acordo com a etapa de purificação e com a atividade em questão no ensaio (LKR ou SDH). Em todas os passos do procedimento de purificação os extratos tiveram concentração protéica determinada, com o objetivo de se calcular os valores de atividade específica. . Uma alíquota do material purificado foi resguardado para avaliação de massa molecular em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), segundo LAEMMLI (1970).

O gráfico do  $K_{av} \times \log$  da MM obtido com dados dos padrões de peso molecular (tiroglobulina, ferritina, catalase, BSA e ovoalbumina) após cromatografia em Superdex 200HR 10/30 (no mesmo tampão que a enzima em estudo) foi usado para estimar a massa molecular, segundo LAUE e RHODES (1990).

### SDS-PAGE

As proteínas foram separadas em gel denaturante de poliacrilamida, numa concentração de 8%. 4.0ug de proteína (em estágios consecutivos da purificação da LKR/SDH de *Phaseolus vulgaris*), foram aplicadas em cada recipiente do gel equivalentes a (ao) : 1, Extrato Bruto; 2, Fração precipitada com PEG8000; 3, cromatografia de troca iônica DEAE Sephacel; 4, cromatografia de filtração em gel, Superdex 200HR 10/30; 5, LKR/SDH purificada de *Zea mays* e 6, o padrão de peso molecular 10kDa *protein ladder* (GIBCO-BRL). A diferença na metodologia de extração das enzimas de ambas as plantas (feijão e milho) é que a única fração protéica utilizada para purificação da enzima em *Zea mays* foi a precipitada com 7.5-15.0% de PEG8000, que reúne maior atividade enzimática nesta espécie. O processo foi realizado em amperagem constante (de 15mA) e, após revelação com *Commassie Blue*, o peso molecular foi determinado pelo programa ELETRO (autoria do Prof. Adilson Leite, CBMEG - UNICAMP).

A amostra de LKR/SDH purificada do hipocótulo de feijão foi concentrada 9X em Amicon - 30 e comparada à enzima do endosperma de

milho num segundo SDS-PAGE (8%). 4.0ug de proteína foram aplicadas nos recipientes 1, enzima de *Phaseolus vulgaris* e 2, *Zea mays*.

### **WESTERN BLOTTING**

A produção dos anticorpos policlonais foi feita anteriormente a este estudo, no CBMEG, segundo metodologia básica de DUNBAR e SCHWOEBEL (1990). Para testar a afinidade de enzimas LKR/SDH purificadas do hipocótilo de feijão-carioca, por anticorpos produzidos contra a mesma enzima do endosperma de milho, utilizou-se um ensaio de *Western Blot*, segundo TIMMONS e DUNBAR (1990). Primeiramente foi feito um gel denaturante de poliacrilamida (8%) aplicando-se neste amostras de proteínas das etapas consecutivas de purificação pelo Método 1, que são: extrato bruto, fração protéica precipitada com PEG8000 e dialisadas, amostra eluída após inóculo em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel e diálise, amostra eluída após inóculo em coluna de troca iônica Protein-Pak 8Q em HPLC e após coluna de filtração Superdex 200HR 10/30, em HPLC. O perfil eletroforético destas amostras foi comparado ao da enzima purificada de milho e ao padrão de peso molecular *pre-stained*.

Após eletroforese o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Tris-HCl 25mM, Glicina 190mM e 20% metanol) por 10 minutos. A transferência das proteínas para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham)

foi feita à 0.8 mA/cm<sup>2</sup> (utilizando-se aparelho Multiphor Novablot, LKB) , por 2 horas. A membrana foi bloqueada durante a noite à 4°C em solução bloqueadora (20mM Tris-HCl, pH7.4, 137mM NaCl, 0.1% Tween 20 e 5% Molico (Nestlé). Todos os passos subsequentes foram realizados à temperatura ambiente, sob agitação. A reação com o anticorpo primário (anti-LKR/SDH de milho) foi realizada por 2 horas, em tampão Tris-HCl, pH 7.4, NaCl 137mM e 5% Molico (Nestlé). A membrana foi lavada 3 x 15 min. com Tris HCl, pH 7.4, 137mM NaCl e 0.05% Tween 20. A reação com o anticorpo secundário (*Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate* -Sigma) foi realizada por duas horas em tampão Tris-HCl, pH 7.4, NaCl 137mM. Novamente a membrana foi lavada 3 x 15 minutos com Tris-HCl, pH 7.4, NaCl 137mM e 0.05% Tween 20. A membrana foi equilibrada com Tris-HCl 10mM, pH 9.5, NaCl 100mM e MgCl<sub>2</sub> 50mM ,por 5 minutos e colocada em solução reveladora (Tris-HCl 10mM, pH 9.5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM e CSPD 1:000 (Tropix), no escuro, por 20 minutos. O excesso de solução reveladora foi retirado e a membrana exposta em filme de auto-radiografia (Amersham) por 15-20 minutos à temperatura ambiente.

## **ISOLAMENTO ENZIMÁTICO**

### **Método 2**

Este método foi adaptado para *Phaseolus vulgaris* devido a rápida perda de atividade da LKR ao longo do processo de purificação nesta planta. O procedimento é seis vezes mais rápido que o Método 1 (com duração de

12horas), mantendo-se ambas as funções enzimáticas (de redutase e de desidrogenase). Além do tempo de extração, diversas características dos tampões utilizados foram modificadas na tentativa de se melhorar a estabilidade enzimática.

Todas as etapas a seguir foram feitas à 4°C. 100g de tecido de hipocótilo foram homogeneizadas (1:2 p/v) em tampão K-PO<sub>4</sub> 100mM, pH 7.0, contendo DTT 1mM, EDTA 1mM, BSA 2%, PMSF 0.5mM, lisina 2mM, α-cetoglutarato 2mM (substratos da LKR), e 5% PVPP, adicionado no momento da homogeneização. A amostra foi filtrada em três camadas de gaze e centrifugada à 20000g por 10 min. Retirou-se uma alíquota do extrato bruto para medida da atividade enzimática e o material seguiu para precipitação em 35% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por 30 min. Após centrifugação à 20000g por 10min. o sobrenadante foi sujeito à nova precipitação com, de 35-70%, por 30 min. e foi centrifugado à 20000g por 10min . A purificação seguiu apenas com a segunda fração protéica (35-70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ), já que a primeira apresentou atividade enzimática muito baixa. O material sedimentado foi ressuspenso em tampão KPO<sub>4</sub> 100mM, pH 7.0 contendo lisina 2mM e α-cetoglutarato 2mM, uma alíquota foi retirada para medida das atividades enzimáticas e o restante seguiu cromatografia em coluna Sephadex G-50 (no mesmo tampão). 6.0mL do extrato enzimático foram aplicados a coluna e coletados em alíquotas de 500uL. Apenas a fração com maior atividade enzimática (de LKR e SDH) foi aplicada (500uL) em coluna Superdex - 200 HR 10/30. Nesta coluna de filtração foi

utilizado o Tampão Tris-HCl 50mM, pH 7.0, contendo NaCl 300mM, DTT 1mM, EDTA 1mM, PMSF 5mM.

Todas as etapas de purificação tiveram atividade de redutase e desidrogenase determinadas e concentração protéica dosada pelo método de BRADFORD (1976), com o kit *protein assay* da Bio Rad.

## IV. RESULTADOS

### Atividade enzimática em diferentes tecidos

A maior atividade por grama de massa fresca, foi encontrada na folha (**Figura. 01A**) e a maior atividade específica no hipocótilo (**Figura. 01B**) de *P. vulgaris*. A atividade por miligrama de proteína da LKR/SDH em folhas, vagens e raízes demonstrou ser muito baixa, chegando a praticamente zero em sementes e cotilédones. Comparando-se a atividade específica da LKR/SDH (após precipitação com PEG 8000) do endosperma de milho com a do hipocótilo de feijão, vemos que a primeira é aproximadamente 12 vezes maior (**Figura. 01B**).

A distribuição desta enzima nos tecidos demonstrou ser semelhante entre a variedade carioca 80 e outros tipos de *P. vulgaris* denominados popularmente de feijão-preto e feijão-branco. A atividade enzimática foi maior na folha, estando em torno de 15 unidades por grama de massa fresca (**Figura 02**), e a maior atividade específica (**Figura 03**) no hipocótilo, (aproximadamente 8 unidades/ mg de proteína) para todas as plantas estudadas. Os outros tecidos não demonstraram ocorrência mensurável da via de catabolismo de lisina.

A atividade da LKR/SDH nos diferentes tecidos (**Figuras 1 e 2**) refere-se a enzima de plantas estioladas de *P. vulgaris*, coletadas logo após a emergência da folha cotiledonar (10 dias após a germinação) e plantas adultas (sementes e vagens), crescidas em campo (**Figura 1**). Tecidos em diferentes estágios de maturação não foram objetos de investigação já que o objetivo principal

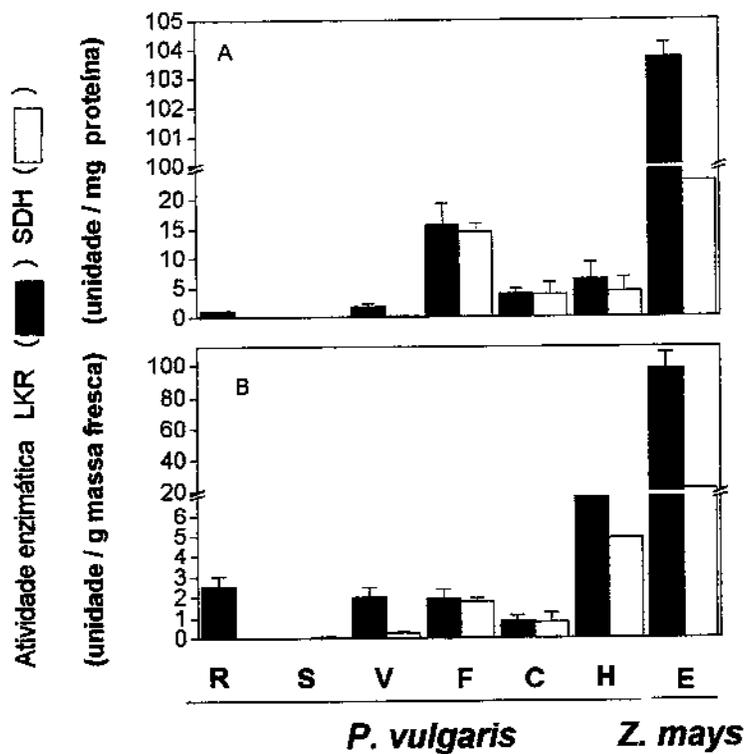
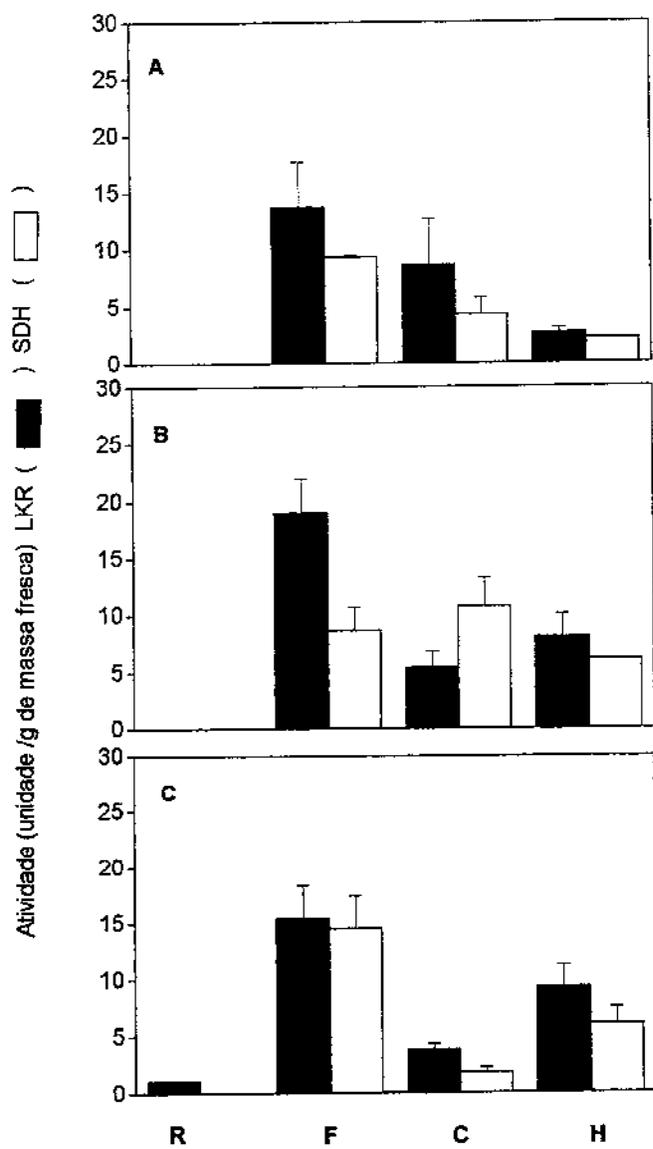
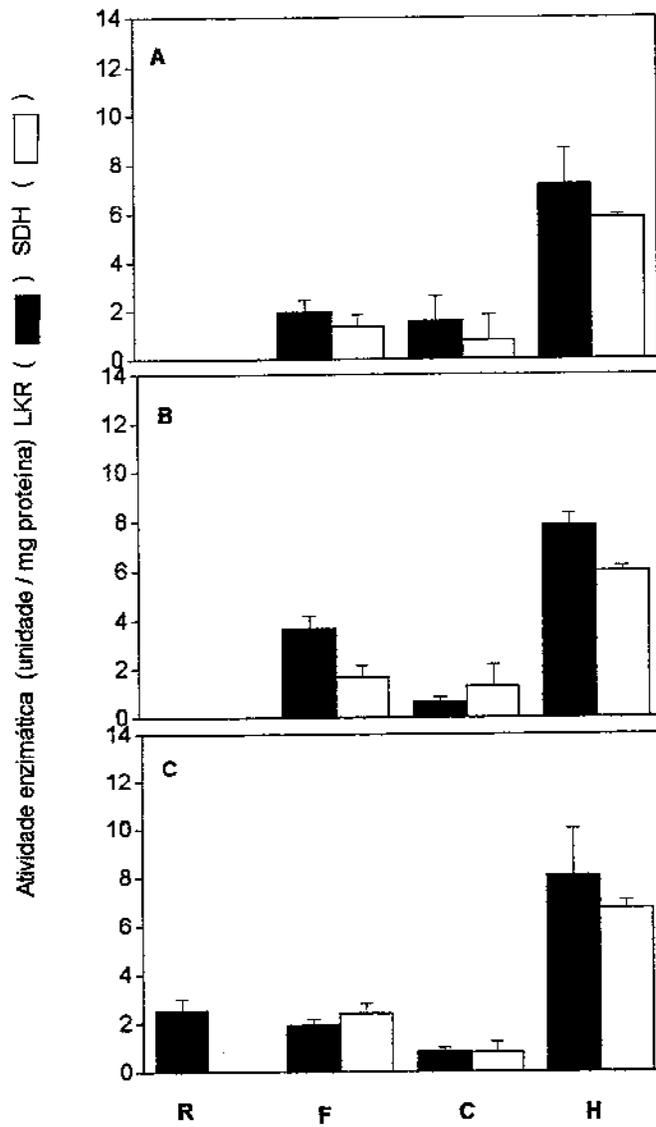


Figura 01. Atividade enzimática total (A) e específica (B) da LKR/SDH nos diferentes tecidos de *Phaseolus vulgaris* e no endosperma de *Zea mays*. F, folha; C, cotilédone; H, hipocótilo e E, endosperma. Foram utilizadas enzimas precipitadas com 15% PEG 8000. As barras acima das colunas representam o erro padrão (n=3).



**Figura 02.** Atividade enzimática da LKR e SDH em (A) feijão-branco, (B) feijão-preto e (C) carioca 80. R, raiz; F, folha; C, cotilédone e H, hipocótilo. Foram utilizadas proteínas precipitadas com 15% PEG 8000. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).



**Figura 03.** Atividade específica da LKR e SDH em (A) feijão-branco, (B) feijão-preto e (C) carioca 80. R, raiz; F, folha; C, cotilédone e H, hipocótilo. Foram utilizadas proteínas precipitadas com 15% PEG 8000. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).

deste trabalho foi o estudo das propriedades físico-químicas da enzima, assim como a sua purificação.

De acordo com estes resultados (**Figura 1, 2 e 3**) puderam ser escolhidos espécie e órgão vegetal mais apropriados para caracterização e purificação da enzima.

### **Fracionamento com PEG 8000**

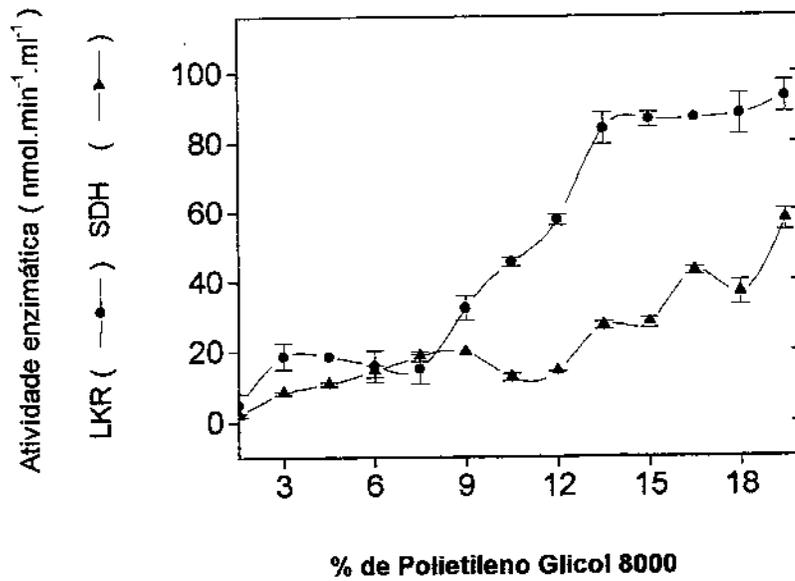
Foi observado que a SDH aumenta progressivamente nas frações até 19,5% de PEG (**Figura 04**) enquanto a LKR revelou dois platôs de atividade enzimática, das proteínas precipitadas com 3,0 - 7,5% e 13,5 - 19,5% de PEG-8000. A partir deste resultado, alguns aspectos investigados avaliaram separadamente as frações protéicas, com o intuito de investigar a possibilidade de haver duas isoformas da enzima em *P. vulgaris*.

Para seleccionar a totalidade das proteínas de cada platô, alguns ensaios posteriores utilizaram duas precipitações com PEG 8000. Primeiramente com 7,5% e depois com 7,5-15,0% PEG, utilizando-se o sobrenadante da primeira precipitação.

## **FATORES QUE PODEM AFETAR A ATIVIDADE DA LKR/SDH**

### **Disponibilidade de lisina no meio de cultivo**

A presença de 10mM lisina no meio de crescimento da plântula não resultou em diferenças significativas na atividade específica da LKR /SDH (em nenhuma das



**Figura 04.** Perfil de atividade da LKR/SDH em diferentes frações protéicas do hipocótilo de *P.vulgaris*, precipitadas com concentrações crescentes de PEG 8000. As barras acima das colunas representam o erro padrão (n=3).

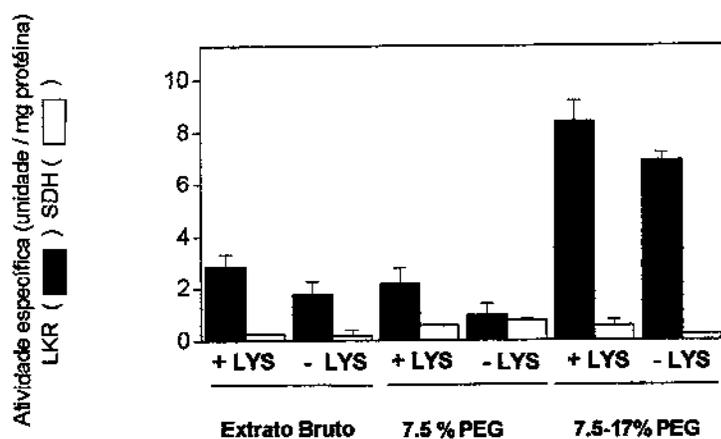
frações protéicas avaliadas) quando comparadas ao controle, crescido em meio sem lisina (**Figura 05**). A concentração de substrato escolhida para ser adicionada ao meio foi relativamente alta (10mM), comparada a outros estudos feitos anteriormente (KARCHI *et al* 1995), por injeção de lisina na vagem. Esse procedimento foi tomado garantir uma resposta enzimática mensurável, já que no presente estudo o aminoácido foi adicionado ao meio, tendo que ser absorvido previamente pela planta.

### **Inibidores de protease**

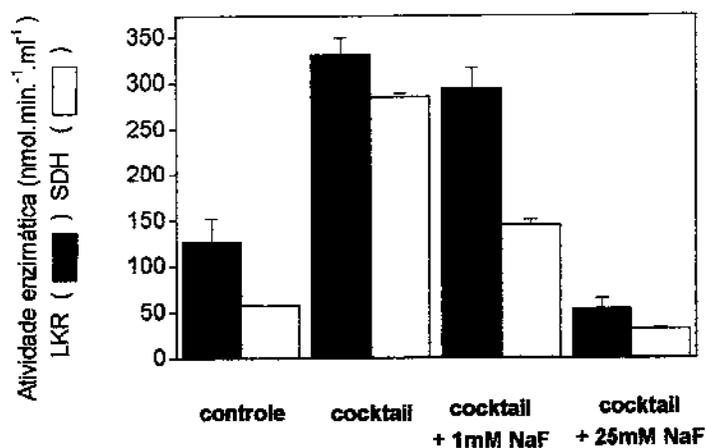
Alguns inibidores de protease adicionados ao tampão de extração (tampão A) foram favoráveis à atividade enzimática da LKR/SDH, indicando a ação de proteases no hipocótilo de feijão (**Figura 06**). Aqueles que melhoraram a atividade foram a Aprotinina (50uM), a Leupeptina (100uM) e o PMSF (0.5mM). O Fluoreto de Sódio (NaF) demonstrou ser inibitório quando adicionado nas concentrações de 1mM e de 25mM. Esses dados se referem ao conteúdo total de LKR/SDH (obtido da precipitação das proteínas com 15% PEG) e foram obtidos desta forma visando uma purificação posterior com o maior volume e atividade de enzima possível.

### **Inibidores de Fosfatase**

Os inibidores sintéticos de fosfatase utilizados no presente trabalho para avaliar o papel da fosforilação da LKR/SDH de *P. vulgaris* foram o vanadato (inibidor de fosfatases do tipo PP2A e 2C, que atuam sobre resíduos de serina-treonina); molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), inibidor de fosfatases que atuam sobre os mesmos



**Figura 05.** Atividade específica da LKR/SDH em plântulas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas na presença (+LYS) e ausência (- LYS) de lisina. Em ambas as condições, foi determinada a atividade enzimática no extrato bruto, fração PEG 7.5 % e fração PEG 7.5 -17%. Os extratos foram obtidos à partir da homogeneização conjunta de todos os tecidos da planta. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).



**Figura 06.** Efeito de inibidores de protease na atividade da LKR / SDH do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris*, extraída com tampão fosfato pH7.4, contendo DTT 1mM, EDTA 2mM e Benzamidina 15mM (CONTROLE); com o mesmo tampão acrescido dos inibidores de protease Aprotinina 50 uM; Leupeptina 100 uM e PMSF 0.5 mM (COCKTAIL); e com o COCKTAIL somado a 1mM e 25mM NaF. O extrato foi precipitado com PEG 8000 15% , centrifugado e ressuspenso usando Tris - HCl pH 8.5 com os mesmos inibidores. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).

resíduos; NaF, inibidor de proteínas tirosina-fosfatases (PTPases) e EDTA, usado como inibidor de PTPases, PPases-2A e 2B (proteínas serina-treonina). Todos esses inibidores são indicados para investigações de fosforilação protéica (PROMEGA, 1996) e demonstraram que, quando presentes no meio de extração enzimática, alteram a atividade da LKR/SDH em feijão, conforme relato a seguir.

#### Molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

As duas frações protéicas responderam de forma oposta em relação ao efeito causado pelo molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) na atividade enzimática (**Figura 07**). Enquanto a fração precipitada com 7.5% de PEG 8000 (denominaremos esta fração de A) sofreu aumento progressivo na atividade da LKR com o aumento na concentração do inibidor, a outra, precipitada com 7.5-15.0% (denominada neste estudo de fração B) sofreu diminuição na atividade, tanto da LKR, quanto da SDH, em concentrações à partir de 5mM. Esses dados indicam que na fração A a fosforilação da enzima (possivelmente num resíduo serina-treonina), foi favorável ao aumento na sua atividade enzimática, principalmente da função redutase (LKR). Já a atividade da fração B, demonstrou não ter sido favorecida pela manutenção da enzima no seu estado fosforilado.

#### Fluoreto de Sódio (NaF)

O Fluoreto de Sódio (NaF) revelou ser inibidor da atividade da LKR/SDH, mesmo quando presente em baixas concentrações (já havia sido testado como

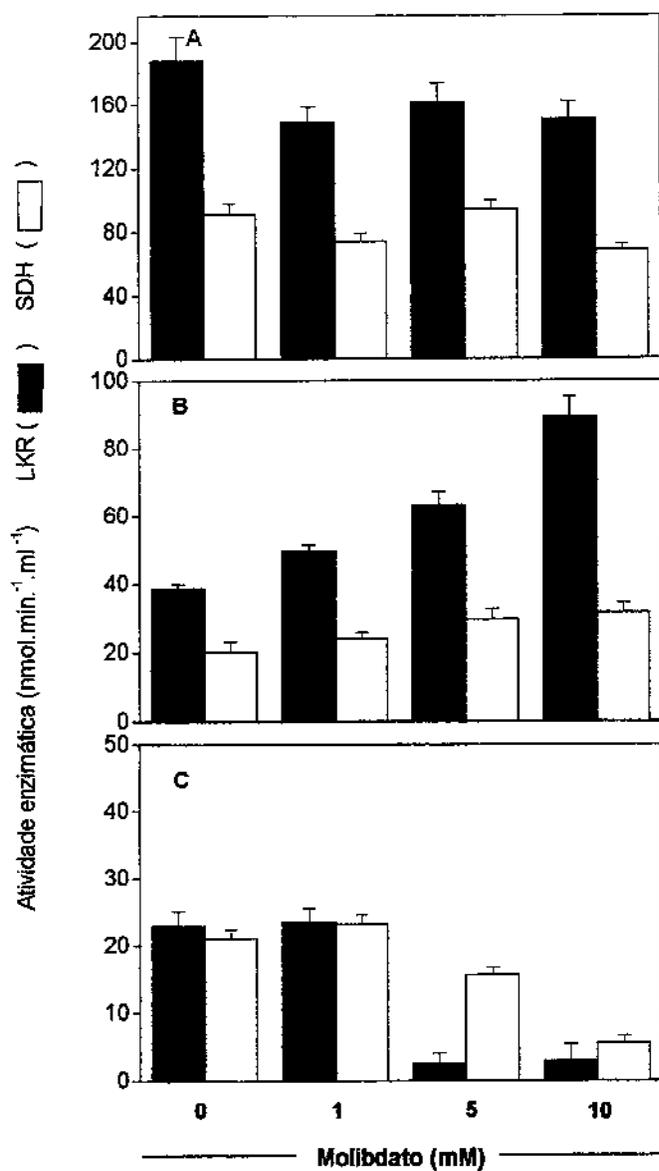
inibidor de protease (**Figura 06**) em concentrações maiores). Todos os valores em gradiente testados (0.3; 0.6; e 0.9mM) causaram pequena diminuição na atividade enzimática da LKR na fração A (**Figura 08**) e o mesmo ocorreu com a SDH, à partir de 0.6mM, na fração B. Como o NaF age sobre fosfatases que atuam sobre resíduos de tirosina, denominadas fosfotirosinas (PROMEGA, 1996), acreditamos que essas fosfatases (PTPases) não estão envolvidas no mecanismo de ativação enzimática.

### EDTA

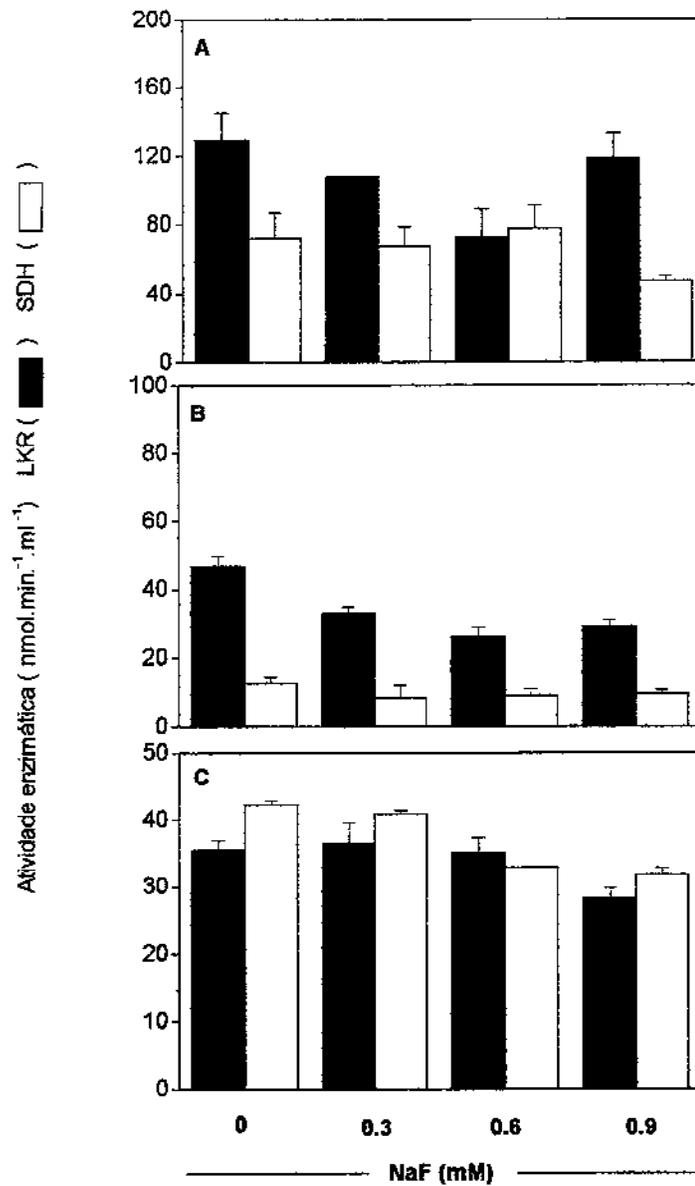
O EDTA é comumente usado como quelante de metais pesados durante processos de purificação. Porém, o reagente também pode ser utilizado como inibidor de fosfatases que atuam sobre resíduos de tirosina e resíduos de serina-treonina (PROMEGA, 1996). Neste ensaio, o EDTA foi usado com o intuito de impedir a desfosforilação de algum resíduo da enzima em estudo, que pudesse estar afetando a sua atividade.

Na fração A (**Figura 09**), não houve aumento significativo em nenhuma das funções enzimáticas (de redutase ou desidrogenase) com o aumento na concentração do EDTA. Já na fração B, houve queda tanto na atividade da LKR quanto da SDH, com o aumento nesta concentração.

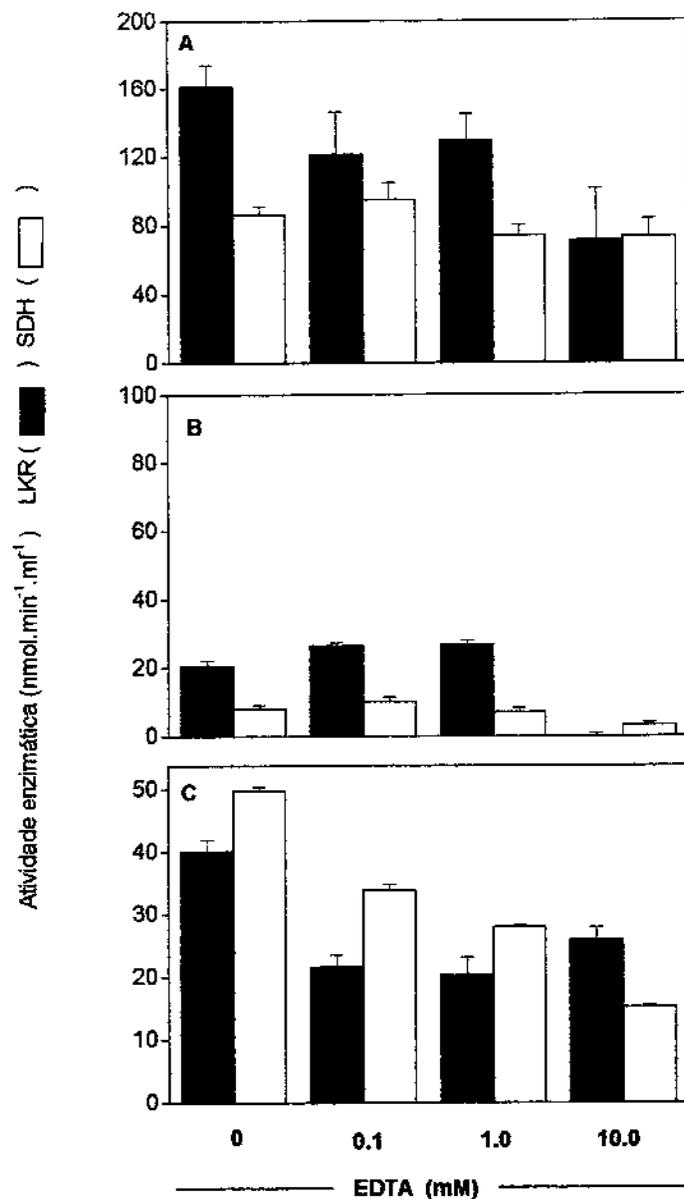
Um aspecto importante observado neste resultado é que numa das isoformas (fração B), o controle do ensaio (que não tinha EDTA acrescido aos tampões de isolamento enzimático) teve atividade significativamente maior do que os outros tratamentos, mesmo quando a concentração deste composto químico estava muito baixa (0.1mM).



**Figura 07.** Efeito do aumento na concentração de molibdato ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) na atividade enzimática total do (A.) extrato bruto, (B.) fração PEG 7.5 % e (C) PEG 7.5 - 15%. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).



**Figura 08.** Efeito do aumento na concentração de Fluoreto de Sódio na atividade enzimática total do (A) extrato bruto, (B) fração PEG 7.5 % e (C) PEG 7.5 - 15%. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).



**Figura 09.** Efeito do aumento na concentração de EDTA na atividade enzimática total do (A) extrato bruto, (B) fração PEG 7.5 % e (C) PEG 7.5 - 15%. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).

### Vanadato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )

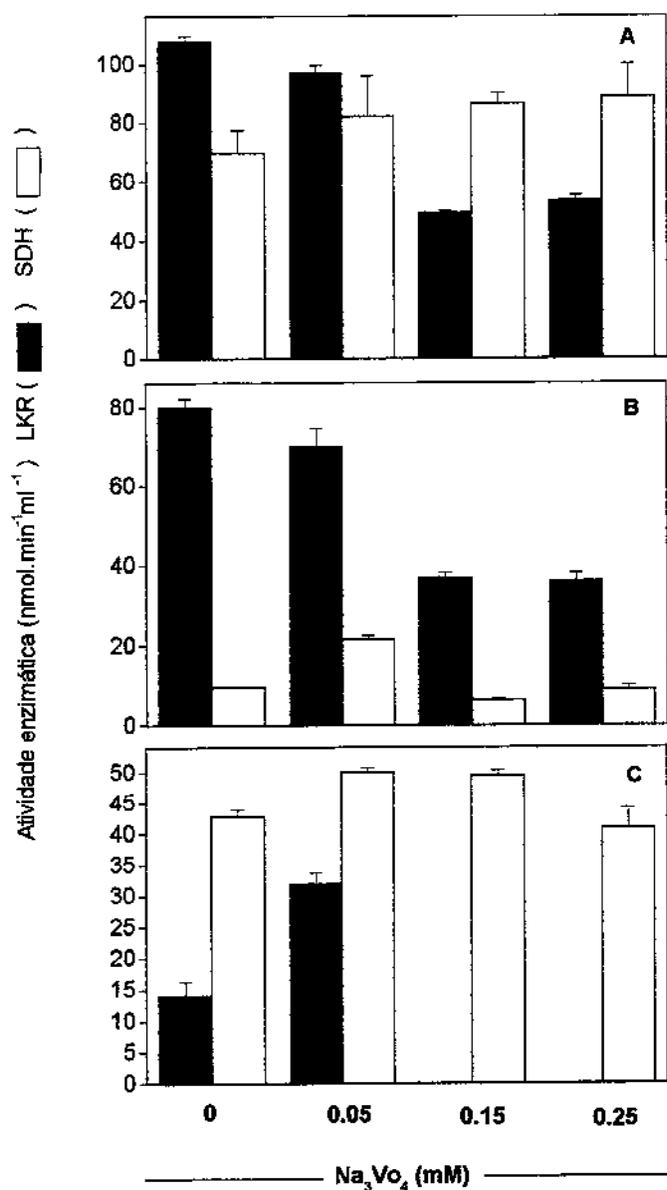
Devido à resposta positiva da enzima ao molibdato (obtida em ensaio anterior), 10mM desse inibidor foi adicionado ao tampão A e B para todos os tratamentos, incluindo o controle. Logo, esse resultado avalia uma ação conjunta de dois inibidores de protease, sendo o vanadato acrescido em concentrações crescentes, à cada tratamento.

Foram obtidas (**Figura 10**) respostas antagônicas nas duas frações enzimáticas avaliadas. Em um gradiente crescente (0, 0.05, 0.15 e 0.25mM) ocorreu diminuição progressiva na atividade da LKR na fração A. Já na fração B ocorreu aumento na atividade da LKR, até 0.05mM. À partir desta concentração houve inibição das duas funções enzimáticas.

### BSA

O BSA foi adicionado aos tampões de extração e isolamento da LKR/SDH com a intenção de protegê-la contra a ação das proteases e manter uma maior estabilidade da enzima. A albumina também age contra lipídeos e ácidos graxos impedindo que esses atuem complexando proteínas.

Este ensaio avaliou separadamente a resposta do extrato bruto e das duas frações protéicas denominadas A e B. Pelos resultados, pudemos observar que ambas responderam de maneira diferente à presença de albumina. Enquanto para a fração A o BSA não exerceu nenhuma influência significativa na LKR/SDH, a outra chegou a aumentar sua atividade em até 4 vezes, para as duas funções



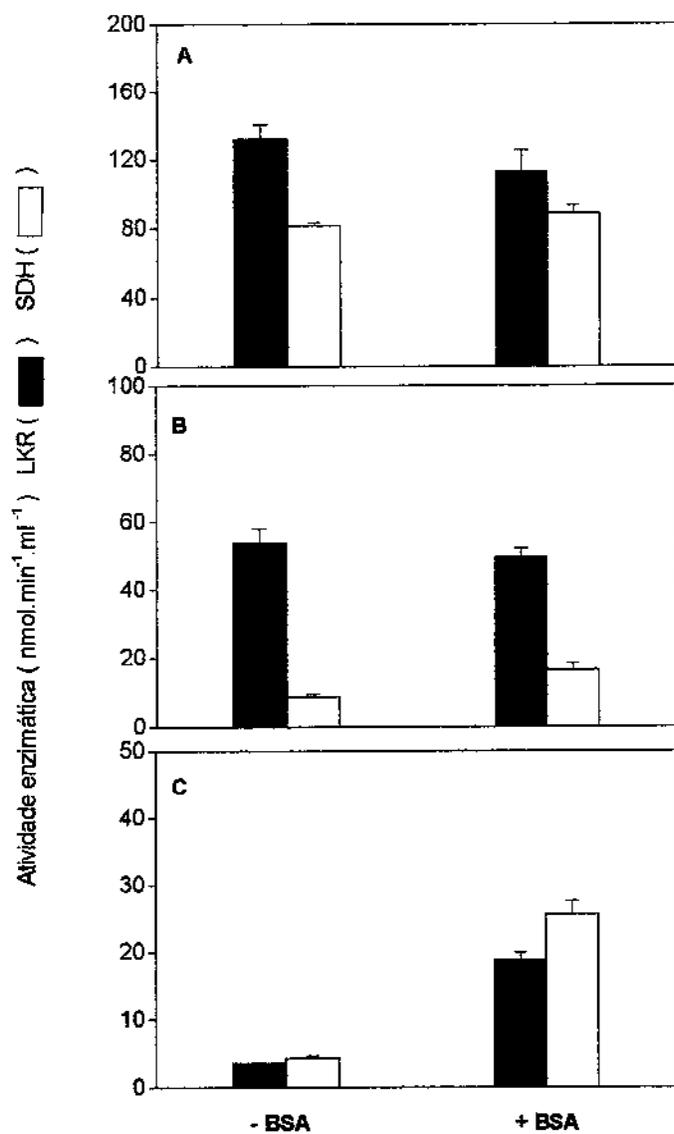
**Figura 10.** Efeito do aumento na concentração de Vanadato na atividade total do (A) extrato bruto, (B) fração PEG 7.5% e (C) PEG 7.5-15%. Os tampões de isolamento enzimático em todos os tratamentos, incluindo o controle, foram acrescidos de 10mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).

enzimáticas (**Figura 11**). Disso pode se concluir que a LKR/SDH pertencente a fração B é mais susceptível a proteção pelo BSA, mantendo melhor a conformação enzimática. Ou ainda, que as proteases, lipídeos e ácidos graxos atuam mais acentuadamente nesta fração protéica. As respostas diferentes entre as frações também refletem duas isoformas enzimáticas no hipocótilo de *P. vulgaris*.

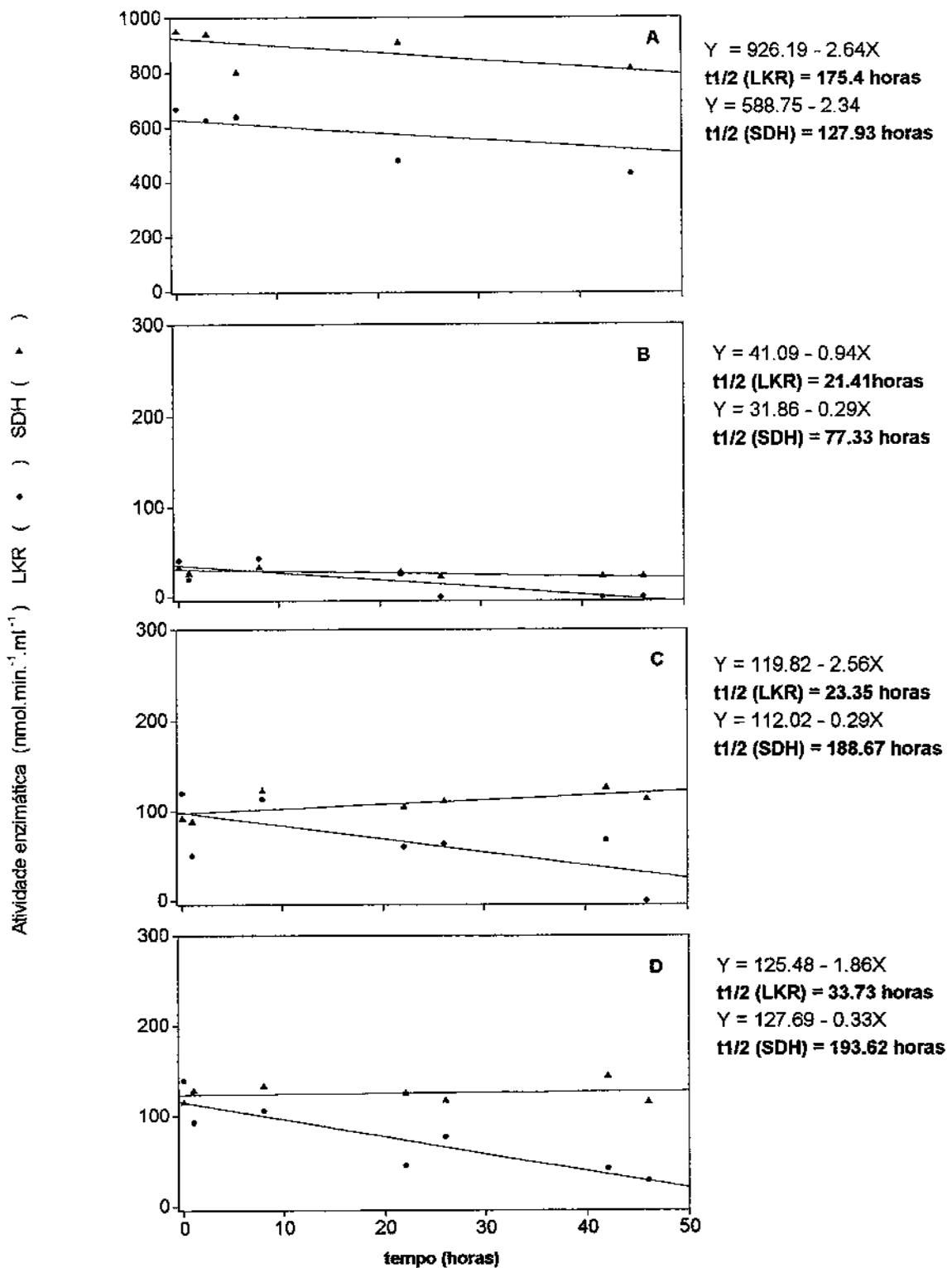
### **Decaimento *in vitro***

A atividade da LKR/SDH no hipocótilo de feijão medida ao longo de 50 horas, demonstrou que o  $t_{1/2}$  (tempo que a enzima leva para perder metade da atividade máxima) variou entre 21 (feijão-branco) e 33 horas (carioca) para a LKR e de 77 (feijão-branco) a 193 (carioca) horas para SDH (**Figura 12**). Esses fatos demonstram que em *P. vulgaris* a estabilidade enzimática da função redutase é de 3.6 a 5.8 vezes menor que a da desidrogenase. O feijão-carioca apresentou, dentre as plantas estudadas da mesma espécie, maior estabilidade para as duas funções enzimáticas.

No endosperma de milho (*Zea mays*), a enzima revelou (**Figura 12**) ser (10-12 X) mais ativa, que em *P. vulgaris*, possuindo um  $t_{1/2}$  de 175.4 horas para a LKR, o que indica estabilidade enzimática muito superior (até 8,33 vezes maior), comparada ao feijão carioca. Também foi observado que a relação entre o  $t_{1/2}$  da SDH e da LKR foi diferente em *Zea mays*, sendo que nesta planta a LKR mantém por mais tempo sua atividade ( $t_{1/2} = 175.4$  horas) comparada à SDH ( $t_{1/2} = 127.93$  horas), inverso do que procede em feijão.



**Figura 11.** Efeito da albumina na atividade enzimática da LKR/SDH. (A) extrato bruto, (B) fração PEG 7.5% e (C) fração PEG 7.5-15.0% do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* isolados na presença, ou não, de BSA 2%. As barras acima das colunas representam o erro padrão da média (n=3).



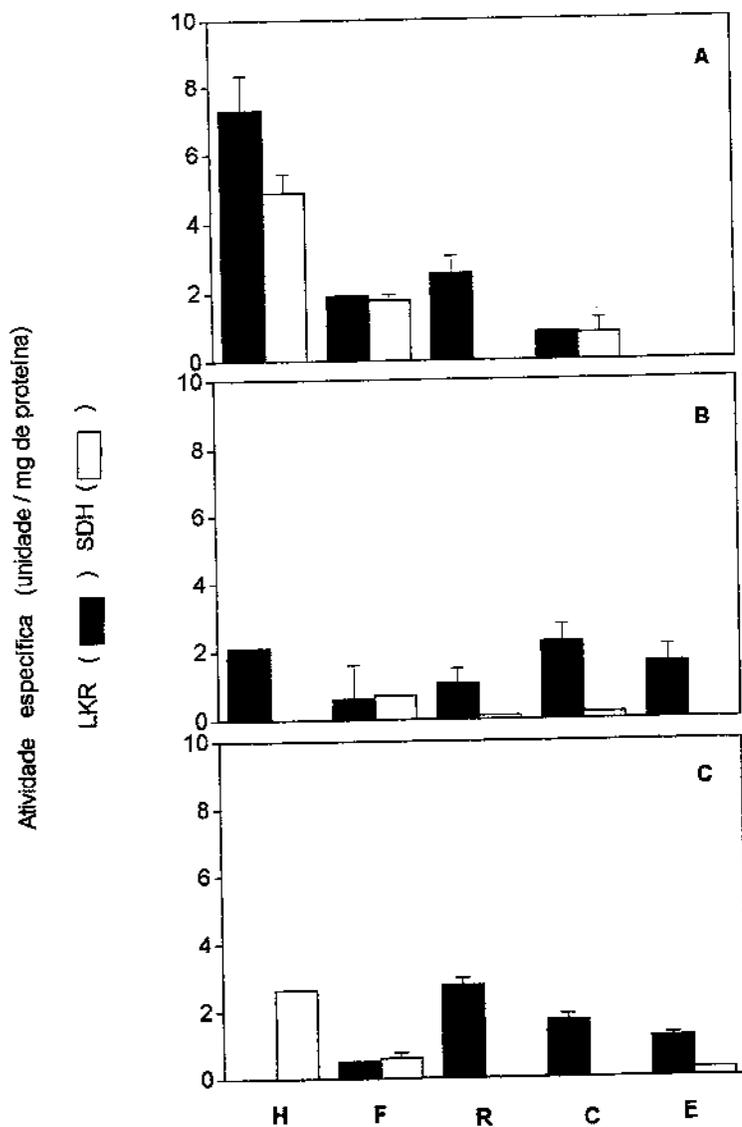
**Figura 12.** Comparação do decaimento na atividade da LKR/SDH ao longo do tempo. A enzima foi extraída do endosperma de milho (A), hipocótilo de feijão-branco (B), de feijão-preto (C) e carioca 80. A equação de regressão linear e  $t_{1/2}$  (tempo que a enzima leva para perder metade da atividade máxima) foram determinados para cada planta.

### Variações na irradiância durante o desenvolvimento vegetal

As plantas de *P. vulgaris* crescidas no escuro tiveram o hipocótilo mais desenvolvido do que aquelas crescidas na luz, além de não terem desenvolvido epicótilo. Naquelas crescidas em casa-de-vegetação ou em câmara-clara o hipocótilo é bem menor e ocorre o desenvolvimento de epicótilo. As folhas das plantas estioladas também são afetadas pela falta de luz, possuindo menor área de limbo e coloração amarela, possivelmente causada pela baixa concentração de clorofila no tecido.

Tanto as plantas crescidas em câmara-clara (irradiância de  $44.6 \text{ umol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) quanto em casa-de-vegetação (72% da irradiância em campo) apresentaram menor atividade da LKR/SDH do que aquelas crescidas em câmara-escura. A atividade total ( $\text{nmol.min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ) destas plantas apresentou valores muito próximos a zero, de forma que a atividade específica (**Figura 13**) permite melhor avaliação dos dados e comparação entre as plantas. As enzimas, que foram precipitadas em sua totalidade com 15% PEG 8000, apresentaram atividade da LKR em torno de 2 unidades/mg de proteína e da SDH próxima à zero. O hipocótilo, tecido que apresentava maior atividade em condições de estiolamento, não apresentou nenhuma quando a planta foi crescida em câmara clara (**Figura 13 C**).

Poderíamos, à partir destes dados, levantar duas hipóteses; uma delas é que a ausência de luz é estimulante na síntese ou ativação da LKR/SDH. A outra é que a presença de luz pode ser inibitória para ambos os mecanismos. De qualquer forma, as duas hipóteses explicariam o fato deste enzima só ter sido encontrada, até então, nos tecidos de reserva da semente, que se encontram protegidos da luz.



**Figura 13.** Comparação da atividade específica da LKR/SDH entre *Phaseolus vulgaris* cultivados sob diferentes condições de iluminação. (A) câmara-escura, (B) casa de vegetação, com 72% da irradiância em campo e (C) câmara-clara, com irradiância de  $44,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . H, hipocótilo; F, folha; R, raiz; C, cotilédono e E, epicótilo. As barras acima das colunas indicam o erro padrão da média ( $n=4$ ).

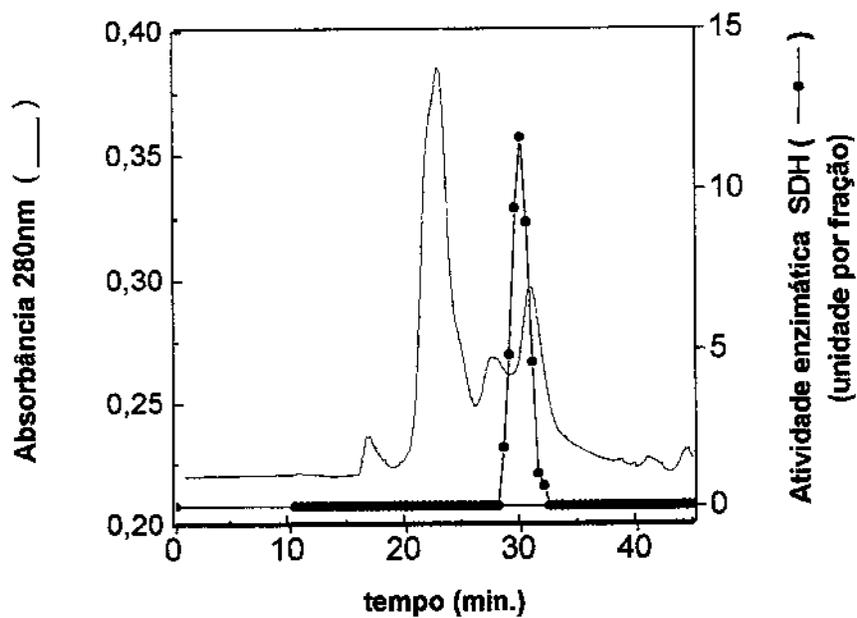
## Purificação da LKR/SDH

### Método 1

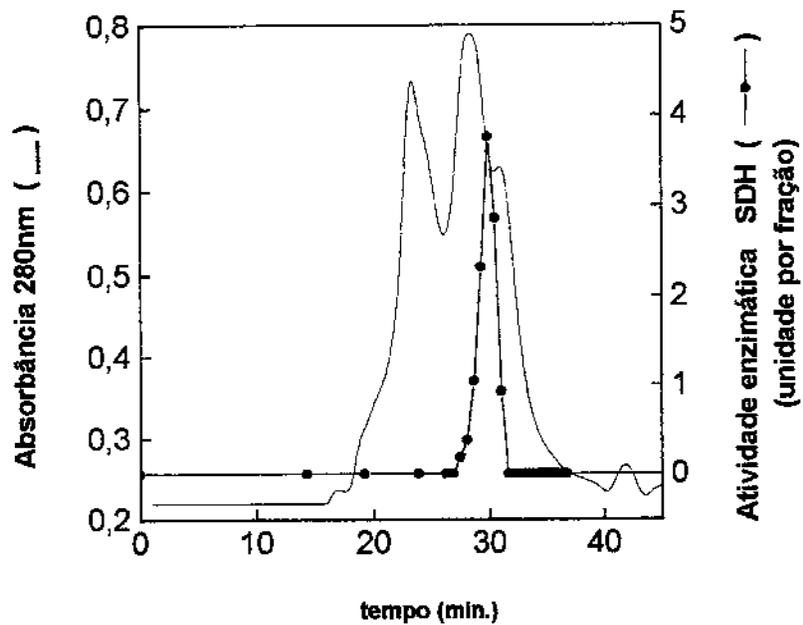
Os resultados obtidos após a última coluna cromatográfica (de filtração, Superdex 200HR 10/30) indicaram que a enzima de *P. vulgaris* tem um perfil semelhante de eluição para as duas frações protéicas avaliadas (fração A **Figura 14** e B **Figura 15**). O  $K_{av}$  coincide para as duas, revelando massa molecular de 94,08 kDa (**Figura 16**). No entanto ambas as frações chegam ao final da purificação apenas com atividade da SDH.

Já foi observado, em resultados anteriores do presente trabalho (**Figura 12**), que a atividade da LKR decai rapidamente com o tempo, tendo um  $t_{1/2}$  de aproximadamente 30 horas, o que por si já explicaria o fato deste método (que demanda 72 horas) não ser o mais adequado para manter o caráter bifuncional da enzima.

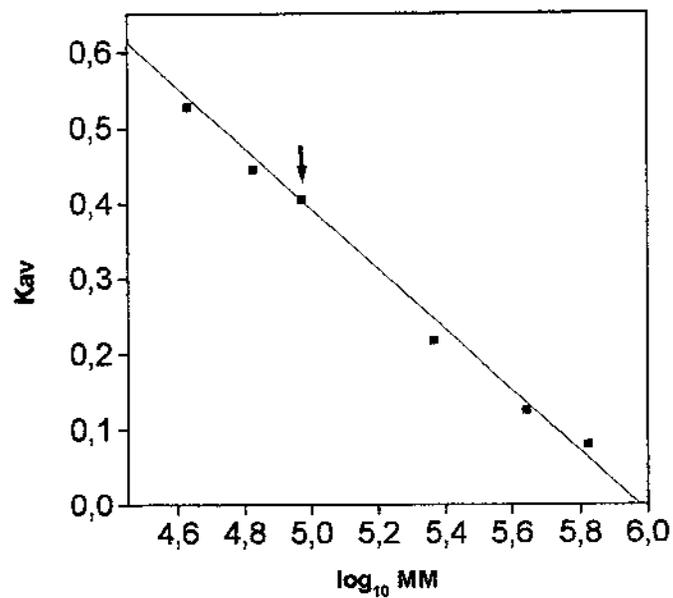
O fato da LKR perder sua atividade a medida em que é passado pelas colunas cromatográficas (**Tabela 1**) e principalmente pelas diálises, já foi observado em *Glycine max* por MIRON, *et al* (1997) e em *Zea mays* por KEMPER *et al* (1998). No entanto, como atividade da LKR/SDH nestas espécies é bem superior (aproximadamente 10 X) que a mesma em *P. vulgaris*, a bifuncionalidade é mantida até o final da purificação.



**Figura 14.** Perfil de eluição da enzima SDH de *Phaseolus vulgaris* precipitada com 7.5% PEG 8000, no último estágio de purificação em coluna Superdex 200 HR. Frações de 0.25 mL foram coletadas e tiveram sua atividade determinada usando 50uL de enzima. Uma unidade de atividade enzimática é definido como a concentração de enzimas necessária para a oxidação de 1nmol de NADPH ou redução de 1nmol de NAD, por minuto, à 30°C.



**Figura 15.** Perfil de eluição da enzima SDH de *Phaseolus vulgaris* precipitada com 7.5-15.0 % PEG 8000, no último estágio de purificação em coluna Superdex 200 HR. Frações de 0.30 mL. foram coletadas e tiveram a atividade determinada usando 100uL de enzima. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a concentração de enzimas necessária para a oxidação de 1nmol de NADPH ou redução de 1nmol de NAD, por minuto, à 30°C.



**Figura 16.** Determinação da massa molecular (MM) da SDH por cromatografia em coluna Superdex 200-HR. As proteínas usadas como padrão foram Tiroglobulina MM 669000, Ferritina=440000; Catalase = 232000; BSA = 67000 e Ovoalbumina=43000.  $K_{av}$  é uma constante que representa o volume disponível da fração estacionária do gel, e  $\log MM$ , o logaritmo da massa molecular. A enzima de *P.vulgaris* está indicada pela seta, revelando MM= 94089 KDa, após purificação pelo método 1.

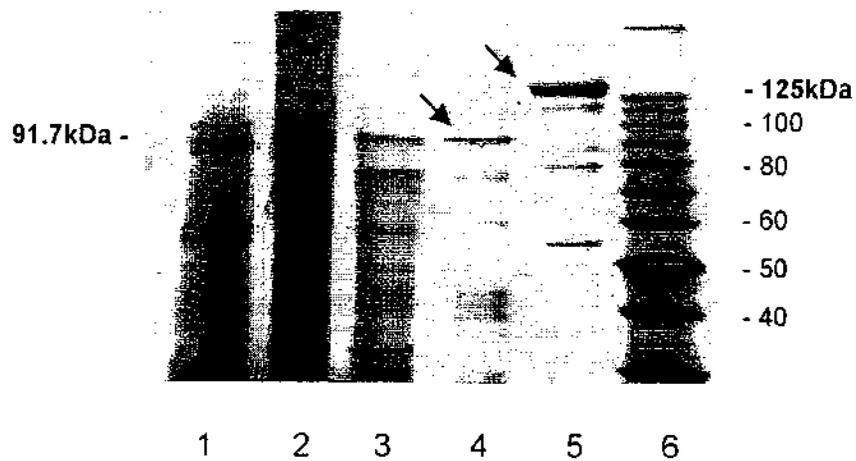
**TABELA 01.** Purificação da LKR/SDH do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris*, variedade carioca 80, em diferentes etapas, segundo o método 1.

Fração	LKR				SDH			
	Proteína Total mg	Atividade Total nmol. min. <sup>-1</sup> .mf <sup>-1</sup>	Atividade Específica unidade/mg	Rec %	Atividade Total nmol. min. <sup>-1</sup> .mf <sup>-1</sup>	Atividade Específica unidade/mg	Rec %	LKR/ SDH
extrato bruto	425.6	7237.0	17.0	100	5065.9	11.9	100	1.42
PEG	222.7	1138.06	5.1	15.7	1667.9	7.48	33	0.682
7.5-15% DEAE dialis.	10.21	50.9	4.98	0.7	221.5	21.7	4.4	0.22
Protein Pak Q	0.88	0	0	0	134.5	152.8	2.6	0
Superdex 200HR	3.36	0	0	0	56.7	16.8	1.1	0

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a concentração de enzimas necessária para a oxidação de 1 nmol de NADPH ou redução de 1 nmol de NAD, por min. à 30°C.

### Gel SDS-PAGE

A Figura 17, apresenta o perfil em SDS-PAGE das proteínas obtidas em etapas consecutivas (recipientes 1, 2, 3 e 4) da purificação. Após eluição em coluna Superdex 200HR 10/30, a LKR/SDH do hipocótilo de *P. vulgaris* é revelada como uma banda mais forte com massa molecular igual à 91.7kDa . O recipiente 5, refere-se a LKR/SDH purificada do endosperma de *Zea mays* pelo mesmo método (cedida por Kemper, E.L./CBMEG-UNICAMP), usada para comparação entre as massas moleculares. Aproximadamente 4ug de proteína purificada de ambas as espécies foram aplicadas no gel e a coloração foi feita com *Comassie Blue*.



**Figura 17.** SDS-PAGE de amostras das etapas consecutivas da purificação de LKR/SDH em *Phaseolus vulgaris*, comparado à enzima purificada do endosperma de *Zea mays*. Os recipientes representam: 1, o extrato bruto; 2, a fração PEG; 3, coluna DEAE Sephacel; 4, Superdex 200HR; 5, LKR/SDH de milho e 6 o padrão de peso molecular 10kDa protein ladder (GIBCO-BRL). Comassie blue (Sigma) foi usado para revelação do gel. As setas indicam, no recipiente 4 e 5, a suposta banda de LKR/SDH do hipocótilo de feijão, (91.7 kDa) e a da mesma enzima em milho (125 kDa).

A enzima de feijão purificada foi concentrada 9x em Amicon 30 e sujeita novamente à SDS-PAGE (**Figura 18**). Uma banda mais forte (no recipiente 1, equivalente à LKR/SDH de *P. vulgaris*) de 91.7kDa e outra de 125kDa (recipiente 2, equivalente à enzima de *Zea mays*) foram reveladas. A massa molecular da enzima de *P. vulgaris* determinada por SDS-PAGE (91.7kDa) está muito próxima àquela obtida após cromatografia de filtração pelo Método 1(94,08kDa), revelada para as duas frações protéicas (A e B) avaliadas.

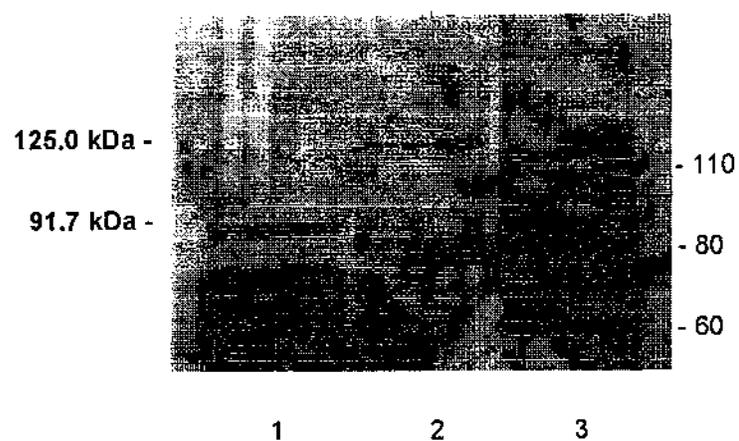
### ***Western Blotting***

A LKR/SDH extraída e purificada do hipocótilo de *P.vulgaris*, sujeita à *Western Blotting* com anticorpo de coelho anti-LKR/SDH de milho (*Zea mays*) não revelou nenhuma banda aparente. Este fato pode ter ocorrido porque o anticorpo produzido contra a LKR/SDH de milho não reconheceu a mesma enzima em feijão , devido a inespecificidade destes (**Figura 19**). Apenas a enzima de milho, usada como controle, reconheceu o anticorpo demonstrando uma banda equivalente à 125kDa (MM da enzima nesta espécie).

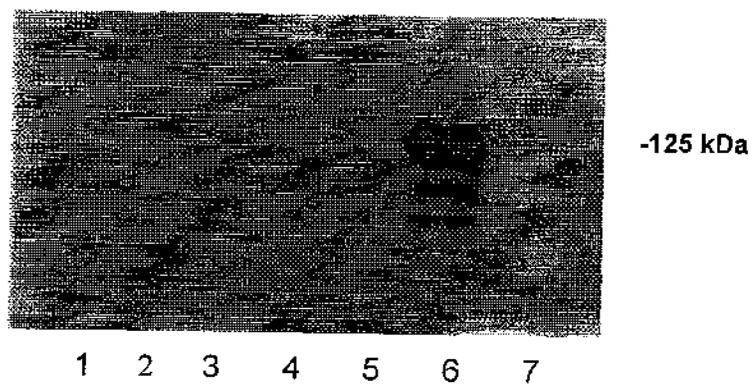
### **Isolamento da LKR/SDH**

#### **Método 2**

O isolamento da LKR/SDH obtido por um processo mais curto, somado à algumas alterações de tampão, demonstrou (**Tabela 02**) ser mais eficaz na manutenção da bifuncionalidade. Desta forma, a enzima contendo as duas



**Figura 18.** SDS - PAGE da enzima LKR / SDH após purificação do (1) hipocótilo de *Phseolus vulgaris* e (2) endosperma de *Zea mays*. O recipiente 3 representa o padrão de massa molecular 10kDa *protein ladder* (GIBCO-BRL). A enzima de feijão foi concentrada previamente (9X) em Amicon-30. Cada recipiente contém 32ug de proteína. *Comassie Blue* (Sigma) foi usado para revelação do gel.



**Figura 19.** *Western Blotting* da LKR / SDH extraída de *Phaseolus vulgaris*, em etapas consecutivas da purificação (Método 1). Os recipientes equivalem a 1, extrato bruto; 2, fração PEG; 3, amostra eluída de coluna DEAE -Sephacel; 4, de coluna Protein Pak- Q; 5, coluna Superdex 200 HR 10/30. O recipiente 6 possui a mesma enzima purificada de milho e o 7 equivale ao padrão *pré-stained* de massa molecular. Foram usados anticorpos de coelho anti-LKR/SDH de *Zea mays* e *Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate* -Sigma, como anticorpo secundário.

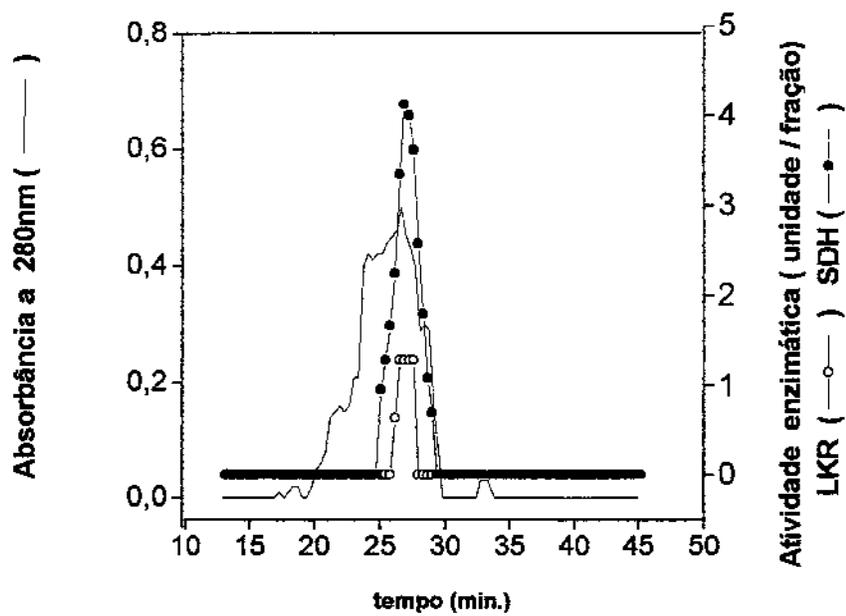
**TABELA 02.** Isolamento da LKR/SDH do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris*, variedade carioca 80, em diferentes etapas, segundo o método 2.

Fração	LKR				SDH			LKR/SDH
	Proteína Total <i>mg</i>	Atividade Total <i>nmol. min.<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup></i>	Atividade Específica <i>u/mg</i>	Rec <i>%</i>	Atividade Total <i>nmol. min.<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup></i>	Atividade Específica <i>u/mg</i>	Rec <i>%</i>	
extrato bruto	620.0	2580.6	4.16	100	840.0	1.35	100	3.07
35-70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	301.0	352.2	1.17	13.64	920.0	3.05	109	0.38
Sephadex G-50	72.17	34.83	0.48	1.34	38.7	0.53	4.6	0.9
Superdex 200HR	45.9	5.8	0.126	0.22	27.42	0.59	3.2 6	0.21

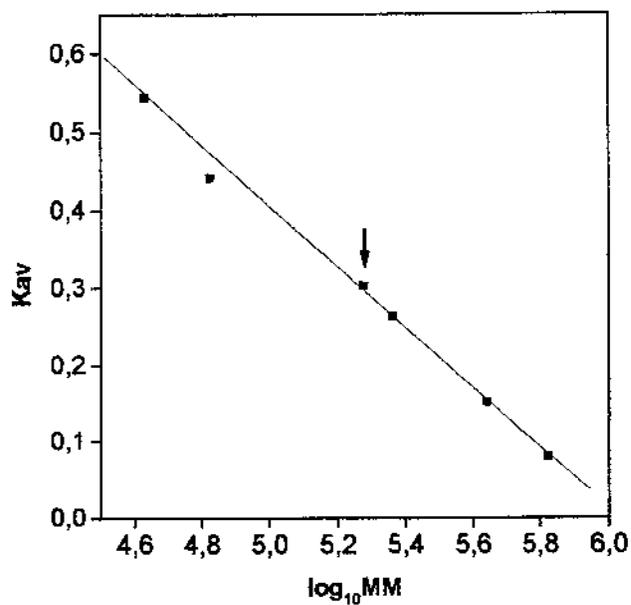
Uma unidade de atividade enzimática é definida como a concentração de enzimas necessária para a oxidação de 1 nmol de NADPH ou redução de 1 nmol de NAD, por min. à 30°C

atividades enzimáticas (de redutase e desidrogenase) eluiu num mesmo pico (**Figura 20**), revelando massa molecular equivalente à 190.2kDa (**Figura 21**). Essa massa equivale à aproximadamente o dobro da obtida pelo Método 1, que foi de 92.5kDa e por SDS-PAGE, 91.7kDa. Este dado levanta a hipótese da enzima de feijão ser um homodímero de 190.2kDa e que os peptídeos constiuintes, de 92.5kDa, foram separados ao longo do processo de purificação.

As modificações metodológicas que permitiram manter a bifuncionalidade da enzima foram : 1. mudança no pH e força iônica do meio (tampão fosfato de sódio 100mM, pH7.0), 2. presença de substratos da enzima (2mM lisina e 2mM  $\alpha$ -cetoglutarato), 3. adição de um antioxidante e protetor contra fenóis no momento da homogenização dos tecidos (5 % de PVPP), 4. precipitação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,



**Figura 20.** Perfil de eluição da enzima LKR/SDH de *Phaseolus vulgaris* em coluna Superdex 200 HR, após isolamento (método 2). Frações de 0.25 mL foram coletadas e tiveram sua atividade determinada usando 50  $\mu$ L de enzima. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a concentração de enzimas necessária para a oxidação de 1nmol de NADPH ou redução de 1nmol de NAD, por minuto, à 30°C.



**Figura 21.** Determinação da massa molecular (MM) da LKR/SDH por cromatografia em coluna Superdex 200-HR. As proteínas usadas como padrão foram Tiroglobulina MM =669000; Ferritina=440000; Catalase=232000; BSA = 67000 e Ovoalbumina=43000. Kav é uma constante que representa o volume disponível da fração estacionária do gel, e log MM, o logaritmo da massa molecular. A enzima de *P. vulgaris* está indicada pela seta, revelando MM = 190228 KDa, após isolamento pelo método 2.

substituindo o PEG 8000 e a necessidade de abaixar o pH para 5.5 , 5. redução no número de etapas cromatográficas (a troca iônica demonstra reduzir drasticamente a atividade da LKR), 6. Substituição da diálise por dessalinização em Sephadex G-50 e 7. redução do tempo de purificação (de 72 para 12 horas), devido à rápida mudança de conformação enzimática e conseqüente queda de atividade, principalmente na função redutase.

## V. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Foi verificada a existência, em *Phaseolus vulgaris*, de atividade da lisina cetoglutarato redutase / sacaropina desidrogenase (LKR/SDH), principal enzima da via de degradação de lisina. As evidências obtidas neste trabalho sugerem que a enzima de feijão tem um caráter bifuncional, com os sítios ativos da LKR e da SDH situados num mesmo polipeptídeo, como já foi verificado em outras plantas (ARRUDA *et al*, 1982; BROCHETO-BRAGA *et al*, 1992; GONÇALVES BUTRUILLE, 1996; TANG, 1997; MIRON, 1997 e GAZIOLA, 1997) e em mamíferos (FELLOWS e LEWIS, 1973), incluindo a espécie humana (FJELLSTEDT e ROBINSON, 1975). A enzima demonstrou ter maior atividade no hipocótilo de feijão-branco, feijão-preto e carioca 80, crescidos em condições de estiolamento (**Figura 02**) e, desta forma, este foi o tecido escolhido para caracterização e purificação da enzima.

A atividade no hipocótilo de feijão carioca 80 demonstrou ser aproximadamente 12x inferior (**Figura 1**) àquela encontrada no endosperma de milho após precipitação com PEG 8000, podendo chegar a 3000X menos após purificação .

Na ampla gama de trabalhos que se referem a atividade da LKR/SDH em plantas, a enzima foi extraída de sementes (*Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, *Arabidopsis*, *Glycine max* e *Oriza sativa*) e, até o momento, não havia sido encontrada em outro local. KARCHI *et al* (1995) chegaram a afirmar que esta via metabólica estava restrita apenas a esse tecido. Em feijão, pudemos observar que o padrão de distribuição da enzima varia de acordo com a irradiância (**Figura 13**)

recebida ao longo do crescimento da plântula, no entanto, nenhuma das condições estudadas induziram a atividade enzimática na semente e nem no cotilédono.

O conteúdo de aminoácidos nos grãos de *Phaseolus vulgaris* determinado por BLANCO e BRESSANI (1989) revelou que a isoleucina, a leucina e a lisina configuram entre os aminoácidos essenciais presentes em maior concentração. Segundo os autores, ocorre uma alta demanda de lisina pela semente, de forma que esta se encontra incorporada às proteínas de reserva, especialmente à globulina e à albumina.

É possível que uma maior incorporação de lisina nas proteínas de semente seja responsável pela baixa concentração deste aminoácido de forma livre, o que explicaria a inexistência de atividade da LKR/SDH na semente de feijão. Em milho, onde a demanda do endosperma é muito pequena (BROCHETO, *et al*, 1992), a lisina livre é mantida em torno de 1.5% (ARRUDA e SILVA, 1983), neste caso, devido a alta atividade da LKR/SDH. Um dado que complementa a hipótese acima é que em tecidos de outras espécies, como a folha de tabaco (com alta concentração de lisina incorporada às proteínas), também não foi detectada nenhuma atividade de LKR /SDH (SHAUL e GALILI, 1992) .

O conteúdo de lisina no hipocótilo de *P. vulgaris* não tem sido abordado em outros trabalhos pelo fato desse órgão vegetal não ter interesse à nível alimentar (no ocidente), como ocorre com a semente. Desta forma não podemos avaliar se a atividade mais alta encontrada no hipocótilo tem alguma relação com o conteúdo de substrato neste tecido. No entanto, é possível que uma concentração relativamente baixa de lisina livre, que estivesse sendo translocada pelos tecidos condutores, fosse a responsável pela via catabólica demonstrada no hipocótilo.

Na duas frações precipitadas com PEG, a atividade da LKR demonstrou ser sempre maior que a da SDH (no hipocótilo), assim como encontrado no endosperma de milho (KEMPER *et al* , 1998) e na placenta humana (onde a LKR chega a ser 5X mais ativa que a SDH). Porém, o inverso ocorre em fígado de humanos, ratos, porcos, cachorros, gatos, rapoza e ovelha (FELLOWS e LEWIS, 1973). Essa diferença é reflexo de uma enzima cuja atividade varia de acordo com a espécie e com o tecido em questão.

A precipitação de proteínas do tecido de hipocótilo em concentrações crescentes de PEG 8000 revelou (**Figura 04**) dois platôs de atividade enzimática, levantando a hipótese de haver duas isoformas da enzima, que precipitariam em concentrações diferentes. Alguns dados obtidos posteriormente contribuem com essa possibilidade, como por exemplo as respostas antagônicas destas frações à um mesmo inibidor de fosfatase (Figura 7 e 10) e à presença de BSA (Figura 11), indicando modulação e estabilidades diferenciadas.

A LKR/SDH também foi encontrada, no presente trabalho, em plântulas de feijão-carioca 80 crescidas *in vitro* à partir de embriões cujo cotilédone foi retirado previamente. Nestas condições a adição lisina no meio de crescimento demonstrou (**Figura05**) não causar alterações significativas na atividade da enzima, em nenhuma das frações protéicas avaliadas. Neste caso, a atividade foi medida em extratos contendo todos os tecidos homogeneizados conjuntamente (da planta crescida *in vitro*) já que a quantidade de material seria muito pequena para separação dos órgãos. Desta forma, é possível que uma resposta ao substrato, no sentido de aumentar o catabolismo, tenha sido mascarada devido a mistura destes

tecidos. TANG *et al*, (1997) demonstraram que a expressão de ambos os genes SDH e LKR/SDH, encontrados em *Arabidopsis*, é regulada de maneira tecido específica durante o desenvolvimento da planta.

KARCHI *et al*, (1995), no entanto, obteve sucesso induzindo a atividade da LKR/SDH em *Nicotiana tabacum* através de adição exógena de lisina em sementes de plantas com 16DAP, ou no chamado "breaking point". Usando-se este método, sementes em desenvolvimento com baixa atividade de LKR a tiveram aumentada significativamente. Porém, as plantas estudadas eram crescidas em campo e encontravam-se mais maduras, comparado com as condições do presente trabalho. Paralelo a isso, a resposta da enzima foi estimada apenas no tecido da semente de tabaco, de forma que uma comparação direta dos resultados induziria a erros de conclusão.

Assim sendo, estudos complementares da resposta à lisina (como por exemplo a injeção direta nos tecidos do hipocótilo de plantas mais maduras) seriam necessários para esclarecer os mecanismos de indução pelo substrato.

Foi demonstrado (**Figura 06**) que a presença de Aprotinina, PMSF (inibidores de serina proteases) e Leupeptina (inibidor de tiol proteases) nos tampões de isolamento enzimático é favorável a atividade da LKR/SDH extraída do hipocótilo de feijão. Estes inibidores são benéficos à enzima devido a presença de proteases agindo no extrato que, em condições normais possivelmente estariam confinadas em compartimentos celulares, mas no momento da homogeneização são liberadas atuando contra a enzima em estudo. As células vegetais, especialmente na família das leguminosas, possuem inibidores de protease agindo como

reguladores de proteínas endógenas, como proteínas de reserva e até na proteção de plantas (BOWLES, 1990) contra patógenos.

A LKR/SDH de *P. vulgaris* também é afetada pelo seu estado de fosforilação, assim como já foi observado em soja (MIRON *et al.*, 1997), tabaco (KARCHI, *et al.*, 1995) e em milho (KEMPER, *et al.*, 1998). Segundo resultados obtidos com inibidores de fosfatase, foi observado que alguns tipos alteram atividade da LKR/SDH (**Figura 07 e 10**) de feijão, especialmente aqueles que agem sobre fosfatases as quais atuam em resíduos de serina-treonina na proteína.

A fosforilação protéica é bem estabelecida como um mecanismo regulatório em plantas superiores, porém, até pouco tempo, apenas algumas enzimas vegetais eram conhecidamente reguladas desta maneira. A descoberta dos inibidores de fosfatase significativamente avançaram o conhecimento dos processos biológicos que são controlados por fosforilação protéica reversível (SMITH e WALKER, 1996) e tem auxiliado na identificação fisiológica de substratos para classes específicas de proteínas fosfatases.

Alguns trabalhos (BENNET,1980;CHENG,1995 e SILVERSTAIN,1993) e SUN,1989) demonstraram que fosfatases serina-treonina encontradas no tilacóide de diferentes espécies de plantas são sensíveis ao molibdato. Esse inibidor também foi usado no presente estudo, demonstrando que a fosforilação tem importante papel na ativação da LKR/SDH de feijão. Somado ao vanadato (também específico de fosfatases que se ligam à resíduos de serina-treonina), esses foram os inibidores que causaram alteração mais acentuada na atividade da enzima em estudo. Desta forma, é possível que, em feijão, a LKR/SDH seja controlada pela fosforilação/desfosforilação de um resíduo de serina-treonina .

As variações observadas entre a fração A e B (**Figura 07 e 10**) na resposta aos inibidores de fosfatase pode ter explicação no fato das enzimas destas frações (duas possíveis isoformas da LKR/SDH) serem moduladas de maneira diferente. Em *Arabidopsis*, onde ocorrem duas isoformas da enzima (TANG *et al*, 1997), uma apenas com o sítio ativo da LKR e outra com ambos (LKR e SDH em um mesmo polipeptídeo), o equilíbrio entre elas demonstrou ser importante no controle do catabolismo de lisina.

O EDTA, cujo papel como inibidor de fosfatases foi investigado neste estudo, demonstrou causar queda significativa na atividade enzimática (**Figura 09**) da fração B, mesmo quando presente em baixas concentrações. É provável que esta suposta isoforma da enzima dependa de algum íon, o qual foi quelado pelo EDTA. Uma segunda hipótese é que o reagente tenha causado uma mudança no estado de fosforilação da proteína, que demonstrou ser desfavorável à atividade enzimática da LKR/SDH.

Outra diferença observada entre as duas possíveis isoformas da enzima do hipocótilo é a resposta à presença de BSA (**Figura11**) nos tampões. Apenas a fração B é beneficiada, aumentando a atividade em até 6X. Os fatores que podem estar contribuindo com esse fato são que: esta fração estaria sofrendo maior ação de proteases e/ou complexação por lipídeos e ácidos graxos e, além disso, o BSA estaria agindo como substrato e conferindo proteção à molécula. Outras enzimas vegetais também já apresentaram resposta positiva à proteínas adicionadas ao meio. A extração com caseína (SANTORO e MAGALHÃES, 1983) causou aumento

no  $t_{1/2}$  (tempo que a enzima leva para perder metade de sua atividade máxima) da redutase nitrato, devido um efeito estabilizante na atividade enzimática.

A estabilidade enzimática medida em *P. vulgaris* e *Zea mays* revelou (**Figura 12**) que a função desidrogenase da enzima é mais estável (6X) que a função redutase em feijão, o que não ocorreu com o milho, onde as duas funções são mantidas por tempo aproximadamente igual. Comparando-se a estabilidade da LKR de milho e de feijão vemos que a primeira é 8.1X mais estável, além de ser 12X mais ativa, logo após a extração e precipitação protéica.

Devido à instabilidade observada em feijão, os métodos de purificação comumente usados para outras plantas (Método1) não foram favoráveis a enzima, causando queda na atividade. Além do período de extração exceder a meia vida da enzima, alguns passos como a diálise e as cromatografias de troca iônica (dados não demonstrados) revelaram afetar profundamente a LKR. Ao final das etapas cromatográficas a LKR/SDH elui como um monômero de 94.08kDa (**Figura 14 e 15**) contendo apenas a atividade da SDH, resultado obtido para as duas possíveis isoformas. Esse valor está de acordo com o obtido em gel denaturante, onde a enzima se apresenta como uma banda mais forte de 91.7kDa.

Num processo mais curto (Método 2) de isolamento, a LKR/SDH chega ao final das etapas cromatográficas com as duas atividades eluindo num mesmo pico (**Figura 20**). Isto sugere que ambos os sítios ativos estão situados num só polipeptídeo, assim como foi encontrado nas outras espécies vegetais. Desta forma, a enzima se apresenta com massa molecular de 190.2kDa (**Figura 21**).

Como a massa molecular da enzima encontrada após purificação parcial (94.08kDa) é aproximadamente metade daquela obtida em procedimentos mais curtos de isolamento, é possível que tenha ocorrido uma separação dos dois polipeptídeos constituintes da enzima e que a LKR/SDH de feijão seja um homodímero de 190.2kDa. Se a LKR depender da estrutura dimerizada para exercer sua atividade, provavelmente esta tenha sido a razão da manutenção apenas da função desidrogenase ao final da purificação.

Assim sendo deve-se optar entre um isolamento parcial (sem algumas etapas necessárias para purificação total) onde ambas as atividades são mantidas, ou um procedimento mais longo onde apenas a SDH é mensurável. Os dados de cinética enzimática, que exigem uma melhor purificação do material para serem obtidos, ficam prejudicados devido à dificuldade de se obter a enzima bifuncional.

As condições de iluminação ao longo do desenvolvimento vegetal revelaram afetar a atividade da LKR/SDH (**Figura 13**). A enzima não foi encontrada em nenhum dos tecidos de plantas crescidas em casa-de-vegetação (sob luz natural) e nem em câmara clara (com luz constante). Esse fato possivelmente ocorre devido à cinases e fosfatases que respondem à luz e que seriam responsáveis, junto a outros fatores, pelo controle da LKR/SDH em feijão. No entanto, estudos adicionais seriam necessários para a melhor compreensão deste mecanismo.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- ARRUDA, P. e SILVA,W.J. (1979) Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry*. **18**, 409-410.
- ARRUDA, P. e SILVA W.J. (1982) Protein and amino acid metabolism in normal and high-lysine sugary opaque-2 maize endosperm during kernel development. *Brazil .J .Genetics*. **2**, 313-327.
- ARRUDA, P. e SILVA,W.J. (1983) Lysine ketoglutarate reductase activity in maize. Its possible role on lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* **22**, 206-208.
- ARRUDA,P.; SODEK,L. e SILVA,W.J.da (1982) Lysine ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol*. **69**, 988-989.
- AZEVEDO,R.A., ARRUDA,P., TURNER,W. e LEA,P.J. (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived aminoacids in higher plants. *Phytochemistry*. **46** (3) 395-419.
- BENNET,J. (1980) Chloroplast phosphoproteins: evidence for a thylakoid-bound phosphoprotein phosphatase. *Eur. J. Bioquem*. **104**, 85-89.
- BLANCO,A. e BRESSANI,R. (1991) Biodisponibilidad de aminoacidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latin. de Nutr*. **151** (1), 38-51
- BLEMINGS, K.P.B., CRENSHAW,T.D., SWICK,R.W. e BENEVENGA,N.J. (1994) Lysine-  $\alpha$ - ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase are located only in the mitochondrial matrix in rat liver. *J. Nutr*. **124**, 1215-1221.

- BOWLES, J.D. (1990) Defense related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 873-875.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- BRIGHT, S.W.J., KUEH, J.S.H., FRANKLIN, J. ROGNES, S.E. e MIFLIN, B.J. (1982) Two genes for threonine accumulation in barley seeds. *Nature.* **299**, 278-279.
- BROCHETTO-BRAGA, M.R.; LEITE, A. e ARRUDA, P. (1992) Partial purification and characterization of lysine ketoglutarate reductase in normal and Opaque-2 maize endosperms. *Plant Physiol.* **98**, 1139-1147.
- CHATTERJEE, S.P. SINGH, B.K. and GILVARG, C. (1994) Biosynthesis of lysine in plants: the putative role of meso-diaminopimelate dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* **26**, 285-290.
- CHENG, H.F. e TAO, M. (1989) Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochem. Biophys. Acta.* **998**, 271-76.
- CHENG, L., STYS, D. e ALLEN, J.F. (1995) Effects of synthetic peptides on thylakoids phosphoproteins. *Physiol. Plant.* **93**, 173-178.
- CICIRELLI, M. (1992) Inhibitors of proteins serine-threonine phosphatase. *Focus* **14**, 16-20.
- CORD - NETO, G., YUNES, J.A., VETTORRE, A.L., da SILVA, M.J., ARRUDA, P. e LEITE, A. (1995) The involvement of Opaque-2 on  $\beta$ -prolamin gene regulation

in maize and *Coix* suggest a more general role for this transcriptional activator.

*Plant. Mol. Biol.* **27**, 1015-1029.

DUNBAR, B.S. e SCHWOEBEL, E.D. (1990) *Meth. Enzymol.* **182**, 663-670.

ESEN, A. (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* **80**, 623-627.

FELLOWS, F.C.I. e CARSON, N.A.J. (1974) Enzyme studies in a patient with saccharopinuria: a defect of lysine metabolism. *Pediat. Res.* **8**, 42-49

FELLOWS, F.C.I. e LEWIS, M.H.R. (1973) Lysine metabolism in mammals. *Biochem. J.* **136**, 329-334.

FJELLSTEDT, T.A. e ROBINSON, J.C. (1975) Purification and properties of L-lysine- $\alpha$ -ketoglutarate reductase from human placenta. *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 536-548.

FOSTER, R.A., SCISLOWSKI, P.W.D., HARRIS, C.I. e FULLER, M.F. (1993) Metabolic response of liver lysine  $\alpha$ -ketoglutarate reductase activity in rats fed lysine limiting or lysine excessive diets. *Nutrition Res.* **13**, 1433-1443.

GALILI, G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell.* **7**, 800-906.

GALILI, G., SHAUL, O., PEARL, A. e KARCHI, H. (1994) Synthesis and accumulation of essential amino acids lysine and threonine in seeds. In *Seed Development and germination*. H. Kegeland G. Galili. eds (New York: Marcel Dekker), 180p.

GAZIOLA, S.A. TEIXEIRA, C.M.; G. e LUGLI, J. (1997) The enzymology of lysine

- catabolism in rice seeds. *Eur. J. Biochem.* **247** (1), 364-371.
- GONÇALVES-BUTRUILLE, M., SZAJNER, P., TORIGOI, E.; LEITE, A. e ARRUDA, P. (1996). Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine ketoglutarate reductase - sacchropine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* **110**:765-771.
- HIBBERD, K.A. e GREEN, C.E.: (1982) Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 559-563.
- HIGGASHINO, K., TSUKADA, K. e LIEBERMAN, I. (1965) Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 285-290.
- HIGGINS, T.J.V. (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 191-221.
- HUTZLER, J. e DANCIS, J. (1968) Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochem. Biophys. Acta.* **158**, 62-68.
- HUTZLER, J. e DANCIS, J. (1975) Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues. *Biochem. Biophys. Acta.* **377**, 42-51.
- JONES, E.E. e BROQUIST, H.P. (1966) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis III. aminoadipic semialdehyde-glutamate reductase, *J. Biol. Chem.* **241**, 3440-3444.

- KARCHI, H., MIRON, D., BEN-YAACOV, S. e GALILI, G. (1995) The lysine dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein phosphorylation. *Plant Cell* **7**, 1963-1970.
- KARCHI, H., SHAUL e GALILI, G. (1994) Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**, 2577-2581.
- KEMPER, E.L., GERMANO, C.N., CAPELLA, A.N., GONSALVES-BUTRUILE, M. e AZEVEDO, R. (1998) Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine ketoglutarate reductase - saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur. J. Biochem.* **253**, 720-729.
- KODRZYCKI, R., BOSTON, R.S. e LARKINS, B.A. (1989) The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* **1**, 105-114.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAUE, T.M. e RHODES, D.G. (1990) Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. *in* *Methods in enzymology – Guide to protein purification*. Academic Press. **82**, 566-87.
- LIU, C.M. e HERMANN, T.E. (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253**, 5892-5894.
- MACKINTOSH, C., COGGINS, J. e COHEN, P. (1991) Plant protein phosphatase: subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of

- phosphatase 2A as the major quinate dehydrogenase phosphatase. *Biochem. J.* **273**, 733-738.
- MACKINTOSH,R.W., DAVIES,S.P., CLARKE,P.R., WEEKS, J. GILLSPIE,J.G., GIBB,B.J. e HARDIE,G. (1992) Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. *Eur.J.Biochem.* **209**, 923-931.
- MARGULIS,L. (1981) Mitochondria: acquisition by whom? *In Symbiosis in cell Evolution.* W.W. Freeman. San Francisco. 132p.
- MARKOVITZ,P.M. , CHUANG,D.T. e COX, R.P. (1984) Familial Hyperlysinemias. *J. Biol Chem.* **259** (19), 11643-11646.
- MARKOVITZ,P.M. e CHUANG,D.T.(1987) The Bifunctional Amino adipic Semialdehyde Synthase in Lysine Degradation. *The J. Biol. Chem.* **262**, 9353-9358.
- MERTZ,E.T., BATES,L.S. e NELSON,O.E. (1964) Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content in maize. *Science.* 145, 270-280.
- MIERNYK,J.A., CAMP P.J. e RANDALL,D.D. (1985) Regulation of plant pyruvate dehydrogenase complexes. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **4**, 175-190.
- MIRON,D. BEN-YAACOV,S. KARCHI,H. e GALILI,G. (1997) In vitro dephosphorilation inhibits the activity of soybean lysine-ketoglutarate reductase in a lysine -regulated manner. *Plant* **12**(6), 1453-1458.
- MISONO,H., TOGAWA,H., YAMAMOTO,T. e SODA,K. (1976).  $m-\alpha-\epsilon$  Diaminopimelate dehydrogenase in *Bacillus sphaericus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 89-93.
- NEURATH,H. (1983) Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* **224**, 350-357.

- NODA,C. e ICHIHORA,A. (1978) Purification and properties of L-lysine-ketoglutarate reductase from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* **525**, 307-313.
- PERL, A. SHAUL, O. e GALILI,G. (1992) Regulation of lysine synthesis in transgenic potato plants expressing a bacterial dihydropicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant Mol Biol* . **10**, 1-9.
- PHILLIPS, R.D. (1993) Starchy legumes in human nutrition, health and culture. *Plant Foods Human Nutr.* **44**,195-211.
- PROMEGA (1996) Protocols and Applications Guide (3rd Ed.) Promega Corporation, USA .351-353.
- RAO, V.V., PAN, X. e CHANG, Y.F. (1992) Developmental changes of L-lysine-ketoglutarate reductase in rat brain and liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B** (1) 221-224.
- RICHARDSON,M. (1977) The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry.* **16**, 159-169.
- RICHARDSON,M. (1991) Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *In: Methods in plant biochemistry.* vol.5, Aminoacids, proteins and nucleic acids (ED.L.J.Rogers).
- ROBERTS,D.M. e HARMON,A.C. (1992) Calcium - modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- SANTORO,L.G. e MAGALHÃES,A.C.N. (1983) Changes in nitrate reductase activity during development of soybean leaf. *Z. Pflanzenphysiol.* **112**, 113-121.

- SAUNDERS,P.P. e BROQUIST,H.P. (1966) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. IV. Saccharopine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **241**, 3435-3440.
- SCHMIDT,R.J., KETUDAT,M., AUKERMAN,M.J. e HOSCHEK,G. (1992) Opaque2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22kDa zein genes, *Plant Cell.* **4**, 689-700.
- SHAUL, O. e GALILI, G. (1992) Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants expressing a bacterial dihydropicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant J.* **2**, 203-209.
- SHAUL,O. e 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.
- SHEWRY, P.R., e TATHAM, A.S. (1990). The prolamin storage proteins. *Biochem.J.* **267**, 1-12.
- SHINNO,H., NODA,C., TANAKA, K. e ICHIHARA,A. (1980) Induction of L-lysine-2-oxoglutarate reductase by glucagon and glucocorticoid in developing and adult rats. *Biochem. Biophys. Acta.* **633**, 310-316.
- SILVA,W.J. e ARRUDA,P. (1979) Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochemistry.* **18**, 1803-1805.
- SILVERSTAIN,T., CHANG,L. and ALLEN,J.F. (1993) Chloroplast thylakoid protein phosphatase reactions are redox-independent and kinetically heterogeneous. *FEBS Lett.* **334**, 101-105.

- SMITH,R.D. e WALKER,J.C. (1996) Plant protein phosphatases. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* **47**, 101-125
- SODEK, L. (1976) Biosynthesis of lysine and other aminoacids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry.* **15**, 1903-1907.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. (1971) Aminoacid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and floury-2 corn endosperm by a modified Osborn procedure. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1144-1150.
- SUN,G. BAILEY,D., JONES,M.W. e MARKWELL,J. (1989) Chloroplast thylacoid phosphatase is a membrane surface associated activity. *Plant Physiol.* **89**, 238-243.
- TANG,G., MIRON,D. SHIMONI, J.X.Z. e GALILI,G. (1997) Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **9**, 1305-1316.
- TIMMONS, T.M. and DUNBAR, B.S. (1990) *Meth. Enzymol.* **182**, 679-688.
- TZCHORI, I.B., PERL,A. e GALILI,G. (1996) Lysine metabolism is subject to complex patterns of regulation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 727-734.
- WALLSGROVE,R.M. and MAZELIS,M. (1980) The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. *FEBS Lett.* **116**, 189-192.
- WENKO,L.K. TREICK,W.R. e WILSON,K.G. (1985) Isolation and characterization of a gene encoding m-Diaminopimelate dehydrogenase from *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.* **4**, 197-204.