

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/39151

IB/80862



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

M791



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

**Controle do catabolismo da lisina na semente de milho:
isolamento, seqüenciamento e caracterização do clone
genômico da enzima lisina cetoglutarato redutase/
sacaropina desidrogenase**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Karen Cristiane Martinez de Moraes
e aprovada pela Comissão Julgadora.
31/8/99

Karen Cristiane Martinez de Moraes
Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

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

1999

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M 791c
	39151
	229199
	D ☒
	25.11.00
	21.11.0199

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

CM-00136277-0

M791c

Moraes, Karen Cristiane Martinez de

Controle do catabolismo da lisina na semente de milho: isolamento, sequenciamento e caracterização do clone genômico da enzima lisina cetoglutarato redutase / sacaropina desidrogenase. / Karen Cristiane Martinez de Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 1999. 104f.:ilus.

Orientador: Paulo Arruda

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

1. Milho. 2. Aminoácidos. 3. Degradação. I. Arruda, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 31 de agosto de 1999

BANCA EXAMINADORA

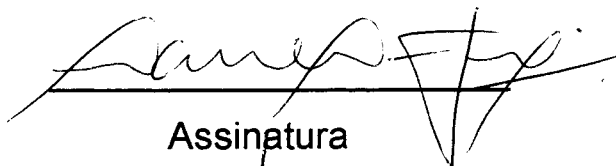
TITULARES:

Prof. Dr. Paulo Arruda



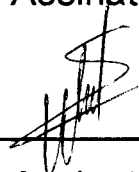
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Assinatura

APROVADA

*“ A um homem nada podemos ensinar;
tudo o que podemos fazer é ajudá-lo a
encontrar as coisas dentro
de si mesmo. ”*

Galileu

A meus pais,

Pelos esforços;
pelo carinho;
pelas preces;
pelos conselhos;
pela torcida;...

enfim, por investirem suas vidas
na minha caminhada, e fazerem
da minha felicidade, as suas realizações
Minha eterna gratidão.

“..... Casar com Déborah ou com Sara,
Meu bom José, você podia;
E nada disso acontecia.....
Mas você foi amar Maria.....”

Ao Querido Carlos Alberto,

“ Há pessoas estrelas e há pessoas cometas...

Os cometas passam.

Apenas são lembrados pelas datas que passam e que retornam.

As estrelas permanecem.

O sol permanece.

Passam anos, milhões de anos e as estrelas permanecem.

Há muita gente cometa. Passa pela vida da gente apenas por instantes.

Gente que não prende ninguém e a ninguém se prende. Gente sem amigos gente que passa pela vida sem iluminar, sem aquecer, sem marcar presença.

Importante é ser estrela. Estar junto.

Ser luz. Ser calor. Ser vida.

Amigo e Paixões são estrelas.

Podem passar anos. Podem surgir distâncias, mas a marca fica no coração.

Coração que não quer enamorar-se de cometas, que apenas atraem olhares passageiros.

Ser cometa é ser companheiro por instantes, explorar os sentimentos humanos, ser aproveitador das pessoas e das situações, fazer-se acreditar e desacreditar ao mesmo tempo.

Solidão é o resultado de uma vida cometa. Ninguém fica, todos passam.

Há necessidades de criar um mundo de estrelas.

Todos os dias poder contar com elas e poder sentir seu calor.

Assim são os amigos estrelas na vida da gente.

São coragem nos momentos de tensão. São luz nos momentos de desânimo.

Ser estrela neste mundo passageiro, nesse mundo cheio de pessoas cometas, é desafio, mas acima de tudo uma recompensa.

Recompensa de ter sido luz para muitos amigos, ter sido calor para muitos corações, ter nascido e vivido e não apenas existido.”

E você para mim é uma grande estrela...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, pela orientação, paciência e por ter me aceito como parte integrante do seu grupo de trabalho.

Ao Dr. Adilson Leite, pelas inúmeras vezes em que se mostrou pronto a ensinar.

Ao Dr. Marcelo Menossi, pela leitura desse manuscrito e pela solicitude com que se dispôs a participar da banca desta tese.

Ao Dr. Michel Vincentez também pela sua solicitude em participar desta banca.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti por sua minuciosa e dedicada avaliação na pré-banca e pela atenção que sempre demonstrou ao meu trabalho.

À Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni pela dedicada avaliação na pré-banca e pela amizade e compreensão que sempre demonstrou.

Às professoras Dra. Anete Pereira de Souza, Dra. Christine Hackel e a Dra. Yoko Bomura Rosato pela participação como membros da banca do exame de qualificação. À professora Yoko, os meus sinceros agradecimentos por ter aceito participar como suplente da banca examinadora.

A todos os companheiros e amigos do laboratório pela convivência. E mais especialmente ao Germano e a Dridri pela compreensão e apoio nos meus momentos mais difíceis.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Índice Geral

RESUMO	01
SUMMARY	03
INTRODUÇÃO	04
1. As proteínas de reserva na semente	04
2. Altos níveis de lisina no endosperma <i>opaco2</i>	05
3. A biossíntese de lisina:	07
3.1 Síntese de lisina em plantas	07
3.2 Degradação de lisina em plantas	11
3.3 A via biossintética da lisina em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
OBJETIVOS	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Material Vegetal	19
2. Linhagens de bactérias	19
3. Plasmídeos	20
4. Preparo de fragmentos de DNA para marcação radioativa	24
4.1 Reações de PCR para produção de insertos usados como sonda	24
4.2 Preparo do DNA plasmideal e purificação de insertos	25
4.3 Marcação e purificação das sondas	25
5. Isolamento do clone genômico da LKR/SDH	26
5.1 Preparo da biblioteca genômica	26
5.2 Obtenção de placas de lise e preparo de membranas	26
5.3 Hibridizações das membranas	27

5.4 Sonda utilizada	27
5.5 Preparo de DNA dos clones λ EMBL3 em pequena escala	27
5.6 Análise do DNA dos fagos	28
5.7 Preparo do DNA dos clones	29
5.8 Preparo de DNA dos clones selecionados em larga escala	29
5.9 Caracterização dos clones selecionados	30
6. Seqüenciamento randômico ("Shotgun sequencing")	31
6.1 Construção de bibliotecas "shotgun"	31
6.2 Seqüenciamento	33
6.3 Análise das seqüências	34
7. Experimento de "Southern blot"	35
7.1 Extração de DNA genômico de milho	35
7.2 Digestões de DNA genômico e separação em gel	36
7.3 Transferência Neutra	36
7.4 Hibridização	37
7.5 Sonda utilizada	37
8. Experimentos de "Northern blot"	37
8.1 Extração de RNA total de endosperma de milho	37
8.2 Preparo das amostras e separação em gel	39
8.3 Transferência	39
8.4 Hibridização	39
8.5 Sonda utilizada	40
RESULTADOS	41
1. Preparo e análise dos insertos utilizados como da sonda	41
2. Isolamento e caracterização do clone genômico da LKR/SDH	41
2.1 Isolamento dos clones	41
2.2 Caracterização dos clones recombinantes	47
3. Seqüenciamento do clone genômico da LKR/SDH	51
3.1 Seqüenciamento "shotgun"	51

3.2 Análise estrutural do clone genômico da LKR/SDH	53
3.3 Análise da seqüência deduzida de aminoácido do gene da LKR/SDH	63
4. Número de genes no genoma do milho	68
5. Análise da expressão temporal	68
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	81
BIBLIOGRAFIA	83

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato e via de catálise da lisina	08
Figura 2A	Esquema ilustrando uma semente de milho e as regiões do endosperma	14
Figura 2B	Coloração histoquímica da atividade da SDH	14
Figura 3	Via da síntese de lisina em fungos e leveduras	17
Figura 4	Representação esquemática do plasmídeo pBluescript II KS(+/-)	22
Figura 5	Esquema ilustrando a construção de uma biblioteca "shotgun"	32
Figura 6	Seqüência do fragmento YAFF	42
Figura 7	Seqüência do fragmento SDHend	43
Figura 8	Seqüência do fragmento LKR 1.2 Kb	44
Figura 9	Esquema representando o alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos dos fragmentos YAFF, LKR 1.2 Kb e SDHend com a seqüência de aminoácidos do cDNA da LKR/SDH	45
Figura 10A	Esquema do bacteriófago λ EMBL3	46
Figura 10B	Clone genômico isolado da enzima LKR/SDH	46
Figura 11	Análise de restrição dos clones genômicos λ M YAFF com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV e <i>Hind</i> III	48
Figura 12	"Southern blot" dos clones genômicos λ M YAFF I a λ M YAFFVI digeridos com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV e <i>Hind</i> III	49
Figura 13	"Southern blot" dos clones genômicos λ M YAFF VII a λ M YAFFXII digeridos com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV e <i>Hind</i> III	50
Figura 14	Padrão de restrição dos clones genômicos λ M YAFF I, λ M YAFF VI, λ M YAFF IX e λ M YAFF XII	52

Figura 15	Seqüência de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos do clone genômico da LKR/SDH de milho	54
Figura 16	Esquema representando os introns e exons no gene da LKR/SDH de milho	58
Figura 17	Representação esquemática comparativa do padrão de exons e introns presentes na seqüência do gene da LKR/SDH de milho e de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
Figura 18A	Seqüência de nucleotídeos deduzida do clone genômico da LKR/SDH de milho	64
Figura 18B	Alinhamento de sub-regiões do domínio LKR homólogo aos sítios de ligação de substrato na proteína LYS1	64
Figura 19	Diagrama esquemático das similaridades entre polipeptídeos mono e bifuncionais da LKR/SDH de levedura, plantas e animais	65
Figura 20	Análise comparativa entre as seqüências deduzidas de aminoácido dos clones genômicos da LKR/SDH de milho e <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Figura 21A	Esquema representando o padrão de restrição do clone da LKR/SDH de milho com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RV	69
Figura 21B	“Southern blot” comparativo de DNAs de milho, Coix e sorgo	69
Figura 22	Análise comparativa do padrão de expressão temporal do gene da LKR/SDH em milho normal e mutante	70
TABELAS		
Tabela 1	Lista dos introns presentes na seqüência do clone genômico da LKR/SDH	59
Tabela 2	Tamanho dos exons e introns presentes nos clones genômicos de milho e <i>Arabidopsis thaliana</i>	62

ABREVIATÓES

°C	Grau Celsius	mm	Milímetros
η	Índice de Refração	MOPS	[3-(N-morfolino) Ácido Propanissulfônico]
μg	Micrograma		
μl	Microlitro	NaCl	Cloreto de Sódio
μM	Micromolar	ng	Nanogramas
BSA	Soro Albumino Bovino	NaOH	Hidróxido de Sódio
Ca²⁺	Íon Cálcio	(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amônio
cpm	Cintilações por Minuto	pb	Pares de Base
CsCl	Cloreto de Césio	pfu	Unidade Formadora de Placa de Lise
DAP	Dias após Polinização		
DEPC	Dietil Pirocarbonato	pmoles	Picomoles
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético	rpm	Rotações por Minuto
		SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
EMBL	European Molecular Biology Laboratories	SSC	NaCl/Citrato trissódico
g	Grama	TE	Tris/EDTA
HCL	Ácido Clorídrico	Tris	Tris(Hidroximetil) Aminometano
Kb	Kilobases		
KDa	Kilodaltons	U	Unidade
KCl	Cloreto de Potássio	v/v	Relação Volume/Volume
L	Litro		
LiCl	Cloreto de Lítio		
M	Molaridade		
mA	Miliampere		
mg	Miligrama		
MgCl₂	Cloreto de Magnésio		
MgSO₄	Sulfato de Magnésio		
ml	Mililitros		
mM	Milimolar		

RESUMO

No endosperma de milho a lisina pode originar-se a partir da via metabólica do ácido aspártico e/ou através da translocação desse aminoácido a partir de outras partes da planta. Entretanto, há evidências de que ao longo do desenvolvimento da semente a lisina é degradada pela via da sacaropina, sugerindo que esse aminoácido é fornecido à semente em quantidades maiores que aquela necessária à síntese de proteínas.

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstram que a enzima lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH) está envolvida nos primeiros passos da degradação da lisina em plantas. Na semente em desenvolvimento, o padrão da atividade da enzima é coordenado com a taxa de deposição de zeínas indicando que tanto os genes que codificam zeínas como o gene que codifica a LKR/SDH estão sob o controle de um mesmo sistema regulatório.

O padrão de expressão temporal do gene da LKR/SDH foi examinado neste trabalho em endospermas normal e mutante o2 através de experimentos de "Northern blot". A análise dos resultados indicou que a mutação o2 afeta drasticamente a transcrição do gene, reduzindo os níveis de polipeptídeos da LKR/SDH. Esse resultado sugere que os níveis de lisina no endosperma são controlados transcricionalmente.

Neste trabalho também descrevemos a clonagem e a caracterização do clone da enzima LKR/SDH de milho, isolado de uma biblioteca genômica construída no vetor λ EMBL3. Dois fragmentos diferentes do cDNA da enzima de milho foram utilizados como sondas para o isolamento do gene; um dos fragmentos correspondente ao domínio LKR (sonda YAFF) e o outro correspondente ao domínio SDH (sonda SDHend). O seqüenciamento do clone genômico isolado revelou que a proteína codificada pelo gene da LKR/SDH cobre aproximadamente 11 Kb do genoma de milho e é constituído por uma "Open reading frame" (ORF) interrompida por 25 introns de tamanhos variando entre 85 a 1028 nucleotídeos e que prediz uma proteína de 1060 aminoácidos. Na região

flanqueadora 5' foi encontrado a -375 pb do início de tradução um domínio G-box, que se caracteriza como um provável sítio de ligação de bZIPs, o que reforça a hipótese de que o fator Opaco-2 exerça um papel importante na degradação de lisina. A análise das seqüências dos genes de milho e *Arabidopsis* mostrou que a estrutura do gene é bastante conservada e a análise por "Southern blot" indicou ainda que existem cópias únicas deste gene em milho, *Coix* e sorgo.

SUMMARY

In maize endosperm, lysine can be synthesized by a specific branch of the aspartic family biosynthetic pathway or can be translocated to other parts of the plant. However, there are evidences that lysine is catabolized via the saccharopine pathway suggesting that this amino acid is supplied in higher amounts than necessary for proteins synthesis.

Lysine ketoglutarate reductase/ saccharopine dehydrogenase (LKR/SDH) catalyzes the first two sequential steps in lysine degradation in maize endosperm. The pattern of enzyme activity is coordinated with zein synthesis. These evidences suggest that both zein and LKR/SDH genes are regulated by under the same control mechanism.

Temporal pattern expression analysis of the LKR/SDH gene were examined in normal and mutant *o2* maize endosperm by Northern blot experiments. The *o2* mutation affects the transcription of LKR/SDH genes. These result suggest that lysine levels in maize endosperm may be controlled at the transcriptional level.

In this work we described the cloning and characterization of the LKR/SDH gene isolated from a maize genomic library. The sequence of LKR/SDH revealed that the gene covers about 11 Kb of the maize genome. This gene is constituted by an open reading frame (ORF) interrupted by 25 introns ranging from 85 to 1028 bp. The predicted ORF encodes a polypeptide of 1060 amino acids showing homology to others LKRs. In the 5' flanking region of the gene was found a G-box cis-element located at 375 pb upstream the translation start codon. This element suggests a possible interaction of Opaque-2 protein with the promoter region of the LKR/SDH gene. Sequences analysis of the gene in maize and *Arabidopsis* revealed that the gene structure is conserved between them and Southern blot analysis showed that there is a single copy in maize, *Coix* and sorgum genomes.

INTRODUÇÃO

1. As proteínas de reserva da semente

Em endosperma normal de sementes de milho, assim como no endosperma de outras gramíneas da tribo Andropogoneae, ocorre o acúmulo de proteínas de reserva ao longo do desenvolvimento. Essas proteínas denominadas prolaminas constituem-se na principal fonte de nitrogênio durante a germinação do embrião e em cereais são ricas em asparagina, glutamina e arginina ou prolina, mas deficientes em lisina, treonina e triptofano (Payne, 1983). Assim, o baixo conteúdo de determinados aminoácidos nas sementes decorre da escassez destes em suas proteínas de reserva.

As proteínas de reserva são solúveis em álcool. Elas são sintetizadas em polirribossomos e são acumuladas em organelas denominadas corpúsculos protéicos (Burr & Burr 1982; Larkins *et al.*, 1984). Em milho, as prolaminas são denominadas zeínas e, baseado na solubilidade diferencial essas proteínas foram classificadas como α -, β - e γ -zeínas (Essen, 1986; Shewry & Tatham, 1990), podendo ser separadas por SDS-PAGE em classes de polipeptídeos de 27, 22, 19, 16, 14 e 10 kDa. Mais de 70% do total das prolaminas pertencem às classes de 19 e 22 kDa e são codificadas por famílias multigênicas (Viotti *et al.*, 1979; Burr & Burr, 1982). Cada uma das outras classes de zeínas são codificadas por um ou poucos genes.

Várias mutações são conhecidas por alterarem os níveis de zeína no endosperma de milho (Motto *et al.*, 1989). O mutante *opaco2* (*o2*), assim denominado por apresentar semente madura opaca, reduz de 50 a 70% os níveis de α -zeínas de 22 kDa (Schmidt, 1993).

A clonagem e a caracterização do fator *Opaco2* (*O2*) mostrou que o gene codifica uma proteína que se caracteriza por um domínio básico/zíper de leucinas (bZIP) e que atua como um ativador transcricional de muitos genes que codificam zeínas os quais apresentam na região do promotor a sequência consenso 5'-GATGApypuTGpu-3' (Schmidt *et al.*, 1987; Motto *et al.*, 1988; Hartings *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1990). Outros genes como aqueles que codificam a proteína

inativadora de ribossomo b-32 (Lohmer *et al.*, 1991; Bass, *et al.*, 1992), a chaperona b-70 (Marocco *et al.*, 1991) e a forma citosólica de piruvato ortofosfato diquinase (Gallusci *et al.*, 1996; Maddaloni *et al.*, 1996) também são afetados pela mutação *o2*. Acredita-se que a proteína *O2* desempenha um papel mais geral na regulação do desenvolvimento do endosperma (Cord Neto *et al.*, 1995).

2. Os altos níveis de lisina no endosperma *opaco2*

Em sementes maduras de milho o endosperma apresenta um baixo valor nutricional devido à deficiência de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano (Mertz *et al.*, 1964).

No endosperma de milho a lisina pode ser sintetizada a partir da via do ácido diaminopimelato (Sodek, 1976), porém ela é translocada em quantidade relativamente alta (cerca de 5% do total de aminoácidos livres) para a semente em desenvolvimento (Arruda & Silva, 1979). Como as zeínas não possuem lisina (Dalby & Tsay, 1975) e como essas proteínas se acumulam abundantemente no endosperma, a demanda por lisina durante o desenvolvimento do endosperma é baixa.

Basicamente a porcentagem de lisina no endosperma de milho é influenciada por três componentes: quantidade de aminoácidos livres, nível das zeínas e das proteínas não-zeínas. No mutante *o2*, que tem o seu padrão de síntese de proteínas no endosperma alterado, há um aumento de 2 a 5 vezes na quantidade de aminoácidos livres no endosperma (Misra *et al.*, 1975). Entretanto, apenas 5% da lisina total do endosperma é não-protéica. (Mehta *et al.*, 1979), contribuindo pouco para o aumento do teor deste aminoácido na semente *o2*. É característico das zeínas a quase total ausência de resíduos de lisina (Dalby e Tsai, 1975; Schmidt, 1993) e, assim, a redução na síntese destas proteínas contribui para o aumento da porcentagem de lisina na semente. A maior parte desse aminoácido essencial encontra-se sob forma de proteínas não-zeínas: as albuminas, as globulinas e as glutelinas que contêm em média 5% de resíduos de lisina (Murphy & Dalby, 1971).

No mutante *o2*, o aumento da síntese de proteínas não-zeínas não pode ser facilmente explicado pelo que se conhece até o momento sobre o fator *O2*. É possível que efeitos pleiotrópicos da mutação *o2* emanem de alterações no metabolismo de nitrogênio, visto que o efeito primário dessa mutação é a redução nos níveis de zeína. Evidências para essa alteração metabólica são sugeridas pelo aumento na concentração de amônia (Misra e Oaks, 1981) e no teor de aminoácidos livres (Misra *et al.*, 1975) no endosperma *o2* em relação ao normal. O acúmulo desses intermediários da assimilação do nitrogênio podem realmente resultar em alterações homeóticas, como por exemplo no pH, que pode alterar o padrão de síntese de proteínas e carboidratos no endosperma.

Outra possibilidade para o aumento na síntese de proteínas ricas em lisina no endosperma *o2* é dada como uma consequência direta do aumento na disponibilidade de lisina livre nesse endosperma (Arruda *et al.*, 1994). Dessa forma, a lisina pode ser um substrato limitante para a síntese protéica no endosperma de milho. Por outro lado, o aumento na concentração de lisina pode estar associado com a baixa atividade de degradação desse aminoácido no endosperma mutante (Sodek e Wilson, 1970; Arruda e Silva, 1983). A análise da composição de aminoácidos e das frações protéicas de endospermas do tipo normal e de mutantes simples e duplos, evidenciou um aumento na síntese de proteínas ricas em lisina no mutante duplo *o2o2Ask1Ask1* (Azevedo *et al.*, 1990). Esse aumento foi atribuído a uma maior disponibilidade de lisina via síntese, devido a aspartato quinase codificada pelo gene *Ask1* que é menos sensível a retroinibição pela lisina, e pela reduzida degradação desse aminoácido determinada pela mutação *o2*.

3. A biossíntese de lisina:

3.1 Síntese de lisina em plantas

O acúmulo de lisina nos tecidos vegetais é regulado por processos complexos que envolvem a síntese, deposição e degradação desse aminoácido.

A lisina, juntamente com a metionina e a treonina, é sintetizada nas plantas superiores pela via do diaminopimelato (Bryan, 1980; Figura 1), um ramo específico da via biossintética dos aminoácidos derivados do aspartato. Nesta via o aspartato é o precursor inicial de uma seqüência metabólica que levará à formação de lisina, metionina e treonina (Abelson *et al.*, 1952; Cohen e Hirsch, 1954; Kalan e Ceithaml, 1954; Azevedo *et al.*, 1997). A treonina, por sua vez, é precursora da isoleucina que, através da via de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, também origina leucina e valina (Singh e Shaner, 1995; Azevedo *et al.*, 1997).

A via metabólica do ácido aspártico em plantas tem sido objeto de muitos estudos a nível bioquímico, genético e molecular. Esses estudos tem revelado que essa via é ramificada e envolve a participação de uma série de enzimas alostericamente retroinibidas pelos aminoácidos produzidos nas respectivas ramificações da via. A atividade da aspartato quinase (AK), a primeira enzima da via, é inibida por lisina e treonina. Adicionalmente, lisina também inibe a atividade da dihidropicolinato sintetase (DHPS), enquanto que a treonina inibe a atividade da homoserina desidrogenase (HSD). Ou seja, lisina e treonina regulam a sua própria síntese por inibição da atividade da primeira enzima que leva exclusivamente a sua síntese e também por inibição da atividade da primeira enzima da via (Figura 1).

As enzimas AK e DHPS são consideradas as principais enzimas da via do aspartato para a síntese da lisina, em função dos efeitos retroinibitórios desse aminoácido sobre a atividade dessas enzimas. Estudos demonstram que os níveis de lisina retroinibem essas enzimas sendo o nível de inibição maior na atividade da enzima DHPS (Galili, 1995).

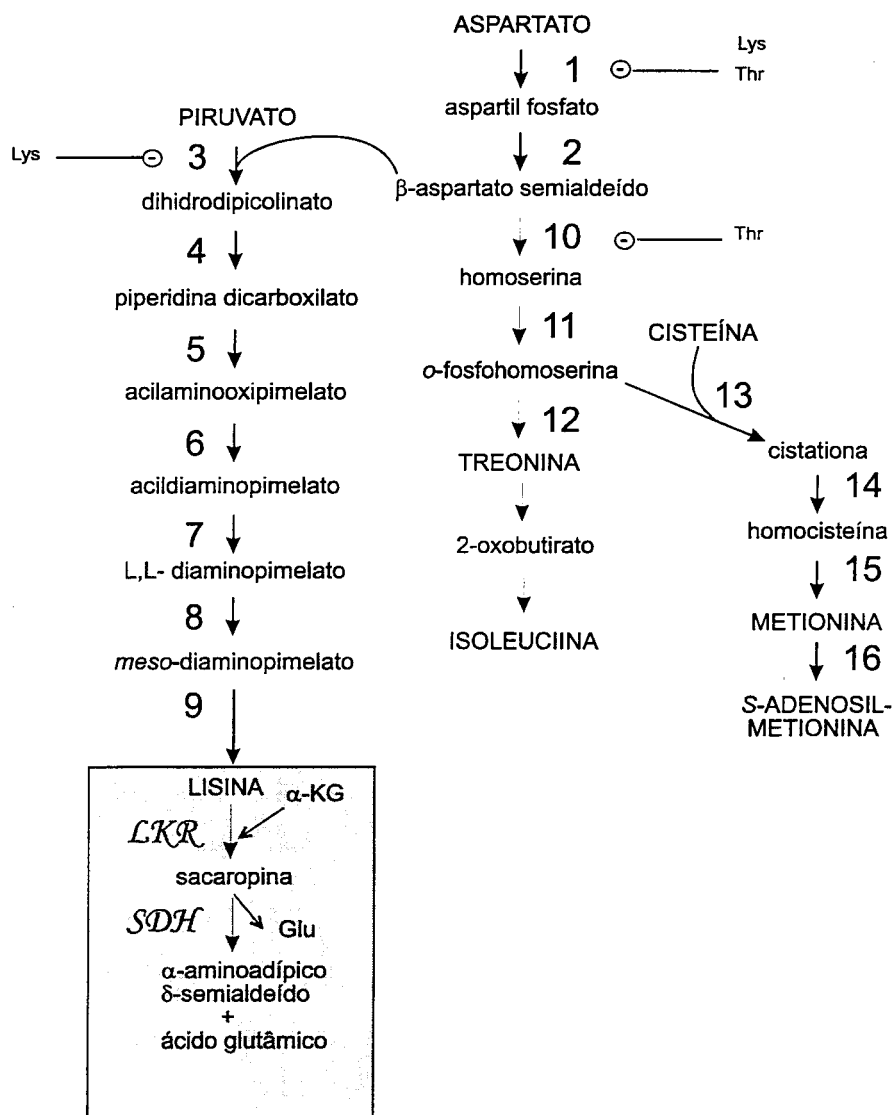


Figura 1. Via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato. Os números especificam as atividades enzimáticas: **1**, aspartato quinase; **2**, aspartato semialdeído desidrogenase; **3**, dihidropicolinato sintetase; **4**, dihidropicolinato redutase; **5**, piperidina dicarboxilato acilase; **6**,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

A via de catálise da lisina é apresentada em destaque. Nessa via catalítica as enzimas lisina cetoglutarato redutase (LKR) e sacaropina desidrogenase (SDH) assumem papéis centrais.

A AK, primeira enzima da via, catalisa a fosforilação do aspartato a β -aspartil fosfato (Datta e Gest, 1964; Patte *et al.*, 1966; Henk e Wahnbaeck, 1977; Bryan, 1980). O β -aspartil fosfato é reduzido pela atividade da aspartato semialdeído desidrogenase a β -aspartil semialdeído (Gengenbach *et al.*, 1978), o qual serve de substrato para duas outras enzimas, a DHPS e a HSD (Figura 1).

Em plantas há evidências da presença de izoenzimas da AK. Algumas são retroinibidas por lisina, outras por treonina ou sinergisticamente por lisina e S-adenosil-metionina (Rognes *et al.*, 1980; Galili, 1995; Azevedo *et al.*, 1997). Clones genômicos e de cDNA de isoformas da AK sensíveis a retroinibição por treonina foram isolados de cenoura, milho e *Arabidopsis* (Weisemann e Matthews, 1993; Ghislain *et al.*, 1994). Outros clones de cDNA de AK sensíveis a retroinibição por lisina também foram clonados (Frankard *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1997).

Dentre as diversas isoformas de AK em plantas, algumas também possuem a atividade de HSD (Wilson *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992). A HSD catalisa a primeira reação que é unicamente associada com a biossíntese de treonina, isoleucina e metionina pela conversão do aspartato semialdeído a homoserina (Figura 1). Pelo menos duas isoformas de HSD, uma sensível e outra insensível à treonina foram clonadas. Essas isoformas são constituídas por um único polipeptídeo com dois domínios respectivamente, AK e HSD.

Dessa maneira, a inibição da AK, a primeira enzima da via, resulta na falta de substratos intermediários para a síntese de metionina. Isto pode limitar a síntese de proteínas, acarretando efeitos adversos ao endosperma em desenvolvimento, uma vez que somente pequenas quantidades de metionina são translocadas à semente (Arruda e Silva, 1979).

Já a retroinibição da DHPS afeta diretamente a síntese de lisina. A DHPS faz a condensação do β -aspartil semialdeído e do piruvato em dihidropicolinato. Dentre as enzimas da via do aspartato em plantas, a DHPS é a enzima mais sensível a inibição por lisina ($I_{0.5}$ entre 10 e 50 μ M), diferentemente de bactérias, nas quais a enzima é muito menos sensível ($I_{0.5}$ aproximadamente 1 mM; Galili *et al.*, 1995).

A DHPS tem sido isolada purificada e caracterizada a partir de várias espécies de plantas. A enzima apresenta-se como um tetrâmero cujo peso molecular é próximo a 123 kDa nas espécies estudadas.

Vários cDNAs de DHPS de plantas já foram clonados e caracterizados, embora nenhum clone genômico completo desta enzima tenha sido isolado. Todos os clones caracterizados codificam proteínas maduras de 326 aminoácidos, exceção feita à proteína de *Populus* que apresenta 327 (Vauterin e Jacobs, 1994). Os polipeptídeos deduzidos revelaram a existência de seqüências de aminoácidos amino-terminais de tamanho e composição característicos de peptídeos de trânsito para plastídeos e/ou cloroplastos, contudo sem grandes conservações de seqüência (Kaneko *et al.*, 1990; Frisch *et al.*, 1991; Vauterin e Jacobs, 1994); Ghislain *et al.*, 1995). A localização da DHPS em plastídeos é crucial para a síntese de lisina, pois as reações bioquímicas catalisadas por esta enzima requerem energia. Contrariamente, a localização da AK dentro da organela não é essencial para a produção de treonina.

Mutantes de cevada e milho com AK insensível à retroinibição por lisina não acumulam esse aminoácido, mas sim o aminoácido treonina (Bright *et al.*, 1982; Hibberd & Green, 1982; Muahlbauer *et al.*, 1994). Esta observação deve-se a retroinibição da enzima DHPS. Em plantas transgênicas de tabaco expressando os genes bacterianos da AK e DHPS também insensíveis à retroinibição pela lisina não acumulam esse aminoácido nas sementes, apesar de acumularem metionina e treonina (Karchi *et al.*, 1994). Plantas transgênicas de tabaco e canola expressando AK e/ou DHPS, mostraram superprodução de treonina e significativos aumentos no acúmulo de lisina em sementes e folhas jovens (Karchi *et al.*, 1993; Falco *et al.*, 1995). Essas plantas, no entanto, apresentam alterações fenotípicas e alta atividade de degradação de lisina foi observada em decorrência do acúmulo de lisina (Karchi *et al.*, 1994; Falco *et al.*, 1995).

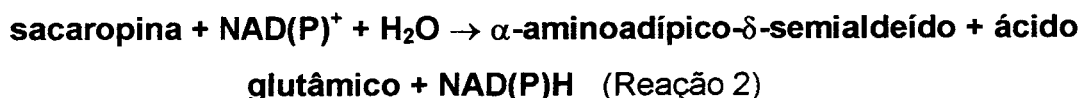
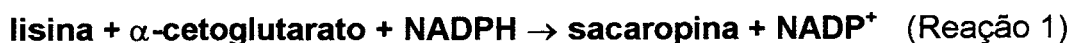
3.2 Degradação de lisina em plantas

Em plantas superiores a via de degradação da lisina é muito semelhante àquela observada em mamíferos, nos quais a lisina é catabolizada em grande parte pela via da sacaropina (Figura 1). Entretanto essa via, que envolve a produção de ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído e sacaropina é encontrada em apenas alguns microorganismos (Vogel *et al.*, 1964).

Experimentos feitos em trigo, milho e cevada utilizando ^{14}C -lisina demonstraram a incorporação da radioatividade em ácido α -aminoadípico e ácido glutâmico (Nigam e McConnel, 1963; Sodek e Wilson, 1970; Brandt, 1975; Moller, 1976). Esses dados evidenciam que a lisina é catabolizada pela via da sacaropina (Figura 1), cujas enzimas chaves são a lisina-cetoglutarato redutase (LKR) e a sacaropina desidrogenase (SDH). Essas enzimas possuem alta atividade no endosperma em desenvolvimento (Arruda *et al.*, 1982, Arruda e da Silva, 1983, Brochetto-Braga *et al.*, 1992) e em plantas estão contidas num polipeptídeo bifuncional (Gonçalves-Butruile *et al.*, 1996).

No endosperma de milho o catabolismo de lisina desempenha um papel importante no mecanismo de controle nos níveis de lisina livre (Arruda e Silva, 1979; Silva e Arruda, 1979). Ao longo do desenvolvimento da semente de milho, a quantidade de lisina encontrada na seiva do pedúnculo da espiga e na região pedicelo-placento chalazal são superiores à encontrada no endosperma (Arruda e Silva, 1979; Arruda e da Silva, 1983; Lyznik *et al.*, 1985). Como a quantidade de lisina translocada para a região do endosperma é aproximadamente duas a três vezes maior que a necessária para a síntese de proteínas (Arruda e da Silva, 1983), espera-se um acúmulo de lisina livre no endosperma. Entretanto isto não ocorre, pois a concentração de lisina livre é mantida a baixos níveis no endosperma. Como citado anteriormente, altas concentrações desse aminoácido inibem a via do diaminopimelato, resultando na falta de precursores da síntese da metionina (Figura 1). Como a metionina é muito pouco translocada para o endosperma, a inibição da via poderia ter efeitos adversos para o desenvolvimento do endosperma. Assim, para manter os níveis de lisina baixo, as células precisam degradar o excesso desse aminoácido livre.

A primeira enzima da via de catálise da lisina é a LKR. Esta enzima condensa a lisina e α -cetoglutarato em sacaropina utilizando NADPH como cofator (Reação 1; Figura 1). O passo subsequente da degradação envolve a hidrólise da sacaropina em ácido α -aminoadípico- δ -semialdeído (AASA) e ácido glutâmico pela atividade da SDH e com a utilização de NAD^+ ou NADP^+ como cofator (Reação 2; Figura 1).



A atividade da LKR tem sido demonstrada em diferentes linhagens de milho. Em todos os materiais observou-se que o padrão da atividade da enzima é coordenado com a taxa de deposição de zeínas (Brochetto-Braga *et al.*, 1992). Assim, com o aumento da taxa de síntese de zeínas há um aumento na atividade da enzima LKR, resultando na degradação do excesso de lisina presente no endosperma. Espera-se, portanto, que a síntese de zeínas e o catabolismo de lisina operem sob um mesmo mecanismo regulador.

A compreensão da via metabólica da lisina em plantas é de grande importância, devido a concentração limitada desse aminoácido essencial nas principais fontes de alimentos como os cereais. Importantes informações podem ser obtidas pela elucidação das propriedades das enzimas envolvidas na biossíntese e catabolismo da lisina e pela análise de mutantes nos quais as atividades das enzimas se encontram alteradas.

Desde a descoberta de que o mutante o2 possui um alto teor de lisina no endosperma (Mertz *et al.*, 1964), muitos estudos se direcionaram à elucidação do metabolismo desse aminoácido no mutante. Experimento com ^{14}C -lisina demonstram que a degradação da lisina se dá em menores taxas no mutante o2 que no endosperma de milho normal (Sodek and Wilson, 1970). Isso ocorre devido à redução no número de unidades da enzima LKR, que é reduzida de 2 a 3 vezes em relação ao número de unidades no endosperma normal. A LKR extraída de

mutantes *o2* tem características essencialmente semelhantes às daquelas do endosperma normal. Além disso, a enzima foi produzida de maneira coordenada com os níveis de zeína durante o desenvolvimento do endosperma. Foi sugerido então que o gene *o2*, que é um transativador das zeínas, possa estar envolvido na regulação do gene da LKR/SDH no endosperma de milho (Brocheto Braga *et al.*, 1992).

Em milho a enzima LKR/SDH apresenta-se como um polipeptídeo bifuncional de 125 kDa (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996). Ensaios histoquímicos revelam que esse polipeptídeo caracteriza-se por ser altamente expresso nas camadas das células de aleurona e subaleurona no endosperma em desenvolvimento (Cord Neto *et al.*, 1999 ; Figura 2). Além disso, a detecção da atividade da LKR e da SDH dá-se apenas em sementes em desenvolvimento. Em milho a enzima LKR/SDH é encontrada no citossol e é transcrita por um único gene. Experimentos de “Northern blot” detectaram que RNAs mensageiros da enzima são encontrados em grande quantidade no endosperma, em baixa concentração em raízes, folhas e coleóptiles e completamente ausentes no embrião (Cord Neto *et al.*, 1999), sugerindo a existência de uma regulação temporal e espacial do gene.

O catabolismo de lisina, entretanto, parece ter uma função mais importante que meramente controlar o nível deste aminoácido. Considerando-se as últimas descobertas envolvendo a ativação da enzima LKR em tabaco e em milho, vê-se que a atividade enzimática é induzida por Ca^{2+} e pela fosforilação de proteínas. Isso sugere o envolvimento de uma via de transdução de sinal mediada por Ca^{2+} em conjunto com algum produto do catabolismo da lisina (Karchi *et al.*, 1995). Além disso, experimentos recentes em nosso laboratório demonstraram que a fosforilação do polipeptídeo LKR/SDH é capaz de alterar somente o padrão de atividade do domínio LKR (Kemper *et al.*, 1999).

Estudos bioquímicos da enzima e a posse de clones genômicos têm demonstrado que na maioria das plantas e em algumas espécies de mamíferos, a LKR não existe como uma unidade independente, mas ligada a SDH em um único polipeptídeo bifuncional. As bases moleculares dessa ligação ainda não estão

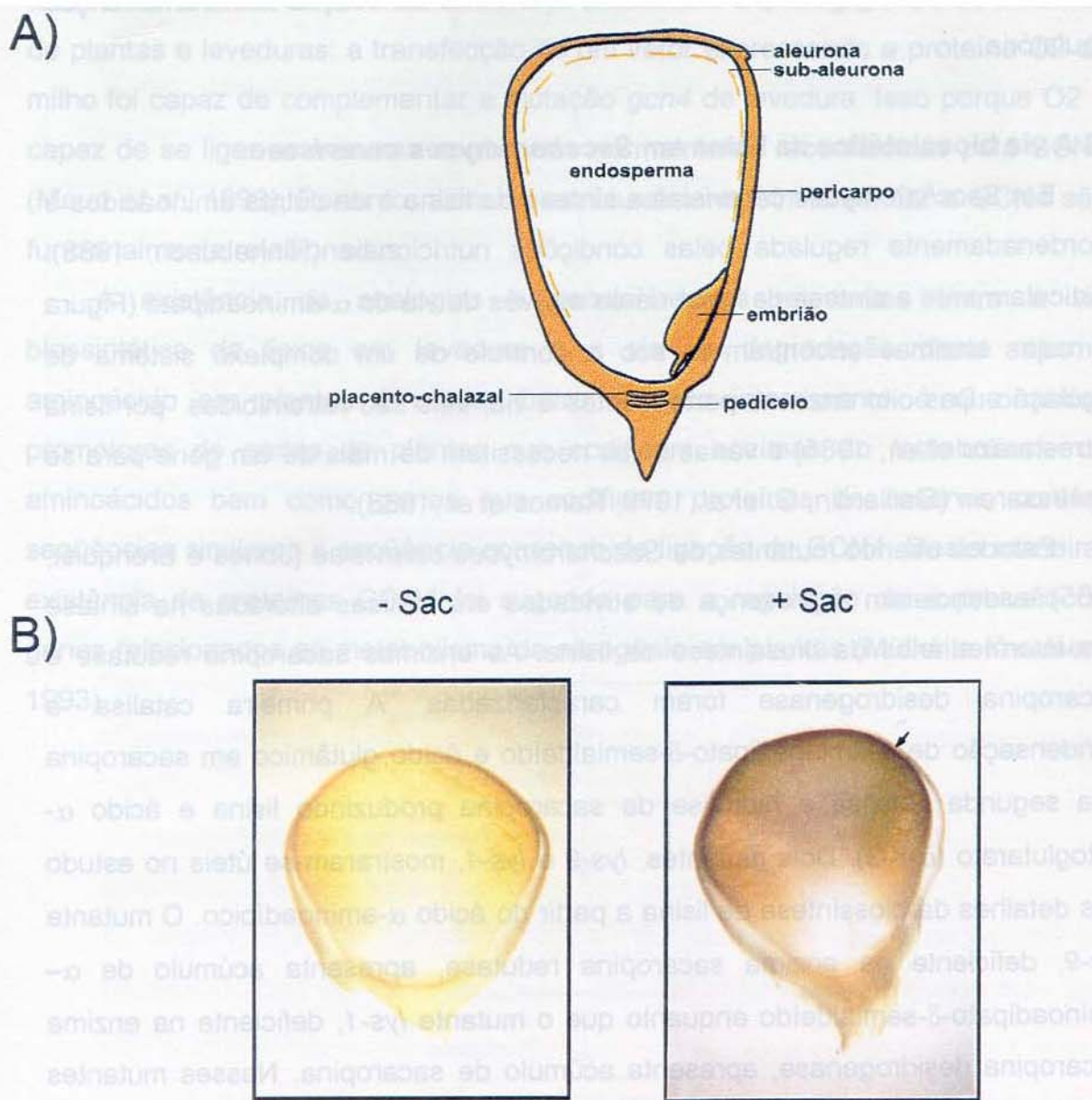


Figura 2. A) Representação esquemática da semente de milho e das regiões do endosperma.

B) Análise histoquímica da atividade da SDH. Sementes com 20 DAP foram seccionadas longitudinalmente e incubadas em uma mistura de reação contendo sacaropina a 2 mM. A figura da esquerda (-Sac) mostra uma seção de endosperma controle incubada na ausência de sacaropina. A reação colorimétrica positiva da atividade da SDH é indicada por uma seta na figura a direita (+Sac).

elucidadas, mas sugerem que a estrutura bifuncional da enzima tenha uma função regulatória.

3.3 A via biossintética da lisina em *Saccharomyces cerevisiae*

Em *Saccharomyces cerevisiae* a síntese da lisina e de outros aminoácidos é coordenadamente regulada pelas condições nutricionais (Hinnebusch, 1988). Particularmente a síntese de lisina dá-se através da via do α -aminoadipato (Figura 3), cujas enzimas encontram-se sob o controle de um complexo sistema de regulação. Das oito enzimas pertencentes à via, seis são retroinibidas por lisina (Urrestarazu *et al.*, 1985) e várias delas necessitam de mais de um gene para se expressarem (Gaillardin, G. *et al.*, 1979, Ramos *et al.*, 1988).

Estudos usando mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Jones e Bronquist, 1965) evidenciaram a presença de atividades enzimáticas alteradas na síntese dos intermediários da biossíntese de lisina. As enzimas sacaropina redutase e sacaropina desidrogenase foram caracterizadas. A primeira catalisa a condensação de α -aminoadipato- δ -semialdeído e ácido glutâmico em sacaropina e a segunda catalisa a hidrólise da sacaropina produzindo lisina e ácido α -cetoglutarato (α -KG). Dois mutantes, *lys-9* e *lys-1*, mostraram-se úteis no estudo dos detalhes da biossíntese de lisina a partir do ácido α -aminoadípico. O mutante *lys-9*, deficiente na enzima sacaropina redutase, apresenta acúmulo de α -aminoadipato- δ -semialdeído enquanto que o mutante *lys-1*, deficiente na enzima sacaropina desidrogenase, apresenta acúmulo de sacaropina. Nesses mutantes não foi observado um sistema de inibição pelo produto final (Jones e Bronquist, 1965). Além do mais, os produtos dos genes *LYS9* e *LYS1* dessa via biossintética encontram seus análogos funcionais, respectivamente, nas enzimas SDH e LKR da via do catabolismo em milho.

Assim como em plantas, muitos dos genes da via biossintética da lisina em *Saccharomyces cerevisiae* também parecem ser ativados transcricionalmente por uma proteína bZIP, a GCN4. Este transativador reconhece seqüências de nucleotídeos com o núcleo 5'-TGACTC-3' presentes nos promotores de vários genes que são regulados pelo sistema GCN (General Control of Nitrogen) em

leveduras. Um fato surpreendente reforça ainda mais a analogia entre os sistemas de plantas e leveduras: a transfecção de um vetor expressando a proteína O2 de milho foi capaz de complementar a mutação *gcn4* de levedura. Isso porque O2 é capaz de se ligar as mesmas seqüências normalmente reconhecidas pela GCN4 (Mauri *et al.*, 1993). Portanto, além de estruturalmente similares, O2 e GCN4 são funcionalmente relacionadas.

A existência de analogias e peculiaridades relevantes entre a via biossintética da lisina em levedura e a via de degradação deste mesmo aminoácido em plantas é nítida. Outro aspecto interessante é que muitos promotores de genes de plantas que codificam enzimas do metabolismo de aminoácidos bem como genes que codificam proteínas de reserva, contêm seqüências similares à seqüência consenso de ligação da GCN4. Desta maneira, existência de proteínas GCN4 foi sugerida para a regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio em plantas (Müller e Knudsen, 1993).

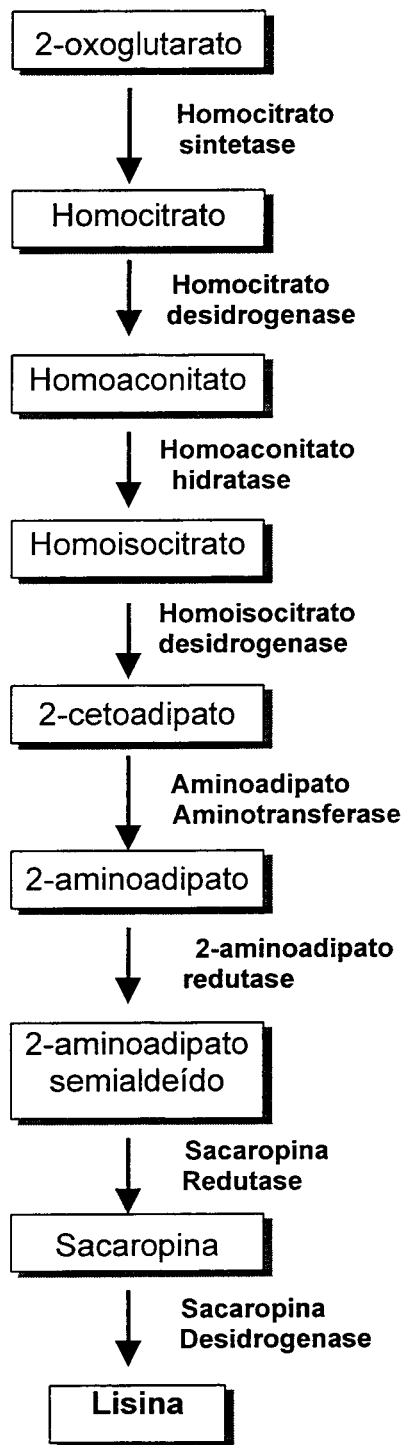


Figura 3. Via da síntese de lisina em fungos e leveduras. Relação dos genes *Lys* (Ramos et al., 1988; Schmidt et al., 1989).

Objetivos

Como destacado anteriormente, sabe-se que o padrão da atividade da LKR é coordenado com a taxa de deposição de zeínas nas sementes em desenvolvimento (Brochetto-Braga *et al.*, 1992). Mutantes *o2* apresentam alterações marcantes na síntese de proteínas de reserva e apresentam também um acréscimo significativo no teor de lisina na semente. Esse aumento no teor de lisina no endosperma *o2* deve-se a um menor número de moléculas da enzima LKR o que nos sugere que tanto os genes que codificam zeínas, como o gene que codifica a LKR/SDH estão sob o controle de um mesmo sistema regulatório, possivelmente envolvendo o fator *O2*.

Diante dessas evidências e buscando uma melhor compreensão a nível molecular e fisiológico do catabolismo da lisina em plantas superiores, o nosso objetivo era isolar e caracterizar o gene codificador da LKR/SDH.

Para tanto o trabalho cumpriu as seguintes etapas:

- a) isolamento do clone genômico da enzima LKR/SDH do endosperma de milho;
- b) seqüenciamento do clone genômico;
- c) comparação da seqüência obtida com seqüências descritas;
- d) determinação do número de cópias do gene em milho e do padrão de expressão do mRNA do gene da LKR/SDH no endosperma em desenvolvimento.

Materiais e Métodos

1. Material vegetal

As sementes de milho (*Zea mays* L. cv. Maya) foram obtidas da coleção de germoplasma do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas. Sementes de milho do híbrido comercial F352, Agrocere S/A (Brasil), foram plantadas no campo experimental da Universidade Estadual de Campinas e autopolinizadas.

2. Linhagens de bactérias

Em seguida são descritas as linhagens de bactérias (*Escherichia coli*) utilizadas durante a realização dos trabalhos.

2.a DH5 α

Genótipo relevante F⁻*supE44* Δ (*lacZYA-argF*)U169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

Linhagem supressora de mutação âmbar (*supE44*), defectiva em recombinação (*recA1*), deficiente em restrição e proficiente em metilação no sistema Eco K (*hsd17*). O caráter F⁻ inviabiliza a infecção por fagos fitas simples macho específico, tais como fagos filamentosos do tipo f1.

A deleção dos genes do operon lac (Δ *lacU169*), e a presença do fragmento *lacZ* Δ M15 inserido no prófago ϕ 80 permite a sua utilização em testes de α -complementação na seleção de recombinantes.

A ausência de superprodução do repressor *lacI^q*, nesta linhagem possibilita a realização do teste de α -complementação na ausência de IPTG (Hanahan, 1983).

Esta linhagem apresenta ainda as marcas cromossômicas para a resistência ao ácido nalidíxico (*gyrA96*), e requerimento de suplementação de meio mínimo com tiamina, devido a mutação do gene *thi*.

A mutação no gene *end* (*endA1*) que codifica para endonuclease I, aumenta o rendimento e a qualidade do DNA plasmideal preparado através de técnicas de minipreparação.

Esta linhagem foi empregada na preparação de células competentes, utilizadas nos experimentos de transformação durante as subclonagens.

2.b K803

Genótipo relevante: *galK2 galT22 hsdS3* ($r_k^- m_k^-$) *lacY1 metB1 mrr^+ supE44 F^-*

Esta linhagem foi utilizada como hospedeira do bacteriófago λ EMBL3 durante a seleção dos clones recombinantes da biblioteca genômica de milho utilizada.

As mutações *galK2 galT22* conferem a incapacidade de utilizar galactose como única fonte de carbono. A linhagem apresenta as marcas cromossômicas para supressão da mutação âmbar (*supE44*), supressão da atividade da lactose permease (*lacY1*) e requerimento de metionina para crescimento em meio mínimo (*metB1*). O caráter F^- inviabiliza a infecção por fagos fitas simples macho específico conforme descrito anteriormente.

A mutação *hsdS3* ($r_k^- m_k^-$) abole os sistemas de metilação e restrição, bem como a mutação *mrr^+* bloqueia a restrição de adeninas metiladas de seqüências específicas de DNA, o que favorece a construção de bibliotecas genômicas de plantas, cujo DNA é rico em seqüências metiladas (Whittaker *et al.*, 1988).

3. Plasmídeos

3.a pBluescript II KS+

Plasmídeos pBluescript II KS+ (Stratagene) foram utilizados como vetor nas subclonagens.

O vetor pBluescript II KS+ é um “phagemid” que contém a região intergênica do fago filamentososo do tipo f1, podendo ser secretado como um DNA fita simples na presença de um fago “helper” do tipo f1 (Stratagene Cloning System). Esta região intergênica codifica para funções *cis* requeridas para o empacotamento e replicação do fago. Existem “phagemids” pBluescript contendo uma das duas possíveis orientações da região intergênica, sendo denominados pBluescript II KS+ (pKS+) e pBluescript II KS- (pKS-). O pKS+ replica-se de forma que a fita

codificadora do gene da β -galactosidase seja secretado na partícula do fago, enquanto que o pKS- secreta a fita não codificadora deste gene.

Os vetores pKS +/- possuem 2961 pb e são derivados dos plasmídeos da série pUC portanto estes vetores também possuem α -complementação, além de permitir uma utilização dos mesmos “primers” utilizados no seqüenciamento de insertos clonados em pUC.

A denominação KS refere-se à orientação da região de policlonagem, com relação aos sítios das enzimas de restrição presentes nas extremidades da região (*Kpn* I $\rightarrow$ *Sac* I). Este tipo de plasmídeo é denominado “phagemid” em virtude de apresentar origem de replicação de fago simples fita e também uma origem de replicação plasmideal (derivado de ColE1), que é utilizada na ausência do bacteriófago “helper”. Da mesma forma que os plasmídeos da série pUC, este plasmídeo contém o gene que confere resistência à ampicilina. O plasmídeo está representado na Figura 4.

3.b pGEM®-T Easy

O plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) foi utilizado na subclonagem de fragmentos provenientes de reações de PCR (reações de amplificação em cadeia). Esse vetor possui α -complementação e tem o sítio de múltipla clonagem previamente arranjado pelo fornecedor. Os “primers” T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') são utilizados nas reações de seqüenciamento de DNA inseridos nesse plasmídeo.

3.c pUC18 *Eco* RI/BAP (“Bovine Alkaline Phosphatase”)

O plasmídeo pUC18 digerido com a enzima de restrição *Eco* RI e tratado com fosfatase alcalina bovina foi utilizado na estratégia de subclonagem randômica (“shotgun”). Esse plasmídeo era parte integrante do “kit” utilizado (Ready to Go – Pharmacia Biotech).

Características similares ao pKS+/- são encontradas nesse plasmídeo de 2700 pb.

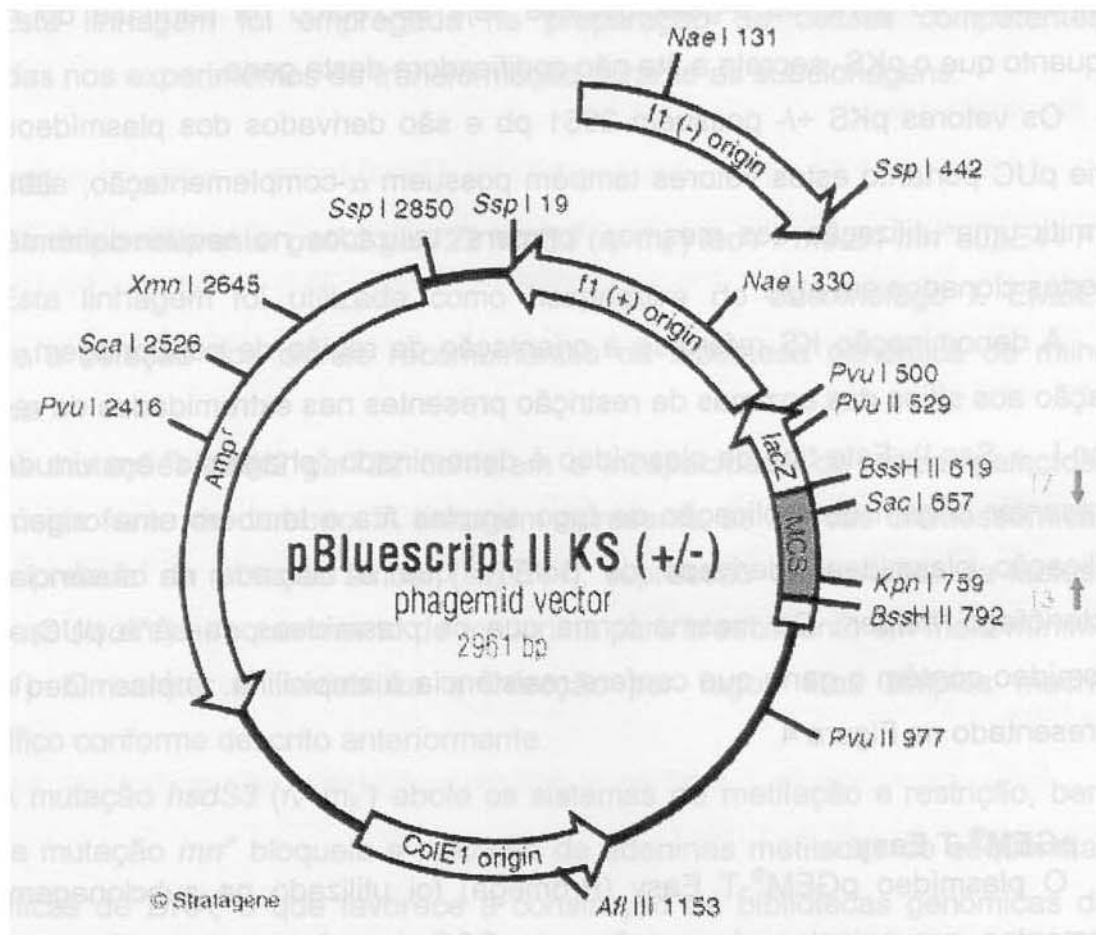


Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pBluescript II KS (+/-). Na figura o sítio de policlonagem está pintado de azul e é delimitado pelos promotores T3 e T7. Em amarelo estão representados o domínio de origem de replicação do plasmídeo quando este é coinfectado com um fago "helper" (f1 (+) origin), o domínio do gene de resistência à ampicilina (Amp^r) e o domínio de origem de replicação do plasmídeo na ausência de um fago "helper" (ColE1 origin).

3.d pKS/LKR 1.2 Kb

O plasmídeo pKS/LKR consiste de um pBluescript (KS+) contendo um fragmento de cDNA da LKR/SDH de milho de 1.2 Kb, clonado entre os sítios de restrição *Bam* HI e *Xba* I. Este fragmento cobre grande parte da região interdomínio do cDNA e foi obtido por RT-PCR (“reverse transcription-polymerase chain reaction”) a partir de oligonucleotídeos sintetizados com base na sequência N-terminal de peptídeos trípticos da enzima. Este plasmídeo foi preparado por outro aluno do laboratório e foi utilizado para o isolamento do clone de cDNA.

3.e pKS/ λ 3-900

O plasmídeo pKS/ λ 3-900 também é um pBluescript (KS+) e contém um fragmento de 900 pb da porção 3’ do cDNA da LKR/SDH de milho. Este plasmídeo foi obtido pela subclonagem do clone de cDNA λ 3 da LKR/SDH. Este plasmídeo foi preparado por outro aluno do laboratório.

3.f pKS/YAFF

O plasmídeo pKS/YAFF contém um fragmento de 522 pb inserido no sítio *Bam* HI do plasmídeo pBluescript II KS (+). Esse fragmento foi obtido pela técnica de “Race” (“Rapid Amplification of cDNA Ends”) a partir de oligonucleotídeos sintetizados com base na sequência do domínio LKR do clone de cDNA de *Arabidopsis thaliana*. Este plasmídeo foi preparado por outro aluno do laboratório.

3.g pKS/SDHend

O plasmídeo pKS/SDHend contém um fragmento de 720 pb, inserido no sítio de *Eco* RI do plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Promega). Esse fragmento foi obtido por reações de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) a partir do plasmídeo pKS/ λ 3-900 e de oligonucleotídeos sintetizados com base na sequência do domínio SDH do clone de cDNA da LKR/SDH de milho, conforme a metodologia descrita a seguir.

4. Preparo de fragmentos de DNA para marcação radioativa

4.1 Reações de PCR para produção de insertos usados como sonda

Reações de PCR foram feitas baseada na técnica descrita por Mc Pherson *et al.*, 1993. Algumas adaptações à metodologia foram necessárias.

Cinquenta nanogramas de DNA do plasmídeo pKS/ λ 3-900 obtidos por minipreparação pelo método de “boiling” (Ausubel *et al.*, 1995) foram utilizados. Nessas reações o “primer” LKR/SDHend desenhado a partir da seqüência do cDNA da LKR/SDH de milho (5'-TTCAACTCTCCACTTTCTCAACCA-3') (Bio Synthesis) e o “primer” T7 (Gibco-BRL) foram utilizados na concentração final de 10 μ M. Duas reações foram feitas para servirem de controle da reação de amplificação. Em cada uma delas somente um dos “primers” foi utilizado.

Para um volume final de 30 μ l de reação foram adicionados $MgCl_2$ a 1.5 mM, dNTP mix a 200 μ M, 3 μ l do tampão Taq DNA Polimerase 10 X (o tampão Taq DNA Polimerase 1X contém 200 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 500 mM KCl) e enzima Taq DNA Polimerase numa concentração final de 0.05 U/ μ l da reação. As condições dos ciclos de amplificação foram: denaturação inicial de 30 segundos a 94 °C, seguido de 20 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos. Após o término desses 20 ciclos houve uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Em seguida o DNA foi precipitado pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5.2 e 2 volumes de etanol gelado, seguido de incubação por 30 minutos a - 70 °C. Após centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 20 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 contendo EDTA 1 mM, pH 8.0).

Após a precipitação e a ressuspensão da reação de amplificação o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0.8 % contendo 0.5 μ g/ml de brometo de etídeo. O fragmento amplificado (SDHend) foi purificado do gel utilizando-se papel DEAE (DE-81, Whatman), de acordo com a metodologia descrita por Dretzen *et al.*, 1982. A eluição do DNA adsorvido foi realizada incubando-se o papel DE-81 em 800 μ l de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM pH

7.9, contendo 10 mM de EDTA e 10 mM de NaCl) durante 40 minutos em banho-maria a 68 °C. Após esse período, o papel DE-81 foi retirado e a solução restante foi centrifugada por 5 minutos a temperatura ambiente para retirada dos fragmentos de DNA remanescentes. O DNA foi precipitado conforme descrito anteriormente e ressuspenso em 10 µl de TE.

O fragmento assim purificado foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fornecedor. O plasmídeo assim obtido, pGem/SDHend, foi utilizado na transformação de bactérias DH5α, de acordo com a metodologia descrita por Sambrook *et al.*, 1989 e seqüenciado para se verificar a identidade do clone.

4.2 Preparo de DNA plasmídeo e purificação de insertos

O DNA dos plasmídeos pGem/SDHend, pKS/YAFF e pKS/LKR foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Sambrook *et al.*, 1989.

As digestões para a obtenção dos insertos utilizados como sondas homólogas foram feitas de acordo com metodologias descritas por Ausubel *et al.*, 1995. O fragmento contido no plasmídeo pKS/YAFF foi obtido através de digestões com a enzima *Bam* HI; o fragmento contido no plasmídeo pGem/SDHend foi obtido através de digestões com a enzima *Eco* RI e o fragmento contido no plasmídeo pKS/LKR foi obtido através de digestões com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I. Estes fragmentos foram duplamente purificados através de eletroforese em gel de agarose 0.8 % utilizando a metodologia descrita por Dretzen *et al.*, 1982 e detalhada acima.

Os fragmentos de DNA foram quantificados em gel de agarose a 0.8 %, com base no padrão do marcador de peso molecular λ Hind III (Gibco BRL).

4.3 Marcação e purificação das sondas

O fragmentos de DNA utilizados como sondas foram marcados radioativamente utilizando-se *Klenow DNA* polimerase I, em reações contendo 25 ng do fragmento molde, 17 pmoles de [α-P³²] dATP ou dCTP, oligonucleotídeos randômicos e demais componentes nas condições descritas no “Kit” Mega-prime

DNA labelling System, Amersham. A radioatividade incorporada foi medida através de contagem Cerenkov em cintilômetro (LKB Rackbeta 217). Obtendo-se em média 80% de incorporação. A sonda foi purificada em mini-coluna de Sephadex G-50, conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989).

5. Isolamento do clone genômico da LKR/SDH

5.1 Preparo da Biblioteca Genômica

Para o isolamento do clone genômico da LKR/SDH foi utilizada uma biblioteca genômica comercial da Clontech construída com DNA genômico de plântula da variedade B73. Essa biblioteca foi construída no vetor de clonagem EMBL3.

A biblioteca foi titulada mediante sucessivas diluições do estoque original em SM (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 100 mM; MgSO₄ 10 mM; 0.01% gelatina), utilizando-se a bactéria hospedeira K803 crescida em meio LB líquido (Bacto-tryptone 10 g/l; Bacto-yeast extract 5 g/l; NaCl 171 mM) suplementado com 10 mM MgSO₄ e 0.2% de maltose (Sambrook *et al.*, 1989).

5.2 Obtenção de placas de lise e preparo de membranas

Vinte e sete placas de Petri (150 x 25 mm) contendo aproximadamente 40.000 pfu (unidade de partícula de fago) cada uma, foram preparadas adicionando-se 150 µl da diluição 10⁻⁴ do estoque original e estas incubadas por 8 horas a 37 °C em estufa.

Após o tempo de incubação adequado para o aparecimento das placas de lise, cada placa de Petri foi mantida por um período de 2 horas a 4 °C e em seguida as placas foram cobertas com membranas de “nylon” (Hybond-N, Amersham). As membranas foram marcadas em três posições assimétricas com uma agulha contendo tinta nanquim e foram deixadas sobre a placa durante 2 minutos. As membranas foram então incubadas por 2 minutos em uma solução de denaturação (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH). Após a denaturação, as membranas foram incubadas por 5 minutos em uma solução de neutralização (1.5 M NaCl, 0.5

M Tris-HCl, pH 8.0) e em seguida lavadas por 30 segundos em solução 2 X SSC (1 X SSC contém 0.15 M de NaCl e 15 mM de citrato de sódio), secadas e incubadas por 2 horas a 80 °C.

5.3 Hibridizações das membranas

As pré-hibridizações e as hibridizações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Sambrook *et al.*, 1989, com pequenas adaptações.

Depois de umedecidas em solução de SSC 2 x, as membranas foram pré-hibridizadas em uma solução 5 x SSC, contendo 10 x Denhardt's (1% de Ficoll, 1% de Polivinil e 1% de albumina bovina fração V em água), 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% SDS, 50% Formamida deionizada e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão denaturado, por um período de 6 horas a 42 °C. Em seguida as membranas foram incubadas em solução de hibridização contendo 5 x SSC, 2 x Denhardt's, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% SDS, 50% Formamida deionizada, 100 µg/ml DNA de esperma de salmão denaturado e 10⁶ cpm/ml da sonda por um período de 12 horas a 42 °C .

Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes consecutivas por 15 minutos a temperatura ambiente com uma solução contendo 2 x SSC e 0.1% SDS. Em seguida as membranas foram lavadas por 15 minutos a 65 °C com uma solução contendo 0.1 x SSC e 0.1% SDS. As membranas foram então autoradiografadas em Hyperfilm-MP, Amersham.

5.4 Sonda utilizada

Para a seleção do clone genômico foi utilizado como sonda o fragmento de 522 pb de cDNA do domínio LKR, contido no clone pKS/YAFF.

5.5 Preparo de DNA dos clones λ EMBL3 em pequena escala

DNA de 36 clones isolados após três seleções consecutivas foram preparados. Placas contendo 10⁵ pfu foram incubadas a 37 °C por 10 horas para obtenção de lise confluenta. Em seguida foram adicionados a cada uma das

placas 8 ml de SM. As placas foram então armazenadas a 4 °C por 8 horas sob agitação suave. Em seguida, o SM de cada placa foi recolhido, acrescido de 100 µl de clorofórmio e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a este foi adicionado 1 gota de clorofórmio. Os lisados foram titulados de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Todos os lisados apresentaram um título maior 5×10^{11} pfu/ ml.

Após a titulação foram adicionados 0.6 ml de lisado líquido a tubos de microcentrífuga contendo 0.6 ml da resina DEAE-cellulose (DE52) previamente equilibrada com meio LB de acordo com a metodologia descrita por Taylor & Benson, 1984. Após a centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos os sobrenadantes foram recolhidos e novamente centrifugados. Em seguida os fagos foram precipitados pela adição ao sobrenadante de 0.625 mM NaCl e 0.7 volumes de isopropanol. Após centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70 % e ressuspensionado em 200 µl de TE. Em seguida o DNA foi extraído duas vezes pela adição de um volume de fenol pH 8.0 e centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O DNA foi precipitado da fase aquosa pela adição de 15 µl de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol. A suspensão foi mantida à - 70 °C por 40 minutos e em seguida o DNA foi lavado com etanol 70 %. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µl de TE.

5.6 Análise do DNA dos fagos

O DNA dos 36 fagos contendo os clones genômicos da LKR/SDH, preparados de acordo com a metodologia descrita anteriormente, foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Xba* I e *Xho* I. Após as digestões o DNA foi denaturado a 68 °C por 10 minutos e submetido a eletroforese em gel de agarose a 0.8 %. Após a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (1 µg/ ml) permitindo a análise do padrão de restrição dos clones e a identificação de clones iguais.

5.7 Preparo de DNA dos clones

DNA de doze clones diferentes foram preparados com a utilização do “Qiagen Lambda Mid Kit”, de acordo com a metodologia contida no manual de instruções do fabricante.

O DNA desses 12 fagos foi então digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RV e *Hind* III. Após as digestões o DNA foi denaturado a 68 °C por 10 minutos e submetido a eletroforese em géis de agarose 0.8 %. A eletroforese foi corrida a 60 V por 4 horas.

Após a eletroforese, o DNA contido nos géis foi transferido para membranas de “nylon” (Hybond-N, Amersham) de acordo com as condições descritas anteriormente. A pré-hibridização, a hibridização consecutiva dessas membranas com as sondas de 522 pb (YAFF) e a de 720 pb (SDHend), bem como as condições de lavagem também foram feitas como descrito anteriormente.

5.8 Preparo de DNA dos clones selecionados em larga escala

A alíquotas de cultura bacteriana K803 contendo 10^{10} células, adicionou-se, separadamente, 5×10^7 pfu de cada um dos clones positivos obtidos. Após incubação por 20 minutos a 37 °C, as células infectadas foram transferidas para Erlenmeyers contendo 500 ml de LB enriquecido com 10 mM MgSO_4 e 0.2% de maltose e incubadas a 37 °C a 300 rpm. Após cerca de 6 horas, as culturas lisaram e a estas foram adicionadas gotas de clorofórmio, seguido de incubação a 37 °C por mais 10 minutos a 300 rpm. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Aos sobrenadantes foram adicionados 10 mg/ml de RNase e 1 mg/ml de DNase. Os lisados foram incubados por 1 hora a 37 °C sob agitação suave.

As partículas do fago foram então precipitadas pela adição de NaCl a 1.0 M e de polietileno glicol (PEG-8000) a 12.5 mM. Essas soluções foram mantidas em gelo durante a noite. As partículas dos bacteriófagos foram recuperadas após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 8 ml de tampão SM. A estas suspensões foram adicionados igual volume de clorofórmio seguida de rápida agitação.

Após centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm à temperatura ambiente foi adicionada à fase superior de cada uma das amostras CsCl a uma concentração final de 2.97 M. Essas suspensões foram então submetidas a um gradiente descontínuo de CsCl, previamente preparado em tubos (Ultraclear) para Rotor SW41 de ultracentrífuga Beckman. O gradiente foi montado com as seguintes fases do topo para o fundo do tubo: 1 ml de CsCl 1.45 g/ml (índice de refração (η) = 1.3768), 1.5 ml de CsCl 1.50 g/ml (η = 1.3815) e 1.5 ml de CsCl 1.7 g/ml (η = 1.3990). Após a centrifugação a 22000 rpm por 4 horas à 4 °C, a banda tênue esbranquiçada contendo as partículas do fago foi recuperada com a utilização de pipeta Pasteur de cada um dos quatro gradientes.

As amostras foram dialisadas por 1 hora contra 1000 volumes de Tris-HCl 50 mM contendo 10 mM NaCl e 10 mM MgCl₂. Após a diálise foram adicionados EDTA na concentração final de 20 mM, 0.5 mg/ml de pronase e 0.5% de SDS. Após incubação por 1 hora a 37 °C foi adicionado um volume igual de fenol. Após centrifugação a 3000 rpm a temperatura ambiente a fase aquosa foi submetida a uma extração de fenol: clorofórmio e precipitada com 0.1 volume de acetato de sódio 3 M pH 7.0 e 2 volumes de etanol a temperatura ambiente durante 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e após secagem o sedimento foi ressuspenso em 500 µl de TE contendo RNase (40 µg/ml).

A quantificação e o controle da qualidade do DNA foram feitos por espectrofotometria e análise em gel de agarose a 0.8%. O DNA foi aliquotado e armazenado a 4 °C.

5.9 Caracterização dos clones selecionados

Um micrograma de DNA dos clones λ M YAFF I, λ M YAFF VI, λ M YAFF IX e λ M YAFF XII foram digeridos com a enzima de restrição SaI. Após as digestões o DNA das amostras foi denaturado a 68 °C por 10 minutos e submetido a eletroforese em gel de agarose a 0.8 %. A eletroforese foi corrida durante a noite a 20 mA.

6. Seqüenciamento Randômico (“Shotgun Sequencing”)

6.1 Construção de bibliotecas “shotgun”

DNAs dos clones genômicos λ M YAFF VI e λ M YAFF IX foram utilizados para construção de bibliotecas “shotgun” (Figura 5). Quarenta microgramas de DNA de cada um dos dois clones genômicos foram precipitados adicionando-se acetato de sódio até a concentração final de 0.3 M, pH 5.2 e dois volumes de etanol absoluto por 1 hora a - 70 °C. Após centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70% e liofilizado.

O DNA de cada clone foi ressuspendido em 39 μ l de água destilada e deionizada. Em seguida, as amostras foram divididas em três alíquotas de 13 μ l e cada uma sonicada a intervalos específicos de 15, 20 e 25 segundos. Alíquotas de 1 μ l foram retiradas de cada uma das amostras e submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação do produto de sonicação. Após esta verificação, o DNA das amostras de cada um dos clones foi reunido em um único tubo e submetido a uma reação de “fill-in” para preenchimento das extremidades dos diversos fragmentos de DNA gerados pela sonicação. Aos DNAs de cada um dos clones foram adicionados 10 μ l de tampão T4 DNA Polimerase 5 X (o tampão T4 DNA Polimerase 10 X contém 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6.7 mM $MgCl_2$, 10 mM β -mercaptoetanol, 16.6 mM $(NH_4)_2 SO_4$, 6.7 μ M EDTA e 160 μ g/ml de BSA), dNTPs na concentração final de 0.2 mM e a enzima T4 DNA polimerase numa concentração final de 1 U/ μ l da reação. As reações foram então incubada a 37 °C por um intervalo de 30 minutos. Após esta incubação foi adicionado a cada reação *DNA Polimerase I* na concentração final de 0.13 U/ μ l. As reações foram deixadas a temperatura ambiente por um intervalo de 15 minutos. Em seguida o DNA de cada reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose LMP (“Low Melting Point”) a 0.8 %. A eletroforese foi corrida a 59 V a temperatura ambiente e os fragmentos de DNA dos clones VI e IX gerados pela sonicação foram identificados através de coloração do gel com uma solução de brometo de etídio (1 μ g/ ml).

Para a construção de duas sub-bibliotecas “shotgun” para cada um dos clones, as frações de DNA correspondentes a 1-2 Kb e 3-5 Kb foram recuperadas

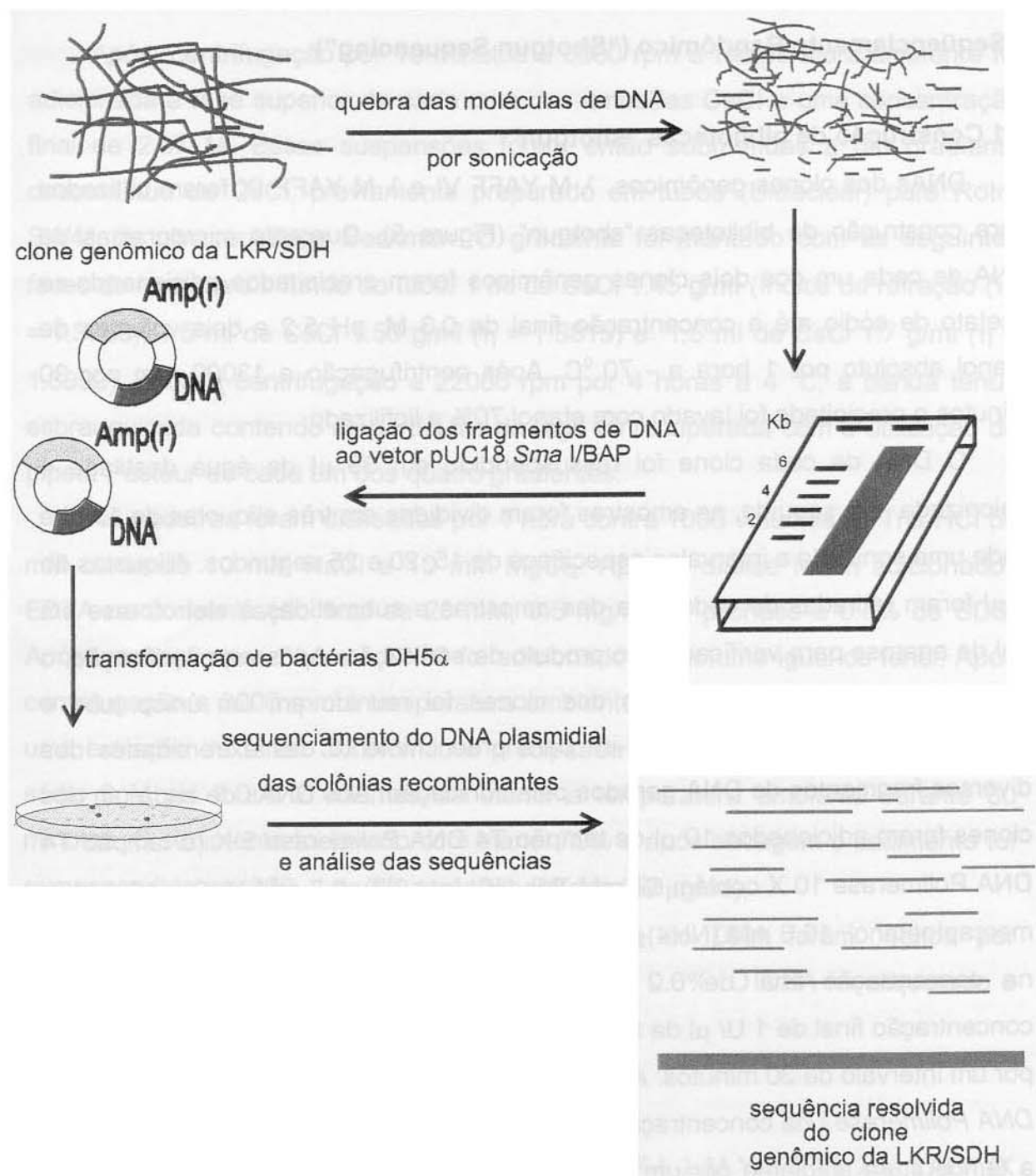


Figura 5. Esquema representando a construção de uma biblioteca randômica utilizada no seqüenciamento do clone genômico da LKR/SDH.

do gel através da excisão das bandas. As bandas de agarose contendo os DNAs foram incubadas a 65 °C por 5 minutos sob agitação vigorosa. Após uma breve centrifugação foi adicionado 0.1 volume de NaCl 4 M às misturas contendo DNA e agarose solubilizada. Essas misturas foram então incubadas por mais 3 minutos a 65 °C. Após esta incubação o DNA de cada amostra foi extraído pela adição de um volume de fenol pH 8.0 e centrifugação a 13000 rpm por 3 minutos. Mais duas extrações com um volume de fenol foram feitas. O DNA foi precipitado da fase aquosa pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio a 3 M, pH 5.2 e 2 volumes de etanol gelado.

Os fragmentos de DNA obtidos foram ressuspensos em 20 µl de água destilada e deionizada. Alíquotas de 3 µl foram retiradas de cada uma das amostras e submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação e quantificação do DNA de cada amostra. Os DNAs assim obtidos foram ligados ao vetor pUC18 *Eco* RI/BAP (Bovine Alkaline Phosphatase), de acordo com a metodologia contida no manual de instruções do fabricante do “kit” Ready to Go (Pharmacia Biotech). Os plasmídeos obtidos foram utilizados para a transformação de bactérias DH 5α (Sambrook *et al.*, 1989).

Após a seleção das colônias recombinantes foram realizadas cerca de 400 minipreparações de plasmídeos de cada uma das sub-bibliotecas de acordo com a metodologia padronizada e descrita em http://chroma.mbt.washington.edu/seq_www/kwseq/preps/anup_plasmids.html. O DNA obtido foi utilizado nas reações de seqüenciamento.

6.2 Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado com base na técnica de dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se o seqüenciador automático DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystem).

Reações de polimerização foram feitas utilizando-se 800 ng de DNA plasmideal obtidos pelas minipreparações. Em cada uma das reações os “primers” universal (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' - Pharmacia) ou reverso (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3' - Gibco-BRL) foram utilizados na

concentração final de 5 μ M. As reações foram preparadas de acordo com a metodologia contida no manual de instruções do fabricante do DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Read Reaction (PE _ Applied Biosystem).

Após as reações de polimerização, o DNA das amostras foi precipitado pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5.2 e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70 % e ressuspendido em 8 μ l de tampão "Formamide Loading Dye" (25 mM EDTA (pH 8.0) contendo Blue dextran na concentração final de 50 mg/ ml, e 5 volumes de formamida deionizada). Em seguida, o DNA das amostras foi denaturado em banho a 70 °C por 10 minutos e aplicado no seqüenciador automático.

6.3 Análise das Seqüências

A edição das seqüências e a montagem da seqüência completa do clone genômico da enzima LKR/SDH de milho foi realizada com a utilização dos programas Pred, Phrap (Phil Green, Washington University) e Staden Package (Medical Research Council, Cambridge, UK). A análise e a tradução da região codante deste gene foi realizada com auxílio do programa Gene Runner v3.0 (Hasting Software, Inc). As pesquisas em bancos de dados utilizaram basicamente o programa Blast (Altschul *et al.*, 1990).

O alinhamento das seqüências de DNA e das proteínas predizíveis do gene da LKR/SDH de milho e *Arbdopsis* foram feitos com o auxílio do programa Clustal V (Higgins e Sharp, 1989) e as análises de similaridades foram feitas com os programas "MACAW program applying" e "Blosum 62 matrix".

A análise de sítios semelhantes aos já descritos para fatores de transcrição foi feito com o auxílio do programa MatInspector (Quandt *et al.*, 1995).

É importante notar que a integração das informações provenientes de cada um dos programas para a confecção final dos resultados foi feita de maneira manual, i.e., os resultados apresentados aqui não são reproduzíveis pela simples repetição dos parâmetros utilizados em um único programa, mas pela

interpretação dos resultados obtidos em cada um e subsequente alteração dos dados e parâmetros empregados nos demais.

7. Experimento de “Southern blot”

7.1 Extração de DNA genômico de milho

O DNA genômico foi extraído de folhas de milho da linhagem F352, de acordo com a metodologia descrita por Rivin *et al.*, 1982.

Após moagem de 40 g de folhas em nitrogênio líquido foram adicionados 20 ml de tampão de homogeneização (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, sacarose a 0.3 M e $MgCl_2$ 5 mM) e a mistura foi homogeneizada em “polytron” por 30 segundos. O homogeneizado foi então filtrado em três camadas de gaze estéril em funil de Buchner com ajuda de bomba de vácuo.

Após a centrifugação do filtrado a 2000 rpm por 10 minutos a 4 °C, os núcleos das células foram sedimentados. Esses núcleos foram então ressuspendidos em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, contendo 20 mM de EDTA). A seguir foi adicionado à mistura Sarkosyl em quantidade suficiente para se obter uma concentração final de 2%. Para a obtenção do lisado a mistura foi incubada a 50 °C por um intervalo de 1 hora. A seguir 0.95 g de CsCl por ml de lisado foram adicionados e misturados gentilmente para a obtenção de uma solução com $\eta = 1.3982$. Em seguida proteínas insolúveis e polissacarídeos foram removidos por centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos à 4 °C. Ao sobrenadante foi então adicionado brometo de etídio para uma concentração final de 300 $\mu g/ ml$.

Após a centrifugação a 50000 rpm por 20 horas à 20 °C a banda de DNA fluorescente na presença de luz ultra-violeta foi recuperada cuidadosamente com a utilização de pipeta Pasteur. O brometo de etídio da amostra foi então extraído por sucessivas extrações com butanol-1 equilibrado com água. Em seguida, o DNA foi dialisado por 16 horas contra 1000 volumes de TE. Após a diálise o DNA foi precipitado pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5.2 e 2

volumes de etanol gelado. Dada a centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70 % e ressuspendido em 2 ml de TE.

A quantificação e o controle de qualidade do DNA foram feitos por espectrofotometria (espectrofotômetro DU-65, Beckman) e análise em gel de agarose a 0.8%. O DNA foi armazenado a 4 °C.

7.2 Digestões de DNA genômico e separação em gel

Duas amostras de dez microgramas de DNA genômico de milho da linhagem F352, Coix e sorgo (estes últimos DNAs gentilmente cedidos pelo Dr. Adilson Leite) foram digeridas por 20 horas a 37 °C com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RV. A reação foi terminada adicionando-se 10 µl de EDTA 0.5 M, pH 8.0. O DNA foi precipitado a - 70 °C por 1 hora, após a adição a mistura de reação de acetato de sódio até a concentração final de 0.3 M, pH 5.2 e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 30 µl TE.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0.8%, juntamente com o padrão de peso molecular 1Kb Ladder (Gibco-BRL). A corrida foi realizada durante a noite a 20 mA. Após a corrida, a separação dos fragmentos de DNA foi verificada através da coloração do gel com uma solução de brometo de etídio (1µg/ml) e fotografado juntamente com uma régua milimetrada, com finalidade de se dispor de uma referência de tamanho real.

7.3 Transferência neutra

Após a eletroforese, o DNA foi depurinado colocando-se o gel em solução de HCl a 0.25 N por 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado por 30 minutos em uma solução contendo NaCl a 1.5 M e NaOH a 0.5 N para denaturação do DNA. Por último, o gel foi incubado em uma solução contendo NaCl a 1.5 M e Tris-HCl a 1.0 M, pH 7.4 por 30 minutos para neutralização do DNA. Os diferentes tratamentos foram intercalados com lavagens do gel em água destilada.

A transferência do DNA para membrana de “nylon” foi realizada através de um sistema no qual o gel foi colocado invertido sobre uma ponte contendo três

folhas de papel Whatman (3MM) de tamanho apropriado, umedecidas em 10 X SSC (NaCl 1.5 M, citrato trissódico 0.15 M) e colocadas em uma plataforma, dentro de uma cuba contendo o tampão de transferência 10 x SSC. A membrana, previamente umedecida em água destilada e deionizada e em 10 x SSC, foi colocada em contato com o gel, e sobre ela foram colocadas três folhas de papel Whatman (3MM) de tamanho idêntico ao do gel e previamente umedecidas em solução de transferência. Por fim colocou-se uma pilha de aproximadamente 7 cm de papel de germinação sobre o gel e um peso variando entre 0.5 e 1 Kg.

Após a transferência (16 horas) a membrana foi lavada em 2 X SSC, deixada secar a temperatura ambiente e fixada em estufa a 80 °C por 2 horas.

7.4 Hibridização

A pré-hibridização, a hibridização e as lavagens foram realizadas conforme descrito anteriormente. As membranas foram então expostas a filmes de raio-X (Amersham) pelo tempo necessário, a -70 °C.

7.5 Sonda utilizada

A membrana contendo DNAs genômicos de milho, *Coix* e sorgo foi hibridizada com o fragmento de 1.2 Kb contido no plasmídeo pKS/LKR.

8. Experimentos de “Northern blot”

A metodologia de “Northern blot” foi utilizada para a análise de expressão do gene da LKR/SDH no endosperma de milho. Para isso foram utilizadas sementes normais do híbrido F352 e sementes com fenótipo opaco (Oh43o2) em diferentes estágios do desenvolvimento (10, 15, 20, 25, 30 e 35 DAP).

8.1 Extração de RNA total de endosperma de milho

O material utilizado na preparação dos RNAs foi previamente tratado com o intuito de se inativar as possíveis RNases presentes. A vidraria foi queimada em estufa a 180 °C por 12 horas. A água e as soluções utilizadas foram tratadas com DEPC. As cubas de eletroforese e de transferência, e quaisquer outros materiais

de acrílico ou plástico utilizados foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% durante 15 minutos e depois enxaguados com água DEPC.

A metodologia empregada na extração do RNA total se baseia na descrita por Prescott & Martin (1987), com algumas adaptações às condições do laboratório.

Aproximadamente 30 sementes de cada material foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O pó foi transferido para tubo falcon de 50 ml e homogeneizado em 10 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 9.0, contendo 150 mM de LiCl, 5 mM de EDTA e 5% de SDS). A seguir foi adicionado 10 ml de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl 0.2 M pH 7.5/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Misturou-se bem por inversão e a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. A fase aquosa foi submetida a nova extração com fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico.

Após nova centrifugação, 8 ml da fase aquosa foram transferidos para tubos de 50 ml e o RNA foi precipitado com 3.2 ml de LiCl 8 M a -20 °C por 2 horas. Dada a centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 4.8 ml de água tratada com DEPC, com auxílio de vortex. A seguir, foi adicionado a suspensão 1.6 ml de LiCl 8 M e esta foi incubada por 1 hora a -20 °C. Após centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos o precipitado foi ressuspensionado em 800 µl de água DEPC. Em seguida o RNA foi precipitado pela adição de 0.1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5.2 e 2.5 volumes de etanol absoluto a - 20°C durante a noite. Dada a centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 10 minutos e dissolvido em 200 µl de água DEPC. O RNA foi estocado a - 70 °C.

A quantificação e o controle da qualidade do RNA foram feitos por espectrofotometria e corrida em gel de agarose contendo formaldeído a 0.66 M (Forney *et al.*, 1988).

8.2 Preparo das amostras e separação em gel

Foram utilizados 15 µg de RNA total de cada amostra por gel. O volume de todas as amostras foi completado para 5 µl com água DEPC e a cada amostra foi adicionado 14.5 µl de uma solução contendo 1 µl de MOPS/EDTA 10 X (MOPS 0.2 M, pH 7.0, acetato de sódio 50 mM, EDTA 10 mM), 3.5 µl de formaldeído, 10 µl de formamida 50% deionizada. As amostras foram então denaturadas a 65 °C por 15 minutos. A seguir foi adicionado 1 µl de brometo de etídio (1 mg/ml) e 0.1 volumes de tampão de amostra (1 mM EDTA, contendo 50% de glicerol, 25% de azul de bromofenol e 0.25% de xileno cianol).

As amostras foram submetidas a eletroforese, juntamente com os padrões de peso molecular de RNA (Gibco BRL), em gel de agarose a 1% contendo 10% MOPS/EDTA 10 x e 0.66 M de formaldeído. A corrida foi realizada a 80 V até que a frente do corante atingisse dois terços do tamanho do gel. A seguir o gel foi fotografado juntamente com uma régua milimetrada.

8.3 Transferência

Após a eletroforese o RNA foi transferido do gel para membranas de “nylon” de acordo com a metodologia descrita por Forney *et al.*, 1988.

O gel foi previamente equilibrado em solução de transferência (SSC 10 x) por 20 minutos sob leve agitação. A membrana foi então umedecida por 5 minutos em água DEPC e a seguir equilibrada em SSC 10 X. O sistema de transferência foi montado conforme descrito para o experimento de “Southern blot”. A transferência foi realizada por aproximadamente 18 horas. A membrana foi então lavada em solução SSC 2 X e queimada por 2 horas a 80 °C.

8.4 Hibridização

A pré hibridização, a hibridização e as lavagens foram realizadas conforme descrito anteriormente. As membranas foram então expostas a filme raio-x (Amersham) pelo tempo necessário, a - 70 °C.

8.5 Sonda utilizada

A membrana contendo os RNAs totais de milho normal e opaco2 foi hibridizada com o fragmento de 1.2 Kb contido no plasmídeo pKS/LKR.

Resultados

1. Preparo e análise dos insertos utilizados como sonda

A obtenção das sondas utilizadas para o isolamento do clone genômico da LKR/SDH de milho foi etapa fundamental para o sucesso do trabalho. Com a clonagem e o seqüenciamento do cDNA da LKR/SDH de milho em nosso laboratório (Cord Neto *et al.*, 1999), alguns dos fragmentos subclonados desse cDNA puderam ser utilizados para o isolamento e posterior análise do clone genômico.

As seqüências de nucleotídeos e as seqüências deduzidas de aminoácidos dos fragmentos utilizados como sonda (YAFF, SDHend e LKR 1.2Kb) são apresentadas nas Figuras 6, 7, e 8. O alinhamento das seqüências desses fragmentos com a seqüência do clone de cDNA da LKR/SDH de milho estão representados esquematicamente na Figura 9. Pela análise da Figura 9 é possível a identificação de uma pequena região de sobreposição entre as sondas LKR 1.2 Kb e SDH end.

2. Isolamento e caracterização do clone genômico da LKR/SDH

2.1 Isolamento dos clones

Para o isolamento do clone genômico da enzima LKR/SDH foram selecionados 1.1×10^6 fagos recombinantes da biblioteca "Corn Genomic Library" (Clontech) construída com DNA genômico de plântulas da variedade B73. A escolha dessa biblioteca comercial construída no bacteriófago λ EMBL3 (Figura 10) deve-se ao recente isolamento de genes maiores que 8 Kb (Kim *et al.*, 1998), o que assegurou a qualidade da mesma.

Os clones positivos foram isolados após três ciclos sucessivos de seleção sob condições de alta estringência utilizando-se como sonda o fragmento de 522 pb do plasmídeo pKS/YAFF, marcado radioativamente. Na primeira etapa de seleção foram identificados 46 possíveis clones recombinantes. Esses clones foram então utilizados numa segunda seleção, que resultou na confirmação de 40

Sonda YAFF

S H T H K A Q K E N M P L L D K I L E E	20
TCCCACACACACAAGGCCCAAAAAGAGAATATGCCACTGTTAGACAAGATCCTTGAAGAA	60
R V S L F D Y E L I V G D D G K R S L A	40
AGGGTGTCCCTTGTGTTGATTATGAGCTAATTGTTGGAGATGATGGGAAAAGATCACTAGCA	120
F G K F A G T A G L I D F L H G L G Q R	60
TTTGGGAAATTTGCTGGTAGAGCTGGACTGATAGATTTCTTACATGGTCTCGGACAGCGA	180
Y L S L G Y S T P F L S L G Q S H M Y P	80
TATTTGAGCCTTGGATACTCGACTCCATTTCTCTCTCTGGGACAATCTCATATGTATCCT	240
S L A A A K A A V I V V A E E I A T F G	100
TCGCTCGCTGCAGCCAAGGCTGCAGTCATTGTCGTTGCAGAAGAGATAGCAACATTTGGA	300
L P S G I C P I V F V F T G V G N V S Q	120
CTTCCATCCGGAATTTGTCCGATAGTGTTTGTGTTCACTGGAGTTGGAAACGTCTCTCAG	360
G A Q E I F K L L P H T F V D A E K L P	140
GGTGCGCAGGAGATATTCAAGTTATTGCCCCATACCTTTGTTGATGCTGAGAAGCTTCCC	420
E I F Q A R N L S K Q S Q S T K R V F Q	160
GAAATTTTTCAGGCCAGGAATCTGTCTAAGCAATCTCAGTCGACCAAGAGAGTATTTCAA	480
L Y G C V V T S R D M V S H	174
CTTTATGGTTGTGTTGTGACCTCTAGAGACATGGTTTCTCAC	522

Figura 6. Seqüência de nucleotídeos (em preto) e a seqüência deduzida de aminoácidos (em azul) do fragmento YAFF utilizado como sonda.

Sonda SDHend

L I Y G D L Y G I S K E A S T I Y R A T	20
CTTATATATGGTGACCTTTATGGTATCTCCAAAGAAGCATCCACCATATATAGGGCTACT	60
L R Y E G F S E I M V T L S K T G F F D	40
CTTCGTTACGAAGGTTTTAGTGAGATTATGGTAACCCTTTCCAAAAGTGGGTTCTTTGAT	120
A A N H P L L Q D T S R P T Y K G F L D	60
GCTGCAAATCATCCACTGCTGCAAGATACTAGTCGTCCAACATATAAGGGTTTCCTTGAT	180
E L L N N I S T I N T D L D I E A S G G	120
GAAGTACTGAATAATATCTCCACAATTAACACGGACTTAGATATTGAAGCCTCTGGTGGA	240
Y D D D L I A R L L K L G C C K N K E I	140
TACGATGATGACCTGATTGCCAGACTGTTGAAGCTCGGGTGTGCAAAAATAAGGAAATA	300
A V K T V K T I K F L G L H E E T Q I P	160
GCTGTTAAGACAGTCAAACCATCAAGTTCTTGGGACTACATGAAGAGACTCAAATACCT	360
T G C S S P F D V I C Q E W N R G W P M	180
ACGGGTTGTTTCGAGCCCATTTGATGTGATTTGCCAAGAATGGAACAGAGGATGGCCTATG	420
A Y M S Q D M V L L H E E V E V D I T R	200
GCCTATATGAGCCAGGACATGGTACTGCTCCACCACGAAGTCGAGGTGGATATAACCCGG	480
T G N P P K S T K R R N G V S G R V E N	220
ACGGGCAACCCCCCAAAAGCACCAAGCGACGTAATGGAGTTTCGGGAAGGGTTGAAAAT	540
G R S T T A M A L T V G I P A A I G A L	240
GGCAGGTCCACCACTGCCATGGCGCTGACCGTCGGCATTCCAGCAGCAATAGGGGCCCTG	600
L L L Q N K V Q T K G V I R P L Q P E I	260
CTATTGCTACAGAATAAGGTCCAGACGAAAGGAGTGATCAGGCCTCTGCAACCGGAAATC	660
Y V P A L E I L E S S G I K L V E K V K	280
TACGTTCCAGCATTGGAGATCTTGGAGTCGTCGGGCATCAAGCTGGTTGAAAAAGTTAAA	720

Figura 7. Sequência de nucleotídeos (em preto) e sequência deduzida de aminoácidos (em azul) do fragmento SDHend utilizado como sonda.

Sonda LKR 1.2 Kb

L T P L Y E Y I P R M R N T M I D L A P	20
TTAACTCCTTTGTATGAATATATCCCTAGGATGAGAAATACTATGATAGATTGGCACCC	60
A H T N P L P D K K Y S T L V S L S G H	40
GCAAAAACAAATCCATTGCCTGACAAGAAGTATAGCACCCCTGGTATCTCTCAGTGGGCAC	120
L F D K F L I N E A L D I I E T A G G S	60
CTATTTGATAAGTTCCTTATAAATGAAGCTTTGGACATCATTGAGACAGCTGGAGGTTCA	180
F H L V R C E V G Q S T D D M S Y S E L	80
TTTCACTTGGTTAGATGTGAAGTTGGACAAAGCACGGATGATATGTCATACTCAGAGCTT	240
E Y G A D D T A T L D K I I D S L T S L	100
GAAGTAGGAGCAGATGATACTGCCACATTGGATAAAATTATTGATTCCTTGACTTCTTTA	300
A N E H G E I T S R A R N E L A L K I G	120
GCTAATGAACATGGTGAGATCACGAGCCGGGCAAGAAATGAATTAGCTCTGAAGATAGGA	360
K V M N M N D S N V I K E G Q D L I F G	140
AAAGTCATGAATATGAATGACTCCAATGTGATAAAGGAGGGCCAAAGATTTAATTTTGG	420
A E E S V G T T A E F L A S Y P D I C T	160
GCTGAAGAGTCTGTGCGGCACGACCGCTGAGTTTCTGGCATCTTACCCAGACATATGTACC	480
Y G V D D H D A D Q I H V I V A S L Y Q	180
TATGGTGTGATGACCATGATGCAGATCAAATTCATGTTATCGTGGCATCTTTGTATCAA	540
K D A E E T V D G I E N T T A T Q L D V	200
AAAGATGCAGAAGAGACAGTTGATGGTATTGAAAATACAACCTGCTACCCAGCTTGATGTT	600
A D I G S L S D L V S Q V E V V I S L L	220
GCTGATATTGGAAGCCTTTCAGATCTTGTCTCAGGTTGAGGTTGTAATTAGCTTGCTG	660
P A S F H A A I A G V C I E L K K H M V	240
CCTGCTAGTTTTTCATGCTGCCATTGCAGGAGTATGCATAGAGTTGAAGAAGCACATGGTA	720
T A S Y V D E S M S N L S Q A A K D A G	260
ACGGCAAGCTATGTTGATGAATCCATGTCAAACCTTGAGCCAAGCTGCCAAAGATGCAGGT	780
V T I L C E M G L D P G I D H L M S M K	280
GTAACATACTTTGTGAAATGGGCCTAGATCCTGGCATAGATCACTTGATGTCAATGAAG	840
M I D E A H A R K G K I K A F T S Y C G	300
ATGATTGATGAAGCTCATGCACGAAAGGGAAAAATAAAGGCATTTACATCTTACTGTGGT	900
G L P S P A A A N N P L A Y K F S W N P	320
GGATTGCCATCTCCAGCTGCAGCAAACAATCCGCTTGCCTATAAATTCAGTTGGAACCCA	960
A G A L R S G K N P A V Y K F L G E T I	340
GCTGGTGCCTCCGGTCAGGGAATAATCCTGCAGTCTACAAATTTCTTGGTGAGACGATC	1020
H V D G H N L Y E S A K P L R L R E L P	360
CATGTAGATGGTCATAACTTGTATGAATCAGCAAAGAGGCTCAGACTACGAGAGCTTCCA	1080
A F A L E H L P N R N S L I Y G D L Y G	380
GCTTTTGTCTCTGGAACACTTGCCAAATCGGAATTCCTTGATATATGGTGACCTTTATGGT	1140
I S K E A S T I Y P A T L P Y E G F S E	400
ATCTCCAAAGAAGCATCCACCATATATAGGGCTACTCTTCGTTACGAAGGTTTTAGTGAG	1200
I M V T L	405
ATTATGGTAACCCTT	1215

Figura 8. Sequência de nucleotídeos (em preto) e sequência deduzida de aminoácidos (em azul) do fragmento LKR 1.2 Kb utilizado como sonda.

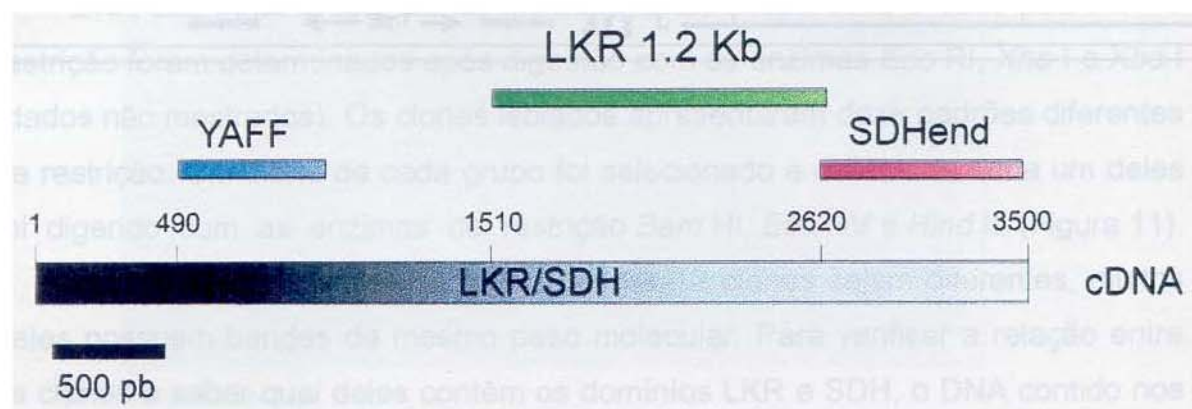
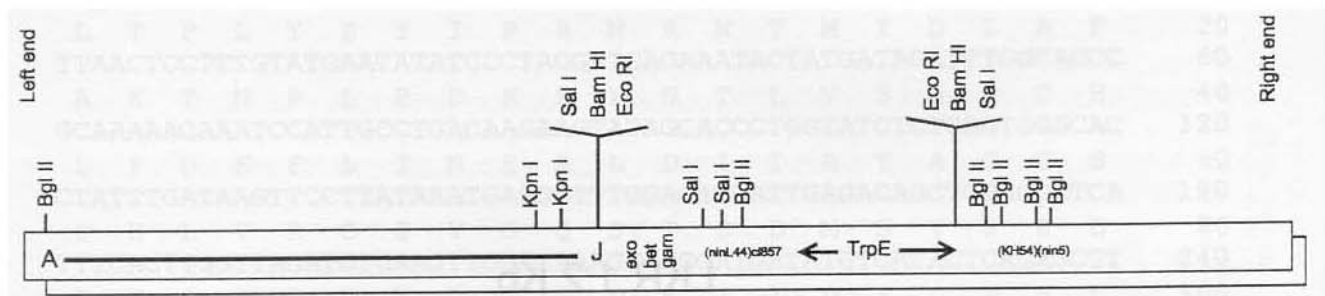


Figura 9. Representação esquemática do cDNA da enzima LKR/SDH e posicionamento dos fragmentos utilizados como sonda.

A)



B)

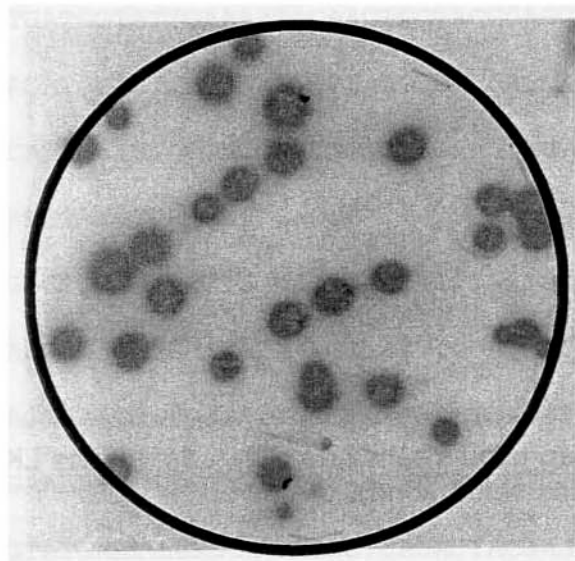


Figura 10. A) Esquema do bacteriófago EMBL3. Este bacteriófago foi utilizado como vetor de clonagem da biblioteca genômica de milho utilizada para a seleção do clone da LKR/SDH. Os nomes das enzimas de restrição indicam sua posição de corte. Os dois sítios de policlonagem aparecem em destaque.

B) Clone genômico isolado da enzima LKR/SDH. Na figura todas as placas de lise apresentam hibridação positiva com a sonda YAFF de 522 Kb.

clones positivos. Esses 40 clones foram submetidos a um terceiro ciclo de seleção, confirmando-se 36 clones recombinantes. A Figura 10 mostra o resultado da terceira seleção de um dos clones selecionados.

2.2 Caracterização dos clones recombinantes

DNA dos trinta e seis clones isolados foram preparados e seus padrões de restrição foram determinados após digestão com as enzimas *Eco* RI, *Xho* I e *Xba* I (dados não mostrados). Os clones isolados apresentaram doze padrões diferentes de restrição. Um clone de cada grupo foi selecionado e o DNA de cada um deles foi digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RV e *Hind* III (Figura 11).

Embora os padrões de restrição desses 12 clones sejam diferentes, muitos deles possuem bandas de mesmo peso molecular. Para verificar a relação entre os clones e saber qual deles contém os domínios LKR e SDH, o DNA contido nos géis, mostrados na Figura 11, foi transferido para membranas de “nylon” e hibridizado com a sonda YAFF, que representa o domínio LKR, e com a sonda SDHend, que representa o domínio SDH. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 12 e 13.

Os clones λ M YAFF II, λ M YAFF IV e λ M YAFF V não apresentaram hibridização com nenhuma das duas sondas utilizadas no experimento e, portanto, podem representar clones falsos positivos. Os demais clones apresentaram várias bandas que se hibridizaram com a sonda YAFF. Os clones λ M YAFF I, λ M YAFF VI, λ M YAFF VII, λ M YAFF VIII e λ M YAFF IX também apresentaram bandas que se hibridizaram fortemente com a sonda SDHend.

A análise do padrão de hibridização também evidencia bandas comuns entre os clones, sugerindo que essas bandas se originam de regiões de sobreposição. Pela análise desse padrão de hibridização escolhemos à princípio os clones λ M YAFF I, λ M YAFF VI, λ M YAFF IX e λ M YAFF XII para serem seqüenciados. Os clones I e VI apresentam o mesmo padrão de hibridização com a sonda YAFF e divergem no padrão de hibridização com a sonda SDHend. Isso sugere que esses clones apresentam uma região comum no domínio LKR e diferenciam-se na extensão do domínio SDH. Apesar de se hibridizar fracamente com a sonda

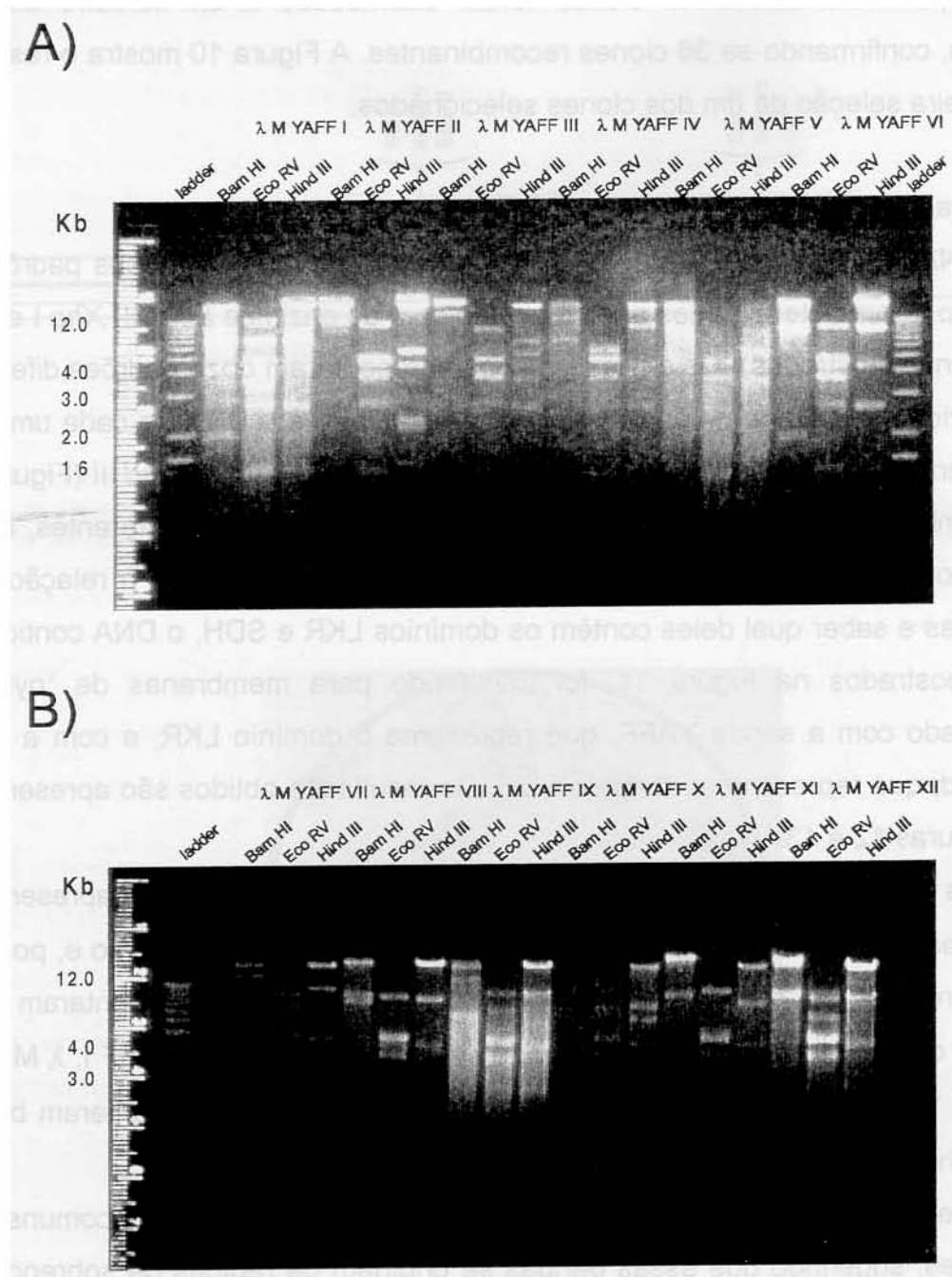


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos clones genômicos λ M YAFF após digestões com as enzimas *Bam* HI, *Eco* RV e *Hind* III. O DNA do clone genômico λ M YAFF X digerido com *Bam* HI não é visualizado na foto. Os números à esquerda representam o padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb - Gibco BRL).

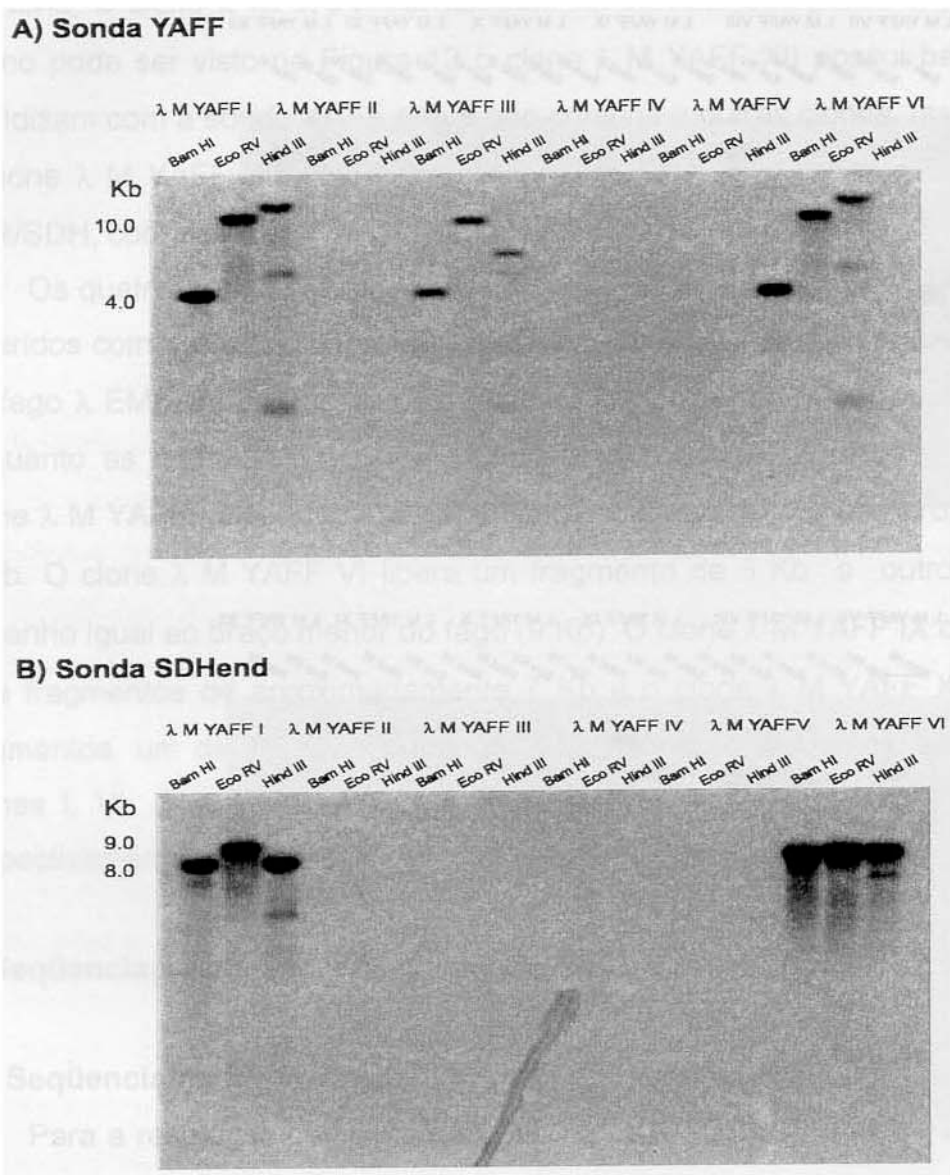


Figura 12. Southern Blot dos clones genômicos λ M YAFF I, II, III, IV, V e VI. Um μg de DNA foi digerido com as enzimas acima relacionadas. Após transferência para membrana de “nylon”, esta foi hibridizada em condições de alta estrigência com a sondas YAFF (A) e SDHend (B) Os números à esquerda representam o padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb – Gibco BRL) em ambas as figuras.

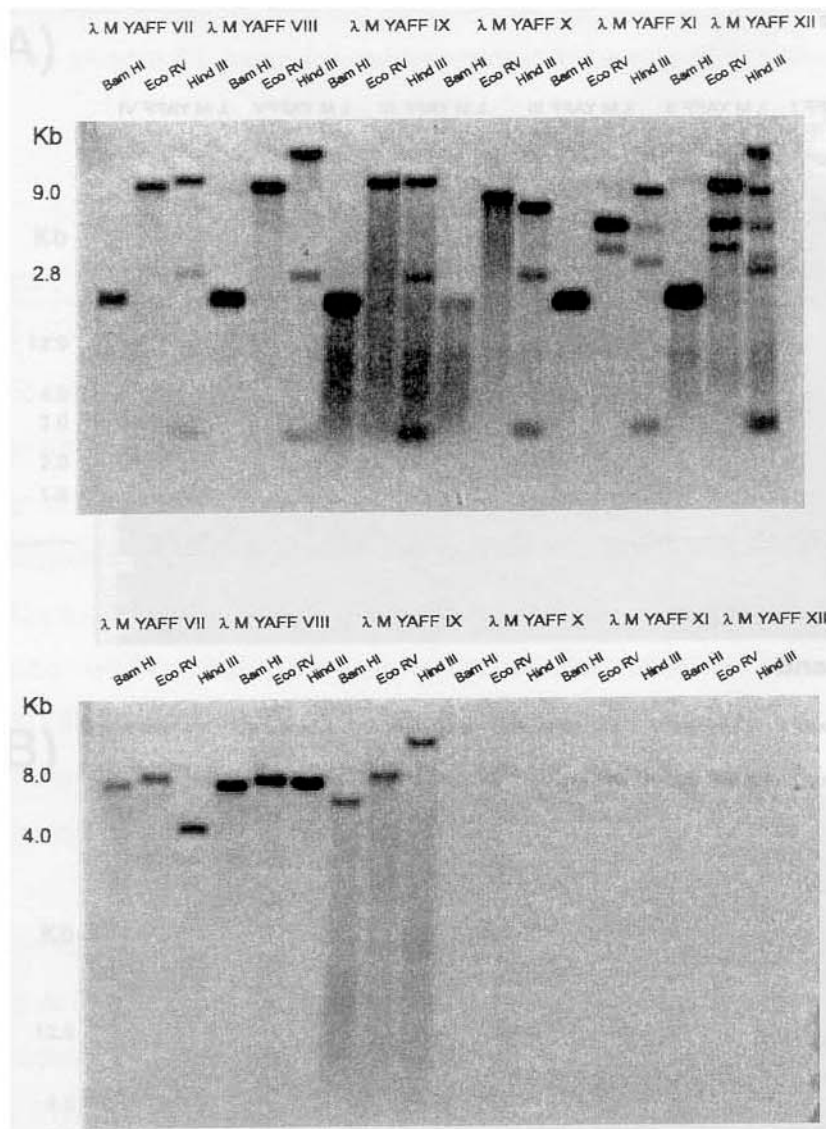


Figura 13. Southern Blot dos clones genômicos λ M YAFF VII, VIII, IX, X, XI e XII. Um μ g de DNA foi digerido com as enzimas relacionadas na figura. Após transferência para membrana de "nylon", esta foi hibridizada em condições de alta estrigência com a sondas YAFF (A) e SDHend (B). Os números à esquerda representam o padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb – Gibco BRL) em ambas as figuras.

SDHend, o clone λ M YAFF XII também foi selecionado para ser seqüenciado. Como pode ser visto na Figura 13 o clone λ M YAFF XII possui bandas que se hibridizam com a sonda YAFF e que são comuns a outros clones. Isso sugere que o clone λ M YAFF XII apresenta porções de DNA localizadas a 5' do gene da LKR/SDH, cobrindo certamente a região promotora do gene.

Os quatro clones selecionados para o seqüenciamento (I, VI, IX e XII) foram digeridos com a enzima *Sa*/I. Esta enzima libera os insertos clonados dos braços do fago λ EMBL3. Os braços dos fagos correspondem às bandas de 9 e 20 Kb, enquanto as demais bandas representam os insertos clonados (Figura 14). O clone λ M YAFFI, digerido com *Sa*/I, libera dois fragmentos de aproximadamente 8 Kb. O clone λ M YAFF VI libera um fragmento de 5 Kb e outro que possui tamanho igual ao braço menor do fago (9 Kb). O clone λ M YAFF IX digerido libera dois fragmentos de aproximadamente 7 Kb e o clone λ M YAFF XII libera dois fragmentos, um de 11 Kb e outro de 2 Kb. Portanto, podemos assumir que os clones I, VI, IX e XII, apresentam insertos de 18 Kb, 14 Kb, 14 Kb e 13 Kb respectivamente.

3. Seqüenciamento do clone genômico da LKR/SDH

3.1 Seqüenciamento “shotgun”

Para a resolução completa do gene da LKR/SDH, os clones genômicos λ M YAFF VI e λ M YAFF IX foram totalmente seqüenciados. Para esse seqüenciamento foi adotada a estratégia de produção de sub-bibliotecas a partir de insertos dos clones genômicos gerados ao acaso (“shotgun”).

Inicialmente foram seqüenciados 280 clones de cada uma das sub-bibliotecas que contêm insertos de tamanho variando entre 1 e 2 Kb. Após as montagens das seqüências de cada uma das sub-bibliotecas foi verificado que os clones seqüenciados não eram suficientemente aleatórios para cobrir a extensão total dos clones genômicos λ M YAFF VI e λ M YAFF IX. O seqüenciamento das extremidades de mais 50 clones de cada uma das sub-bibliotecas que contêm

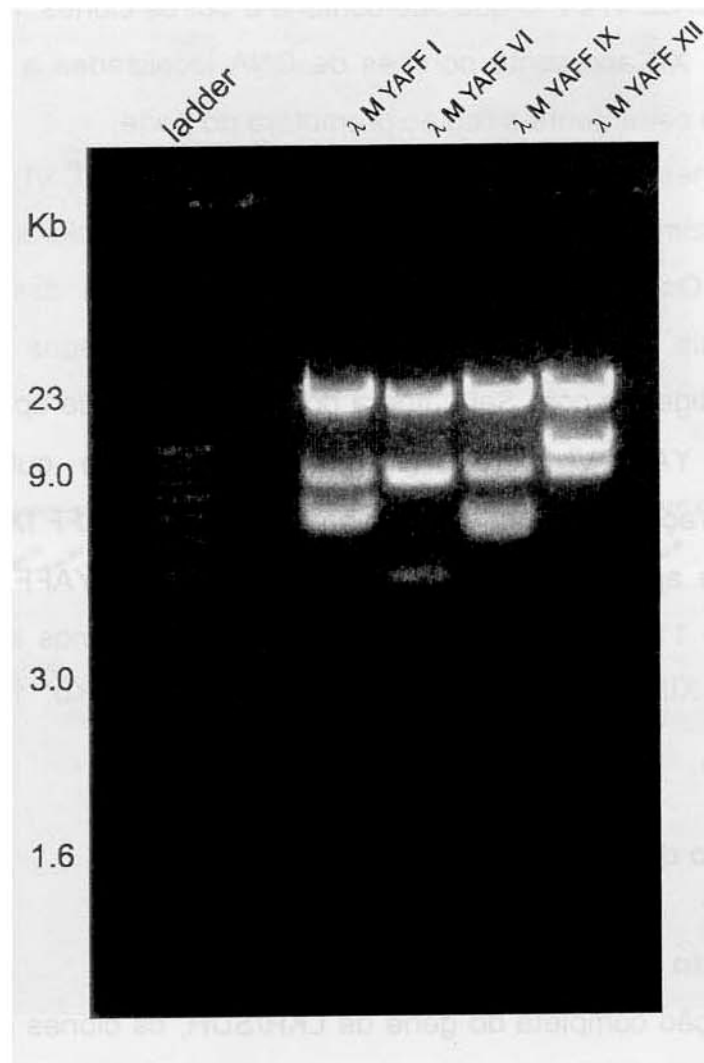


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose dos clones genômicos λ M YAFF I, λ M YAFF VI, λ M YAFF IX e λ M YAFF XII após digestão com a enzima *Sa*/I. Os números à esquerda representam o padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb – Gibco BRL).

insertos de DNA entre 3 e 5 Kb, possibilitou a montagem da sequência completa dos clones λ M YAFF VI e λ M YAFF IX (dados não apresentados).

As duas grandes seqüências montadas foram analisadas. A precisão dos resultados do seqüenciamento permitiu a identificação de regiões de sobreposição entre as seqüências dos clones VI e IX e a montagem final de uma única seqüência, que foi submetida a análise em banco de dados utilizando o programa “Blast”. Esta seqüência resolveu a estrutura do gene da LKR/SDH (Figura 15).

3.2 Análise estrutural do clone genômico da LKR/SDH

O alinhamento da seqüência do clone genômico da LKR/SDH de milho com a seqüência do cDNA da enzima (Cord Neto *et al.*, 1999) mostrou que o gene é composto de 26 exons e 25 introns distribuídos em 11 kb. Os 15147 pb apresentados na Figura 15 contêm a seqüência completa do gene da LKR/SDH, incluindo os domínios 5' e 3'. A Figura 16 mostra a organização estrutural do gene e a Tabela 1 mostra as seqüências que flanqueiam as junções exon/intron, conforme o consenso descrito por Brown (1986).

Na seqüência do clone genômico de milho os 25 introns variam de 85 a 1028 nucleotídeos, assegurando o tamanho mínimo de 66 pb necessários para o processamento do elemento transcrito. Em suas extremidades 3' e 5' os introns são determinados pelos nucleotídeos 'GT...AG' (Brown, 1986) respectivamente e apresentam um valor médio no conteúdo de A+T em torno de 63% enquanto que nos exons o valor do conteúdo de A+T cai para 54%. Os altos níveis de A+T nas seqüências dos introns parece ser característica comum nos genes de planta. Essa característica parece assumir um papel fundamental no reconhecimento dos introns e no processamento do RNA pela maquinaria celular da planta (Wiebauer, 1988).

Os 26 exons presentes na seqüência do gene variam de 55 a 321 nucleotídeos. O exon 2 contém o “codon” ATG, que marca o início da tradução. A região interdomínio estende-se pelos exons 12, 13, 14 e 15 e no exon 26 é encontrado o “codon” TGA que corresponde ao final da tradução. Na região 3' não codante, encontramos uma região que delimita um putativo sítio de poliadenilação

2821 ATCCAATCATCTAATCCAAACTATAAAACCTTCTCTGTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGTGTGGAGGATGGAGAGGGATAAATAG
-2735 GGAGGGCCGAGGCGGGGAGCGTCTGTTGCTGCGTACCTCAAAGCGTTCTGTGGGATCATGTCATACCACCTGGAACGCTCGTTGC
-2649 TTTCCTGAGCTGTTGGTCGATGTAGCAGAGAGGAGGTGGCGCGGCCGAGAGAGCGGGAGGGGCGCGCGGTGCGGAGGAGG
-2563 GTGGCCCTGGCATCGGAGGCGGGAGGCTTTGCGCAATCGAGAGGTGCGCGTGGGAGTCTCGCGAGGACCGGCGCGGTGGCCGAC
-2477 AGAGCCGCGTCGTTGCGGCGGAGGCTGCGCGGTTACGCGGAGAGAGTTGGGAGGGAGAGGCAGAGGGAGGAAGCGAGGCTGGTCTGA
-2391 GCTAGTGGTGGGGCTCTGCATCGGAGGATAGGACACAGATCAGGGGAAGGTGATGGTGGCGGCTAGGGGAGGGAATCACGGTGTTC
-2305 TCTCGGACGTGCGCGGCGAGGCGAGCTGACAACGCGAGGGGCGACGGGCGGGGCGATGGTGAAGGTTGTGGACGCTCAATTTTGT
-2219 ATCTTATAGAGTTGTAGAGATAAATATTAGAAATTTGGATGAGTCTGTGAGAGACCGAGGACCGGCAATGACATCTTTAT
-2133 CACTGGGACATAGACATGTCAAATGGGCGGGCCGGTGTAGTGGGCGCTGACCGGCGACGGTCTGGGCCGCGCAGCAGCAGGCCCCG
-2047 GCGGACATAGAACCGTGCCCGGGCGGGCGCGGTCCGATAGCCGTGCCGGGCTTGGGCTGGCGGTCTGGCCTGCGGTGCGAGGACGCG
-1961 GCCCGGACAGGTTAATTGGTATGCACGATAACGGCCGGTTTTAGGAATTTATTTTGAAGTCTCAGTCTGTTTTAGCATATAATAG
-1875 TGATAATATGTTTATTATAAGATATCTCGAATTTGTATATGTGTTCTTCTGTGATCTGAAATCTTTTATCTAAGTATGTATCT
-1789 AAAATTATAAATAATTAATTAATGAATCTAAACTAAATTTGAATATTATATTAATCTAAATCTGAATTTTAGAGTTTTTTTTGTGTTTA
-1703 GGGTCCGACCCGGCAGACAGGCGCGTCTGCCTCCGGCCCGCACGGCCCGTATAAGAATAATCGTGTGCGGCGCTGGGCTATGTC
-1617 AGCCAGCCCGCAGCGCGGCGCGCGCACGACACTGAACCGTGTGCGGCTTGGAGTACGCCCCCTCGTCCGCGGCCCATGCTG
-1531 CCGGTCGCGAGCCGCGCGCGCGCGCGTGGACATGTATAACTGGGACCGGTCTTCTGTTGATCTGTTTCAAAAACATGTGTTG
-1445 TGAAACTATGATGTACTGTAGGCTATAATTTGTAGTATAGTCAGGATTTAGTTCAGTGCTAAATATTGAAGGCTAAATATTTATAA
-1359 TTTTCATATTTTGAACATATTTATATTTTTTTTAAATAGTAAAAATGGTACCAACGATGCAGCTGGAGGCGTCATCTACTTAC
-1273 TTTGCTCCATGGACGCTGAGTTTGTGCTCAAGTTTCTACTGCAGTGCTATATAGTTCTGCTCGCTCAAAACCCCTTTGTCCTTCGCAT
-1187 GGCAATCTAGTTCAATAATTAAGCTGTGCTTTTGGCCCTTCCACCTAGTCACAGCAGCAGTGGTGGTATTTTATAATTTTA
-1101 TAATCCAGTGCACAATGCAAAAACCTTTTAAAGCACGTAAAGATTAATTAATTTGCTCTATCTAAATTAATTTTGTGTTTAGTAA
-1015 TTAATAAGTCTTACAATATTTGATGTATACATATTTTATATTTTGTGCTAGGTTCACTTTATCCATTTAAAAACAAGAGATA
-929 AAACGATAACTACTTTAGGGTGAAGGAATACAACCTATAACGGCAAGGGGATTTATAGACATGCAAAAACAAGAGATCGAACCA
-843 TAACAGGTGCTCAATTGCTTAACAATTTTCCATAAAATTCACAAATACAAAAAATGATCTCCATGCATCGGCTTGGACATTAT
-757 GATGTGTTGGTAGGGTTAGGCTTGGCAAAAACGATTATGGTTTTTTTTTAAAAAGCAGCTTTCTGGTAGATCCGAGGCAATT
-671 TTGCAATCGTTTGAAGAAACGACTTACTTTAAAGTTAGAGTCATTTTCCATATTAATTAATTTGCTAGTGCTAGAGTTAAAC
-585 TGGTAAACCTAATATTTGTGGCTTCTTCTCGTAGTAAAAAATGCTTTCGCCTTTTAAATGTTTTTCATAGTATGCCATTTAAAAA
-499 AATAATGTTCCATAGACTTTTATCATAGAAAACCATAGCCGAAGCATTGGCTCAATCTCTAATAAAAGCATTTGGCTCCACTTCG
G- box
-413 GCAAAAATGGAGTGCAATGCGTCTGCTGCGGCGGCGTACTCGATTTCGTCCCTCGCCACGCCCCACGCGGTCTCT
-327 TGGGTCTTGCCTCCGCTCCGGCAGTCCGGTCTCAGAGTGCAGTTCCTCTTTGGGCTCTTCTTCCATCCCCATCGTGTCTGTCTG
-241 TGCCGTGCGCTTCCGAGACAGCTCACTCCACCAGCAGGGCCGTCAACACAGCTCGGCGTCGCCATCCATCTCTCGTCGGAGCC
GCN4 like elemento CCAAT
-155 CAGGCCAGCTGAGAGCTGACTCTCTCCCCGAAAGGCTGGAACCGTCAAAAAGGAGGGTGCAGATAGCGTGTCCAAATCGAAAT
TATA +1
-69 CGAGCAGAGTTCCTGGGCGACTGGGCGCTCTCTATTTTAAAGCTGACCTCCCTCCAGATAAACTCCGCGACGCGCAGGCGCTCGTC
18 CGTCTCGGTTTCGCTCTCCCTCCCGCGCACCTCACTCGTTCGCGGCTCGCGCGCGCGCGTGCGCCATCTCCACTCCAGCGCG
104 CTCTACGCGGATCGAGCTGCCAGgtacggcacogcgccactctctctctctccgacggcggtccogaatatggccggcatcgc
190 cagttaatctactagcttgcttggagtatcgctcgcaogggcaogggcgcaoggggtgtacggcgctcctcgcggcggtgatg
276 cgaattctggcggtgttccggggggtcggttaatttaatttgcggttccaaogcggaagtcgctcgatcagtgcggttaatttg
362 ggacgcggggcgggcgggcggtcggtcgctcggtggcggttggttggaagcggtggcggttagggcggtcggtcgacgc
448 caccgttgaccgtacacgtgcatttgctccagaggatagggaggagcgtgacaaagcctgtgcggtgtgctgatgctgatgata
534 caggtctctgtccggaogaaacttatgctgtgcccagatagcggcaggcgagacoggtgaagcaggtggagactagggacggaaocggaca
620 gtgtgagcgtgatgcactcgcgtgacttagcttgcttaogtgcagcttctggtactactagtgagtgatcgttgcgcgcttcaag
706 cgtgtcgaaagcagcttatagtagacaggaaaggaogggacgtgttcttcaatctctacactagtagtagtgaaagcagctgatg
792 acaactactatgctctcttgggttagtaatttgatttggaaccttcogttgcttggagtttggaactgggttcattcagtggt
878 gacactgggtggtgtactctgtccagacgtaccttccagacagtaactggttggaactactagcttctcttcttcttcttctt
964 ccgcacgcgctggcgactattcagattcagtaaaatggcggaatttcaactagtaatttggtatcgtagctgtgacacgaca
1050 ttgcatgctgcttcttgaactgtatttcgctccctgacaacatctcactgtattaatttgacacttctgaacgctcagctgtgt
M G S A A
1136 aaactcacttctcattttcagGAGGTGTGGATTTCATGTCCGTGATCTAGGCGCCTTACTTGGACTCAGGTATGGGTTCTGCTGCTA
T E
1222 CTGAGgtgtgtaatctgaccccttttgttgttgcaaacogtgcggtgtttgataacottgttctttaaattgtacggttaattatgt
G N D T L L G N G V V G I L A E T C N M W E
1308 tgattcaattttccactcgcagGGCAATGACACCTTGTGTTGGGCAATGGAGTTGTTGGGATTCTTGCTGAGACTTGTAAATATGTTGGGA
R R A P L T P S H C A R L L L G G G K A N G P R V N R I I
1394 AAGAAGGGCGCGTAACTCCTTCCCATTTGTGCCGCTCTGCTAGGAGGAGGCAAGACGACCTCGAGTAACCGGATTATTG
V Q P S T R R I H H D A Q Y E D A G C E I S E D L S E C G
1480 TGCAGCCAAGCAAGGAGGATCCATCATGACGCTCAGTATGAGGATGCAGGATGCGAGATTTCAGAAGACCTGTGAGAATGCGGC
L I I G I K Q P K
1566 CTTATCATGGCATCAACAACCCAGgtcatattttotcattaagtttagatactotattggacagtgctotataccaatatcagat
L Q M I L S D R A Y A F F S
1652 atcaaccatggttctgaaacgcttggaggtgtcttcaottggcgagCTGCAGATGATCTTTTTCAGATAGAGCGTACGCTTTCTTTTC
H T H K A Q K E N M P L L D K
1738 ACACACACAAAGCCCAAAAAGAGAAATATGCCACTGTAGACAAGgtattaaacataagctcgtaacttctcatcatttcagtcgtc
I L E E R V S L F D Y
1824 aactgccattgtcattcoatgtaggatattaaatcattgactaatgtctcagATCCTTGAAGAAAGGGTGTCTTGTGTTGATTATG
E L I V G D T D G K R S L A F G K F A G R A G L I D F L H G
1910 AGCTAATTTGGAGATGATGGGAAAAGATCACTAGCATTTGGGAATTTTGTGTTAGAGCTGGACTGATAGATTTCTTACATGGT

1996 CTCGGACAGCGtaagtatgatgaccaaacactaataaaataactcgtgcagtgacttgataaatattatgcocttggtaactggatttt
 2082 ccatctgaggtttgttgcaggaaactagtttaatttgcctcactgcaacttatgattaattgtttacaatgatttaaaatgaattcaact
 2168 gctgattcatagtagacaacctatgacttgtgatgtgcctgtttgggtgtgtatgtcactcaagcagcttaagggttttccctgacaat
 2254 ttcagGATATTTGAGCCTTGGA TACTCGACTCCATTTCTCTCTCTGGGACAATCTCATATGTATCCTTGGCTCGCTGCAGCCCAAGG
 2340 CTGCAGTCATTTGCTGTTGCAGAAGAGATAGCAACATTTGGACTTCCATCCGGAATTTGTCCGATAGTGTGTTGTGTTCACTGGAATT
 2426 GGAAACGGtaattgtgctgtcaacatattttccatttgaattttataataggaaaccccttatatggctactgtcccaacctgtgtt
 2512 tttgacatatgatgcactctatttggggcatttgcctctttgccccttttagcagttgagtgctttaacactgggtcatctcataatc
 2598 ttgatgagtttaattggttccagtgacataaaatattttcttctactgcgcagtgtgatgttatgatcactgttttctatatctatttttg
 2684 ggccattgtacaaataactatgtcgtttacagaatttttctggtgtatgtgcctgtcatttttagtgcaagcttaagaaaaatacatc
 2770 ttactcttttcccttcaaagggtcaaaatgacattaccttattgacatctccttgaattagtggtgtaaatatgattttgtgaaacta
 2856 aatatcttaagcctgtcggcactaggcgatatttgatagcattacattgaccaaaaaagttatatagatatacatgctttcttaaga
 2942 aaataaaaaaactagaccgtagggtactatgtctcaatttttgcacotttagtgatgtgttttatotaaaaaatcttaacattggc
 3028 ggcataataaacttcaaogtgacagTCTCTCAGGGTGGCAGGAGATATTCAAGTTATTGCCCATACCTTTGTTGATGCTGAGAA
 3114 GCTTCCCGAAATTTTTCAGGtattatgcttttactcattctcttgcattaaatcataaattcaaactaaagttagotaaatgaatatt
 3200 tcttagtaattatttttccctaaatgaaattccatcaaattttatgtttccatcttctctgtatccatcaggattagctattgttacttg
 3286 gtttaatttgaagcatgcttcataaagcagtagttatactctaaactctgttttaattgttttttaaggaactctgttttta
 3372 atgtacacagGCCAGGAATCTGTCTAAGCAATCTCAGTCGACCAAGAGAGTATTTCAACTTTATGGTGTGTGTGTGACCTCTAGAGA
 3458 CATGGTTTCTCACAAGGATCCCACCAGACAATTTGACAAAgtaatgcatgtctcttcaaacataagtggtgatttgtagttctctctt
 3544 gatggtcagttataaacaacttttggttatctccagagatgtattgcaccacataccacacatttttaattccatcgtctctgttat
 3630 actggttgtgcacaggagcctttgcgcctatctgttttttttggttataacggcaatgtcctaattgtagttaatcgtcttataca
 3716 tatagatcttaaatatatttttaagttaaatgtcatccatatttttcagttatttttataattagacaagaacacattagcatttca
 3802 atgggtcagtgctcactcaaaaaactttaaatctgtgtaactgtgcagGGTGACTATTATGCTCATCCAGAACACTACACCCCTGT
 3888 TTTTCATGAAGAATTGCTCCATATGCATCTGTCTATCGGtattggtcttggatgaactgcttttggtaagaaattgttccgatgtaactc
 3974 tttgaaccaactagaacatgtttttttatcaactttgaacatgtgagaccagccatataatgggaattacctgttttgatgcaactc
 4060 ttttaatacagcccaggcaacacattcttcttcttggtaattgttaataactcttagcaagatgcagagtttctagaagagtttaa
 4146 cctgctgggtcttgggtcgggttcgtcacctttagctgtcttaagaatagctgataacccttagagcggtcgggtcaggttctctctgtt
 4232 gatattgtaactcttttttgcgtctctgggtgtgtgtgtgatgtcttgcacaggaaggtcctcatcatgtaggaccttctcttttt
 4318 ctctctaataataaagatgcacagctctcctgcgcgttcagagagaaaaatgttaataactcttaagaaagtgcagtatagcatat
 4404 aacagttttagggttaaaaaactatttctatccatgataaacattcttgggtagtttttatataagatgggtgggtatttagtaata
 4490 gctgctacttatttgaataaattttctagagttagccatatttgcaccacactcagttctataaattgggtctcattggttctggagT
 4576 AAAGTGTATGTATTGGGAGAAGAGGTTTCCACCATTACTAAATATGGATCAGTTACAGCAATTGATGGAGACTGGTGTCTCTTAG
 4662 TCGGCGTTTGTGACATAAATTGTGATATTGGAGGTTCCATTGAATTTATCAACAAGAGTACATCAATAGAGAGGCGCTTTCTTTGCG
 4748 taatcaggttctccattttccattcttaaaatttaaaactggaaaaggtataataacccatgagtagcagtcataatctcctaaggt
 4834 gtgttggcattacttacatccctaattcttttgaatattcatttgggatgcacagtttgccttacagtattctgtccttgcctagtt
 4920 ttaggttccagtggaattccctgatatttacagcaacctagggttctgggtggtgtcttctcaatcaccacagttactgttaatagt
 5006 tcttcttataggtatgatttotaactaattacgggatagcgaacctatagGTATGATCCTTCTAAGAATTCTATACCATGATGATATGG
 5092 AAGGTGCGGAGTGGTCTGCTTGGCTGTGACATTCTCCCTACAGAATTCTCTAAGAGGtactccatccaatctcttttttaagc
 5178 gtctgagcatatttttgaaaaaaaacttatttataagatgctgcaaagtagtgaggcgtacataattaacttgggttctatggtaactc
 5264 gaagcgaccaaagcatgatttgcacctgattggttgggtgctagtgttatcacacatgcaagcatctaaatttggaaagtttaaccat
 5350 ccaccttgggcagctggcatgcaaaatggacacgaacgtggcataaaacactagattaattcttgtgtgactgcactggcgtct
 5436 tggattttatagtagcgttgcogtgccttaaaaaacagaatggagtaacagatttcttactacaacaaagatgctattttgtatag
 5522 gcatcagcttgcgtcattgatcttactttttttctcgaacattgatcttactgttgtccatttatatgggaacctgtagGCCT
 5608 CCCAACATTTTGGAAACATACTATCTAGACTTGTGCTAGTTTGGCCTCAGTGAAGCAACCGGCAGAACTTCTTCTACTTGTGAGA
 5694 AGAGCTTGCATTGCACATGCTGGCAGATTAACTCCTTTGTATGAATATATCCCTAGGATGAGAAATACTATGATgtaagcttcaaa
 5780 tacttctattcttcattgttattctctcagatagttcacttgtacgatgtgatccatataaggtgcaaacactcaaatagata
 5866 ttgttaaaatattgtgattatttttagtgttttgcactatgcttgttattctacaatacggggagtagccttttattaaacagccct
 5952 gcaatttggctccttcaaagtttcaagttggcgactttcttaccatggcatagactatgcttgtatccctccaaactcacactatg
 6038 ctgagtataaaaggggttagaccggttagagtgtacttatgctgtggaattagttatttgtataggatgctactatgaatacatcccc
 6124 ttgcactcctttgtgcagagtgttccccattgggcattgtaaatggatgtgtttcttaactctatagttctactattgttaacca
 6210 gaacacttcaggttggataaaggactaagtggcctagtttttactcttttttgccttaactagtatgctttgttgggtattttttaa
 6296 taagttgacaagcatctctgattcattgtctcttttggattcttatcaataatttgaacacacatcatctctgtcctcttattttt
 6382 tttgttcagaaaacttctctatgtagtgggtgctcatgttgtatataattgttttttgggattttccatagcatcacataaattctt
 6468 ttctcattatgggtgcttaacagttatttaaccaattggcacatttttaaggtaacttaattgttgggtggaagttatactctattctt

6554 gcagAGATTGCGACCCGCAAAAACAAATCCATTGCCTGACAAGAAGTATAGCACCCCTGgtagcaaatagtagtttttctagtagt
 6640 ccagtagacattcatgtcttgtatttgaaccaatacacaattacttagcctttttgccttttaaaattattgattctatgaaacagGTAT
 6726 CTCTCAGTGGGCACCTATTTGATAAGTTCCTTATAAATGAAGCTTTGGACATCATTGAGACAGCTGGAGGTTCAATTCACCTTGGTT
 6812 AGATGTGAAGTTGGACAAAGCACGGATGATATGTCATACTCAGAGCTTGAAGtaagcatttaacttcatactgaatctcaaatag
 6898 ttaggttgaaaaatctctctctggaaaaagatttaggataaatctttttaaagaaggtagttctagttttttttaaagaacaatct
 6984 tctgctggccaaacacaaccataatttgatttggttctgaaacatatgatacacacctttctgcagGTAGGAGCAGATGATACTGCC
 7070 ACATTGGATAAAATTATTGATTCTCTGACTTCTTTAGCTAATGAACATGGTGGAGATCACGATGCCGGGCAAGAAATTGAATTAGC
 7156 TCTGAAGATAGGAAAAGTCAATGAGTATGAAACTGACGTCACAATTGATAAAGGAGGGCCAAAGATTTTAATTCTTGGAGCTGGAA
 7242 GAGTCTGTCCGCCAGCTGCTGAGTTTCTGGCATCTTAACCCAGACATATGTACCTATGGTGTGATGACCATGATGCAGATCAAAAT
 7328 CATGTTATCGTGGCATCTTTGTATCAAAAAGATGCAGAAGAGgttattctgcgaatgatgcattcccatgtcttgacattctctc
 7414 tgaactgtctgggtgcttgcaatgacttgcatttaacatgatctatgaacatcagtgagcaataaccagattcaaaatcactgtatttg
 7500 gttaccctgtatgcaaatatttgtgaaattggacctttatcttatcatgtctctatatctgtacatgcagACAGTTGATGGTATTGA
 7586 AAATACAACTGCTACCCAGCTTGATGTTGCTGATATTGGAAGCCTTTTCAGATCTTGTCTTCAGgtaagtttcatctctgatactta
 7672 aatctgtgtgtgtgtctccattgttttttaactaacttcattcacacttaggcaatagcttctatgcggttcaggacattgtgtgtg
 7758 cttctctctgtggcaaatatttcaactgtaccctgaatttgttgattacagtaactagtcagaagattaatgatgcagactc
 7844 ctcttgagcagGTTGAGGTTGTAATTAGCTTGCTGCCTGCTAGTTTTTCATGCTGCCATTGCAGGAGTATGCATAGAGgtagtctctc
 7930 atctgttctgtgtgtatctataaaatctctggagctctgttgaagcatttaaacattattgatgtgatatttattgtgaagagattct
 8016 gactgacaaattcatctattacagTTGAAGAAGCACATGGTAACGGCAAGCTATGTTGATGAATCCATGTCAAACTTGAGCCAAGC
 8102 TGCCAAAGATGCAGGTGTAACATATACTTTGTGAAATGGGCCTAGATCCTGGCATAGgtaacttctctcattgtaatggtcactgagaa
 8188 agtgtgtgttctcatcataagtttaaatctctgttaaaaaaagcttatgtatatttatgttatgcagATCACTTGATGTCAATGAAGAT
 8274 GATTGATGAAGCTCATGCACGAAAGGGAAAAATAAAGGCATTTACATCTTACTGTGGTGGATTGCCATCTCCAGCTGCAGCAAAACA
 8360 ATCCGCTTGCCCTATAAATTCAGgttagatgtatccattttttctgaaacggttaggagaactgogcatcattatattaagaagaaa
 8446 ataggtaatacaaggtccaaagcggttagaggtatccatgttcttaagtaatccagttatcagtaactcaatagtagtacaatgaggtt
 8532 totacatccaaatattcttaacaataatatttcaagtggtgtccattcaaaacaaatcatgtgccatttttttgaaatgctaataa
 8618 ttatcttctctcttttttcagTTGGAACCCAGCTGGTGCACCTCCGGTCAGGGAAAAATCCTGCAGTCTACAAATTTCTTGGTGGAGCG
 8704 ATCCATGTAGATGgtaagttgttacaattttatttctctgacctgctacactaaataaggagcaagtgctgtctgtatgttctc
 8790 ctttttttcaaaaaggatggcagtagctttacataaattggtcaagagagaattagatgtacaaattacaacacacatctcatata
 8876 aacacactgataggaatagtaaccaattcagagggaacccatgatggcctatattaatgggagatagggagcccttgcatctattc
 8962 atatcctggaatctaatagtctcttgaaaagatgggttactccacacagctcctgagtgatttaacttaccacttcaattcaatagG
 9048 TCATAACTTGTATGAATCAGCAAAAGAGGCTCAGACTACGAGAGCTTCCAGCTTTTGCTCTGGAACACTTGCCAAATCGGAATTCCT
 9134 TGATATATGGTGACCTTTATGGTATCTCCAAAGAAGCATCCACCATATATAGGGCTACTCTTCTGTACGAAGgtaagcaactgcat
 9220 acccttttgccttcagtgaggcattgctttgcattgcaagttctgatttctgcttccattttgtctgcatatgtgcagGTTTATGTA
 9306 GATTATGGTAACCCCTTTCCAAAACCTGGGTCTTTTGAATGCTGCAAAATCATCCACTGCTGCAAGATACTAGTGTCCAAATATAAGG
 9392 GTTTCCTTGTATGAACACTGAATAATATCTCCACAATTAACACGGACTTAGATATTGAAGCCTCTGGTGGATACGATGATGACCTG
 9478 ATTGCCAGACTGTTGAAGCTCGGGTGTGCAAAAATAAGGAAATAGCTGTTAAGACAGTCAAAACCATCAAGttagctctctgatac
 9564 ccgtgctacaaaattcatactctttctgaactgttgcagtgaaatataaatgttgccatcaagttaatatgtttaaagaatcccttg
 9650 gcaaaaaatgatttaggaataatagaacaggaacacatgaagttgttagttgtattttagaactgcaaaaaacagcatcatacaga
 9736 gcagGTTCTTGGGACTACATGAAGAGACTCAAATACCTAAGGGTGTTCGAGCCCATTGATGTGATTGCCAGCGAATGGAACAG

9822 AGGATGGCCTATGGCCACAATGAGCAAGttagggttaataactacotttagcacatgtottatgttctatgtgttgoatgttagotgtt
 9908 aaaaatccgtgctacagttctttctttctttctgtgaaaccataaagagattcaacctactaattttatgtttgttagttgcocta
 9994 cagttctgttgtataaatttgacagggacaaaactcagatacaaaacagacttttaattcctttagatctgcagtagattacccg
 10080 ttttaacgattaatgtgaatcccaaaacttcttttcagaactgtgtctaccagaactagotogcatcatatttcataactgtttttactt

 10166 catgttcaaaaaatggatcaaatcaagtcaatagbagaggactcctgtgtgaggaagagotcttgttaattcagGACATGGTACTGC
 10252 TCCACCACGAAGTCGAGGTGGAATAACCGGACGGGCAACCCGCCGAAAAAGCACCAGCGACGCTACTGGAGTTCGGGAAGGTTGAA
 10338 AATGGCAGGTCCACCACTGCCATGGCGTACCGTGGGCTTCCAGCAGCAATAGGGGCCCTGgtactaaacctaaacacaattat
 10424 acttgacagtagtaaggaaaaagcaaaagcaaaagtcggggagggaatgatgtgtgtcatttggctctcgaaacatgttatactgag
 10510 CTATTGCTAAAGAATAAGGTCCAGACGAAAAGGAGTGATCAGGCCCTCTGCAACCGGAAATCTACGTTCCAGgtgtgtacgttagt
 10596 ttcattgcttcttctgttggaaattacatgaagtgttaacggtgtgtgacctgtgtgttgggtgttgaagCATTGGAGATCTTGGAG
 10682 TCGTCGGGCATCAAGCTGGTTGAGAAAGTGGAGACTTGAAGTTCCTTGATACACAGATAAAGATAGTATGATATAGCAGGGCACA
 10768 TGTATCTTTGTATTAACTCCGTTCTGGAATATATATTTTGAACATAAAATGTGACAAATAAAAAGAACGGGTGGAGTATATTCTA
 10854 AGAGACGGCAGAAAGAACTCTGTATATATGACCTGTGATATCAAAATAATGCCGATCAGTTAGTTGGCTTGGCTCTTTTGAAGGTT
 10940 TAGTTTATACTAGTAAATGAGAGCAACCAGCGAAGCATAAACAAGATGAGACGTCAGAGCAGCAACAACAACCTGGCTTGCCTTTG
 11026 GTTTATATTGCATCGGTTCTCCGAATGAACCTTGCATCCTGTGCACATCAGACATGTCCCAGAGGGATTTTCAATTTTCATTAAATTG
 11112 ACATATCAGCAAACTGTGCTTATGCGTCGAGATATTTATGAGAGGGGAAGAGAGCTTCATGAAACCAACCCGCTCCTCAGCACTACC
 11198 CAGGCGATGAAATCCCCGCTAGGCTGATTGCTTGATCTATCTACTGCGGCTGCTCCAGTTCCTCAGGTGGGCACCGGCCCTCCTT
 11284 CCACGGCTGCTACAGTCCAGACTCTTCCTGTTTCGCGCCAACTCCCTCAAGCCCTACCTACAAACCCGCTTCAACGGCTGTTCC
 11370 TCAGGTGGACAGTTTCTTTTTCAGTCAGTAATAACAACGCTATATTTAAACAGGCACCCACTGTATTTCTTCTTTTCAACACTCAC
 11456 TGAGCCTGTTTCTGACTTTATGTTTCAGTTCGGTTCGGCAACAATTGCCACAGGTACAGTGAACCAACCAAGCGGATAACCTTGT
 11542 TTA AAAACATGTGGTACAGGATGCAATCCCTGGGGATCCAGATTTCAAAACAAACAACAATCCTTGATAGAACCTCAGCATGACA
 11628 CAATCACCAGAAAGATCCCGGAGTCTAAAATCAACATATTCATGAAGACACTCTCTAGTTGTACACCATATACTTGGGTGTTGC
 11714 ACTGAATTTCTGGTAGCCCTTGATGACCTTATTGACAGCATCGAGAAAATCCTTCTCTGTCCCGTTTCTTCTGCGGGCACGAATGG
 11800 CATACATCCCGGCTTCTGTGCAGACGCTCCTTATATCCGCTCCTGGAGTAACAAAGCAAGGCTATGTGAGAACCTGATCATCTATC
 11886 GCAAGTCTTCAAGTAAATCAATTGAATCAAGCAGAAACACAAACATTCTGCTGAAACCACAAAGCAACTCACCAGTAGAGTTGGG
 11972 GCAGAGCCGTGCCAGAAGCTCGAAACGAATATCTCGCTCGCAGTTCATGGTGCCTGTATGGATCTTAAAGATTTGGGTACGGCCCT
 12058 CCAGGTGAGGTAGCCGAATTTCTACCTTTCTGTCCAGACGACCAGGACGCAAGTGCAGGATCCAATGTATCAGGCCTGGAAGGA
 12144 AAAAAACAAAAAGTGGTCAGCTTCTGGGACCTGGGATATGGCCAAATAAATTTTAAAGCATATCAGTTCAAGACATGGAGCCTA
 12230 TAAACAATAGATTTTCGTGCAGAACATTGCATATTTCAAAATCCTATGTTTCTCTGATAATAGCTTCAGAATAGAGCTCGAGGTAA
 12316 GCACATAAAA

Figura 15. Sequência de nucleotídeos (em preto) e sequência deduzida de aminoácidos (em azul) do clone genômico da LKR/SDH de milho. Na figura os introns estão representados pelas letras minúsculas e a sequência correspondente aos exons estão representadas em letras maiúsculas à direita da posição +1, que indica o início da transcrição e que foi determinada pela análise da sequência do clone de cDNA de milho. A região promotora e reguladora do gene está representada pela porção 5' não codante à esquerda da posição +1. Domínios conservados da região promotora, responsáveis pela possível modulação e ativação da transcrição, estão assinalados em amarelo. Na região 3' não codante a sequência de um provável sítio de poliadenilação está indicado em vermelho.

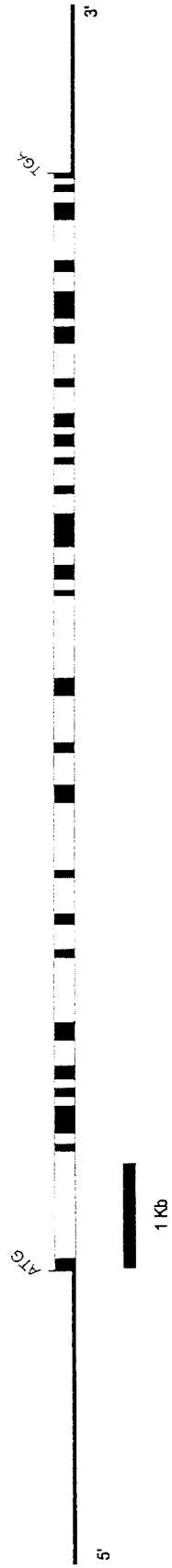


Figura 16. Representação do padrão de introns e exons do gene da LKR/SDH de milho. As caixas escuras (■) representam os exons e as caixas claras representam os introns (□). As regiões 5' e 3' estão representadas pelas barras mais finas.

Tabela 1. Lista dos introns e seqüências das bordas das junções exon/intron do clone genômico da LKR/SDH de milho.

Intron número	Exon/ (borda 3')	Seqüências delimitantes da borda dos introns	/Exon (borda 5')	Intron %A+T
1	...GCCAG 3'	5'- <u>GT</u> ACG...TTCAG-3'	5'GAGGT...	44.9
2	...CTGAG 3'	5'- <u>GT</u> GTG...CGCAG-3'	5'GGCCA...	59.8
3	...CCAAG 3'	5'- <u>GT</u> CAT...GGCAG-3'	5'CTGCA...	59.6
4	...ACAAG 3'	5'- <u>GT</u> ATT...CTCAG-3'	5'ATCCT...	64.1
5	...ACAGC 3'	5'- <u>GT</u> AAG...TTCAG-3'	5'GATAT...	64.8
6	...AAACG 3'	5'- <u>GT</u> AAT...GACAG-3'	5'TCTCT...	65.6
7	...TTCAG 3'	5'- <u>GT</u> ATT...TACAG-3'	5'GCCAG...	74.2
8	...ACAAA 3'	5'- <u>GT</u> AAT...TGCAG-3'	5'GGTGA...	67.0
9	...CATCG 3'	5'- <u>GT</u> ATG...TGCAG-3'	5'TAAAC...	62.4
10	...TTTCG 3'	5'- <u>GT</u> AAT...CATAG-3'	5'GTATG...	61.9
11	...AAGAG 3'	5'- <u>GT</u> ACT...TGTAG-3'	5'GCCTC...	61.1
12	...ATGAT 3'	5'- <u>GT</u> AAG...TGCAG-3'	5'AGATT...	64.9
13	...CCCTG 3'	5'- <u>GT</u> TAG...CAGAG-3'	5'GTATC...	70.6
14	...TTGAA 3'	5'- <u>GT</u> GTA...CAGAG-3'	5'GTAGG...	69.3
15	...AAGAG 3'	5'- <u>GT</u> TAT...TGCAG-3'	5'ACAGT...	63.8
16	...CTCAG 3'	5'- <u>GT</u> AAG...TGCAG-3'	5'GTTGA...	62.0
17	...TAGAG 3'	5'- <u>GT</u> AGT...TACAG-3'	5'TTGAA...	67.7
18	...CATAG 3'	5'- <u>GT</u> ACT...TGCAG-3'	5'ATCAC...	70.2
19	...TTCAG 3'	5'- <u>GT</u> AGA...TTCAG-3'	5'TTGGA...	66.7
20	...AGATG 3'	5'- <u>GT</u> AAG...AATAG-3'	5'GTCAT...	62.4
21	...CGAAG 3'	5'- <u>GT</u> AAG...TGCAG-3'	5'GTTTT...	56.7
22	...ATCAA 3'	5'- <u>GT</u> TAG...AGCAG-3'	5'GTTCT...	65.9
23	...AGCAA 3'	5'- <u>GT</u> GAG...CAGAG-3'	5'GACAT...	63.8
24	...CCCTG 3'	5'- <u>GT</u> ACT...CAGAG-3'	5'CTATT...	58.7
25	...TCCAG 3'	5'- <u>GT</u> GTG...TGAAG-3'	5'CATTG...	51.8

definido pela sequência consenso AATAAAAA (Joshi, 1987). Esta sequência localiza-se a 103 pb “downstream” da sequência de terminação de tradução (TGA).

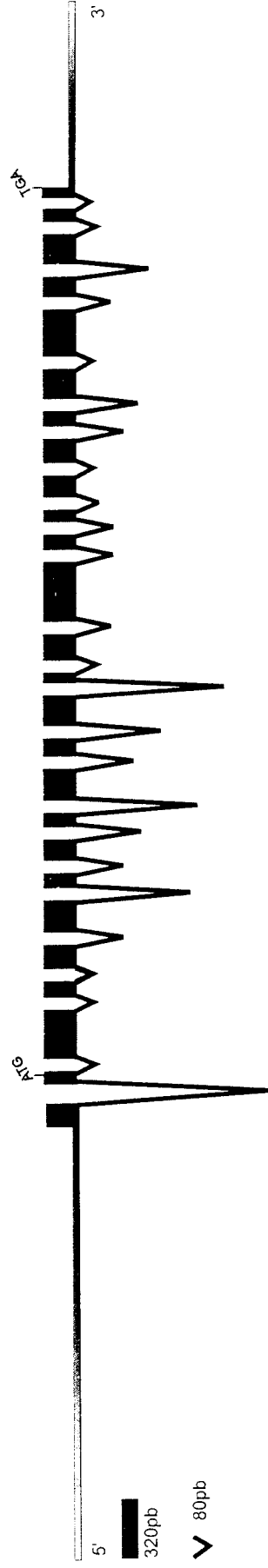
Na região 5' não traduzida do gene alguns sítios conservados são encontrados (Figura 15). A sequência consenso ao domínio TATA box (5' - TATTTTAAGT- 3') é encontrada na posição -25 pb do início de transcrição, condizente com o posicionamento da maioria desses elementos em plantas (Joshi, 1987). A -76 pb do início da região de transcrição posiciona-se o elemento CCAAT.

Outros domínios também são encontradas na região promotora. Na posição -131 pb há um domínio que se caracteriza como um "GCN4-like" (5' - AGCTGACTCCT - 3') e há fortes evidências de que esse domínio media a resposta ao nitrogênio em plantas (Müller e Knudsen, 1993). A -374 pb é encontrado uma região conservada que se caracteriza como um G-box. O domínio G-box é encontrado em vários genes de plantas e parece estar envolvido na resposta a diversos estímulos ambientais e/ou fisiológicos (Menken *et al.*, 1995). Sequências similares ao elemento G-box (5' - CCACGTGG - 3') são comumente reconhecidas por proteínas bZIP de plantas, como por exemplo o fator Opaco-2. Fortes evidências sugerem que o gene da LKR/SDH possa estar sobre o controle do fator de transcrição Opaco-2 (Brochetto- Braga *et al.*, 1992).

Comparações feitas entre as sequências dos clones genômicos da LKR/SDH de milho e a de *Arabidopsis thaliana* (Falco, *et al.*, 1997) mostrou que o gene de milho possui um intron a mais do que o gene de *Arabidopsis*. O gene de milho possui 25 introns e 26 exons enquanto que o gene de *Arabidopsis* possui 24 introns e 25 exons. O exon 2 na sequência do milho está ausente na sequência de *Arabidopsis*.

A Figura 17 traz uma representação esquemática do posicionamento dos introns e exons do gene da LKR/SDH de milho e do gene de *Arabidopsis* e a Tabela 2 traz os dados referentes ao tamanho desses introns e exons. Pela análise dos dados vê-se que a somatória dos nucleotídeos referentes aos exons e aos introns em milho correspondem respectivamente a 3360 pb e 7360 pb. Em

Milho



Arabidopsis thaliana

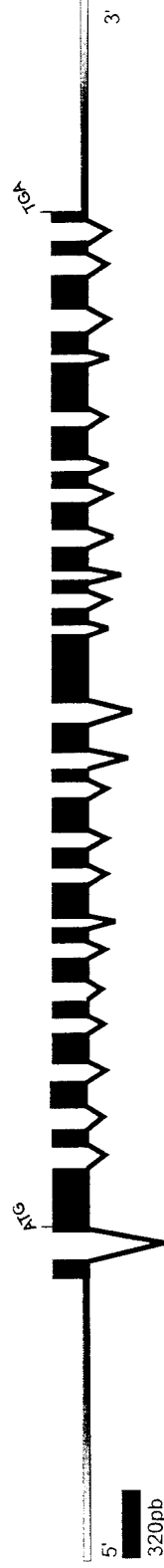


Figura 17. Esquema representando o padrão de exons e introns do gene da LKR/SDH em milho e em *A. thaliana*. Na figura os exons são representados pelas caixas hachuradas (■) e os introns estão representados pelas caixas abertas (V). As regiões 5' e 3' aparecem flanqueando a região codante.

Tabela 2. Tamanho em pares de bases (pb) dos introns e exons dos clones genômicos da LKR/SDH de milho e *Arabidopsis thaliana*. Os números à esquerda da tabela referem-se ao número do intron e do exon na sequência do clone genômico de milho.

posição	EXON (pb)		INTRON (pb)	
	MILHO	ARABDOPSIS	MILHO	ARABDOPSIS
1	126		1028	
2	72	91	102	352
3	264	303	104	80
4	87	87	92	78
5	130	130	253	83
6	174	174	620	80
7	80	83	248	68
8	117	117	352	93
9	76	76	649	132
10	172	172	307	83
11	97	97	453	90
12	164	167	790	88
13	55	61	109	190
14	141	141	186	203
15	321	351	199	94
16	81	81	203	93
17	66	66	121	152
18	118	118	94	123
19	130	130	255	101
20	80	80	330	96
21	159	159	90	81
22	253	232	191	96
23	109	109	390	100
24	162	162	109	94
25	70	70	85	97
26	56	53		

Arabidopsis os exons e introns correspondem a 3310 pb e 2747 pb respectivamente (Falco *et al.*, 1997). A análise das seqüências do gene da LKR/SDH nessas duas espécies revela que a grande diferença existente no tamanho desses clones se deve principalmente ao tamanho total dos introns; conforme referido anteriormente, os introns em milho variam de 85 a 1028 pb e em *Arabidopsis* de 68 a 352 pb. Os dados apresentados na Tabela 2 revelam ainda que o tamanho das seqüências dos exons em milho e em *Arabidopsis* possuem uma correlação.

3.3 Análise da seqüência deduzida de aminoácidos do gene da LKR/SDH

A seqüência deduzida de aminoácidos do clone genômico da LKR/SDH de milho revela um polipeptídeo de 1060 aminoácidos (Figura 18 A). Em SDS-PAGE um único polipeptídeo de 125 kDa é observado (Brochetto-Braga *et al.*, 1992; Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996; Kemper *et al.*, 1998). A análise dessa seqüência revelou a presença de um domínio de ligação de Ca^{2+} (EF Hand like) na região delimitada pelos aminoácidos 382 a 396 (Kemper *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que o Ca^{2+} em altas concentrações está envolvido na ativação e na modulação da enzima LKR (Kemper *et al.*, 1998).

A comparação da estrutura primária da proteína deduzida de milho com a seqüência da proteína de outros organismos revela vários domínios conservados. O sítio de iniciação ATG e os codons de terminação, apresentam alto grau de similaridade. Os resíduos H-110, K-113 e R-145 do domínio LKR de milho (Figura 18 B) são conservados em todas as seqüências. Esses resíduos são essenciais para a ligação da sacaropina à proteína LYS1 (Ogawa *et al.*, 1979; Fujioka *et al.*, 1980; Ogawa and Fujioka, 1980; Fujioka and Takata, 1981).

Na Figura 19 está esquematizado a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos da enzima de milho e de outros organismos que apresentam enzimas mono e bifuncionais da LKR/SDH. A enzima bifuncional de milho é constituída por um domínio SDH C-terminal que apresenta 42 % de similaridade com a proteína LYS9 de levedura e 27 % de similaridade em seu domínio N-terminal com a proteína LYS1 de levedura. Similaridades significativas entre a

A)

```

MGSAATEGNDTLLGNGVVGILAETCNMWERRAPLTPSHCARLLLGGGKNG 50
PRVNRIIVQPSTRRIHHDAQYEDAGCEISEDLSCEGLIIGIKQPKLQMIL 100
SDRAYAFFSHTHKAQKENMPLLDKILEERVSLFDYELIVGDDGKRSALFG 150
KFAGRAGLIDFLHGLGQRYLSLGYSTPFLSLGQSHMYPSLAAAKAAVIVV 200
AEEIATFGLPSGICPIVFVFTGVGNVSQGAQEIFKLLPHTFVDAEKLPEI 250
FQARNLSKQSQSTKRVFQLYGCVVTSRDMVSHKDPTRQFDKGDYYAHPEH 300
YTPVFHERIAPYASVIVNCOMYWEKRFPPLLNDQLQQLMETGCPLVGVCD 350
                                     Ca2+ EF Hand like
ITCDIGGSIEFINKSTSIERPFFRYDPSKNSYHDDMEGAGVVCCLAVDILP 400
TEFSKEASQHFIGNILSRLVASLASVKQPAELPSYLRACIAHAGRLTPLY 450
EYIPMRNTMIDLAPAKTNPLPDKKYSTLVSLSGHLFDKFLINEALDIE 500
TAGGSFHLVRCEVGQSTDDMSYSELEVGAADDATLDKIIDSLSLANEHG 550
GDHDAGQEIELALKIGKVNEYETDVTIDKGGPKILILGAGRVCRAAEFL 600
ASYPDICTYGVDDHDADQIHVIVASLYQKDAEETVDGIENTTATQLDVAD 650
IGSLSDLVSQVEVVISLLPASFHAAGVCIELKKHMTASYVDESMSNL 700
SQAAKDAGVTILCEMGLDPGIDHLSMKMIDEAHARKGKIKAFSTSYCGGL 750
PSPAAANNPLAYKFSWNPAGALRSGKNPAVYKFLGETIHVDGHNLYESAK 800
RLRLRELPAFALEHLPNRNSLIYGDLYGISKEASTIYRATLRYEGFSEIM 850
VTLSKTGFFDAANHPLQLDTSRPTYKGFLELLNNISTINTDLDEASGG 900
YDDDLIARLLKLGCCKNKEIAVKTVKTIKFLGLHEETQIPKGCSSPFDVI 950
CQRMQRMAYGHNEQDMVLLHHEVEVEYPDGQPAEKHQATLLEFGKVENG 1000
RSTTAMALTVGIPAAIGALLLLKNKVQTKGVIRPLQPEIYVPALEILESS 1050
GIKLVEKVET 1060

```

B)

ZE	FFSHTHKAQKENMPLLDKILEERVSLFDYELIVGDDGKRSALFG
AT	FFSHTHKAQKENMPLLDKILSERVTLCDYELIVGDHGKRLLAFG
CE	FFSHTIKAQQDNMEMLDLILQNRILLDYEKICDDKGKRLVMFG
CAL	QFAHCYKDQAGWQDVLKRFPPQNGIYDLEFLNDQGRVAAFG
YLI	QFAHCYKDQGGWKDVLRSFPAGNGTLYDLEFLDDNGRVAAGF
SCE	QFAHCYKDQAGWQNVLMRFIKGHGTLYDLEFLNDQGRVAAFG
	* * * * *

Figura 18. A) Sequência de nucleotídeos deduzida do clone genômico da LKR/SDH de milho. Na figura está assinalado um domínio de ligação de Ca²⁺ ("EF Hand Like").

B) Alinhamento de subregiões do domínio LKR homólogo aos sítio de ligação de substrato na proteína LYS1. Os resíduos essenciais à acoplagem do substrato (H-110, K-113 e R-145) estão em negrito. Os asteriscos (*) indicam os aminoácidos conservados. ZEA, *Zea mays*; ATH, *Arabidopsis thaliana*; CEL, *Caenorhabditis elegans*; CAL, *Candida albicans*; YLI, *Yarrowia lipolytica*; SCE, *Saccharomyces cerevisiae*.

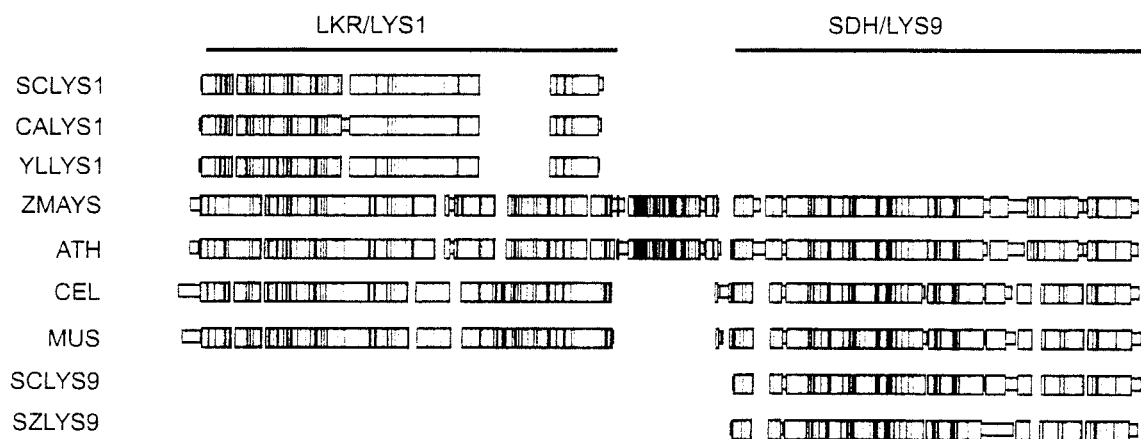


Figura 19. Diagrama esquemático das similaridades entre polipeptídeos mono e bifuncionais da LKR/SDH de levedura, plantas e animais.

A sequência de amino ácidos predita pela sacaropina desidrogenase (LYS1, formadora de lisina) e pela sacaropina desidrogenase (LYS9, formadora de glutamato) de levedura foram alinhadas ao polipeptídeo bifuncional da LKR/SDH de plantas, nemátodos e mamíferos. O alinhamento das seqüências e a análise das similaridades foram feitas com o uso do programa “MACAW program applying” e “BLOSUM62 matrix”. O nível de similaridade de cada posição está designada pelo seguinte código de cores: **vermelho**, > 90%; **azul claro**, 50 a 90%; **azul escuro**, 10 a 49% e **branco**, < 10% de similaridade.

Na figura estão indicados os domínios LKR e SDH que correspondem respectivamente as proteínas LYS1 e LYS9 de levedura. A única região interdomínio presente no polipeptídeo bifuncional de plantas também está indicada. Os espaços em branco indicam seqüências e “gaps” introduzidas para maximizar a homologia. Nomenclatura e número de acesso são: SCLYS1, *Saccharomyces cerevisiae* (P38998); CALYS1, *Candida albicans* (P43065); YLLYS1, *Yarrowia lipolytica* (P38997); ZMAYS, *Zea mays* (AF003551); ATH, *Arabidopsis thaliana* (U95759); CEL, *Caenorhabditis elegans* (AF038615); MUS, *Mus musculus* (AJ 224761); SCLYS9, *S. cerevisiae* (P38999) e SZLYS9, *Schizosaccharomyces pombe* (AL022244).

proteína de milho e as proteínas camundongo e *C. elegans* também são encontradas (42% e 46 %, respectivamente).

O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da LKR/SDH de milho com a sequência da proteína de *Arabidopsis* revelou uma homologia em torno de 66% (Figura 20). Considerando-se os três domínios da proteína LKR/SDH (domínio LKR, região interdomínio e domínio SDH) e se comparando o resultado do alinhamento das sequências deduzidas de milho e *Arabidopsis* são encontrados valores significativamente diferentes para cada região. Assim, na região do domínio LKR a homologia entre as sequências aproxima-se de 73 %. Na região definida como interdomínio essa homologia cai para 58% e na região do domínio SDH a homologia entre as duas sequências é de 60%.

Como no gene da LKR/SDH de *Arabidopsis thaliana*, o gene de milho codifica uma proteína que não possui na sequência N-terminal peptídeos de trânsito para mitocôndria ou plastídeos, pois difere em pelo menos três posições importantes descritas por Von Heijne *et al.*, 1989 para genes de plantas. O segundo aminoácido não é uma alanina e são encontrados aminoácidos carregados nos primeiros 10 resíduos (Glu-7 e Asp-10). Além disso em sequências de aminoácidos que se caracterizam como peptídeos sinais de várias organelas os níveis de serina encontram-se em torno de 20 % e na sequência deduzida de milho os primeiros 100 aminoácidos não são ricos em serina (somente cerca de 5%).

4. Número de genes no genoma do milho

Para determinar o número de genes da LKR/SDH no genoma do milho e em cereais filogeneticamente próximos como *Coix* e sorgo foi realizada uma análise por “Southern blot”. Quando a membrana contendo DNA genômico de milho, *Coix* e sorgo digeridos com *Bam* HI e *Eco* RV foi hibridizada sob condições de alta estringência com o fragmento de DNA de 1.2 kb obtido por RT-PCR, que corresponde a região central do cDNA, uma única banda foi detectada em cada canaleta.

A hibridização do DNA genômico de milho digerido com as enzima *Bam* HI mostrou uma banda com aproximadamente 8.0 kb e na digestão do DNA genômico de milho com *Eco* RV uma banda com 9.0 kb é visualizada. De acordo com o mapa de restrição essas bandas são as esperadas (Figura 21).

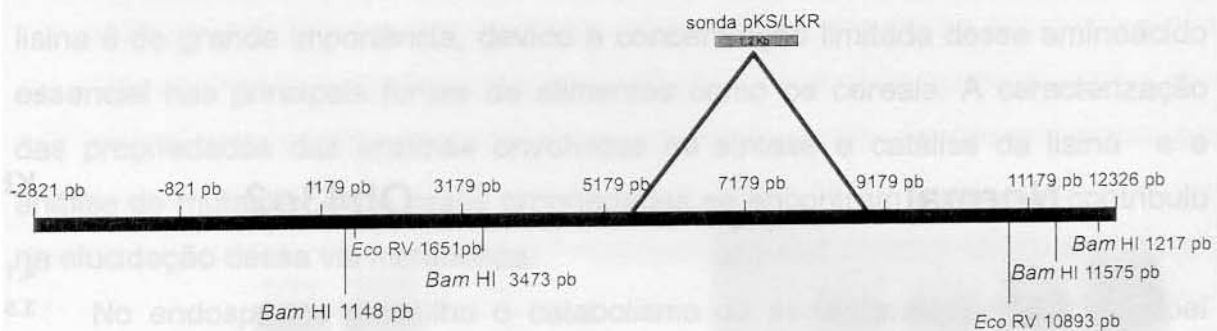
5. Análise da expressão temporal

Quando o RNA total extraído dos endospermas de milho normal e opaco2 em diferentes estágios de desenvolvimento foi hibridizado com a sonda LKR 1.2 Kb, foi verificada a presença de várias bandas com tamanho entre 1.5 Kb e 4.1 Kb (Figura 22). O transcrito de 3.5 Kb corresponde a maioria absoluta do total de transcritos e condiz com o tamanho do mRNA predito pela sequência do clone genômico. Os outros transcritos provavelmente se originaram de transcrições alternativas do mesmo gene da LKR/SDH existente no genoma do milho.

Pela análise da Figura 22, verificou-se que o pico da expressão do gene para o milho normal é de 15 DAP, decaindo nos estágios subsequentes do desenvolvimento. A 35 DAP a expressão do gene é nula. No milho opaco2 o pico da expressão é de 20 DAP e assim como no milho normal a expressão do gene decai durante o desenvolvimento, sendo nula a 35 DAP. No entanto, a 20 DAP o nível de expressão no mutante é bastante reduzida quando comparado com o nível de expressão do milho normal.

A)

LKR/SDH



B)

Bam HI *Eco* RV
maize coix sorgum maize coix sorgum

Kb

9.0
8.0

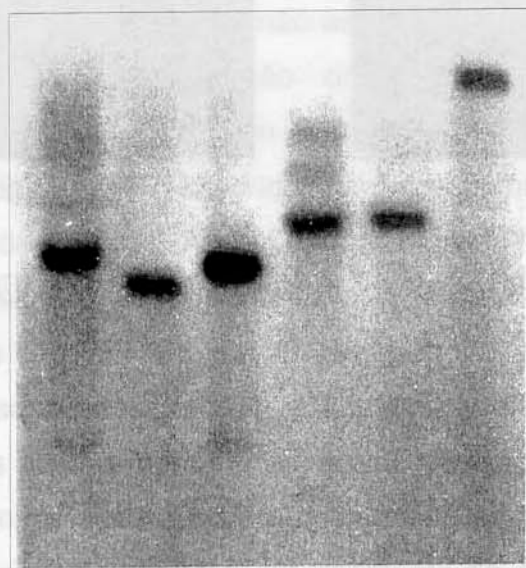


Figura 21. Em A é apresentado o padrão de restrição do clone genômico da enzima LKR/SDH de milho com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RV. Na figura a região delimitada corresponde a extensão do clone genômico abrangida pela sonda LKR 1.2 Kb. Em B, "Southern blot" de DNA genômico de milho, coix e sorgo. Dez microgramas de DNA genômico foram digeridos com as enzimas indicadas acima e separados em gel de agarose, transferidos para uma membrana e hibridizados sob condições de alta estrigência com a sonda de 1.2 Kb do plasmídeo pKS/LKR. Os números à esquerda representam o padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb - Gibco BRL).

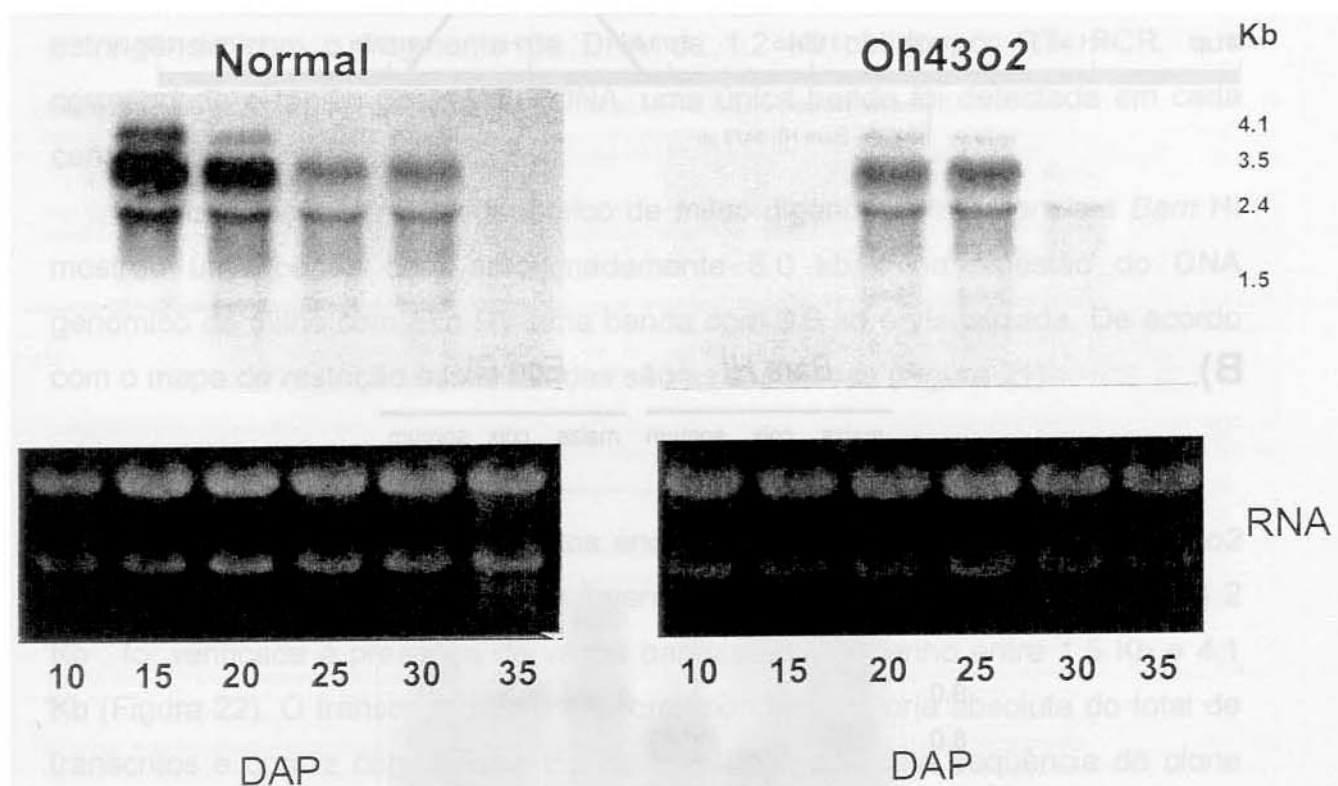


Figura 22. Quinze microgramas de RNA total de milho normal e opaco2 (Oh43o2) foram fracionados em gel de agarose a 1.5% contendo formaldeído a 0.66 M, transferidos para membrana da "nylon" e hibridizados com a sonda LKR 1.2 Kb. O padrão de peso molecular foi visualizado pela adição de brometo de etídio ao gel. À direita estão representados estes padrões.

Discussão

O estudo e a compreensão da via metabólica de síntese e degradação da lisina é de grande importância, devido a concentração limitada desse aminoácido essencial nas principais fontes de alimentos como os cereais. A caracterização das propriedades das enzimas envolvidas na síntese e catálise da lisina e a análise de mutantes onde essas propriedades se encontram alteradas, contribuiu na elucidação dessa via metabólica.

No endosperma de milho o catabolismo da lisina desempenha um papel importante no mecanismo de controle nos níveis de lisina livre (Arruda and Silva, 1979; Silva and Arruda, 1979). Estudos prévios mostraram que esse aminoácido é catabolizado em plantas pela via da sacaropina (Moller, 1976; Arruda and Silva, 1979; Silva and Arruda, 1979; Bryan 1980; Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996) cujas enzimas chaves são a LKR e a SDH. Entretanto os mecanismos moleculares da regulação do catabolismo de lisina ainda não estão claramente elucidados. Assim sendo, para uma melhor compreensão desses mecanismos moleculares envolvidos no catabolismo da lisina em plantas superiores, nós isolamos e caracterizamos o gene da LKR/SDH de endosperma de milho.

A posse de um clone de cDNA da LKR/SDH de milho (Cord Neto *et al.*, 1999) em nosso laboratório serviu de ponto de partida para o isolamento do clone genômico. A análise da sequência desse cDNA permite a identificação de dois domínios (LKR e SDH) separados por uma região intermediária, cuja função ainda não está definida. Essa análise permitiu a escolha de fragmentos ideais para a seleção do clone genômico. Assim, um fragmento de 522 pb correspondente ao domínio LKR do cDNA (sonda YAFF) e outro fragmento de 720 pb correspondente à região SDH do cDNA (sonda SDHend) foram utilizados no isolamento e caracterização inicial do clone genômico.

A utilização de dois fragmentos como sondas para o isolamento do gene da LKR/SDH deve-se à presença de dois domínios na proteína e principalmente devido ao tamanho esperado do clone genômico. A análise do tamanho da sequência do clone de cDNA da enzima de milho e a análise da estrutura dos clones genômico e de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, sugere que o gene em milho

apresentaria um tamanho ao redor de 12 Kb. Assim para se garantir o isolamento de um clone completo da LKR/SDH de milho, utilizamos como sonda o fragmento correspondente ao domínio LKR (sonda YAFF) durante a seleção do clone da enzima em banco genômico. Em seguida os clones isolados foram analisados por digestões com enzimas de restrição, caracterizados e divididos em 12 grupos. Um clone de cada grupo (λ M YAFF I a λ M YAFF XII) foi analisado através da hibridização das membranas obtidas por “Southern blot” com os fragmentos correspondentes aos domínios LKR e SDH (sonda SDHend).

A análise do padrão de hibridização desses clones com as duas sondas (Figuras 12 e 13) mostra que somente 6 dos 12 clones analisados apresentam o domínio SDH. Além disso, os resultados obtidos permitiram a identificação de 3 clones caracterizados como falsos positivos. O DNA destes clones contido nas membranas não se hibridizam com nenhuma das sondas utilizadas no experimento. O isolamento de clones falsos positivos deve-se a presença nesses clones de seqüências similares a seqüências do fragmento utilizado como sonda durante o processo de seleção na biblioteca genômica.

A garantia de se trabalhar com clones inteiros do gene da LKR/SDH evitou seqüenciamentos desnecessários. Assim, a análise do padrão de hibridização dos clones com as duas sondas foi fundamental para a escolha dos clones que certamente resolveriam a seqüência do gene da LKR/SDH.

Os dois clones genômicos (λ M YAFF VI e λ M YAFF IX) seqüenciados pela estratégia de sub-bibliotecas randômicas (“shotgun”) resolveram com alta qualidade a seqüência completa do gene da LKR/SDH. A seqüência de 15137 pb resolvida contém 10720 pb da seqüência correspondente à proteína traduzida, 2821 pb da região 5' não traduzida e 1596 pb da região 3' não traduzida. O alinhamento da seqüência genômica com o clone de cDNA revelou a presença de 26 exons e 25 introns. Todos os introns são flanqueados por uma região de seqüências conservadas denominadas “splice junction sequence” (Brown, 1986). A Tabela 1 traz a lista dos introns presentes no clone genômico da LKR/SDH e apresenta as seqüências que delimitam as junções exon/intron. A Tabela 1 traz também informações sobre a porcentagem (%) de A+T nos introns. Todos os introns são

ricos em seu conteúdo A+T. Nos genes de planta os altos níveis de A+T parece ser característica fundamental para o reconhecimento dos introns e processamento do RNA pela maquinaria celular (Wiebauer, 1988).

Na porção 3' não traduzida do gene é encontrado o sinal de poliadenilação que se localiza a 103 pb abaixo da sequência de terminação da tradução. Sabe-se que o processamento da região terminal 3' da molécula de mRNA pode exercer um papel importante na regulação da expressão gênica, estimulando o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma (Eckner *et al.*, 1991). O processamento da região 3' também influencia a estabilidade (Birnstiel *et al.*, 1985) e a tradução da molécula de mRNA (Jackson and Standart, 1990). Apesar da importância do processamento da região 3', os mecanismos envolvidos no processamento desta região da molécula de mRNA nuclear de plantas ainda não estão bem definidos.

Com a utilização do programa Maltinspector (Quandt *et al.*, 1995) foi possível encontrar na região promotora do gene possíveis sítios envolvidos na regulação de sua expressão (Figura 15). O elemento TATA presente na região promotora do gene da LKR/SDH apresenta baixa similaridade com a sequência canônica descrita para o elemento em eucariotos (Bucher, 1990). O elemento TATA assemelha-se ao "Pribnow box" dos procariotos e localiza-se normalmente entre 20 e 36 pb a montante do início da transcrição. Estudos com mutantes (Kuhlemeier *et al.*, 1987) mostraram que é no domínio TATA box ou em sequências funcionalmente relacionadas que a RNA polimerase se liga determinando o início da transcrição a cerca de 30 pb abaixo do consenso TATA.

O elemento CCAAT posicionado a -76 pb do início da transcrição é uma sequência descrita em vários genes de cereais. A necessidade de um elemento CCAAT nos promotores eucariotos não está totalmente clara. Evidências apontam que este elemento esteja envolvido com a modulação nos níveis de transcrição dos genes.

A -131 pb do início da transcrição do gene da LKR/SDH há uma sequência de DNA semelhante àquela encontrada em genes de levedura. Este domínio se caracteriza como um sítio de ligação do fator de transcrição GCN4.

O fator GCN4 é um dos mais bem caracterizados fatores de regulação da transcrição de eucariotos e assim como o fator O2 de plantas se caracteriza como uma bZIP. A proteína GCN4 é um dos fatores determinantes do mecanismo regulador em leveduras denominado "General Control of Nitrogen". Neste sistema, a proteína GCN4 ativa a transcrição de um grande número de genes relacionados a vias biossintéticas de aminoácidos (Hinnebusch, 1988). O fator O2, por sua vez, regula a síntese de proteínas de reserva no endosperma e controla a disponibilidade de carbono durante o desenvolvimento da semente (Giroux *et al.*, 1994; Gallusci *et al.*, 1996).

Além de estruturalmente similares, O2 e GCN4 são funcionalmente relacionadas. A transfecção de um vetor expressando a proteína O2 de milho foi capaz de complementar a mutação *gcn4* de levedura. Isto porquê O2 é capaz de se ligar às mesmas seqüências normalmente reconhecidas pela GCN4 (Mauri *et al.*, 1993). Este fato reforça ainda mais a analogia entre os sistemas regulados por GCN4 e O2, sugerindo um provável envolvimento da proteína O2 na regulação de vias metabólicas de aminoácidos no endosperma de milho.

É ainda interessante notar que em leveduras a via biossintética da lisina apresenta analogias com a via de degradação desse aminoácido em plantas. Em levedura o α -aminoadipato (AASA) é um intermediário da via de síntese da lisina e age juntamente com o fator GCN4 na indução da expressão de pelo menos quatro genes desta via: *LYS1*, *LYS2*, *LYS5* e *LYS9*. O produto dos genes *LYS1* e *LYS9* têm analogia funcional com as enzimas LKR e SDH da via do catabolismo em milho. Em levedura o mecanismo de indução é mediado pela proteína regulatória *LYS14*, que se caracteriza como uma proteína da classe "zinc finger" (Feller *et al.*, 1994). Atualmente, frente as analogias entre os sistemas regulados pelos fatores GCN4 e O2, especula-se sobre o papel do α -aminoadipato na ativação do gene da LKR/SDH e sobre a possível existência de uma proteínas do tipo *LYS14* em plantas.

Estudos realizados por Müller e Knudsen (1993) sugeriram a existência de uma família de fatores de transcrição funcionalmente homólogos que se ligariam a motivos "GCN4-like", mediando a resposta ao nitrogênio em plantas. Foi

constatada que uma relação extensa de genes de plantas possuem tais elementos em diversos graus de similaridade e muitos com comprovada atividade no controle da expressão gênica. A proteína Opaco 2, por sua vez, é capaz de regular diversos genes de plantas através da interação com elementos *in cis* do tipo “GCN4-like” (TGA^G/cTC). Entre estes genes constam aqueles que codificam uma α -coixina (Yunes *et al.*, 1994), uma glutelina de baixo peso molecular em trigo (Holsworth *et al.*, 1995), a albumina b-32 de milho (Bass *et al.*, 1992), ortofosfato diquinase citossólica (Maddaloni *et al.*, 1996) e lectina de ervilha (de Pater *et al.*, 1994).

No endosperma de milho, a produção coordenada da enzima LKR/SDH com os níveis de zeína no endosperma em desenvolvimento e a redução no número de unidades da enzima LKR nos mutantes *o2* (Brochetto-Braga *et al.*, 1992), são evidências de que o gene *o2*, que é um transativador de zeínas (Schmidt *et al.*, 1992), está envolvido na regulação do gene da LKR/SDH no endosperma de milho.

O elemento G-box presente na posição -374 da região promotora do gene reforça ainda mais as evidências do possível envolvimento do fator O2 na ativação transcricional do gene da LKR/SDH. A sequência denominada G-box está envolvida na ativação transcricional de genes mediada por proteínas bZIP em diversos processos fisiológicos (Katagari and Chua, 1992). Estudos com o promotor da β -faseolina demonstraram que a presença do motivo G-box, existente nesta região, é imprescindível para a obtenção de altos níveis de expressão deste promotor em sementes de tabaco (Bustos *et al.*, 1989; Burow *et al.*, 1992). Por outro lado, a análise de deleção do promotor do gene *o2* de *Coix* mostra que a remoção da região que contém o G-box causa a completa inativação do promotor (Vettore *et al.*, 1998).

Em ensaios de EMSA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”) a proteína O2 mostrou alta afinidade por seqüências contendo o motivo central ACGT (Izawa *et al.*, 1993). Promotores dos genes da β -coixina e β -zeína, por exemplo, estão sob o controle da proteína O2 que interage com o motivo ACGT (Cord Neto *et al.*, 1995). No entanto, Muth *et al.*, (1996) mostraram que a proteína O2 é capaz de

reconhecer três sítios no promotor da α -zeína de 22 kDa, sendo que a maior afinidade de ligação se dá com o domínio que possui o consenso central 'ACGT'. Isso é uma clara evidência de que a proteína O2 tolera uma relativa degeneração em sua sequência consenso (GATGAPyPuTGpu).

No gene da LKR/SDH a sequência 5'-TGCC**ACG**TCGCC-3' na região promotora (G-box), sugere um provável reconhecimento desse sítio pela proteína O2, concordando com as evidências de uma possível regulação dos níveis da LKR pelo fator O2 no endosperma de milho (Brochetto-Braga *et al.*, 1992).

A presença de múltiplas sequências regulatórias *cis* no promotor dos genes de eucariotos vem sendo extensivamente documentada. Evidências sugerem que essas sequências podem estar envolvidas numa ativação transcricional cooperativa (Toniatti *et al.*, 1990). Neste contexto, a presença dos domínios "GCN4-like" e G-box no promotor da LKR/SDH sugere um mecanismo de ativação transcricional cooperativo e altamente regulado pelo fator O2. Yunes *et al.* (1998) demonstraram através de ensaios de "Footprinting" Quantitativo e de expressão transitória em protoplastos de tabaco que a proteína O2 interage com dois sítios adjacentes presentes no promotor de α -coixina através de ligação cooperativa de dois dímeros da proteína. Estudos futuros elucidarão precisamente os mecanismos envolvidos na regulação do gene da LKR/SDH.

Para uma melhor análise estrutural do clone genômico da LKR/SDH de milho foram feitas comparações com o clone genômico de *Arabidopsis thaliana* (Falco *et al.*, 1997). A comparação das sequências de DNA desses clones revelou características comuns. Apesar do gene de milho ter um exon e um intron a mais que o gene de *Arabidopsis* (26 exons e 25 introns no gene de milho e 25 exons e 24 introns no gene de *Arabidopsis*), o posicionamento da maioria dos introns é idêntico, embora a sequência dos mesmos não sejam conservadas. O intron número 2 presente na estrutura do clone de milho não encontra seu análogo estrutural na sequência do clone de *Arabidopsis*. A Figura 17 traz uma representação esquemática e comparativa do posicionamento dos introns no gene da LKR/SDH nessas duas espécies e a Tabela 2 apresenta o tamanho (pb) dos introns e exons presentes nesses genes. Pela análise da figura e dos dados

apresentados na Tabela 2 é constatado uma grande diferença no tamanho dos introns dos clones de milho e *Arabidopsis*. Os introns do clone de *Arabidopsis* variam de 68 a 352 pb e concordam com o tamanho dos introns da maioria dos genes de *Arabidopsis*. No clone de milho os introns variam de 85 a 1028 pb. A maior variação no tamanho dos introns do gene de milho se deve ao próprio processo evolutivo de diferenciação dessas duas espécies.

Nos eucariotos superiores 90% da sequência de nucleotídeos correspondem a introns. Especulações sobre a origem e as funções dos introns são comumente discutidas há vários anos. Alguns autores defendem o posicionamento de que os introns são remanescentes do material genético original (Darnell and Doolittle, 1986; Gilbert, 1987), outros autores se posicionam na defesa de que os introns foram introduzidos durante a evolução (Orgel and Crick, 1980; Dobb and Newman, 1989; Rogers, 1989). Diversos modelos matemáticos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de se chegar a um consenso sobre a verdadeira origem dos introns. Todos os modelos procuram correlações com forças evolutivas.

Segundo Doebley e White (1998) o genoma do milho é considerado dinâmico e a inserção de transposons nas regiões intergênicas e nos introns pode acarretar poucas consequências para a planta, pelo fato de não haver alterações de sequências traduzíveis. Entretanto, essas inserções contribuem com a amplificação do genoma do milho. Por outro lado a inserção de pequenos transposons conhecidos como *MITEs* ("miniature inverted repeated transposons") em regiões regulatórias, sugere um importante mecanismo de evolução da expressão do gene.

Independentemente de qual seja a verdadeira origem dos introns presentes nas estruturas gênicas, o gene da LKR/SDH de milho possui introns maiores que aqueles presentes na estrutura do gene de *Arabidopsis*.

Pela análise da Figura 17 e dos dados apresentados na Tabela 2 é observada ainda uma correlação entre os tamanhos das sequências dos exons nos clones de milho e *Arabidopsis*. Os exons nesses clones apresentam em geral similaridades. As maiores diferenças estão nos exons 1, 2 e 3 de milho que são totalmente discrepantes dos exons de *Arabidopsis*. A Figura 17 deixa evidente que

essas diferenças entre os exons de milho e *Arabidopsis* recaem sobre a região em que há um intron a mais na estrutura do clone de milho. No entanto, a somatória dos nucleotídeos desses três exons do clone de milho (462 nucleotídeos), aproxima-se relativamente do valor obtido com a somatória dos dois primeiros exons do gene de *Arabidopsis* (394 nucleotídeos). Pela análise dos dados observa-se uma conservação no padrão exibido pelos exons no gene da LKR/SDH das duas espécies, sugerindo que as seqüências de DNA fundamentais à função do gene são evolucionariamente conservadas.

Por outro lado, a análise da estrutura do promotor dos genes da LKR/SDH de milho e *Arabidopsis* apresentou características próprias em cada um dos genes. Em *Arabidopsis* a região promotora apresenta somente os sítios TATA e CCAAT (Falco *et al.*, 1997). Além dos domínios presentes na região promotora do gene de *Arabidopsis*, na estrutura do gene de milho são encontrados os domínios “GCN4-like” e o G-box. Estes dados sugerem a existência de mecanismos particulares no controle da regulação da expressão de cada um dos genes.

A análise das seqüências das proteínas de milho e *Arabidopsis* mostram características interessantes. Um provável “EF-hand-like” é encontrado na região carboxi-terminal da região LKR. Os domínios “EF-hands” são sítios de ligação de Ca^{2+} . Como foi demonstrado recentemente o Ca^{2+} promove a dimerização da calmodulina (Lafitte *et al.*, 1999), o que sugere que o Ca^{2+} possa ter uma função mais importante na dimerização da proteína. Esses domínios na estrutura da proteína sugere também uma provável modulação e ativação da mesma. Estudos evidenciam que a enzima LKR de milho é ativada por altas concentrações de Ca^{2+} (Kemper *et al.*, 1998).

A análise e a comparação da seqüência da proteína deduzida do clone genômico da LKR/SDH de milho com as proteínas deduzidas de outras espécies apresenta características relevantes. As enzimas de milho, *Arabidopsis*, *C.elegans* e *M. musculus* são bifuncionais e as enzimas de levedura são monofuncionais. Como ilustrado na Figura 19, a seqüência de aminoácidos dessas enzimas apresentam similaridades significativas. No entanto, diferenças importantes são encontradas entre os polipeptídeos bifuncionais da LKR/SDH de plantas e

animais. Primeiro, enquanto a enzima de milho é expressa no citossol (Falco *et al.*, 1997; Cord Neto *et al.*, 1999; Figura 2 b), a proteína de mamíferos é encontrada na matriz mitocondrial (Blemings *et al.*, 1994) e em extratos de frações mitocondriais (Markovitz *et al.*, 1984; Ameen *et al.*, 1987). Outra característica que diverge a proteína de planta da proteína de animal é a ausência da região interdomínio na enzima de animal. Estudos de proteólise limitada com a enzima de milho sugerem que a região interdomínio possa estar envolvida com a modulação da atividade da LKR (Kemper *et al.*, 1998).

A caracterização bioquímica da enzima (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996) evidenciou a presença de um único polipeptídeo de 125 kDa. Com a clonagem do gene da LKR/SDH de milho, o número de genes da enzima no genoma do milho foi determinado através de experimentos de “Southern blot”. Para se uniformizar os resultados obtidos, DNA do milho híbrido F352 foi utilizado neste experimento. O milho híbrido F352 foi utilizado no isolamento do clone de cDNA .

A hibridização da sonda LKR 1.2 Kb, correspondente à região central do gene da LKR/SDH, com DNA genômico de milho, Coix e sorgo previamente digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RV demonstrou a presença de uma única banda em cada uma das digestões. Este resultado sugere que na tribo Andropogoneae o gene se encontra como cópia única.

A análise do mapa de restrição do clone genômico da LKR/SDH com *Bam* HI e *Eco* RV e a comparação dos dados com o padrão de hibridização do DNA genômico de milho digerido com essas mesmas enzimas (Figura 21) confirma a presença de um único gene no genoma de milho.

Experimentos de “Northern blot” com RNA de endosperma normal e endosperma opaco2 de milho demonstraram que a 20 DAP a mutação o2 causa uma redução de 90% nos níveis de mRNA. Os resultados obtidos corroboram os dados de que o número de unidades da enzima é reduzida de 2 a 3 vezes no endosperma opaco em relação ao número de unidades no endosperma normal. (Brochetto-Braga *et al.*, 1992).

Esta severa redução causada pela mutação o2 no acúmulo de mRNAs da LKR/SDH é comparável a redução observada na expressão de α -zeínas (Cord

Neto *et al.*, 1995). Estes dados corroboram a existência de um sistema coordenado entre padrão de atividade da enzima LKR/SDH com a taxa de deposição de zeínas (Brochetto-Braga *et al.*, 1992) e concordam com a hipótese de que a diminuição no catabolismo de lisina no endosperma *opaco2* é um dos principais responsáveis pelo aumento dos níveis desse aminoácido no endosperma.

Dentro do contexto de regulação coordenada de síntese de zeínas e aumento da expressão e atividade de gene da LKR/SDH, estudos futuros com o clone genômico da enzima possibilitarão a dissecação dos mecanismos que controlam a regulação a nível transcricional e funcional do gene.

Conclusões

1. O clone genômico da LKR/SDH de milho foi isolado e 15147 pb foram seqüenciados. A seqüência inclui 10720 pb da seqüência correspondente à proteína traduzida, 2801 pb da região 5' não traduzida e 1596 pb da região 3' não traduzida.
2. Na região flanqueadora 5' do gene da LKR/SDH de milho foram identificadas seqüências consenso de possíveis domínios, envolvidos na regulação da expressão gênica: um TATA box, um elemento CCAAT, um domínio similar ao sítio de ligação ao fator de transcrição de leveduras GCN4 e um G-box. A 103 pb do códon de terminação é encontrado um possível sinal de poliadenilação.
3. A comparação da seqüência do clone genômico da LKR/SDH de milho com o clone de *Arabidopsis* revelou a presença de um intron a mais na estrutura do gene de milho. No entanto, as seqüência de DNA possivelmente críticas à função do gene são evolucionariamente conservadas.
4. A seqüência de aminoácidos deduzida do clone genômico da LKR/SDH de milho apresenta similaridades significativas com a seqüência das proteína monofuncionais ou bifuncionais da LKR/SDH de outras espécies
5. A presença de um domínio G-box na região promotora do gene da LKR/SDH reforça as evidências de que a degradação da lisina esteja sob controle do locus O2.
6. O gene está presente como cópia simples nos genomas do milho e dos seus cereais relacionados, *coix* e sorgo.
7. Os níveis de mRNA da enzima LKR/SDH são afetados negativamente pela mutação o2.

8. O padrão de expressão do gene da LKR/SDH é retardado aproximadamente 5 dias no endosperma mutante em relação ao normal.

9. A transcrição do gene da LKR/SDH produz cinco tipos de transcritos, um mais abundante que codifica a proteína de 125 kDa. Os outros quatro transcritos alternativos possivelmente não são traduzidos.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F., Gish, W., Millar, W., Myers, E.W and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Ameen, M., Palmer, T. and Oberholzer, V.G. (1987). Inhibition of bovine liver lysine-ketoglutarate reductase by urea cycle metabolites and saccharopine. *Biochem. Intl.* **14**: 589-595.
- Abelson, P.H., Bolton, E.T. and Aldous, E. (1952). Utilization of carbon dioxide in the synthesis of proteins by *Escherichia coli* II. *J. Biol. Chem.* **198**: 173-178.
- Arruda, P., & Silva, W. (1979). Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry* **18**: 409-410.
- Arruda, P., Sodek, L. and da Silva, W.J. (1982). Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* **69**: 988-989.
- Arruda, P., and da Silva, W.J. (1983). Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize. It's possible role on lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* **22**: 2687-2689.
- Arruda, P., Cord Neto, G., and Gonçalves-Butruille, M. (1994). Lysine catabolism and the regulation of lysine accumulation in maize endosperm. In Larkins, B.A. and Mertz, E., eds. *Quality protein Maize: 1964-1994. Proceedings of International Symposium on Quality Protein Maize*, Sete Lagoas, Brasil. Sasakawa Global 2000-Mozambique. Pp. 175-184.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidmen, J.G., Smith, J.A. and Strul, K. (eds). (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Azevedo, R.A., Arana, J.L., and Arruda, P. (1990). Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*1* with *opaque-2* maize mutant. *Plant Science* **70**: 81-90.
- Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.P. and Lea, P.J. (1997). The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **46**: 395-419.
- Azevedo, R.A., Smith, R.J., Lea, P.J. (1992). Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of treonine sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* **31**: 3371-3374.
- Bass, H.W., Webster, C., Obrain, G.R., Roberts, J.K.M., and Boston, R.S. (1992). A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell.* **4**: 225-234.
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M. and Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* **41**: 349-359.
- Blemings, K.P., Crenshaw, T.D., Swick, R.W. and Benevenga, N.J. (1994). Lysine- α -ketoglutarate reductase and Saccharopine dehydrogenase are located only in the mitochondrial matrix in rat liver. *J. Nutr.* **124**: 1215-1221.
- Brandt, A.B. (1975) In vivo incorporation of lysine-C¹⁴ into the endosperm of wild type and high lysine barley. *FEBS Lett.* **52**: 288-291.

- Bright, S.W.J., Mifflin B.J. and Rognes, S.E.** (1982). Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. *Biochem. Genet.* **20**: 229-243.
- Brochetto-Braga, M.R., Leite, A., and Arruda, P.** (1992). Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate in normal and opaque-2 maize endosperm. *Plant Physiol.* **98**: 1139-1147.
- Bryan, J.K.** (1980). In: *The Biochemistry of Plants*, Vol 5 (Mifflin, B.J., ed.). New York: Academic Press, pp. 403-452.
- Brown, J.W.S.** (1986). A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucl. Acid. Res.* **14**: 9548-9559.
- Bucher, P.** (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212**: 563-578.
- Burr, B. and Burr, F.A.** (1982). Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: comparison of zein polypeptides, in vitro synthesis and processing, mRNA levels, and genomic organization. *J. Cell Biology* **94**: 201-206.
- Burrow, M.D., Sen, P., Chian, C.A. and Muari, N.** (1992). Developmental control of β -phaseolin genes requires positive, negative and temporal seed-specific transcriptional regulatory elements and a negative element for stem and root expression. *Plant J.* **2**: 537-548.
- Bustos, M.M., Guiltinan, M.J., Jordano, J., Begum, D., Kalkan, F.A. and Hall, T.C.** (1989). Regulation of β -glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, cis-acting sequence found upstream of a french bean β -phaseolin gene. *Plant Cell* **1**: 839-853.
- Cohen, G.N. and Hirsch, M.L.** (1954). Threonine synthase, a system synthesizing L-threonine from L-homoserine. *J. Bacteriol.* **67**: 182-190.
- Cord Neto, G., Kemper, E.L., Papes, F., Moraes, K.C.M., Leite, A., and Arruda, P.** (1999). The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. Submitted.
- Cord Neto, G., Yunes, J.A., Silva, M.J. da, Vettore, A.L., Arruda, P. and Leite, A.** (1995). The involvement of Opaque-2 on β -prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1015-1029.
- Dalby, A. and Tsai, Y.** (1975). Comparison of lysine and zein and non-zein protein contents in immature and mature maize mutants. *Crop Sci.* **15**: 513-515.
- Darnell, J.E. and Doolittle, W.F.** (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 1271-1275.
- Datta, P and Gest, H.** (1964). Alternative patterns of end product control in biosynthesis of amino acids of the aspartic family. *Nature* **203**: 1259-1261.
- De Pater, S., Katagiri, F., Kijne, J., Chua, N-H.** (1994). BZIP proteins binding to a palindromic sequence without a ACGT core located in a seed specific element of the pea lectin promoter. *Plant J.* **6**: 133-140.

- Dibb, N.J. and Newman, A.J.** (1989). Evidence that introns arose at proto-splice sites. *EMBO J.* **8**: 2015-2021.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corse, P., Chambon, P.** (1982). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **112**: 295-298.
- Dobley, J. and White, S.** (1998). Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends in Genetics* **14**: 327-332.
- Eckner, R., Ellmeier, W. and Birnstiel, M.L.** (1991). Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleous. *EMBO J.* **10**: 3515-3522..
- Esen, A.** (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize in three fractions by differential solubility. *Plant Physiology* **80**: 623-627.
- Falco, S.C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T. and Webb, P.** (1995). Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* **13**: 577-582.
- Falco, S.C., Epelbaum, S. and McDevitt, R.** (1997). Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. *Plant Mol. Biol.* **35**: 735-748.
- Feller, A., Dubois, E., Ramos, F. and Piérard, A.** (1994). Repression of the genes for lysine biosynthesis in *Saccaromyces cereviseae* is caused by limitation of Lys14-dependent transcriptional activation. *Mol. Cel. Biol.* **14**: 6411-6418.
- Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day III, R.S. and Peterson, M.C.** (1988). Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* **10**: 5-7.
- Frankard, V., Vauterin, M. and Jacobs, M.** (1997). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. *Plant Molecular Biol.* **34**: 233-242.
- Frisch, D.A., Tommey, A. M., Gengenbach, B.G. and Somers, D.A.** (1991). Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydropicolinate synthase in a *Escherichia coli* *dapA* auxotroph. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 287-293.
- Fujioka, M., Takata, Y., Ogawa, H. and Okamoto, M.** (1980). The inactivation of saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming) by diethyl pyrocarbonate. *J. Biol. Chem.* **255**: 937-942.
- Fujioka, M. and Takata, Y.** (1981). Role of arginine in saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming) from baker's yeast. *Biochemistry* **20**: 468-472.
- Gaillardin, G., Poirier, L., Ribet, A. M. and Heslot, H.** (1979). General and lysine specific control of saccharopine dehydrogenase level in the yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Biochimie.* **61**: 473-482.
- Galili, G.** (1995). Regulation of lysine and threonine synthesis. *The Plant Cell* **7**: 899-906.
- Gallusci, P., Salamini, F. and Thompson, R.D.** (1994). Differences in cell type-specific expression of the gene Opaque-2 in maize and transgenic tobacco. *Mol Gen. Genet.* **244**: 391-400.

- Gallusci, P., Varott, S., Matsuoko, M., Maddaloni, M., e Thompson, R. D.** (1996). Regulation of cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase expression in developing maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **31**: 45-55
- Gengenbach, B.G., Walter, T.J., Green, L.E, and Hibberd, K.A.** (1978). Feedback regulation of lysine, threonine and methionine biosynthetic enzyme in corn. *Crop Science* **18**: 472-476.
- Gonçalves-Butruille, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A. and Arruda, P.** (1996). Purification and characterization of a bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase/sacharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* **110**: 765-771.
- Ghislain, M., Frankard, V. and Jacobs, M.** (1995). A dinucleotide mutation in dihydropicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J.* **8**: 733-743.
- Ghislain, M., Frankard, V., Vandenbosche, D., Matthews, B.J. and Jacobs, M.** (1994). Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **24**: 835-851.
- Gilbert, W.** (1987). The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 901-905.
- Giroux, M.J., Boyer, C. Feix, G. and Hannah, C.** (1994). Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in maize endosperm. *Plant Physiol.* **106**: 713-722.
- Hanahan, D.** (1983). Estudios on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557.
- Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Motto, M., Salamini, F. and Thompson, R.** (1989). The O2 gene wich regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J.* **8**: 2795-2801.
- Henk, R.R. and Wahnbaeck, R.** (1977). β -Aspartokinase from developing endosperm of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 38-45.
- Hibberd, K.A., and 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.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M.** (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**: 151-153.
- Hinnebush, A.G.** (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino biosynthesis in *Saccharomyces cereviseae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
- Holdsworth, M., Munõz-Blanco, J., Hammond-Kosack, M.C., Colot, V., Schuch, W. and Bevan, M.W.** (1995). The maize transcription factor Opaque-2 activates a wheat glutenin promoter in plant and yeast cells. *Plant Mol. Biol.* **29**: 711-720.
- Izawa, T., Foster, R. and Chua, N.** (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* **230**: 1131-1144.
- Jackson, R.J. and Standart, N.** (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation ? *Cell* **62**: 15-24.

- Jones, E.E. and Bronquist, H.P.** (1965). Saccharopine, as intermediate of aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. II. Studies in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **240**: 2531- 2536.
- Joshi, C.P.** (1987). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. Nucl. Acids Res. **15**: 9627-9640.
- Kalan, E.B. and Ceithaml, J.** (1954). Methionine biosynthesis in *Eschericia coli*. J. Bacteriol. **68**: 293-298.
- Kaneko, T., Hashimoto, T., Kumpaisal, R. and Yamada, Y.** (1990). Molecular cloning of wheat dihydropicolinate synthase. J. Biol. Chem. **265**: 17451-17455.
- Karchi, H., Shaul, O and Galili, G.** (1993). Seed specific expression of a bacterial desensitized aspartate kinase increases de production of seed threonine and methionine in transgenic tobacco. Plant J. **3**: 721- 727.
- Karchi, H., Orit, S., Galili, G.** (1994). Lysine synthesis and catabolism are cordinately regulated during tobacco seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2577-2581.
- Karchi, H., Miron, D., Bem-Yaacov, S., and Galili, G.** (1995). The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seeds require calcium and protein phosphorylation. The Palnt Cell **7**: 1963-1970.
- Katagari, F. and Chua, N.-H.** (1992). Plant transcriptional transcription activators: present knowloge and future challengers. Trends Genet. **8**: 22-27
- Kim, K., Fisher, D.K., Gao, M., Guiltinan, M.J.** (1998). Genomic organization and promoter activity of the maize starch branching enzyme I gene. Gene **216**: 233-243.
- Kemper, E.L., Cord Neto, G., Capella,A.N., Gonçalves-Butruille, M. Azevedo, R.A. and Arruda P.** (1998). Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. Eur. J. Biochem. **253**: 720-729.
- Kemper, E.L., Papes, F., da Silva, A.C., Leite, A. and Arruda, P.** (1999) The activity of lysine-oxoglutarate reductase in maize is modulated by Ca ²⁺ mediated dimerization and lysine-dependente. Submitted.
- Kuhlemeier, C., Green, P.J., Chua, N.H.** (1987). Regulation of gene expression in higher plants. Annu. Ver. Plant Physiol. **38**:221-257.
- Lafitte, D., Heck, A.J., Hill, T.J., Jumel, K., Harding, S.E. and Derrick, P.J.** (1999). Evidence of noncovalent dimerization of calmodulin. Eur. J. Biochem. **261**: (1) 337-344.
- Larkins, B.A., Pedersen, K., Marks, M.D., Wilson, D.R.** (1984). The zein proteins of maize endosperm. Trends Biochem. Sci. **9**: 306-308.
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fonzo, N., Harting, H., Salamini, F., Thompson, R.D.** (1991). The maize regulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein wich activates the transcription of the b-32 gene. EMBO J. **10**: 617-624.

Lyznik, L., Rafalski, A., Raczynska-Bojanowska, K. (1985). Amino acid metabolism in the pedicel-placento-chalazal region of the developing maize kernal. *Phytochemistry* **24**: 425-430.

Maddaloni, M., Donini, G., Balconi, C., Rizzi, E., Gallusci, P., Forlani, F., Lohmer, S., Thompson, R.D., Salamini, F., and Motto, M. (1996). The transcriptional activator Opaque-2 controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 647-654.

Markovitz, P.J., Chuang, D.T. and Cox, R.P. (1984) Familial hyperlysinemias: Purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde syntetase with LKR and SDH activities. *J. Biol. Chem.* **259**: 11643-11646.

Marocco, A., Santucci, A., Cerioli, S., Motto, M., Di Fonzo, N., Thomposon, R.D. and Salamini, F. (1991). Three high-lysine mutations control the level of ATP-binding HSP70-like proteins in the maize endosperm. *Plant Cell* **3**: 507-515.

Mauri, I., Massim, M., Lohmer, S., Motto, M., Salamini, F., Thompson, R. and Martegoni, E. (1993). Functional expression of the transcriptional activator Opaque-2 of *Zea mays* in transformed yeast. *Molecular General Genetics* **241**: 319-326.

Mc Pherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R. (1993). *PCR a Pratical Approach*. 2nd ed. IRL Press. Oxford University, England.

Mehta, S.L., Dongre, A.B., Johari, R.P., Lodha, M.L., Naik, M.S. (1979). In: *Seed protein improvement in cereals and grain legumes*, pp. 241-257. International atomic energy agency, Vienna.

Menken, A., E., Schindler, U., Casmore, A.R. (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biol Sci.* **20**: 506-510.

Mertz, E.T., Bates, L.S., Nelson, O.E. (1964). Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science* **145**: 279-280.

Misra, P.S., Mertz, E.T., Glover, D.V. (1975). Studies on corn protein. VIII. Free amino acid content of *opaque-2* double mutants. *Cereal Chem.* **52**: 844-848.

Misra, P.S. and Oaks, A. (1981). Enzymes of nitrogen assimilation during seed development in normal and high lysine mutants in maize (*Zea mays*, W64A). *Can. J. Bot.* **59**: 2735-2743.

Moller, B.L. (1976) Lysine catabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* **57**: 687-692.

Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Brembilla, M., Marotta, R., Di Fonzo, N., Soave C., Thompson, R., and Salamini, F. (1988). Molecular cloning of the *02-m5* allele of *Zea mays* during transposon marking. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 488-494.

Motto, M., Di Fonzo, N., Hartings, H., Maddaloni, M., Salamini, F., Soave, C., Thompson, R.D. (1989). In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol. 6, B.J. Mifflin, ed. (Oxford University Press), pp. 87-114.

- Muahlbauer, G.J., Gengenbach, B.G., Somers, D.A. and Donovan, C.M.** (1994). Genetic and amino-acid analysis of two maize threonine-overproduction, lysine-insensitive aspartate kinase mutants. *Theor Appl. Genet.* **89**: 767-774.
- Müller, M. and Knudsen, S.** (1993). The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J.* **4**: 343-355.
- Murphy, J.J., & Dalby, A.** (1971). Changes in the protein fraction of developing normal and *opaque-2* maize endosperm. *Cereal Chem.* **48**: 336-349.
- Muth, J.R., Müller, M., Lohmer, S. Salamini, F. and Thompson, R.D.** (1996). The role of multiple binding sites in the activation of zein gene expression by Opaque2. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 723-732.
- Nigam, S.N., McConnel W.B.** (1963). Studies on wheat plants using carbon-14 compounds. *Canad. J. Biochem. And Physiol.* **41**: 1367-1371.
- Ogawa, H., and Fujioka, M.** (1980). The reaction of pyridoxal 5'-phosphate with an essential lysine residue of saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming). *J. Biol. Chem* **255**: 7420-7425.
- Ogawa, H., Okamoto, M. and Fujioka, M.** (1979). Chemical modification of the active site sulfhydryl group of saccharopine dehydrogenase (L-lysine-forming). *J. Biol. Chem* **254**: 7030-7035.
- Orgel, L.E. and Crick, F.H.C.** (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature, Lond.* **315**: 458-459.
- Patte, J.C., Bachi, P.T. and Cohen, G.N.** (1966). The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartatekinase activities of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **128**: 426-439.
- Payne, P.I.** (1983). Breeding for protein quantity and protein quality in seed crops. *In* Daussant, J., Mossé, J. and Vaughan, J., eds, *Seed Proteins*. London, Academic Press, pp 223-253.
- Prescott, A. and Martim, C.** (1987). Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Mol. Biol. Report* **4**: 219-224.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. e Werner, T** (1995). Matland and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4878-4884.
- Ramos, F., Dubois, E. and Piérard, A.** (1988). Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthesis pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a regulatory role of gene *LYS14*. *Eur. J. Biochem.* **171**: 171-176.
- Rivin, C.J., Zimmer, E.A., Walbot, V.** (1982). Isolation of DNA and DNA recombinants from maize. *In*: Sheridan, W.F. (ed). *Maize for Biological Research*, University Press, University of North Dakota, Grand Forks. pp. 161-164.
- Rogers, J.H.** (1989). How were introns inserted into nuclear genes? *Trends Genet.* **5**: 213-216.
- Rognes, S.E., Lea, P.J. and Mifflin, B.J.** (1980). S-Adenosyl methionine _ A novel regulator of aspartate kinase. *Natur* **287**: 357-359.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.
- Schmidt, H., Bode, R. and Birnbaum, D.** (1989) Regulation of the lysine biosynthesis in *Pichia guilliermondii*. Antonie von Leeuwenhoek **56**: 337-347.
- Schmidt, R.J.** (1993). In: Control of Plant Gene Expression. Verma, D.P.S., ed.(Boca Raton, FL, USA, CRC press), pp. 337-355.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. and Burr, B.** (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the regulatory locus Opaque-2. Science. **2238**: 960-963.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J., and Burr, B.** (1990). Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to Zein DNA. Proc. Nat. Acad. Science USA **87**: 46-50.
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J., Hoschek, G.** (1992). Opaque 2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 kDa zein genes. Plant Cell **4**: 689-700.
- Shewry, P.R., and Tatham, A.S.** (1990). The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochemistry. J. **267**: 1-12.
- Silva, W.J. and Arruda, P.** (1979). Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. Phytochemistry **18**: 1803-1805.
- Singh, B.K. and Shaner, D.L** (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from the test tube to field. Plant Cell **7**: 935-944.
- Sodek, L.** (1976). Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. Phytochemistry **15**: 1903-1907.
- Sodek, L. and Wilson, C.M.** (1970). Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. Arch Biochem Biophys **140**: 29-38.
- Tang, G., Zhu-Shimoni, J.X., Amir, R., Zchori, I.B.-T. and Galili, G.** (1997). Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine sensitive enzyme of *Escherichia coli*. Plant Mol. Biol. **34**: 287-294.
- Taylor, R.K. & Benson, S.A.** (1984). A rapid small-scale procedure for isolation of λ phage DNA. Bio Techniques, May/June, 126-127.
- Toniatti, C., Demartis, A. Monaci, P. Nicosia, A., Ciliberto, G.** (1990). Synergistic transactivation of the human C- reactive promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. EMBO J. **9**: 4467-4475.
- Urrestarazu, L. A., Borell, C.W., and Bhattacharjee, J.K.** (1985). General and specific controls of lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. **9**: 341-344.
- Vauterin, M. and Jacobs, M.** (1994). Isolation of a polar *Arabidopsis thaliana* dihydropicolinate synthase cDNA clone. Plant Mol. Biol. **23**: 759-768.

- Vettore, A.L., Yunes, J.A., Cord Neto, G., da Silva, M.J., Arruda, P. and Leite, A.** (1998). The molecular and functional characterization of an *Opaque2* homologue gene from *Coix* and a new classification of a plant bZIP proteins. *Plant Mol. Biol.* **36**: 249-263.
- Viotti, A., Sala, E., Marotta, R., Alberi, P., Balducci, C., Soave, C.** (1979). Genes and mRNAs coding for zein polypeptides in *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.* **102**: 211-222.
- Vogel, H.J.** (1964). Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The Amer. Natur.* **98**: 435-446.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J., Hermann, R.G.** (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**: 535-545.
- Weisemann, J.M. and Matthews, B.F.** (1993). Identification and expression of a cDNA encoding a bifunctional aspartate kinase-homosserine dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* **22**: 301-312.
- Wiebauer, K., Herrero, J.J., and Filipowicz, W.** (1998). Nuclear pre mRNA processing in plants: distinct models of 3'-splice site selection in plants and animals. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2042-2051.
- Wilson, B.J., Gray, A. and Matthew, B.F.** (1991). Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Physiol.* **97**: 1323-1328.
- Whittaker, P.A., Campbell, A.J., Southern, E.M. and Murray, N.E.** (1988). Enhanced recovery and restriction mapping of DNA fragments cloned in a new lambda vector. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6725-6736.
- Yunes, J.A., Cord Neto, G., Silva, M.J. Leite, A. Ottoboni, L.M.M. and Arruda, P.** (1994). The transcriptional activator Opaque-2 recognize two different target sequences in the 22 kD-like α -prolamin genes. *Plant Cell* **6**: 237-249.
- Yunes, J.A., Vettore, A.L., Silva, M.J. Leite, A. and Arruda, P.** (1998). Cooperative DNA binding and sequence discrimination by the Opaque2 bZIP factor. *Plant Cell* **10**: (11) 1941-55.