Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização das enzimas chaves para o controle do metabolismo d	le
lisina em milho (Zea mays L.) geneticamente modificado	

Vanessa Rizzi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Vanessa Rizzi Engenheira Agrônoma

Caracterização das enzimas chaves para o controle do metabolismo de lisina em milho (Zea mays L.) geneticamente modificado

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Rizzi, Vanessa

Caracterização das enzimas chaves para o controle do metabolismo de lisina em milho (*Zea mays* L.) geneticamente modificado / Vanessa Rizzi.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 112 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Milho 2. Lisina 3. Zeolina 4. Proteínas de Reserva I. Título

CDD 633.15 R627c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha Mãe Rosania Maria Rizzi Ao meu Rai Sbanez Rizzi Às minhas três lindas irmãs Ao Cesar, meu companheiro Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", a todos os professores e funcionários pelos ensinamentos e colaboração;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela colaboração e oportunidade de orientação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processos: 2009/54676-0 e 2011/03134-2 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

À Salete, pela paciência desde o começo e por ajudar sempre com seu conhecimento;

À Daiana, pela sua imensa vontade de ensinar, pela paciência e conselhos. Certamente esta conquista também é sua;

À minha família maravilhosa, que de longe torce por mim e acredita na educação como sendo o meio de transformação das nossas vidas;

Ao meu companheiro Cesar, que sempre ao meu lado está a me fortalecer. Agradeço pela força, carinho e amor. E a toda sua família que me acolhe como filha e irmã;

À todos os colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Amerivan, Berenice, Daniel, Felipe, Fernando, Gisele, Georgia, Jackeline, Leila, Lucas, Lucélia, Manuella, Milca, Mônica, Paula, Roberta, pela convivência, cafés e conhecimentos compartilhados;

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma participaram deste processo de aprendizagem e crescimento, que estão em meu coração, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Proteínas de reserva e características das sementes de milho	25
2.2 A via metabólica do ácido aspártico	28
2.3 Biossíntese de lisina e sua regulação	30
2.3.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase	31
2.3.2 Dihidrodipicolinato sintase	32
2.4 Catabolismo de lisina	33
2.5 Estratégias para aumentar lisina em milho	35
2.5.1 Melhoramento convencional	35
2.5.2 Transgenia	36
2.5.2.1 A zeolina	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Produção do material vegetal e coleta	43
3.2 Proteínas de reserva	45
3.2.1 Extração de proteínas de reserva	45
3.2.2 Quantificação de proteínas	46
3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	46
3.3 Aminoácidos solúveis totais	47
3.3.1 Extração de aminoácidos solúveis totais	47

3.3.2 Hidrólise ácida das proteínas de reserva	48
3.3.3 Separação e determinação da composição de aminoácidos por UPLC	48
3.4 Extração e purificação parcial das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina	48
3.4.1 Precipitação com sulfato de amônio	49
3.4.2 Dessalinização das amostras	50
3.4.3 Ensaio enzimático da AK	51
3.4.4 Cálculo da atividade da AK	51
3.4.5 Ensaio enzimático da HSDH	52
3.4.6 Cálculo da atividade da HSDH	52
3.4.7 Ensaio enzimático da DHDPS	53
3.4.8 Síntese do β-aspartato semialdeído (ASA)	53
3.4.9 Cálculo da atividade da DHDPS	53
3.4.10 Ensaio enzimático da LOR	54
3.4.11 Cálculo da atividade da LOR	54
3.4.12 Ensaio enzimático da SDH	54
3.4.13 Cálculo da atividade da SDH	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Proteínas de Reserva	57
4.2 Perfil proteico por SDS-PAGE	57
4.3 Teor de aminoácidos em cada fração proteica	61
4.4 Teor de aminoácidos solúveis totais	69
4.5 Enzimas envolvidas na síntese de lisina	72
4.5.1 Determinação da atividade específica de AK	72
4.5.2 Determinação da atividade específica de HSDH	76
4.5.3 Determinação da atividade específica de DHDPS	79
4.6 Enzimas envolvidas na degradação de lisina	84
4.6.1 Determinação da atividade de LOR	84

4.6.2 Determinação da atividade de SDH	86
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	103

RESUMO

Caracterização das enzimas chaves para o controle do metabolismo de lisina em milho (Zea mays L.) geneticamente modificado

A lisina é um dos aminoácidos essenciais e um dos fatores limitantes ao uso de cereais como o milho na alimentação, pois, sem suplementação, não permite a obtenção de uma dieta balanceada. A fim de melhorar a qualidade nutricional dos cereais, várias tentativas têm sido realizadas baseadas em resultados obtidos sobre as rotas de metabolismo da lisina em plantas e o acúmulo de proteínas de reserva no endosperma. Ambrozevicius (2010) com o objetivo de produzir plantas de milho transgênicas com alto teor de lisina utilizou a estratégia de expressão de proteínas de reserva de outras espécies vegetais ricas em lisina, ou seja, através da expressão de uma proteína heteróloga: a zeolina. O presente trabalho teve como objetivo estudar os 6 eventos transformados expressando a zeolina na geração F3, caracterizando as proteínas de reserva, o perfil de aminoácidos e as enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em milho geneticamente modificado, para compreender quais as possíveis alterações bioquímicas podem ter sido geradas pela transformação, e que podem ter levado ao incremento dos aminoácidos essenciais neste material transgênico. O perfil de proteínas de reserva dos eventos transformados exibiu redução na proporção das zeínas II e glutelinas em relação ao controle HiII, e ainda aumentos muito discretos da fração globulina, porém não para todos os eventos transformados. Na composição de aminoácidos solúveis totais foram observados incrementos nos teores dos aminoácidos que fazem parte da via metabólica do ácido aspártico: lisina, metionina, treonina e isoleucina. Para os aminoácidos incorporados em proteínas, foram observados incrementos nos teores de lisina nos eventos transformados da fração globulina e da fração glutelina, ambos em relação ao controle HiII. Já a fração zeína I teve o maior conteúdo total de aminoácidos em todos os eventos transformados. A análise das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina revelou que ocorreram alterações em duas enzimas, a primeira enzima envolvida na síntese de lisina, aspartato quinase (AK) e a segunda envolvida na degradação de lisina, lisina cetoglutarato redutase (LOR). Embora as outras enzimas envolvidas na síntese e na degradação de lisina também tenham sido alteradas, os resultados foram variáveis para os diferentes eventos. Este trabalho mostrou que a expressão da proteína heteróloga zeolina causou alterações na composição das frações protéicas, no teor dos aminoácidos solúveis totais e aminoácidos incorporados em proteína em consequencia das alterações das enzimas envolvidas na síntese e degradação da lisina. Os resultados obtidos sugerem que a expressão da proteína heteróloga zeolina, que tem a necessidade de incorporação de lisina em sua estrutura, pode ter alterado a via metabólica do ácido aspártico para suprir a nova demanda de lisina. Essas alterações podem incluir o aumento na atividade da enzima AK, que é a primeira enzima da via que leva a síntese deste aminoácido e também uma redução na atividade da enzima de degradação LOR, pois o excesso de lisina livre que seria degradada é incorporado à nova proteína.

Palavras-chave: Milho; Lisina; Zeolina; Proteínas de Reserva

ABSTRACT

Key enzymes characterization to the control of lysine metabolism in genetic modified corn (*Zea mays* L.)

Lysine is an essential amino acid and one of the limiting factors for the use in cereals such as corn feed therefore, without supplementation; it does not allow obtaining a balanced diet. In order to improve the nutritional quality of cereals, several attempts have been made based on the results about routes of metabolism of lysine in plants and accumulation of storage proteins in endosperm. Ambrozevicius (2010) with the objective of producing transgenic corn plants with high content of lysine used a strategy of expression of storage proteins from other plant species which are rich in lysine, it means, through the expression of a heterologous protein: zeolin. This work aimed to study the 6 events processed expressing zeolina in F3 generation, featuring the storage proteins, the profile of amino acids and enzymes involved in the metabolism of lysine in genetically modified corn, in order to understand the possible biochemical changes which may have been generated by the transformation, and that may have led to the increase of essential amino acids in transgenic material The storage protein profile of transformed events exhibited reduction in the proportion of zein II and glutelins compared to control HiII, and yet very discrete increments of globulin, but not for all events processed. In the composition of soluble amino acids, it was observed increments in concentration of amino acids forming part of the metabolic pathway of aspartic acid: Lysine, methionine, threonine and isoleucine. For the amino acids incorporated into proteins, it was observed increments in the levels of lysine in the transformed events of globulin and glutelin fraction, both in relation to the control HiII. On the other hand, zein fraction I had the highest total amino acid content in all transformed events. The analysis of the enzymes involved in the metabolism of lysine revealed that changes occurred in two enzymes, the first enzyme involved in the synthesis of lysine, aspartate kinase (AK) and the second involved in the degradation of lysine, lysine ketoglutarate reductase (LOR). Although other enzymes involved in the synthesis and degradation of lysine have also been changed, the results were variable for different events. This work showed that the expression of heterologous protein zeolina caused changes in the composition of protein fractions, in the content of soluble amino acids and amino acids incorporated in consequence of changes in enzymes involved in the synthesis and degradation of lysine. The results suggest that the expression of heterologous protein zeolina, which has the need for incorporation of lysine in its structure, may have changed the aspartic acid pathway to meet the new demand for lysine. These changes may include the increase in AK enzyme activity, which is the first enzyme of the pathway leading to the synthesis of this amino acid and also a reduction in the activity of the enzyme degradation LOR, since the excess free lysine would be degraded is incorporated into the new protein.

Keywords: Corn; Lysine; Zeolin; Storage Proteins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição do aminoácido lisina nas sementes de milho. (Adaptados portalsaofrancisco.com.br e dl.sciencesocieties.org)
Figura 2 -	Via metabólica do ácido aspártico em plantas superiores: AK, aspartato quinase. LOR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina dehidropina dehidrogenase; HSD, homoserina dehydrogenase; DHPS, dihidrodipicolinato sintase (AZEVEDO, 2002)
Figura 3 -	Via de degradação da lisina, estudada inicialmente por Arruda, Sodek e Silva (1982). LOR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina desidrogenase (AZEVEDO; LEA, 2001)
Figura 4 -	Sequência de aminoácidos da proteína quimérica zeolina. Os resíduos 1 ao 421 representam a sequência completa da faseolina. O peptídeo sinal N-terminal está marcado em cinza-escuro e a sequência de ligação sintética está em cinza-claro. Os resíduos 437 ao 525 correspondem aos 89 resíduos da γ-zeína (MAINIERI et al., 2004)
Figura 5 -	Condução do experimento em casa de vegetação. A. Plântulas de milho 15 dias após a semeadura. B. Plantas de milho no final do estágio reprodutivo, 70 dias após a polinização
Figura 6	- Método indireto para detecção da transgenia através do teste imunocromatográfico, com tiras de fluxo lateral detectando a proteína PAT, com folha de milho 12 dias após a semeadura. A. Corte do fragmento de folha. B Tiras de fluxo lateral com resultado positivo e negativo para transgenia
Figura 7 -	Precipitação com sulfato de amônio (g/L). A faixa de precipitação requerida é a referência para a quantidade de sulfato de amônio a ser utilizado nas amostras 50
Figura 8 -	SDS-PAGE da fração Globulina. P. Padrão BenchMark TM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo, 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado
Figura 9 -	SDS-PAGE da fração Albumina. P. Padrão BenchMark TM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado
Figura 10	- SDS-PAGE da fração Zeína I. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6 Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado
Figura 11	- SDS-PAGE da fração Zeína II. P. Padrão BenchMark TM Protein Ladder; 1-6 Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

Figura 12	- SDS-PAGE da fração Glutelina. P. Padrão BenchMark TM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado
Figura 13 -	Aminograma padrão para UPLC. AU: Absorbância; Minutos: tempo de retenção de cada aminoácido, em fluxo de 0,7 mL/min71
Figura 14	- Atividade específica de AK em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 15	- Atividade específica de AK em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 16	- Atividade específica de AK em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 17	- Atividade específica de HSDH em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 18	- Atividade específica de HSDH em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
	- Atividade específica de HSDH em mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 20	- Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min. mg - proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de S - aminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM . Eventos transformados Zeo4 - Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 21	- Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min1.mg -1 proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de S-aminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM . Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Figura 22	- Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min. mg proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de S-aminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 23 -	Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min1. mg -1 proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 24 -	Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 25 -	Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 26 -	Atividade específica de SDH em ηmol NAD min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 27 -	Atividade específica de SDH em ηmol NAD min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade
Figura 28 -	Atividade específica de SDH em ηmol NAD min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração das proteínas de reserva de sementes maduras de milho expressos em mg.mL ⁻¹ e o desvio padrão ±
Tabela 2 -	Teor de aminoácidos na fração Globulina de sementes maduras, valores expressos em ng.mg ⁻¹ de proteína, ± desvio padrão
Tabela 3 -	Teor de aminoácidos na fração Albumina de sementes maduras, valores expressos em ng.mg ⁻¹ de proteína, ± desvio padrão
Tabela 4 -	Teor de aminoácidos na fração Zeína I de sementes maduras, valores expressos em ng.mg ⁻¹ de proteína, ± desvio padrão
Tabela 5 -	Teor de aminoácidos na fração Zeína II de sementes maduras, valores expressos em ng.mg ⁻¹ de proteína, ± desvio padrão
Tabela 6 -	Teor de aminoácidos na fração Glutelina de sementes maduras, valores expressos em ng.mg ⁻¹ de proteína, ± desvio padrão
Tabela 7 -	Teor de aminoácidos solúveis totais em sementes maduras de milho. Valores expressos em μg.100g ⁻¹ de MS (matéria seca), ± desvio padrão70
Tabela 8	- Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao ensaio controle
Tabela 9	- Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 20 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio
Tabela 10	- Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 24 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio
Tabela 11	- Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio
Tabela 12	- Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 20 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio
Tabela 13	- Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 24 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio
Tabela 14	- Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

Tabela	15	- Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína n	ıas
		concentrações de 1 mM e 5 mM em 20 DAP dos 5 eventos transformados e	do
		controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio	82
Tahela	16	- Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína n	าลต
Tabela	10	concentrações de 1 mM e 5 mM em 24 DAP dos 5 eventos transformados e	
		controle Hill Porcentagem relativa ao controle do ensajo	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPAT N-acil-L,L-diaminopimelato aminotransferase

ADPD α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase

AEC Aminoetil L-Cisteína
AK Aspartato Quinase

ASA β-aspartato-semialdeído
ATP Trifosfato de Adenosina
BSA Soroalbumina Bovina

DAPD Diaminopimelato descarboxilase

DAPE Diaminopimelato epimerase

DHDPR Dihidrodipicolinato redutase

DHDPS Dihidrodipicolinato Sintase

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DTT Ditiotreitol

EC Enzyme Commission Number
EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético

HK Homoserina Quinase

HSDH Homoserina Desidrogenase

LOR Lisina Cetoglutarato Redutase

NADP⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida

OPH O-fosfohomoserina

PMSF Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

RNA Ácido Ribonucléico

RNAi Ácido Ribonucléico de interferência

SAM S-Adenosil Metionina

SDH Sacaropina Desidrogenase

TEMED N, N, N', N'-Tetrametilletilenodiamina

THDPA Tetrahidrodipicolinato

TS Treonina Sintase

TRIS Tris-(hidroximetil)-Aminometano

1 INTRODUÇÃO

O milho (Zea Mays L.) é uma gramínea originária do México extremamente cultivada e utilizada na alimentação humana e animal em todo o mundo. Dentre os cereais mais consumidos compete com o trigo e o arroz e sua produção ao longo dos anos, através das extensas pesquisas, têm aumentado consideravelmente.

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA, a produção mundial de milho na safra 2011/2012 foi de 876,8 milhões de toneladas. Para a safra 2012/2013 a CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento estima que, apenas no Brasil, sejam colhidos aproximadamente 71.936,4 milhões de toneladas de milho, cultivados em uma área de aproximadamente 14.762,6 milhões de hectares.

Porém, o interesse por uma produtividade cada vez maior faz com que o fator nutricional seja de certa forma esquecido em relação aos valores de carboidratos, vitaminas, gorduras, sais minerais e proteínas. Especula-se que a deficiência de alguns aminoácidos essenciais no milho seja resultado do processo de seleção e melhoramento ao longo das décadas para determinadas características agronômicas, o que resultou na perda de genes que poderiam estar envolvidos com características diversas, dentre elas o metabolismo de aminoácidos e padrão das proteínas de reserva acumuladas (SHERRY et al., 2009; SWARUP et al., 1995).

As proteínas de origem vegetal são muito importantes, pois fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, e até 50% deste valor é representando pelos grãos dos cereais, fato este mais relevante em países em desenvolvimento, onde os cereais são a única fonte energética e protéica na dieta da maioria da população (MILLWARD, 1999).

O milho é um cereal importante para a nutrição humana e animal, mas a carência de determinados aminoácidos essenciais como a lisina, limita o seu valor nutricional (ZHAO et al., 2012).

Seres humanos, bem como animais monogástricos, não são capazes de sintetizar uma série de aminoácidos (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina) denominados "aminoácidos essenciais", os quais devem ser ministrados através da dieta. Entre estes aminoácidos essenciais a lisina é o mais importante, uma vez que é a mais limitante nos cereais. Em países desenvolvidos este não é um problema, pois o consumo de carne e leite geralmente proporciona um teor suficiente destes aminoácidos

essenciais em suas dietas. No entanto, a falta de lisina é de suma importância em países em desenvolvimento onde a principal fonte de alimentação são os cereais. (KIRMA et al., 2012).

Assim, é comum a utilização de lisina sintética, farelo de soja ou aminoácidos produzidos por fermentação bacteriológica para complementação da ração de suínos e frangos, o que representa grandes gastos para o setor produtivo. Um trabalho realizado nos EUA no ano de 2001 mostrou que, dobrando o conteúdo de lisina nos grãos de milho, sem alterar o conteúdo protéico, uma economia de cerca de \$360 milhões anuais poderia ser realizada no mercado mundial de rações (JOHNSON et al., 2001).

No mesmo sentido, estudos mostram que crianças com problemas de nutrição, se alimentadas com variedades de milho para alta lisina obtêm melhoria em diferentes características, tais como ganho de peso e altura quando comparadas a crianças alimentadas com o milho convencional (GRAHAM et al., 1980).

Programas de melhoramento de plantas estão sendo conduzidos com o objetivo de melhorar o teor de lisina nos cereais através do melhoramento convencional, identificação de mutantes naturais (exemplo opaco e floury), indução de mutantes bioquímicos e produção de plantas transgênicas (AZEVEDO et al., 2001).

Ambrozevicius (2010) com o objetivo de produzir plantas de milho transgênico com alto teor de lisina utilizou a estratégia de expressão de proteínas de reserva ricas em lisina de outras espécies vegetais, ou seja, a expressão de uma proteína heteróloga. A proteína que se apresentou mais promissora foi a zeolina, que contém uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da γ-zeína (que possui 25 resíduos de lisina) (MAINIERI et al., 2004). A hipótese do trabalho era que, se houvesse uma expressão estável dessa proteína de reserva nutricionalmente balanceada no endosperma de milho, ela provocasse mudanças nas rotas metabólicas e, consequentemente, nos teores finais de aminoácidos, principalmente de lisina nos grãos. Parte do objetivo do trabalho foi alcançado, com a obtenção de 6 eventos transformados que foram testados e apresentaram expressão dessa proteína.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar essas plantas transformadas expressando a zeolina, para analisar questões relacionadas à regulação das relações fonte/dreno de aminoácidos nas plantas. Para isso, as frações protéicas foram caracterizadas, foram quantificados os aminoácidos incorporados em cada uma dessas frações protéicas e os aminoácidos solúveis totais, bem como a atividade enzimática das principais enzimas que fazem parte da síntese e da degradação da lisina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas de reserva e características das sementes de milho

Proteínas de reserva são assim chamadas por serem a reserva de nitrogênio e energia durante o processo de germinação e a fase inicial de crescimento. São armazenadas em compartimentos intracelulares para evitar a degradação prematura por proteases formando uma estrutura especial, chamado de corpo proteico. Essa estrutura deve ser capaz de sofrer desidratação e reidratação durante o processo de germinação e controle rigoroso do balanço entre aminoácidos livres e incorporados na proteína, que depende do transporte de metabólitos de carbono, nitrogênio e enxofre produzidos nas partes vegetativas da planta (GALILI; HÖFGEN, 2002).

Osborne et al., (1924) desenvolveu um sistema de classificação das proteínas de reserva, modificado por Landry e Moureaux (1970) baseado na solubilidade dessas proteínas durante o processo de extração. Desta forma, quatro grupos foram definidos: albuminas: solúveis em água, globulinas: solúveis em sal, zeínas: solúveis em álcool e glutelinas: solúveis em solução alcalina ou ácida (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000).

As albuminas e as globulinas se localizam principalmente no embrião e nas células de aleurona que envolve o endosperma, possuem funções metabólicas e estruturais, sendo também chamadas de proteínas citoplasmáticas formadas por uma série de proteínas com alto teor de lisina. As glutelinas se encontram no endosperma e são estruturalmente semelhantes às zeínas, porém não são solúveis em álcool, uma vez que formam polímeros de alto peso molecular estabilizados por pontes dissulfeto inter-cadeias (SHEWRY; TATHAM, 1990).

Albuminas, globulinas e glutelinas apresentam proteínas contendo teores adequados de aminoácidos essenciais aos seres humanos e animais monogástricos, especialmente lisina e triptofano. São conhecidas também como fração não—zeína, pela ampla distribuição na semente e pela composição de aminoácidos (BASS et al., 1992).

As zeínas, ou prolaminas são assim chamadas porque possuem uma grande quantidade de prolina e aminas (glutamina) (HERMAN; LARKINS, 1999). Sua extração é realizada em duas etapas, zeína I e zeína II. E estão localizadas principalmente no endosperma, tendo como função fornecer nitrogênio durante a germinação e estágios primários de crescimento das plântulas Os peptídeos que constituem a fração zeína se caracterizam pela deficiência dos

aminoácidos lisina e triptofano, concentrações inadequadas de treonina e valina e um desbalanço entre os aminoácidos leucina e isoleucina.

Na Figura 1 está representada a estrutura da semente de milho, a relação entre o teor de proteína encontrada (9%) com seu percentual do aminoácido lisina (2,7%) e a localização das zeínas, que formam entre 60 a 70% do conteúdo total de proteínas de reserva. Podemos observar que as zeínas possuem um percentual de lisina de apenas 0,1%, enquanto que as frações não-zeínas, que formam apenas 30% das proteínas de reserva possuem um percentual muito maior de lisina, 6,1%.

Essas concentrações inadequadas de aminoácidos essenciais na fração zeína podem explicar a deficiência de lisina na semente de milho (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). Em contrapartida, o mutante o2 de milho (MERTZ; BATES; NELSON, 1964) que apresenta teores muito baixos de zeína nas sementes, tem um conteúdo equilibrado de lisina e triptofano (SODEK; WILSON, 1971).

As zeínas são classificadas em quatro tipos distintos com base em sua estrutura primária e solubilidade (SHEWRY; HALFORD, 2002; ADAMS et al., 2004):

- α-zeína (19 e 22 kDa) codificada por uma família multigênica, constitui cerca de 60% das zeínas;
- β-zeína (15 kDa) codificada por um gene, constitui cerca de 5 a 10% das zeínas;
- γ-zeína (16, 27 e 50 kDa) codificada por três genes, constitui cerca de 25% das zeínas;
- δ-zeína (10 e 18 kDa) codificada por dois genes, constitui cerca de 5% das zeínas;

Normalmente os grãos de milho contêm aproximadamente 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9% de fibras e 9-11% de proteínas, sendo que, 70 a 90% são proteínas de reserva. Totalizando, albuminas (3-5% da proteína total), globulinas (10-20% da proteína total), glutelinas (35-45% da proteína total) e a fração zeína, denominada de zeína no milho, representam entre 60 a 70% do conteúdo total de proteína dos grãos maduros (LANDRY et al., 2005).

Uma importante característica das proteínas de reserva no milho é a formação do corpo protéico no endosperma, uma estrutura de cerca de 1-2 μ m que se forma através da interação entre as diferentes zeínas. Lending e Larkins (1989) propuseram um modelo inicial em que a β - e a γ -zeína iniciavam o processo e depois a α -zeína era incorporada no interior do corpo protéico. Neste esquema a α -zeína forma um núcleo central, com a β - e a γ -zeína formando uma camada externa. Estudos usando o "two-hybrid system" (KIM et al., 2002) confirmaram que a γ -zeína de 16 kDa e a β -zeína de 15 kDa iniciam o processo nas células

mais novas na região da sub-aleurona e determinam a região do retículo endoplasmático em que o corpo proteico será formado. O corpo proteico aumenta de tamanho, com a formação de lóculos centrais contendo α -zeínas. Finalmente esses lóculos se fundem para formar uma região central contínua constituída pelas α -zeínas e com as β - e γ -zeínas na região periférica do corpo proteico maduro, conforme esquematizado na Figura 1 (GIBBON; LARKINS; BRIAN, 2005).

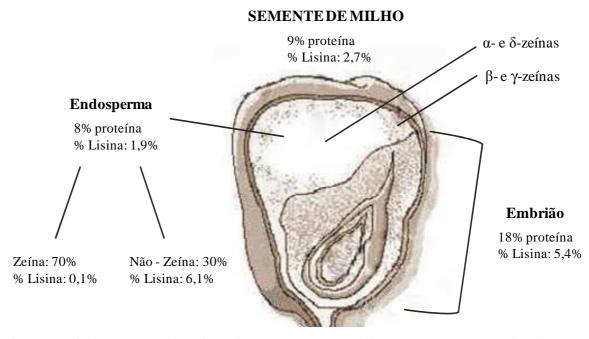


Figura 1 - Distribuição do aminoácido lisina nas sementes de milho. (Adaptado: portalsaofrancisco.com.br e dl.sciencesocieties.org)

A formação do corpo proteico em milho é controlada em diversos níveis, incluindo a regulação espacial e temporal da expressão dos genes da zeína e a regulação da transcrição e das interações que ocorrem entre os diferentes tipos de zeínas (WOO, et al., 2001; KIM et al., 2002).

Eventos transgênicos obtidos em milho através da técnica de RNAi apresentaram redução de 30% no conteúdo da α-zeína de 19 kDa, resultando em incrementos nos aminoácidos metionina, lisina, triptofano e ácido aspártico e decréscimo de prolina e leucina (HUANG. et al., 2004). Esses incrementos no conteúdo de aminoácidos essenciais podem ser devido à redução das proteínas pobres nestes aminoácidos, as zeínas, e a um aumento das frações proteica ricas em aminoácidos essenciais, uma vez que estas podem drenar o excesso de lisina para sua síntese.

A manipulação genética pode ser realizada, também através da supressão das frações com baixo teor de aminoácidos essenciais, alterando o balanço final das frações proteicas, o que possibilita um incremento daquelas proteínas consideradas ricas em aminoácidos essenciais.

2.2 A via metabólica do ácido aspártico

A via do ácido aspártico (Figura 2) sintetiza quatro dos nove aminoácidos essenciais, lisina, treonina, metionina e isoleucina, os quais participam de inúmeros processos importantes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (JANDER; JOSHI, 2010).

A via tem esse nome, pois inicia com o ácido aspártico, que é o primeiro composto estável com quatro carbonos e que representará a base do esqueleto dos aminoácidos formados na via. O ácido aspártico é formado pelo processo de transaminação do ácido oxaloacético, o qual pode ser formado no ciclo de Krebs nas mitocôndrias, ou através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase no citoplasma (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Na via metabólica do ácido aspártico, a primeira reação ocorre pela ação da enzima aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4) que catalisa a fosforilação do aspartato, utilizando ATP para formar o β -aspartil fosfato. O β -aspartil fosfato é então convertido a β -aspartil semialdeído (ASA) em uma reação catalisada pela aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11).

Até esse ponto a via é comum para os quatro aminoácidos nela formados, a partir daí se ramifica em dois ramos: um responsável pela biossíntese de lisina e o outro que é dividido em dois sub-ramos, um que leva a síntese de metionina e o outro a formação de treonina e isoleucina.

O aminoácido lisina é sintetizado a partir do ASA através de sete reações consecutivas, inicializadas pela ação da enzima DHDPS (EC 4.2.1.52 (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2005). Na via de síntese de lisina ocorre a condensação do piruvato e do β- aspartil semialdeído formando dihidrodipicolinato, pela enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS). A segunda reação é a formação do composto tetrahidrodipicolinato (THDPA), catalisado pela enzima dihidrodipicolinato redutase (DHDPR, EC 1.3.1.26). Em seguida são adicionados nitrogênios ao esqueleto de carbono, pela enzima N-acil-L,L-diaminopimelato aminotransferase (ADPAT, EC 2.6.1.17) e logo pela -α-acil-L,L-diaminopimelato deacilase (ADPD, EC 3.5.1.18). Modificações finais são

realizadas pelas enzimas diaminopimelato epimerase (DAPE, EC 5.1.1.17) e diaminopimelato descarboxilase (DAPD, EC 4.1.1.20), originando o aminoácido lisina (HUDSON et al., 2005; HUDSON et al., 2006).

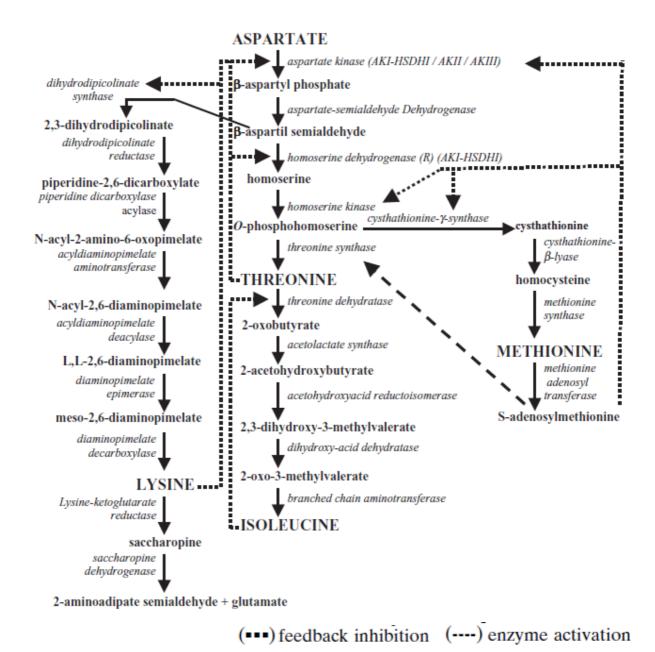


Figura 2 - Via metabólica do ácido aspártico em plantas superiores: AK, aspartato quinase; LOR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina dehidropina dehidrogenase; HSD, homoserina dehydrogenase; DHPS, dihidrodipicolinato sintase (AZEVEDO, 2002)

No outro ramo, β- aspartil semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) na presença da coenzima NADH ou NADPH. Em seguida, a homoserina é fosforilada a o-fosfohomoserina

(OPH) pela ação da homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) na presença de ATP (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

O substrato OPH é convertido à treonina pela ação da enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2). O aminoácido isoleucina é formado a partir da treonina em uma série de cinco reações enzimáticas catalisada pelas enzimas treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16), ácido acetohidroxi sintase (AHAS, EC 4.1.3.18), ácido acetohidroxi isomeroredutase (AHRI, EC 1.1.1.86), ácido dihidroxi desidratase (DHAD, EC 4.2.1.9) e aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (BCAT, EC 2.6.1.42). (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A partir da OPH a metionina é sintetizada, no outro ramo da via com três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationina γ-sintase (CGS, EC 4.9.99.9) que leva a formação de cistationina. Este composto é transformado na sequência em homocisteína pela enzima cistationina β-liase (CBL, EC 4.4.1.8) e em seguida em metionina pela enzima metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O S-adenosil Metionina (SAM) é sintetizado a partir da metionina em uma reação enzimática catalisada pela S-adenosilmetionina sintase (SAMS, EC 2.5.1.6).

Além da importância da via do ácido aspártico pela síntese de quatro dos nove aminoácidos essenciais, também fornece precursores para a biossíntese de outros metabólitos essenciais, como o S-adenosilmetionina (SAM) e o etileno que atuam na regulação do crescimento de plantas e repostas ao ambiente (AMIR; HACHAM; GALILI, 2002). A treonina através da sua conversão a isoleucina participa nas vias de interações plantapatógeno e na produção de energia celular (KANG et al., 2006), além de ser precursora na síntese de glicina, e assim participar nos processos de fotorrespiração (JOSHI et al., 2006) A biossíntese de isoleucina é economicamente relevante, pois uma enzima desta via é alvo de uma série de herbicidas (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2005), e por fim o metabolismo de lisina está relacionado a interações planta-patógeno e com a produção do hormônio do estresse, o ácido salicílico (LESS; GALILI, 2009).

2.3 Biossíntese de lisina e sua regulação

Numerosos estudos têm tentado compreender os mecanismos que regulam a síntese e o acúmulo de lisina no endosperma, devido este ser o aminoácido essencial mais limitante nos cereais. Recentes evidências genéticas, moleculares e bioquímicas sugerem que a síntese e o catabolismo de lisina são regulados por mecanismos complexos (FERREIRA; MEINHARDT;

AZEVEDO, 2005). Desta forma, várias revisões têm sido realizadas em relação à rota metabólica do ácido aspártico (AZEVEDO et al., 1997).

Acredita-se que em vias multienzimáticas, em que o produto de uma enzima se torna o substrato da próxima, a primeira enzima da sequência normalmente atua como reguladora da velocidade de todo o sistema, sendo chamada de enzima reguladora. Porém, a regulação da via metabólica do ácido aspártico ocorre em determinados pontos de ramificação, através da regulação das enzimas que se encontram nestes pontos (GIOVANELLI, 1980).

A regulação das enzimas chave de vias multienzimáticas, chamadas de enzima reguladoras, ocorre através da ativação/inibição por seus produtos finais (YOSHIDA et al., 2010), processo chamado de retroalimentação positiva/retroalimentação negativa, que desempenha papel fundamental para a regulação da via e consequentemente na síntese dos seus aminoácidos produtos.

Na via de síntese da lisina o principal controle é exercido pelas enzimas AK, HSDH e DHDPS, assim, estudos objetivam entender os seus mecanismos de regulação.

2.3.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase

A AK é a primeira enzima da rota catalisando a conversão do aspartato em β-aspartil fosfato (GALILI, 1995). Os primeiros estudos desta enzima foram realizados em microorganismos e posteriormente em plantas, sendo identificada, parcialmente purificada e bioquimicamente caracterizada em várias espécies de cereais de importância econômica (AZEVEDO et al., 1997), como cevada (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982), cenoura (RELTON et al., 1988), milho (DOTSON; SOMERS; GENGENBACH, 1989; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992), arroz (TEIXEIRA et al., 1998), tabaco (FRANKARD; GHISLAIN; JACOBS, 1997).

Pelo menos duas isoenzimas têm sido relatadas em plantas (GALILI, 1995; FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2005). Uma monofuncional sensível a inibição por lisina e outra que está presente como um polipeptídio bifuncional apresentando um domínio de AK e outro de HSDH, sendo esta sensível a inibição por treonina (AK-HSDH) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A isoenzima sensível a inibição por lisina normalmente é responsável por cerca de 60-80% da atividade total de AK e está envolvida na regulação geral da via (AZEVEDO; LEA, 2001) além de ser sinergicamente inibida por SAM

(ROGNES; LEA; MIFLIN, 1980). A isoenzima sensível a inibição por treonina contabiliza cerca de 10-20% da atividade total de AK.

Em milho, duas isoenzimas da AK sensível á lisina foram eluídas em colunas de cromatografia de troca iônica, e uma terceira sensível a inibição por treonina identificada por filtração em gel, confirmando a hipótese da existência de três isoenzimas de AK em vegetais superiores (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992).

Os resultados provenientes de estudos moleculares em milho revelaram a presença de no mínimo cinco genes que codificam para duas ou mais isoformas de AK, com base em suas propriedades de inibição pelo produto final (DOTSON et al., 1989; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992). Dois genes, *ask1 e ask2*, que codificam a isoforma monofuncional de AK foram mapeados no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 2, respectivamente (AZEVEDO; ARANA; ARRUDA, 1990; MUEHLBAUER et al., 1994). Existem no mínimo três genes que codificam para a isoforma bifuncional AK-HSDH, os quais codificam AK sensível a inibição por treonina. Dois genes foram mapeados, um no braço longo do cromossomo 2 e o outro no braço curto do cromossomo 4 (MUEHLBAUER. et al., 1994).

A homoserina desidrogenase (HSDH) é a primeira enzima envolvida na síntese de treonina e metionina e catalisa a conversão do aspartato semialdeído a homoserina na presença de NADH ou NADPH. Os primeiros estudos com esta enzima foram realizados em procariotos, principalmente *Escherichia coli* e posteriormente em vegetais.

Pelo menos duas isoenzimas de HSDH têm sido observadas em plantas, uma sensível e a outra resistente a inibição por treonina, sendo esta última, encontrada como uma isoforma monofuncional no citoplasma, cuja função é ainda desconhecida (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992). A isoenzima sensível a inibição por treonina que está localizada nos plastídios e representa a maior porção da atividade total de HSDH, sugerindo um papel fundamental da atividade desta isoenzima na síntese de treonina. As duas isoenzimas diferem muito em relação a sua massa molecular. A isoenzima sensível a inibição por treonina é um homodímero com massa molecular de 180 kDa, enquanto que a isoenzima resistente a inibição por treonina foi relatada com uma massa molecular de 70 kDa.

2.3.2 Dihidrodipicolinato sintase

A DHDPS é a primeira enzima do ramo da via que leva exclusivamente a síntese de lisina, sendo considerado o principal ponto de regulação da síntese deste aminoácido em

plantas (AZEVEDO et al., 1997). Catalisa a condensação do piruvato e do β aspartato semialdeído para produção de 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato e tem sido purificada e caracterizada em plantas exibindo massa molecular entre 115 a 167 kDa (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2005).

Esta enzima possui uma única forma e é altamente sensível a inibição por baixas concentrações de lisina. Galili (1995) observou que em plantas a DHDPS é aproximadamente 10 vezes mais sensível à lisina que a AK e aproximadamente 100 vezes mais sensível à inibição por lisina do que a DHDPS em Escherichia coli.

Segundo (GALILI, 1995; GALILI, 2002) plantas que expressam DHDPS insensível à inibição por lisina apresentaram uma superprodução de lisina, enquanto que plantas expressando AK insensível à inibição por lisina apresentaram um aumento na produção de treonina. Este estudo corrobora a hipótese da existência de uma função regulatória mais importante no ponto da via catalisado pela DHDPS. A superprodução de lisina em plantas expressando DHDPS insensível a inibição por lisina está geralmente associada com níveis reduzidos de treonina, sugerindo que a DHDPS e HSDH competem pelo mesmo substrato, o β-aspartato-semialdeído (ASA) (GALILI, 1995; GALILI, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

2.4 Catabolismo de lisina

O controle do nível de lisina, particularmente em sementes, pode ser regulado tanto pela sua síntese quanto pelo catabolismo (ARRUDA; SILVA; TEIXEIRA, 2000).

O catabolismo de lisina é iniciado com a enzima 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8) que é a primeira enzima desta via, a qual condensa lisina e 2-oxoglutarato para formar sacaropina. Posteriormente, a sacaropina é hidrolisada à ácido α-aminoadípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela enzima sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9), como pode ser observado na Figura 3. Estas enzimas apresentam domínios separados em um polipeptídeo bifuncional LOR-SDH (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LEA, 2001). Entretanto, a isoforma monofuncional de ambas as enzimas também foi encontrada (TANG et al., 2002).

A regulação da atividade do polipeptídio bifuncional de LOR ocorre pela interação com o domínio de SDH, a qual é mediada pela região intermediária de ligação entre os dois domínios (ZHU; TANG. GALILI, 2002).

Em monocotiledôneas, como o arroz (GAZIOLA et al., 1997) e em dicotiledôneas, como tabaco (KARCHI, SHAUL, GALILI, 1994) o catabolismo da lisina é realizado pela via da sacaropina, mas o papel fisiológico do catabolismo deste aminoácido pode diferir entre as duas famílias de plantas.

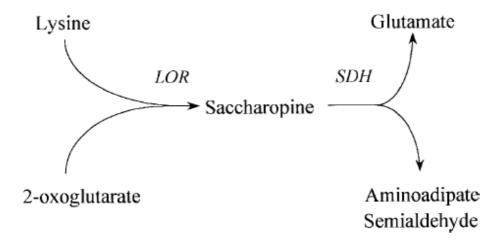


Figura 3 - Via de degradação da lisina, estudada inicialmente por Arruda, Sodek e Silva (1982). LOR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina desidrogenase (AZEVEDO; LEA, 2001)

A regulação do catabolismo de lisina ocorre não apenas pelas enzimas LOR e SDH, mas também pelo padrão de sua expressão. Em milho, os genes que codificam para as zeínas e para a enzima LOR-SDH estão sob o controle do mesmo fator de transcrição, chamado opaco-2, assim, com o aumento da taxa de síntese das zeínas, através da ativação dos genes pelo fator opaco-2 há também um incremento na atividade de LOR-SDH, resultando na degradação de lisina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

O mutante homozigoto recessivo para o gene *opaco-2* é caracterizado por um alto teor de lisina nas sementes quando comparado com o milho normal, devido às alterações na distribuição das proteínas de reserva e grande acúmulo de lisina na forma solúvel (GAZIOLA et al., 1999). Trabalhos com o mutante opaco-2 revelaram que houve uma redução nos níveis de mRNA (superior a 90%), na proteína madura LOR-SDH e também da atividade da enzima, e confirmaram o papel do fator de transcrição opaco-2 no catabolismo de lisina (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992; GAZIOLA et al., 1999; KEMPER et al., 1998).

A clonagem do gene *o2* revelou que este codifica um fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP) (SCHMIDT et al., 1992), capaz de controlar a síntese das α-zeínas e a transcrição da enzima LOR/SDH, envolvida no catabolismo da lisina (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992).

A significante atividade de catabolismo da lisina em sementes observada em diferentes experimentos sugere que estratégias para aumentar o teor de lisina nos grãos podem requerer a sua redução ou eliminação (GALILI; HÖFGEN, 2002). Desta forma, a complexa regulação que existe entre as rotas para síntese do diferentes aminoácidos através de um precursor comum e, o acúmulo de lisina que também envolve a regulação de seu catabolismo, são pontos importantes a serem esclarecidos para um melhor entendimento da via do ácido aspártico em cereais.

2.5 Estratégias para aumentar lisina em milho

Com o objetivo de melhorar a composição de aminoácidos nas sementes dos cereais, vários trabalhos vêm sendo realizados através da exploração de mutantes naturais para alta lisina, transformação de plantas para alteração da via metabólica do ácido aspártico (SHEWRY, 2007), expressão de proteínas heterólogas e supressão de proteínas de reserva. No caso do milho o objetivo principal é aumentar o teor de lisina.

Assim, o melhoramento de plantas, a identificação de mutantes naturais, a indução de mutantes bioquímicos e a produção de plantas transgênicas têm sido métodos utilizados como alternativas para estudo e desenvolvimento de variedades com altos teores de lisina. (AZEVEDO; LEA,2001).

2.5.1 Melhoramento convencional

Desde o início da ciência os mutantes naturais servem como base para os estudos genéticos por possuírem alelos variados, que auxiliam os estudiosos a desvendar como o material genético regula o metabolismo e fisiologia das plantas.

Uma série de mutações naturais em milho foram identificadas, como os mutantes recessivos (opaque), semi-dominantes (floury) ou dominantes (Mucronate Mc) e Defective Endosperm B30 (DE-B30) (GIBBON; WANG; LARKINS, 2005). As mutações do tipo opaco conferem um endosperma uniforme e amiláceo e maiores teores de lisina nos grãos (GEETHA et al., 1991).

Em 1964 o mutante natural Opaco-2 (o2) foi caracterizado (MERTZ; BATES; NELSON, 1964). Enquanto o genótipo selvagem apresenta teores de 1,5% de lisina o opaco apresenta níveis de cerca de 3,8%. Este aumento é resultado de um maior teor de lisina

solúvel e de proteínas do tipo não-zeínas, além da redução do conteúdo das zeínas do grão (HUNTER et al., 2002) e de uma redução na atividade das enzimas envolvidas no catabolismo de lisina (GAZIOLA et al., 1999).

No opaco a característica de alta lisina e endosperma mais amiláceo, esta associada a problemas agronômicos nos programas de melhoramento comercial, como maior susceptibilidade ao ataque de insetos e doenças, maiores teores de umidade e redução da produção.

Para a introdução de características comerciais no mutante o2, um intenso trabalho de melhoramento foi realizado pelo "Centro Internacional de melhoramento de milho e trigo" (CIMMYT) desde a década de 60, resultando no lançamento das variedades de milho denominadas QPM - "Quality Protein Maize". O QPM possui teores de lisina e triptofano maiores do que o milho convencional e níveis de produtividade e características agronômicas semelhantes a este (PRASANNA et al., 2001).

No QPM os níveis da γ-zeína são 2-3 vezes maiores que no mutante o2 (GEETHA et al., 1991), o que sugere o seu envolvimento nas modificações do endosperma tornando-o mais duro devido, provavelmente, a uma compactação dos corpos proteicos ricos na γ-zeína de 27 kDa ou a interação com a rede de amilopectina na superfície dos grãos de amido (DANNENHOFFER et al., 1995; GIBBON; WANG;LARKINS, 2003).

2.5.2 Transgenia

Com o uso da transgenia materiais com teores mais adequados de lisina puderam ser testados, a exemplo podemos citar pelo menos duas formas de estudo: alteração de enzimas envolvidas no metabolismo da lisina e alteração no padrão das proteínas de reserva.

No estudo das enzimas devemos pensar na função de cada uma delas dentro da rota metabólica, a AK e a DHDPS são responsáveis pela síntese de lisina, no entanto são retroinibidas por esse aminoácido quando o nível dele aumenta. Já a LOR e SDH são responsáveis pela degradação da lisina quando esta se encontra em níveis mais altos que o normal.

A primeira tentativa de alteração da atividade enzimática foi a transformação de tabaco para expressar a enzima AK de *Escherichia coli* menos sensível a inibição por lisina, porém, ocorreu uma superprodução e acúmulo de treonina, e incremento insignificante nos níveis de lisina (SHAUL; GALILI, 1992). Esse resultado ressaltou o papel regulatório central da enzima DHDPS na síntese de lisina.

Entretanto, em tabaco transgênico foi observado que a expressão constitutiva da enzima DHDPS de *Escherichia coli* ocasionou efeitos deletérios no fenótipo da planta, entre eles degeneração dos órgãos florais e esterilidade (SHAUL; GALILI, 1992). Para solucionar esse problema, foi utilizado o gene que codifica a DHDPS de bactéria sob controle do promotor da faseolina, pois sua expressão ocorre especificamente nas sementes. Quando ainda em desenvolvimento as sementes apresentaram um alto teor de lisina, porém sementes maduras apresentaram os mesmo níveis do que o controle não transformado. Este resultado é devido, provavelmente, ao catabolismo, já que a superprodução de lisina nestas sementes estimulou a atividade das enzimas envolvidas nesse processo (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994).

Através da mutação da DHDPS de plantas, pesquisadores obtiveram os mesmos resultados encontrados em bactérias por Shaver et al. (1996), em que a DHDPS é menos sensível a retroinibição por lisina, de forma que, a rota de biossíntese de lisina é estimulada levando ao seu acúmulo (FALCO et al., 1995; KWON; SASAHARA; ABE, 1995; SHAUL; GALILI, 1992). Em soja e canola, a expressão da DHDPS de bactérias resultou em altos teores de lisina nas sementes, mas acarretou problemas na germinação (FALCO et al., 1995). Já em milho a expressão da DHDPS de bactérias no embrião das sementes aumentou os teores de lisina nos grãos, mas o mesmo resultado não foi obtido quando se utilizou um promotor endosperma específico devido, provavelmente, ao aumento do catabolismo da lisina nestas sementes (MAZUR; KREBBERS; TINGEY, 1999). Desta forma, estratégias para aumentar o teor de lisina nos grãos podem requerer a redução do catabolismo de lisina ou sua eliminação juntamente com a expressão da enzima DHDPS menos sensível ou resistente à inibição por lisina. No entanto, o procedimento exato para manipular este processo depende se esse é um processo essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta (ZHU, X. et al., 2002).

Mutantes duplos de *Arabidopsis*, apresentando redução da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na rota de catabolismo da lisina e expressando a DHDPS de bactérias, apresentaram um efeito sinergístico, onde o nível de lisina solúvel nas sementes foi até 80 vezes maior que o controle, mas neste caso as sementes também apresentaram germinação e desenvolvimento retardado (ZHU; GALILI, 2003).

A técnica do RNA interferente (RNAi) foi utilizada para supressão do catabolismo da lisina em *Arabidopsis*, onde uma sequência dupla fita originada do domínio LOR da LOR/SDH com um promotor para expressão nas sementes. Os resultados mostraram que o defeito do catabolismo de lisina pós-germinação pode ter sido o responsável pela inibição do

crescimento de plântulas, além disso, foram detectados aumentos na lisina solúvel de 0,29-0,39 mol% nas sementes controle para 0,21-2,11 mol% nas sementes transformadas (ZHU; TANG; GALILI, 2004).

A importância do catabolismo de lisina no equilíbrio energético das plantas e consequentemente no aparecimento do processo fotossintético associado ao processo pósgerminativo, bem como um efeito negativo nos níveis de uma série de metabólitos do ciclo de Krebs foram comprovados nas sementes que acumulam altos níveis de lisina (ANGELOVICI et al., 2011).

Para a alteração no padrão das proteínas de reserva pelo menos três estratégias têm sido testadas, como a utilização de peptídeos sintéticos ou a alteração dos aminoácidos de uma proteína endógena, mudança no perfil das proteínas de reserva utilizando a técnica do RNAi ou transformação com uma proteína heteróloga.

Com a compreensão da estrutura, função, dobramento e topologia das proteínas é possível realizar a síntese de genes que codificam uma nova proteína, com características desejáveis, e também a inserção ou substituição de aminoácidos de uma proteína existente (SUN; LIU, 2004). Através da proteína endógena de milho γ-zeína (com resíduos de lisina) modificada, diferentes construções foram testadas e mostraram que somente um posicionamento correto do inserto contendo lisina produz uma proteína modificada com a correta conformação e estabilidade. Neste caso a construção da γ-zeína com cauda de lisina causou degradação da proteína modificada, enquanto a construção com maior chance de sucesso possui resíduos de lisina inseridos no domínio Pro-Xaa mostrando que importantes características dos polipeptídeos desenhados para síntese da lisina são a sua conformação, estabilidade e localização celular (TORRENT et al., 1997).

No caso da estratégia baseada na utilização do RNAi, um alvo interessante para alteração do perfil de aminoácidos são as α-zeína, expressas de forma abundante no endosperma de milho e com uma composição desbalanceada de aminoácidos, principalmente devido a deficiência de lisina e triptofano. A fim de interromper ou reduzir a expressão da α-zeína de 22 kDa, Segal et al. (2003) utilizaram a técnica do RNAi com uma construção da α-zeína inversamente repetida introduzida no genoma, com o objetivo de silenciar os genes da α-zeína de 22 kDa pós-transcricionalmnete (IR-22 kDa). Os resultados mostraram uma redução da expressão da proteína de 22 kDa, alterando o balanço de aminoácidos e aumentando de forma modesta os níveis de lisina nos grãos, com aumentos de 18,5 e 11,1% em cada evento obtido, em relação aos teores de lisina do controle não transformado.

Recentemente o arroz também foi alterado para superexpressar as enzimas AK e DHDPS insensíveis a lisina, a fim de se obter alta produção de lisina, e através da técnica de RNAi regular a expressão de LOR e SDH para diminuir a degradação da lisina em sementes. Em algumas plantas o nível de lisina livre chegou a aumentar até 12 vezes nas folhas e até 60 vezes nas sementes. As plantas transgênicas não mostraram alterações na germinação e no crescimento (LONG et al., 2012).

O uso de genes que codificam uma proteína heteróloga também tem sido uma das estratégias para incrementar o valor nutricional da espécie de interesse. Como exemplo podemos citar a proteína específica de grãos de pólen de batata (*Solanum berthaultii*), chamada sb401, rica em lisina que foi expressa em milho sob controle do promotor da α-zeína de 19 kDa. Os resultados mostraram incrementos nos teores de lisina de 16,1% para 54,8% e de proteína total de 11,6% para 39% (% do peso do grão), comparando-se as plantas transformadas com o controle não transformado (YU et al., 2005). O milho transgênico Y642 foi submetido a testes toxicológicos, e foram fornecidos na dieta de ratos durante 90 dias e, comparados com a linhagem QPM não transgênica. Os resultados não mostraram qualquer efeito negativo aos ratos alimentados com este milho transgênico, concluindo que este é um alimento nutritivo e seguro, assim como a linhagem QPM (HE et al., 2009).

Além de proteínas de outras espécies de plantas, proteínas animais também têm sido pesquisadas para melhoria dos teores de aminoácidos essenciais no milho. Bicar e colaboradores (2008) expressaram a proteína α-lactoalbumina do leite nos grãos de milho e obtiveram 2 eventos transformados. A transformação foi confirmada por Southern blot e pelo Western blot. Os teores de lisina nos grãos transformados tiveram um aumento de 29 a 47% em relação aos controles.

Outra proteína heteróloga que está sendo pesquisada como alternativa para melhoria da qualidade nutricional do milho é a zeolina, que foi sintetizada inicialmente por Mainieri et al. (2004) para estudar o acúmulo e a localização subcelular em tabaco, investigando se o domínio da γ-zeína era capaz de alterar o endereçamento da faseolina.

2.5.2.1 A zeolina

A zeolina é uma proteína formada pelas principais proteínas de armazenamento do milho e do feijão. As γ-zeínas que são acumuladas no retículo endoplasmático e as faseolinas

que são acumuladas em vacúolos de armazenamento (MÜNTZ, 1998; LENDING; LARKINS, 1989).

Por ser uma proteína quimérica, é composta por 421 aminoácidos da faseolina T343F do feijão, um peptídeo sinal seguido por uma sequência de ligação de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ ligado à região N-terminal da γ-zeína, que compreende 89 aminoácidos (Figura 4) (MAINIERI et al., 2004).

1	MMRARVPLLL	LGILFLASLS	ASFATSLREE	EESQDNPFYF	NSDNSWNTLF	KNQYGHIRVL	60
61	QRFDQQSKRL	QNLEDYRLVE	FRSKPETLLL	PQQADAELLL	VVRSGSAILV	LVKPDDRREY	120
121	FFLTSDNPIF	SDHQKIPAGT	IFYLVNPDPK	EDLRIIQLAM	PVNNPQIHEF	FLSSTEAQQS	180
181	YLQEFSKHIL	EASFNSKFEE	INRVLFEEEG	QQEGVIVNID	SEQIKKLSKH	AKSSSRKSLS	240
241	KQDNTIGNEF	GNLTERTONS	LNVLISSIEM	EEGALFVPHY	YSKAIVILVV	NEGEAHVELV	300
301	GPKGNKETLE	YESYRAELSK	DDVFVIPAAY	PVAIKATSNV	NFFGFGINAN	NNNRNLLAGK	360
361	TDNVISSIGR	ALDGKDVLGL	TFSGSGDEVM	KLINKQSGSY	FVDAHHHQQE	QQKGRKGAFV	420
421	YGGGGSGGG	SGGGGGGGGG	CQPPPPVHLP	PPVHLPPPVH	LPPPVHLPPP	VHLPPPVHLP	480
481	PPVHVPPPVH	LPPPPCHYPT	QPPRPQPHPQ	PHPCPCQQPH	PSPCQ		

Figura 4 - Sequência de aminoácidos da proteína quimérica zeolina. Os resíduos 1 ao 421 representam a sequência completa da faseolina. O peptídeo sinal N-terminal está marcado em cinza-escuro e a sequência de ligação sintética está em cinza-claro. Os resíduos 437 ao 525 correspondem aos 89 resíduos da γ-zeína (MAINIERI et al., 2004)

Várias proteínas vegetais de armazenamento, em vez de viajar diretamente a partir do RE para o complexo de Golgi e em seguida, ao seu destino final, formam grandes agregados chamados de corpos proteicos dentro do retículo endoplasmático (VITALE et al., 2004), como é o caso da γ-zeína, que dá essa característica à zeolina.

Conforme Mainieri et al. (2004), a γ-zeína de 27 kDa, é formada pelo domínio PPPVHL repetido oito vezes ("tandem repeat"), seguido por um domínio rico em prolina (domínio "Pro-rich") e um domínio C-terminal rico em cisteína (domínio "Cys-rich").

O acumulo de γ-zeína no RE pode acontecer tanto em tecidos vegetativos quanto de reserva, mesmo na ausência das demais classes de zeínas. O que indica que o domínio N-terminal rico em prolina e o domínio C-terminal rico em cisteína determina a retenção no RE, através da interação com a membrana ou através de uma associação entre as proteínas. Assim, nenhum outro fator tecido específico pode ser requerido. Isto está de acordo com os resultados obtidos com *Arabidopsis*, em que houve acúmulo da γ-zeína mesmo sendo uma proteína de reserva do grão de milho (GELI; TORRENT; LUDEVID, 1994). Esta hipótese também foi reportada em outro trabalho em que a zeolina foi expressa em alfafa, resultando em um acúmulo nas folhas de 0,22 mg a 0,28 mg de zeolina/g de peso fresco, aproximadamente 0,35% do total da proteína solúvel. Os autores acreditam que a porção de γ-zeína presente na proteína de fusão é suficiente para induzir a formação de proteína no interior do corpo do retículo endoplasmático (BELLUCCI; MARCHIS; ARCIONI, 2007).

Bellucci, Marchis e Arcioni (2007) mostraram que a zeolina pode acumular também no cloroplasto a níveis mais baixos do que no retículo endoplasmático, porém sua estabilidade é comprometida pela atividade proteolítica do cloroplasto. Nesta organela a zeolina não é armazenada em corpos proteicos, nem os polipeptídeos parecem estar ligados por ligações dissulfeto inter-cadeias, que são geralmente formadas pelas seis cisteínas da porção γ-zeína, o que indica o dobramento anormal da proteína recombinante.

A faseolina faz parte da classe das proteínas de reserva 7S, uma das proteínas de leguminosas mais importantes para a nutrição humana. As proteínas de reserva das leguminosas são classificadas de acordo com o seu coeficiente de sedimentação em globulinas 2S, 7S ou 11S. As proteínas nativas 7S são trímeros ou tetrâmeros com polipeptídios heterogêneos com M_r maior ou igual a 40 kDa (CARBONARO, 2006). As subunidades da faseolina são montadas dentro do lúmen do RE e mantidas juntas por interações hidrofóbicas, formando homotrímeros solúveis. Os trímeros seguem então para o complexo de Golgi e desta organela são transportados para os vacúolos de armazenamento, devido a um peptídeo sinal AFVY (FRIGERIO et al., 1998).

Uma hipótese para explicar a estabilidade da zeolina no retículo endoplasmático, é de que a zeolina se torna insolúvel rapidamente, através da formação de pontes dissulfeto e a formação de oligômeros, e devido a associação com chaperonas moleculares BiP ("Binding Protein"). Essa característica de retenção no RE pode ser conferida às outras proteínas através do domínio N-terminal da γ-zeína (domínios "tandem repeat" e "Pro-rich"), sendo que, a formação dos corpos proteicos ocorre mesmo que o domínio C-terminal da γ-zeína não esteja presente, talvez por uma própria tendência das proteínas da classe 7S de formar grandes complexos (MAINIERI et al., 2004).

Os seis resíduos de cisteína presentes na zeolina são responsáveis pela formação das pontes dissulfeto inter-cadeia, sendo um dos responsáveis pela insolubilidade da proteína, o que impede que a mesma trafegue pela via secretória, ocasionando sua retenção no RE com a formação dos corpos protéicos (POMPA; VITALE, 2006).

A zeolina se apresentou como uma proteína duplamente atrativa para ser expressa em milho: por suas características de estabilidade, permitindo um grande acúmulo no endosperma, e por apresentar 25 resíduos de lisina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção do material vegetal e coleta

As sementes de milho (*Zea mays* L.) estudadas neste projeto fazem parte da tese de doutorado da aluna Luciana Ambrozevicius, que transformou sementes híbridas de milho com uma proteína quimérica denominada zeolina, que é uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da γ-zeína do milho sintetizada e descrita inicialmente por Mainieri et al.(2004) e inserida no genoma do milho sob controle de um promotor endosperma específico isolado da γ-kafirina de sorgo. Na transformação foi utilizado o híbrido HiII, que é resultado do cruzamento das linhagens A188 e B73, linhagens estas que são de domínio público. As transformações do híbrido HiII foram realizadas na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas.

No presente projeto, inicialmente, foi necessário propagar o material vegetal da geração F2, estudado por Ambrozevicius (2010), dos seis eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8 e Zeo 10) e do híbrido HiII não transformado (controle HiII), para que obtivéssemos a geração F3, alvo do estudo.

As sementes foram semeadas em sacos plásticos para mudas e após a germinação e teste de transgenia transplantadas em vasos de 20 L (Figura 5 A) mantendo-se 1 planta por vaso, totalizando 10 plantas por evento e 10 plantas para o controle distribuídas inteiramente ao acaso na casa de vegetação (Figura 5 B) no departamento de genética da ESALQ – USP em Piracicaba.



Figura 5 - Condução do experimento em casa de vegetação. A. Plântulas de milho 15 dias após a semeadura. B. Plantas de milho no final do estágio reprodutivo, 70 dias após a polinização

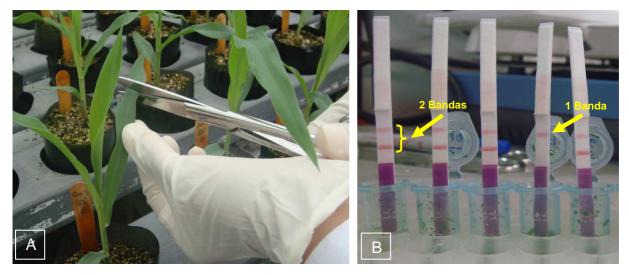


Figura 6 – Método indireto para detecção da transgenia através do teste imunocromatográfico, com tiras de fluxo lateral detectando a proteína PAT, com folha de milho 12 dias após a semeadura. A. Corte do fragmento de folha. B. Tiras de fluxo lateral com resultado positivo e negativo para transgenia

Após 12 dias da germinação todas as plantas foram testadas para identificação da presença do transgene na geração F3 visto que existe segregação na progênie. Esta identificação foi realizada de forma indireta através da detecção da proteína PAT (fosfinotricina acetil transferase) usada como marcador de seleção.

O procedimento consiste em retirar um pequeno pedaço da folha das plântulas germinadas (Figura 6 A), colocar em tubo plástico, acrescentar 750 uL de tampão, macerar com um pistilo, colocar a fita e ler o resultado após 5 min. A presença de uma única banda indica que a amostra é negativa para presença da proteína PAT e a presença de duas bandas indica que a amostra é positiva, ou seja, a planta é transgênica (Figura 6 B).

Como o milho é uma planta alógama, foi realizada a autopolinização controlada das plantas e a coleta de grãos imaturos aos 16, 20 e 24 dias após a polinização (DAP). As espigas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80°C, para posterior extração das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina (AK, HSDH, DHDPS, LOR, SDH).

Foram plantadas sementes extras do controle HiII não transformado a fim de garantir a disponibilidade de pólen para as plantas transformadas, caso não ocorresse sincronização do florescimento, no entanto não foi necessário utilizá-los. No final do ciclo foram coletadas sementes maduras para caracterização de proteínas de reserva, quantificação de aminoácidos e propagação de gerações futuras.

3.2 Proteínas de reserva

3.2.1 Extração de proteínas de reserva

Para extração das proteínas de reserva, foi utilizado o método de Landry, Delhaye e Damerval (2000). Foram utilizados 100 mg de farinha, com 2 repetições. As amostras foram tratadas com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, deixadas para secar overnight. O hexano foi utilizado para solubilizar os lipídeos presentes na farinha e impedir que estes pudessem interferir na extração proteica.

O processo de extração é sequencial, desta forma foi utilizado o precipitado da extração anterior como pellet da extração seguinte. Durante toda a extração sequencial a amostra foi levemente agitada durante 5 minutos, para auxiliar a solubilização das proteínas. Após a solubilização de cada fração proteica, a amostra foi centrifugada a 9.000 g durante 5 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -70 °C para posterior análise.

Para a extração da primeira fração proteica, as globulinas, foi adicionado à farinha seca 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl por 30 minutos a 4 °C, este processo foi repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram misturados e armazenados.

A fração albumina foi extraída submetendo o pellet anterior a uma nova extração com 1 mL de água Milli-Q por 15 minutos a 4 °C, repetido duas vezes. O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi armazenado, e o sobrenadante da segunda centrifugação foi descartado.

As zeínas foram obtidas em duas frações, zeína I e zeína II. A zeína I foi extraída a partir do pellet anterior, em 1 mL de solução 55% (v/v) 2-propanol e 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol por 30 minutos à temperatura ambiente, este processo foi repetido três vezes e os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram misturados e armazenados. Sequencialmente, a zeína II foi extraída em 1 mL de solução 0,5 M NaCl, pH 10 contendo 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol à temperatura ambiente por 30 minutos, repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos de cada fração foram misturados e armazenados.

A última fração proteica, a glutelina, foi obtida pela extração do pellet anterior com 1 mL de solução 0,5% (p/v) SDS, pH 10, contendo 0,6% 2-mercaptoetanol por 30 minutos à

temperatura ambiente, repetido três vezes. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram misturados e armazenados.

3.2.2 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína de cada fração extraída foi quantificada utilizando-se o Kit da Bio-Rad, segundo o método de Bradford (1976), o qual utiliza soro albumina bovino (BSA) como padrão. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de BSA por regressão linear. A leitura foi realizada por espectrofotômetro (Perkin Elmer – Lambda 40) a 595nm.

3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações do tipo pontes dissulfeto (LAEMMLI, 1970).

A eletroforese de cada fração proteica foi realizada em cuba vertical, utilizando sistema de mini-gel no tamanho de 8,3 x 10,2 cm (Mini Protein II) da Bio-Rad. A concentração do gel foi de 10% de poliacrilamida para todas as frações estudadas.

Para a confecção do gel de resolução (um mini gel) foi utilizado 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M, pH 8,9, 5 mL de água e 100 μL de SDS 10%. Como catalisadores foram utilizados 19 μL de TEMED e 25 μL de persulfato de amônio 1%. Após a polimerização deste gel (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento. Para a confecção deste, foi utilizado 500 μL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM pH 6,7, 2,75 mL de água e 50 μL de SDS 10%. Para a polimerização foram utilizados 10 μL de TEMED e 50 μL de persulfato de amônio 1%.

Para cada gel foram aplicados 4 μL de padrão BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen e 6 μg de proteína de cada amostra. Para cada amostra foi adicionado na proporção 1:1 de tampão de amostra, que contém 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de SDS (10%), 400 μL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 400 μL de mercaptoetanol.

A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de corrida contém 25 mM TRIS pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%.

Para a coloração dos géis foi utilizado nitrato de prata. Após a corrida, o gel foi colocado em solução fixadora overnight contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético glacial. Posteriormente, o gel foi colocado em solução incubadora por 15 minutos, contendo 3,4 g de acetato de sódio trihidratado, 15 mL de etanol, 0,2 g de tiossulfato de sódio e 260 μL de glutaraldeído 25%, completando o volume para 50 mL. Posteriormente o gel foi lavado por 45 minutos (3 x 15 minutos) com água destilada e incubado em solução de nitrato de prata por 15 minutos, contendo 0,05 g de nitrato de prata e 10 μL de formaldeído, completando o volume para 50 mL com água destilada. O gel foi colocado em solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio e 5 μL de formaldeído, completando o volume para 50 mL de água destilada, até aparecerem as bandas e posteriormente colocados em solução stop (0,73 g de EDTA em 50 mL de água destilada) para parar a reação de coloração (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.3 Aminoácidos solúveis totais

3.3.1 Extração de aminoácidos solúveis totais

Os aminoácidos solúveis foram extraídos segundo o método de Bieleski e Turner (1966), com duas repetições. Foi utilizado 200 mg de farinha fina e homogênea de sementes maduras de milho com 2 repetições, em 2 mL de MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). A mistura foi mantida overnight a 4 °C e centrifugada a 10.0000 g durante 20 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada para cada 4 mL de MCW utilizado. A amostra foi centrifugada novamente e a fase aquosa formada foi retirada cuidadosamente. A fase coletada foi colocada em banho-maria por 1 h a 38 °C e utilizadas para dosagem de aminoácidos solúveis totais, separação e determinação da composição de aminoácidos solúveis por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

3.3.2 Hidrólise ácida das proteínas de reserva

Foi realizada extração de aminoácidos incorporados em proteínas de todas as frações proteicas individualmente (Globulinas, Albuminas, Zeínas I, Zeínas II e Glutelinas) através da hidrólise ácida de proteínas com HCl 6 N (FOUNTOULAKIS; LAHM, 1998).

Para a hidrólise, foi utilizado 50 µg de proteína de cada fração proteica, com 2 repetições, na proporção de 4 mL de HCl para cada 10 mg de proteína. A mistura foi colocada em tubo eppendorf de 1,5 mL e o volume foi completado com nitrogênio líquido para retirada do oxigênio. Os tubos foram colocados em banho seco a 110 °C durante 22 horas.

A proteína hidrolisada foi centrifugada a 9.000g durante 20 minutos, e o sobrenadante foi liofilizado. As amostras foram ressuspendidas em 30 μL de água Milli-Q para posterior quantificação dos aminoácidos presentes no hidrolisado proteico através de UPLC.

3.3.3 Separação e determinação da composição de aminoácidos por UPLC

A análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi realizada com o sistema Acquity (Waters), coluna BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m), fluxo de 0,7 mL/min e temperatura da coluna de 46 °C.

Foram utilizados para a derivatização 70 μ L de tampão borato, 10 μ L da amostra contendo os aminoácidos e 20 μ L do derivatizante (AccQ - fluor). Após, a mistura foi colocada em banho seco a 55 °C por 10 minutos e inserida em tubos específicos para injeção da amostra. O volume da injeção foi de 1 μ L e a detecção ocorreu através de comprimento de onda de 260 nm.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas em relação à curva padrão de concentrações conhecidas dos aminoácidos histidina, serina, arginina, glicina, aspartato, glutamato, treonina, alanina, prolina, lisina, tirosina, metionina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina.

3.4 Extração e purificação parcial das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina

Para a extração das enzimas foram utilizados grãos imaturos provenientes de uma amostragem composta, composta por 3 espigas oriundas de diferentes plantas, de cada evento para cada um dos estágios de 16, 20 e 24 DAP. Os grãos com 16, 20 e 24 DAP foram

trituradas em almofariz em nitrogênio líquido para manter as amostras congeladas até obtenção de um material com aspecto de farinha fina e homogênea.

Para a extração das enzimas da síntese de lisina: AK, HSDH e DHDPS foram utilizados diferentes tampões, descritos a seguir.

Para extração da enzima AK os grãos imaturos macerados foram homogeneizados com tampão de extração (50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM L-lisina, 2 mM L-treonina, 10% (v/v) glicerol, 0,1 mM PMSF e 5% (p/v) PVPP) na proporção 1:2 (10 g de material para 20 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo (AZEVEDO et al., 2003).

Para a enzima HSDH os grãos imaturos foram homogeneizados com tampão de extração (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 mM L-treonina, 10% (v/v) glicerol, 0,1 mM PMSF e 5% (p/v) PVPP) na proporção 1:2 (5 g de material para 10 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo (AZEVEDO et al., 2003).

Para extração da enzima DHDPS os grãos imaturos foram homogeneizados com tampão de extração (100 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1,4% (p/v) ácido ascórbico e 5% (p/v) PVPP) na proporção 1:2 (10 g de material para 20 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo.

Para extração das enzimas de degradação de lisina LOR e SDH os grãos imaturos macerados foram homogeneizados com tampão de extração na proporção 1:2 (5 g de material para 10 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo. Foi utilizado tampão de extração 100 mM fosfato de potássio (pH 7,0), contendo 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10% (v/v) glicerol e 5% (p/v) PVPP (GAZIOLA et al., 1997).

Para cada enzima os extratos foram centrifugados a 9.000 g por 30 minutos. Os restos celulares precipitados foram descartados, o sobrenadante, denominado de extrato bruto, foi submetido à precipitação com sulfato de amônio. Todo o processo de extração foi conduzido a 4 °C.

3.4.1 Precipitação com sulfato de amônio

Neste procedimento de purificação de proteínas, uma quantidade recomendada de sulfato de amônio sólido para a precipitação de proteínas na faixa de 30% - 60% (Figura 7) foi adicionada vagarosamente ao extrato enzimático e homogeneizado por agitação lenta (em agitador magnético) durante aproximadamente 30 minutos, até a completa dissolução do sal e

posteriormente centrifugadas a 9.000 g durante 30 minutos. Todo o processo foi conduzido a 4 °C e o precipitado obtido foi armazenado em freezer a -80 °C. Método adaptado de Dawson e colaboradores (1969).

F.	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
P.																	
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	242	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80												14				77	157
90																	79

F. P. = Faixa de Precipitação.

Figura 7 - Precipitação com sulfato de amônio (g/L). A faixa de precipitação requerida é a referência para a quantidade de sulfato de amônio a ser utilizado nas amostras

3.4.2 Dessalinização das amostras

Foram utilizadas colunas Sephadex G-25 equilibradas com 5X o volume da coluna com o tampão de eluição respectivo para cada enzima. Amostras coletadas desta coluna foram utilizadas para a determinação da atividade específica para cada enzima. Todo o processo foi conduzido a 4 °C.

O precipitado da amostra contendo AK, obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 25 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT, 0,1 mM L-lisina, 0,1 mM L-treonina e 10% (v/v) de glicerol.

O precipitado da amostra contendo HSDH, obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 mM L-treonina e 10% (v/v) de glicerol.

O precipitado da amostra contendo DHDPS, obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 2 mM EDTA e 1,4% (p/v) ácido ascórbico.

O precipitado da amostra contendo LOR e SDH, obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT, 1 mM EDTA e 10% (v/v) glicerol.

O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

3.4.3 Ensaio enzimático da AK

A determinação da atividade da enzima AK baseada no ensaio do hidroxamato fornece uma medida indireta da atividade da enzima (PECHERE; CAPONY, 1968). A hidroxilamina é convertida a hidroxamato ao reagir com o acil-fosfato, formado pela reação da enzima na fosforilação do aspartato, e o hidroxamato presente pode então ser medido por espectrofotometria a um comprimento de onda de 505 nm.

O ensaio da atividade da AK foi conduzido num volume final de 500 μL de acordo com a metodologia (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992). A mistura do ensaio foi composta por 100 μL de tampão 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT e 20% (v/v) glicerol, 100 μL 250 mM ácido aspártico (pH 7,4), 50 μL 125 mM sulfato de magnésio, 50 μL 200 mM ATP (pH 7,4), 50 μL hidroxilamina 4 M (pH 7,4), 50 μL água destilada, 100 μL extrato enzimático. Controles contendo 50 μL L-lisina 100 mM, 50 μL L-treonina 100 mM e 50 μL L-lisina e L-treonina 100 mM, foram adicionados no ensaio para identificar possíveis isoenzimas sensíveis a lisina e treonina. Para o branco o substrato da enzima (ácido aspártico) foi substituído por água destilada. O ensaio foi iniciado pela adição do ATP e incubado por 60 minutos a 35 °C. A reação foi finalizada pela adição de 500 μL de cloreto férrico 670 mM contendo 370 mM HCl e 20% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). Para remoção dos precipitados proteicos formados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm (Perkin Elmer – Lambda 40), com três repetições.

3.4.4 Cálculo da atividade da AK

A quantidade de hidroxamato formado foi determinada em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de DL-aspartato-β-hidroxamato, por regressão linear, baseado na

leitura em espectrofotômetro (Perkin Elmer – Lambda 40) a 505 nm. A atividade específica da enzima em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína, foi obtida dividindo-se a quantidade de hidroxamato formada na reação pela quantidade de proteína da amostra e pelo tempo de ensaio em minutos.

3.4.5 Ensaio enzimático da HSDH

O ensaio de HSDH foi baseado na reação reversa da enzima, que consiste na formação do aspartato semialdeído utilizando a homoserina como substrato e o NADP⁺ como co-fator reduzindo-o a NADPH. A determinação da atividade da enzima é, portanto, a medida da formação de NADPH, a qual foi realizada por espectrofotômetro (Milton Roy, Genesys 5) a 340 nm, com três repetições.

A mistura de ensaio num volume final de 1 mL foi conduzido como descrito por Azevedo et al. (1992). Foi utilizado 800 μL Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) contendo 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 100 μL homoserina 200 mM, 100 μL NADP⁺ 4,8 mM e 100 μL extrato enzimático. Controle contendo 10 μL treonina 500 mM (concentração final de 5 mM) foi adicionado no ensaio para verificar o efeito deste aminoácido na atividade da enzima. No ensaio denominado branco, foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NADP⁺ sem a adição do substrato da enzima (homoserina) o qual foi substituído pelo tampão de ensaio Tris-HCl (pH 9,0).

A reação foi iniciada pela adição do co-fator NADP⁺ e a absorbância a 340 nm determinada imediatamente após o início da reação (tempo inicial) e posteriormente incubadas por 30 minutos a 30 °C, e realizada novamente a leitura de absorbância após a incubação (tempo final). A atividade da enzima foi verificada pelo aumento na absorbância a 340 nm. O ensaio de cada amostra foi feito com três repetições.

3.4.6 Cálculo da atividade da HSDH

Para o cálculo foi utilizada a diferença entre a absorbância no tempo final e no tempo inicial, descontando-se o branco (redução inespecífica do NADP⁺). A atividade específica da enzima em ηmol NADP⁺ reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ proteína foi calculada considerando que cada ηmol de NADP⁺ reduzido a NADPH representa um aumento de 0,00622 na absorbância a 340 nm, assim a quantidade de NADPH formada foi dividido pelo tempo de incubação em minutos e pela quantidade de proteína presente na amostra.

3.4.7 Ensaio enzimático da DHDPS

A determinação da atividade da DHDPS foi realizada pela reação de condensação do piruvato e do β-aspartato semialdeído (ASA) para formação de 4-hidroxi-2,3,4,5tetrahidrodipicolinato. O ensaio em um volume final de 500 µL foi conduzido como descrito por Varisi et al. (2007), com algumas modificações. A mistura foi composta por 50 µL tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), 50 μL piruvato 100 mM, 50 μL β-aspartato semialdeído (ASA) 10 mM (neutralizado antes do uso com NaOH), 100 µL água destilada e 250 µL do extrato da enzima. Controles contendo 100 µL L-lisina 5 mM e 25 mM (concentração final de 1 mM e 5 mM) e 100 μL aminoetil L-cisteína (AEC), um análogo sintético da lisina, 5 mM e 25 mM (concentração final de 1 mM e 5 mM) foram utilizados para determinar o efeito destes aminoácidos na atividade da enzima. Para o branco, o substrato da enzima (ASA) foi substituído por água destilada. O ensaio foi incubado a 35 °C por 60 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 500 µL da solução stop contendo 220 mM ácido cítrico, 550 mM fosfato de sódio e 0,25 mg.mL⁻¹ o-aminobenzaldeído dissolvido em etanol (ABA). O ensaio foi novamente incubado a 35 °C por 60 minutos para permitir a coloração. Após a incubação os ensaios foram centrifugados a 12.000 g durante 10 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 520 nm (Perkin Elmer – Lambda 40), com três repetições.

3.4.8 Síntese do \(\beta\)-aspartato semialdeído (ASA)

O β-aspartato semialdeído (ASA) foi obtido pela ozonólise da DL-alilglicina. Para a produção do ASA, 2,3 g (20 mM) de DL-alilglicina foram dissolvidos em 20 mL HCl 1 N e submetido ao processo de ozonólise, sendo a solução mantida em banho de gelo durante 120 minutos até a conversão completa da DL-alilglicina a β-aspartato semialdeído (BLACK; WRIGHT, 1955). A solução contendo ASA foi subdivida em frações contendo 1 mL e mantidas congeladas em meio ácido para manter a solução estável, sendo neutralizada pela adição de NaOH, somente na hora do uso.

3.4.9 Cálculo da atividade da DHDPS

A atividade da DHDPS foi determinada em unidades da enzima.mg⁻¹ proteína, sendo que 1 unidade da enzima foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima que

produz uma alteração na absorbância a 520 nm de 0,001.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína (WALLSGROVE, R M; MAZELIS, 1980).

3.4.10 Ensaio enzimático da LOR

A determinação da atividade enzimática da LOR foi baseada na reação de condensação de lisina e 2-oxoglutarato para formação de sacaropina, utilizando NADPH como co-fator, oxidando-o à NADP.

O ensaio foi conduzido para um volume final de 900 μ L, como descrito por Gaziola et al. (1997). A mistura do ensaio foi composta por 720 μ L 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 60 μ L L-lisina 300 mM, 30 μ L ácido α -cetoglutárico 300 mM (neutralizado com KOH), 30 μ L NADPH 4,2 mM e 60 μ L do extrato enzimático. A atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica da NADPH foi medida pelo ensaio sem adição do substrato lisina (branco). A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático e a absorbância a 340 nm foi determinada em espectrofotômetro (Milton Roy, Genesys 5), foi determinada imediatamente após o início da reação (tempo inicial) e posteriormente depois de um período de 15 minutos de incubação a 30 $^{\circ}$ C (tempo final). A atividade da enzima foi verificada pela queda na absorbância a 340 nm. O ensaio de cada amostra foi feito com três repetições.

3.4.11 Cálculo da atividade da LOR

Para obter a atividade da enzima foi calculada a diferença entre a absorbância no tempo inicial e absorbância no tempo final (após 15 minutos de incubação), descontando-se o branco. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de 1 ηmol de NADPH.min⁻¹, que representa uma queda na absorbância a 340 nm de 0,00622. A atividade específica da enzima foi descrita em ηmol de NADPH oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, dividindo a quantidade de NADPH oxidado pelo tempo reação em minutos e pela quantidade de proteína presente na amostra.

3.4.12 Ensaio enzimático da SDH

A SDH atua no segundo passo da degradação da lisina, e a determinação de sua atividade foi baseado na reação de conversão da sacaropina em 2-aminoadipato semialdeído e acido glutâmico, utilizando o NAD⁺ como co-fator, reduzindo-o à NADH.

O ensaio para atividade de SDH foi realizado num volume final de 900 μL, como descrito por Gaziola et al. (1997). Foi utilizado 600 μL Tris-HCl 100 mM (pH 8,4), 90 μL sacaropina 20 mM, 90 μL NAD⁺ 20 mM e 120 μL do extrato enzimático. A atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NAD⁺ foi medida num ensaio sem adição do substrato sacaropina (branco). A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático e a absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (Milton Roy, Genesys 5) foi determinada imediatamente após o início da reação (tempo inicial) e posteriormente depois de incubadas por 15 minutos a 30 °C (tempo final). A atividade da enzima foi verificada pelo aumento na absorbância a 340 nm. O ensaio de cada amostra foi feito com 3 repetições.

3.4.13 Cálculo da atividade da SDH

O cálculo da atividade da SDH segue o mesmo procedimento descrito para LOR, descrito no item 3.2.10. A atividade específica da enzima foi descrita em ηmol de NAD⁺ reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

4 RESULTADOS

4.1 Proteínas de Reserva

A extração das proteínas de reserva do milho foi realizada com sementes maduras de cada um dos eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10) e do controle HiII), com 2 repetições. Todos os materiais encontravam-se na terceira geração de autofecundação (F3).

A Tabela 1 apresenta a concentração de cada fração protéica expressas em mg.mL⁻¹, com respectivo desvio padrão. A concentração total de proteínas foi maior no evento de transformação Zeo 10 (3,16 mg.mL⁻¹), seguido por Zeo 8 (3,14 mg.mL⁻¹) e pelo controle HiII (3,10 mg.mL⁻¹). Os outros eventos vêm em seguida com pequenas diferenças entre si.

Tabela 1 - Concentração das proteínas de reserva de sementes maduras de milho expressos em mg.mL⁻¹ e o desvio padrão ±

	Proteínas de reserva													
	Globu	ılina	Albun	ninas	Zeín	a I	Zeín	a II	Glute	Total				
	mg.mL ⁻¹	±	mg.mL ⁻¹	±	mg.mL ⁻¹	±	mg.mL ⁻¹	±	mg.mL ⁻¹	±	mg.mL ⁻¹			
Zeo 3	1,25	±0,05	0,09	±0,03	0,92	±0,13	0,19	±0,01	0,47	±0,06	2,91			
Zeo 4	1,19	$\pm 0,11$	0,07	$\pm 0,01$	0,71	$\pm 0,02$	0,17	$\pm 0,00$	0,40	$\pm 0,02$	2,54			
Zeo 5	1,16	$\pm 0,04$	0,10	$\pm 0,00$	0,83	$\pm 0,06$	0,13	$\pm 0,04$	0,41	$\pm 0,08$	2,63			
Zeo 6	1,56	$\pm 0,09$	0,07	$\pm 0,02$	0,76	± 0.07	0,20	±0,02	0,39	±0,02	2,99			
Zeo 8	1,37	$\pm 0,04$	0,12	$\pm 0,01$	0,98	±0,02	0,21	$\pm 0,00$	0,46	$\pm 0,05$	3,14			
Zeo 10	1,53	$\pm 0,01$	0,07	$\pm 0,01$	0,94	$\pm 0,10$	0,17	±0,02	0,45	±0,02	3,16			
HiII	1,32	±0,03	0,07	±0,02	0,98	±0,12	0,22	±0,01	0,52	±0,02	3,10			

4.2 Perfil proteico por SDS-PAGE

Quando se comparou o perfil proteico do controle HiII em relação aos eventos transformados, diferenças qualitativas e quantitativas foram observadas.

A fração globulina (Figura 8) foi a fração que apresentou a maior quantidade de bandas, (até 29 bandas) com massas moleculares variando entre 12,00 kDa e 111,26 kDa (Figura 8). No evento Zeo 6 e no evento Zeo 5 duas bandas se destacam, de 25 kDa e próxima a 27 kDa, nos outros eventos essa banda de 25 kDa é fraca e no controle HiII está ausente. No evento Zeo 6 a banda de 60 kDa também apresentou um aumento na intensidade quando comparada ao controle HiII e aos outros eventos transformados. Além disso, uma banda

próxima a 70 kDa foi detectada no evento Zeo 6 com forte intensidade, sendo que, esta mesma banda não está presente nos eventos Zeo 5 e Zeo 8, mas está presente no controle HiII. As demais bandas apresentaram intensidades semelhantes em todos os materiais estudados.

Na fração albumina foi possível visualizar proteínas com massas moleculares variando entre 12,75 kDa e 93,83 kDa (Figura 9), totalizando 17 bandas. Essa fração apresentou uma grande variação entre as intensidades das bandas comparando-se os eventos transgênicos com o controle HiII. Nos eventos Zeo 5 e Zeo 10 houve uma redução na intensidade das bandas com massa próximos de 15, 25, 27, 38 e 50 kDa em relação ao controle HiII.

A fração zeína I (Figura 10) é caracterizada por apresentar um número reduzido de proteínas. Foram detectadas até 9 bandas com massa molecular variando entre 10,33 kDa e 82,50 kDa. As bandas predominantes foram aquelas com massa em torno de 25 kDa. Nesta fração proteica, variações qualitativas foram observadas. As bandas próximas a 30 kDa e 70 kDa desaparecem nos eventos Zeo 3, Zeo 4, Zeo 6 e Zeo 10 em relação ao controle HiII. A proteína de 30 kDa, foi detectada no evento Zeo 5 e a outra, com 70 kDa, foi detectada no evento Zeo 8.

Com massas moleculares variando entre 7,37 kDa e 136,40 kDa a fração zeína II (Figura 11) apresentou até 13 bandas nos eventos transformados e no controle HiII. No evento Zeo 4 foi observado a presença de uma banda com massa molecular próxima a 120 kDa que não esta presente no controle HiII e em nenhum outro evento transformado. Também no evento Zeo 3 foi detectada uma banda de 60 kDa com fraca intensidade que não está presente nem no controle HiII, nem nos outros eventos transformados.

Na última fração, glutelina, foi possível detectar até 27 proteínas com massas moleculares variando entre 11,52 kDa e 216,16 kDa (Figura 12). Destacam-se com maior intensidade bandas próximas a 20, 50 e 100 kDa em todo perfil proteico. No evento Zeo 8 as bandas próximas a 48, 50, 60 e 10 kDa foram mais intensas em relação aos outros eventos e o controle HiII. As bandas próximas a 10, 48, 50 e 60 kDa tiveram um aumento de intensidade no evento Zeo 8 em relação ao controle HiII. Para os demais eventos, alterações de intensidade nestas bandas não foram verificadas. Já a banda próxima de 20 kDa apresentou maior intensidade no evento Zeo 6 em relação ao controle HiII, e manteve-se constante nos demais eventos.

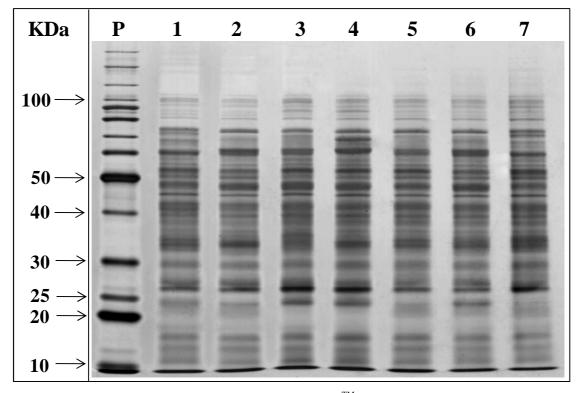


Figura 8 - SDS-PAGE da fração Globulina. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo, 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

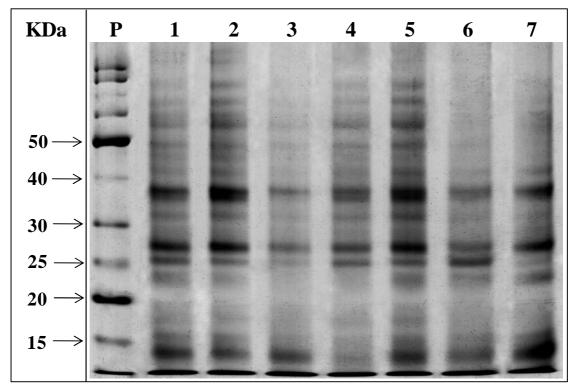


Figura 9 - SDS-PAGE da fração Albumina. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

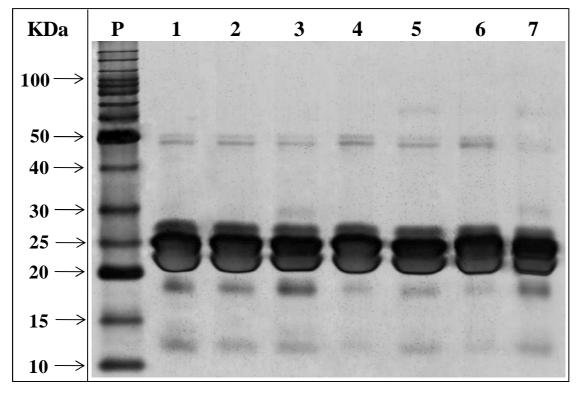


Figura 10 - SDS-PAGE da fração Zeína I. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

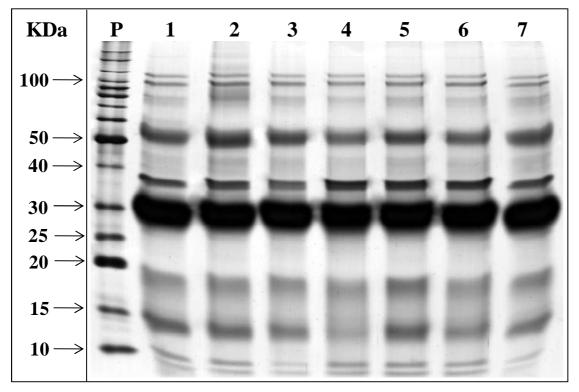


Figura 11 - SDS-PAGE da fração Zeína II. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

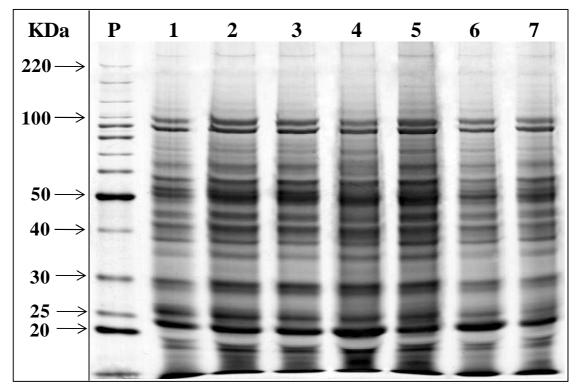


Figura 12 - SDS-PAGE da fração Glutelina. P. Padrão BenchMarkTM Protein Ladder; 1-6. Eventos transformados (Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5, Zeo 6, Zeo 8, Zeo 10); 7. Controle HiII não transformado

4.3 Teor de aminoácidos em cada fração proteica

Em cada uma das frações proteicas foram separados e quantificados até 14 aminoácidos incorporados, são eles: histidina, serina, arginina, asparagina, glutamina, treonina, alanina prolina, lisina, tirosina, metionina, valina, leucina e fenilalanina.

Na composição de aminoácidos na fração globulina (Tabela 2) o conteúdo total de aminoácidos variou entre 6,228 ng.mg⁻¹ de proteína no controle HiII a 15,539 ng.mg⁻¹ de proteína no evento Zeo 3. Mostrando uma predominância dos aminoácidos histidina (His), asparagina (Asp), glutamina (Glu) e alanina (Ala). O maior conteúdo total de aminoácidos encontrado no evento Zeo 3 foi devido aos teores superiores dos aminoácidos histidina, aspartato e valina (Val) com 3,031; 6,870 e 0,931 ng.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Como pode ser observado o controle HiII apresentou conteúdo total de aminoácidos inferior a todos os materiais transgênicos, devido a diminuição de quase todos os aminoácidos, exceto arginina, asparagina e prolina (Pro) que se mantiveram semelhantes aos eventos transformados. Houve incremento na composição de lisina (Lys) em quase todos os eventos transformados, exceto para Zeo 3, em relação ao HiII. Em relação ao controle HiII, também

foram observados incrementos nos teores de treonina (Thr) e metionina (Met) nos eventos Zeo 5 e Zeo 6, respectivamente.

Na fração albumina (Tabela 3) o conteúdo de aminoácidos totais variou entre 6,045 a 17,058 ng.mg⁻¹ de proteína, para os eventos Zeo 3 e Zeo 10, respectivamente. Houve uma predominância dos aminoácidos arginina, asparagina, glutamina e alanina. O evento Zeo 10 apresentou o maior conteúdo de aminoácidos totais, devido os altos níveis dos aminoácidos serina (Ser), treonina, tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), arginina, asparagina e glutamina. Já o evento Zeo 3 teve redução no teor de praticamente todos os aminoácidos, inclusive a lisina que teve o menor valor em relação aos outros eventos e o controle HiII, com apenas 0,103 ng.mg⁻¹ de proteína. Quase todos os eventos transformados apresentaram uma redução no teor dos aminoácidos não essenciais arginina, glutamina e alanina quando comparados com o controle HiII. O evento Zeo 8 foi o que apresentou o maior conteúdo de lisina e treonina, 0,579 e 1,259 ng.mg⁻¹ de proteína, respectivamente, quando comparados ao controle HiII e aos outros eventos.

A fração zeína I (Tabela 4) contabilizou teor total de aminoácidos superior as outras frações, com valores de 31,703 ng.mg⁻¹ de proteína no controle HiII a 56,742 ng.mg⁻¹ de proteína no evento Zeo 3. Os aminoácidos alanina, prolina, tirosina e fenilalanina foram predominantes. Todos os eventos transformados apresentaram maior conteúdo total de aminoácidos em relação ao controle HiII. Porém os valores de lisina são os menores entre todas as frações, mesmo com um pequeno aumento no nível de lisina nos eventos transformados (exceto no evento Zeo 5) quando comparados ao controle HiII. Outro aminoácido da rota metabólica do ácido aspártico que aumentou nos eventos transformados em relação ao controle HiII foi a treonina, enquanto no controle HiII o teor foi de 0,597 ng.mg⁻¹ de proteína, no evento Zeo 8 chegou a 1,601 ng.mg⁻¹ de proteína. Por outro lado o teor de metionina caiu de duas a três vezes em todos os eventos transformados em relação ao controle HiII.

A fração zeína II (Tabela 5) apresentou conteúdo total de aminoácidos variando de 3,577 ng.mg⁻¹ de proteína no evento Zeo 8 a 46,721 ng.mg⁻¹ de proteína no controle HiII. Os aminoácidos predominantes nesta fração foram histidina, prolina, glutamina e tirosina. O controle HiII apresentou um teor total de aminoácidos muito maior que os eventos transformados devido a elevada concentração de todos os aminoácidos. Dentre os eventos, Zeo 5 foi que se destacou com altos teores de quase todos os aminoácidos, a lisina foi um deles com uma concentração de 0,535 ng.mg⁻¹ de proteína.

Na fração glutelina (Tabela 6) o conteúdo total de aminoácidos variou entre 7,203 ng.mg⁻¹ de proteína a 36,541 ng.mg⁻¹ de proteína para os eventos Zeo 6 e Zeo 4, respectivamente. Os aminoácidos predominantes foram a prolina, a tirosina e a fenilalanina. Nesta fração foram observados os maiores níveis de lisina entre todas as frações. O maior teor deste aminoácido foi observado no evento Zeo 4, com 2,016 ng.mg⁻¹ de proteína. Em contraste o evento Zeo 6, que apresentou a menor quantidade de aminoácidos totais, também foi o que apresentou a menor teor de lisina, com 0,198 ng.mg⁻¹ de proteína.

 $Tabela\ 2\ -\ Teor\ de\ amino\'acidos\ na\ fração\ Globulina\ de\ sementes\ maduras,\ valores\ expressos\ em\ ng.mg^{-1}\ de\ prote\'ina,\ \pm\ desvio\ padr\~ao$

_	Globulina													
Aa	Zeo	3	Zec	0 4	Zee	0 5	Ze	eo 6	Ze	o 8	Zeo	10	Hi	II
His	3,031	±0,639	0,185	±0,047	0,207	±0,042	0,374	±0,055	0,156	±0,012	0,415	±0,017	0,173	±0,036
Ser	0,121	$\pm 0,004$	-	-	-	-	0,093	$\pm 0,009$	-	-	-	-	-	-
Arg	0,578	±0,022	-	-	0,629	$\pm 0,172$	0,878	$\pm 0,133$	0,932	$\pm 0,080$	0,931	± 0.097	1,166	$\pm 0,279$
Asp	6,870	$\pm 0,657$	-	-	2,120	$\pm 0,647$	2,655	$\pm 0,222$	1,554	±0,317	2,065	$\pm 0,342$	0,983	$\pm 0,185$
Glu	1,799	$\pm 0,128$	2,179	$\pm 0,104$	3,407	$\pm 0,245$	1,625	$\pm 0,186$	1,597	$\pm 0,353$	1,686	$\pm 0,138$	0,706	$\pm 0,013$
Thr	0,345	$\pm 0,118$	0,416	±0,031	0,631	$\pm 0,053$	0,360	$\pm 0,009$	0,301	$\pm 0,025$	0,303	$\pm 0,003$	0,354	$\pm 0,074$
Ala	-	-	1,220	$\pm 0,071$	2,084	$\pm 0,799$	0,967	$\pm 0,045$	1,009	$\pm 0,157$	0,948	$\pm 0,074$	0,499	±0,023
Pro	-	-	0,883	$\pm 0,015$	0,635	$\pm 0,055$	0,617	$\pm 0,033$	0,987	$\pm 0,132$	0,940	$\pm 0,043$	1,037	$\pm 0,047$
Lys	0,088	$\pm 0,005$	0,761	$\pm 0,064$	0,604	$\pm 0,171$	0,182	$\pm 0,032$	0,460	$\pm 0,090$	0,494	$\pm 0,044$	0,168	±0,019
Tyr	0,581	$\pm 0,105$	0,554	±0,022	0,486	±0,119	0,393	$\pm 0,067$	0,472	$\pm 0,042$	0,520	$\pm 0,069$	0,322	$\pm 0,047$
Met	0,275	$\pm 0,161$	0,211	±0,120	0,216	$\pm 0,051$	0,894	$\pm 0,124$	0,122	$\pm 0,007$	0,146	$\pm 0,041$	0,123	±0,003
Val	0,931	$\pm 0,035$	0,473	$\pm 0,041$	0,938	±0,161	0,333	±0,113	0,359	±0,049	0,348	±0,014	0,222	$\pm 0,042$
Leu	0,592	±0,073	0,227	$\pm 0,027$	0,316	$\pm 0,250$	0,190	$\pm 0,020$	0,167	$\pm 0,020$	0,162	$\pm 0,010$	0,186	$\pm 0,044$
Phe	0,327	$\pm 0,041$	0,815	± 0.037	0,451	$\pm 0,060$	0,198	$\pm 0,070$	0,596	$\pm 0,042$	0,610	±0,013	0,289	$\pm 0,170$
Total	15,539		7,924		12,724		9,758		8,712		9,569		6,228	

⁻ teor não detectado

 $Tabela~3~-~Teor~de~amino\'acidos~na~fração~Albumina~de~sementes~maduras,~valores~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~maduras,~valores~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~albumina~de~sementes~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina~expressos~expres$

-	Albumina													
Aa	Ze	eo 3	Zeo	4	Ze	o 5	Ze	o 6	Zeo 8	3	Zeo	10	Hi	II
His	-	-	0,236	±0,086	0,229	±0,055	0,218	±0,033	0,661	±0,132	0,425	±0,082	0,242	±0,064
Ser	0,290	$\pm 0,090$	0,336	$\pm 0,101$	0,671	$\pm 0,100$	0,329	$\pm 0,100$	1,868	$\pm 0,204$	1,083	$\pm 0,091$	0,440	$\pm 0,117$
Arg	1,673	$\pm 0,319$	2,501	$\pm 0,420$	2,904	$\pm 0,056$	1,577	±0,548	1,921	$\pm 0,270$	1,423	$\pm 0,366$	2,799	$\pm 0,514$
Asp	1,876	$\pm 0,203$	2,543	$\pm 0,364$	3,096	$\pm 0,828$	1,264	±0,270	3,332	$\pm 0,183$	3,369	$\pm 0,109$	1,863	$\pm 0,032$
Glu	0,516	$\pm 0,117$	1,634	$\pm 0,183$	1,783	$\pm 0,464$	0,909	±0,569	1,359	$\pm 0,175$	4,154	$\pm 0,264$	1,935	$\pm 0,009$
Thr	0,148	$\pm 0,044$	0,272	$\pm 0,083$	0,429	$\pm 0,115$	0,231	$\pm 0,117$	1,259	$\pm 0,288$	0,918	$\pm 0,100$	0,318	$\pm 0,070$
Ala	0,374	$\pm 0,084$	0,806	$\pm 0,128$	1,497	$\pm 0,357$	0,267	$\pm 0,113$	0,753	$\pm 0,022$	0,566	$\pm 0,093$	0,970	$\pm 0,042$
Pro	0,216	$\pm 0,051$	0,705	$\pm 0,057$	0,949	$\pm 0,231$	0,364	$\pm 0,146$	0,969	$\pm 0,014$	0,706	$\pm 0,106$	0,906	$\pm 0,324$
Lys	0,130	$\pm 0,023$	0,444	$\pm 0,085$	0,374	$\pm 0,094$	0,242	$\pm 0,074$	0,579	$\pm 0,003$	0,322	$\pm 0,080$	0,301	$\pm 0,188$
Tyr	0,289	$\pm 0,092$	0,583	$\pm 0,111$	0,688	$\pm 0,193$	0,429	$\pm 0,168$	0,506	$\pm 0,131$	1,861	$\pm 0,165$	0,785	$\pm 0,156$
Met	0,225	$\pm 0,060$	0,258	$\pm 0,075$	0,218	$\pm 0,100$	-	-	0,204	$\pm 0,026$	0,268	$\pm 0,050$	0,550	$\pm 0,180$
Val	0,114	$\pm 0,067$	0,296	$\pm 0,073$	0,401	$\pm 0,094$	0,187	±0,087	0,195	$\pm 0,094$	0,582	±0,052	0,248	$\pm 0,084$
Leu	-	-	0,141	$\pm 0,040$	0,190	$\pm 0,056$	0,059	±0,083	0,116	±0,025	-	-	0,149	$\pm 0,060$
Phe	0,195	±0,059	0,555	$\pm 0,146$	0,573	$\pm 0,158$	0,378	±0,125	0,574	$\pm 0,140$	1,380	±0,022	0,347	±0,014
Total	6,045		11,309		14,001		6,453		14,297		17,058		11,854	

⁻ teor não detectado

 $Tabela~4~\textbf{-}~Teor~de~amino\'acidos~na~fração~Ze\'ina~I~de~sementes~maduras,~valores~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~na~fração~Ze\'ina~I~de~sementes~maduras,~valores~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~na~fração~Ze\'ina~I~de~sementes~maduras,~valores~expressos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~padrão~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'ina,~\pm~desvio~amino\'acidos~em~ng.mg^{-1}~de~prote\'acidos~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~ng~em~$

	Zeína I													
Aa	Zeo	3	Zeo	4	Zeo	5	Ze	o 6	Zee	0 8	Zeo	10	Hi	П
His	1,102	±0,262	0,986	±0,379	0,987	±0,131	0,607	±0,002	1,107	±0,278	0,685	±0,175	0,376	±0,090
Ser	1,500	$\pm 0,027$	1,157	$\pm 0,177$	1,522	$\pm 0,045$	1,071	$\pm 0,176$	1,669	$\pm 0,041$	1,136	$\pm 0,345$	0,877	$\pm 0,119$
Arg	1,358	$\pm 0,343$	1,027	$\pm 0,292$	1,414	$\pm 0,450$	2,535	±0,315	3,883	$\pm 0,379$	2,792	$\pm 0,546$	1,820	$\pm 0,071$
Asp	2,292	$\pm 0,150$	1,804	$\pm 0,354$	2,187	$\pm 0,071$	1,793	$\pm 0,261$	1,923	$\pm 0,531$	1,896	$\pm 0,316$	1,174	$\pm 0,135$
Glu	1,818	$\pm 0,280$	0,658	$\pm 0,127$	2,162	$\pm 0,544$	1,492	$\pm 0,427$	2,830	$\pm 0,016$	1,766	$\pm 0,615$	1,161	±0,013
Thr	1,555	$\pm 0,341$	1,112	$\pm 0,341$	1,432	$\pm 0,153$	0,928	$\pm 0,521$	1,601	$\pm 0,348$	1,037	±0,239	0,597	±0,096
Ala	12,721	$\pm 2,525$	10,103	$\pm 2,746$	10,451	±0,683	8,283	$\pm 0,980$	11,594	$\pm 2,083$	10,331	$\pm 0,735$	6,829	$\pm 0,483$
Pro	11,245	$\pm 1,903$	7,651	$\pm 2,566$	8,966	±0,943	6,130	$\pm 0,505$	9,800	$\pm 2,172$	6,751	$\pm 1,077$	4,719	$\pm 0,132$
Lys	0,146	$\pm 0,017$	0,147	$\pm 0,015$	0,108	$\pm 0,007$	0,139	$\pm 0,032$	0,123	$\pm 0,001$	0,143	$\pm 0,008$	0,113	$\pm 0,014$
Tyr	4,919	$\pm 0,133$	4,274	$\pm 1,485$	5,202	±0,615	3,283	$\pm 0,228$	4,225	$\pm 1,087$	3,721	$\pm 0,577$	2,550	$\pm 0,124$
Met	0,477	$\pm 0,069$	0,385	$\pm 0,112$	0,365	±0,036	0,245	$\pm 0,025$	0,430	$\pm 0,024$	0,278	$\pm 0,077$	1,114	$\pm 0,145$
Val	2,259	$\pm 0,490$	1,504	$\pm 0,424$	1,985	±0,244	1,279	$\pm 0,037$	1,419	$\pm 0,322$	1,451	$\pm 0,210$	0,967	$\pm 0,138$
Leu	1,457	$\pm 0,558$	0,963	$\pm 0,346$	1,429	±0,232	0,800	$\pm 0,045$	0,962	$\pm 0,293$	0,907	$\pm 0,158$	0,633	$\pm 0,141$
Phe	13,894	$\pm 1,844$	11,298	$\pm 1,721$	17,003	±1,614	11,147	±0,891	13,175	±3,552	12,482	±2,126	8,775	±0,936
Total	56,742		43,070		55,214		39,732		54,742		45,376		31,703	

⁻ teor não detectado

Tabela 5 - Teor de aminoácidos na fração Zeína II de sementes maduras, valores expressos em ng.mg⁻¹ de proteína, ± desvio padrão

	Zeína II													
Aa	Zeo	0 3	Zeo	4	Ze	o 5	Ze	eo 6	Z	eo 8	Zeo	10	HiI	I
His	1,506	±0,317	2,195	±0,112	0,514	±0,046	0,811	±0,137	0,484	±0,057	0,397	±0,064	4,686	±0,241
Ser	0,745	$\pm 0,048$	1,210	$\pm 0,332$	0,325	$\pm 0,022$	0,478	$\pm 0,058$	0,210	$\pm 0,003$	0,255	$\pm 0,010$	3,061	±0,239
Arg	0,668	$\pm 0,027$	0,442	$\pm 0,154$	0,280	$\pm 0,000$	0,394	$\pm 0,065$	0,216	$\pm 0,005$	0,212	±0,012	2,625	$\pm 0,174$
Asp	0,422	$\pm 0,090$	1,098	$\pm 0,149$	0,206	$\pm 0,027$	0,412	$\pm 0,104$	0,140	$\pm 0,040$	0,215	$\pm 0,009$	1,979	$\pm 0,192$
Glu	-	-	1,094	$\pm 0,078$	0,681	$\pm 0,156$	1,464	±0,201	0,652	±0,241	0,839	$\pm 0,184$	9,804	±1,385
Thr	0,442	$\pm 0,133$	1,102	±0,091	0,256	$\pm 0,010$	0,355	±0,059	0,173	$\pm 0,003$	0,200	$\pm 0,025$	2,659	$\pm 0,188$
Ala	0,460	$\pm 0,147$	1,187	±0,026	0,328	$\pm 0,084$	0,366	$\pm 0,058$	0,152	$\pm 0,033$	0,205	$\pm 0,003$	2,505	$\pm 0,406$
Pro	1,403	$\pm 0,576$	1,009	±0,121	0,787	$\pm 0,028$	0,880	$\pm 0,085$	0,440	$\pm 0,109$	0,473	$\pm 0,046$	6,667	±2,050
Lys	0,214	$\pm 0,019$	0,535	±0,019	0,123	$\pm 0,023$	0,147	±0,026	-	-	0,088	$\pm 0,004$	1,175	$\pm 0,188$
Tyr	0,416	$\pm 0,097$	1,704	$\pm 0,050$	0,222	$\pm 0,024$	0,822	$\pm 0,185$	0,607	$\pm 0,284$	0,506	$\pm 0,074$	3,225	±0,069
Met	0,393	$\pm 0,138$	-	-	-	-	0,145	±0,026	0,067	$\pm 0,095$	0,123	$\pm 0,010$	0,857	$\pm 0,030$
Val	0,144	$\pm 0,048$	0,331	$\pm 0,118$	0,218	$\pm 0,046$	0,231	±0,032	0,136	$\pm 0,046$	0,126	$\pm 0,020$	1,794	$\pm 0,418$
Leu	-	-	0,310	$\pm 0,050$	0,000	-	-	-	-	-	-	-	0,627	$\pm 0,089$
Phe	0,179	$\pm 0,053$	0,507	$\pm 0,084$	0,452	$\pm 0,048$	0,629	±0,086	0,299	±0,031	0,360	$\pm 0,004$	5,059	±0,796
Total	6,992		12,725		4,392		7,131		3,577		3,999		46,721	

⁻ teor não detectado

Tabela 6 - Teor de aminoácidos na fração Glutelina de sementes maduras, valores expressos em ng.mg⁻¹de proteína, ± desvio padrão

	Glutelina													
Aa	Zeo	3	Zeo	4	Zeo	5	Ze	o 6	Ze	o 8	Zeo	10	Hi	П
His	2,063	±0,353	2,057	±0,775	1,672	±0,139	0,162	±0,038	0,561	±0,167	0,637	±0,128	0,625	±0,632
Ser	-	-	3,713	±0,813	1,847	±0,134	0,573	$\pm 0,154$	1,049	±0,359	1,548	$\pm 0,373$	1,314	±0,242
Arg	2,630	±0,038	3,013	$\pm 1,082$	2,343	$\pm 0,693$	0,537	±0,126	0,841	$\pm 0,276$	1,170	±0,231	1,183	$\pm 0,662$
Asp	3,510	$\pm 0,155$	2,737	$\pm 0,242$	1,075	$\pm 0,174$	0,564	±0,093	1,154	$\pm 0,428$	2,088	$\pm 0,573$	1,648	$\pm 0,568$
Glu	2,174	$\pm 0,245$	1,138	$\pm 0,155$	-	-	0,672	$\pm 0,079$	1,014	$\pm 0,160$	3,233	$\pm 0,014$	1,958	±0,313
Thr	-	-	2,800	$\pm 0,381$	1,319	$\pm 0,004$	0,492	$\pm 0,127$	0,745	$\pm 0,297$	0,998	$\pm 0,246$	1,176	$\pm 0,571$
Ala	1,920	$\pm 0,084$	2,282	$\pm 0,156$	2,788	$\pm 0,504$	0,641	$\pm 0,097$	1,061	$\pm 0,317$	2,739	$\pm 0,226$	1,245	$\pm 0,286$
Pro	4,655	±1,431	2,391	$\pm 0,738$	2,998	$\pm 0,187$	0,616	$\pm 0,117$	1,013	$\pm 0,258$	2,499	±0,013	0,940	$\pm 0,060$
Lys	1,597	$\pm 0,068$	2,016	$\pm 0,623$	0,766	$\pm 0,055$	0,198	$\pm 0,002$	0,546	$\pm 0,248$	1,390	$\pm 0,500$	0,828	$\pm 0,505$
Tyr	4,148	$\pm 0,504$	4,080	±1,452	2,951	$\pm 0,344$	1,038	$\pm 0,115$	1,373	±0,257	1,628	$\pm 0,187$	1,274	±0,025
Met	0,310	$\pm 0,137$	0,570	$\pm 0,204$	0,415	±0,113	-	-	-	-	-	-	0,208	±0,090
Val	0,982	$\pm 0,146$	2,688	$\pm 0,847$	-	-	0,340	±0,062	0,741	±0,197	1,178	$\pm 0,285$	0,989	±0,531
Leu	0,303	±0,065	1,689	±0,421	1,042	±0,061	0,212	$\pm 0,044$	0,496	±0,218	0,961	$\pm 0,071$	0,692	±0,340
Phe	-	-	5,365	$\pm 0,357$	5,154	$\pm 0,280$	1,186	±0,349	2,037	$\pm 0,671$	5,235	±0,355	4,706	±0,638
Total	24,291		36,541		24,369		7,230		12,630		25,305		18,786	

⁻ teor não detectado

4.4 Teor de aminoácidos solúveis totais

Os aminoácidos solúveis totais (Tabela 7) foram separados por UPLC e quantificados em relação à curva de aminoácidos, determinada por uma concentração conhecida. Na figura 13 pode-se visualizar um dos aminogramas da curva padrão utilizada neste cálculo, com o tempo de retenção de cada um dos 17 aminoácidos detectados. Nos materiais de milho analisados no presente trabalho foram identificados 16 aminoácidos, entre eles: histidina, serina, arginina, glicina, asparagina, glutamina, treonina, alanina prolina, lisina, tirosina, metionina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina.

Os aminoácidos solúveis totais predominantes foram glutamina, alanina e prolina. O conteúdo total de aminoácidos variou entre $2,432~\mu g.100g^{-1}$ de MS no evento Zeo $3~e~6,411~\mu g.100g^{-1}$ de MS no evento Zeo 5.

O teor de todos os aminoácidos essenciais que fazem parte da via metabólica do ácido aspártico (treonina, metionina, leucina e lisina), foi maior nos eventos transformados em comparação ao controle HiII, exceto para o evento Zeo 3 em que o conteúdo de lisina foi menor. No entanto, os aminoácidos não essenciais glicina e alanina também apresentaram um maior teor nos eventos transformados em relação ao controle HiII.

Tabela 7 - Teor de aminoácidos solúveis totais em sementes maduras de milho. Valores expressos em $\mu g.100g^{-1}$ de MS (matéria seca), \pm desvio padrão

	Aminoácidos Solúveis Totais													
Aa	Ze	eo 3	Ze	o 4	Ze	eo 5	Z	eo 6	Ze	eo 8	Zeo	10	Hil	П
His	0,049	±0,004	0,138	±0,100	0,056	±0,001	0,080	±0,030	0,076	±0,006	0,066	±0,005	0,068	±0,010
Ser	0,183	$\pm 0,020$	0,096	$\pm 0,020$	0,446	±0,010	0,293	$\pm 0,080$	0,336	$\pm 0,040$	0,299	$\pm 0,090$	0,206	±0,010
Arg	0,076	$\pm 0,007$	0,090	$\pm 0,004$	0,120	±0,001	0,178	$\pm 0,040$	0,160	±0,010	0,166	< 0,001	0,116	±0,010
Gly	0,069	$\pm 0,008$	0,056	$\pm 0,030$	0,075	$\pm 0,005$	0,056	$\pm 0,020$	0,054	$\pm 0,007$	0,050	< 0,001	0,039	$\pm 0,001$
Asp	0,078	$\pm 0,010$	0,342	$\pm 0,100$	0,313	±0,010	0,419	$\pm 0,100$	0,286	$\pm 0,040$	0,336	< 0,001	0,180	±0,030
Glu	0,418	$\pm 0,020$	0,302	$\pm 0,100$	0,751	±0,003	0,684	$\pm 0,100$	0,942	$\pm 0,100$	0,823	< 0,001	0,499	$\pm 0,050$
Thr	0,085	$\pm 0,006$	0,329	$\pm 0,100$	0,231	±0,004	0,161	$\pm 0,060$	0,177	±0,020	0,147	< 0,001	0,081	±0,020
Ala	0,598	$\pm 0,050$	0,660	$\pm 0,100$	1,666	±0,010	0,764	$\pm 0,100$	0,762	$\pm 0,080$	0,827	< 0,001	0,423	$\pm 0,040$
Pro	0,390	$\pm 0,030$	0,455	$\pm 0,100$	1,518	±0,090	0,720	$\pm 0,100$	1,852	$\pm 0,100$	2,393	$\pm 0,001$	1,402	$\pm 0,060$
Lys	0,022	$\pm 0,001$	0,097	$\pm 0,090$	0,047	±0,001	0,038	$\pm 0,010$	0,045	$\pm 0,005$	0,046	< 0,001	0,029	$\pm 0,003$
Tyr	0,121	$\pm 0,020$	0,079	$\pm 0,070$	0,255	±0,020	0,243	$\pm 0,090$	0,233	±0,030	0,219	< 0,001	0,182	$\pm 0,004$
Met	0,031	$\pm 0,002$	0,093	$\pm 0,100$	0,058	±0,001	0,050	$\pm 0,020$	0,054	$\pm 0,007$	0,045	< 0,001	0,031	±0,010
Val	0,125	$\pm 0,010$	0,087	$\pm 0,020$	0,379	$\pm 0,007$	0,190	$\pm 0,070$	0,231	±0,020	0,189	< 0,001	0,123	$\pm 0,008$
Ile	0,071	$\pm 0,007$	0,054	$\pm 0,001$	0,232	$\pm 0,008$	0,086	$\pm 0,030$	0,155	±0,010	0,083	< 0,001	0,106	$\pm 0,001$
Leu	0,048	$\pm 0,003$	0,059	$\pm 0,020$	0,156	$\pm 0,007$	0,103	$\pm 0,040$	0,106	±0,010	0,081	< 0,001	0,046	$\pm 0,003$
Phe	0,067	$\pm 0,009$	0,049	$\pm 0,020$	0,108	±0,009	0,120	$\pm 0,050$	0,098	±0,010	0,083	<0,001	0,052	<0,001
Total	2,432		2,984		6,411		4,185		5,565		5,852		3,583	

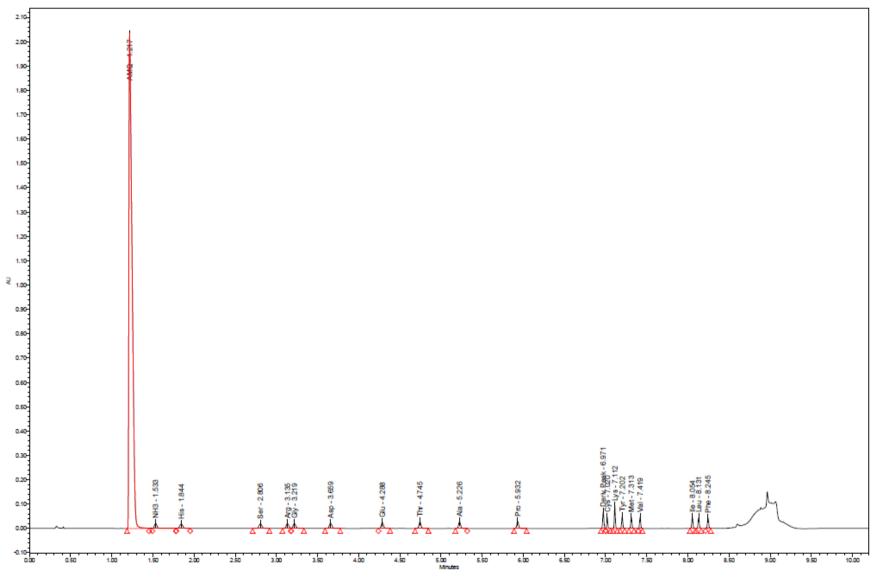


Figura 13 - Aminograma padrão para UPLC. AU: Absorbância; Minutos: tempo de retenção de cada aminoácido, em fluxo de 0,7 mL/min

4.5 Enzimas envolvidas na síntese de lisina

4.5.1 Determinação da atividade específica de AK

A atividade específica da enzima AK foi encontrada nos três estágios de desenvolvimento dos grãos aos 16, 20 e 24 DAP, como pode ser observado nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.

Na Figura 14 observa-se a atividade específica da enzima AK no estágio 16 DAP. O evento de transformação Zeo 8 foi o que apresentou a maior atividade (0,00065 mmol.min⁻¹.mg⁻¹), com um aumento de 3 vezes em relação ao controle HiII. Neste estágio todos os eventos apresentaram atividade específica maior que ao controle HiII, sendo que os eventos que se destacaram são o Zeo 6, Zeo 8 e Zeo 10.

Em 20 DAP (Figura 15) observa-se que o evento Zeo 5 foi o que se destacou com a maior atividade específica, aproximadamente 7 vezes superior ao controle HiII. Este evento também apresentou maior atividade específica em 24 DAP (Figura 16) em relação ao controle HiII, porém nesta fase de desenvolvimento houve um acréscimo de apenas 3 vezes. Importante observar que para todos os estágios de desenvolvimento, no controle HiII, a atividade da enzima AK apresentou menor atividade específica que os eventos que receberam inserção da proteína zeolina.

Ainda, no estágio 20 DAP os eventos Zeo 4, Zeo 5 e Zeo 6 tiveram atividade específica significativamente maior que o controle HiII. Já em 24 DAP respostas significativamente maiores foram detectadas apenas nos eventos Zeo 5 e Zeo 8 em relação ao controle HiII.

Além do ensaio controle, também foram realizados ensaios contendo os aminoácidos treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM. A presença dos aminoácidos testados causou inibição da atividade específica da enzima AK em quase todos os materiais (Tabelas 8, 9 e 10), o que sugere a presença de isoformas de AK sensíveis a cada um destes aminoácidos durante todo o desenvolvimento dos grãos. Vemos que, a lisina foi que provocou maior inibição da atividade total de AK, sugerindo a predominância da isoforma sensível a este aminoácido. Porém, foram detectadas também ativações na atividade de AK nos estágios 16 e 24 DAP, o que nos mostra um resultado contrário ao esperado, pois com as isoformas sensíveis a esses aminoácidos deveria acontecer a inibição da atividade e não sua ativação.

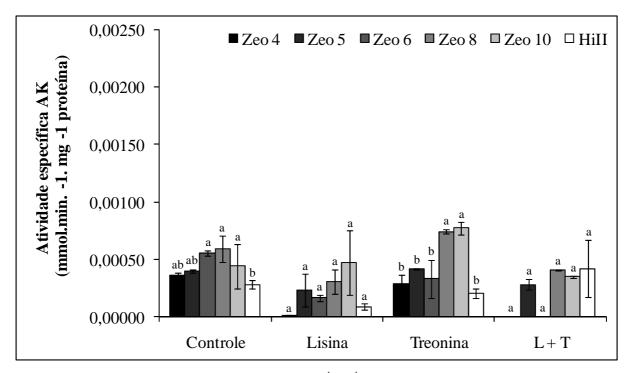


Figura 14 - Atividade específica de AK em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 8 - Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao ensaio controle

% Inibição					
Lisina Treonina L+T					
Zeo 4	96,20	18,96	-		
Zeo 5	41,90	*	29,01		
Zeo 6	70,48	40,19	-		
Zeo 8	48,39	*	31,58		
Zeo 10	*	*	20,37		
HiII	69,21	27,04	*		

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

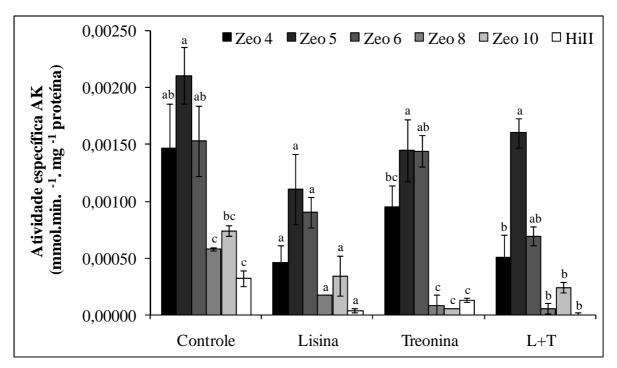


Figura 15 - Atividade específica de AK em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 9 - Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 20 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição						
	Lisina Treonina $L + T$					
Zeo 4	68,59	35,53	65,56			
Zeo 5	47,59	31,19	24,08			
Zeo 6	41,22	5,99	54,78			
Zeo 8	70,88	86,92	90,70			
Zeo 10	54,27	92,20	67,60			
HiII	88,31	59,59	-			

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

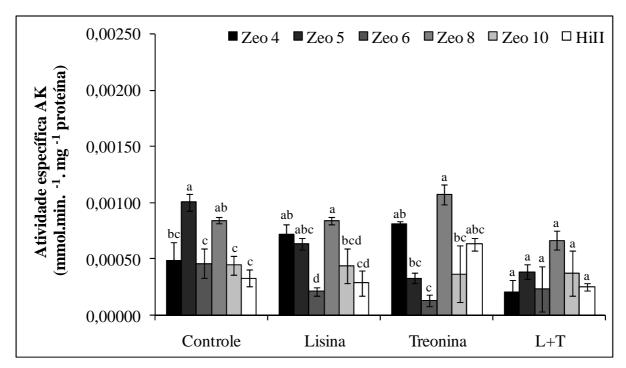


Figura 16 - Atividade específica de AK em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 10 - Inibição da atividade da AK por lisina, treonina e lisina + treonina na concentração de 5 mM no estágio de 24 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição				
	Lys	Thr	L/T	
Zeo 4	*	*	57,95	
Zeo 5	37,22	67,59	61,73	
Zeo 6	54,62	71,69	50,33	
Zeo 8	0,28	*	21,11	
Zeo 10	1,35	17,79	15,82	
HiII	13,11	*	24,51	

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

4.5.2 Determinação da atividade específica de HSDH

A atividade específica da enzima HSDH foi detectada nos três estágios de desenvolvimento dos grãos aos 16, 20 e 24 DAP, como pode ser observado nas Figuras 17, 18 e 19, respectivamente.

O evento Zeo 4 foi o que apresentou a maior atividade específica de HSDH (4,38 mmol.min⁻¹.mg⁻¹) em relação ao controle HiII (3,52 mmol.min⁻¹.mg⁻¹) e aos outros eventos transformados em 16 DAP (Figura 17), neste estágio apenas o Zeo 4 e o Zeo 10 tiveram atividade específica significativamente maior em relação ao controle HiII.

Aos 20 DAP (Figura 18) o controle HiII foi aquele que apresentou a maior atividade específica (5,78 mmol.min⁻¹.mg⁻¹) e significativamente maior em relação aos eventos transformados.

Já no estágio 24 DAP (Figura 19) o evento Zeo 4, que manteve atividade desta enzima constante durante todos os estágios de desenvolvimento, foi aquele que apresentou maior atividade específica, significativamente maior, em relação ao controle HiII e aos demais eventos transformados, com 4,85 mmol.min⁻¹.mg⁻¹. Além do Zeo 4, apenas o evento Zeo 8 e Zeo 10 tiveram atividade específica maior que o controle HiII.

Ensaios na presença de 5 mM de treonina também foram realizados. Observou-se inibição na atividade específica da enzima HSDH em todos os eventos transformados e no controle HiII em todos os estágios estudados (Tabelas 11, 12 e 13). Aos 16 DAP o evento Zeo 8 mostrou a maior inibição da atividade com 31,81%, em 20 DAP o controle HiII apresentou maior inibição com 40,69% e aos 24 DAP o evento Zeo 4 foi o mais sensível, com inibição de 50,28 % na atividade específica da enzima.

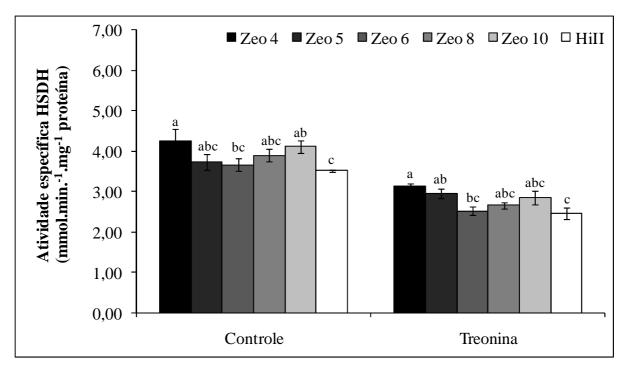


Figura 17 - Atividade específica de HSDH em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 11 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição		
Thr		
26,11		
20,80		
31,04		
31,81		
30,78		
30,18		

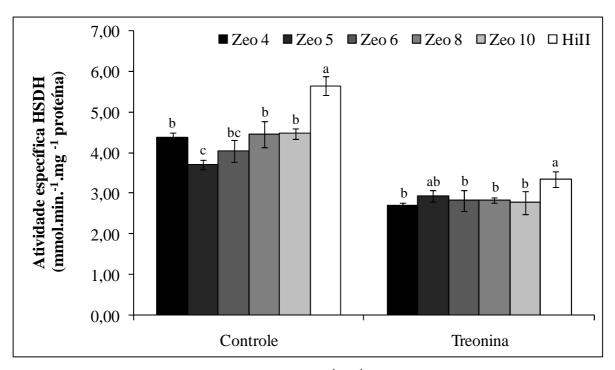


Figura 18 - Atividade específica de HSDH em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 12 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 20 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição		
	Thr	
Zeo 4	38,27	
Zeo 5	21,09	
Zeo 6	30,30	
Zeo 8	36,45	
Zeo 10	38,08	
HiII	40,69	

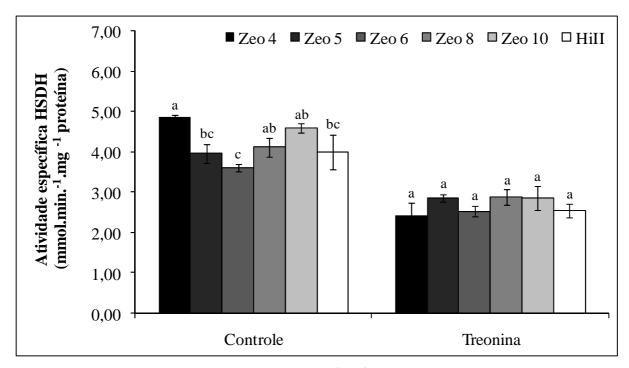


Figura 19 - Atividade específica de HSDH em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. O tratamento corresponde à presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 13 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM no estágio de 24 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição		
	Thr	
Zeo 4	50,28	
Zeo 5	27,72	
Zeo 6	29,75	
Zeo 8	32,70	
Zeo 10	36,00	
HiII	36,65	

4.5.3 Determinação da atividade específica de DHDPS

A atividade específica da enzima DHDPS também foi determinada nos três estágios de desenvolvimento dos grãos aos 16, 20 e 24 DAP (Figuras 20, 21 e 22, respectivamente).

Aos 16 DAP (Figura 20) os eventos Zeo 4 e Zeo 8 foram os únicos que apresentaram atividade específica maior (5,8786 e 4,4743 unidades da enzima.min.⁻¹.mg⁻¹ proteína,

respectivamente) que o controle HiII, que apresentou 4,4035 unidades da enzima.min. -1.mg -1 proteína. Sendo que, apenas o Zeo 4 teve diferença significativamente maior.

Em 20 DAP (Figura 21) o evento Zeo 6 foi o único que apresentou atividade específica (5,2398 unidades da enzima.min.⁻¹.mg⁻¹ proteína) maior que o controle HiII (4,1831 unidades da enzima.min.⁻¹.mg⁻¹ proteína).

Em 24 DAP (Figura 22) dois eventos tiveram atividade específica maior, Zeo 4 e Zeo 6 (com 4,57,58 e 5,6821 unidades da enzima.min.⁻¹.mg⁻¹ proteína, respectivamente) em relação ao controle HiII que teve atividade de 3,0874 unidades da enzima.min.⁻¹.mg⁻¹ proteína. Sendo que, apenas a atividade do evento Zeo 6 foi significativamente maior que do controle HiII.

Ensaios na presença de 1 mM e 5 mM de lisina foram realizados (Tabelas 14, 15 e 16). Observou-se inibição na atividade específica da enzima DHDPS em praticamente todos os materiais transformados e no controle HiII em ambas as concentrações.

No geral, as inibições com 1 mM de lisina foram menores do que as inibições com 5 mM, no entanto, essa resposta não foi constante entre os eventos transformados. Quando utilizado 5 mM de lisina encontramos as maiores inibições entre todos os eventos transformados e o controle HiII. Em 16 DAP e 20 DAP o evento Zeo 4 apresentou as maiores inibições, 46,32% e 55,36% respectivamente. Já em 24 DAP foi o evento Zeo 6 que teve maior inibição, 54,17%, também com lisina a 5 mM.

A presença de S-aminoetilcisteína em concentrações de 1 mM e 5 mM também causou inibição da atividade da DHDPS, porém em proporções distintas à lisina.

Detectamos as maiores inibições da atividade da DHDPS com 1 mM de S-aminoetilcisteína, 5 mM de S-aminoetilcisteína também causou inibições, porém menores. Mesmo assim as inibições causadas pelo aminoácido lisina continuam sendo maiores entre todos os ensaios realizados. Com 1 mM de S-aminoetilcisteína verificamos em 16 DAP a maior inibição no evento Zeo 6 (28,25%), em 20 DAP a maior inibição foi no controle HiII (66,00%) e em 24 DAP a maior inibição foi no evento Zeo 6 (49,67%). Com 5 mM de S-aminoetilcisteína detectamos em 16 DAP a maior inibição no evento Zeo 4 (36,63%), em 20 DAP a maior inibição foi no controle HiII (36,76%) e em 24 DAP a maior inibição foi no evento (35,24%). Assim como nos ensaios da enzima AK, detectamos nos ensaios da DHDPS ativações na sua atividade, no entanto para os três estágios estudados (16, 20 e 24 DAP), tanto na presença de S-aminoetilcisteína a 1 mM e 5 mM, quanto na presença de lisina a 1 mM e 5 mM.

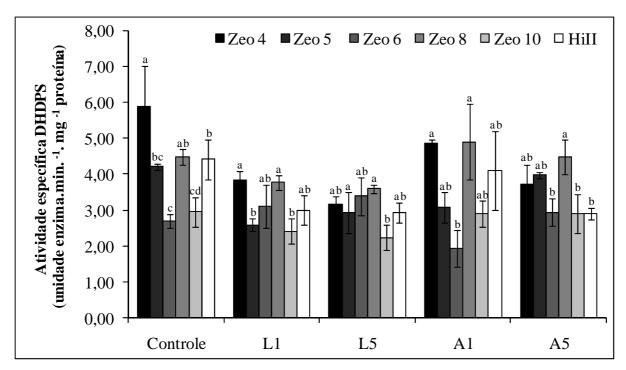


Figura 20 - Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min. $^{-1}$.mg $^{-1}$ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de S - aminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM . Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 14 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em 16 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição				
	Lys 1 mM	Lys 5 mM	AEC 1 mM	AEC 5 mM
Zeo 4	34,94	46,32	17,37	36,63
Zeo 5	38,68	30,62	27,09	5,61
Zeo 6	*	*	28,25	*
Zeo 8	15,91	19,85	*	0,02
Zeo 10	18,21	24,36	1,94	1,61
HiII	32,01	33,39	6,85	34,28

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

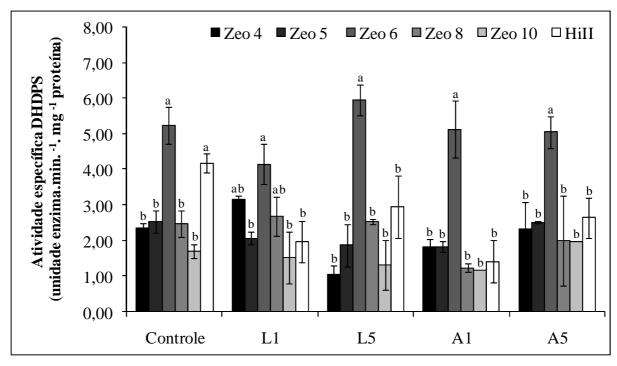


Figura 21 - Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min. mg - 1 proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de Saminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM . Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 15 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em 20 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

% Inibição				
	Lys 1 mM	Lys 5 mM	AEC 1 mM	AEC 5 mM
Zeo 4	*	55,36	22,56	1,39
Zeo 5	18,62	26,03	27,74	1,14
Zeo 6	20,73	*	1,93	3,54
Zeo 8	*	*	49,81	18,73
Zeo 10	10,27	22,92	31,20	*
HiII	52,78	29,39	66,00	36,76

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

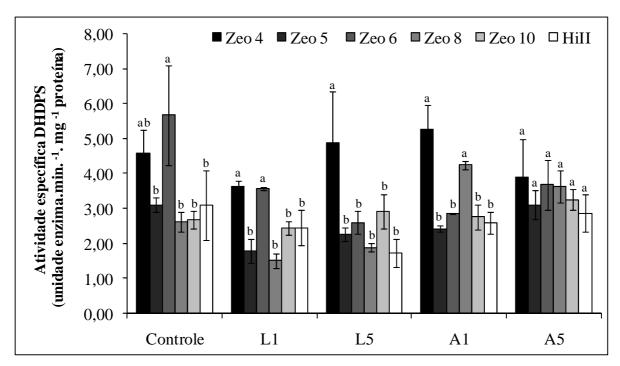


Figura 22 - Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min. proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Os tratamentos correspondem à presença do aminoácido lisina (L) e de Saminoetilcisteína (A) nas concentrações de 1 mM e 5 mM. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

Tabela 16 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S - aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em 24 DAP dos 5 eventos transformados e do controle HiII. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

	% Inibição				
	Lys 1 mM	Lys 5 mM	AEC 1 mM	AEC 5 mM	
Zeo 4	20,91	*	*	14,45	
Zeo 5	42,61	27,42	22,04	*	
Zeo 6	37,27	54,17	49,67	35,24	
Zeo 8	42,82	28,43	*	*	
Zeo 10	8,85	*	*	*	
HiII	20,70	44,33	16,14	7,02	

⁻ inibição total da atividade

^{*} ativação da atividade

4.6 Enzimas envolvidas na degradação de lisina

4.6.1 Determinação da atividade de LOR

A atividade específica de LOR foi detectada nos três estágios de desenvolvimento (16, 20 e 24 DAP). Exceto a atividade do evento Zeo 6 e do controle HiII não foram detectados aos 16 DAP.

A variação de atividade específica no estágio de 16 DAP (Figura 23) foi de 0,5731 a 1,6484 ηmol NADPH oxidado min. -1. mg -1 proteína nos eventos Zeo 10 e Zeo 5, respectivamente. Não sendo detectada nenhuma diferença significativa pela falta da atividade do controle HiII.

No estágio de 20 DAP (Figura 24) o evento transformado que apresentou a menor atividade específica de LOR foi o evento Zeo 4 (1,3402 ηmol NADPH oxidado min. -1. mg -1 proteína) em relação ao controle HiII (2,7432 ηmol NADPH oxidado min. -1. mg -1 proteína). Neste estágio todos os eventos transformados apresentaram diminuição da atividade de LOR em relação ao controle HiII, porém, sem diferenças significativas.

Por outro lado, aos 24 DAP (Figura 25) o evento transformado que apresentou menor atividade especifica de LOR significativamente diferente foi o evento Zeo 10 (1,3844 ηmol NADPH oxidado min. mg - proteína) em relação ao controle HiII (4,1790 ηmol NADPH oxidado min. mg - proteína). Neste estágio também foi verificada diminuição da atividade específica de LOR em todos os eventos transformados em relação ao controle HiII, e com diferenças significativas para quase todos os eventos, exceto o Zeo 8.

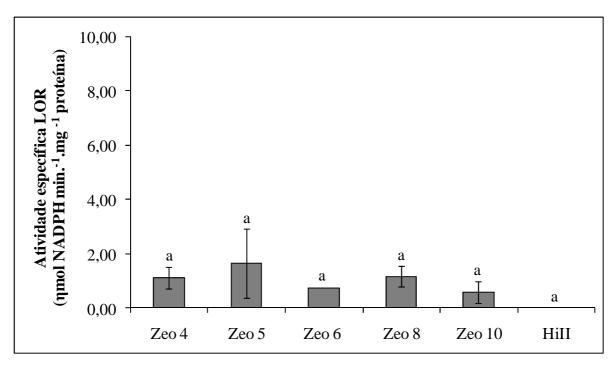


Figura 23 - Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min. -1. mg -1 proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

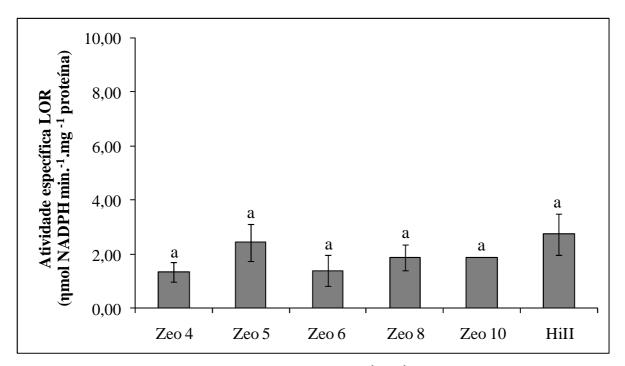


Figura 24 - Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min⁻¹. mg⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

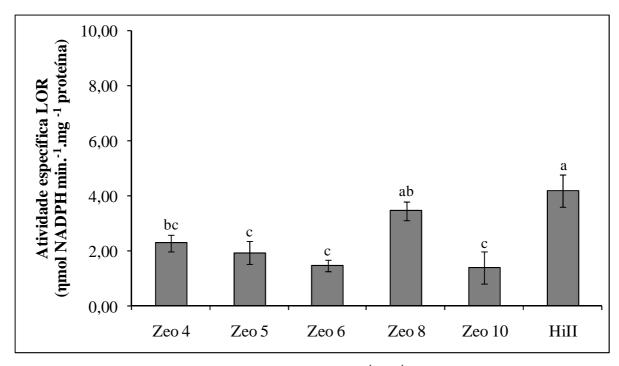


Figura 25 - Atividade específica de LOR em ηmol NADPH min⁻¹. mg⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

4.6.2 Determinação da atividade de SDH

A atividade da enzima SDH foi detectada durante todo o desenvolvimento dos grãos, apresentando menor atividade especifica aos 24 DAP, independente do material estudado (Figuras 26, 27 e 28).

No estágio de 16 DAP (Figura 26) o único evento que apresentou atividade específica de SDH menor que o controle HiII (4,8305 ηmol NAD min. ⁻¹. mg ⁻¹ proteína) foi o evento Zeo 6 (4,4888 ηmol NAD min. ⁻¹. mg ⁻¹ proteína), no entanto, não foi verificada diferença significativa na redução da atividade desse evento.

No estágio de 20 DAP (Figura 27) os eventos Zeo 4 e Zeo 6 é que foram os únicos a resultar em atividades específicas menores que o controle HiII, porém sem diferenças significativas. Enquanto o controle HiII teve 6,8797 ηmol NAD min. ⁻¹. mg ⁻¹ proteína o evento Zeo 4 teve 6,7546 ηmol NAD min. ⁻¹. mg ⁻¹ proteína e o evento Zeo 6 teve 6,1903 ηmol NAD min. ⁻¹. mg ⁻¹ proteína.

Aos 24 DAP (Figura 28) todos os eventos transformados resultaram em atividades específicas menores que o controle HiII, sendo que, o evento que apresentou a maior diferença significativa foi o Zeo 6 com atividade de 2,3045 ηmol NAD min. ⁻¹ proteína contra 4,6818 ηmol NAD min. ⁻¹ proteína no controle HiII.

Com todos esses dados das enzimas de degradação LOR e SDH observamos que o evento Zeo 6 em todos os gráficos de atividade específica foi o evento que se manteve com as atividades mais baixas em relação ao controle HiII e aos outros eventos transformados.

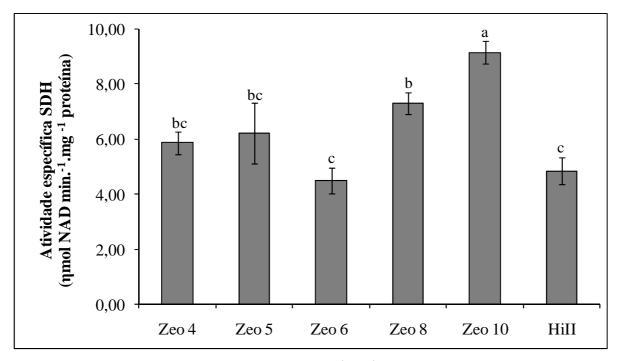


Figura 26 - Atividade específica de SDH em ηmol NAD min⁻¹. mg⁻¹ proteína encontrada em 16 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

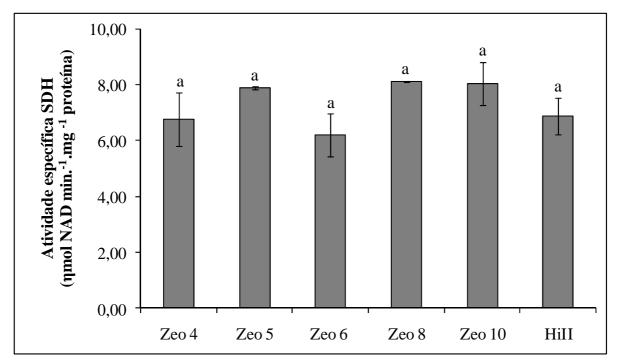


Figura 27 - Atividade específica de SDH em ηmol NAD min⁻¹. mg⁻¹ proteína encontrada em 20 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

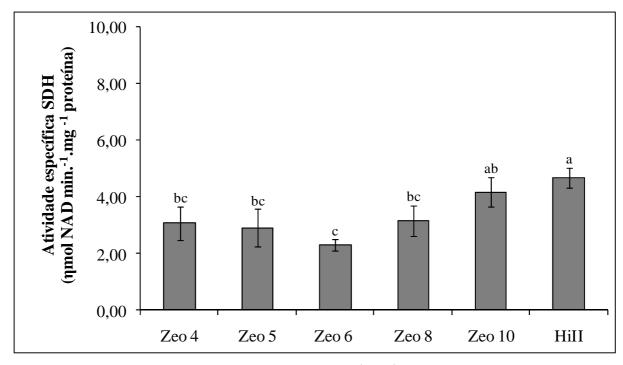


Figura 28 - Atividade específica de SDH em ηmol NAD min⁻¹. mg⁻¹ proteína encontrada em 24 DAP, com desvio padrão. Eventos transformados Zeo4 – Zeo10 e controle HiII. Teste T a 5% de probabilidade

5 DISCUSSÃO

A limitação mais importante do endosperma de milho é o desbalanço na composição de aminoácidos, sendo que, a deficiência de aminoácidos essenciais, como a lisina, pode reduzir a disponibilidade de outros aminoácidos presentes em abundância (BICAR et al., 2008) e assim reduzir a qualidade nutricional da semente como um todo. O alto teor de zeínas no endosperma de milho é a principal razão para a baixa qualidade nutricional, já que a fração zeína é a fração que acumula menos aminoácidos essenciais. Desta forma, para se obter sementes de milho com melhor qualidade nutricional, uma das estratégias seria a expressão de proteínas heterólogas.

Acredita-se que a falta de sucesso para o melhoramento das culturas é devido à limitação de recursos genéticos para conteúdo de alta lisina e que os caracteres para alta lisina são associados a caracteres deletérios, que causam desenvolvimento anormal das plantas, bem como germinação ineficiente de sementes (KIRMA et al., 2012). No entanto, recentemente a variedade de milho waxy (ou milho ceroso) e os opacos o2 e o16 foram cruzados a fim de obter um milho waxy mais nutritivo e com alta capacidade de reprodução. Os resultados mostram um aumento no teor de lisina nesta variedade, em que os genes modificadores de endosperma diminuíram a fragilidade das sementes do opaco, o que pode impedir problemas com doenças (ZHANG et al., 2013).

Neste sentido, Ambrozevicius (2010) utilizou a estratégia de expressar uma proteína heteróloga rica em lisina para aumentar o teor de lisina em milho. A proteína utilizada foi a zeolina, uma proteína quimérica contendo uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da γ-zeína, descrita por Mainieri et al. (2004), sob controle de um promotor endosperma específico, isolado da γ-kafirina de sorgo. A zeolina possui 25 resíduos de lisina na porção da faseolina e os domínios responsáveis pela retenção no retículo endoplasmático (RE), no fragmento da γ-zeína do milho, o que poderia aumentar a estabilidade da proteína quimérica expressa no milho.

A hipótese do trabalho de Ambrozevicius (2010) era de que a expressão estável de uma proteína de reserva nutricionalmente balanceada no endosperma de milho provocasse mudanças nas rotas metabólicas e consequentemente, no acúmulo de aminoácidos, principalmente de lisina, nos grãos. A expressão da zeolina deveria ocorrer independentemente do número de cópias do transgene e se localizar principalmente no endosperma, por esse motivo foi utilizado o promotor da γ-kafirina, isolado por Freitas et al.

(1994). Pois através de análises histoquímicas da atividade da GUS (β glucuronidase) foi demonstrado que em sementes bombardeadas, este promotor foi capaz de conferir níveis semelhantes de expressão do gus em Coix, milho e sorgo, e que esta expressão ocorreu somente no endosperma, indicando que fatores regulatórios controlando a expressão tecido-específica foram conservados nas três espécies testadas (FREITAS et al.,1994).

Assim, foi utilizada a transformação por dois métodos, pela biobalística e a por meio da Agrobacterium, a fim aumentar as chances de sucesso em obter um evento de transformação, uma vez que a eficiência da transformação de uma monocotiledônea como o milho é relativamente baixa. Apesar de desejável pelo fato de ser mais estável, a transformação com Agrobacterium não obteve sucesso e todos os embriões e calos tipo II transformados não se desenvolveram. O protocolo utilizado para transformação do milho com a zeolina por biobalística foi descrito por (CARNEIRO et al., 2004). Dentre o total de cerca de 2300 explantes transformados por biobalística e com o uso de Agrobacterium, 41 explantes transformados por biobalística, representando 17 eventos de transformação, foram capazes de se desenvolverem em meio seletivo e chegar à etapa de regeneração, representando uma eficiência de cerca de 0,7% na transformação (AMBROZEVICIUS, 2010).

Em todos os procedimentos de transformação foi utilizado o híbrido HiII, que apresenta no seu background genético as linhagens A188 e B73, com as vantagens de ter uma grande capacidade de formar calos embriogênicos tipo II e de regeneração em meio de cultura (ZHAO et al., 2002). O milho HiII não transformado foi utilizado como controle.

Ao final do processo, para análise e confirmação da transformação das plantas foram realizados três tipos de análise: a verificação da inserção do DNA do transgene no genoma do milho através da PCR, a expressão gênica deste DNA através da RT-PCR e da PCR para detecção do mRNA transcrito e a comprovação da tradução da proteína do transgene através do Western Blot com anticorpo anti-faseolina. O evento que apresentou expressão mais forte da zeolina foi o Zeo 3, com uma banda de alta intensidade aos 20 DAP, mas com bandas detectáveis também aos 16 e 24 DAP. Todos os demais eventos apresentaram bandas mais fracas, detectáveis aos 16, 20 e 24 DAP, exceto o evento Zeo 8 que apresentou uma forte expressão apenas aos 16 DAP (AMBROZEVICIUS, 2010).

Com a obtenção de plantas transformadas expressando a zeolina, questões relacionadas à regulação das relações fonte/dreno de aminoácidos na planta, como o metabolismo de aminoácidos, seus aspectos regulatórios e a síntese de proteínas de reserva deveriam ser investigadas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi repetir análises das frações proteicas e quantificação de aminoácidos em uma geração após (geração F3) a aquela

já estudada por Ambrozevicius (geração F2) a fim de confirmar os resultados obtidos e também estudar o metabolismo de lisina através da quantificação da atividade das principais enzimas envolvidas na síntese e degradação de lisina.

Para verificar o padrão de expressão das diferentes frações proteicas nos grãos de milho das plantas transformadas do controle HiII foi realizada análise quantitativa (quantificação pelo método de Bradford (1976), Tabela1), e análise qualitativa (SDS-PAGE) (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12).

Com relação à quantificação de cada fração proteica, a porcentagem relativa de cada fração variou entre os eventos de transformação e o controle HiII. O perfil de proteínas de reserva dos eventos transformados exibiu redução na proporção das zeínas II e glutelinas em relação ao controle HiII, e ainda aumentos muito discretos da fração globulina, porém não para todos os eventos transformados. Os eventos que tiveram aumento nesta fração em relação ao controle HiII foram os eventos Zeo 6, Zeo 8 e Zeo 10.

Alterações nas frações protéicas acumuladas nos grãos de milho devido à expressão de uma proteína exógena eram esperadas principalmente para a classe das zeínas, visto que a expressão da construção γ-kafirina + zeolina ocorre no endosperma, com acúmulo esperado no RE (AMBROZEVICIUS, 2010). Vemos que existe a tendência de diminuição da fração zeína II, no entanto o incremento compensatório nas outras frações ocorreu de forma branda, diferentemente do que Kawakatsu e colaboradores (2010) encontraram quando produziram diferentes linhagens transgênicas de arroz com padrão de proteínas de reserva alterado. Os genes que codificam as glutelinas, globulinas ou prolaminas foram suprimidos separadamente, através da técnica do RNAi. Em todos os casos, a redução da expressão de um determinada proteína de reserva acarretou em incrementos compensatórios de outras proteínas, tanto nos transcritos de mRNA quanto nos níveis de proteínas acumuladas.

Nossos dados são mais parecidos com os resultados que Bicar e colaboradores (2008) obtiveram quando investigaram o padrão das zeínas do endosperma de milho expressando a proteína heteróloga α -lactoalbumina sob controle do promotor da γ -zeína nativa. Para verificar se o acúmulo de uma proteína exógena poderia afetar o acúmulo das zeínas, ou se o uso do promotor da zeína poderia competir por fatores de transcrição utilizados na transcrição das zeínas nativas, ou se poderia causar o silenciamento dos genes da zeína. Esses autores chegaram à conclusão que mesmo com algumas diferenças entre os grãos expressando a α -lactoalbumina e os controles, estas diferenças não foram consistentes em todos os eventos. Assim, concluíram que a presença da α -lactoalbumina nos grãos de milho poderia afetar

algumas classes de zeínas, mas o efeito encontrado no acúmulo total das zeínas foi muito pequeno.

No processo de extração das frações proteicas, as zeínas são extraídas em duas etapas, zeína I e zeína II. A fração zeína II é constituída principalmente pela γ-zeína de 27 kDa e é nesta fração que se espera encontrar a proteína zeolina introduzida, já que esta apresenta a mesma solubilidade e propriedades das γ-zeínas nativas (POMPA; VITALE, 2006). Em testes preliminares utilizando o Western Blot para detecção da zeolina nas frações zeína I e zeína II Ambrozevicius (2010) verificou a presença da zeolina na fração zeína II, conforme esperado.

No trabalho de Mainieri et al (2004) realizado com tabaco expressando a zeolina e estudado mais a fundo por Pompa e Vitale (2006), o polipeptídio mais abundante apresentou massa molecular em torno de 60 kDa, tamanho esperado para zeolina intacta. Além da faseolina intacta, o anti-soro anti-faseolina detectou outras duas classes de polipeptídios em tabaco, de 45 kDa e 95 kDa. O polipeptídeo de 45 kDa corresponde a massa da faseolina intacta, indicando que a zeolina pode ter se fragmentado na porção entre a zeína e a faseolina através da proteólise pós-transcricional, enquanto o polipeptídeo de 95 kDa poderia representar a fração da zeolina que escapa do acúmulo no RE e sofre glicosilação durante o tráfico intracelular. Além destas, formas de alto peso molecular (maiores que 200 kDa) também foram observadas, originadas da desnaturação incompleta da proteína devido à formação de grandes polímeros mantidos juntos por pontes dissulfeto, que dificilmente são desnaturados por completo.

No gel da zeína II deste trabalho (Figura 11) observamos que no evento Zeo 4 foi detectada uma banda de 80 kDa com maior intensidade e outra banda de fraca intensidade com 60 kDa, que pode ser a zeolina com solubilidade e propriedades da γ-zeína. Apesar da tendência de mudanças no perfil da fração zeína II com a inserção da zeolina, não foram detectadas alterações nos demais eventos transformados quando comparados com o controle HiII. O peso molecular da γ-zeína é descrito como 50 kDa por alguns autores (WOO et al., 2001), sendo que nos géis SDS-PAGE de Ambrozevicius (2010) a banda referente a γ-zeína está um pouco acima do marcador com 50 kDa. Pompa e Vitale (2006) reforçaram que a zeolina acumula principalmente como polipeptídios intactos de 60 kDa quando estudaram em detalhes os mecanismos de retenção da zeolina em tabaco.

As demais frações proteicas apresentaram apenas diferenças entre intensidades de bandas, como na fração globulina (Figura 8) em que duas bandas próximas a 60 kDa e 70 kDa do evento Zeo 6 mostraram-se um pouco mais intensas em relação ao aos outros eventos

transformados e o controle HiII. Esse resultado pode estar associado com o aumento discreto detectado na quantificação do evento Zeo 6 na fração globulina.

Para verificar possíveis alterações no perfil de aminoácidos nas sementes das plantas transformadas em função da expressão da zeolina, foram quantificados os aminoácidos solúveis totais e os aminoácidos incorporados nas proteínas através de UPLC.

Nos aminoácidos solúveis totais (Tabela 7) o teor dos aminoácidos essenciais que fazem parte da via metabólica do ácido aspártico (treonina, metionina, leucina e lisina) encontrados nos eventos transformados foi maior em relação ao controle HiII, exceto no evento Zeo 3, em que o teor de lisina foi menor. O aumento de lisina solúvel não ocasiona necessariamente aumento na síntese de proteínas ricas em lisina, o que sugere que a disponibilidade de aminoácidos livres não é o fator limitante para que estes sejam incorporados em proteínas (REYES et al., 2009).

Na análise dos aminoácidos solúveis totais, Ambrozevicius (2010) não verificou diferenças relevantes entre os valores mensurados nos eventos transformados, mas, detectou resultados interessantes em relação aos aminoácidos incorporados quantificados em HPLC, com valores de 40% a 274% maiores para todos os aminoácidos quantificados no evento Zeo 3 em relação ao controle HiII. Esta diferença deve se referir aos aminoácidos incorporados na proteína zeolina. Com a expressão da zeolina, a demanda por aminoácidos como a lisina é maior, assim mais aminoácidos são produzidos, mas estes são direcionados à síntese da zeolina e não ficam disponíveis na forma de aminoácidos solúveis totais, o que coincide com os resultados que Ambrozevicius (2010) obteve. Desta forma a zeolina funcionaria como um dreno, em que os aminoácidos que estão em excesso são incorporados a ela e as rotas metabólicas são capazes de se ajustar a fim de atender o requerimento por aminoácidos.

Verificamos então uma diferença de resposta entre as duas gerações estudadas. Ambrozevicius (2010) não detectou diferenças nos níveis de lisina solúvel na geração F2, apenas nos aminoácidos incorporados. Na F3 foi o contrário, houve diferenças nos níveis de aminoácidos solúveis totais (Tabela 7) enquanto que os aminoácidos incorporados apresentaram poucas diferenças (Tabelas de 2 a 6).

Analisando cada fração proteica individualmente vemos que a fração globulina (Tabela 2) teve incremento no teor de lisina em quase todos os eventos transformados (menos no Zeo 3) em relação ao controle HiII. Na fração albumina (Tabela 3) o evento Zeo 8 é que apresentou o maior teor de lisina. A fração zeína I (Tabela 4) teve o maior conteúdo total de aminoácidos entre todos os eventos transformados, porém os teores de lisina foram os

menores entre todas as frações. Já na fração zeína II (Tabela 5) o controle HiII apresentou o maior teor de todos os aminoácidos, inclusive da lisina. E na fração glutelina (Tabela 6) foram observados os maiores níveis de lisina entre todas as frações. Esses resultados mostram que pode ter ocorrido uma redistribuição dos aminoácidos entre as proteínas de reserva.

Materiais transgênicos de milho estudados por Frizzi et al. (2010) mostram que a substituição das α-zeína de 19 e 22 kDa, que são proteínas pobres em lisina, por frações proteicas que apresentam um conteúdo de aminoácidos balanceado e maior proporção de lisina em sua composição, como as globulinas, albuminas e glutelinas, foram responsáveis pelos incrementos no conteúdo de lisina e triptofano nas sementes. O teor de aminoácidos incorporados encontrados em algumas frações do presente trabalho coincide com os resultados de Frizzi et al (2010), pois aqui a zeolina possui 25 resíduos de lisina na porção faseolina, sendo considerada uma proteína com conteúdo de aminoácidos balanceados. Assim, quando observamos, nos eventos transformados, aumentos nos teores de aminoácidos, principalmente lisina nas frações globulinas e glutelinas podemos sugerir que as alterações são devido à expressão dessa proteína heteróloga.

Em outro trabalho, realizado com arroz, alterações significativas no conteúdo de aminoácidos essenciais foi observado principalmente nas plantas que apresentaram redução na zeína de 13 kDa, em que aumentos de até 56% nos níveis de lisina nas sementes foram observados em relação ao controle não transformado. Os autores sugerem que este incremento pode ter sido resultado do maior conteúdo de proteínas ricas em lisina em substituição da zeína de 13 kDa que é pobre neste aminoácido (KAWAKATSU et al., 2010).

Através de estudos com mutantes naturais de alta lisina da série opaque, floury, Mc e DeB30 em termos da composição de aminoácidos foi observado que, dentre os mutantes analisados, o mutante opaco2 apresentou os maiores níveis de lisina nos grãos (3,1 a 3,8%) quando comparado ao genótipo selvagem (1,5%), este aumento é resultado de um maior teor de lisina solúvel e de proteínas do tipo não-zeínas, além da redução do conteúdo das zeínas do grão. Além destes resultados foi constatado que os teores dos demais aminoácidos apresentaram variações, com redução ou aumento, dependendo do aminoácido analisado e do mutante (AZEVEDO et al., 2003; HUNTER et al., 2002). Esses dados mostram que os eventos aqui transformados possuem potencial para grãos com alta lisina, já que foram encontrados aumentos nos teores de lisina solúvel e diminuição na concentração das zeínas II.

Uma comparação de perfis de aminoácidos entre o milho QPM e duas linhagens transgênicas de milho, a 642 e a Y642, transformadas com a inserção do gene *sb401* da batata, resultou em teores mais altos de todos os 17 aminoácidos nas linhagens transgênicas em

relação ao QPM. O teor de todos os aminoácidos nas linhagens de milho transgênico ficou dentro da recomendação do banco de dados ILSI International Food Biotechnology Committee, exceto a treonina, glicina e fenilalanina, cujos conteúdos foram mais elevados do que os valores máximos permitidos nutricionalmente. As variedades transgênicas 642 e Y642 ricas em lisina mostraram um bom equilíbrio de aminoácidos com uma melhoria no teor total de aminoácidos essenciais. Demonstrou-se que a inserção do gene rico em lisina não afetou o equilíbrio da composição de aminoácidos e que a proteína transgênica rica em lisina não só melhorou o teor de lisina, mas também enriqueceu o teor total de aminoácidos, o que sugere um maior valor nutricional das variedades de milho transgênicas (TANG et al., 2012). Dessa forma, com a expressão dos genes que codificam a proteína zeolina nos 6 eventos transformados temos em mãos dados que nos levam a pensar se nesses eventos transformados existe ou não um equilíbrio na composição dos aminoácidos. Apesar do aumento esperado no teor de lisina em alguns eventos transformados em relação ao controle HiII, vimos uma redução na proporção das zeínas II em relação ao controle HiII, o que não era esperado, já que a zeolina é uma proteína da fração zeína II e sua expressão deveria aumentar a proporção dessa fração em relação ao controle HiII. Essa redução na proporção da zeína II pode também ser devido a outros fatores, que não relacionados à inserção da proteína heteróloga, o que nos leva a crer que as diferenças nos teores de aminoácidos não influenciaram diretamente a proporção das frações protéicas, como comentado anteriormente com o trabalho de Bicar e colaboradores (2008).

Um estudo referente à atividade das enzimas envolvidas na síntese e degradação da lisina foi realizado para investigar se a atividade dessas enzimas foi alterada com o propósito de fornecer maiores teores dos aminoácidos requeridos para incorporação nas proteínas de reserva e possivelmente na zeolina.

A aspartato quinase (AK) é a primeira enzima envolvida na via do acido aspártico e sua atividade é determinada pela ação de pelo menos duas isoenzimas separadas, uma que é sensível à inibição causada por treonina (AZEVEDO et al., 1997). A atividade da enzima AK, durante os três períodos analisados (Figuras 14, 15 e 16), foi superior em todos os eventos transformados em relação ao controle HiII. O aminoácido lisina provocou a maior inibição da atividade total de AK, indicando a predominância da isoforma sensível a este aminoácido. A inibição causada pela presença de lisina e treonina mostrou um efeito aditivo na inibição da atividade da enzima, isto é, houve a soma da inibição dos aminoácidos, como já observado anteriormente em trabalhos com

mutantes para alta lisina (AZEVEDO et al., 2004). Estes resultados estão de acordo com o mecanismo de regulação por retroalimentação, característico de enzimas alostéricas em vias de biossíntese, citadas para milho em inúmeros trabalhos (AZEVEDO et al., 1992; AZEVEDO et al., 2006).

Em outro trabalho Azevedo et al. (2003) realizou uma avaliação nas enzimas envolvidas no metabolismo de lisina no milho selvagem Oh43+ e nas mutações o1, o2, f11 e f12 neste background genético e o que foi observado é que a isoforma sensível a lisina é a predominante em todos os materiais, independente da mutação, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho. Nos materiais mutantes a inibição causada pelo aminoácido treonina foi baixa em todos os mutantes, sendo que as mutações o2 e f11 é que causaram a maior inibição. A inibição causada pela lisina sofreu uma redução substancial em todos os mutantes. Além disso, outros mutantes foram avaliados e a mutação o11 introduzida no background genético do tipo selvagem W22+ interessantemente exibiu ativação de 30% na atividade da enzima AK na presença de treonina, enquanto que a mutação o13 exibiu uma inibição muito baixa (2,83%) comparado com o tipo selvagem W22+.

A zeolina é rica em resíduos de lisina, e, portanto requer maior síntese de lisina para suprir a demanda, conforme já comentado, o que pode explicar a maior atividade da enzima AK nos materiais transformados. Entretanto, esses são resultados parciais, e devem ser analisados de forma global com a atividade das demais enzimas.

A homoserina desidrogenase (HSDH) é a primeira enzima envolvida na síntese de treonina e metionina. E também tem como característica duas isoenzimas de HSDH, uma sensível e a outra resistente a inibição por treonina (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992). A atividade da enzima HSDH, durante os três períodos analisados, mostrou oscilação. Aos 16 DAP (Figura 17) todos os eventos transformados tiveram atividade maior que o controle HiII, já em 20 DAP (Figura 18) o controle HiII é que apresentou a maior atividade e em 24 DAP (Figura 19) os eventos Zeo 4, Zeo 8 e Zeo 10 é que apresentaram a maior atividade. De maneira geral é possível observar que a variação ocorreu mais no controle HiII ao longo do desenvolvimento do grão do que nos eventos transformados, estes se mantiveram mais estáveis em termos de atividade da enzima HSDH.

A HSDH está no ponto de ramificação da via do ácido aspártico, onde ela e a enzima DHDPS competem por um substrato comum, o β-aspartil semialdeído (ASA) e este fato pode ser um ponto chave na determinação do fluxo de carbono da via que leva a síntese de lisina ou treonina (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004).

Ensaios na presença de 5 mM de treonina mostraram inibição em todos os estágios na atividade da enzima HSDH em todos os materiais transformados e no controle HiII (Tabelas 11, 12 e 13). Essa inibição causada pelo aminoácido treonina sugere a presença de uma isoforma sensível ao aminoácido treonina (AZEVEDO et al., 2006).

A atividade específica da enzima DHDPS, que é a primeira enzima relacionada diretamente com a síntese de lisina, não demonstrou grandes diferenças significativas em relação ao controle HiII nos três estágios de desenvolvimento (Figuras 20, 21 e 22). Em todos os estágios estudados, apenas os eventos Zeo 4 e Zeo 6 se destacaram com atividades significativamente superiores ao controle HiII. Ensaios na presença de 1 e 5 mM de lisina revelaram maior inibição da atividade da enzima DHDPS com lisina a 5 mM (Tabelas 14, 15 e 16). A adição de AEC a 1 e 5 mM também provocou inibições, porém menores que a lisina e com resultados variados entre os eventos transformados.

Em diferentes mutantes de milho para alta lisina (Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1 e Oh43fl2) a enzima DHDPS foi isolada e sua atividade foi quantificada. Os resultados são semelhantes com os obtidos neste trabalho, em que a atividade específica de DHDPS não apresentou diferenças significativas entre os diferentes materiais estudados e o controle. Esse resultado sugere que o acúmulo de lisina nestes materiais é mais dependente das demais enzimas da via do ácido aspártico do que propriamente da DHDPS. Em compensação, a via de degradação de lisina nesses materiais foi drasticamente alterada, o que explica os altos níveis de lisina solúvel nas sementes destes materiais (VARISI et al., 2007).

Resultados com grande diferença nos teores de lisina solúvel foram observados quando o gene *cordapA* que codifica a enzima DHDPS de Corynebacterium glutamicum insensível a inibição por lisina foi expresso em sementes de milho, sendo que, até 43 vezes mais lisina foi detectada nestes materiais em relação ao controle não transformado. Além disso, quando essas linhagens foram combinadas com materiais transgênicos com reduzido teor de zeínas observou-se um efeito sinergístico de ambas as transformações, resultando num conteúdo de lisina de até 67 vezes maior que o controle não transformado (HUANG et al., 2005). Estes resultados confirmam a importância da enzima DHDPS no controle da síntese de lisina e indicam que esta enzima provavelmente necessita ser desregulada para permitir incrementos no acúmulo de lisina, o que provavelmente não aconteceu nos seis eventos transformados deste trabalho.

A via de degradação de lisina é muito importante para o acúmulo de lisina nos grãos. A primeira enzima envolvida na degradação de lisina é a lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR), que catalisa a condensação da lisina e do cetoglutarato para formar sacaropina, que em seguida é hidrolisada a ácido glutâmico e ácido α-aminoadípico através da enzima sacaropina desidrogenase (SDH) (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Nos eventos transformados foi verificada redução da atividade de degradação de lisina pela enzima LOR, durante os estágios 20 e 24 DAP (Figura 24 e 25) em relação ao controle HiII. Os resultados mostram que a transformação ocasionou redução na degradação de lisina, isso pode ser explicado pelo fato de que a lisina livre nas células é degradada pela via da sacaropina caso não seja incorporado em proteínas, pois deve ser mantida em níveis constantes (homeostase). Assim, a presença da proteína zeolina que é rica em lisina funciona como um dreno para este aminoácido que está na forma livre e consequentemente reduz sua concentração, não deixando que entre na via de degradação.

Para entendermos um pouco mais sobre a importância da via de degradação sobre o acúmulo de lisina nas sementes temos como exemplo a utilização da tecnologia de RNAi para reduzir o catabolismo de lisina no embrião e no endosperma de sementes de milho, em que Reyes e colaboradores (2009) observaram efeito sinergístico quando foi induzida a supressão da LOR-SDH em ambos os tecidos, sendo que, a supressão no embrião resultou num acúmulo de 0,2 mg.g⁻¹ matéria seca (MS) de lisina solúvel em sementes maduras, 0,90 mg.g⁻¹ MS no endosperma e com a combinação 1,60 mg.g⁻¹ MS. Outro exemplo é o trabalho de Hournard e colaboradores (2007) que também utilizaram a técnica do RNAi para a transformação da planta com uma construção IR-SDH (sequência repetida invertida do domínio SDH da LKR/SDH) sob controle de um promotor endosperma específico e obtiveram aumentos nos níveis de lisina solúvel de 30 ppm para 500-700 ppm.

A atividade da enzima SDH nos eventos transformados foi maior que no controle HiII, nos estágios de 16 e 20 DAP (Figuras 26 e 27). Apenas em 24 DAP (Figura 28) é que se verificou uma redução na atividade da SDH nos eventos transformados. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados no mutante o10 em que houve redução da atividade de LOR de 4,5 vezes e no mutante o13 em que a redução da atividade de LOR chegou a 5,6 vezes. No entanto, para a enzima SDH a diminuição da atividade não foi tão drástica (AZEVEDO et al., 2004).

Embora cada evento transformado tenha apresentado uma intensidade de resposta diferente, que é esperado devido ao fato de que o número de cópias do transgene e o local onde foi inserido no genoma podem variar. Os resultados obtidos até o momento mostram mudanças na atividade das enzimas e em alguns aspectos regulatórios, o que já é uma grande constatação, pois para a formação da proteína zeolina há a necessidade de incorporação da

lisina livre em sua estrutura, assim, deve haver uma alteração na via metabólica do ácido aspártico para suprir a nova demanda de lisina. Essas alterações podem incluir o aumento na atividade da enzima AK, que é a primeira enzima da via que leva a síntese deste aminoácido e também uma redução na atividade da enzima de degradação LOR, pois o excesso de lisina livre que seria degradada é incorporado à nova proteína.

Mais conhecimentos são necessários sobre a regulação do metabolismo dos aminoácidos e a sua influência sobre outros processos e metabólitos, como o estudo sobre os efeitos que um maior teor de lisina pode provocar sobre a expressão e acumulação de proteínas de reserva de sementes. Apesar de vários estudos combinando a estratégia de aumento de síntese e diminuição da degradação, o conhecimento sobre estas combinações e seus efeitos na biologia de sementes é ainda incompleto (GALILI; AMIR, 2013).

6 CONCLUSÕES

Na geração F2, estudada por Ambrozevicius (2010), não foram detectadas diferenças nos níveis de lisina solúvel, apenas nos aminoácidos incorporados, e na geração F3 foi o contrário, houve diferença nos níveis de aminoácidos solúveis totais enquanto que os aminoácidos incorporados apresentaram poucas diferenças em relação ao controle HiII.

O acréscimo da atividade da enzima de síntese aspartato quinase (AK) e a redução da atividade da enzima de degradação 2-oxoglutarato redutase (LOR) nos eventos transformados em relação ao controle nos leva a pensar que mais substrato esta sendo produzido pela AK, o qual pode estar sendo utilizado para formação de mais aminoácidos da via do ácido aspártico.

A expressão de uma proteína rica em aminoácidos essenciais pode ser o motivo para a maior atividade de AK e consequente diminuição da atividade da enzima de degradação LOR, já que para formação da zeolina mais aminoácidos essenciais são utilizados, resultando em uma diminuição na quantidade de aminoácidos que devem ser degradados.

Por fim, verificamos que as frações globulinas e glutelinas apresentaram aumentos nas concentrações de lisina entre os eventos transformados em relação ao controle HiII, sendo que, os eventos que mais se destacaram foram Zeo 3, Zeo 4, Zeo 5 e Zeo 10.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. R.; HUANG, S.; KRIZ, A. L.; LUETHY, M. H. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1842-1849, 2004.
- AMBROZEVICIUS, L. **Transformação genética de milho com uma nova proteína-a Zeolina.** 2010. 131 p. Tese Doutorado (Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo Piracicaba, 2010.
- AMIR, R.; HACHAM, Y.; GALILI, G. Cystathionine gamma-synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. **Trends in plant science**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 153-156, 2002.
- ANGELOVICI, R.; FAIT, A.; FERNIE, A. R; GALILI, G. A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down *Arabidopsis* seed germination. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, n. 1, p. 148-159, 2011.
- ARRUDA, P.; KEMPER, E. L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 324-330, ago 2000.
- ARRUDA, P.; SODEK, L.; SILVA, W. J.Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. **Plant Physiology**, Washington, v. 69, n.1, p. 988-989, 1982.
- AZEVEDO, R. A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, Wien, v.22, n. 9, p. 217-230, 2002.
- AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 3731-3734, 1992.
- AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino acids**, Wien, v. 20, n. 3, p. 261-279, 2001.
- AZEVEDO, R. A.; LANCIEN, M.; LEA, P. J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino acids**, Wien, v. 30, n. 2, p. 143-162, 2006.
- AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, P.; TURNER, W. L.; LEA, P. J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 395-419, 1997.
- AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P. J.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A. A.; GAZIOLA, S. A.; BERDEJO, B. D. A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 24, p. 4898-4908, 2003.

- AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LEA, P. J.; LANDRY, J.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A. A.; GAZIOLA, S. A.; VARISI, V. A.; GRATAO, P. L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, n. 4, p. 339-348, 2004.
- AZEVEDO, R. A.; ARANA, J. L.; ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant Ltr*1 with opaque-2 maize mutant. **Plant Science**, Limerick, v. 70, n. 1, p. 81-90, 1990.
- BASS, H. W.; WEBSTER, C.; OBRIAN, G. R.; ROBERTS, J. K. M.; BOSTON, R. S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 2, p. 225-234, 1992.
- BELLUCCI, M.; MARCHIS, F.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein that can be used to produce value-added proteins in alfalfa (Medicago sativa L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, Dordrecht, v. 90, n. 1, p. 85-91, 2007.
- BELLUCCI, M.; MARCHIS, F.; NICOLETTI, I.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein with different solubility and stability properties according to its localization in the endoplasmic reticulum or in the chloroplast. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 97-105, 2007.
- BICAR, E. H.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; SANGTONG, V.; PETERSON, J. M.; YANG, S. S.; LEE, M.; SCOTT, M. P. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. **Transgenic research**, London, v. 17, n. 1, p. 59-71, 2008.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Saparation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BLACK, S.; WRIGHT, N. G. Aspartic beta-semialdehyde dehydrogenase and aspartic beta-semialdehyde. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 213, n. 1, p. 39-50, 1955.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRIGHT, S. W.; MIFLIN, B. J.; ROGNES, S. E. Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. **Biochemical genetics**, New York, v. 20, n. 3-4, p. 229-43, 1982.
- BROCHETTO-BRAGA, M. R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant physiology**, Washington, v. 98, n. 3, p. 1139-1147, 1992.

- CARBONARO, M. 7S Globulins from Phaseolus vulgaris L.: Impact of Structural Aspects on the Nutritional Quality. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Bunkyo-ku, v. 70, n. 11, p. 2620-2626, 2006.
- CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E (Eds.) **Transformação Genética de Milho Utilizando o Bombardeamento de Partículas.** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2004. 44 p. (Documentos 32: Embrapa Milho e Sorgo).
- DANNENHOFFER, J. M.; BOSTWICK, D. E.; OR, E.; LARKINS, B. A. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1931-1935, 1995.
- DOTSON, S. B.; SOMERS, D. A.; GENGENBACH, B. G. Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell cultures. **Plant physiology**, Washington, v. 91, n. 4, p. 1602-1608, 1989.
- DAWSO, N. R. M. C.; ELLIOTT D. C.; ELLIOTT, W. H. and JONES K. M. (Eds.) **Data for Biochemical Research**, 2nd Ed. London: Oxford Univ. Press, 1969.
- FALCO, S. C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R. T.; WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Biotechnology**, New York, v. 13, n. 6, p. 577-582, 1995.
- FERREIRA, R. R.; VARISI, V. A; MEINHARDT, L. W; LEA, P. J; AZEVEDO, R. A. Are high-lysine cereal crops still a challenge? **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 985-994, 2005.
- FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 826, n. 2, p. 109-134, 1998.
- FRANKARD, V.; VAUTERIN, M.; JACOBS, M. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 233-242, maio 1997.
- FREITAS, F. A.; YUNES, J. A.; SILVA, M. J.; ARRUDA, P.; LEITE, A. Structural characterization and promoter activity analysis of the gamma-kafirin gene from sorghum. **Molecular & general genetics**, Heidelberg, v. 245, n. 2, p. 177-186, 1994.
- FRIGERIO, L.; VIRGILIO, M.; PRADA, A.; FAORO, F.; VITALE, A. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **The Plant cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 1031-42, 1998.
- GALILI, G. Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. **The Plant cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 899-906, 1995.
- GALILI, G.; AMIR, R. Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. **Plant biotechnology journal**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 211-222, 2013.

- GALILI, G.; HÖFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic engineering**, San Diego, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.
- GAZIOLA, S. A.; ALESSI, E. S.; GUIMARAES, P. E. O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R. A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lisine metabolism. **Journal of agricultural and food chemistry**, Eazton, v. 47, n. 3, p. 1268-1275, 1999.
- GAZIOLA, S. A.; TEIXEIRA, C. M. G.; LUGLI, J.; SODEK, L.; AZEVEDO, R. A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds: isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 371, n. 1, p. 364-371, 1997.
- GEETHA, K. B.; LENDING, C. R.; LOPES, M. A.; WALLACE, J. C.; LARKINS, B. A. Opaque-2 modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **The Plant cell**, Rockville, v. 3, n. 11, p. 1207-1219, 1991.
- GELI, M. I.; TORRENT, M.; LUDEVID, D. Two structural domains mediate two sequential events in γ-zein targeting: protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation. **The Plant cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1911-1922, 1994.
- GIBBON, B. C.; LARKINS, BRIAN A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in genetics**, London, v. 21, n. 4, p. 227-33, abr 2005.
- GIBBON, B. C.; WANG, X.; LARKINS, B. A. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15329-15334, 2003.
- GRAHAM, G. G.; GLOVER, D. V.; ROMAÑA, G. L.; MORALES, E.; MacLEAN, W. C. J. Nutritional value of normal, opaque-2 and sugary-2 opaque-2 maize hybrids for infants and children. **The Journal of nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 5, p. 1061-1069, 1980.
- HE, X. Y.; TANG, M, Z.; LUO, Y. B.; LI, X.; CAO, S. S.; YU, J. J.; DELANEY, B.; HUANG, K. L. A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in Sprague-Dawley rats. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 425-432, 2009.
- HERMAN, E. M.; LARKINS, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-614, 1999.
- HOUMARD, N. M.; MAINVILLE, J. L.; BONIN, C. P.; HUANG, S.; LUETHY, M. H.; MALVAR, T. M. High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. **Plant biotechnology journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 605-614, 2007.
- HUANG, S. S.; KRUGER, D. E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R. L.; FLORIDA, C. A.; ADAMS, W. R.; BROWN, W. E.; LUETHY, M. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant biotechnology journal**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 555-569, 2005.

- HUANG, S.S.; ADAMS, W. R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K. P.; VOYLES, D. A.; ANTHONY, J.; KRIZ, A. L.; LUETHY, M. H. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 52, n. 7, p. 1958-1964, 2004.
- HUDSON, A. O.; SINGH, B. K.; LEUSTEK, T.; GILVARG, C. An LL-Diaminopimelate Aminotransferase Defines a Novel Variant of the Lysine Biosynthesis Pathway in Plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, n. 1, p. 292-301, 2006.
- HUDSON, A. O.; BLESS, C.; MACEDO, P.; CHATTERJEE, S. P.; SINGH, B. K.; GILVARG, C.; LEUSTEK, T. Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1721, n. 1-3, p. 27-36, 2005.
- HUNTER, B. G.; BEATTY, M. K.; SINGLETARY, G. W.; HAMAKER, B. R.; DILKES, B. P.; LARKINS, B. A.; JUNG, R. Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. **The Plant cell**, Rockville, v. 14, n. 10, p. 2591-2612, 2002.
- JANDER, G.; JOSHI, V. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. **Molecular plant**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 54-65, 2010.
- JOHNSON, L. A.; HARDY, C. L.; BAUMEL, C. P.; YU, T. H.; SELL, J. L. Identification of valuable corn quality traits for livestock feed. **Cereal Foods World**, Saint. Paul, v. 46, n. 10, p. 472-481, 2001.
- JOSHI, V.; LAUBENGAYER, K. M.; SCHAUER, N.; FERNIE, A. R.; JANDER, G. Two *Arabidopsis* threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. **The Plant cell**, Rockville, v. 18, n. 12, p. 3564-3575, 2006.
- KANG, J.-H.; WANG, L.; GIRI, A.; BALDWIN, I. T. Silencing threonine deaminase and JAR4 in Nicotiana attenuata impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against Manduca sexta. **The Plant cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3303-3320, 2006.
- KARCHI, H.; SHAUL, O; GALILI, G. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p. 2577-2581, 29, 1994.
- KAWAKATSU, T.; HIROSE, S.; YASUDA, H.; TAKAIWA, F. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. **Plant physiology**, Washington, v. 154, n. 4, p. 1842-1854, 2010.
- KEMPER, E. L.; CORD-NETO, G.; CAPELLA, A. N.; GONCALVES-BUTRUILE, M.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v. 253, n. 3, p. 720-729, 1998.

- KIM, C. S.; WOO, Y. M.; CLORE, A. M.; BURNETT, R. J.; CARNEIRO, R. P.; LARKINS, B. A. Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 655-672, 2002.
- KIRMA, M.; ARAÚJO, W. L.; FERNIE, A. R.; GALILI, G. The multifacetal role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 63, n. 14, p. 4995-5001, 2012.
- KWON, T.; SASAHARA, T.; ABE, T. Lysine accumulation in transgenic tobacco expressing dihydrodipicolinate synthase of escherichia coli. **Journal of plant physiology**, Jena, v. 146, n. 5, p. 615-621, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANDRY, J.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R. A.; DELHAYE, S. Effect of the opaque and floury mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 6, p. 549-556, 2005.
- LANDRY, J; DELHAYE, S; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating alpha-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal chemistry**, Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 620-626, 2000.
- LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of glutelins of corn seeds selective extraction and composition of amino acids of 3 isolated fractions. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**, Paris, v. 52, n. 10, p. 1021, 1970.
- LENDING, C. R.; LARKINS, B. A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. **The Plant cell**, Rockville, v. 1, n. 10, p. 1011-1023, 1989.
- LESS, H.; GALILI, G. Coordinations between gene modules control the operation of plant amino acid metabolic networks. **BMC systems biology**, London, v. 3, n. 14, p. 1-18, 2009.
- LONG, X.; LIU, Q.; CHAN, M.; WHANG, Q.; SUN, S. S. M. Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine. **Plant biotechnology Journal**, Oxford, v. 11, p. 1-12, 2012.
- MAINIERI, D.; ROSSI, M.; ARCHINTI, M.; BELLUCCI, M; De MARCHIS, F.; VAVASSORI, S.; POMPA, A.; ARCIONI, S.; VITALE, A. Zeolin . A New Recombinant Storage Protein Constructed. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3447-3456, 2004.
- MAZUR, B.; KREBBERS, E.; TINGEY, S. Gene discovery and product development for grain quality traits. **Science**, Washington, v. 285, n. 5426, p. 372-375, 1999.
- MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, n. 3629, p. 279-280, 1964.

- MILLWARD, D. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 44, n.7, p. 249-260, 1999.
- MUEHLBAUER, G. J.; GENGENBACH, B.G.; SOMERS, D. A.; DONOVAN, C. M. Genetic and amino-acid analysis of two maize threonine-overproducing, lysine-insensitive aspartate kinase mutants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 89, n. 6, p. 767-774, 1994.
- MUEHLBAUER, G.; SOMERS, D.; MATTHEWS, B.; CENGENBACH, C. Molecular genetics of the maize (Zea mays L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. **Plant Physiology**, Washington, v. 106, n. 4, p. 1303-1312, 1994.
- MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 38, n. 1-2, p. 77-99, 1998.
- OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B.; FERRY, E. L.; WAKEMAN, A. J. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 18, n. 1, p. 1-16, 1924.
- PECHERE, J. F.; CAPONY, J. P. On the colorimetric determination of acyl phosphates. **Analytical biochemistry**, New York, v. 22, n. 66, p. 536-539, 1968.
- POMPA, A.; VITALE, A. Retention of a bean phaseolin/maize gamma-Zein fusion in the endoplasmic reticulum depends on disulfide bond formation. **The Plant cell**, Rockville, v. 18, n. 10, p. 2608-2621, 2006.
- PRASANNA, B.; VASAL, S.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality protein maize. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.
- RELTON, J. M.; BONNER, P. L. R.; WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension culture. **Biochimica et Biophysica Acta: International Journal of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 953, n. 1, p. 48-60, 1988.
- REYES, A. R.; BONIN, C. P.; HOUMARD, N. M.; HUANG, S.; MALVAR, T. M. Genetic manipulation of lysine catabolism in maize kernels. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 69, n. 1, p. 81-89, 2009.
- ROGNES, S. E.; LEA, P J; MIFLIN, B. J. S-adenosylmethionine--a novel regulator of aspartate kinase. **Nature**, London, v. 287, n. 5780, p. 357-359, 1980.
- SCHMIDT, R.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M. J.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 6, p. 689-700, 1992.
- SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant. **Gentics**, Austin, v. 397, n. 9, p. 387-397, 2003.

- SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in tabacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **The Plant Journal**, Washington, v. 2, n. 2, p. 203-209, 1992.
- SHAVER, J. M.; BITTEL, D. C.; SELLNER, J. M.; FRISCH, D. A.; SOMERS, D. A.; GENGENBACH, B. G. Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1962-1966, 1996.
- SHERRY, A.; GARCIA, F.; BODNAR, A. L.; SCOTT, M. P. Wide variability in kernel composition, seed characteristics, and zein profiles among diverse maize inbreds, landraces, and teosinte. **Theoretical and applied genetics**, Heidelberg, v. 119, n. 6, p. 1129-1142, 2009.
- SHEWRY, P. R; NAPIER, J. A; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.
- SHEWRY, P. R; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **The Biochemical journal**, London, v. 267, n. 1, p. 1-12, 1990.
- SHEWRY, P. R; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947-58, 2002.
- SHEWRY, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 239-250, 2007.
- SODEK, L.; WILSON, C. M. Amino acid composition of proteins isolated from normal, opaque-2, and floury-2 corn endosperms by a modified osborne procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 19, n. 6, p. 1144-1150, 1971.
- STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.; GALILI, G.Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino acids**, Wien, v. 30, n. 2, p. 121-125, 2006.
- SUN, S.; LIU, Q. Transgenic approaches to improve the nutritional quality of plant proteins. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 40, n. 2, p. 155-162, 2004.
- SWARUP, S.; TIMMERMANS, M.; CHAUDHURI, S.; MESSING, J. Determinants of the hight-methionine trait in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 359-368, 1995.
- TANG, G.; ZHU, X.; GAKIERE, B.; LEVANONY, H.; KAHANA, A.; GALILI, G. The bifunctional LKR/SDH locus of plants also encodes a highly active monofunctional lysine-ketoglutarate reductase using a polyadenylation signal located within an intron. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 9, p. 147-154, 2002.
- TANG, M.; HE, X.; LUO, Y.; MA, L.; TANG, X.; HUANG, K. Nutritional assessment of transgenic lysine-rich maize compared with conventional quality protein maize. **Journal of the science of food and agriculture**, Malden, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2012.

- TEIXEIRA, C. M.G.; GAZIOLA, S. A.; LUGLI, J.; AZEVEDO, R. A. Isolation, partial purification and characterization of isoenzymes of aspartate kinase from rice seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 153, n. 3-4, p. 281-289, 1998.
- TORRENT, M.; ALVAREZ, I.; GELI, M. I.; DALCOL, I.; LUDEVID, D. Lysine-rich modified γ-zeins accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 139-149, 1997.
- VARISI, V. A.; MEDICI, L. O.; MEER, I. V. D.; LEA, J. P.; AZEVEDO, R. A. Dihydrodipicolinate synthase in opaque and floury maize mutants. **Plant Science**, Limerick, v. 173, n. 4, p. 458-467, 2007.
- VITALE, A.; CERIOTTI, A. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? **Plant Physiology**, Washington, v. 136, n. 11, p. 3420-3426, 2004.
- WALLSGROVE, R. M.; MAZELIS, M. The enzymology of lysine biosynthesis complete localization in higher plants synthase of the regulatory enzyme dihydrodipicolinate in the chloroplasts of spinach leaves. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 189-192, 1980.
- WOO, Y. M.; HU, D. W. N.; LARKINS, B. A.; JUNG, R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **The Plant cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2297-2317, 2001.
- YOSHIDA, A.; TOMITA, T.; KUZUYAMA, T.; NISHIYAMA, M. Mechanism of concerted inhibition of alfa 2, beta 2-type heterooligomeric aspartate kinase from Corynebacterium glutamicum. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 35, p. 27477-27486, 2010.
- YU, J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of the lysine-rich protein gene sb401 significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 427-431, 2005.
- ZHANG, W.; YANG, W.; WANG, M.; WANG, W.; ZENG, G.; CHEN, Z.; CAI, Y. Increasing lysine content of waxy maize through introgression of opaque-2 and opaque-16 genes using molecular assisted and biochemical development. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2013.
- ZHAO, G.; LI, M.; ZHANG, D.; LI, X.; WU, Z.; CI, X.; XIE, C.; BAI, L.; LU, Z.; CHEN, L.; HAO, Z.; ZHANG, S. Kernel lysine content does not increase in some maize opaque2 mutants. **Planta**, Heidelberg, v. 235, n. 1, p. 205-15, jan 2012.
- ZHAO, Z. Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 323-333, 2002.

- ZHU, X.; GALILI, G. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 4, p. 845-853, 2003.
- ZHU, X.; GALILI, G. Lysine Metabolism Is Concurrently Regulated by Synthesis and Catabolism in Both Reproductive. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, n. 1, p. 129-136, 2004.
- ZHU, X.; TANG, G.; GALILI, G. The activity of the *Arabidopsis* bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is regulated by functional interaction between its two enzyme domains. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 51, p. 49655-49661, 2002.