Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa

Vanderlei Aparecido Varisi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

Vanderlei Aparecido Varisi
Engenheiro Agrônomo

Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Varisi, Vanderlei Aparecido

Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa /
Vanderlei Aparecido Varisi. - - Piracicaba, 2007.
121 p.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Aminoácidos 2. Enzimas 3. Genética vegetal 4. Milho 5. Pseudocereais
I. Título

CDD 633.15

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

*Aos meus pais, Antonio e Elza,
que jamais mediram esforços
para que eu pudesse chegar até aqui,*

DEDICO

*Ao meu irmão Amilton, a minha
cunhada Fabiana e aos meus sobrinhos
Diego e Alice pelo incentivo, amor,
amizade e alegria fundamentais para
essa conquista,*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pelo apoio e confiança desde a graduação;

A Dra. Ingrid van der Meer pela supervisão;

À minha família, especialmente aos meus pais Antonio e Elza e ao meu irmão Amilton;

Aos meus avôs e avós pelo amor, por todos os momentos felizes e por seus ensinamentos;

Aos meus amigos Aldo, Prof. Dra. Aline, Ana Letícia, Ana Paula Pallu, Anderson, Cláudia Gai, Carlos Vildoso, Eric, Fabrício, Fernando Zambrosi, Francisco Andreote, Georgia, Guilherme, Prof. Dr. Isaías, Joelma, José Carmezini, Maria Beatriz, Maria Graziela, Leandro, Liliane, Liana, Paulo Lacava, Patrícia, Priscila Rosseto, Priscila Karen, Raphael, Rudi, Renato, Walter Fernando e Welington;

Aos meus amigos Fernando, Rodrigo e Ana Paula pela convivência familiar na Holanda;

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas: Alejandro, Ariane, Bertha, Carol, Flávia, Giselle, Leonardo, Luciana, Paula, Priscila, Ricardo, Rui e Salete;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

Aos amigos da Holanda: Betânia, Carol Soares, Isa, Pablo e Rodrigo Taketani;

Aos amigos do Plant Research International: Agatha, Froukje, Jeroen e Maria Gacio;

Ao CNPq e a CAPES pela concessão da bolsa e a FAPESP (Projeto Temático 04/16039-4 e Auxílio Regular 01/13904-8);

Ao Dr. Carlos Roberto Spehar do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil, por gentilmente ceder sementes de quinoa;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, muito obrigado!

*Ora, a fé é o firme fundamento das
coisas que se esperam e a prova das
coisas que não se vêem.*

Hebreus 11:1

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Revisão bibliográfica	12
1.1.1 Assimilação de Nitrogênio	12
1.1.2 A síntese dos aminoácidos.....	14
1.1.3 A via metabólica do ácido aspártico	18
1.1.4 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase	21
1.1.5 Dihidrodipicolinato sintase	23
1.1.6 Síntese de lisina: estágios finais	24
1.1.7 O catabolismo de lisina	25
1.1.8 Regulação da via metabólica do ácido aspártico	26
1.1.9 Mutantes bioquímicos	27
1.1.10 Plantas transgênicas	29
1.1.11 O milho	30
1.1.12 As mutações <i>opaco-2</i> e <i>floury-2</i>	31
1.1.13 Efeitos das mutação <i>opaco</i> e <i>floury</i>	34
1.1.14 Variedades <i>Quality Protein Maize (QPM)</i>	37
1.1.15 <i>Chenopodium quinoa</i> willd (quinoa)	38
Referências	40
2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AK E HSDH EM MUTANTES DE MILHO <i>OPACO</i> E <i>FLOURY</i>	53
Resumo	53
Abstract	54
2.1 Introdução	55
2.2 Material e Métodos.....	57
2.2.1 Material	57
2.2.2 Extração e purificação parcial das Enzimas AK e HSDH	57
2.2.3 Análises das enzimas AK e HSDH	58

2.2.4 Determinação da concentração de proteínas	59
2.3 Resultados	59
2.3.1 Determinação da atividade da AK.....	59
2.3.2 Determinação da atividade da HSDH.....	61
2.4 Discussão	62
Referências	65
3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA DIHIDRODIPICOLINATO SINTASE EM MUTANTES DE MILHO <i>OPACO</i> E <i>FLOURY</i>	70
Resumo	70
Abstract	71
3.1 Introdução	72
3.2 Material e métodos	74
3.2.1 Material	74
3.2.2 Síntese de aspartato semialdeído.....	75
3.2.3 Extração e purificação parcial da Enzima DHDPS.....	75
3.2.4 Determinação da atividade da enzima DHDPS	75
3.2.5 Análise de aminoácidos	76
3.2.6 Determinação da concentração de proteínas	77
3.3 Resultados	77
3.3.1 Determinação da atividade da DHDPS	77
3.3.2 Composição de aminoácidos solúveis.....	80
3.3.3 Composição de aminoácidos protéicos	80
3.4 Discussão	82
Referências	89
4 BIOSSÍNTESE DE LISINA E METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM QUINOA (<i>Chenopodium quinoa</i>): ESTUDO DE ENZIMAS E COMPOSTOS NITROGENADOS ...	94
Resumo	94
Abstract	95
4.1 Introdução	96
4.2 Material e Métodos.....	98
4.2.1 Material	98

4.2.2 Extração e purificação parcial das Enzimas AK, HSDH e DHDPS	98
4.2.3 Análises das enzimas AK, HSDH e DHDPS.....	99
4.2.4 Determinação da atividade da NR	100
4.2.5 Extração de compostos nitrogenados.....	101
4.2.6 Determinação da concentração de nitrato, alantoato e alantoína.....	101
4.2.7 Determinação da concentração de proteínas	101
4.2.8 Análise de aminoácidos	101
4.3 Resultados	102
4.3.1 Atividades da AK, HSDH e DHDPS durante o desenvolvimento das sementes em quinoa	102
4.3.2 Efeitos de aminoácidos e AEC sobre as atividades da AK, HSDH e DHDPS.....	102
4.3.3 Atividade da NR, concentração de nitrato e ureídeos.....	104
4.3.4 Composição de aminoácidos	107
4.4 Discussão	109
Referências	116

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE LISINA DE MILHO E QUINOA

RESUMO

O aspartato é o precursor comum dos aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina. Devido à deficiência em lisina, a via metabólica do ácido aspártico tem sido estudada em cereais e os resultados obtidos indicaram a importância da aspartato quinase (AK), da homoserina desidrogenase (HSDH) e da dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) como enzimas chave na regulação da síntese de lisina. Considerando-se a importância do milho e da quinoa como fontes de proteínas para humanos e animais, os objetivos deste trabalho foram: i) estudar as enzimas AK e HSDH nas sementes dos mutantes B77xB79o5; B37o7; W22o10, W22o11 e W22o13 e de seus respectivos tipos selvagens; ii) caracterizar a enzima DHDPS e analisar a composição de aminoácidos solúveis e incorporados nas proteínas das sementes dos mutantes Oh43o1, Oh43o2, Oh43f11, Oh43f12 e no respectivo tipo selvagem; iii) estudar nas sementes as enzimas AK, HSDH e DHDPS e alguns aspectos envolvidos na assimilação de nitrogênio e o perfil de aminoácidos de quinoa. Quando os mutantes B77xB79o5; B37o7; W22o10, W22o11 e W22o13 foram estudados, as análises demonstraram importantes variações nas atividades da AK e da HSDH entre os genótipos quando comparados com os respectivos tipos selvagens. A atividade da DHDPS foi fortemente inibida por lisina e não foram observadas variações significativas entre os genótipos Oh43o1, Oh43o2, Oh43f11 e Oh43f12, quando comparados com o genótipo Oh43+. A composição de aminoácidos revelou as maiores concentrações de lisina solúvel e incorporada em proteínas no mutante Oh43o2. Os estudos com quinoa demonstraram a presença de pelo menos duas isoenzimas da AK, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina, duas isoenzimas da HSDH, uma resistente e a outra sensível à inibição por treonina e uma isoenzima da DHDPS sensível à inibição por lisina. As sementes de quinoa também apresentaram altas concentrações de lisina solúvel e incorporada em proteínas.

Palavras-chave: Aspartato quinase; Homoserina desidrogenase; Dihidrodipicolinato sintase

CHARACTERIZATION OF ENZYMES INVOLVED IN LYSINE SYNTHESIS IN MAIZE AND QUINOA

ABSTRACT

Aspartate is the common precursor of the essential amino acids lysine, threonine, methionine and isoleucine. Due to the deficiency in lysine, the aspartate metabolic pathway has been studied in cereal crops and the results obtained have indicated the importance of aspartate kinase (AK), homoserine dehydrogenase (HSDH) and dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) as the key enzymes involved in the synthesis of lysine. Considering the importance of maize and quinoa as sources of protein for humans and animals, the objectives of this work were: i) to study the enzymes AK and HSDH in the seeds of the maize mutants B77xB79o5; B37o7; W22o10, W22o11 and W22o13 and their respective wild type; II) to characterize the enzyme DHDPS and to analyze the composition of soluble and amino acids incorporated into proteins in the seeds of the maize mutants Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1 and Oh43fl2 and the wild type OH43+; iii) to study the enzymes AK, HSDH, DHDPS in quinoa seeds and some aspects involved in nitrogen assimilation and amino acids profile. When the mutants B77xB79o5; B37o7; W22o10, W22o11 and W22o13 were studied, the analysis revealed important variations on AK and HSDH activities among the genotypes when compared to their respective wild type. The results indicated that DHDPS was strongly inhibited by lysine, and that there was not significant variation among the mutants Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1 and Oh43fl2 when compared to the wild type. The amino acids composition revealed high concentrations of lysine in the soluble form and incorporated into protein in the Oh43o2 mutant. The study of quinoa seeds allowed the identification of at least two AK isoenzymes, one sensitive to lysine inhibition and another sensitive to threonine, two HSDH isoenzymes, one resistant and another sensitive to threonine inhibition and one DHDPS isoenzyme sensitive to lysine inhibition. Quinoa also exhibited high concentration of soluble lysine and lysine incorporated into protein.

Keywords: Aspartate kinase; Homoserine dehydrogenase; Dihydrodipicolinate synthase

1 INTRODUÇÃO

A fome e a desnutrição estão entre os problemas mais devastadores que afetam grande parte da população mundial. Aproximadamente 30% das pessoas nos países em desenvolvimento sofrem de uma ou mais formas de desnutrição (FERREIRA et al., 2005). As consequências atingem todas as faixas etárias causando diferentes distúrbios. Em embriões e fetos, a desnutrição acarreta principalmente danos cerebrais e baixo peso ao nascimento. Crianças e adolescentes desnutridos são mais sensíveis às infecções e podem apresentar retardamento mental e de crescimento. Em idosos a desnutrição está associada à redução na qualidade de vida, maior sensibilidade às infecções e alto risco de morte (FERREIRA et al., 2005).

Entre os diversos tipos de desnutrição, as deficiências protéicas estão entre as formas mais graves. A qualidade protéica de um alimento está relacionada com sua composição de aminoácidos, principalmente os essenciais, e com sua digestibilidade (FERREIRA et al., 2005). Em geral, os alimentos de origem animal apresentam melhor qualidade protéica quando comparados às fontes de alimentos vegetais. Algumas pesquisas revelaram que as fontes de proteínas vegetais fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, com grãos de cereais representando 47% (MILLWARD, 1999). Este trabalho também revelou que os alimentos de origem animal são a principal fonte de proteínas para humanos em países desenvolvidos, enquanto que nos países pobres ou em desenvolvimento os alimentos de origem vegetal são a fonte mais importante de proteína para a população (MILLWARD, 1999).

No entanto, alguns grupos vegetais, como os cereais, apresentam deficiências de lisina e treonina, enquanto que as leguminosas apresentam deficiência no aminoácido metionina (FERREIRA et al., 2005; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Os aminoácidos lisina, treonina, metionina e isoleucina são derivados do ácido aspártico. Dos 20 aminoácidos incorporados nas proteínas somente 11 podem ser sintetizados por animais, sendo 9 aminoácidos essenciais e, portanto, adquiridos através das dietas alimentares (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006). Este fato levou grupos de pesquisa em diversas partes do mundo a realizarem estudos bioquímicos, genéticos e moleculares, que têm levado à identificação de alguns mecanismos envolvidos na regulação da via metabólica do ácido aspártico, demonstrando que várias enzimas são reguladas por retro-inibição pelos aminoácidos produtos finais ou seus análogos (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para o estudo desta via metabólica e para a obtenção de materiais que apresentem uma melhor qualidade protéica. Entre as principais abordagens destacam-se o uso de mutantes bioquímicos, plantas transgênicas e mutantes naturais, principalmente os da série *opaco (o)* e *floury (fl)* (AZEVEDO, 2002).

No presente trabalho foram caracterizadas importantes enzimas da via de síntese de lisina, determinada a composição de aminoácidos em mutantes de milho e em quinoa, uma espécie vegetal que tem sido apontada como uma importante fonte de proteína. O objetivo do estudo envolvendo os mutantes de milho foi o de se verificar o efeito das mutações sobre a atividade de enzimas da via do ácido aspártico e sobre a síntese de aminoácidos. No caso da quinoa, o objetivo da caracterização de enzimas da via metabólica do ácido aspártico foi o de se entender os mecanismos regulatórios envolvidos na síntese do aminoácido lisina nesta espécie.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Assimilação de Nitrogênio

A disponibilidade de nitrogênio é considerada um dos mais importantes fatores limitantes da produtividade na agricultura mundial (LEA; AZEVEDO, 2006; LEA et al., 2007), principalmente aquelas caracterizadas pelo baixo uso de tecnologia e fertilizantes (MEDICI et al., 2004a; MEDICI et al., 2004b; MEDICI et al., 2005), sendo que os maiores requerimentos de nitrogênio têm sido observados para a produção de sementes e forragens (LEA; AZEVEDO, 2006).

O nitrogênio está presente no solo como uma mistura complexa de formas orgânicas e inorgânicas, apresentando uma distribuição bastante heterogênea. A maior parte do nitrogênio está presente no solo na forma de complexas moléculas orgânicas que são convertidas para amônio através da ação de microrganismos em um processo denominado mineralização. O amônio pode ser oxidado para a formação de nitrato através de um processo conhecido como nitrificação e o nitrato pode ser convertido em nitrogênio gasoso através do processo de denitrificação (MILLER; CRAMER, 2005).

Normalmente, o nitrato é a principal fonte de nitrogênio disponível para as plantas (MEDICI et al., 2005). O nitrato absorvido pelas raízes é reduzido e incorporado na célula

através de uma série de reações catalisadas por enzimas assimilatórias (ANDREWS et al., 2004). Inicialmente, o nitrato absorvido pela planta é reduzido a nitrito em uma reação catalisada pela enzima nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1). Posteriormente, o nitrito é reduzido a amônio pela ação da enzima nitrito redutase (NiR, EC 1.7.7.1), que é convertido em aminoácidos pela ação das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (GS - GOGAT; EC 6.3.1.2 e EC 1.4.7.1, respectivamente) (ANDREWS et al., 2004).

A NR é uma enzima complexa, composta de duas subunidades formadas por flavina adenina dinucleotídeo (FAD), citocromo 557 e pelo cofator molibdênio (SOLOMONSON; BARBER, 1990) e sua ação é regulada pelo substrato (nitrato) e por produtos finais sintetizados em diferentes vias metabólicas como os aminoácidos (CAMARGOS; AGUIAR; AZEVEDO, 2006). Nas raízes, alterações na atividade da NR podem ocorrer como resultado de alterações na expressão gênica ou por modificações pós-traducionais, sendo a atividade da NR induzida pela presença de seu substrato, nitrato, a exemplo do que ocorre com os transportadores de nitrogênio. Por outro lado, em folhas, a presença de luz é necessária para que ocorra uma expressão ótima da NR (MILLER; CRAMER, 2005).

Alguns aminoácidos desempenham importantes funções na regulação da atividade da NR e na absorção de nitrato. Efeito inibitório sobre a absorção de nitrato foi observado quando aminoácidos exógenos como aspartato, glutamina, asparagina, arginina e alanina foram suplementados em soja (FAN et al., 2006). Além disso, uma redução na atividade da NR em raízes de cevada foi observada com o uso exógeno de glutamina (FAN et al., 2006).

A maioria dos vegetais é capaz de reduzir nitrato principalmente em raízes e folhas. O predomínio da redução de nitrato em folhas tem sido descrito em espécies como *Lotus japonicus* (PAJUELO et al., 2002) e *Trifolium repens* (CASTLE; ROWARTH, 2003). Em contraste, em centeio (CASTLE; ROWARTH, 2003) e *Dactylus glomerata* (SCHEURWATER et al., 2002) o principal sítio de redução ocorre nas raízes. Interessantemente, em *Canavalia ensiformis* o sítio principal de redução do nitrato apresentou alterações durante o ciclo de desenvolvimento da planta, predominando em folhas durante o desenvolvimento vegetativo e nas raízes durante o florescimento (CAMARGOS; AGUIAR; AZEVEDO, 2006).

A NiR é uma enzima codificada por genes do núcleo da célula e transportada para o estroma dos cloroplastos em tecidos verdes e para os plastídeos nas raízes (MILLER; CRAMER, 2005). A enzima NiR apresenta uma regulação similar a observada para a enzima NR, sendo

fortemente induzida por nitrato, provavelmente para prevenir o acúmulo de nitrito tóxico (WANG et al., 2000) e na presença de luz (OREA et al., 2001). A NiR também pode ser induzida na presença de carboidratos ou sofrer inibição na presença dos aminoácidos glutamina e asparagina (SIVASANKAR; ROTHSTEIN; OAKS, 1997).

1.1.2 A síntese dos aminoácidos

Os aminoácidos são sintetizados nos vegetais em complexas vias metabólicas (ver Figura 1.1) controladas por enzimas, substratos e pelos próprios aminoácidos produtos finais. Além dos vinte aminoácidos que são comumente produzidos e incorporados nas proteínas, mais de trezentos tipos adicionais têm sido identificados nos vegetais (FERREIRA et al., 2005). Os aminoácidos também desempenham importantes funções como transportadores de nitrogênio para diferentes partes nos vegetais (LEA; AZEVEDO, 2006; TODD; POLACCO, 2006), como reguladores em diversos processos envolvidos em resposta a diferentes condições ambientais e sendo, ainda, importantes para a qualidade nutricional das proteínas presentes nas sementes (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Entre os vinte aminoácidos incorporados nas proteínas, nove (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, leucina, valina e histidina) são denominados essenciais porque não são sintetizados por humanos e animais monogástricos, sendo adquiridos nas dietas alimentares (FERREIRA et al., 2005).

Inicialmente o amônio absorvido do solo ou reduzido a partir de nitrato via NR e NiR é assimilado em glutamina e glutamato via ciclo GS-GOGAT (ANDREWS et al., 2004). A partir deste ponto, complexas vias metabólicas darão origem aos demais aminoácidos.

A lisina, treonina, metionina e isoleucina são sintetizadas a partir de um precursor comum, o aspartato (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Esta via metabólica será descrita com maiores detalhes posteriormente.

As vias metabólicas de síntese de leucina e valina são consideradas bioquimicamente paralelas e o controle destas vias ocorre principalmente através da ação da enzima acetolactato sintase (EC 4.1.3.18). O ramo que conduz à síntese de leucina também é independentemente regulado pela ação da enzima α -isopropilmalato sintase (EC 4.1.3.12). O aminoácido valina é sintetizado em quatro reações enzimáticas catalisadas pelas enzimas acetolactato sintase, ácido acetohidroxi redutoisomerase (EC 1.1.1.86), ácido dihidroxi desidratase (EC 4.2.1.9) e

aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (EC 2.6.1.42). O aminoácido leucina é sintetizado a partir de 2-oxoisovalerato em quatro reações catalisadas pelas enzimas α -isopropilmalato sintase (EC 4.1.3.12), 3-isopropilmalato desidratase (EC 4.2.1.33), β -isopropilmalato desidrogenase (EC 1.1.1.85) e aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (VELISEK; CEJPEK, 2006).

O estudo da síntese de asparagina apresenta um interesse considerável devido à função central deste composto no transporte e no armazenamento de nitrogênio em plantas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Na maioria dos vegetais, a síntese de asparagina ocorre pela ação da enzima asparagina sintetase (EC 6.3.5.4) que utiliza o aminoácido glutamina como doador de grupamento amida (LEA et al., 2007). Um mecanismo alternativo para a síntese de asparagina envolve a condensação de cisteína e ácido cianídrico (HCN) formando β -cianoalanina e água. Estas reações são catalisadas pelas enzimas β -cianoalanina sintase (EC 4.4.1.9) e β -cianoalanina hidratase (EC 4.2.1.65) (BRYAN, 1990).

A alanina é sintetizada a partir de piruvato, acceptor de grupo amino, em uma reação catalisada por uma enzima aminotransferase (BRYAN, 1990).

As sínteses de serina e glicina estão intimamente relacionadas com a via de fotorrespiração nos vegetais. O glicolato formado nos cloroplastos é oxidado a glioxalato e convertido a glicina nos peroxissomos através da ação das enzimas glicolato oxidase (EC 1.1.3.15), serina:glioxilato aminotransferase (EC 2.6.1.45) e aminoácido:glioxalato aminotransferase (EC 2.6.1.46). O aminoácido glicina formado é, então, utilizado para a síntese de serina nas mitocôndrias. Esta síntese é facilitada por um complexo de enzimas com atividades de glicina descarboxilase e serina hidroximetiltransferase. Na ausência de fotorrespiração a serina também é sintetizada a partir de fosfoglicerato em uma série de reações catalisadas pelas enzimas fosfoglicerato desidrogenase (EC 1.1.1.95), fosfoserina aminotransferase (EC 2.6.1.52) e fosfoserina fosfatase (EC 3.1.3.3). Uma vez sintetizado, o aminoácido serina é convertido em glicina em uma reação catalisada pela enzima serina hidroximetiltransferase (EC 2.1.2.1) (BRYAN, 1990).

Os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano são sintetizados na via metabólica do ácido shikímico. A partir dos substratos fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato ocorrem sete reações enzimáticas que levam a formação de corismato. A partir desse ponto a via se divide em dois ramos, um que conduz a síntese de triptofano e o outro que conduz a síntese de

fenilalanina e tirosina. O aminoácido triptofano é sintetizado a partir de cinco reações enzimáticas iniciando-se com a ação da enzima antranilato sintase (EC 4.1.3.27). No outro ramo da via, ocorre a conversão de corismato formando prefenato pela ação da enzima corismato mutase (EC 5.4.99.5). A seguir, ocorre a transaminação de prefenato para a formação de arogenato. A síntese de tirosina a partir de arogenato é catalisada pela enzima arogenato desidrogenase (EC 1.3.1.43), enquanto que a síntese de fenilalanina é catalisada pela enzima arogenato desidratase (EC 4.21.91) (VELISEK; CEJPEK, 2006).

Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a via metabólica responsável pela síntese de histidina. A síntese de histidina inicia-se com a ação da enzima ATP fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.17). Após uma série de reações enzimáticas, o aminoácido histidina é sintetizado a partir de histidinol em uma reação catalisada pela enzima histidinol desidrogenase (EC 1.1.1.23) (STEPANSKY; LEUSTEK, 2006).

A arginina e a prolina são sintetizadas a partir do aminoácido glutamato em duas diferentes vias. Arginina é sintetizada a partir de glutamato em uma série de reações enzimáticas iniciando-se com as enzimas acetilCoA:glutamato N-acetiltransferase (EC 2.3.1.1) e acetilornitina:glutamato N-acetiltransferase (EC 2.3.1.35), sendo sintetizada em uma última reação que converte o arginosuccinato em arginina pela ação da enzima arginosuccinato liase (EC 4.3.2.1). A prolina é sintetizada em outro ramo em quatro reações enzimáticas, sendo formada em um último estágio a partir de pirrolina 5-carboxilato em uma reação catalisada pela enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (EC 1.5.1.2) (BRYAN, 1990).

Figura 1.1 – Visão geral das principais vias metabólicas envolvidas na síntese dos 20 aminoácidos

1.1.3 A via metabólica do ácido aspártico

O aspartato é o composto inicial da via metabólica do ácido aspártico (Figura 1.2) e é formado pelo processo de transaminação do ácido oxaloacético, sendo originado no ciclo de Krebs nas mitocôndrias ou através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase no citoplasma (FERREIRA et al., 2005; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O aspartato atua como precursor comum em duas vias metabólicas. A primeira conduz à síntese do aminoácido asparagina, que atua como transportador de nitrogênio, sendo produzido pela ação da enzima asparagina sintetase (ANDREWS et al., 2004). A segunda conduz à síntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO, 2002).

Devido à baixa concentração de lisina observada nos cereais, a via metabólica do ácido aspártico tem sido estudada utilizando-se abordagens moleculares e bioquímicas e os resultados obtidos têm demonstrado a importância das enzimas aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52) como enzimas chave envolvidas na síntese de lisina (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), enquanto que as enzimas lisina cetoglutarato redutase (LKR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são enzimas chave envolvidas na via de degradação de lisina (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Na via metabólica do ácido aspártico, a primeira reação enzimática ocorre pela ação da enzima AK que catalisa a fosforilação do aspartato formando β -aspartil fosfato. O β -aspartil fosfato é, então, convertido a β -aspartato semialdeído pela ação da enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A partir desse ponto a via metabólica se divide em dois ramos, um que conduz à síntese de lisina e o outro que conduz à síntese de treonina, isoleucina e metionina. Sendo que o último se ramifica em dois ramos distintos, um que conduz à síntese de metionina e o outro que leva à formação de treonina e isoleucina (FERREIRA et al., 2005).

O aminoácido lisina é sintetizado a partir de β -aspartato semialdeído em sete reações enzimáticas iniciadas pela ação da enzima DHDPS que catalisa a condensação de piruvato e β -aspartato semialdeído formando 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato. Após a formação do tetrahidrodipicolinato seguem-se seis reações enzimáticas catalisadas pelas enzimas

dihidrodipicolinato redutase (DHDPR, EC 1.3.1.26), tetrahidrodipicolinato acilase (THPA, EC 2.3.1.117), N-acil-L,L-diaminopimelato aminotransferase (ADPAT, EC 2.6.1.17), N- α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase (ADPD, EC 3.5.1.18), diaminopimelato epimerase (DAPE, EC 5.1.1.17) e diaminopimelato descarboxilase (DAPD, EC 4.1.1.20) (HUDSON et al., 2005; HUDSON et al., 2006).

No outro ramo, o β -aspartato semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima HSDH. A seguir, a homoserina é fosforilada a *O*-fosfohomoserina pela ação da enzima homoserina kinase (HK, EC 2.7.1.39) e convertida em treonina pela enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2). O aminoácido isoleucina é sintetizado a partir de treonina em uma série de cinco reações enzimáticas catalisadas pelas enzimas treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16), ácido acetohidroxi sintase (AHAS, EC 4.1.3.18), ácido acetohidroxi isomeroreductase (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 metionina é sintetizada em outro ramo a partir de *O*-fosfohomoserina em três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationina γ -sintase (CGS, EC 4.9.99.9), cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8) e metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A presença do catabolismo de lisina (Figura 1.3) em plantas foi descrita por Sodek e Wilson (1970). O aminoácido lisina é catabolizado em duas reações enzimáticas consecutivas que envolvem a enzima LKR, a qual catalisa a formação de sacaropina que em seguida é hidrolisada em glutamato e em ácido α -aminoadípico pela ação da enzima SDH (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Figura 1.2 – A via metabólica do ácido aspártico. *AS*, asparagina sintetase; *ASNase*, asparaginase; *AK*, aspartato quinase; *ASADH*, aspartato semialdeído desidrogenase; *HSDH*, homoserina desidrogenase; *HK*, homoserina quinase; *CGS* cistationina γ -sintase; *TS* treonina sintase; *CBL*, cistationina β -liase; *MS*, metionina sintase; *SAM-S*, S-adenosilmetionina sintetase; *TD*, treonina deaminase; *AHAS*, ácido acetohidroxi sintase; *AHRI*, ácido acetohidroxi isomeroreductase; *DHAD*, ácido dihidroxi desidratase; *BCAT*, aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase; *DHDPS*, dihidrodipicolinato sintase; *DHDPR*, dihidrodipicolinato redutase; *THPA*, tetrahidrodipicolinato acilase; *ADAPAT*, *N*-acil-L,L-diaminopimelato aminotransferase; *ADPD*, *N*- α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase; *DAPE*, diaminopimelato epimerase; *DAPD*, diaminopimelato decarboxilase; (-) inibição; (+) indução; (*) não existe evidência da existência em vegetais superiores

Figura 1.3 - A via de degradação de lisina e os metabólitos gerados. LKR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina desidrogenase

1.1.4 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase

A aspartato quinase é a primeira enzima da via metabólica do ácido aspártico que catalisa a fosforilação do aspartato para a produção de β -aspartil fosfato. Inicialmente a AK foi estudada em microrganismos e posteriormente em diversas espécies vegetais como milho (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992a; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992b; AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b), arroz (TEIXEIRA et al., 1998; LUGLI; GAZIOLA; AZEVEDO, 2000), coix (LUGLI et al., 2002) e sorgo (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006).

Nos vegetais, pelo menos, duas isoenzimas distintas da AK têm sido descritas. Uma isoenzima monofuncional e sensível à inibição por lisina (FERREIRA et al., 2005) e a outra presente em um polipeptídeo bifuncional apresentando um domínio de AK e outro de HSDH, sendo sensível à inibição por treonina (ROGNES et al., 2003; AZEVEDO; LANCIEN; LEA,

2006). Embora as isoenzimas da AK possam variar dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento, em geral, a isoenzima monofuncional tem sido descrita como predominante (GALILI, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), com raras exceções a exemplo de coix (LUGLI et al., 2002) no qual a isoenzima bifuncional e sensível à inibição por treonina foi descrita como predominante.

Bioquimicamente, a enzima AK tem sido purificada utilizando-se cromatografia de troca aniônica e filtração em gel e suas propriedades caracterizadas em diversas espécies (AZEVEDO, 2002). Em células de milho, a enzima AK foi purificada após cinco etapas que incluíram precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica, filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida (AZEVEDO et al., 1992). Duas isoenzimas da AK sensíveis à inibição por lisina foram eluídas em colunas de cromatografia de troca aniônica e uma terceira isoenzima sensível à inibição por treonina foi identificada por filtração em gel, confirmando a hipótese da existência de três isoenzimas presentes em vegetais superiores (AZEVEDO et al., 1992). Em folhas de cevada, três picos de atividade da enzima foram eluídos em coluna de DEAE-celulose, sendo o primeiro pico referente à isoenzima da AK sensível à inibição por treonina, denominada de AKI e os outros dois picos, um referente à isoenzima sensível à inibição por lisina e o outro por lisina mais SAM, denominadas de AKII e AKIII, respectivamente (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982). A enzima AK também foi purificada de sementes de sorgo (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006) sendo obtido um baixo nível de purificação e sendo observada baixa estabilidade da atividade como também relatado para coix (LUGLI et al., 2002).

A enzima HSDH catalisa a conversão de β -aspartato semialdeído em homoserina na presença de NADH ou NADPH (FERREIRA et al., 2005). A enzima HSDH foi primeiramente estudada em procariotos e posteriormente em vegetais (AZEVEDO; LEA, 2001). Duas isoenzimas da HSDH têm sido observadas em vegetais, uma sensível e a outra resistente à inibição por treonina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A existência de um polipeptídeo bifuncional, contendo os domínios de AK e HSDH, foi sugerida pela primeira vez por Aarnes e Rognes (1974) trabalhando com ervilha. Contudo, a existência deste polipeptídeo contendo as atividades de AK e HSDH sensíveis à inibição por treonina somente foi confirmada por Wilson et al. (1991) em células de cenoura e por Azevedo et al. (1992a) em células de milho através da co-purificação das atividades da AK e HSDH.

Além dos estudos bioquímicos, importantes resultados utilizando-se abordagens moleculares trouxeram importantes informações sobre a regulação e a função dos genes da AK e HSDH em vegetais (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O gene que codifica para a isoenzima bifuncional da AK-HSDH foi clonado em diversas espécies como cenoura (WEISEMANN; MATTHEWS, 1993), soja (GEBHARDT; WEISEMAN; MATTHEWS, 1993) e milho (MUEHLBAUER et al., 1994).

O primeiro clone genômico do gene da AK-HSDH (denominado *akthr1*) foi isolado de *Arabidopsis thaliana* a partir de uma biblioteca genômica utilizando-se como sonda um cDNA da AK-HSDH de cenoura (GHISLAIN et al., 1994). Posteriormente, um novo cDNA da AK-HSDH, denominado *akthr2*, foi isolado de *A. thaliana* pelo complemento funcional de um gene da HSDH (*hom6*) de um mutante de levedura (ROGNES et al., 2003). Em *A. thaliana*, também foram isolados três diferentes cDNAs que codificam para a enzima monofuncional da AK sensível à inibição por treonina (FRANKARD; VAUTERIN; JACOBS, 1997; TANG et al., 1997b; YOSHIOKA; KUREI; MACHIDA, 2001).

Em milho foram isolados três cDNAs que codificam para a AK-HSDH. A análise dos cDNAs denominados pAKHSDH1 e pAKHSDH2 revelaram a presença completa da região codificadora da enzima bifuncional AK-HSDH, enquanto que o cDNA denominado pAKHSDH3 apresentou apenas a sequência parcial do gene (MUEHLBAUER et al., 1994).

1.1.5 Dihidrodipicolinato sintase

O aminoácido lisina é sintetizado a partir de β -aspartato semialdeído em sete reações enzimáticas iniciadas pela ação da enzima DHDPS. A enzima DHDPS catalisa a condensação do piruvato e β -aspartato semialdeído para a produção de 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A atividade da DHDPS tem sido detectada em diversos tecidos vegetais e sua localização tem sido descrita em cloroplastos (AZEVEDO; LEA, 2001). A enzima DHDPS foi purificada parcialmente em espécies como trigo (KUMPAISAL; HASHIMOTO; YAMADA, 1987), milho (FRISCH et al., 1991) e ervilha (DEREPPE et al., 1992). Diferentemente do observado para as enzimas AK e HSDH, somente uma forma altamente sensível à inibição por baixas concentrações de lisina tem sido descrita (AZEVEDO; LANCIEN;

LEA, 2006) e estudos cinéticos indicaram que o piruvato se liga alostericamente, enquanto que o β -aspartato semialdeído se liga de forma não alostérica à enzima (DEREPPE et al., 1992).

As enzimas DHDPS isoladas de trigo, milho, *Nicotiana sylvestris* e espinafre foram descritas como enzimas oligoméricas com massas moleculares de 123 kDa, 130 kDa, 164 kDa e 115 kDa, respectivamente, todas sendo compostas por quatro subunidades idênticas (AZEVEDO; LEA, 2001). A estrutura da DHDPS foi determinada em *N. sylvestris*, sendo formada por um homotetrâmero composto por dois dímeros (BLICKLING et al., 1997). Além disso, a determinação da estrutura na presença de lisina revelou alterações estruturais importantes que explicam a forte inibição causada na atividade desta enzima por este aminoácido (BLICKLING et al., 1997).

Os genes que codificam para a DHDPS foram isolados em espécies como soja (SILK et al., 1994), *A. thaliana* (VAUTERIN; JACOBS, 1994) e coix (DANTE et al., 1999). Em milho, o uso de mutação, alterando um único aminoácido, provocou importantes alterações na estrutura da enzima eliminando a sensibilidade da DHDPS à inibição causada por lisina (SHAVER et al., 1996). Em *N. sylvestris*, um mutante para alta produção de lisina foi obtido por mutação e seleção em meio contendo S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) (GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1995). A análise da sequência de aminoácidos revelou que a insensibilidade da enzima à inibição pelo aminoácido lisina foi causada pela substituição de asparagina por isoleucina na posição 104 da proteína madura (GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1995).

Em *A. thaliana*, foram isolados e identificados dois genes que codificam para a enzima DHDPS (VAUTERIN; FRANKARD; JACOBS, 1999; SARROBERT et al., 2000). O gene *dhdps-1* foi descrito localizado no cromossomo III, enquanto que, o gene *dhdps-2* foi localizado no cromossomo II de *A. thaliana*. Estudos de inibição demonstraram que a enzima DHDPS2 foi menos sensível à inibição por lisina do que a enzima DHDPS1 (SARROBERT et al., 2000).

1.1.6 Síntese de lisina: estágios finais

Após a formação do dihidrodipicolinato, a síntese de lisina ocorre em seis reações enzimáticas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Contudo, poucas informações estão disponíveis sobre as enzimas que participam desta etapa final (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Em vegetais tem sido proposto que a síntese de lisina ocorre a partir do ácido diaminopimélico (DAP), contudo, três variantes desta via têm sido descritas em procariotos: A primeira variante apresenta o N-succinil como intermediário, a segunda utiliza o N-acetil e a terceira utiliza a enzima *meso*-diaminopimelato desidrogenase para converter o dihidrodipicolinato a *m*-DAP (HUDSON et al., 2005).

Em uma tentativa de elucidar os últimos estágios da via de síntese de lisina, Hudson et al.(2005) preparam extratos de milho, tabaco, soja e *Chlamydomonas* para análise enzimática. Contudo, não foi possível a detecção significativa da atividade das enzimas *N*- α -succinil- α -amino-acetopimelato-glutamato aminotransferase, *N*- α -succinil-L,L-diaminopimelato deacilase ou *N*- α -acetil-L,L-diaminopimelato deacilase nos extratos utilizados (HUDSON et al., 2005). Para confirmar os resultados bioquímicos negativos, uma busca utilizando-se seqüências de genes disponíveis em bancos de dados foi realizada e genes ortólogos das enzimas dihidrodipicolinato redutase e diaminopimelato epimerase foram encontrados no genoma de *A. thaliana* (HUDSON et al., 2005). Estudos posteriores demonstraram que a enzima LL-DAP aminotransferase codificada pelo locus *At4g33680* em *A. thaliana* foi capaz de complementar a atividade das enzimas *dapD* e *dapE* de *E. coli* (HUDSON et al., 2006). Estes resultados demonstraram evidências de que os vegetais podem utilizar uma variante da via de síntese de lisina descrita em bactérias.

1.1.7 O catabolismo de lisina

A presença do catabolismo de lisina foi confirmada em vegetais pela observação de que ¹⁴C-lisina injetada em sementes de cevada era convertida em glutamato e α -aminoadípico semialdeído (SODEK; WILSON, 1970). Duas enzimas estão envolvidas no catabolismo de lisina em animais, microrganismos e plantas. A enzima LKR é a primeira enzima da via e é responsável pela condensação da lisina e do cetoglutarato formando sacaropina que é hidrolisada em ácido aminoadípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela enzima SDH (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006). Embora as enzimas LKR e SDH possam estar presentes em vegetais como enzimas monofuncionais, a maior parte dos trabalhos tem demonstrado que a maior parte da atividade da LKR e SDH está presente em um polipeptídeo bifuncional (GALILI, 2002; LIMA et al., 2003). A caracterização bioquímica da enzima monofuncional da LKR e da

bifuncional LKR-SDH de *A. thaliana* revelou que o K_m da enzima monofuncional para lisina foi aproximadamente 10 vezes maior do que para a isoenzima bifuncional (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Alguns estudos cinéticos têm revelado resultados diversos. Em milho, a sacaropina é um inibidor competitivo de lisina e não-competitivo de cetoglutarato, sugerindo um mecanismo em que a lisina inicialmente interage com a enzima e depois com cetoglutarato e NADPH, sendo o oposto observado em arroz (FORNAZIER et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado em diferentes espécies que o aminoácido lisina pode regular seu próprio catabolismo com as enzimas sendo moduladas diferencialmente em uma cascata de sinais intracelular envolvendo principalmente cálcio e um processo de fosforilação-desfosforilação da proteína (AZEVEDO, 2002).

O gene que codifica para a enzima bifuncional LKR-SDH foi clonado pela primeira vez de *A. thaliana* (TANG et al., 1997a), sendo posteriormente, clonado de outras espécies como milho (KEMPER et al., 1999). Em *A. thaliana*, o locus *lkr-sdh*, além de codificar para o polipeptídeo bifuncional da LKR-SDH, ainda codifica para a enzima monofuncional da SDH, presente em um gene autônomo que está localizado no interior da região codante e 3'UTR (3' não traduzida) do gene da *lkr-sdh* (TANG et al., 1997a; ZHU; TANG; GALILI, 2000; TANG et al., 2002).

1.1.8 Regulação da via metabólica do ácido aspártico

Na via de síntese de lisina o principal controle é exercido pelas enzimas AK e DHDPS. Embora as duas enzimas sejam inibidas por retro-inibição pelo aminoácido lisina, a DHDPS é a principal enzima limitante da síntese de lisina. Diversos estudos têm demonstrado que a enzima DHDPS (K_i 5-50 μ M) apresenta uma sensibilidade maior à lisina do que a isoenzima da AK sensível à inibição por este aminoácido (K_i 200-600 μ M). Alguns trabalhos com plantas expressando formas das enzimas AK e DHDPS menos sensíveis à inibição por lisina corroboram a hipótese de uma função regulatória mais importante no ponto da via catalisado pela enzima DHDPS (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Além disso, a observação de que plantas expressando a DHDPS insensível à inibição por lisina apresentaram reduzido conteúdo do aminoácido treonina sugere que as enzimas DHDPS e HSDH competem pelo substrato comum, β -aspartato semialdeído, e o

aumento na concentração celular levando ao acúmulo de lisina ou treonina podem alterar o fluxo de carbono através da via metabólica (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

O mecanismo envolvido na regulação por retro-inibição das enzimas AK e DHDPS em vegetais ainda não é completamente conhecido. Em bactérias e fungos, a sensibilidade destas enzimas à lisina ou treonina está associada a domínios específicos aos quais estes aminoácidos se ligam. Estes domínios estão localizados na parte C-terminal da isoenzima monofuncional ou no domínio intermediário entre os domínios de AK e HSDH na isoenzima bifuncional (VIOLA, 2001). Alguns trabalhos, também sugerem a participação de algumas chaperonas como a FKP12 em fungos (ALARCON; HEITMAN, 1997) ou GroE em *E. coli* (McLENNAN; MASTERS, 1998) na regulação destas enzimas por retro-inibição.

Além da via de síntese, a via metabólica do ácido aspártico também é altamente regulada durante o processo de degradação, principalmente pelas enzimas LKR e SDH. O acúmulo de lisina em plantas transgênicas expressando a enzima DHDPS insensível à inibição por lisina provocou estímulos na atividade da enzima LKR via cascata de sinalização que requer a participação de cálcio e fosforilação-desfosforilação da proteína (GALILI et al., 2001). Alguns estudos sugerem que o estímulo causado na atividade da LKR pela fosforilação da LKR-SDH possa ser mediada pela participação da caseína quinase II (ARRUDA et al., 2000). Além disso, é possível que a caseína quinase II também regule a transcrição do gene da LKR-SDH (GALILI et al., 2001). De modo geral, a regulação pós-traducional da enzima LKR está fortemente associada com a regulação dos níveis celulares de lisina (ARRUDA et al., 2000).

1.1.9 Mutantes bioquímicos

Os estudos bioquímicos, genéticos e moleculares da via do ácido aspártico levaram à compreensão de mecanismos importantes para a manipulação metabólica da via e para a elaboração de estratégias para produção de cereais com alto teor de lisina nas sementes. Quatro principais estratégias têm sido utilizadas para produção de cereais que acumulam alta concentração de lisina: O melhoramento genético, a identificação de mutantes naturais (exemplo: *opaco* e *floury*), a indução de mutantes bioquímicos e a produção de plantas transgênicas (AZEVEDO; LEA, 2001).

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e regeneração de plantas permitiu a obtenção de mutantes bioquímicos utilizando-se mutagênese e seleção em meios seletivos contendo alta concentração de aminoácidos da via do ácido aspártico ou de análogos destes aminoácidos (AZEVEDO, 2002).

Em um primeiro momento, foram selecionados e obtidos mutantes de cevada, milho, tabaco e *A. thaliana* que apresentaram resistência aos aminoácidos lisina e treonina (AZEVEDO, 2002). Em milho, os mutantes selecionados apresentaram resistência à treonina e lisina como característica dominante. Estes mutantes apresentaram alto conteúdo de treonina, mas não apresentaram alta concentração de lisina no endosperma (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002). Em cevada, a análise bioquímica dos mutantes demonstrou associação com propriedades metabólicas de duas isoenzimas da AK sensível à lisina, sendo observados aumentos em treonina solúvel que variaram entre 15 a 70 vezes entre os mutantes selecionados. Contudo, foi observada apenas uma pequena variação na concentração de lisina (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002). Em *A. thaliana*, o mutante resistente à inibição por treonina e lisina demonstrou um aumento de 6 vezes na concentração de treonina solúvel, que foi devido à insensibilidade parcial da isoenzima da AK sensível à lisina, enquanto que um segundo mutante contendo uma isoenzima da AK sensível a treonina alterada, apresentou um relativo aumento em lisina, mas a análise de um duplo mutante não demonstrou nenhum aumento no acúmulo de lisina ou treonina (AZEVEDO; LEA, 2001).

Uma segunda abordagem utilizada foi a seleção de plantas resistentes ao aminoetil cisteína (AEC). Seguindo-se esta estratégia, mutantes resistentes a este análogo de lisina foram obtidos em cevada, *A. thaliana*, milho e tabaco (AZEVEDO, 2002). As análises bioquímicas e genéticas revelaram que os mutantes de cevada, *A. thaliana* e milho apresentaram resistência ao AEC devido à redução na absorção deste composto pelas raízes das plantas. No entanto, o mutante de tabaco obtido apresentou uma forma da enzima DHDPS insensível à inibição pelo aminoácido lisina que foi responsável pelo aumento na concentração de lisina solúvel em folhas (AZEVEDO, 2002).

1.1.10 Plantas transgênicas

O estudo dos mutantes apresentando alterações na sensibilidade das enzimas AK e DHDPS aos aminoácidos lisina, treonina e ao AEC, contribuíram para a compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos na via metabólica do ácido aspártico, principalmente aos relacionados à regulação das enzimas chave da síntese de lisina AK e DHDPS. Além dos mutantes bioquímicos, o uso de plantas transgênicas se revelou como uma importante metodologia para o estudo desta via metabólica.

Utilizando-se a mesma estratégia de se alterar a regulação de enzimas como a AK e a DHDPS, foram obtidas plantas transgênicas expressando genes bacterianos menos sensíveis à inibição por lisina ou genes contendo alterações na composição de aminoácidos que tornaram as enzimas menos sensíveis à inibição por este aminoácido (GALILI, 1995). Plantas transgênicas contendo o gene *lysC* de *E. coli* foram obtidas em tabaco, em canola, em cevada e em *A. thaliana* (AZEVEDO, 2002). Em tabaco, a análise demonstrou um aumento de 20 vezes na concentração de lisina nas folhas, enquanto que em canola foi observado um incremento de 20 vezes na concentração de treonina em sementes (GALILI, 1995; AZEVEDO; LEA, 2001). Além dos genes da AK, foram obtidas plantas transgênicas contendo o gene *dapA* de *E. coli* em tabaco, em cevada e em *A. thaliana* e contendo o gene *dapA* de *Corynebacterium* em canola (GALILI, 1995; AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002). Em tabaco, foi observado um aumento de 100 vezes na concentração de lisina em folhas, enquanto que em sementes de canola e cevada, além do aumento na concentração de lisina, foi observado um incremento na concentração de ácido α -aminoadípico, indicando um aumento na degradação de lisina (AZEVEDO; LEA, 2001). Em soja e canola, plantas transgênicas foram produzidas expressando combinações dos genes *dapA* e *lysC-M4* que codificam para a AK e DHDPS, respectivamente. Em soja, foi observado aumento na concentração solúvel de lisina em sementes, o que não ocorreu com a canola. Contudo, as plantas que apresentaram incrementos na concentração de lisina também apresentaram alterações fenotípicas como esterilidade parcial e retardo no florescimento (FALCO et al., 1995).

Para elucidar a importância da via de degradação no acúmulo de lisina Zhu et al. (2001) produziram plantas transgênicas de *A. thaliana* com *Knockout* do gene da LKR-SDH. A análise revelou alta concentração do aminoácido lisina nas sementes. Posteriormente, o gene da DHDPS de bactéria foi expresso em plantas selvagens e transgênicas de *A. thaliana* para *knockout* da

LKR-SDH (ZHU; GALILI, 2003). Enquanto as plantas transgênicas expressando o gene da DHDPS apresentaram aumentos de 5 a 12 vezes em relação ao tipo selvagem, as plantas que apresentavam a combinação dos dois caracteres demonstraram um efeito sinérgico que provocou um aumento de 80% na concentração de lisina solúvel (ZHU; GALILI, 2003). Contudo, esta característica se mostrou correlacionada a severas reduções na germinação das sementes (ZHU; GALILI, 2003). Para elucidar se os efeitos observados durante a germinação das sementes nestas plantas transgênicas estavam associados aos efeitos negativos do excesso de lisina ou aos efeitos de pós-germinação devido à redução no catabolismo de lisina, foram produzidas plantas co-expressando o gene da DHDPS de bactéria e uma construção de RNAi para silenciamento do gene da LKR-SDH sobre o controle de um promotor específico para o desenvolvimento do endosperma (ZHU; GALILI, 2004). A análise destas plantas revelou que as reduções na germinação das sementes observadas anteriormente, ocorreram devido ao bloqueio na via de degradação de lisina e não devido ao acúmulo excessivo de lisina em concentrações tóxicas para a planta (ZHU; GALILI, 2004).

1.1.11 O milho

O cultivo do milho (*Zea mays*) é amplamente difundido no mundo. Os maiores produtores mundiais são os Estados Unidos da América, China, União Européia e Brasil (SCHIERBAUM, 2007). Em países da Ásia, África e América Latina a maior parte do milho produzida é utilizada como alimento e representa a base alimentar da grande maioria da população. Entretanto em países desenvolvidos, o milho é utilizado principalmente para a alimentação animal e apenas 10% é destinado ao consumo humano (SCHIERBAUM, 2007).

Normalmente os grãos de milho contém aproximadamente 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9-11% de proteínas e 9% de fibras (LANDRY et al., 2005). As proteínas de reserva do milho são classificadas em grupos de acordo com suas características de solubilidade: Albumina (solúvel em água), globulina (solúvel em soluções salinas), prolamina (solúvel em álcool) e glutelina (solúvel em álcali diluído) (LANDRY et al., 2005).

As frações albumina e globulina representam aproximadamente 6% das proteínas totais, enquanto que a fração glutelina corresponde a 30-40% do total. A fração prolamina, conhecida

como zeína, é a mais abundante e pode representar 60-70% do total das proteínas (BALCONI et al., 1998; LANDRY et al., 2005).

As frações zeína e glutelina se localizam principalmente no endosperma, enquanto que as frações albumina e globulina, embora sejam encontradas em todo o grão, estão presentes principalmente no embrião e em baixas quantidades no endosperma (HOLDING; LARKINS, 2006).

A fração zeína é formada por proteínas hidrofóbicas que se caracterizam pela deficiência nos aminoácidos lisina e triptofano em sua composição, concentrações inadequadas de treonina e valina e um balanço inadequado entre os aminoácidos leucina e isoleucina (HOLDING; LARKINS, 2006). Em contraste, as frações albumina, globulina e glutelina apresentam concentrações balanceadas de aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano (HOLDING; LARKINS, 2006). A fração não-zeína apresenta função estrutural e em alguns casos metabólica, a exemplo da albumina b-32 pertencente à classe de proteínas *RIPs* (RNA N-glicosidases), enquanto que a fração zeína tem a função de prover nitrogênio durante a germinação e estágios primários do crescimento das plântulas (BASS et al., 1992).

A fração zeína quando observada em SDS-PAGE apresenta polipeptídeos que estão divididos nas classes γ -zeína (27-kDa), α -zeína (22-kDa e 19-kDa), β -zeína (16-kDa e 14-kDa) e δ -zeína (10-kDa) (HERMAN; LARKINS, 1999). A α -zeína representa a classe mais abundante correspondendo a 75-80% dos polipeptídeos, a β -zeína corresponde a 10%, γ -zeína representa 10-15%, enquanto que a δ -zeína corresponde a menor fração (HOLDING; LARKINS, 2006; LENDING; LARKINS, 1992). Por outro lado, as frações glutelina, albumina e globulina apresentam um perfil eletroforético mais complexo com numerosas bandas.

1.1.12 As mutações *opaco-2* e *floury-2*

Os mutantes de milho que apresentam alterações no endosperma (aspecto opaco) geralmente estão agrupados em três classes: os mutantes recessivos da série *opaco* (*o1*, *o2*, *o5*, *o7*, *o9-o11* e *o13-o17*), os mutantes semi-dominantes *floury* (*fl1*, *fl2* e *fl3*) e os mutantes dominantes *Mucronate* (*Mc*). Estudos têm sugerido que as mutações recessivas afetam genes regulatórios como os fatores de transcrição, enquanto que as mutações semi-dominantes e

dominantes afetam genes estruturais (HUNTER et al., 2002; SEGAL; SONG; MESSING, 2003; HUANG et al., 2005).

A mutação *o2* em milho foi identificada pela primeira vez na década de 1930, contudo os efeitos desta mutação somente foram descritos anos mais tarde (MERTZ; NELSON; BATES, 1964). Mertz et al. (1964) demonstraram que o mutante *o2* apresentava uma composição de aminoácidos mais balanceada com significativo aumento no conteúdo de lisina em sementes quando comparado ao genótipo selvagem. Contudo, neste mutante foram observadas características agronômicas negativas como menor produtividade, maior suscetibilidade aos danos mecânicos, às pragas e às doenças quando comparados com as linhagens comerciais (AZEVEDO; LEA, 2001).

O gene *o2* foi clonado utilizando-se a técnica de *transposon tagging* com elemento *Supressor-mutator* (Spm) que gerou mutantes instáveis que foram utilizados para isolar um fragmento de restrição contendo o elemento Spm e uma porção do *locus o2* (SCHMIDT; BURR; BURR, 1987). Posteriormente, o gene *o2* foi clonado e seqüenciado. A análise revelou uma seqüência contendo seis exons interrompida por cinco introns e precedida por uma região 5' UTR longa contendo três ATGs anteriores ao códon ATG de início da tradução (SCHMIDT et al., 1990). A seqüência deduzida de aminoácidos revelou uma proteína contendo 437 aminoácidos apresentando forte homologia com a família de fatores de transcrição que apresentam um domínio de união ao DNA do tipo *basic leucine zipper* (bZIP-zíper básico de leucina) que se caracteriza por uma repetição periódica de leucinas a cada sete aminoácidos e que constitui a interface de dimerização (SCHUERMANN et al., 1989). O exon-5 contém o domínio de dimerização e o exon-4 o motivo básico responsável pelo reconhecimento específico da seqüência de DNA alvo (NEUBERG et al., 1989). O motivo de dimerização é representado pela seqüência L₁-L₂-L₃-L₄-A-L₅-L₆ em que uma simples alanina interrompe a seqüência de repetição de leucina (NEUBERG et al., 1989).

A proteína O2 reconhece uma seqüência palindrômica imperfeita 5'-TCCACGTAGA-3', denominada de *o2-box*, presente na região promotora de genes como a α -zeína de 22-kDa (SCHMIDT et al., 1992). Esta seqüência está inserida na *prolamin-box*, em que estão presentes três sítios de união para o motivo *o2*, denominados Z1, Z2 e Z3, em associação com outra seqüência reguladora, o motivo endosperma (MAURI et al., 1993).

Similarmente ao que ocorre com a síntese de polipeptídeos da fração zeína, a transcrição do *o2* se inicia aos 11 DAP (dias após a polinização) e permanece constante por aproximadamente 25 dias (GALLUSCI; SALAMINI; THOMPSON, 1994). Diversos trabalhos têm descrito os mecanismos regulatórios envolvendo a proteína O2. Ciceri et al. (1997) demonstraram que a proteína O2 é fosforilada em diferentes níveis e que somente as formas hipofosforiladas ou não fosforiladas de O2 podem se unir com elevada afinidade às seqüências *o2-box*. Os autores ainda sugeriram que o mecanismo de fosforilação-desfosforilação possa ser influenciado por variações nas condições ambientais (CICERI et al., 1997). Trabalhos posteriores demonstraram que os transcritos de *o2* apresentavam oscilações durante o ciclo dia-noite e que estas variações seriam controladas por ciclo circadiano (CICERI et al., 1999).

Apesar das similaridades fenotípicas, existem algumas diferenças bioquímicas entre as mutações *o2* e *fl2*. A mutação *o2* é recessiva, enquanto que a mutação *fl2* é semi-dominante. Os dois mutantes apresentam menor acúmulo da fração zeína, mas a mutação *o2* afeta principalmente a classe de α -zeína de 22-kDa, enquanto que a mutação *fl2* afeta igualmente a síntese de todas as classes de zeínas; os corpos protéicos nos mutante *o2* e *fl2* são menores do que nos genótipos normais, mas a mutação *fl2* codifica corpos protéicos assimétricos e com deformações quando comparados aos codificados pelo mutante *o2* (HUNTER et al., 2002).

Coleman et al. (1995) clonaram o gene que codifica para uma classe de proteína de 24-kDa de um mutante *fl2*, a qual é expressa semelhantemente à classe de α -zeína de 22-kDa. A análise da seqüência e a comparação com a seqüência de aminoácidos da classe de α -zeína de 22-kDa revelou a substituição de um resíduo de alanina por um de valina na porção C-terminal na região do peptídeo sinal, a inserção de um resíduo de histidina com a sétima repetição da α -hélice e uma substituição de um resíduo de alanina por treonina na mesma α -hélice da proteína (COLEMAN et al., 1995). Com base nestes resultados, os autores propuseram algumas conseqüências desta mutação que justificariam os efeitos observados no mutante *fl2*. Nestes mutantes, a zeína de 24-kDa permanece ancorada na membrana do retículo endoplasmático rugoso onde ocorre a formação dos corpos de proteínas. No desenvolvimento normal dos corpos protéicos, as α -zeínas são retidas no retículo endoplasmático onde coalescem em corpos esféricos nos quais estão localizadas no interior de uma concha formada por β - γ -zeínas. A retenção das α -zeínas na membrana do retículo endoplasmático rugoso inibiria o seu movimento para o interior dos corpos protéicos. A interação das α -zeínas ligadas ao retículo endoplasmático rugoso com a

concha de β - γ -zeínas pode interferir na organização espacial das proteínas durante o desenvolvimento dos corpos protéicos formando vários locais para síntese e agregação das α -zeínas perto da superfície da membrana do retículo endoplasmático (COLEMAN et al., 1995). Esta retenção associada ao peptídeo sinal pode explicar a super expressão de *Bips* (*Biding protein*) que se ligam às cadeias polipeptídicas não ativas e estão associadas ao transporte de proteínas no interior do retículo endoplasmático. De modo geral, um defeito no processamento das zeínas pode afetar a via secretora através do retículo endoplasmático, que levaria a uma redução na síntese de proteínas de reserva, aumentos nos níveis de *BiPs* e alterações nos níveis de diversas proteínas citoplasmáticas (COLEMAN et al., 1995).

1.1.13 Efeitos das mutação *opaco* e *floury*

A mutação *o2* tem sido descrita regulando a expressão de genes que codificam para diferentes polipeptídeos da fração zeína, principalmente das classes α -zeína de 22-kDa e 19-kDa (DAMERVAL; DEVIENNE, 1993), e vários outros genes (HUNTER et al., 2002), incluindo o gene da LKR-SDH (KEMPER et al., 1999). Análises das frações de proteínas de reserva utilizando-se 2D-PAGE revelaram que no genótipo W22, a mutação *o2* provocou uma maior redução na expressão da classe de α -zeína de 22-kDa quando comparada com a de 19-kDa. Contudo, o efeito da mutação *o2* sobre a expressão das diferentes classes de zeínas pode variar de acordo com o genótipo em que a mutação for introgridida (CICERI et al., 2000). Plotnikov e Bakaldina (1996) observaram que as sementes do mutante *o2* apresentaram reduções nos níveis de mRNA, principalmente das α -zeínas de 19-kDa e 22-kDa, quando comparadas com as do genótipo selvagem. Neste trabalho, foram observados aumentos de 60 a 70% da atividade RNase em sementes do mutante *o2*, sugerindo-se que a estabilidade diferencial dos mRNAs representam um fator importante na modulação pós-transcricional da expressão de genes que codificam para a fração zeína durante o desenvolvimento das sementes de milho (PLOTNIKOV; BAKALDINA, 1996). Além das proteínas da classe zeína, foi observada alteração na expressão da proteína b-32 no genótipo *o2* (LOHMER et al., 1991). Lohmer et al. (1991) demonstraram que o promotor do gene da albumina b-32 é ativado na presença do produto do gene *o2* e que a informação necessária para esta ativação reside em um fragmento de DNA de 440 pb que contém cinco sítios de ligação para O2 (GATGAPyPuTGpu).

Além das proteínas de reserva, diversas proteínas podem ter sua expressão alterada como consequência da mutação *o2*. A análise do efeito da mutação *o2* na expressão de proteínas durante o desenvolvimento das sementes de milho W54A, F2, W22, B37 e Oh43 revelou reduções nos níveis de expressão da acetohidroxiácido sintase e ortofosfato diquinase e aumentos das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, UDP-glucoronosil transferase e sorbitol desidrogenase (DAMERVAL; LE GUILLOUX, 1998). Maddaloni et al. (1996) mostraram que o fator de transcrição *o2* regula também a expressão da enzima ortofosfato diquinase no endosperma de milho, que apresentou um padrão de expressão similar ao observado para o gene *lkr-sdh*. Estas observações também foram importantes porque reforçaram a hipótese de controle transcricional do gene da *lkr-sdh* pelo fator de transcrição *o2* (MADDALONI et al., 1996). Com base nesta hipótese, foi isolado um clone que codifica para a enzima bifuncional LKR-SDH. O polipeptídeo apresentou um domínio N-terminal de LKR e um domínio C-terminal de SDH. O estudo da expressão do gene da LKR-SDH durante o desenvolvimento em milho normal e *o2*, revelou reduções nos níveis de mRNA que foi seguido por reduções nos níveis do polipeptídeo e da atividade enzimática, sugerindo-se que este gene tem sua expressão reduzida pela mutação *o2* (KEMPER et al., 1999).

Conforme descrito anteriormente, a mutação *fl2* atua por um mecanismo diferente da mutação *o2* afetando cada grupo de zeína de modo equivalente e sendo o efeito altamente dependente da dose gênica (COLEMAN et al., 1995). Outra importante característica da mutação *fl2* é a elevada produção da proteína solúvel b70 que se apresenta em duas isoformas, a b70I e a b70II (BOSTON et al., 1991). Dois cDNAs de uma proteína *BiP* (binding protein) associada ao retículo endoplasmático e pertencente a família de chaperonas moleculares *heat shock protein 70* (HSP70) com funções envolvidas na oligomerização, conformação das proteínas no lúmen do retículo endoplasmático e remoção de proteínas com conformação não adequada, foram isolados e a análise do padrão de expressão gênica por *Northern blot* revelou aumentos nos níveis de RNA nos mutantes *fl2*, *Mucronate* e endosperma defeutivo *B30*, os quais apresentam produção anormal de proteínas de reserva (BOSTON; VIITANEN; VIERLING, 1996). Li e Larkins (1996) observaram aumentos nos níveis de mRNA da proteína dissulfeto isomerase, que estão associadas às cisternas e aos corpúsculos do retículo endoplasmático, em sementes do mutante *fl2* durante o desenvolvimento entre os 10 e 14 DAP. Este aumento também se mostrou correlacionado com aumentos das *BiPs*. Estes resultados indicaram que a indução da dissulfeto isomerase no mutante

fl2 reflete o seu papel funcional como chaperona atuando juntamente com as *BiPs* durante os diferentes estágios de processamento das proteínas da fração zeína para a construção dos corpúsculos protéicos (LI; LARKINS, 1996).

Embora muitos estudos tenham sido realizados utilizando-se o mutante *o2* e em menor extensão o mutante *fl2*, somente recentemente outros mutantes começaram a ser estudados (HUNTER et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b). Para uma melhor compreensão das bases genéticas e bioquímicas, a composição de aminoácidos e o perfil de transcritos de mRNA foram determinados em linhas isogênicas dos mutantes W64Ao1, W64Ao2, W64Ao5, W64Ao9, W64Ao11, W64Afl1, *Mucronate* (*Mc*) e endosperma defectivo *B30* (HUNTER et al., 2002). As maiores reduções na síntese de zeínas foram observadas nos genótipos W64Ao2, *B30* e W64Afl2 (HUNTER et al., 2002). A análise da expressão gênica utilizando-se *Affymetrix GeneChip* contendo mais de 1400 seqüências de genes de milho, revelou que as mutações *opaco* criam uma extensiva mudança no padrão de expressão gênica, causando aumentos principalmente em genes associados ao estresse fisiológico (HUNTER et al., 2002).

A regulação das enzimas AK, HSDH, LKR e SDH no genótipo selvagem Oh43+ e em quatro mutantes (Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1 e Oh43fl2) foram estudadas por Azevedo et al. (2003). Nesse trabalho, foram observados aumentos significativos da atividade da AK para os mutantes Oh43o1 e Oh43fl2 e, em contraste, foram observadas reduções da atividade enzimática nos mutantes Oh43o2 e Oh43fl1 quando comparados ao genótipo selvagem (AZEVEDO et al., 2003). As enzimas do catabolismo de lisina, LKR e SDH, também apresentaram alterações significativas sendo observadas reduções na atividade das duas enzimas nos mutantes Oh43o2, Oh43fl1 e Oh43fl2 em relação ao genótipo Oh43+ (AZEVEDO et al., 2003). A caracterização bioquímica dos mutantes *o5* e *o7*, demonstrou redução no conteúdo de zeínas (AZEVEDO et al., 2004b). Altas concentrações de lisina solúvel foram observadas nos mutantes *o11* e *o13* quando comparados ao tipo selvagem W22+, enquanto que o mutante *o10* exibiu redução na concentração deste aminoácido (AZEVEDO et al., 2004b). O uso de mutantes naturais tem se apresentado como uma importante metodologia para o estudo de diferentes vias metabólicas e, embora, exista um número considerável de mutantes disponíveis para distintas espécies, poucos estudos foram realizados utilizando-se estes materiais. Contudo, os estudos realizados com as mutações *o1*, *o2*, *fl1*, *fl2*, *o5*, *o7*, *o10*, *o11* e *o13* mostraram importantes efeitos sobre o

metabolismo de lisina, sobre a composição de aminoácidos e sobre a distribuição das proteínas de reserva nas sementes de milho (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; POMPEU et al., 2006).

1.1.14 Variedades *Quality Protein Maize* (QPM)

A descoberta de mutantes apresentando alta concentração de lisina despertou o interesse em melhorar a qualidade nutricional de variedades comerciais de milho, utilizando-se principalmente os mutantes *o2* e *fl2*. As características agronômicas negativas correlacionadas aos fenótipos destes mutantes, levaram a estudos que foram responsáveis pela identificação de “genes modificadores do endosperma *o2*”, que possibilitaram a obtenção de diversas variedades QPM (PRASANNA et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais os genes modificadores convertem o fenótipo *o2* para o fenótipo normal é pouco compreendido. Os genótipos QPM apresentam níveis de α -zeína de 22-kDa semelhantes aos encontrados para o genótipo *o2*, contudo as variedades QPM apresentam aumentos de 2 a 3 vezes nos níveis de γ -zeína de 27-kDa (PRASANNA et al., 2001; GIBBON; LARKINS, 2005). Diante desta constatação alguns autores sugerem que o aumento no conteúdo de γ -zeína de 27-kDa possa estar envolvido na restauração do fenótipo vítreo observado nestas variedades. O aumento na concentração de γ -zeína de 27-kDa parece facilitar a formação de corpos protéicos e a interação das γ -zeína de 27-kDa formando ligações cruzadas por pontes de dissulfeto que juntamente com outras proteínas ricas em cisteína poderiam contribuir para formação de uma rede protéica ao redor dos grãos de amido, sendo este um dos fatores responsáveis pela formação do fenótipo vítreo (GIBBON; LARKINS, 2005). Embora, o aumento observado de γ -zeína de 27-kDa possa contribuir para formação de um fenótipo vítreo, possivelmente outros fatores estão envolvidos nas modificações observadas no endosperma de genótipos QPM (PRASANNA et al., 2001; GIBBON; LARKINS, 2005).

A superioridade nutricional e biológica do milho QPM tem sido demonstrada em sistemas utilizando-se ratos, porcos, crianças e adultos. Alguns estudos demonstraram que as variedades QPM apresentam qualidade protéica de aproximadamente 90% quando comparadas com as proteínas do leite, aumento de 55% na concentração de triptofano, 30% de lisina e redução na

concentração de leucina. Além dessas características, as variedades QPM ainda apresentam aumentos na concentração de cálcio, carboidratos e caroteno (PRASANNA et al., 2001).

Devido à importância nutricional destas variedades, futuros estudos deverão ser direcionados para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle das modificações observadas nas sementes destes materiais que serão essenciais para o desenvolvimento de novas cultivares.

1.1.15 *Chenopodium quinoa* willd (quinoa)

As espécies domesticadas de *Chenopodium* estão divididas em duas sub-seções classificadas de acordo com a morfologia do pericarpo e perianto (BONIFACIO, 2003). A primeira, Cellulata, contém alotetraplóides ($2n=4x=36$) a exemplo de *C. quinoa* e *C. berlandieri*, enquanto que a segunda, Leiosperma, inclui formas domesticadas e semi-domesticadas como *C. pallidicaule* ($2n=18$) e *C. album* ($2n= 18, 36, 54$) (BONIFACIO, 2003). *Chenopodium quinoa* Willd pertence ao grupo de plantas conhecido como pseudocereal, gênero *Chenopodium*, família *Chenopodiaceae* (BONIFACIO, 2003).

A quinoa é uma espécie anual que apresenta caule ereto, folhas alternadas, podendo atingir até 1,5 m de altura, com um sistema radicular bem desenvolvido atingindo profundidades de até 1,5 m. As folhas apresentam polimorfismo sendo as folhas superiores lanceoladas e as inferiores romboidal. A inflorescência é em forma de panícula, que surge no topo da planta e nas axilas das folhas inferiores. O fruto é um aquênio formado por diferentes camadas: perigônio, pericarpo e endosperma, podendo ser cônicos ou cilíndricos (BONIFACIO, 2003).

A quinoa tem sido cultivada em diferentes regiões na América do Sul, especialmente na região dos Andes e em países como Colômbia, Chile, Bolívia, Equador, Peru, tendo sido recentemente introduzida na Europa, América do Norte, Ásia e África (JACOBSEN; MUJICA; ORTIZ, 2003).

O grão apresenta um excepcional balanço entre óleos, proteínas e carboidratos sendo o pericarpo, embrião e endosperma as principais áreas de armazenamento (PREGO; MALDONADO; OTEGUI, 1998). O amido é armazenado no pericarpo, enquanto que lipídeos e proteínas estão presentes principalmente no endosperma e embrião (PREGO; MALDONADO; OTEGUI, 1998). O conteúdo de amido pode variar de 51 a 61%, e consiste de grânulos

uniformes menores do que 3 μm de diâmetro (PREGO; MALDONADO; OTEGUI, 1998). As fibras do grão correspondem em média a 4,1%, sendo este nível maior do que os encontrados em arroz (0,4%), trigo (2,7%) e milho (1,7%) (REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003). O grão de quinoa ainda contém importantes concentrações de minerais como Ca, Fe, Zn, Cu e Mn (RUALES; NAIR, 1992).

Diversos estudos têm demonstrado que o conteúdo de óleo em quinoa varia entre 1,8 e 9,5%, apresentando em média 5 a 7%. O óleo de quinoa é rico em ácidos graxos essenciais como linoleato e linolenato, apresentando, ainda, uma alta concentração de antioxidantes como α -tocoferol e γ -tocoferol (REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003).

Embora haja poucos trabalhos sobre o conteúdo de vitaminas no grão, Ruales e Nair (1992) reportaram importantes concentrações de tiamina (0,4 mg/100g), ácido fólico (78,1 mg/100g), vitamina C (16,4 mg/100g). Repo-Carrasco et al. (2003), também reportaram importantes concentrações de vitaminas A, B e E.

O conteúdo de proteína no grão varia entre 7,47 e 22,80%, apresentando em média 13,81%, sendo a qualidade protéica do grão superior a maioria dos cereais. Os grãos também apresentam um excelente balanço de aminoácidos como lisina, histina, metionina e triptofano (COMAI et al., 2007).

Contudo, a presença de saponinas tem sido descrita como o principal fator antinutricional presente nas sementes de quinoa. O conteúdo de saponinas pode variar de 0,2 a 11,3 g.kg^{-1} de matéria seca (MASTEBROEK et al., 2000). As saponinas são removidas utilizando-se métodos úmidos, lavagens em água fria, ou secos, através de métodos abrasivos, que em muitos casos acaba reduzindo o conteúdo de vitaminas e minerais presentes nas sementes (MASTEBROEK et al., 2000). Apesar de ser um fator antinutricional, as saponinas apresentam importância nas indústrias de sabão, detergentes, xampus, cerveja, cosméticos e indústria farmacêutica (MASTEBROEK et al., 2000).

Por todas essas características, recentemente tem se dado uma grande atenção ao cultivo da quinoa em diversas partes do mundo e diversos estudos têm abordado principalmente as qualidades nutricionais desta espécie.

Referências

AARNES, H.; ROGNES, S.E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 13, p. 2717-2724, 1974.

ALARCON, C.M.; HEITMAN, J. FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 17, p. 5968-5975, 1997.

ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 145, p. 25-40, 2004.

ARRUDA, P.; KEMPER, E.L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 324-330, 2000.

AZEVEDO, R.A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, New York, v. 22, p. 217-230, 2002.

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, p. 395-419, 1997.

AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from Maize. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3725-3730, 1992.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by *opaque* and *floury* mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LEA, P.J.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; VARISI, V.A.; GRATÃO, P.L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 339-348, 2004a.

AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 143-162, 2006.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, p. 261-279, 2001.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; VARISI, V.A.; GAZIOLA, S.A.; GRATÃO, P.L.; TORO, A.A. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the *opaque-5* and *opaque-7* maize mutations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 4865-4871, 2004b.

AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3735-3737, 1992a.

AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for copurification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3731-3734, 1992b.

BALCONI, C.; BERARDO, N.; REALI, A.; MOTTO, M. Variation in protein fractions and nitrogen metabolism of developing normal and *opaque* endosperm mutants of maize. **Maydica**, Bergamo, v. 43, p. 195-203, 1998.

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*. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 225-234, 1992.

BLICKLING, S.; BEISEL, H.G.; BOZIC, D.; KNABLEIN, J.; LABER, B.; HUBER, R. Structure of dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* reveals novel quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 274, p. 608-621, 1997.

BONIFACIO, A. *Chenopodium sp.*: Genetic resources, ethnobotany and geographic distribution. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, p. 1-7, 2003.

BOSTON, R.S.; FONTES, E.B.P.; SHANK, B.B.; WROBEL, R.L. Increased expression of the maize immunoglobulin binding-protein homolog B-70 in three zein regulatory mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 497-505, 1991.

BOSTON, R.S.; VIITANEN, P.V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 32, p. 191-222, 1996.

BRIGHT, S.W.J.; 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, p. 229-243, 1982.

BRYAN, J.K. Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In: MIFFLIN, B.J.; LEA, P.J. (Eds.). **The biochemistry of plants**. San Diego: Academic Press, 1990, chap. 5, p. 161-195.

CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; AZEVEDO, R.A. Site of nitrate reduction in Jack bean (*Canavalia ensiformis*) changes from leaf to root during development. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 34, p. 131-137, 2006.

CASTLE, M.L.; ROWARTH, J.S. *In vivo* nitrate reductase activity in ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*): Differences due to nitrogen supply, development, and plant part. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 46, p. 31-36, 2003.

CICERI, P.; CASTELLI, S.; LAURIA, M.; LAZZARI, B.; GENGA, A.; BERNARD, L.; STURARO, M.; VIOTTI, A. Specific combinations of zein genes and genetic backgrounds influence the transcription of the heavy-chain zein genes in maize *opaque-2* endosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 451-460, 2000.

CICERI, P.; GIANAZZA, E.; LAZZARI, B.; LIPPOLI, G.; GENGA, A.; HOSCHEK, G.; SCHMIDT, R.J.; VIOTTI, A. Phosphorylation of *opaque-2* changes diurnally and impacts its DNA binding activity. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 97-108, 1997.

CICERI, P.; LOCATELLI, F.; GENGA, A.; VIOTTI, A.; SCHMIDT, R.J. The activity of the maize *opaque-2* transcriptional activator is regulated diurnally. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 1321-1327, 1999.

COLEMAN, C.E.; LOPES, M.A.; GILLIKIN, J.W.; BOSTON, R.S.; LARKINS, B.A. A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury-2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 6828-6831, 1995.

COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C.V.L.; ALLEGRI, G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, p. 1350-1355, 2007.

DAMERVAL, C.; DEVIENNE, D. Quantification of dominance for proteins pleiotropically affected by *opaque-2* in maize. **Heredity**, London, v. 70, p. 38-51, 1993.

DAMERVAL, C.; GUILLOUX, M. Characterization of novel proteins affected by the *o2* mutation and expressed during maize endosperm development. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 257, p. 354-361, 1998.

DANTE, R.A.; NETO, G.C.; LEITE, A.; YUNES, J.A.; ARRUDA, P. The *DapA* gene encoding the lysine biosynthetic enzyme dihydrodipicolinate synthase from *Coix lacryma-jobi*: Cloning, characterization, and expression analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 551-561, 1999.

DEREPPE, C.; BOLD, G.; GHISALBA, O.; EBERT, E.; SCHAR, H.P. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 813-821, 1992.

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio-Technology**, New York, v. 13, p. 577-582, 1995.

FAN, X.R.; GORDON-WEEKS, R.; SHEN, Q.R.; MILLER, A.J. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 1333-1340, 2006.

FERREIRA, R.R.; MEINHARDT, L.W.; AZEVEDO, R.A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: Characterisation of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 77-86, 2006.

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, p. 985-994, 2005.

FORNAZIER, R.F.; AZEVEDO R.A.; FERREIRA, R.R.; VARISI, V.A. Lysine catabolism: Flow, metabolic role and regulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 15, p. 9-18, 2003.

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, p. 233-242, 1997.

FRISCH, D.A.; GENGENBACH, B.G.; TOMMEY, A.M.; SELLNER, J.M.; SOMERS, D.A.; MYERS, D.E. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 444-452, 1991.

GALILI, G. Regulation of lysine and threonine synthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 899-906, 1995.

GALILI, G. New insights into the regulation and functional significance of lysine metabolism in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 27-43, 2002.

GALILI, G.; TANG, G.L.; ZHU, X.H.; GAKIERE, B. Lysine catabolism: A stress and development super-regulated metabolic pathway. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 261-266, 2001.

GALLUSCI, P.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R.D. Differences in cell type specific expression of the gene *opaque-2* in maize and transgenic tobacco. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 244, p. 391-400, 1994.

GEBHARDT, J.S.; WEISEMAN, J.M.; MATTHEWS, B.F. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, p. 69-69, 1993.

GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana glauca* leads to lysine overproduction. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 733-743, 1995.

GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; VANDENBOSSCHE, D.; MATTHEWS, B.F.; JACOBS, M. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, p. 835-851, 1994.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, London, v. 21, p. 227-233, 2005.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 601-613, 1999.

HOLDING, D.R.; LARKINS, B.A. The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. **Maydica**, Bergamo, v. 51, p. 243-254, 2006.

HUANG, S.S.; KRUGER, D.E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R.L.; FLORIDA, C.A.; ADAMS, W.R.; BROWN, W.E.; LUETHY, M.H. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, p. 555-569, 2005.

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 General Subjects**, Amsteram, v. 172, p. 27-36, 2005.

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**, Rockville, v. 140, p. 292-301, 2006.

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. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2591-2612, 2002.

JACOBSEN, S.E.; MUJICA, A.; ORTIZ, R. The global potential for quinoa and other Andean crops. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, p. 139-148, 2003.

KEMPER, E.L.; NETO, G.C.; PAPES, F.; MORAES, K.C.M.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of *Opaque2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1981-1993, 1999.

KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 145-151, 1987.

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, p. 549-556, 2005.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 243-247, 2006.

LEA, P.J.; SODEK, L.; PARRY, M.A.J.; SHEWRY, R.; HALFORD, N.G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 150, p. 1-26, 2007.

LENDING, C.R.; LARKINS, B.A. Effect of the *floury-2 locus* on protein body formation during maize endosperm development. **Protoplasma**, Wien, v. 171, p. 123-133, 1992.

LI, C.P.; LARKINS, B.A. Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize *floury-2* mutant. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 30, p. 873-882, 1996.

LIMA, S.T. C.; AZEVEDO, R.A.; SANTORO, L.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J. Isolation of the bifunctional enzyme lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from *Phaseolus vulgaris*. **Amino Acids**, New York, v. 24, p. 179-186, 2003.

LOHMER, S.; MADDALONI, M.; MOTTO, M.; DIFONZO, N.; HARTINGS, H.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R.D. The maize regulatory *locus opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the B-32 gene. **Embo Journal**, New York, v. 10, p. 617-624, 1991.

LUGLI, J.; CAMPBELL, A.; GAZIOLA, S.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Enzymes of lysine metabolism from *Coix lacryma-jobi* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 25-32, 2002.

LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, Clare, v. 150, p. 51-58, 2000.

MADDALONI, M.; DONINI, G.; BALCONI, C.; RIZZI, E.; GALLUSCI, P.; FORLANI, F.; LOHMER, S.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F.; MOTTO, M. The transcriptional activator *opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 250, p. 647-654, 1996.

- MASTEBROEK, H.D.; LIMBURG, H.; GILLES, T.; MARVIN, H.J.P. Occurrence of sapogenins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 80, p. 152-156, 2000.
- MAURI, I.; MADDALONI, M.; LOHMER, S.; MOTTO, M.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R.; MARTEGANI, E. Functional expression of the transcriptional activator *opaque-2* of *Zea mays* in transformed yeast. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 241, p. 319-326, 1993.
- McLENNAN, N.; MASTERS, M. GroE is vital for cell-wall synthesis. **Nature**, London, v. 392, p. 139-139, 1998.
- MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 1-9, 2004a.
- MEDICI, L.O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 142, p. 535-541, 2004b.
- MEDICI, L.O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Identification of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 903-915, 2005.
- MERTZ, E.T.; NELSON, O.E.; BATES, L.S. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, p. 279-280, 1964.
- MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, p. 1-36, 2005.
- MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 58, 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**, New York, v. 89, p. 767-774, 1994.

NEUBERG, M.; SCHUERMANN, M.; HUNTER, J.B.; MULLER, R. Two functionally different regions in FOS are required for the sequence specific DNA interaction of the FOS JUN protein complex. **Nature**, London, v. 338, p. 589-590, 1989.

OREA, A.; PAJUELO, P.; PAJUELO, E.; MARQUEZ, A.J.; ROMERO, J.M. Characterisation and expression studies of a root cDNA encoding for ferredoxin-nitrite reductase from *Lotus japonicus*. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 113, p. 193-202, 2001.

PAJUELO, P.; PAJUELO, E.; OREA, A.; ROMERO, J.M.; MARQUEZ, A.J. Influence of plant age and growth conditions on nitrate assimilation in roots of *Lotus japonicus* plants. **Functional Plant Biology**, Gollingwood, v. 29, p. 485-494, 2002.

PLOTNIKOV, V.K.; BAKALDINA, N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, p. 507-515, 1996.

POMPEU, G.B.; VENDEMIATTI, A.; GRATAO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Saccharopine dehydrogenase activity in the high-lysine *opaque* and *floury* maize mutants. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, p. 55-64, 2006.

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science**, Bangalore, v. 81, p. 1308-1319, 2001.

PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 481-488, 1998.

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, p. 179-189, 2003.

ROGNES, S.E.; DEWAELE, E.; AAS, S.F.; JACOBS, M.; FRANKARD, V. Transcriptional and biochemical regulation of a novel *Arabidopsis thaliana* bifunctional aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene isolated by functional complementation of a yeast hom6 mutant. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 281-294, 2003.

RUALES, J.; NAIR, B.M. Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, p. 1-11, 1992.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M.C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, p. 357-367, 2000.

SCHEURWATER, I.; KOREN, M.; LAMBERS, H.; ATKIN, O.K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1635-1642, 2002.

SCHIERBAUM, F. World corn production, uses and ending stocks: Recorded figures for fiscal years 2004/05 and 2005/06. **Starch-Starke**, Weinheim, v. 59, p. 192-195, 2007.

SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; AUKERMAN, M.J.; BURR, B. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a leucine-zipper motif that binds to zein DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 46-50, 1990.

SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; BURR, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory *locus opaque-2*. **Science**, Washington, v. 238, p. 960-963, 1987.

SCHMIDT, R.J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M.J.; HOSCHEK, G. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 kDa zein genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 689-700, 1992.

SCHUERMANN, M.; NEUBERG, M.; HUNTER, J.B.; JENUWEIN, T.; RYSECK, R.P.; BRAVO, R.; MULLER, R. The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with JUN AP-1 and is required for transformation. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 507-516, 1989.

SEGAL, G.; SONG, R.T.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Baltimore, v. 165, p. 387-397, 2003.

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, p. 1962-1966, 1996.

SILK, G.W.; MATTHEWS, B.F.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Cloning and expression of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 989-993, 1994.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 583-589, 1997.

SODEK, L.; WILSON, C.M. Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in developing endosperm of normal and *opaque-2* corn. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 140, p. 29-38, 1970.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 225-253, 1990.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 121-125, 2006.

STEPANSKY, A.; LEUSTEK, T. Histidine biosynthesis in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 127-142, 2006.

TANG, G.L.; MIRON, D.; ZHUSHIMONI, J.X.; GALILI, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1305-1316, 1997a.

TANG, G.L.; ZHU, X.H.; 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**, Rockville, v. 130, p. 147-154, 2002.

TANG, G.L.; ZHUSHIMONI, J.X.; AMIR, R.; ZCHORI, I.B.T.; GALILI, G. Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, p. 287-293, 1997b.

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**, Jena, v. 153, p. 281-289, 1998.

TODD, C.D.; POLACCO, J.C. AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. **Plant**, New York, v. 223, p. 1108-1113, 2006.

VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 695-708, 1999.

VAUTERIN, M.; JACOBS, M. Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, p. 545-550, 1994.

VELISEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of food constituents: Amino acids: 2. The alanine-valine-leucine, serine-cysteine-glycine, and aromatic and heterocyclic amino acids groups - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 24, p. 45-58, 2006.

VIOLA, R.E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 34, p. 339-349, 2001.

WANG, R.C.; GUEGLER, K.; LABRIE, S.T.; CRAWFORD, N.M. Genomic analysis of a nutrient response in arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1491-1509, 2000.

WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.F. Identification and expression of a cDNA from *Daucus carota* encoding a bifunctional aspartokinase-homoserine dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, p. 301-312, 1993.

WILSON, B.J.; GRAY, A.C.; MATTHEWS, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 1323-1328, 1991.

YOSHIOKA, Y.; KUREI, S.; MACHIDA, Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression. **Genes and Genetic Systems**, Shizuoka, v. 76, p. 189-198, 2001.

ZHU, X.H.; 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 in arabidopsis seeds. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 845-853, 2003.

ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 129-136, 2004.

ZHU, X.H.; TANG, G.L.; GALILI, G. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite at *Atlkr/sdh* locus of arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1363-1371, 2000.

ZHU, X.H.; TANG, G.L.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; GALILI, G. A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 1539-1545, 2001.

2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AK E HSDH EM MUTANTES DE MILHO *OPACO* E *FLOURY*

Resumo

As enzimas aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4) e a homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) foram parcialmente purificadas de sementes dos mutantes W22*o10*, W22*o11*, W22*o13*, B37*o7* e B77xB79*o5* e dos seus respectivos tipos selvagens, W22+, B37+ e B77xB79+. As atividades destas enzimas foram estudadas na presença de L-lisina, L-treonina e L-lisina mais L-treonina. Os aminoácidos lisina e treonina foram capazes de inibir a atividade da enzima AK em todos os genótipos estudados, com exceção do mutante W22*o11* no qual treonina não foi eficiente inibindo a atividade enzimática, sugerindo a existência de pelo menos duas isoenzimas da AK, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina. Foi observada uma importante variação sobre a atividade da AK entre os genótipos. A atividade da HSDH foi parcialmente inibida por treonina, com exceção do mutante W22*o11*, sugerindo a presença de uma isoenzima sensível e a outra resistente à inibição por treonina. Também foi observada uma importante variação sobre a atividade da HSDH entre os genótipos estudados.

Palavras-chave: Aspartato quinase; Homoserine dehydrogenase; Lisina; Mutantes

2 DETERMINATION OF AK AND HSDH ENZYMES IN MAIZE *OPAQUE* AND *FLOURY* MUTANTS

Abstract

Aspartate kinase (AK, EC 2.7.2.4) and homoserine dehydrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) were partially purified from seeds of the maize mutants W22*o10*, W22*o11*, W22*o13*, B37*o7* and B77xB79*o5* and their respective wild type counterparts, W22+, B37+ e B77xB79+. The activities of these enzymes were studied in the presence of L-lysine, L-threonine and L-lysine plus L-threonine. Lysine and threonine were able to inhibit AK activity in all genotypes studied, except threonine for W22*o11*, indicating the existence of at least two AK isoenzymes, one inhibited by lysine and the other by threonine. Important variations on AK activity pattern among the genotypes were clearly observed. The activity of HSDH was partially inhibited by threonine, except for W22*o11*, indicating the presence of threonine-resistant and threonine-sensitive HSDH isoenzymes. Variations on HSDH activity pattern also were observed in the genotypes studied.

Keywords: Aspartate Kinase; Homoserine dehydrogenase; Lysine; Mutants

2.1 Introdução

O milho é uma espécie pertencente ao grupo dos cereais e está entre as culturas mais importantes no mundo (AZEVEDO et al., 2003). Os cereais são uma das principais fontes de proteínas para os seres humanos e animais monogástricos, contudo, este grupo vegetal se caracteriza pelas baixas concentrações de lisina presentes na forma solúvel ou incorporada em proteínas de reserva (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO, 2002; FERREIRA et al., 2005).

Os aminoácidos são os principais compostos nitrogenados em plantas e são importantes na constituição das proteínas (AZEVEDO; LEA, 2001). Entre os vinte aminoácidos constituintes das proteínas, nove são denominados essenciais porque não são sintetizados pelos seres humanos e animais monogástricos, sendo obtidos através das dietas alimentares (FORNAZIER et al., 2005).

Os aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina são sintetizados na via metabólica do ácido aspártico (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006). A AK é a primeira enzima da via que é responsável pela conversão do ácido aspártico em β -aspartil fosfato e pode existir em pelo menos duas isoenzimas distintas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), uma sensível à inibição por lisina e presente em um polipeptídeo monofuncional e a outra sensível à inibição por treonina e presente em um polipeptídeo bifuncional (AZEVEDO et al., 1992). As isoenzimas da AK têm sido descritas em diversas espécies (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006) e os resultados têm demonstrado que esta enzima é um dos principais pontos envolvidos na regulação da via metabólica controlando a síntese de lisina e treonina (FERREIRA et al., 2005). A HSDH catalisa a conversão do aspartato semialdeído em homoserina na presença de NADH ou NADPH e está presente em duas isoenzimas, uma resistente e a outra sensível à inibição pelo aminoácido treonina (AZEVEDO; LEA, 2001; ROGNES et al., 2003). A primeira enzima exclusiva da síntese de lisina, a dihidrodipicolinato sintase (DHDPS; EC 4.2.1.52), catalisa a condensação do piruvato e aspartato semialdeído para a formação de ácido dihidrodipicolínico (CRACIUN; JACOBS; VAUTERIN, 2000; SARROBERT et al., 2000) apresentando uma única isoenzima altamente sensível à inibição por baixas concentrações de lisina (VAUTERIN; FRANKARD; JACOBS, 1999). Na via de degradação duas enzimas são importantes, a enzima lisina cetoglutarato redutase (LKR; EC 1.5.1.8), que converte o aminoácido lisina em sacaropina e a sacaropina desidrogenase (SDH; EC 1.5.1.9) que catalisa a

hidrólise da sacaropina em glutamato e ácido aminoadípico semialdeído (GAZIOLA et al., 1997; GALILI, 2002; LIMA et al., 2003; STEPANSKY et al., 2006).

Para compreensão e estudo da via metabólica do ácido aspártico, mutantes bioquímicos e plantas transgênicas foram produzidas exibindo importantes alterações nas concentrações de lisina e de outros aminoácidos (FRANKARD et al., 1991; FALCO et al., 1995; GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1995; HEREMANS; JACOBS, 1997; ZHU; GALILI, 2003; ZHU; GALILI, 2004) evidenciando a importância das enzimas AK, DHDPS e LKR-SDH para o acúmulo de lisina em sementes (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Outra estratégia importante para o estudo da via metabólica do ácido aspártico tem sido a utilização de mutantes naturais (AZEVEDO, 2002). Os mutantes de milho que apresentam alterações no endosperma, geralmente, estão agrupados em três classes: os mutantes recessivos da série *opaco* (*o1*, *o2*, *o5*, *o7*, *o9-o11* e *o13-o17*), os mutantes semi-dominantes *floury* (*fl1*, *fl2* e *fl3*) e os mutantes dominantes *Mucronate* (*Mc*) (HUNTER et al., 2002; SEGAL; SONG; MESSING, 2003; HUANG et al., 2005). O mutante *o2* tem sido extensivamente estudado e o produto do gene *o2* foi descrito como sendo um fator de transcrição que é especificamente expresso em endosperma (SCHMIDT et al., 1990; GALLUSCI; SALAMINI; THOMPSON, 1994) e regula direta ou indiretamente algumas classes de proteínas de reserva e outros genes pertencentes a diversas vias metabólicas (SODEK; WILSON, 1971; SCHMIDT et al., 1992; DAMERVAL; LE GUILLOUX, 1998). O mutante *o2* é caracterizado pela alta concentração de lisina em sementes que ocorre devido ao aumento na concentração deste aminoácido na forma solúvel ou a alteração da distribuição das proteínas de reserva (GAZIOLA et al., 1999). O mutante *o2*, apresenta um acúmulo das frações protéicas albuminas, globulinas e glutelinas, que contém altas concentrações de lisina, como consequência da redução na fração prolamina (LANDRY et al., 2005). Embora o mutante *o2* apresente uma composição balanceada de aminoácidos, esta característica está associada com características agronômicas indesejáveis como baixa produtividade e maior susceptibilidade à pragas e doenças (MERTZ; NELSON; BATES, 1964). Contudo, a identificação de genes modificadores, permitiu o uso deste mutante em programas de melhoramento que levou a obtenção de variedades *Quality Protein Maize* (QPM), as quais mantiveram a alta concentração de lisina e restauraram as características agronômicas favoráveis (PRASANNA et al., 2001).

Embora muitas informações estejam disponíveis sobre a mutação *o2* e seus efeitos, somente recentemente outros mutantes caracterizados como contendo alta concentração de lisina em sementes começaram a ser estudados (HUNTER et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003). No presente trabalho, foi realizado o isolamento e a caracterização das enzimas AK e HSDH nos mutantes *o5*, *o7*, *o10*, *o11* e *o13*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material

As sementes dos mutantes W22*o10*, W22*o11*, W22*o13* e do respectivo tipo selvagem W22+ e dos mutantes B77xB79*o5* e B37*o7* e seus respectivos tipos selvagens, B77xB79+ e B37+ foram fornecidas pelo The Maize Genetics Cooperation Seed Stock Center (Urbana, IL, USA). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na ESALQ-USP, no Departamento de Genética, Brasil, mantidas à temperatura de 25-32°C com fotoperíodo de 16 h. As plantas de todos os genótipos foram auto-polinizadas e as sementes foram colhidas aos 20 dias após a polinização (DAP), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer à temperatura de -80°C.

2.2.2 Extração e purificação parcial das Enzimas AK e HSDH

Para o estudo das enzimas AK e HSDH o experimento foi elaborado segundo o delineamento inteiramente casualizado com três plantas por parcela e os resultados expressam a média e o desvio padrão de três repetições.

Para a extração das enzimas AK e HSDH todos os procedimentos foram conduzidos à 4°C. As sementes imaturas foram utilizadas para extração enzimática em 5 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 200 mM de cloreto de potássio (KCl); 0,1 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF); 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM de ditioneitol (DTT); 2 mM de L-lisina; 2 mM de L-treonina; 10% (v/v) glicerol e 5% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 30 min para remover restos celulares. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para

saturação a 30% e, a seguir, o extrato foi colocado sob agitação por 30 min. Após agitação a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 30 min e o sobrenadante foi submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 12.000 g e o pelete foi dissolvido em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de DTT; 0,1 mM de L-lisina; 0,1 mM de L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. As amostras foram dessalinizadas em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletadas para análise das atividades da AK e HSDH.

2.2.3 Análises das enzimas AK e HSDH

O ensaio da atividade da AK foi realizado em um volume final de 500 μ L como descrito por Azevedo et al. (2003), contendo 100 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de DTT e 20% (v/v) de glicerol; 100 μ L de ácido aspártico 500 mM; 50 μ L de sulfato de magnésio 125 mM; 50 μ L de adenosina trifosfato (ATP) 200 mM; 50 μ L de hidroxilamina 4 M; 100 μ L de água e 50 μ L de amostra. O ensaio foi iniciado pela adição de 50 μ L de ATP e incubado à 35°C por 30 min. Após incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de 500 μ L de solução de cloreto férrico [670 mM FeCl_3 e 20% (p/v) ácido tricloroacético]. Após centrifugação a 12.000 g por 10 min, a absorbância foi determinada a 505 nm. Controles contendo L-lisina, L-treonina e L-lisina + L-treonina foram incluídos em diferentes ensaios para determinar a atividade da AK e para identificar as isoenzimas sensíveis à inibição por lisina e treonina. A atividade da AK foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Foram utilizadas triplicatas para cada ensaio enzimático.

A atividade da enzima HSDH foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm em um volume final de 1 mL como descrito previamente por Azevedo et al. (2003), contendo 700 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) contendo 150 mM de KCl, 1 mM DTT e 0,5 mM de EDTA; 100 μ L de DL-homoserina 200 mM; 100 μ L de NADPH 4,8 mM e 100 μ L de extrato. O efeito de treonina sobre a atividade da HSDH foi determinado pela adição do aminoácido no ensaio. A atividade foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Foram utilizadas triplicatas para cada ensaio enzimático.

2.2.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

2.3 Resultados

2.3.1 Determinação da atividade da AK

A atividade da enzima AK foi determinada em sementes durante o desenvolvimento aos 20 DAP nos mutantes *W22o10*, *W22o11*, *W22o13*, *B37o7* e *B77xB79o5* e nos seus respectivos tipos selvagens *W22+*, *B37+* e *B77xB79+*. Considerando-se as mutações introduzidas no genótipo *W22+*, os resultados demonstraram que o mutante *W22o10* ($15,527 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) exibiu uma maior atividade da AK quando comparado com o tipo selvagem ($11,527 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), enquanto que os mutantes *W22o11* ($5,330 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e *W22o13* ($5,259 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) exibiram menores atividades em relação ao tipo selvagem *W22+* ($11,527 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) (Tabela 2.1). Quando o efeito do aminoácido lisina foi testado sobre a atividade da AK, foram observados padrões de inibição variando entre 36,5% para o mutante *W22o11* e 49,9% para o mutante *W22o10* (Tabela 2.1). A adição de treonina ao ensaio causou uma inibição de 49,2% no tipo selvagem *W22+*, enquanto que a menor inibição foi observada no mutante *W22o13* (2,83%). Contudo, quando os dois aminoácidos foram adicionados juntos ao ensaio um maior efeito inibitório foi observado, sendo que a maior inibição foi observada no tipo selvagem (89,7%) e a menor no mutante *W22o11* (24,7%) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Determinação da atividade específica da AK ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína $\pm$ desvio padrão) em sementes de milho aos 20 DAP e % de inibição causado pela adição de lisina (K), treonina (T) e lisina + treonina (K+T)

	Genótipos			
	W22+	W22o10	W22o11	W22o13
Controle	11,527 $\pm$ 0,39	15,527 $\pm$ 0,36	5,330 $\pm$ 0,19	5,259 $\pm$ 0,089
% inibição 5 mM K	36,9 $\pm$ 1,2	49,9 $\pm$ 1,7	36,5 $\pm$ 1,0	49,0 $\pm$ 2,1
% inibição 5 mM T	49,2 $\pm$ 1,8	44,1 $\pm$ 1,5	+30,8 $\pm$ 3,0*	2,83 $\pm$ 0,1
% inibição 5 mM K+T	89,7 $\pm$ 3,6	68,1 $\pm$ 3,0	24,7 $\pm$ 2,1	62,0 $\pm$ 2,6

* indica ativação

A atividade da AK também variou consideravelmente para os mutantes B37o7 (9,033 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e B77xB79o5 (1,901 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), sendo que a introdução destas mutações causaram reduções na atividade da enzima AK quando comparadas com seus respectivos tipos selvagens (Tabela 2.2). A inibição causada pela adição do aminoácido lisina também variou, sendo que os mutantes B37o7 e B77xB79o5 apresentaram um menor nível de inibição quando comparados aos tipos selvagens (Tabela 2.2). A adição de treonina também causou um efeito inibitório sobre a atividade da AK, sendo observada uma maior inibição no mutante B77xB79o5 (53,6%), enquanto que a adição dos dois aminoácidos ao ensaio causou um efeito inibitório maior do que o observado com a adição dos aminoácidos separadamente (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Determinação da atividade específica da AK ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína $\pm$ desvio padrão) em sementes de milho aos 20 DAP e % de inibição causado pela adição de lisina (K), treonina (T) e lisina + treonina (K+T)

	Genótipos			
	B37+	B37o7	B77xB79+	B77xB79o5
Controle	25,030 $\pm$ 0,79	9,033 $\pm$ 0,41	7,708 $\pm$ 0,21	1,901 $\pm$ 0,09
% inibição 5 mM K	50,6 $\pm$ 1,9	35,0 $\pm$ 1,6	59,6 $\pm$ 2,3	16,4 $\pm$ 0,8
% inibição 5 mM T	23,0 $\pm$ 0,9	26,0 $\pm$ 0,9	4,9 $\pm$ 0,2	53,6 $\pm$ 3,1
% inibição 5 mM K+T	78,9 $\pm$ 3,8	53,6 $\pm$ 2,0	74,7 $\pm$ 3,4	70,0 $\pm$ 4,0

2.3.2 Determinação da atividade da HSDH

A atividade da enzima HSDH também variou consideravelmente entre os genótipos analisados, variando de 4,7 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína no mutante *W22o13* a 21,6 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína no mutante *W22o10* (Tabela 2.3). Quando treonina foi adicionada ao ensaio a maior inibição da atividade da HSDH foi observada no mutante *W22o10* (13,9%) e a menor inibição no mutante *W22o13* (7,7%) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Determinação da atividade específica da HSDH (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína $\pm$ desvio padrão) em sementes de milho aos 20 DAP e % de inibição causado pela adição de treonina (T)

	Genótipos			
	W22+	W22o10	W22o11	W22o13
Controle	10,2 $\pm$ 0,29	21,6 $\pm$ 0,99	7,8 $\pm$ 0,38	4,7 $\pm$ 0,21
% inibição 5 mM T	8,8 $\pm$ 0,3	13,9 $\pm$ 0,5	+7,7 $\pm$ 0,4*	7,7 $\pm$ 0,6

* indica ativação

Para os outros dois grupos analisados, os resultados demonstraram que a atividade da HSDH exibiu uma importante variação no mutante *B37o7* (27,3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína) quando comparado ao seu respectivo tipo selvagem (Tabela 2.4). A adição de treonina ao ensaio provocou maiores inibições na atividade enzimática dos tipos selvagens (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Determinação da atividade específica da HSDH (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína $\pm$ desvio padrão) em sementes de milho aos 20 DAP e % de inibição causado pela adição de treonina (T)

	Genótipos			
	B37+	B37o7	B77xB79+	B77xB79o5
Controle	20,3 $\pm$ 0,61	27,3 $\pm$ 1,00	21,5 $\pm$ 0,97	19,8 $\pm$ 0,43
% inibição 5 mM T	13,8 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,3	12,1 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 0,3

2.4 Discussão

A caracterização da mutação *o2* e de seus efeitos trouxe importantes contribuições para a compreensão dos mecanismos envolvidos na síntese de proteínas e aminoácidos em vegetais (MERTZ; NELSON; BATES, 1964). Contudo, recentemente o estudo da expressão gênica e de proteínas de reserva em outros mutantes (HUNTER et al., 2002) e o estudo de proteínas de reserva, aminoácidos e de enzimas envolvidas na via metabólica do ácido aspártico (AZEVEDO et al., 2003) indicaram que ainda existem importantes aspectos a serem compreendidos a respeito dos mecanismos genéticos e bioquímicos relacionados a esses mutantes.

Em estudos anteriores a atividade da AK e da HSDH foi determinada durante o desenvolvimento da semente (GAZIOLA et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003) demonstrando um pico entre os 16 e 20 DAP, decrescendo para níveis próximo a zero aos 28 DAP (GAZIOLA et al., 1999). De acordo com aqueles resultados, no presente trabalho, as enzimas AK e HSDH foram analisadas aos 20 DAP.

AZEVEDO et al. (2003) demonstraram previamente os efeitos das mutações *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* sobre as enzimas AK, HSDH, LKR-SDH, indicando a importância de se compreender o efeito destas e outras mutações sobre a via metabólica do ácido aspártico e sobre a síntese de lisina. No presente trabalho, o mutante W22*o10* exibiu um aumento na atividade da AK, enquanto que os outros mutantes, W22*o11* e W22*o13*, exibiram reduções quando comparados ao tipo selvagem. A atividade total da AK tem sido descrita apresentando pelo menos duas isoenzimas, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Na maioria dos vegetais a isoenzima sensível à inibição por lisina é normalmente predominante (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006), com raras exceções a exemplo de coix (LUGLI et al., 2002). O padrão de inibição, observado com a adição dos aminoácidos lisina e treonina, variou consideravelmente entre os genótipos de acordo com o gene mutante introduzido. Diferentemente do observado para outras linhagens de milho, a atividade da AK no genótipo W22+ foi fortemente inibida por treonina, indicando uma possível predominância desta isoenzima neste genótipo. Além disso, a baixa inibição da atividade enzimática, observada pela adição do aminoácido treonina no mutante W22*o13*, dificultou a obtenção de evidência sobre a presença da isoenzima da AK sensível à inibição por este aminoácido neste genótipo. Interessantemente, a adição de treonina causou uma indução na atividade da AK no W22*o11*. Estes resultados foram

confirmados quando os aminoácidos lisina e treonina foram adicionados juntos ao ensaio, sendo observada uma redução do efeito inibitório sobre a atividade total da AK nestes dois mutantes quando comparados ao genótipo selvagem, principalmente para o mutante W22*o11*, sugerindo que a mutação *o11* causa uma forte interferência sobre a isoenzima da AK sensível à inibição por treonina. Quando a atividade da AK foi analisada nos mutantes B37*o7* e B77xB79*o5*, foi observada uma redução da atividade enzimática em relação aos respectivos tipos selvagens. Quando a atividade da AK foi determinada na presença dos aminoácidos lisina e treonina, também foram verificadas importantes variações no padrão de inibição da AK destes dois mutantes quando comparados com seus respectivos tipos selvagens.

As variações observadas sobre a atividade total e nas isoenzimas da AK, entre os mutantes estudados quando comparados com os seus respectivos tipos selvagens, são importantes porque esta é a primeira enzima da via do ácido aspártico representando uma importante etapa no controle da síntese de lisina, treonina, isoleucina e metionina (AZEVEDO, 2002).

Para a enzima HSDH, considerando-se as mutações *o10*, *o11* e *o13*, foram observadas importantes variações na atividade enzimática entre os mutantes estudados em relação ao tipo selvagem W22+. Particularmente, o aumento observado na atividade desta enzima no mutante W22*o10* em relação ao tipo selvagem, pode ser importante favorecendo o fluxo da via para a síntese de treonina. O padrão de inibição observado com a adição do aminoácido treonina sugere a presença de duas isoenzimas da HSDH, uma sensível e a outra resistente à inibição por este aminoácido como têm sido descrito em outras espécies estudadas (GALILI, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), sendo a isoenzima resistente predominante. Além disso, a indução observada sobre a atividade da HSDH no mutante W22*o11*, com a adição de treonina ao ensaio, reforça a observação de uma forte interferência da mutação *o11* sobre o gene da isoenzima bifuncional da AK-HSDH. No caso da mutação *o7* também foi observada uma importante variação sobre a atividade da HSDH, enquanto que para a mutação *o5* não foi observada variação tão pronunciada, não sendo possível se obter maiores evidências do efeito desta mutação sobre a atividade total da HSDH neste mutante.

Embora não haja evidências de que a HSDH possa regular a síntese de lisina, estas variações observadas na atividade enzimática entre os mutantes quando comparados com os seus respectivos tipos selvagens são importantes, porque esta enzima compartilha o mesmo substrato, aspartato semialdeído, com a enzima DHDPS, sendo que um aumento na atividade total da

HSDH pode ser favorável à síntese de treonina, enquanto que a redução pode ser favorável ao aumento da atividade da DHDPS favorecendo a síntese de lisina.

De modo geral, os trabalhos envolvendo as mutações *o1*, *o2*, *fl1*, *fl2* (AZEVEDO et al., 2003), *o5*, *o7*, *o10*, *o11* e *o13* têm gerado novas informações que têm ajudado na compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos na via metabólica do ácido aspártico e na síntese de proteínas de reserva. Neste trabalho foram observadas importantes variações na atividade da AK e da HSDH de acordo com a mutação introduzida, especialmente para o mutante *o11*, para o qual foi observado indução destas enzimas na presença do aminoácido treonina.

Referências

AZEVEDO, R.A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, New York, v. 22, p. 217-230, 2002.

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, p. 395-419, 1997.

AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 3725-3730, 1992.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by *opaque* and *floury* mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 143-162, 2006.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, p. 261-279, 2001.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

CRACIUN, A.; JACOBS, M.; VAUTERIN, M. Arabidopsis loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 487, p. 234-238, 2000.

DAMERVAL, C.; GUILLOUX, M. Characterization of novel proteins affected by the *o2* mutation and expressed during maize endosperm development. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 257, p. 354-361, 1998.

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio-Technology**, New York, v. 13, p. 577-582, 1995.

FERREIRA, R.R.; MEINHARDT, L.W.; AZEVEDO R.A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: Characterisation of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 77-86, 2006.

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, p. 985-994, 2005.

FORNAZIER, R.F.; GAZIOLA, S.A.; HELM, C.V.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Isolation and characterization of enzymes involved in lysine catabolism from sorghum seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1791-1798, 2005.

FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; NEGRUTIU, I.; JACOBS, M. High threonine producer mutant of *Nicotiana sylvestris* (Spegg and Comes). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 82, p. 273-282, 1991.

GALILI, G. New insights into the regulation and functional significance of lysine metabolism in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v. 53, p. 27-43, 2002.

GALLUSCI, P.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R.D. Differences in cell-type-specific expression of the gene *opaque-2* in maize and transgenic tobacco. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 244, p. 391-400, 1994.

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 lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, 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**, Oxford, v. 247, p. 364-371, 1997.

GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 733-743, 1995.

HEREMANS, B.; JACOBS, M. A mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh with modified control of aspartate kinase by threonine. **Biochemical Genetics**, New York, v. 35, p. 139-153, 1997.

HUANG, S.S.; KRUGER, D.E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R.L.; FLORIDA, C.A.; ADAMS, W. R.; BROWN, W.E.; LUETHY, M.H. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, p. 555-569, 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. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2591-2612, 2002.

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, p. 549-556, 2005.

LIMA, S.T.C.; AZEVEDO, R.A.; SANTORO, L.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J. Isolation of the bifunctional enzyme lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from *Phaseolus vulgaris*. **Amino Acids**, New York, v. 24, p. 179-186, 2003.

LUGLI, J.; CAMPBELL, A.; GAZIOLA, S.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Enzymes of lysine metabolism from *Coix lacryma-jobi* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 25-32, 2002.

MERTZ, E.T.; NELSON, O.E.; BATES, L.S. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, p. 279-280, 1964.

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science**, Bagalore, v. 81, p. 1308-1319, 2001.

ROGNES, S.E.; DEWAELE, E.; AAS, S.F.; JACOBS, M.; FRANKARD, V. Transcriptional and biochemical regulation of a novel *Arabidopsis thaliana* bifunctional aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene isolated by functional complementation of a yeast *hom6* mutant. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 281-294, 2003.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M.C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, p. 357-367, 2000.

SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; AUKERMAN, M.J.; BURR, B. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a leucine-zipper motif that binds to zein DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 46-50, 1990.

SCHMIDT, R.J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M.J.; HOSCHEK, G. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 kDa zein genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 689-700, 1992.

SEGAL, G.; SONG, R.T.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Baltimore, v. 165, p. 387-397, 2003.

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, p. 1144-1150, 1971.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.H; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 121-125, 2006.

VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 695-708, 1999.

ZHU, X. H.; 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 in *arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 845-853, 2003.

ZHU, X. H.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 129-136, 2004.

3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA DIHIDRODIPICOLINATO SINTASE EM MUTANTES DE MILHO *OPACO* E *FLOURY*

Resumo

A enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52) foi isolada de quatro mutantes de milho (*Oh43o1*, *Oh43o2*, *Oh43fl1* e *Oh43fl2*) e do genótipo selvagem *Oh43+* aos 16, 20 e 24 DAP, analisada e caracterizada na presença de alguns aminoácidos, S-aminoetil L-cisteína (AEC), S-adenosilmetionina (SAM) e cálcio. Os resultados indicaram que a DHDPS foi fortemente inibida por lisina e nenhuma variação significativa foi observada entre os genótipos. A alta concentração de lisina observada nas sementes dos mutantes na maturidade pode ser explicada pelo acúmulo de lisina solúvel causado pela redução na degradação deste aminoácido e, principalmente, pela redução das zeínas.

Palavras-chave: Dihidrodipicolinato sintase; Ácido aspártico; Mutantes; *Opaco*; *Floury*

3 CHARACTERIZATION OF DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE ENZYME IN MAIZE *OPAQUE* AND *FLOURY* MUTANTS

Abstract

Dihydrodipicolinate synthase enzyme (DHDPS, EC 4.2.1.52) was isolated from four high-lysine maize mutants (*Oh43o1*, *Oh43o2*, *Oh43fl1* and *Oh43fl2*) and from the wild type *Oh43+* at 16, 20 and 24 DAP. The activity of DHDPS was analyzed and characterized in the presence of some amino acids, S-aminoethyl L-cysteine (AEC), S-adenosylmethionine (SAM) and calcium. The results indicated that DHDPS was strongly inhibited by lysine, and that there was no significant variation among the genotypes. The high concentration of lysine observed in the seeds of the mutants at maturity may be explained by the accumulation of soluble lysine caused by a reduction in lysine degradation and by the reduction of zeins.

Keywords: Dihydrodipicolinate synthase; Aspartic acid; Lysine; Mutants; *Opaque*; *Floury*

3.1 Introdução

O cultivo do milho está entre as cinco culturas mais importantes no mundo e esta espécie tem sido utilizada como uma importante fonte de nutrientes e proteínas para os seres humanos e animais (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b). Entretanto, as proteínas presentes nas sementes de milho são caracterizadas pela baixa qualidade nutricional devido, principalmente, a predominância das prolaminas, fração de proteína de reserva deficiente em lisina e triptofano (LANDRY et al., 2005).

Os aminoácidos são sintetizados nos vegetais em complexas vias metabólicas controladas por enzimas, substratos, intermediários e pelos próprios aminoácidos (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Além dos vinte aminoácidos que são comumente produzidos e incorporados em proteínas, mais de trezentos tipos de aminoácidos adicionais têm sido identificados em vegetais (FERREIRA et al., 2005). Os aminoácidos também desempenham importantes funções como transportadores de nitrogênio para diferentes partes nos vegetais (LEA; AZEVEDO, 2006; TODD; POLACCO, 2006), como reguladores em diversos processos envolvidos em resposta às diferentes condições ambientais e sendo, ainda, importantes para a qualidade nutricional das proteínas presentes nas sementes (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Entre os vinte aminoácidos incorporados nas proteínas, nove são denominados essenciais porque não são sintetizados por humanos e animais monogástricos, sendo, portanto adquiridos nas dietas alimentares (FERREIRA et al., 2005).

O ácido aspártico é o precursor comum dos aminoácidos lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002; CURIEN et al., 2007). Devido a importância destes aminoácidos, a via metabólica do ácido aspártico têm sido estudada em diversas espécies vegetais para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação desta via com o objetivo de se obter informações importantes para a manipulação de enzimas chave e frações protéicas visando a produção e o acúmulo em níveis balanceados dos aminoácidos lisina e treonina em sementes (AZEVEDO et al., 1997). As enzimas chave da via do ácido aspártico têm sido estudadas utilizando-se abordagens moleculares e bioquímicas em diversos tecidos e espécies vegetais (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Os resultados obtidos indicaram que a aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), a homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e a DHDPs (EC 4.2.1.52) são enzimas chave na regulação da síntese de lisina e treonina

(AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), enquanto que as enzimas lisina cetoglutarato reductase (LKR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são importantes no processo de degradação (ARRUDA et al., 2000; GAZIOLA et al., 1997; FORNAZIER et al., 2005; STEPANSKY et al., 2006).

A AK é a primeira enzima comum que conduz à síntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina e catalisa a fosforilação do aspartato para a produção de β -aspartil fosfato (AZEVEDO et al., 1997). Duas isoenzimas da AK têm sido isoladas e caracterizadas em vegetais, uma sensível à inibição pelo aminoácido lisina e a outra sensível à inibição pelo aminoácido treonina (ROGNES et al., 2003; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O aspartato semialdeído serve como substrato comum para as enzimas HSDH e DHDPS. A partir deste ponto, a via metabólica se divide em dois diferentes ramos, um que conduz à síntese de lisina e o outro que se subdivide em dois diferentes ramos, um que conduz à síntese de treonina e o outro de metionina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). No ramo que conduz à síntese de treonina e isoleucina, o aspartato semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima HSDH. Duas diferentes isoenzimas da HSDH têm sido isoladas e caracterizadas em vegetais, uma delas sensível à inibição por treonina e presente em um polipeptídeo bifuncional apresentando dois domínios principais, um com atividade da enzima AK e o outro com atividade da HSDH, e outra isoenzima resistente à inibição pelo aminoácido treonina (FERREIRA et al., 2005; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

O aminoácido lisina é sintetizado a partir do aspartato semialdeído em sete reações enzimáticas iniciadas pela ação da enzima DHDPS. A enzima DHDPS catalisa a condensação do piruvato e aspartato semialdeído para produção de 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A enzima DHDPS tem sido isolada e caracterizada e somente uma isoenzima altamente sensível à inibição por baixas concentrações de lisina têm sido descrita em vegetais (AZEVEDO, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A estrutura da DHDPS foi determinada em *Nicotiana sylvestris* sendo formada por um homotetrâmero composto por dois dímeros (BLICKLING et al., 1997). Além disso, a determinação da estrutura na presença do aminoácido lisina revelou alterações estruturais importantes que explicam a forte inibição causada na atividade desta enzima por este aminoácido (BLICKLING et al., 1997). Os genes que codificam a DHDPS têm sido isolados em diferentes espécies e diversos estudos têm sido realizados (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Em milho, o uso de mutação alterando um

único aminoácido provocou importantes alterações na estrutura da enzima eliminando sua sensibilidade pelo aminoácido lisina (SHAVER et al., 1996). Em *Arabidopsis thaliana*, foram isolados e identificados dois genes que codificam para a enzima DHDPS (VAUTERIN; FRANKARD; JACOBS, 1999; SARROBERT et al., 2000). O gene *dhdps-1* está localizado no cromossomo III, enquanto que o gene *dhdps-2* está localizado no cromossomo II de *A. thaliana* e estudos de inibição demonstraram que a enzima DHDPS2 é menos sensível à inibição pelo aminoácido lisina do que a enzima DHDPS1 (SARROBERT et al., 2000). Na via de degradação, o aminoácido lisina é inicialmente convertido a sacaropina em uma reação catalisada pela enzima LKR, a qual é hidrolisada em glutamato e aminoadípico semialdeído pela ação da enzima SDH (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

O aumento na concentração de lisina no mutante de milho *o2* é causado pela redução na expressão da fração protéica prolamina (zeína) deficiente em lisina e triptofano (GAZIOLA et al., 1999) e pela redução na expressão do gene e na atividade da enzima LKR-SDH (KEMPER et al., 1999). Em trabalhos anteriores, o metabolismo de lisina e treonina (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; POMPEU et al., 2006) e o acúmulo de matéria seca e proteínas de reserva (LANDRY et al., 2005) foi estudado em sementes de diferentes mutantes de milho *opaco* e *floury*. No presente trabalho, foi realizado o isolamento e a caracterização da enzima DHDPS durante o desenvolvimento das sementes em quatro mutantes de milho. Além disso, a composição de aminoácidos solúveis e protéicos foi analisada em sementes na maturidade.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

As sementes dos genótipos mutantes *opaco* (*o1* e *o2*) e *floury* (*fl1* e *fl2*) e o respectivo genótipo selvagem, Oh43+, foram fornecidas pelo The Maize Genetics Cooperation Seed Stock Center (Urbana, Il, USA). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na ESALQ-USP, no Departamento de Genética, Brasil, mantidas à temperatura de 25-32°C com iluminação natural. As plantas de todos os genótipos foram auto-polinizadas e as sementes foram colhidas aos 16, 20

e 24 dias após a polinização (DAP), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer à -80°C.

3.2.2 Síntese de aspartato semialdeído

O substrato DL-aspartato semialdeído foi sintetizado por ozonólise de DL-alilglicina e purificado de acordo com o método de Black e Wright (1955) sendo eluído de uma coluna de troca catiônica utilizando-se uma solução de ácido clorídrico (HCl) 4 N e estocado a -80°C.

3.2.3 Extração e purificação parcial da Enzima DHDPS

Para o estudo da enzima DHDPS o experimento foi elaborado segundo o delineamento inteiramente casualizado com tratamento fatorial com 5 genótipos e 3 tempos com três plantas por parcela e os resultados expressam a média e o desvio padrão de três repetições.

Para a extração da enzima DHDPS todos os procedimentos foram conduzidos à temperatura de 4°C. A extração foi realizada utilizando-se sementes imaturas colhidas aos 16, 20 e 24 DAP em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF); 2 mM de EDTA; 1,4% (p/v) de ácido ascórbico e 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Cada extrato foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 30 min para remoção de resíduos celulares. Após centrifugação, ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30%. Após agitação por 30 min, para permitir a completa solubilização do sulfato de amônio, o extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 min e o sobrenadante foi submetido a uma segunda precipitação a 60%. Após homogeneização o extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 min e o pelete foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de EDTA e 1,4% de ácido ascórbico. O extrato foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e as amostras foram coletadas para determinação da atividade da DHDPS.

3.2.4 Determinação da atividade da enzima DHDPS

A determinação da atividade da DHDPS foi realizada em um volume final de 250 µL como descrito previamente por Wallsgrove e Mazelis (1980) com modificações realizadas de

acordo com os resultados obtidos neste trabalho. O ensaio continha 25 μL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); 25 μL de piruvato 100 mM; 25 μL de aspartato semialdeído 10 mM (neutralizado antes do uso com NaOH); 125 μL de extrato e água. O ensaio foi incubado à 35°C por 1 h e a reação foi interrompida pela adição de tampão de parada (0,22 M de ácido cítrico; 0,55 M de fosfato de sódio e 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *o*-aminobenzaldeído). O ensaio foi novamente incubado à 35°C por 1 h para permitir a coloração. Após a incubação, o ensaio foi centrifugado a 12.000 g por 10 min e a absorbância foi determinada a 520 nm. A atividade da DHDPS foi determinada em unidades. mg^{-1} proteína e 1 unidade de atividade da enzima foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima que produz uma alteração em A_{520} de 0,001. min^{-1} . A atividade da DHDPS também foi determinada na presença de 1 e 5 mM de L-lisina; L-treonina; L-lisina + L-treonina; L-metionina; aminoetil L-cisteína (AEC); S-adenosilmetionina (SAM); 1 mM de L-lisina + SAM; 1 mM de L-treonina + SAM; 1,6 mM de CaCl_2 ; 1,6 mM de EGTA e 1,6 mM de CaCl_2 + EGTA. Foram utilizadas triplicatas para cada ensaio enzimático.

3.2.5 Análise de aminoácidos

Para a análise de aminoácidos o experimento foi elaborado segundo o delineamento inteiramente casualizado com três plantas por parcela e os resultados expressam a média e o desvio padrão de três repetições.

Após liofilização, as sementes foram moídas e a farinha obtida foi utilizada para a extração de aminoácidos solúveis e protéicos. Para a extração de aminoácidos solúveis, 150 mg de amostra de farinha foram utilizadas em 500 μL de tampão fosfato 70 mM (pH 7,0), contendo 1 mM de ditioneitol (DTT). Três microlitros de norleucina foram adicionados ao extrato como padrão interno. Cada amostra foi misturada por 3 min e 2,5 mL de MCW (metanol, clorofórmio e água) (12/3/5, v/v/v) foram adicionados. Cada amostra foi misturada e 500 μL de água destilada-deionizada foi adicionada ao extrato. Após centrifugação a 3.000 g por 25 min, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de vidro. Um volume de 2,3 mL de água foi adicionado ao pelete seguido de posterior homogeneização por 3 min. Após centrifugação a 3.000 g por 25 min, a fase aquosa foi transferida para o tubo anterior. O mesmo procedimento foi repetido novamente e todas as fases aquosas obtidas foram misturadas e centrifugadas a 3.000 g por 25 min para obtenção de uma solução livre de compostos insolúveis. A solução aquosa foi transferida para um

novo tubo e liofilizada por 12 h. O material liofilizado foi solubilizado em 1 mL de água e centrifugado a 12.000 por 30 min para obtenção de uma solução livre de compostos insolúveis.

Para a hidrólise de aminoácidos totais, 200 µL da amostra foram transferidos para um novo tubo e 5 µL de NaOH 0,2 N, contendo 1% (v/v) de ácido ditiodipropiônico; 40 µL de fenol 1,25% (v/v) e 245 µL de HCl 12 N foram adicionados ao extrato. As amostras foram incubadas à 110°C por 24 h na presença de nitrogênio. Após incubação os aminoácidos totais foram extraídos utilizando-se MCW como descrito previamente.

A análise de aminoácidos foi realizada utilizando-se o sistema BioChrom 20 (Amersham Pharmacia Biotech). Para as análises 150 µl de tampão citrato de lítio 0,2 M (pH 2,2) foram adicionados a 150 µl de amostra e 40 µl da solução foram injetados em uma coluna de troca iônica. Os aminoácidos foram eluídos de uma coluna de troca iônica (Ultrapac 8 resin lithium form, I=200 mm, d=4-6 mm) utilizando-se 5 tampões padrão de eluição de citrato de lítio. Os aminoácidos foram detectados com o auxílio de derivatização e a concentração expressa em mg.g⁻¹ de matéria seca (MS).

3.2.6 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.3 Resultados

3.3.1 Determinação da atividade da DHDPS

Neste estudo, a atividade da DHDPS no genótipo selvagem Oh43+ e em quatro mutantes (Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1 e Oh43fl2) foi inicialmente determinada durante o desenvolvimento das sementes aos 16, 20 e 24 DAP (Figura 3.1). O principal pico de atividade da enzima DHDPS foi observado entre 16 e 20 DAP, seguido de uma redução aos 24 DAP (Figura 3.1). Não foram observadas variações significativas sobre a atividade da DHDPS entre os genótipos estudados aos 16, 20 e 24 DAP (Figura 3.1). De acordo com estes resultados observados durante o desenvolvimento das sementes, algumas propriedades regulatórias da enzima foram analisadas na presença de diferentes efetores aos 20 DAP.

Figura 3.1 – Atividade específica da enzima DHDPS isolada de sementes dos genótipos (A) Oh43+, (B) Oh43o1, (C) Oh43o2, (D) Oh43fl1 e (E) Oh43fl2 aos 16, 20 e 24 DAP

A enzima DHDPS de todos os genótipos foi extraída aos 20 DAP e foi parcialmente purificada utilizando-se sulfato de amônio e os extratos eluídos de coluna Sephadex G-25 foram analisados na presença de lisina, treonina, metionina, AEC, SAM, cálcio e EGTA. A adição de lisina ao ensaio provocou uma inibição de até 86% sobre a atividade da DHDPS a 1 e 5 mM e nenhuma diferença sobre o efeito inibitório foi observada entre os genótipos estudados (Figura 3.2). A adição de AEC ao ensaio provocou um efeito inibitório de 75% sobre a atividade da DHDPS no mutante Oh43fl1 a 1 mM (Figura 3.2D), enquanto que a adição de 5 mM provocou uma inibição de 86% sobre a atividade da DHDPS no genótipo Oh43+ (Figura 3.2A). A adição de treonina, metionina ou SAM não provocou alteração sobre a atividade da enzima em nenhuma das concentrações estudadas. Além disso, as adições de cálcio ou/e EGTA também não provocaram alterações, a exemplo de efeitos aditivos ou sinérgicos (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Efeito da adição de 1 e 5 mM dos aminoácidos (K, lisina; T, treonina; M, metionina), aminoetil L-cisteína (AEC), S-adenosilmetionina (SAM), Ca e EGTA sobre a atividade da enzima DHDPS (valores relativos) isolada dos genótipos (A) Oh43+, (B) Oh43o1, (C) Oh43o2, (D) Oh43fl1, (E) Oh43fl2 aos 20 DAP

3.3.2 Composição de aminoácidos solúveis

Quando a composição de aminoácidos solúveis foi analisada na maturidade, foram observadas altas concentrações dos aminoácidos aspartato, asparagina, glutamato e alanina no endosperma de todos os genótipos analisados (Tabela 3.1). O mutante Oh43o2 exibiu a maior concentração de aspartato ($0,43 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) seguido pelo mutante Oh43fl2 ($0,39 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (Tabela 3.1). As maiores concentrações de lisina foram observadas nos mutantes Oh43fl2 ($0,08 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e Oh43o2 ($0,08 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), enquanto que o genótipo selvagem, Oh43+, exibiu a menor concentração ($0,04 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (Tabela 3.1). As maiores concentrações de treonina foram observadas nos mutantes Oh43o2 e Oh43fl2 ($0,04 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (Tabela 3.1), enquanto que as maiores concentrações dos aminoácidos metionina e isoleucina foram observadas no mutante Oh43o2 ($0,03 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (Tabela 3.1).

3.3.3 Composição de aminoácidos protéicos

Quando a composição de aminoácidos incorporados em proteínas foi analisada na maturidade, os aminoácidos glutamato + glutamina foram predominantes em todos os genótipos analisados (Tabela 3.2). O mutante Oh43o2 exibiu a maior concentração de aspartato + asparagina ($9,24 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e também as maiores concentrações de lisina e treonina ($5,17$ e $5,20 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 - Composição de aminoácidos solúveis em sementes dos genótipos Oh43+, Oh43o1, Oh43o2, Oh43fl1, Oh43fl2. Valores expressos em mg.g⁻¹ MS ± desvio padrão. N.D. (não detectado)

Aminoácido	Genótipos				
	Oh43+	Oh43o1	Oh43o2	Oh43fl1	Oh43fl2
Aspartato	0,14 ± 0,005	0,22 ± <0,001	0,43 ± <0,001	0,17 ± <0,001	0,39 ± 0,005
Treonina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,04 ± <0,001
Serina	0,03 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001
Asparagina	0,28 ± 0,005	0,42 ± 0,005	0,64 ± 0,005	0,24 ± <0,001	0,74 ± 0,005
Glutamato	0,20 ± 0,015	0,27 ± <0,001	0,29 ± 0,010	0,16 ± 0,005	0,23 ± 0,015
Glutamina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± 0,005
Prolina	0,30 ± 0,005	0,35 ± 0,005	1,53 ± <0,001	0,31 ± 0,005	0,74 ± 0,005
Glicina	0,03 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,05 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,04 ± <0,001
Alanina	0,12 ± <0,001	0,17 ± <0,001	0,19 ± <0,001	0,10 ± <0,001	0,18 ± 0,005
Valina	0,03 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,07 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,06 ± <0,001
Cisteína	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Metionina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001
Isoleucina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001
Leucina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,02 ± 0,005	0,03 ± 0,005
Tirosina	0,05 ± <0,001	0,06 ± <0,001	0,08 ± <0,001	0,05 ± <0,001	0,12 ± 0,010
Fenilalanina	0,02 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,05 ± <0,001
Lisina	0,04 ± <0,001	0,05 ± <0,001	0,08 ± <0,001	0,05 ± <0,001	0,08 ± 0,005
Hisitina	0,02 ± <0,001	0,03 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,02 ± <0,001	0,05 ± <0,001
Arginina	0,04 ± 0,005	0,05 ± 0,005	0,09 ± <0,001	0,04 ± <0,001	0,10 ± 0,005
Total	1,40	1,84	3,73	1,34	2,96

Tabela 3.2 - Composição de aminoácidos incorporados em proteínas em sementes dos genótipos Oh43+, Oh43*o1*, Oh43*o2*, Oh43*fl1*, Oh43*fl2*. Valores expressos em mg.g⁻¹ MS $\pm$ desvio padrão

Aminoácido	Genótipos				
	Oh43+	Oh43 <i>o1</i>	Oh43 <i>o2</i>	Oh43 <i>fl1</i>	Oh43 <i>fl2</i>
Aspartato + Asparagina	6,95 $\pm$ 0,23	7,80 $\pm$ 0,41	9,24 $\pm$ 0,29	7,30 $\pm$ 0,10	7,15 $\pm$ 0,92
Treonina	4,07 $\pm$ 0,11	4,56 $\pm$ 0,23	5,20 $\pm$ 0,18	4,33 $\pm$ 0,01	3,94 $\pm$ 0,46
Serina	5,57 $\pm$ 0,10	6,14 $\pm$ 0,31	6,42 $\pm$ 0,16	5,85 $\pm$ 0,02	5,37 $\pm$ 0,63
Glutamato + Glutamina	22,53 $\pm$ 0,07	25,34 $\pm$ 1,82	22,45 $\pm$ 0,67	24,41 $\pm$ 0,75	19,92 $\pm$ 2,24
Prolina	9,94 $\pm$ 0,11	10,98 $\pm$ 0,57	9,81 $\pm$ 0,31	10,58 $\pm$ 0,39	8,61 $\pm$ 0,82
Glicina	4,24 $\pm$ 0,20	4,59 $\pm$ 0,14	6,78 $\pm$ 0,18	4,21 $\pm$ 0,04	4,59 $\pm$ 0,57
Alanina	9,49 $\pm$ 0,12	10,67 $\pm$ 0,64	9,73 $\pm$ 0,29	10,28 $\pm$ 0,25	8,50 $\pm$ 1,04
Valina	5,41 $\pm$ 0,11	5,95 $\pm$ 0,21	6,74 $\pm$ 0,19	5,58 $\pm$ 0,18	5,45 $\pm$ 0,56
Isoleucina	4,12 $\pm$ 0,09	4,84 $\pm$ 0,29	4,78 $\pm$ 0,15	4,45 $\pm$ 0,01	4,12 $\pm$ 0,43
Leucina	16,69 $\pm$ 0,03	18,98 $\pm$ 1,38	14,74 $\pm$ 0,39	17,98 $\pm$ 0,32	14,34 $\pm$ 1,38
Tirosina	5,26 $\pm$ 0,23	6,29 $\pm$ 0,04	5,75 $\pm$ 0,19	6,01 $\pm$ 0,21	4,74 $\pm$ 0,23
Fenilalanina	6,22 $\pm$ 0,06	7,03 $\pm$ 0,55	6,65 $\pm$ 0,14	6,73 $\pm$ 0,22	5,71 $\pm$ 0,65
Lisina	2,78 $\pm$ 0,02	3,15 $\pm$ 0,06	5,17 $\pm$ 0,15	2,87 $\pm$ 0,05	3,55 $\pm$ 0,40
Histidina	2,83 $\pm$ 0,01	3,07 $\pm$ 0,18	3,95 $\pm$ 0,16	2,90 $\pm$ 0,02	2,57 $\pm$ 0,44
Arginina	4,53 $\pm$ 0,33	4,91 $\pm$ 0,25	7,87 $\pm$ 0,28	4,68 $\pm$ 0,08	5,21 $\pm$ 0,54
Total	110,63	124,30	125,28	118,16	103,77

3.4 Discussão

Para a compreensão da via metabólica do ácido aspártico, que conduz à síntese de lisina, treonina, isoleucina e metionina, as enzimas chave AK, HSDH, LKR e SDH têm sido estudadas e caracterizadas em diversas espécies vegetais (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A utilização de mutantes naturais, a exemplo dos mutantes da série *opaco* e *floury*, tem se mostrado como uma importante metodologia para o estudo desta via metabólica. Embora importantes informações foram obtidas sobre o gene *o2* e sobre os efeitos desta mutação afetando importantes características, como a composição das proteínas de reserva e aminoácidos em sementes de milho, apenas recentemente, o efeito de outras importantes mutações sobre o metabolismo de lisina e síntese de proteínas de reserva foram descritas (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et

al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; POMPEU et al., 2006). Embora esses trabalhos, tenham levado ao isolamento e à caracterização das enzimas AK, HSDH, LKR e SDH em diversos mutantes *opaco* e *floury*, a principal enzima responsável pelo controle da síntese de lisina, a DHDPS, ainda não tinha sido isolada e caracterizada. Neste trabalho, a enzima DHDPS foi isolada e suas propriedades foram caracterizadas em mutantes de milho *opaco* e *floury*.

Independente do genótipo analisado, a enzima DHDPS exibiu o mesmo padrão de atividade durante o desenvolvimento das sementes. Os maiores níveis de atividade foram observados entre os 16 e 20 DAP, ocorrendo uma redução aos 24 DAP. Este resultado é similar aqueles descritos previamente para as enzimas AK e HSDH em que foram utilizados os mesmos genótipos (AZEVEDO et al., 2003). Além disso, a análise enzimática de variedades *Quality Protein Maize* (QPM) revelou níveis mais elevados de atividade das enzimas AK e HSDH aos 16 DAP, decrescendo para níveis próximo a zero aos 28 DAP (GAZIOLA et al., 1999). Esta alta taxa de atividade das enzimas AK, HSDH e DHDPS observada entre os 16 e 24 DAP segue o mesmo padrão de síntese e acúmulo das proteínas de reserva (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b).

A regulação das enzimas AK, HSDH, LKR e SDH no genótipo selvagem Oh43+ e em quatro mutantes (Oh43*o1*, Oh43*o2*, Oh43*fl1* e Oh43*fl2*), os mesmos utilizados neste trabalho, foram estudadas previamente por Azevedo et al. (2003) sendo observados aumentos significativos da atividade da AK para os mutantes Oh43*o1* e Oh43*fl2* e, em contraste, foram observadas reduções da atividade enzimática nos mutantes Oh43*o2* e Oh43*fl1* quando comparados ao genótipo selvagem (AZEVEDO et al., 2003). As enzimas do catabolismo de lisina, LKR e SDH, também apresentaram alterações significativas sendo observadas reduções na atividade das duas enzimas nos mutantes Oh43*o2*, Oh43*fl1* e Oh43*fl2* em relação ao genótipo Oh43+ (AZEVEDO et al., 2003). Embora os estudos realizados por Azevedo et al. (2003) revelaram importantes variações sobre a atividade das enzimas AK, LKR e SDH; para a enzima DHDPS não foi observada nenhuma variação significativa entre os genótipos nos três estágios analisados, não sendo possível a obtenção de nenhuma evidência de que os genes *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* possam exercer algum efeito sobre a atividade da DHDPS. Na verdade, enquanto que para a DHDPS não existe nenhuma evidência em trabalhos anteriores sobre os efeitos destas mutações afetando a atividade desta enzima, com relação à enzima AK, alguns trabalhos apresentaram evidências de que a atividade desta enzima seria regulada pelo gene *o2* (AZEVEDO; ARANA; ARRUDA, 1990;

KEMPER et al., 1999). Para as enzimas da via de degradação de lisina, Kemper et al. (1999) demonstraram reduções nos níveis de mRNA, polipeptídeos e na atividade das enzimas LKR-SDH como um dos efeitos da mutação *o2*. O fato de que a enzima DHDPS não foi significativamente afetada pelos genes mutantes utilizados neste estudo, enquanto que as enzimas AK, LKR e SDH apresentaram importantes alterações quando os mutantes foram comparados com o genótipo Oh43+ (AZEVEDO et al., 2003), sugere que estas mutações possam afetar o controle da via metabólica do ácido aspártico principalmente através da enzima AK, que está relacionada com a síntese dos aminoácidos lisina, treonina, metionina e isoleucina, e também através das enzimas envolvidas no catabolismo de lisina, mas não afetam diretamente o ramo da via metabólica que conduz exclusivamente para a síntese de lisina.

Para o estudo de algumas propriedades regulatórias da DHDPS, a atividade enzimática foi determinada na presença de alguns aminoácidos, AEC, SAM e cálcio. Alguns trabalhos têm demonstrado que o aminoácido lisina exerce uma forte inibição sobre a atividade da DHDPS (FERREIRA et al., 2005). Para todos os genótipos analisados a atividade da enzima DHDPS foi fortemente inibida pela adição de 1 mM de lisina ao ensaio. Estes resultados sugerem a existência de uma única isoenzima altamente sensível à inibição causada pelo aminoácido lisina, o qual exerce o controle da sua própria síntese através da inibição da atividade da enzima DHDPS como descrito previamente em outras espécies estudadas (AZEVEDO et al., 1997). Além disso, ao contrário do que foi observado para as enzimas AK e HSDH em relação à inibição pelos aminoácidos lisina e treonina que confirmaram uma alteração na regulação das enzimas AK e HSDH, possivelmente causada pela introdução das mutações no germoplasma Oh43+ (AZEVEDO et al., 2003), para a DHDPS os resultados não demonstraram nenhuma variação no padrão de inibição causado pelo aminoácido lisina entre os genótipos estudados. A importância da DHDPS como uma enzima regulatória na síntese de lisina tem sido confirmada por uma série de estudos em que foram utilizados mutantes bioquímicos e plantas transgênicas expressando genes que codificam para enzimas da AK e DHDPS menos sensíveis à inibição causada pelo aminoácido lisina (STEPANSKY et al., 2006). Em um dos estudos foi relatado um aumento na concentração de lisina solúvel em linhas transgênicas de milho expressando o gene *CordapA* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para uma enzima da DHDPS menos sensível à inibição por lisina (HUANG et al., 2005). Quando as linhas transgênicas expressando o gene *CordapA* foram combinadas por cruzamento com linhas transgênicas que apresentavam uma

redução na concentração da fração protéica zeína, foram observados aumentos de até duas vezes na concentração de lisina total (Lisina solúvel + protéica) (HUANG et al., 2005). Em *A. thaliana*, as propriedades regulatórias envolvidas na síntese e catabolismo de lisina foram analisadas em tecidos vegetativos e reprodutivos utilizando-se plantas transgênicas (ZHU; GALILI, 2004). A concentração de lisina solúvel em plantas controles, não transgênicas, variou entre 0,29 e 0,39 mol%, enquanto que em plantas transgênicas expressando uma enzima da DHDPS proveniente de bactéria, *phas::DHDPS*, a concentração de lisina variou entre 1,15 e 10,99 mol% (ZHU; GALILI, 2004). Além disso, as plantas que foram transformadas com uma construção de RNAi, *phas::dsLKR*, exibiram concentrações de lisina solúvel variando entre 0,21 e 2,11 mol%, enquanto que as plantas transgênicas contendo as duas construções, apresentaram acúmulos de lisina solúvel de até 25,06 mol% (ZHU; GALILI, 2004). Todos os resultados obtidos utilizando-se mutantes e plantas transgênicas apresentando alterações em enzimas da via metabólica do ácido aspártico confirmaram a importância da enzima DHDPS controlando a síntese de lisina e indicaram que esta enzima precisa ter sua sensibilidade a este aminoácido alterada para que ocorra o acúmulo na forma solúvel.

Embora existam evidências de que a enzima HSDH não exerça nenhuma função regulatória sobre a síntese de lisina, esta enzima compartilha o mesmo substrato, aspartato semialdeído, com a enzima DHDPS, e a alta sensibilidade desta enzima ao aminoácido lisina, observada em todos os genótipos estudados, pode ser um ponto chave na determinação do fluxo de carbono através da via metabólica determinando a prioridade de síntese entre os aminoácidos lisina ou treonina.

A adição de AEC ao ensaio provocou inibição na atividade da enzima DHDPS em todos os genótipos analisados. Contudo, a adição deste análogo de lisina não provocou inibição semelhante à observada com a adição de lisina. O uso de análogos de lisina em estudos envolvendo propriedades regulatórias da enzima DHDPS revelou que análogos como etil éster lisina e threohidroxi lisina provocaram efeitos inibitórios na atividade da DHDPS em concentrações muito similares às observadas com lisina, enquanto que AEC tornou-se inibitório a 1 mM (FRISCH et al., 1991). Curiosamente, enquanto que a adição de lisina não causou nenhuma variação no padrão de inibição da DHDPS, a adição de AEC provocou variações significativas no padrão de inibição enzimático entre os genótipos estudados, sugerindo que diferentes análogos podem produzir respostas distintas na atividade da DHDPS. Também é

importante ressaltar que AEC produz diferentes respostas como inibidor ou como substrato para LKR dependendo da espécie estudada. Enquanto que em milho alguns resultados demonstraram que AEC não atua como substrato para a enzima LKR substituindo o aminoácido lisina, nem inibindo a atividade enzimática (BROCHETTO-BRAGA et al., 1992), em arroz, a adição de AEC além de provocar a inibição parcial da atividade da enzima LKR, possivelmente pela competição com o aminoácido lisina pelo sítio ativo da enzima, também se mostrou eficiente substituindo parcialmente o aminoácido lisina como substrato desta enzima (GAZIOLA et al., 2000).

Embora a adição ao ensaio dos aminoácidos treonina, metionina ou SAM tenha sido eficiente inibindo a atividade de algumas enzimas da via metabólica do ácido aspártico (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), o uso destes aminoácidos e SAM não provocou nenhum efeito sobre a atividade da DHDPS. Além dos aminoácidos, AEC e SAM, o efeito do cálcio também foi investigado sobre a atividade da DHDPS. A importância do cálcio atuando como um sinalizador em plantas em resposta a diferentes estímulos regulando diversas funções celulares (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006) e como modulador da atividade de enzimas da via do ácido aspártico tem sido investigada em diversas espécies vegetais (LUGLI; GAZIOLA; AZEVEDO, 2000). Contudo neste estudo, a atividade da DHDPS não foi afetada pela adição de cálcio ou EGTA, sugerindo que o cálcio não atua como modulador da atividade da enzima DHDPS. Embora o efeito do cálcio nunca tenha sido testado sobre a atividade da DHDPS, existe muita controvérsia sobre o efeito modulador do cálcio sobre enzimas da via metabólica do ácido aspártico, sendo que na maioria dos estudos, utilizando-se principalmente a enzima AK, não foi obtida nenhuma evidência clara que confirme tal função (AZEVEDO et al., 1997).

Os perfis de aminoácidos solúveis e incorporados às proteínas foram analisados em sementes na maturidade utilizando-se HPLC. Embora foram observadas algumas variações entre os genótipos estudados, aspartato, asparagina, glutamato, prolina e alanina foram os aminoácidos solúveis predominantes em todos os genótipos estudados. Além disso, a análise do perfil de aminoácidos demonstrou que os mutantes *Oh43o2* e *Oh43fl2* exibiram as maiores concentrações de aminoácidos solúveis totais e de alguns aminoácidos como aspartato, asparagina, prolina entre outros, enquanto que os mutantes *Oh43o1* e *Oh43fl1* apresentaram uma composição muito similar ao genótipo selvagem. Resultado semelhante utilizando-se o mutante *o1* foi descrito por Nelson et al (1965) e confirmado por Hunter et al. (2002). O mutante *Oh43o2* exibiu alta

concentração solúvel do aminoácido lisina, corroborando com resultados previamente descritos em outros trabalhos (SODEK; WILSON, 1971; GAZIOLA et al., 1999; WANG; LARKINS, 2001). Apesar da variação entre os genótipos estudados, o mutante Oh43*fl*2 exibiu aumento similar na concentração de lisina ao observado para o mutante Oh43*o*2, enquanto que os mutantes Oh43*fl*1 e Oh43*o*1 exibiram menores concentrações, mas maiores do que a observada para o genótipo selvagem. Este resultado obtido para a mutação *o*1, confirma os resultados obtidos previamente por Hunter et al. (2002) e Azevedo et al. (2003). Em geral, todos os mutantes apresentaram aumentos na concentração de lisina solúvel, o que pode ser explicado pelos elevados níveis de síntese, pela redução nos níveis de degradação ou pela inabilidade destes aminoácidos em serem incorporados às proteínas de reserva (ARRUDA et al., 2000). Entretanto, no caso dos mutantes Oh43*o*2 e Oh43*fl*2, o alto acúmulo de lisina solúvel pode ser explicado principalmente pelas reduções das atividades das enzimas LKR e SDH que estão envolvidas na degradação do aminoácido lisina (AZEVEDO et al., 2003).

As proteínas de reserva estão agrupadas em duas diferentes classes denominadas zeína e não zeína. A fração não zeína é composta por albuminas, globulinas e glutelinas, enquanto que a zeína, denominada prolaminas, é composta por diferentes subunidades (LANDRY et al., 2005). Os aminoácidos glutamato + glutamina foram os aminoácidos predominantes incorporados em proteínas em todos os genótipos estudados. O mutante Oh43*o*2, além da maior concentração de treonina também apresentou a maior concentração de lisina. Este aumento observado na concentração de lisina em relação ao genótipo Oh43+ sugere que a mutação *o*2 possa exercer um maior efeito reduzindo a síntese e o acúmulo da fração zeína, deficiente em lisina, quando comparada com as demais mutações.

De modo geral, os resultados mostraram que a mutação *o*2 provocou um maior aumento na concentração de lisina nas sementes. Este aumento pode ser explicado pelos aumentos nas concentrações de lisina solúvel e principalmente incorporada em proteínas. O alto conteúdo de lisina protéica pode ser explicado pela redução na síntese da fração zeína e, conseqüente aumento na concentração das demais frações protéicas presente nas sementes (LANDRY et al., 2005).

O uso de mutantes têm se apresentado como uma importante metodologia para o estudo de diferentes vias metabólicas e, embora, exista um número considerável de mutantes disponíveis para distintas espécies, poucos estudos foram realizados utilizando-se estes materiais. Contudo, os estudos realizados utilizando-se as mutações *opaco* e *floury* mostraram importantes efeitos

sobre o metabolismo de lisina, sobre a composição de aminoácidos e sobre a distribuição das proteínas de reserva nas sementes de milho (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; POMPEU et al., 2006).

Referências

ARRUDA, P.; KEMPER, E.L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 324-330, 2000.

AZEVEDO, R.A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, v. 22, p. 217-230, 2002.

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**, Clare, v. 70, p. 81-90, 1990.

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, p. 395-419, 1997.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by *opaque* and *floury* mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LEA, P.J.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; VARISI, V.A.; GRATÃO, P.L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 339-348, 2004a.

AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 143-162, 2006.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, p. 261-279, 2001.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; VARISI, V.A.; GAZIOLA, S.A.; GRATÃO, P.L.; TORO, A.A. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the *opaque-5* and *opaque-7* maize mutations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 4865-4871, 2004b.

BLACK, S.; WRIGHT, N.G. Aspartic β -semialdehyde dehydrogenase and aspartic β -semialdehyde. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 213, p. 39-50, 1955.

BLICKLING, S.; BEISEL, H.G.; BOZIC, D.; KNABLEIN, J.; LABER, B.; HUBER, R. Structure of dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* reveals novel quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 274, p. 608-621, 1997.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

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**, Rockville, v. 98, p. 1139-1147, 1992.

CURIEN, G.; LAURENCIN, M.; ROBERT-GENTHON, M.; DUMAS, R. Allosteric monofunctional aspartate kinases from Arabidopsis. **Febs Journal**, Oxford, v. 274, p. 164-176, 2007.

FERREIRA, R.R.; MEINHARDT, L.W.; AZEVEDO, R.A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: Characterisation of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 77-86, 2006.

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, p. 985-994, 2005.

FORNAZIER, R.F.; GAZIOLA, S.A.; HELM, C.V.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Isolation and characterization of enzymes involved in lysine catabolism from sorghum seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1791-1798, 2005.

FRISCH, D.A.; GENGEBACH, B.G.; TOMMEY, A.M.; SELLNER, J.M.; SOMERS, D.A.; MYERS, D.E. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 444-452, 1991.

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 lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1268-1275, 1999.

GAZIOLA, S.A.; SODEK, L.; ARRUDA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Degradation of lysine in rice seeds: Effect of calcium, ionic strength, S-adenosylmethionine and S-2-aminoethyl-L-cysteine on the lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 110, p. 164-171, 2000.

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**, Oxford, v. 247, p. 364-371, 1997.

HUANG, S.S.; KRUGER, D.E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R.L.; FLORIDA, C.A.; ADAMS, W.R.; BROWN, W.E.; LUETHY, M.H. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, p. 555-569, 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. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2591-2612, 2002.

KEMPER, E.L.; NETO, G.C.; PAPES, F.; MORAES, K.C. M.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of *opaque-2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1981-1993, 1999.

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, p. 549-556, 2005.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 243-247, 2006.

LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, Clare, v. 150, p. 51-58, 2000.

NELSON, O.E.; MERTZ, E.T.; BATES, L.S. Second mutant gene affecting amino acid pattern of maize endosperm proteins. **Science**, Washington, v. 150, p. 1469-1470, 1965.

POMPEU, G.B.; VENDEMIATTI, A.; GRATAO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Saccharopine dehydrogenase activity in the high-lysine *opaque* and *floury* maize mutants. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, p. 55-64, 2006.

ROGNES, S.E.; DEWAELE, E.; AAS, S.F.; JACOBS, M.; FRANKARD, V. Transcriptional and biochemical regulation of a novel *Arabidopsis thaliana* bifunctional aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene isolated by functional complementation of a yeast *hom6* mutant. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 281-294, 2003.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M.C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, p. 357-367, 2000.

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, p. 1962-1966, 1996.

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, p. 1144-1150, 1971.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 121-125, 2006.

TODD, C.D.; POLACCO, J.C. AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v. 223, p. 1108-1113, 2006.

VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell specific manner. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 695-708, 1999.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants: Complete localization of the regulatory enzyme dihydrodipicolinate synthase in the chloroplasts of spinach leaves. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 116, p. 189-192, 1980.

WANG, X.L.; LARKINS, B.A. Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1766-1777, 2001.

ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 129-136, 2004.

4 BIOSSÍNTESE DE LISINA E METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM QUINOA (*Chenopodium quinoa*): ESTUDO DE ENZIMAS E COMPOSTOS NITROGENADOS

Resumo

As enzimas aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.21.52) foram parcialmente purificadas de *Chenopodium quinoa* Willd e estudadas na presença de 1 e 5 mM de L-lisina, L-treonina, L-metionina e aminoetil L-cisteína (AEC). A inibição da atividade da AK, observada na presença de lisina e treonina, sugere a existência de pelo menos duas isoenzimas, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina, sendo a isoenzima sensível à inibição por treonina predominante. O aminoácido metionina e o AEC, análogo de lisina, não produziram nenhuma alteração na atividade da AK. Somente a adição de treonina inibiu a atividade da HSDH, sugerindo a presença de duas isoenzimas, uma resistente e a outra sensível à inibição por este aminoácido. A adição de lisina causou uma forte inibição na atividade da DHDPS. Este resultado sugere uma importante função da DHDPS controlando a síntese de lisina. A atividade da enzima nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1) foi determinada nas raízes e folhas, sendo o sítio predominante de redução observado nas folhas. A composição de aminoácidos solúveis foi determinada nas folhas, raízes e sementes. Os resultados mostraram que o glutamato foi o aminoácido solúvel predominante nas folhas, enquanto que a glutamina foi predominante nas raízes. Altas concentrações de lisina e treonina solúveis foram observadas nas sementes. Os resultados indicam que a alta concentração de lisina observada nas sementes de quinoa é causada pelos aumentos nos conteúdos de lisina solúvel e incorporado em proteínas de reserva que corresponderam a 1,72% e 4,26% do total de aminoácidos, respectivamente.

Palavras chave: Aspartato quinase; Homoserina desidrogenase; Dihidrodipicolinato sintase; Lisina; Nitrato redutase

4 LYSINE BIOSYNTHESIS AND NITROGEN METABOLISM IN QUINOA (*Chenopodium quinoa*): STUDY OF ENZYMES AND NITROGEN CONTAINING COMPOUNDS

Abstract

Aspartate kinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserine dehydrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) and dihydrodipicolinate synthase (DHPS, EC 4.2.1.52) were partially purified from *Chenopodium quinoa* Willd and studied in the presence of L-lysine, L-threonine, L-methionine and aminoethyl L-cysteine (AEC) at 1 mM and 5 mM. Lysine and threonine were able to inhibit AK activity indicating the existence of at least two AK isoenzymes, one inhibited by lysine and the other by threonine, the latter being predominant in quinoa seeds. Methionine and AEC were not able to produce any alteration on AK activity. The activity of HSDH was only partially inhibited by threonine indicating the presence of threonine-resistant and threonine-sensitive HSDH isoenzymes. The addition of lysine and its analogue, AEC, caused a strong inhibition of DHPS activity. This result suggests an important role of DHPS on lysine biosynthesis. Nitrate reductase (NR, EC 1.6.6.1) activity was determined in roots and leaves. The predominant site of nitrate reduction was shown to be the leaves. Soluble amino acids composition was also determined in leaves, roots and seeds. Soluble glutamate was predominant in leaves while glutamine was predominant in roots. High concentrations of soluble lysine and threonine were observed in seeds. The results indicate that the high concentration of lysine observed in quinoa seeds is due to both, increased soluble lysine content and protein lysine accounting for 1.72% and 4.26% of the total amino acids pool, respectively.

Keywords: Aspartate kinase; Dihydrodipicolinate synthase; Homoserine dehydrogenase; Lysine; Nitrate reductase.

4.1 Introdução

A espécie *Chenopodium quinoa* pertence ao grupo vegetal conhecido como pseudocereal, gênero *Chenopodium*, família *Chenopodiaceae* (BONIFACIO, 2003), cultivada principalmente na região dos Andes. A espécie quinoa tem sido descrita como uma importante fonte de proteínas para a alimentação humana devido à alta digestibilidade e a composição balanceada de aminoácidos (RUALES; NAIR, 1992). As análises da composição nutricional têm mostrado valores de proteínas nas sementes variando entre 7,47 a 22,08%, apresentando em média 13,80% (BHARGAVA; SHUKLA; OHRI, 2006), sendo a composição balanceada de aminoácidos presente nas proteínas de reserva comparáveis às descritas para caseína (REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003). Além disso, nas sementes estão presentes importantes quantidades de óleo, vitaminas, minerais como cálcio e magnésio e carboidratos (REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003). Entretanto, a presença de saponinas tem sido descrita como um fator negativo afetando o consumo de quinoa (SOUZA; SPEHAR; SANTOS, 2004).

Normalmente, o nitrato é a principal fonte de nitrogênio disponível para os vegetais (LEA; AZEVEDO, 2006) e a deficiência de nitrogênio tem sido descrita como um dos mais importantes fatores limitantes da produtividade na agricultura mundial caracterizada pelo baixo uso de tecnologia e fertilizantes (MEDICI et al., 2004). O nitrogênio é um importante componente de aminoácidos, ácidos nucleicos, coenzimas e outros metabólitos. Os aminoácidos são os principais constituintes de proteínas sendo importantes em diferentes processos celulares e para o crescimento e desenvolvimento das plantas (FERREIRA et al., 2005; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Inicialmente o nitrato absorvido pelas raízes é reduzido a nitrito em uma reação catalisada pela enzima NR. Posteriormente, o nitrito é reduzido a amônio pela ação da enzima nitrito redutase (NiR, EC 1.7.7.1), que é convertido em aminoácidos pela ação das enzimas glutamina sintetase – glutamato sintase (GS - GOGAT; EC 6.3.1.2 e EC 1.4.7.1, respectivamente) (ANDREWS et al., 2004). A NR é uma enzima complexa composta de duas subunidades (AHMAD; ABDIN, 1999) e sua ação é regulada por substratos (nitrato) e produtos finais sintetizados em diferentes vias metabólicas como os aminoácidos (CAMARGOS; AGUIAR; AZEVEDO, 2006). A maioria dos vegetais é capaz de reduzir nitrato principalmente nas raízes

(CASTLE; ROWARTH, 2003) e nas folhas (PAJUELO et al., 2002; CASTLE; ROWARTH, 2003).

Os aminoácidos são sintetizados em complexas vias metabólicas controladas por enzimas, substratos e produtos finais. Os aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina são sintetizados na via metabólica do ácido aspártico (AZEVEDO et al., 1997). A aspartato quinase (AK), a homoserina desidrogenase (HSDH) e a dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) são consideradas enzimas chave na síntese de lisina, enquanto que a lisina cetoglutarato redutase (LKR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são importantes no catabolismo (AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; FORNAZIER et al., 2005; POMPEU et al., 2006).

A primeira reação enzimática da via do ácido aspártico é catalisada pela enzima AK que tem sido isolada, purificada e caracterizada bioquimicamente em várias espécies (FERREIRA et al., 2005) e pelo menos duas isoenzimas da AK estão normalmente presentes em vegetais, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A isoenzima sensível à inibição por lisina está presente em um polipetídeo monofuncional sendo responsável pela maior parte da atividade total da AK (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006) e a isoenzima sensível à inibição por treonina está presente em um polipeptídeo bifuncional contendo os domínios da AK e da HSDH (ROGNES; BRIGHT; MIFLIN, 1983). A existência da isoenzima bifuncional da AK-HSDH sensível à inibição por treonina tem sido confirmada pela clonagem e pela análise de genes que codificam para a enzima em várias espécies vegetais (GHISLAIN et al., 1994). A HSDH é a primeira enzima do ramo que conduz à síntese de treonina e metionina e compartilha com a DHDPS o mesmo substrato, β -aspartato semialdeído. Duas isoenzimas, uma sensível e a outra resistente à inibição por treonina têm sido descritas em vegetais (FERREIRA et al., 2005). No ramo que conduz à síntese de lisina, a enzima DHDPS catalisa a condensação de piruvato e β -aspartato semialdeído para produzir 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato. Diferentemente das enzimas AK e HSDH, somente uma isoenzima altamente sensível à inibição por lisina tem sido observada em vegetais (AZEVEDO; LEA, 2001). A DHDPS tem sido purificada, caracterizada em várias espécies e sua estrutura foi demonstrada em *Nicotiana sylvestis* (BLICKLING et al., 1997).

Embora, recentemente diversos trabalhos têm demonstrado importantes resultados sobre quinoa e considerando-se que se trata de uma espécie com grande potencial para o consumo

humano apresentando importantes características nutricionais (COMAI et al., 2007), as regulações envolvidas no metabolismo de lisina são totalmente desconhecidas para esta espécie. Neste estudo foi reportado o isolamento e alguns padrões regulatórios envolvendo enzimas da síntese de lisina em sementes de quinoa durante o desenvolvimento. Outros aspectos relacionados com a assimilação de nitrogênio e perfis de aminoácidos também foram estudados.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

As sementes de *Chenopodium quinoa* BRS Piabiru foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Carlos Roberto Spehar do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil. As plantas de quinoa foram cultivadas em casa de vegetação na ESALQ-USP, Brasil, sob condições naturais de iluminação, com temperatura variando entre 25°C e 32°C. Os experimentos foram elaborados segundo o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições com 3 potes por parcela. No primeiro experimento, para a análise do metabolismo de nitrogênio, as plantas foram cultivadas em potes de 1,2 L com duas plantas por pote contendo areia. Um volume de 0,5 L de solução nutritiva de Hoagland, contendo 15 mM de nitrato, foi aplicado a cada 2 dias, as plantas foram coletadas durante o desenvolvimento vegetativo aos 20, 28 e 36 dias após a germinação (estágio 1, 2 e 3). No segundo experimento, para o estudo das enzimas envolvidas na síntese de lisina, duas plantas foram cultivadas em potes contendo substrato e as sementes foram colhidas durante o desenvolvimento aos 16, 20 e 24 dias após a antese (DAA), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas em freezer à -80°C.

4.2.2 Extração e purificação parcial das Enzimas AK, HSDH e DHDPS

Para a extração das enzimas AK e HSDH todos os procedimentos foram conduzidos à 4°C. As sementes imaturas foram utilizadas para extração enzimática em 5 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 200 mM de cloreto de potássio (KCl); 0,1 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF); 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM

ditiotreitól (DTT); 2 mM de L-lisina; 2 mM de L-treonina; 10% (v/v) glicerol e 5% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 30 min para remover restos celulares. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e, a seguir, o extrato foi colocado sob agitação por 30 min. Após agitação a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 30 min e o sobrenadante foi submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 12.000 g e o pelete foi dissolvido em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de DTT; 0,1 mM de L-lisina; 0,1 mM de L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. A amostra foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da AK e HSDH.

Para a extração da enzima DHDPS todos os procedimentos foram conduzidos à 4°C. As sementes imaturas foram utilizadas para extração enzimática em 5 volumes de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de PMSF; 2 mM de EDTA; 1,4% (p/v) de ácido ascórbico e 5% (p/v) de PVPP. Após maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 30 min para remover restos celulares. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e o extrato foi colocado sob agitação por 30 min. Após agitação a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 30 min e o sobrenadante foi submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 12.000 g e o pelete foi dissolvido em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de EDTA e 1,4 % (p/v) de ácido ascórbico. A amostra foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da DHDPS.

4.2.3 Análises das enzimas AK, HSDH e DHDPS

O ensaio da atividade da AK foi realizado em um volume final de 500 µL como descrito por Azevedo et al. (2003), contendo 100 µL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de DTT; 20% (v/v) de glicerol; 100 µL de ácido aspártico 500 mM; 50 µL de sulfato de magnésio 125 mM; 50 µL de adenosina trifosfato (ATP) 200 mM; 50 µL de hidroxilamina 4 M; 100 µL de água e 50 µL de amostra. O ensaio foi iniciado pela adição de 50 µL de ATP e incubado à 35°C por 30 min. Após a incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de 500 µL de solução de cloreto férrico [670 mM FeCl₃ e 20% (p/v) ácido tricloroacético]. Após

centrifugação por 12.000 g por 10 min, a absorbância foi determinada a 505 nm. Controles contendo 1 e 5 mM de L-lisina, L-treonina e L-lisina + L-treonina foram incluídos em diferentes ensaios para determinar a atividade da AK e para identificar as isoenzimas sensíveis à inibição por lisina e treonina. Os efeitos de 1 e 5 mM de L-metionina e AEC sobre a atividade da AK também foram investigados. A atividade da AK foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da enzima HSDH foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm em um volume final de 1 mL como descrito previamente por Azevedo et al. (2003), contendo 700 μL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) contendo 150 mM de KCl e 1 mM DTT; 0,5 mM de EDTA; 100 μL de DL-homoserina 200 mM; 100 μL de NADPH 4,8 mM e 100 μL de extrato. A atividade da HSDH foi determinada na presença de 1 e 5 mM de L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina, L-metionina e AEC. A atividade da HSDH foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da enzima DHDPs foi determinada em um volume final de 250 μL como descrito por Wallsgrove e Mazelis (1980) com modificações de acordo com os resultados obtidos. O ensaio continha 25 μL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); 25 μL de piruvato 100 mM; 25 μL de β -aspartato semialdeído 10 mM (neutralizado com NaOH imediatamente antes do ensaio); 125 μL de extrato e água. O ensaio foi incubado à 35°C por 1 h. Após incubação o ensaio foi interrompido pela adição de 1 mL de tampão de parada (0,22 M ácido cítrico; 0,55 M de fosfato de sódio e 0,25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ *o*-aminobenzaldeído). O ensaio foi incubado à 35°C por 1 h. Após centrifugação a 12.000 g por 10 min, a absorbância foi determinada a 520 nm. A atividade da enzima DHDPs foi determinada na presença de 1 e 5 mM de L-lisina, L-treonina, L-lisina + L-treonina, L-metionina e AEC. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que produz uma alteração em A_{520} de 0,001 $\cdot \text{min}^{-1}$.

Foram utilizadas triplicatas para cada ensaio enzimático.

4.2.4 Determinação da atividade da NR

A determinação da atividade da NR foi conduzida como previamente descrito por Radin (1973). Discos de folha e raízes frescos foram previamente infiltrados e incubados no escuro à 30°C por 1 h em uma solução contendo nitrato. A absorbância foi determinada a 540 nm.

4.2.5 Extração de compostos nitrogenados

O conteúdo de nitrogênio não protéico de folhas e raízes frescas e de sementes foi extraído em 10 volumes em uma solução contendo metanol/clorofórmio/água (MCW) em uma proporção de (6/2,5/1,5; v/v/v). Para a extração de aminoácidos incorporados em proteínas nas sementes, ao precipitado obtido na fase anterior foi adicionado 10 volumes de NaOH 0,1 M e a mistura foi homogeneizada. Após centrifugação a 4.000 g por 40 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. 4 mL de HCl 6 N foi adicionado à solução contendo 10 mg de proteínas. A solução foi incubada à 105°C por 22 h.

4.2.6 Determinação da concentração de nitrato, alantoato e alantoína

A concentração de nitrato foi determinada de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975), em um ensaio contendo 100 µL de amostra e 400 µL de ácido salicílico (5%). O ensaio foi incubado à temperatura ambiente por 20 min e 9,5 mL de NaOH foram adicionados a mistura. A absorbância foi determinada a 410 nm. O conteúdo de aminoácidos solúveis foi determinado pelo ensaio de ninidrina conforme descrito por Azevedo et al. (2003) e alantoato e alantoína foram determinados pelo método de Vogels e Vanderdr (1970). Foram utilizadas triplicatas para cada ensaio.

4.2.7 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.2.8 Análise de aminoácidos

Para quantificação de aminoácidos, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) por derivatização utilizando-se *o*-phthalaldehyde (OPA) como descrito por Azevedo et al. (2003).

4.3 Resultados

4.3.1 Atividades da AK, HSDH e DHDPS durante o desenvolvimento das sementes em quinoa

As atividades das enzimas AK, HSDH e DHDPS foram inicialmente determinadas durante o desenvolvimento das sementes que foi dividido em três estágios (16, 20 e 24 DAA). (Tabela 4.1). A determinação da atividade das enzimas indicou níveis bastante similares durante os estágios analisados (Tabela 4.1) indicando que qualquer um dos estágios poderia ser utilizado para estudo de algumas propriedades regulatórias das enzimas.

Tabela 4.1 - Atividade específica das enzimas AK, HSDH ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e DHDPS ($\text{unidades} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) isoladas de sementes de *C. quinoa*, em três estágios de desenvolvimento

Enzima	Estágio de desenvolvimento da semente		
	16 DAA	20 DAA	24 DAA
AK	$9,57 \pm 0,53$	$9,51 \pm 0,15$	$9,66 \pm 0,41$
HSDH	$4,63 \pm 0,09$	$4,44 \pm 0,15$	$4,55 \pm 0,26$
DHDPS	$6,80 \pm 0,36$	$7,72 \pm 0,20$	$7,28 \pm 0,20$

4.3.2 Efeitos de aminoácidos e AEC sobre as atividades da AK, HSDH e DHDPS

A atividade da AK, HSDH e DHDPS foram analisadas na presença de distintos efetores. A adição de lisina causou inibição da atividade da AK a 1 mM (19,5%) e a 5mM (23,8%), respectivamente (Figura 4.1). A adição de treonina também causou um efeito inibitório sobre a atividade da AK a 1 mM (45,2%) e a 5 mM (49,5%), enquanto que a combinação dos dois aminoácidos causou uma inibição a 1 mM (37,6%) e a 5 mM (47,6%), respectivamente (Figura 4.1). O aminoácido metionina e o AEC não produziram nenhuma alteração na atividade da AK nas duas concentrações testadas (Figura 4.1). Os aminoácidos lisina e metionina e o AEC não afetaram a atividade da HSDH, enquanto que a adição de treonina causou um efeito inibitório sobre a atividade da HSDH a 1 mM (46,9%) e a 5 mM (63,9%) (Figura 4.2), que não foi alterado quando adicionado em combinação com lisina. A adição de lisina provocou uma forte inibição na atividade da DHDPS a 1 mM (65,3%) e a 5 mM (69,9%), enquanto que AEC causou uma

inibição na atividade enzimática de 28,7% e 60,1% a 1 mM e 5 mM, respectivamente (Figura 4.3). Os aminoácidos treonina e metionina não afetaram a atividade da DHDPS (Figura 4.3).

Figura 4.1 - Efeito da adição dos aminoácidos (K, lisina; T, treonina; M, metionina) e aminoetil L-cisteína (AEC) nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre a atividade da enzima AK

Figura 4.2 - Efeito da adição dos aminoácidos (K, lisina; T, treonina; M, metionina) e aminoetil L-cisteína (AEC) nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre a atividade da enzima HSDH

Figura 4.3 - Efeito da adição dos aminoácidos (K, lisina; T, treonina; M, metionina) e aminoetil L-cisteína (AEC) nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre a atividade da enzima DHDPS

4.3.3 Atividade da NR, concentração de nitrato e ureídeos

A atividade da NR e a concentração de nitrato e ureídeos foram determinadas em três estágios durante o início do desenvolvimento vegetativo. A atividade da NR nas folhas foi maior do que nas raízes nos três estágios analisados (Figura 4.4A). Em raízes houve uma redução da atividade durante o desenvolvimento, enquanto que para folhas foi observada uma redução somente no estágio 3 (Figura 4.4A). A concentração de nitrato aumentou durante o desenvolvimento (Figura 4.4B). A presença de ureídeos foi detectada em folhas e raízes de quinoa nos três estágios (Figura 4.5). A maior concentração de alantoato foi observada no estágio 3 nos dois tecidos (Figura 4.5A), enquanto que a concentração de alantoína permaneceu constante durante todos os estágios analisados (Figura 4.5B).

Figura 4.4 - Variação na atividade da enzima NR (A) e na concentração de nitrato (B) em folhas e raízes de *Chenopodium quinoa* avaliados em três estágios durante o desenvolvimento vegetativo

Figura 4.5 - Variação na concentração de alantóato (A) e na concentração de alantoína (B) em folhas e raízes de *Chenopodium quinoa* avaliados em três estágios durante o desenvolvimento vegetativo

4.3.4 Composição de aminoácidos

A concentração de aminoácidos solúveis foi analisada em folhas, raízes e sementes. A concentração de aminoácidos solúveis totais permaneceu inalterada durante o desenvolvimento sendo observada uma maior concentração em folhas quando comparada com raízes (Figura 4.6). A análise do perfil de aminoácidos revelou que em folhas o glutamato foi o principal aminoácido correspondendo a 35,66% do total de aminoácidos solúveis, enquanto que em raízes a glutamina foi predominante representando 28,13% do total de aminoácidos solúveis. Em sementes, o glutamato também foi o principal aminoácido solúvel correspondendo a 21,46%, enquanto que os aminoácidos derivados da via do ácido aspártico lisina, treonina e metionina apresentaram concentrações de 1,72%; 5,09% e 4,89%, respectivamente (Tabela 4.2). Quando a composição de aminoácidos incorporados em proteínas foi analisada, glutamato + glutamina foram predominantes correspondendo a 20,86% do total de aminoácidos protéicos, enquanto que a lisina representou 4,26% do total de aminoácidos protéicos (Tabela 4.3).

Figura 4.6 - Variação na concentração de aminoácido total em folhas e raízes de *Chenopodium quinoa* avaliados em três estágios durante o desenvolvimento vegetativo

Tabela 4.2 – Composição de aminoácidos solúveis (mol% $\pm$ desvio padrão) em folhas, raízes e sementes de *Chenopodium quinoa*. N.D. (não detectado)

Aminoácido	Folhas	Raízes	Sementes
Aspartato	17,61 $\pm$ 1,89	9,69 $\pm$ 0,43	6,71 $\pm$ 0,85
Glutamato	35,66 $\pm$ 2,09	18,81 $\pm$ 0,36	21,46 $\pm$ 1,80
Asparagina	1,20 $\pm$ 0,21	4,09 $\pm$ 0,62	2,36 $\pm$ 0,32
Serina	7,70 $\pm$ 0,69	5,02 $\pm$ 0,58	3,21 $\pm$ 0,48
Glutamina	9,39 $\pm$ 0,01	28,13 $\pm$ 0,67	4,30 $\pm$ 0,34
Histina	3,81 $\pm$ 0,04	5,06 $\pm$ 0,53	6,28 $\pm$ 1,17
Glicina	N.D.	N.D.	N.D.
Treonina	5,78 $\pm$ 1,69	5,21 $\pm$ 0,33	5,09 $\pm$ 0,97
Arginina	3,92 $\pm$ 0,20	0,78 $\pm$ 0,06	9,92 $\pm$ 0,26
Alanina	6,90 $\pm$ 0,21	4,54 $\pm$ 0,11	17,54 $\pm$ 0,71
Tirosina	1,85 $\pm$ 0,72	7,65 $\pm$ 0,22	4,15 $\pm$ 1,58
Metionina	1,47 $\pm$ 0,26	2,03 $\pm$ 0,16	4,89 $\pm$ 0,39
Valina	1,06 $\pm$ 0,06	3,10 $\pm$ 0,26	5,31 $\pm$ 0,58
Fenilalanina	0,67 $\pm$ 0,25	0,33 $\pm$ 0,11	1,37 $\pm$ 0,23
Isoleucina	1,01 $\pm$ 0,03	2,62 $\pm$ 0,32	3,14 $\pm$ 0,28
Leucina	0,79 $\pm$ 0,07	1,78 $\pm$ 0,26	2,54 $\pm$ 0,28
Lisina	1,19 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,08	1,72 $\pm$ 0,16

Tabela 4.3 - Composição de aminoácidos incorporados em proteínas (mol% $\pm$ desvio padrão) em sementes de *Chenopodium quinoa*

Aminoácidos	Sementes
Aspartato + Asparagina	10,04 $\pm$ 0,36
Glutamato + Glutamina	20,86 $\pm$ 0,86
Serina	7,90 $\pm$ 0,09
Histidina	8,06 $\pm$ 1,58
Treonina + glicina	14,99 $\pm$ 0,42
Arginina	8,66 $\pm$ 0,22
Alanina	7,59 $\pm$ 0,23
Tirosina	2,33 $\pm$ 0,15
Metionina	0,39 $\pm$ 0,04
Valina	3,51 $\pm$ 0,33
Fenilalanina	2,69 $\pm$ 0,23
Isoleucina	3,62 $\pm$ 0,36
Leucina	5,09 $\pm$ 0,22
Lisina	4,26 $\pm$ 0,87

4.4 Discussão

As enzimas chave que controlam a síntese de aminoácidos da via metabólica do ácido aspártico têm sido purificadas e algumas de suas propriedades regulatórias têm sido caracterizadas (AARNES, 1977; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), contudo, em quinoa, uma espécie vegetal que têm sido descrita como uma importante fonte nutricional para humanos exibindo em média 13,8% de proteínas em grãos (BHARGAVA; SHUKLA; OHRI, 2006), esta via metabólica ainda não foi estudada. Neste trabalho três enzimas chave na síntese de lisina, treonina e metionina foram isoladas e suas atividades foram analisadas. Este estudo também apresenta aspectos importantes para a compreensão da síntese e o acúmulo de aminoácidos solúveis e incorporados em proteínas.

Com o objetivo de se detectar a atividade de enzimas envolvidas na síntese de lisina, sementes imaturas colhidas em três estágios de desenvolvimento (16, 20 e 24 DAA) foram analisadas. Os três estágios analisados exibiram níveis similares de atividades da AK, HSDH e

DHDPS, indicando que qualquer um dos estágios poderia ser utilizado para o estudo de algumas propriedades regulatórias. Recentemente, resultados similares foram observados para as enzimas AK e HSDH em sementes de sorgo (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006), enquanto que em coix as maiores atividades para todas as enzimas da via metabólica do ácido aspártico foram observadas no estágio 2 (LUGLI et al., 2002). Em milho, as enzimas AK e HSDH exibiram um pico de atividade aos 16 DAP, reduzindo a níveis próximo a zero aos 28 DAP (GAZIOLA et al., 1999), que seguiram os mesmos padrões de síntese e acúmulo das proteínas de reserva.

As atividades da AK, HSDH e DHDPS foram parcialmente purificadas utilizando-se sulfato de amônio sendo posteriormente analisadas na presença de lisina e treonina separadamente e em combinação. Desde que os dois aminoácidos inibiram parcialmente a atividade da enzima AK, os resultados sugerem a presença de pelo menos duas diferentes isoenzimas, uma sensível à inibição por lisina e a outra sensível à treonina, nas sementes de quinoa como tem sido descrito em outras espécies estudadas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Além disso, quando os dois aminoácidos foram adicionados juntos, nenhuma alteração como efeitos aditivos ou sinérgicos foi observada. Os aminoácidos lisina e treonina têm sido relatados inibindo a atividade da AK em diferentes espécies (AZEVEDO et al., 1997) e duas isoenzimas distintas, uma sensível à inibição por lisina e a outra por treonina, têm sido identificadas, embora o número de isoenzimas possa variar entre as espécies vegetais (AZEVEDO et al., 1997). Os resultados também mostraram, claramente, que a adição de treonina induziu uma maior inibição da atividade da AK do que lisina, sugerindo que a isoenzima da AK sensível à inibição por treonina é predominante em sementes de quinoa como relatado em sementes imaturas de coix (LUGLI et al., 2002) e parece estar relacionada com o fluxo de carbonos através da via do ácido aspártico sendo direcionado principalmente para a síntese de lisina. Para a HSDH, somente foi observado um efeito inibitório induzido por treonina, enquanto que todos os outros compostos não afetaram a atividade da enzima. Embora a adição de treonina tenha sido efetiva em causar inibição a 1 mM, a atividade da HSDH não pode ser completamente inibida por este aminoácido mesmo a 5 mM. Este resultado sugere que duas isoenzimas da HSDH também estão presentes em quinoa, uma sensível e a outra resistente à inibição por treonina como tem sido observado em outras espécies estudadas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Este resultado pôde ser confirmado quando treonina e lisina foram adicionadas juntas ao

ensaio e nenhuma alteração no padrão de inibição foi observada. Interessantemente, a inibição de 46% e 63% causada por 1 mM e 5 mM de treonina, respectivamente, indica que a isoenzima sensível à inibição por treonina realmente é predominante em sementes de quinoa. Os resultados também sugerem que o polipeptídeo bifuncional da AK-HSDH sensível à inibição por treonina identificado em outras espécies provavelmente também existe e é predominante em sementes de quinoa. Além disso, os resultados que demonstraram aumentos no efeito inibitório da atividade da HSDH a altas concentrações de treonina utilizadas são importantes porque que a HSDH e a DHDPS compartilham o mesmo substrato, β -aspartato semialdeído, e aumentos na concentração celular levando ao acúmulo de treonina podem alterar o fluxo de carbono através da via causado por uma forte inibição da atividade da HSDH, conduzindo para o ramo da via responsável pela síntese de lisina, que é principalmente regulado pela enzima DHDPS.

A atividade da DHDPS foi inibida por lisina, mesmo em baixas concentrações, sugerindo a existência de uma única isoenzima que é fortemente inibida por este aminoácido. Este resultado também pôde ser comprovado pela inibição observada quando AEC foi testado. Estes resultados confirmam que lisina exerce uma retro-inibição sobre a atividade da DHDPS controlando sua própria síntese como previamente descrito em diferentes espécies (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A importância da DHDPS como uma enzima regulatória na síntese de lisina tem sido confirmada em vários estudos utilizando-se mutantes bioquímicos e plantas transgênicas. Utilizando-se a estratégia de se alterar enzimas chave da via metabólica do ácido aspártico, mutantes bioquímicos foram obtidos em milho (DOTSON et al., 1990) e em *A. thaliana* (HEREMANS; JACOBS, 1994). Em tabaco, um mutante expressando uma isoenzima da AK sensível à lisina menos sensível à retro-inibição por este aminoácido mostrou aumento no acúmulo de treonina (FRANKARD et al., 1991). Também em tabaco, outro mutante contendo uma DHDPS insensível a retro-inibição por lisina foi obtido e as análises mostraram um aumento na concentração de lisina solúvel somente em folhas (NEGRUTIU et al., 1984). Contudo, um duplo mutante de tabaco contendo as duas enzimas insensíveis à inibição por lisina exibiu alto acúmulo de lisina em folhas quando comparado com os mutantes simples (FRANKARD; GHISLAIN; JACOBS, 1992). Estratégias similares também foram utilizadas com plantas transgênicas e apresentaram resultados bastante semelhantes aos observados com os mutantes bioquímicos (SHAUL; GALILI, 1992b; SHAUL; GALILI, 1992a). Estes resultados indicaram que a enzima DHDPS deve ter sua sensibilidade alterada para que ocorra o acúmulo de lisina.

A presença de AEC tem sido descrita afetando as atividades da AK (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006) e da DHDPS (FRISCH et al., 1991) e também substituindo lisina em proteínas e como substrato para LKR (AZEVEDO et al., 1997). A adição de AEC ao ensaio não afetou as atividades da AK ou HSDH, mas foi capaz de inibir a atividade da DHDPS, mas não na mesma proporção que a causada por lisina. Entretanto, é importante ressaltar, que alguns trabalhos demonstraram que em algumas espécies, o AEC não produziu nenhum efeito como inibidor ou não foi eficiente substituindo lisina como substrato para LKR (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992).

O efeito da metionina sobre a atividade da AK e HSDH tem sido descrito previamente em outras espécies vegetais (LUGLI; GAZIOLA; AZEVEDO, 2000; FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006) e, embora, em sementes de sorgo a metionina provocou uma redução na atividade da AK (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006) em quinoa nenhum efeito foi observado sobre nenhuma das enzimas testadas.

Embora alguns aminoácidos exerçam uma importante função na regulação da via metabólica do ácido aspártico pela inibição da atividade das enzimas AK, HSDH e DHDPS, este mecanismo ainda não é bem compreendido em plantas (GALILI; HOFGEN, 2002). A sensibilidade destas enzimas à inibição por lisina ou treonina é determinada por domínios nos quais aparentemente estes aminoácidos se ligam (GALILI; HOFGEN, 2002). Contudo, algumas evidências obtidas de microrganismos sugerem que este processo possa ocorrer não somente pela simples interação entre enzima e aminoácido, mas possa requerer a assistência de chaperonas moleculares (GALILI; HOFGEN, 2002).

O sítio predominante de atividade da NR tem sido descrito em folhas (MACK; SCHJOERRING, 2002; SCHEURWATER et al., 2002; CAMARGOS; AGUIAR; AZEVEDO, 2006) ou raízes (PAJUELO et al., 2002), dependendo da espécie e da disponibilidade de nitrato (DRUART et al., 2000). De acordo com a atividade da NR, o principal sítio de redução de nitrato em quinoa ocorre nas folhas, o que pode ser uma vantagem para esta espécie em utilizar diretamente os produtos da fotossíntese, desde que os metabolismos de carbono e nitrogênio compartilham alguns produtos. A NR é regulada por diversos fatores e o nitrato tem sido descrito como um sinal primário para o controle desta enzima (CHEN et al., 2004). Desde que foi observado um aumento na concentração de nitrato e não foi observada uma indução na atividade da NR em quinoa, é possível sugerir que somente certas concentrações de nitrato podem ser

responsáveis por induções na atividade da NR e aumentos acima desta concentração podem não causar nenhum efeito sobre a atividade da enzima. De fato, Chen et al. (2004) reportaram que altas concentrações de nitrato não causaram nenhuma indução na atividade da NR e que em alguns casos foram observadas até mesmo reduções. Alguns trabalhos têm descrito que a atividade da NR pode ser afetada por aumentos na concentração de aminoácidos como asparagina e glutamina, ou estes aminoácidos podem afetar a absorção de nitrato causando um efeito indireto sobre a atividade da NR (SIVASANKAR; ROTHSTEIN; OAKS, 1997; SHANKAR; SRIVASTAVA, 1998; ASLAM; TRAVIS; RAINS, 2001). Durante os estágios de desenvolvimento vegetativo a atividade da NR decresceu. Desde que tem sido reportado que a glutamina em concentrações aproximadamente fisiológicas pode inibir a atividade da NR em milho (SIVASANKAR; ROTHSTEIN; OAKS, 1997), é possível sugerir que este aminoácido pode ser um fator responsável pela redução observada na atividade da NR em folhas e raízes de quinoa. O efeito de aminoácidos na atividade da NR também foi sugerido em *C. ensiformis*, na qual o sítio principal de redução de nitrato ocorreu predominantemente em folhas durante o desenvolvimento vegetativo e em raízes durante o florescimento, sendo que esta redução da atividade da NR nas folhas foi correlacionada com o aumento do conteúdo de glutamina (CAMARGOS; AGUIAR; AZEVEDO, 2006). Em conjunto, os resultados de atividade da NR, concentrações de nitrato e de aminoácidos solúveis indicam que as plantas foram cultivadas sem qualquer deficiência de nitrogênio, da mesma forma como indicado por Chen et al. (2004). Como a enzima NR representa uma etapa inicial no controle da assimilação de nitrogênio, esses resultados sugerem que houve nitrogênio suficiente para o metabolismo geral e também para o de aminoácidos.

Os resultados também mostraram a presença de importantes concentrações de alantoato e alantoína em raízes e folhas de quinoa. Ureídeos têm sido estudados principalmente em espécies leguminosas e são produzidos pelo catabolismo das purinas durante o processo de fixação de nitrogênio e são importantes como transportadores de nitrogênio para a parte aérea da planta (TODD; POLACCO, 2006). Entretanto, existem poucos estudos em que a presença de ureídeos tem sido observada em plantas não leguminosas. Ureídeos são intermediários no processo de catabolismo das purinas, entretanto, eles podem não acumular ou acumular em não leguminosas abaixo do nível de detecção. Sendo assim, quinoa é uma espécie que acumula significativas

concentrações de ureídeos, exibindo potencial para estudos envolvendo estes compostos em espécies não leguminosas.

Em quinoa, a análise do perfil de aminoácidos solúveis sugere uma importante função do aminoácido glutamina como transportador de nitrogênio para diversas partes da planta conforme observado em outras espécies (TODD; POLACCO, 2006). Em sementes, o glutamato foi o aminoácido solúvel predominante e importantes concentrações de lisina, treonina, metionina e isoleucina solúveis também foram observadas. No caso do aminoácido lisina, os resultados podem indicar uma possível redução das atividades das enzimas LKR e SDH causando uma redução no catabolismo de lisina como tem sido observado em outras espécies (ARRUDA et al., 2000; AZEVEDO et al., 2003; GAZIOLA et al., 1997; LIMA et al., 2003; STEPANSKY et al., 2006). Quando os aminoácidos incorporados em proteínas foram analisados em sementes, glutamato + glutamina foram os aminoácidos predominantes. Em quinoa, também foi encontrada alta concentração de lisina incorporada em proteínas, confirmando resultados anteriores descritos por Ruales e Nair (1992), que observaram altas concentrações de ácido aspártico, lisina e treonina nas sementes. Esta alta concentração do aminoácido lisina incorporado em proteínas é esperada desde que foram observadas importantes quantidades de lisina solúvel em sementes e, além disso, as frações protéicas albuminas e globulinas são predominantes em quinoa, enquanto que as prolaminas, a fração de proteínas de reserva deficiente em lisina, são encontradas em quantidades insignificantes em sementes (BHARGAVA; SHUKLA; OHRI, 2006). Estes resultados não seguem o padrão de distribuição de proteínas de reserva observado em alguns cereais como milho em que a fração prolamina representa 55-70% do total das proteínas de reserva em sementes (LANDRY et al., 2005).

Quinoa é uma espécie que tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa porque se apresenta como uma importante fonte de proteínas para a alimentação humana devido a alta digestibilidade e a composição balanceada de aminoácidos solúveis e presentes nas proteínas de reserva. Neste trabalho, o predomínio da isoenzima da AK sensível à inibição por treonina e a alta inibição causada na atividade da HSDH pela adição deste aminoácido podem ser importantes características em quinoa, desde que o acúmulo de treonina pode mudar o fluxo de carbono através da via metabólica do ácido aspártico pela inibição da atividade da HSDH, direcionando para a síntese de lisina e, conseqüentemente, aumentando a concentração disponível deste aminoácido para ser incorporado nas proteínas de reserva, principalmente nas frações albuminas

e globulinas. Este fato pode explicar a importante quantidade de lisina encontrada nesta espécie. Entretanto, a caracterização em sementes de quinoa das enzimas LKR e SDH, que estão envolvidas no catabolismo de lisina, seria importante para a compreensão de alguns aspectos regulatórios envolvidos na via de degradação deste aminoácido em quinoa.

Referências

- AARNES, H. Lysine-sensitive aspartate kinase and two molecular forms of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. **Plant Science Letters**, Dordrecht, v. 9, p. 137-145, 1977.
- AHMAD, A.; ABDIN, M.Z. NADH:nitrate reductase and NAD(P)H:nitrate reductase activities in mustard seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 143, p. 1-8, 1999.
- ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 145, p. 25-40, 2004.
- ARRUDA, P.; KEMPER, E.L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 324-330, 2000.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; RAINS, D.W. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. **Plant Science**, Clare, v. 160, p. 219-228, 2001.
- 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, p. 395-419, 1997.
- AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by *opaque* and *floury* mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 4898-4908, 2003.
- AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LEA, P.J.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; VARISI, V.A.; GRATÃO, P.L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 339-348, 2004a.
- AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 143-162, 2006.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, p. 261-279, 2001.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; VARISI, V.A.; GAZIOLA, S.A.; GRATÃO, P.L.; TORO, A.A. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the *opaque-5* and *opaque-7* maize mutations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 4865-4871, 2004b.

BHARGAVA, A.; SHUKLA, S.; OHRI, D. *Chenopodium quinoa*: An Indian perspective. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 23, p. 73-87, 2006.

BLICKLING, S.; BEISEL, H.G.; BOZIC, D.; KNABLEIN, J.; LABER, B.; HUBER, R. Structure of dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* reveals novel quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 274, p. 608-621, 1997.

BONIFACIO, A. *Chenopodium sp.*: Genetic resources, ethnobotany and geographic distribution. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, p. 1-7, 2003.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

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**, Rockville, v. 98, p. 1139-1147, 1992.

CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; AZEVEDO, R.A. Site of nitrate reduction in Jack bean (*Canavalia ensiformis*) changes from leaf to root during development. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 34, p. 131-137, 2006.

CASTLE, M.L.; ROWARTH, J.S. *In vivo* nitrate reductase activity in ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*): differences due to nitrogen supply, development, and plant part. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 46, p. 31-36, 2003.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHEN, B.M.; WANG, Z.H.; LI, S.X.; WANG, G.X.; SONG, H.X.; XI-NA, W. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. **Plant Science**, Clare, v. 167, p. 635-643, 2004.

COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C.V.L.; ALLEGRI, G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, p. 1350-1355, 2007.

DOTSON, S.B.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Lysine-insensitive aspartate kinase in two threonine-overproducing mutants of maize. **Planta**, New York, v. 182, p. 546-552, 1990.

DRUART, N.; GOUPIL, P.; DEWAELE, E.; BOUTIN, J.P.; RAMBOUR, S. Nitrate assimilation in chiry roots (*Cichorium intibus* L.) which acquire radial growth, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 539-546, 2000.

FERREIRA, R.R.; MEINHARDT, L.W.; AZEVEDO, R.A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: Characterisation of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 77-86, 2006.

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, p. 985-994, 2005.

FORNAZIER, R.F.; GAZIOLA, S.A.; HELM, C.V.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Isolation and characterization of enzymes involved in lysine catabolism from sorghum seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1791-1798, 2005.

FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana Sylvestris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1285-1293, 1992.

FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; NEGRUTIU, I.; JACOBS, M. High threonine producer mutant of *Nicotiana Sylvestris* (Spegg and Comes). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 82, p. 273-282, 1991.

FRISCH, D.A.; GENGENBACH, B.G.; TOMMEY, A.M.; SELLNER, J.M.; SOMERS, D.A.; MYERS, D.E. Isolation and characterization of dihydrodipicolinate synthase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 444-452, 1991.

GALILI, G.; HOFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic Engineering**, San Diego, v. 4, 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 lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, 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**, Oxford, v. 247, p. 364-371, 1997.

GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; VANDENBOSSCHE, D.; MATTHEWS, B.F.; JACOBS, M. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, p. 835-851, 1994.

HEREMANS, B.; JACOBS, M. Selection of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh mutants resistant to aspartate derived amino acids and analogs. **Plant Science**, Clare, v. 101, p. 151-162, 1994.

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, p. 549-556, 2005.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 243-247, 2006.

LIMA, S.T.C.; AZEVEDO, R.A.; SANTORO, L.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J. Isolation of the bifunctional enzyme lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from *Phaseolus vulgaris*. **Amino Acids**, New York, v. 24, p. 179-186, 2003.

LUGLI, J.; CAMPBELL, A.; GAZIOLA, S.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Enzymes of lysine metabolism from Coix lacryma-jobi seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 25-32, 2002.

LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, Clare, v. 150, p. 51-58, 2000.

MACK, G.; SCHJOERRING, J.K. Effect of nitrate supply on N metabolism of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) with special focus on the tubers. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 999-1009, 2002.

MEDICI, L.O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 142, p. 535-541, 2004.

NEGRUTIU, I.; CATTOIRREYNEARTS, A.; VERBRUGGEN, I.; JACOBS, M. Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana Sylvestris* (Spegazzini and Comes). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 68, p. 11-20, 1984.

PAJUELO, P.; PAJUELO, E.; OREA, A.; ROMERO, J.M.; MARQUEZ, A.J. Influence of plant age and growth conditions on nitrate assimilation in roots of *Lotus japonicus* plants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, p. 485-494, 2002.

POMPEU, G.B.; VENDEMIATTI, A.; GRATAO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Saccharopine dehydrogenase activity in the high-lysine *opaque* and *floury* maize mutants. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, p. 55-64, 2006.

RADIN, J.W. *In vivo* assay of nitrate reductase in cotton leaf disks: Effect of oxygen and ammonium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, p. 332-336, 1973.

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, p. 179-189, 2003.

ROGNES, S.E.; BRIGHT, S.W.J.; MIFLIN, B.J. Feedback-insensitive aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to lysine plus threonine. **Planta**, New York, v. 157, p. 32-38, 1983.

RUALES, J.; NAIR, B.M. Nutritional Quality of the Protein in Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, p. 1-11, 1992.

SCHEURWATER, I.; KOREN, M.; LAMBERS, H.; ATKIN, O.K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1635-1642, 2002.

SHANKAR, N.; SRIVASTAVA, H.S. Effect of glutamine supply on nitrate reductase isoforms in maize seedlings. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 701-706, 1998.

SHAUL, O.; GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 1157-1163, 1992a.

SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high-levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 203-209, 1992b.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1571-1575, 1997.

SOUZA, L.A.C.; SPEHAR, C.R.; SANTOS, R.L.B. Image analysis to determinate the saponin content in quinoa. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 397-401, 2004.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 121-125, 2006.

TODD, C.D.; POLACCO, J.C. AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v. 223, p. 1108-1113, 2006.

VOGELS, G.D.; VANDERDR, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 33, p. 143-157, 1970.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. The enzymology of lysine biosynthesis in higher-plants: Complete localization of the regulatory enzyme dihydrodipicolinate synthase in the chloroplasts of spinach leaves. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 116, p. 189-192, 1980.