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

Caracterização de proteínas de reserva, perfil de aminoácidos e enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em cevada (*Hordeum vulgare* L.) geneticamente modificada

Daiana Schmidt

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

Piracicaba
2011

Daiana Schmidt
Engenheira Agrônoma

Caracterização de proteínas de reserva, perfil de aminoácidos e enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em cevada (*Hordeum vulgare* L.) geneticamente modificada

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

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

Piracicaba
2011

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

Schmidt, Daiana
Caracterização de proteínas de reserva, perfil de aminoácidos e enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em cevada (*Hordeum vulgare L.)* geneticamente modificada / Daiana Schmidt . - - Piracicaba, 2011.
153 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Aminoácidos 2. Cevada 3.Enzimas 4. Plantas transgênicas 5. Proteínas de plantas I. Título

CDD 633.16
S349c

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

Aos meus pais, Ivanildo e Erotides,
pelo apoio e incentivo incondicional
pelo amor e compreensão
por acreditarem no meu potencial,
com muito carinho
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela estrutura oferecida;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação, oportunidade, confiança e apoio;

À Salete, pelas inúmeras contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e pelo imenso apoio em todas as ocasiões;

Aos professores do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas;

Aos funcionários do departamento, especialmente Cláudio e Aparecido pela imensa ajuda com o experimento na casa de vegetação;

Aos meus pais Ivanildo e Erotides, pelo incentivo diário e por acreditarem nos meus sonhos e principalmente por me ajudarem a realizá-los;

Ao meu irmão Márcio, pelo incentivo;

À minha avó Hilda, por sempre orar por mim;

À minha especial amiga Leila, pelo companheirismo, a paciência, a amizade, a força, a compreensão! Por todos os passos que demos juntas desde o início da nossa jornada na ESALQ;

Á minha amiga Priscila, pela nossa amizade, incentivo e conselhos. Por dividir seu espaço comigo durante quase três anos com tanta generosidade;

Ás minhas amigas Giselle, Mônica e Vanessa, por toda ajuda na realização deste trabalho e principalmente pela amizade em todos os momentos fossem bons ou ruins;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Amerivan, Aline, Berenice, Bertha, Carolina, Flávia, Fernando, Lucas, Manuella, Mariana, Milca, Paula, Rogério, Sandra, Tiago, pela convivência, apoio e pelas longas conversas;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 19
1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
2.1 Proteínas de reserva 23
2.2 Via metabólica do ácido aspártico 28
2.3 Enzimas chaves envolvidas na síntese de lisina 32
2.3.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase 33
2.3.2 Dihidrodipicolinato sintase 37
2.4 Regulação da síntese de lisina 39
2.5 Enzimas envolvidas na degradação de lisina e sua regulação 41
2.6 Estratégias para aumentar lisina em cereais 44
2.6.1 Mutantes para alta lisina 45
2.6.1.1 Milho 45
2.6.1.2 Cevada 46
2.6.2 Alteração no metabolismo de lisina 48
2.6.3 Alteração das proteínas de reserva 51
3 MATERIAL E MÉTODOS 55
3.1 Material vegetal 55
3.2 Proteína total 57
3.3 Proteínas de reserva 57
3.3.1 Extração de proteínas de reserva 57
3.3.2 Quantificação de proteínas 58
3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 58
3.3.4 Extração de aminoácidos de cada fração das proteínas de reserva 60
3.3.5 Separação e análise da composição de aminoácidos de cada fração protéica em HPLC 60
3.4 Aminoácidos solúveis totais 61
3.4.1 Extração de aminoácidos solúveis totais 61

3.4.2 Dosagem de aminoácidos solúveis totais 61
3.5 Enzimas envolvidas no metabolismo de lisina 62
3.5.1 Enzimas envolvidas na síntese de lisina 62
3.5.1.1 Extração da AK 62
3.5.1.2 Precipitação com sulfato de amônio 63
3.5.1.3 Dessalinização das amostras 63
3.5.1.4 Ensaio enzimático da AK 64
3.5.1.5 Cálculo da atividade da AK 64
3.5.1.6 Extração da HSDH 65
3.5.1.7 Dessalinização das amostras 65
3.5.1.8 Ensaio enzimático da HSDH 65
3.5.1.9 Cálculo da atividade da HSDH 66
3.5.1.10 Extração da DHDPS 66
3.5.1.11 Dessalinização das amostras 67
3.5.1.12 Ensaio enzimático da DHDPS 67
3.5.1.13 Síntese do β-aspartato semialdeído (ASA) 68
3.5.1.14 Cálculo da atividade da DHDPS 68
3.5.2 Enzimas envolvidas na degradação de lisina 68
3.5.2.1 Extração da LOR e SDH 68
3.5.2.2 Dessalinização das amostras 69
3.5.2.3 Ensaio enzimático da LOR 69
3.5.2.4 Cálculo da atividade da LOR 69
3.5.2.5 Ensaio enzimático da SDH 70
3.5.2.6 Cálculo da atividade da SDH 70
3.5.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-denaturantes (PAGE) 70
4 RESULTADOS 73
4.1 Proteína Total 73
4.2 Proteínas de Reserva 74
4.3 Perfil protéico por SDS-PAGE 75
4.4 Composição de aminoácidos em cada fração protéica 80
4.5 Aminoácidos solúveis totais 89

4.5.1 Sementes Maduras 89
4.5.2 Sementes Imaturas..... 91
4.6 Enzimas envolvidas na síntese de lisina..... 93
4.6.1 Determinação da atividade da AK durante o desenvolvimento da semente..... 94
4.6.2 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima AK 95
4.6.3 Determinação da atividade específica da AK..... 96
4.6.4 Determinação da atividade da HSDH durante o desenvolvimento da semente..... 98
4.6.5 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima HSDH 99
4.6.6 Determinação da atividade específica da HSDH.....101
4.6.7 Determinação da atividade da DHDPS durante o desenvolvimento da semente 102
4.6.8 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima DHDPS 103
4.6.9 Determinação da atividade específica da DHDPS.....104
4.7 Enzimas envolvidas na degradação de lisina.....107
4.7.1 Determinação da atividade da LOR durante o desenvolvimento da semente 107
4.7.2 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima LOR 107
4.7.3 Determinação da atividade específica da LOR.....108
4.7.4 Determinação da atividade da SDH durante o desenvolvimento da semente 109
4.7.5 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima SDH 110
4.7.6 Determinação da atividade específica da SDH.....111
4.7.7 Análise qualitativa da enzima SDH 112
5 DISCUSSÃO.....115
6 CONCLUSÕES 131
REFERÊNCIAS 133

RESUMO

Caracterização de proteínas de reserva, perfil de aminoácidos e enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em cevada (*Hordeum vulgare* L.) geneticamente modificada

Os cereais representam importantes fontes de proteína para alimentação humana e animal. Entretanto, são caracterizados pela baixa qualidade nutricional de suas proteínas devido à composição desbalanceada de aminoácidos, causada pelo excesso dos aminoácidos prolina e glutamina e deficiência de lisina, treonina e triptofano. As proteínas de reserva prolaminas constituem 50% do conteúdo total de proteínas no endosperma e são as principais responsáveis por tais características nos cereais. As informações sobre o metabolismo de lisina e o acúmulo de proteínas de reserva no endosperma vêm sendo utilizadas para desenvolver e aplicar estratégias em programas de melhoramento de plantas que visam suprir a deficiência de lisina encontrada nos cereais. Lange e colaboradores (2007) relataram a produção de linhagens transgênicas de cevada com padrão de proteínas de reserva alterado e que apresentaram incremento no teor de lisina e outros aminoácidos essenciais. O presente trabalho teve como objetivo identificar os mecanismos responsáveis pelas alterações observadas. Para tanto, avaliou-se a atividade das enzimas envolvidas na síntese e degradação de lisina, além da caracterização das proteínas de reserva e sua composição de aminoácidos. Observou-se redução na fração protéica das prolaminas (5,91 a 18,34%) e incrementos compensatórios na fração protéica das glutelinas (2,16 a 6,52%). As demais frações apresentaram respostas variáveis dependendo do evento avaliado. Além disso, a composição de aminoácidos foi alterada nas diferentes frações protéicas. As prolaminas exibiram incrementos nos teores de lisina (1,79 a 49,13%), treonina (5,04 a 22,60%) e metionina (13,57 a 45,38%), enquanto que as globulinas aumentaram principalmente o conteúdo de metionina (32,30 a 142,56%). Para os aminoácidos solúveis, foram observados incrementos na ordem de duas a três vezes de histidina, lisina, fenilalanina e metionina. A análise das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina revelou que ocorreram alterações nas três principais enzimas da via do ácido aspártico. A enzima aspartato quinase (AK) apresentou aumentos na atividade (4,44 a 47,27%), entretanto, foi mais sensível a inibição causada por lisina. A enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) também apresentou incremento na atividade (1,50 a 66,32%), mas diferente da AK, foi menos sensível à inibição causada por lisina. A enzima homoserina desidrogenase (HSDH), a qual compete o substrato ASA com a enzima DHDPS, exibiu redução na atividade (3,36% a 28,80%) (exceto um evento de transformação) e foi menos sensível a inibição causada por treonina. Embora as enzimas envolvidas na degradação de lisina também foram alteradas, os resultados foram variáveis para os diferentes eventos. Para aqueles que foram observados redução na atividade da enzima lisina cetoglutarato redutase (LOR), foi também verificado para enzima sacaropina desidrogenase (SDH), mas na ordem de duas vezes, sendo válido para aqueles que apresentaram incremento. Este trabalho mostrou que a alteração no padrão de proteínas de reserva ocasionou mudanças no metabolismo de aminoácidos, neste caso a lisina, para suprir a demanda necessária para incorporação em proteínas de reserva

Palavras-chave: Cevada (*Hordeum vulgare* L.); Lisina; Proteínas de reserva; Enzimas

ABSTRACT

Characterization of storage proteins, amino acid profile and enzymes involved in lysine metabolism in genetic modified barley (*Hordeum vulgare* L.)

Cereals represent an important source of protein to human food and animal feed. However, they are characterized by low nutritional quality of proteins due to the unbalanced composition of amino acids, caused by the excess of the amino acids proline and glutamine and deficiency of lysine, threonine and tryptophan. The prolamin storage proteins constitute 50% of the total protein content in the endosperm and is primarily responsible for these characteristics in cereals. Information on the metabolism of lysine and accumulation of storage proteins in endosperm have been used to develop and implement strategies in plant breeding programs that aim to address the deficiencies found in cereals. Lange and coworkers (2007) reported the production of transgenic lines of barley with a pattern of storage proteins that showed altered and increase in the levels of lysine and other amino acids. This study aimed to identify what were the mechanisms responsible for observed changes. For this, we evaluated the activity of enzymes involved in synthesis and degradation of lysine, besides the characterization of storage proteins and their amino acid composition. There was a reduction in the prolamin protein fraction (5.91 to 18.34%) and compensatory increases in the glutelin fractions (2.16 to 6.52%). The other fractions had variable responses depending on the event evaluated. Moreover, the amino acid composition was changed in the different protein fractions. Prolamins exhibited increases in levels of lysine (1.79 to 49.13%), threonine (5.04 to 22.60%) and methionine (13.57 to 45.38%), whereas increases were mainly globulins content of methionine (32.30 to 142.56%). With respect to soluble amino acids, increases were observed in the order of 2-3 fold of histidine, lysine, phenylalanine and methionine. Analysis of enzymes involved in lysine metabolism showed that changes in three key enzymes of the pathway of aspartic acid. The enzyme aspartate kinase (AK) showed increase in activity (4.44 to 47.27%), however, was more sensitive to inhibition by lysine. The enzyme dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) also showed increased activity (from 1.50 to 66.32%), but unlike the AK, was less sensitive to inhibition by lysine. The enzyme homoserine dehydrogenase (HSDH) that competes for the substrate ASA with the DHDPS, exhibited reduced activity (3.36% to 28.80%) (an exception one transgenic line) and was less sensitive to inhibition by threonine. The enzymes involved in degradation of lysine were also changed, though the results varied for different events. Those who observed decreased activity of the enzyme lysine ketoglutarate reductase (LOR) was also found for enzyme saccharopine dehydrogenase (SDH), but the order of twice, which was valid for those who had increased. This study showed that the change in the pattern of storage proteins produced changes in amino acid metabolism, in this case lysine, to supply the demand needed for incorporation into storage proteins.

Keywords: Barley (*Hordeum vulgare* L.); Lysine; Storage proteins; Enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das diferentes classes de prolaminas em cevada, trigo e centeio. A. Prolaminas ricas em enxofre; B. Prolaminas pobres em enxofre; C. Prolaminas de alto peso molecular. Os blocos repetitivos estão representados pelas setas e os domínios não repetitivos (A, B e C) estão indicados na figura. O número de blocos repetitivos e o tamanho do esquema não estão em escala (SHEWRY; TATHAM, 1990) 25

Figura 2 - Via metabólica do ácido aspártico. AK, aspartato quinase; AK-HSDH, aspartato quinase-homoserina desidrogenase, HSDH-R, homoserina desidrogenase resistente a treonina; HK, homoserina quinase; TS, treonina sintase; TD, treonina deaminase; CS, cistationina γ-sintase; DHDPS, dihidrodipicolinato sintase; (-) inibição; (+) indução (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006) 30

Figura 3 - Via de degradação da lisina e metabólitos derivados desta rota. LKR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina desidrogenase (STEPANSKY et al., 2006) 32

Figura 4 - Produção do material vegetal durante período vegetativo. A. Plântulas de cevada (15 dias após semeadura); B. Início do perfilhamento (40 dias após a semeadura); C. Final do perfilhamento (55 dias após semeadura) 56

Figura 5 - Cultivar BRS Sampa durante o período de florescimento. A. Estágio 1 (grão em leite fraco); B. Estágio 2 (grão leitoso pastoso); C. Estágio 3 (grão em pasta média)..... 56

Figura 6 - Teor de proteína total expresso em %. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa 73

Figura 7 - SDS-PAGE da fração Globulina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa 78

Figura 8 - SDS-PAGE da fração Albumina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa 78

Figura 9 - SDS-PAGE da fração Prolamina I. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa 79

Figura 10 - SDS-PAGE da fração Prolamina II. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa..... 79

Figura 11 - SDS-PAGE da fração Glutelina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa 80

Figura 12 - Concentração de aminoácidos solúveis totais de sementes maduras expressos em mmol.g^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa 89

Figura 13 - Concentração de aminoácidos solúveis totais em três estágios de desenvolvimento das sementes e nas sementes maduras da cultivar BRS Sampa, expressos em mmol.g^{-1} matéria seca 92

Figura 14 - Concentração de aminoácidos solúveis totais em sementes imaturas no estágio de desenvolvimento 2 expressos em mmol.g^{-1} matéria seca. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 93

Figura 15 - Atividade específica AK em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina) 94

Figura 16 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima AK (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 505 nm 96

Figura 17 - Atividade específica AK em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 97

Figura 18 - Atividade específica HSDH em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. O tratamento inclui a presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM 99

Figura 19 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima HSDH (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm 100

Figura 20 - Atividade específica HSDH em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. O tratamento corresponde a presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 101

Figura 21 - Atividade específica DHDPS em unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos lisina (Lys) e S-aminoetilcisteína (AEC) na concentração de 1 mM e 5 mM 103

Figura 22 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima DHDPS (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 525 nm 104

Figura 23 - Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. O tratamento corresponde a presença do aminoácido lisina (Lys) nas concentrações de 1mM e 5 mM. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 106

Figura 24 - Atividade específica LOR em nmol NADPH.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa.....107

Figura 25 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima LOR (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm.....108

Figura 26 - Atividade específica de LOR em nmol NADPH.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 109

Figura 27 - Atividade específica de SDH em nmol NAD.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa.....110

Figura 28 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima SDH (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm.....111

Figura 29 - Atividade específica de SDH em nmol NAD.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC.....112

Figura 30 - Análise qualitativa da enzima SDH em gel não desnaturante PAGE. 1. Milho normal; 2. Mutante Risø 1508; 3. Controle não transformado; 4-9. Linhagens transgênicas AsHorC. As setas indicam diferentes isoformas da enzima.....113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das hordeínas e controle gênico (Modificado: Melzer; Kleinhofs, 1987) 26

Tabela 2 - Composição de aminoácidos (valores expressos em mol%) das frações protéicas albumina, globulina, glutelina e dos subgrupos de hordeína em cevada (Modificado: Shewry,1993)..... 28

Tabela 3 - Concentração das proteínas de reserva de sementes maduras de cevada expressos em $mg.mL^{-1}$ e a proporção relativa em %. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 75

Tabela 4 - Composição de aminoácidos totais na fração Globulina expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 84

Tabela 5 - Composição de aminoácidos totais na fração Albumina expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 85

Tabela 6 - Composição de aminoácidos totais na fração Prolamina I expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 86

Tabela 7 - Composição de aminoácidos totais na fração Prolamina II expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 87

Tabela 8 - Composição de aminoácidos totais na fração Glutelina em expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 88

Tabela 9 - Composição de aminoácidos livres em sementes maduras expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa..... 90

Tabela 10 - Inibição da atividade da AK por treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM durante o desenvolvimento das sementes da cultivar BRS Sampa. Porcentagem relativa ao controle do ensaio..... 95

Tabela 11 - Inibição da atividade da AK por treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 98

Tabela 12 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM durante o desenvolvimento das sementes da cultivar BRS Sampa. Porcentagem relativa ao controle do ensaio 99

Tabela 13 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC 102

Tabela 14 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S-aminoeilcisteína na concentração de 1 e 5 mM em três diferentes estágios de desenvolvimento das sementes. Porcentagem relativa ao controle do ensaio 103

Tabela 15 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S- aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC..... 106

1 INTRODUÇÃO

Os cereais representam o cultivo de maior importância no mundo com uma produção anual que excede 2,22 bilhões de toneladas, o que representa 85% do total de grãos produzidos. As principais culturas responsáveis por esta produção são o milho (32,3%), trigo (31,4%), arroz (21,4%) e cevada (7,2%), segundo os dados do departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA).

Dentro deste cenário, a cultura da cevada (*Hordeum vulgare* L.) ocupa a quarta posição na produção mundial de cereais, com cerca de 170 milhões de toneladas produzidos anualmente. Os seus grãos são utilizados principalmente na alimentação animal, para a produção do malte e na alimentação humana, é consumida *in natura*, malteada ou na forma de farinhas. Assim como os demais cereais, os grãos de cevada são excelentes fontes de energia metabolizável na forma de amido e boas fontes de fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais e outros nutrientes.

As proteínas de origem vegetal fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, e até 50% deste valor é representado pelos grãos dos cereais, fato este mais relevante em países em desenvolvimento, onde os cereais são a principal fonte protéica na dieta da maioria da população.

Entretanto, o teor de proteína (8-14%) é considerado relativamente baixo quando comparado com grãos de leguminosas (20-40%). Além disso, essas proteínas apresentam baixo valor nutricional ocasionado pela composição de aminoácidos, as quais apresentam deficiência principalmente de lisina, treonina e triptofano.

Dos vinte aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, nove (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina) são considerados essenciais, pois não são sintetizados pelos humanos e animais monogástricos, portanto, necessitam serem fornecidos através de dietas alimentares. A via metabólica do ácido aspártico é responsável pela síntese de quatro aminoácidos essenciais: lisina, treonina, metionina e isoleucina. A regulação desta via ocorre em determinados pontos chave, através do controle da atividade de enzimas que atuam nestes pontos. Essas enzimas são reguladas por retro-inibição/ativação pelos aminoácidos, produtos finais ou seus análogos e por interações gênicas. A compreensão desta via e seus mecanismos de regulação são de fundamental importância para o desenvolvimento e aplicação de estratégias em programas de melhoramento de plantas que visam

alterar a composição de aminoácidos com a finalidade de adequação aos requerimentos nutricionais.

As estratégias utilizadas para tal finalidade podem ser divididas em dois tipos: melhoramento convencional e as técnicas de engenharia genética. O melhoramento convencional tem utilizado a mutação natural *opaco-2* para milho e *lys* para cevada, os quais apresentam alteração no padrão das proteínas de reserva acumuladas e teores de lisina cerca de duas vezes maior que os materiais convencionais. Na engenharia genética, duas estratégias principais têm sido empregadas: a alteração de enzimas envolvidas no metabolismo de lisina ou a alteração no padrão das proteínas de reserva.

A produção de linhagens transgênicas de cevada com padrão de proteínas de reserva alterado foi relatado por Lange e colaboradores (2007), os quais exibiram incrementos de até 16% no conteúdo de lisina, além de outros aminoácidos essenciais.

Estes materiais geneticamente modificados foram utilizados para realização do presente trabalho. O objetivo principal consistiu em estudos bioquímicos com enfoque na via metabólica do ácido aspártico e seus mecanismos de regulação, para melhor elucidar os incrementos nos teores de aminoácidos essenciais, e responder a seguinte pergunta: A alteração do perfil das proteínas de reserva ocasionou alterações bioquímicas no metabolismo de lisina nesses materiais transgênicos? A hipótese deste trabalho foi baseada na observação do mutante natural de milho, o opaco-2, que apresenta conteúdo reduzido da fração protéica considerada pobre em lisina (as zeínas) e aumentos em outros grupos de proteínas ricas em lisina, como as albuminas, globulinas e principalmente as glutelinas. Esse padrão alterado de proteínas de reserva nos mutantes naturais ocasionou alterações no metabolismo de lisina, principalmente na via de degradação deste aminoácido, permitindo que o excesso de lisina pudesse ser incorporado em proteínas que demandam mais lisina para sua formação. Além disso, permitiu o acúmulo de lisina solúvel nas sementes. Entretanto, essa alteração no padrão de proteínas de reserva é ocasionada pelo gene *o2* que codifica um fator transcricional, o qual regula a transcrição dos genes das prolaminas como também os genes das enzimas envolvidas na degradação de lisina. Assim, a pergunta é se nessas plantas transgênicas de cevada, mecanismos semelhantes ao opaco-2 foram desencadeados para suprir o requerimento de lisina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas de reserva

As proteínas de reserva das sementes são extensivamente estudadas há mais de 250 anos e têm sido tema atual de inúmeras revisões (GALILI; HOFGEN, 2002; SHEWRY; HALFORD, 2002; SHEWRY, 2007; KAWAKATSU, TAIJI; TAKAIWA, FUMIO, 2010), devido sua abundância nos grãos e importância econômica.

O primeiro estudo científico descrito foi o isolamento do glúten do trigo em 1745 (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995), no entanto estudos detalhados das proteínas de reserva já foram relatados a partir de 1924 quando T.B. Osborne desenvolveu um sistema classificatório baseado na solubilidade das proteínas durante o processo de extração, amplamente utilizado até os dias atuais. Quatro grupos foram definidos: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas os quais são solúveis em água, solução salina, álcool e solução alcalina, respectivamente (OSBORNE et al., 1914; LANDRY; MOUREAUX, 1970; LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000).

As albuminas e as globulinas são denominadas proteínas citoplasmáticas formadas por uma série de proteínas com alta lisina, têm funções metabólicas e estruturais e se localizam, principalmente, no embrião e nas células de aleurona, que envolvem o endosperma. Essas frações protéicas representam de 3 a 5% e 10 a 20% respectivamente, do conteúdo de proteína total. Entretanto em cereais de grãos pequenos como a cevada (*Hordeum vulgare* L.), o embrião e a aleurona representam apenas 10% do peso seco dos grãos, e são geralmente removidos durante processamento realizado para o consumo (SHEWRY; HALFORD, 2002). As glutelinas são estruturalmente semelhantes às prolaminas, porém não são solúveis em álcool uma vez que formam polímeros de alto peso molecular estabilizados por pontes dissulfeto inter-cadeias. São encontradas principalmente no endosperma, contêm cerca de 5% de lisina e representam uma fração importante variando de 35 a 45% do conteúdo total de proteína (LINKO et al., 1989; SHEWRY; TATHAM, 1990).

As prolaminas são as principais proteínas de reserva dos cereais e representam cerca de 50% do conteúdo total de proteínas, com exceção para aveia e arroz que contém cerca de 10% desta fração (SHEWRY; TATHAM, 1990). São encontradas principalmente no endosperma e tem função de prover nitrogênio durante a germinação e estágios primários de crescimento das

plântulas. Supõe-se que as prolaminas pertencem a uma família antiga e difundida de proteínas de reserva denominada “superfamília das prolaminas”, que antecedem a origem evolutiva das gramíneas (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). As tribos Triticeae (trigo, cevada e centeio) e Panicoideae (milho, sorgo e milheto) apresentam origens evolutivamente distintas para as prolaminas, entretanto, a maioria destas proteínas compartilha características estruturais comuns. A primeira é a presença de regiões distintas, ou domínios, que adotam estruturas diferentes entre si e podem ter origens diferentes. A segunda é a presença de sequências de aminoácidos constituído de blocos repetidos de um ou mais peptídeos curtos, ou uma sequência de um aminoácido específico. Essas características são responsáveis pela elevada proporção de glutamina e prolina ou outros aminoácidos específicos em algumas proteínas do grupo da prolaminas.

Nas espécies da tribo Triticeae as prolaminas são dividas em três subgrupos: proteínas de alto peso molecular, proteínas ricas em enxofre e proteínas pobres em enxofre (SHEWRY; MIFLIN; KASARDA, 1984). Todas essas proteínas contêm sequências repetidas baseadas em motivos ricos em prolina e glutamina, sendo esses motivos, altamente relacionados com os subgrupos de prolaminas ricas e prolaminas pobres em enxofre (KREIS et al., 1985).

Segundo Kreis et al. (1985), o evento inicial de evolução das prolaminas ocorreu com a triplicação de um domínio não repetitivo, conservado, rico em resíduos de cisteína, referidos como domínios A, B e C, tipicamente encontrado na região C-terminal das prolaminas ricas em enxofre. Estes domínios não repetitivos também são encontrados nas prolaminas de alto peso molecular. Em uma etapa seguinte do processo evolutivo foram inseridas outras sequências entre os três domínios, e na porção N-terminal foram adicionados blocos repetitivos de prolina e glutamina. As prolaminas pobres em enxofre foram originadas a partir das prolaminas ricas em enxofre, através da remoção dos sequências não repetitivas da porção C-terminal (Figura 1).

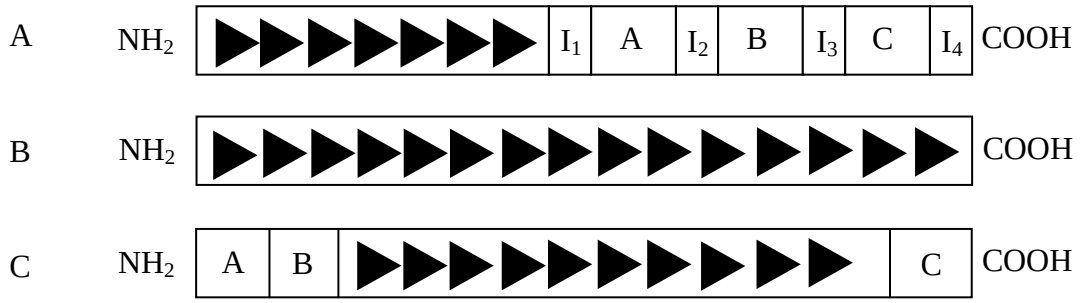

Figura 1 - Esquema das diferentes classes de prolaminas em cevada, trigo e centeio. A. Prolaminas ricas em enxofre; B. Prolaminas pobres em enxofre; C. Prolaminas de alto peso molecular. Os blocos repetitivos estão representados pelas setas e os domínios não repetitivos (A, B e C) estão indicados na figura. O número de blocos repetitivos e o tamanho do esquema não estão em escala (SHEWRY; TATHAM, 1990)

Os domínios A, B e C foram encontrados em outros grupos de proteínas, na 2S albumina em dicotiledôneas e em inibidores de α-amilase e tripsina em cereais, entretanto as regiões repetitivas não foram encontradas em plantas dicotiledôneas. Estes resultados sugerem que os genes que codificam prolaminas em cereais podem ter dupla origem evolutiva, uma família gênica presente no antecessor das monocotiledôneas e dicotiledôneas, e outra que evoluiu recentemente após a especiação destes dois grupos. Outra evidência encontrada é uma origem evolucionária comum para um grande número de proteínas que divergiram em estrutura e função (SHEWRY; TATHAM, 1990).

Em cevada, as prolaminas são denominadas hordeínas e classificadas em quatro subgrupos (B, C, D e γ hordeínas), os quais diferem em proporção na fração total de prolaminas e na composição de aminoácidos (SHEWRY et al., 1986). As hordeínas representam cerca de 40-50% do conteúdo total de proteínas da semente. Juntos os subgrupos B e C representam 95% do total de hordeínas nas sementes maduras enquanto D e γ aparecem em menores proporções.

As hordeínas têm sido amplamente estudadas, porém existe uma grande variação encontrada na literatura quanto ao número e o peso molecular dos polipeptídios ou unidades estruturais. Shewry (1993) cita o peso molecular das hordeínas variando entre 30 a 105 kDa, Echart-Almeida e Cavalli-Molina (2000) avaliaram hordeínas de 12 variedades brasileiras (*Hordeum vulgare* L.) e 2 espécies nativas de cevada (*H. euclaston* Steud. e *H. stenostachys* Godr.) e encontraram 40 polipeptídios com massa molecular variando entre 30 a 94 kDa; Helm et al. (2004) avaliaram seis variedades brasileiras de cevada nua e encontraram 31 bandas de polipeptídios diferentes variando entre 16 a 91 kDa. As variações ocorrem principalmente nos dois subgrupos mais abundantes as B e C hordeínas, e podem ser explicadas devido as variações

ambientais, estágio morfofisiológico da semente, composição química do extrator assim como a molaridade, pH, presença de agentes redutores e a temperatura de extração (RHODES; GILL, 1980).

A eletroforese de hordeínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tem sido o principal método empregado na identificação de variedades de cevada na Austrália (MCCAUSLAND; WRIGLEY, 1977), Reino Unido (SHEWRY; PRATT; MIFLIN, 1978), Estados Unidos (HEISEL; PETERSON; JONES, 1986), Iugoslávia (RADOVIC; VAPA, 1996), Espanha (BERNARDO et al., 1997; ATIENZA et al., 2005) e Brasil (ECHART-ALMEIDA; CAVALLI-MOLINA, 2000; HELM et al., 2004) para análise da variabilidade intravarietal e intraespecífica, e na análise da similaridade entre cultivares e espécies nativas do gênero *Hordeum*.

As hordeínas são codificadas por uma família multigênica (genes designados *hor*) localizados no cromossomo 5 (1H). O gene que codifica a D hordeína está localizado no braço longo e os demais genes localizados no braço curto. Estes genes estão presentes em múltiplas cópias no genoma, com exceção do locus hor3 que codifica as D hordeínas (SHEWRY et al., 1985; MELZER; KLEINHOFS, 1987; ENTWISTLE et al., 1991; KANAZIN; ANANIEV; BLAKE, 1993) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das hordeínas e controle gênico

Hordeína	Massa molecular (kDa)	% do total de hordeína	Gene	Número de cópias
D	> 100	> 5	*hor3*	...
C	48 - 72	10 - 20	*hor1*	20 - 30
B	30 - 46	80 - 90	*hor2*	13 - 50
γ	10 - 16	> 5	*hor5*	...

Fonte: Melzer; Kleinhofs, 1987

Nota: Sinal convencional utilizado:
...Dado numérico não disponível

Embora um grande número de trabalhos tenha explorado as bases moleculares das prolaminas (GU et al., 2003; STEIN, 2007; XU; MESSING, 2009; HAN et al., 2010), muito ainda é necessário elucidar a respeito da estrutura e evolução das regiões no genoma de cevada que contêm os genes que codificam essas moléculas.

Em relação à composição de aminoácidos, os quatros subgrupos de hordeínas diferem entre si (Tabela 2) e são responsáveis pela baixa qualidade nutricional dos grãos. Todos os

subgrupos apresentam altos níveis de glutamina e prolina, entretanto a proporção de glutamina varia de 30 mol% a 41 mol% e prolina de 11 mol% a 30 mol% nas D e C hordeínas respectivamente. Com exceção do subgrupo D, as hordeínas contêm baixos níveis de aminoácidos essenciais como lisina e treonina, sendo a C hordeína aquela que apresenta os menores valores (0,2 mol% de lisina e 1,0 mol% de treonina). Enquanto os subgrupos B, D e γ hordeínas são ricos em cisteína e metionina, as C hordeínas são ditas pobres em aminoácidos sulfurados, pois não contém cisteína e baixos níveis de metionina (0,2 mol%).

Diferentemente das hordeínas, as frações protéicas albumina, globulina e glutelina (Tabela 2), são consideradas de qualidade nutricional superior, pois contêm elevados níveis de aminoácidos essenciais (lisina e metionina) e baixos níveis de glutamina e prolina.

As hordeínas são encontradas no endosperma e desempenham um importante papel na germinação das sementes, sendo fonte de energia e nitrogênio. Desta forma, assim como as demais proteínas de reserva, necessitam cumprir três requerimentos importantes para que executem sua função: a) deposição em compartimentos intracelulares para evitar a degradação prematura por proteases; b) formação de uma estrutura especial, o corpo protéico, capaz de sofrer desidratação e de ser rehidratado durante o processo de germinação e c) controle rigoroso do balanço entre aminoácidos livres e incorporados na proteína, que por sua vez depende do transporte de metabólitos de carbono, nitrogênio e enxofre produzidos nas partes vegetativas da planta (GALILI; HOFGEN, 2002).

As proteínas de reserva são sintetizadas através da via secretória e armazenadas em discretos corpos protéicos, localizados no retículo endoplasmático (RE) e em uma classe especial de vacúolos, chamados vacúolos de proteínas de reserva (GALILI; HOFGEN, 2002).

A síntese de hordeínas inicia-se 14 dias após a antese, quando o endosperma está com aproximadamente 10% do seu peso seco final (RAHMAN; SHEWRY; MIFLIN, 1982). Os quatro subgrupos são sintetizados no endosperma amiláceo nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático (RE), com um peptídeo sinal curto (cerca de 20 resíduos), o qual é clivado quando os polipeptídios são transportados para o interior do lúmen do RE para posteriormente serem armazenados em corpos protéicos (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995).

O mecanismo de distribuição e armazenamento das prolaminas em cereais diverge entre as diferentes espécies (MATSUOKA; BEDNAREK, 1998). Por exemplo, em milho e arroz essas proteínas são armazenadas diretamente no lúmen do retículo endoplasmático, levando a formação

de discretos corpos protéicos circundados por uma membrana proveniente do RE, enquanto que em trigo, cevada e provavelmente centeio as prolaminas são armazenadas em vacúolos, tendo duas rotas de transporte distintas. A maioria dessas proteínas que estão armazenadas no lúmen do RE é transferida diretamente para esses vacúolos e incorporadas por um mecanismo ainda pouco elucidado, e a minoria é transportada para esses vacúolos através do aparato de golgi (VITALE; GALILI, 2001).

Tabela 2 - Composição de aminoácidos (valores expressos em mol%) das frações protéicas albumina, globulina, glutelina e dos subgrupos de hordeína em cevada

Aa	Hordeínas				Albumina	Globulina	Glutelina
	B	C	D	γ			
Asp[1]	1,4	1,0	1,3	2,9	10,7	9,2	9,2
Thr	2,1	1,0	8,1	3,1	4,5	3,9	5,5
Ser	4,7	4,6	9,7	5,5	5,5	6,4	7,2
Glu[2]	35,4	41,2	29,6	32,4	9,6	11,4	11,8
Pro	20,6	30,6	11,6	16,5	5,6	4,4	6,5
Gly	1,5	0,3	15,7	5,9	9,0	17,5	10,7
Ala	2,2	0,7	2,5	2,6	9,6	1,1	10,1
Cys	2,5	0	1,5	2,7	2,0	4,3	1,2
Val	5,6	1,0	4,5	3,7	7,8	6,4	7,0
Met	0,6	0,2	0,2	1,2	1,9	1,5	1,4
Ile	4,1	2,6	0,7	2,9	5,5	3,6	4,1
Leu	7,0	3,6	3,3	8,6	7,6	7,4	8,7
Tyr	2,5	2,3	3,9	1,7	3,3	2,3	2,2
Phe	4,8	8,8	1,4	4,7	4,0	3,4	4,5
His	2,1	1,1	3,4	2,0	1,9	1,7	2,5
Lys	0,5	0,2	1,1	1,6	5,3	5,2	5,3
Arg	2,4	0,8	1,5	2,0	4,3	9,0	4,2

Fonte: Shewry,1993

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamina

2.2 Via metabólica do ácido aspártico

O metabolismo de aminoácidos está entre os processos bioquímicos mais importantes e estudados nos sistemas biológicos. Em plantas, os aminoácidos desempenham inúmeras funções

relacionadas ao crescimento (LESS et al., 2010), tal como importantes compostos armazenadores de nitrogênio e também base para síntese de proteínas (MEDICI et al., 2004). Vinte aminoácidos são normalmente incorporados em proteínas, entretanto mais de 300 aminoácidos não protéicos foram identificados em plantas, os quais desempenham papel fundamental como intermediários em diversas vias metabólicas (FERREIRA et al., 2005).

Entre os vinte aminoácidos protéicos, nove são chamados essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina, pois não podem ser sintetizados por humanos e animais monogástricos, portanto necessitam ser ministrados na dieta alimentar (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

As plantas e a maioria das bactérias e fungos têm a capacidade de sintetizar os vinte aminoácidos requeridos para a síntese de proteínas (AZEVEDO et al., 1997), os quais são classificados em famílias, de acordo com o precursor da via de biossíntese.

Em plantas, o aspartato é um composto formado pelo processo de transaminação do ácido oxaloacético, o qual pode ser formado no ciclo de Krebs nas mitocôndrias, ou através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase no citoplasma (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O ácido oxalacético atua como precursor em duas vias metabólicas. A primeira conduz à síntese da asparagina, que participa no transporte e armazenamento de nitrogênio (ANDREWS et al., 2004) através da enzima asparagina sintetase (AS, EC 6.3.5.4). Esta última transfere o nitrogênio do grupo amida da glutamina para o aspartato (LEA et al., 2007). A segunda via conduz a síntese de quatro (lisina, metionina, treonina e isoleucina) dos nove aminoácidos essenciais (AZEVEDO, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006; LESS; GALILI, 2009).

Os quatro aminoácidos resultantes da via metabólica do ácido aspártico participam de inúmeros processos importantes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (JANDER; JOSHI, 2010). A via fornece precursores para a biossítense de outros metabólitos essenciais, como por exemplo, o S-adenosilmetionina (SAM) e o etileno que atuam na regulação do crescimento de plantas e repostas ao ambiente (AMIR; HACHAM; GALILI, 2002). A treonina através da sua conversão á isoleucina participa nas vias de interações planta-patógeno e na produção de energia celular (KANG et al., 2006), além de ser precursora na síntese de glicina, e assim participar nos processos de fotorrespiração (JOSHI et al., 2006). A biossíntese de isoleucina é economicamente relevante, pois uma enzima desta via é alvo de uma série de herbicidas (FERREIRA et al., 2005), e por fim o metabolismo de lisina está relacionado à

interações planta-patógeno e com a produção do hormônio do estresse, o ácido salicílico (LESS; GALILI, 2009).

Devido principalmente a sua importância nutricional, uma vez que sintetiza quatro aminoácidos essenciais, a via metabólica do ácido aspártico (Figura 2), tem sido extensivamente estudada utilizando-se abordagens genéticas e bioquímicas a fim de se obter maiores conhecimentos na regulação desta via. Assim, contribuir para futuras manipulações genéticas com objetivo de produzir plantas capazes de acumular lisina e treonina nas sementes.

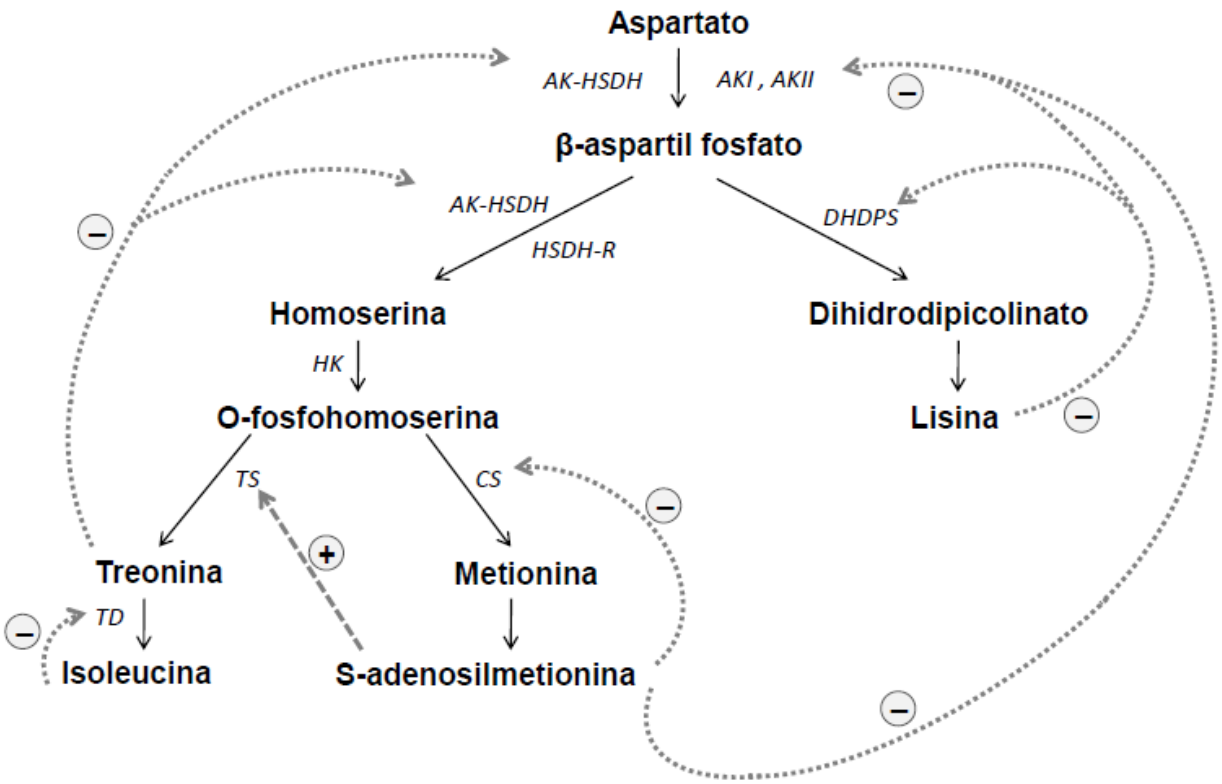

Figura 2 - Via metabólica do ácido aspártico. AK, aspartato quinase; AK-HSDH, aspartato quinase-homoserina desidrogenase, HSDH-R, homoserina desidrogenase resistente a treonina; HK, homoserina quinase; TS, treonina sintase; TD, treonina deaminase; CS, cistationina γ-sintase; DHDPS, dihidrodipicolinato sintase; (-) inibição; (+) indução (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006)

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

A partir deste ponto, a via é dividida em dois ramos, um responsável pela biossíntese de lisina e o outro que conduz a síntese de treonina, isoleucina e metionina. Este último é dividido em dois sub-ramos, um que leva a síntese de metionina e o outro a formação de treonina e isoleucina (Figura 2).

A primeira reação na biossíntese de lisina é a condensação do piruvato e do β- aspartato semialdeído formando dihidrodipicolinato, catalisada pela enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52). A segunda reação é a formação do composto tetrahidrodipicolinato (THDPA), catalisado pela enzima dihidrodipicolinato redutase (DHDPR, EC 1.3.1.26). Em plantas, a partir da formação do THDPA, ocorrem ainda cinco reações enzimáticas até a síntese de lisina, catalisadas pelas enzimas 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). Esta via recentemente identificada em plantas, e assim como em procariotos, utiliza o ácido diaminopimélico (DAP) como intermediário (VOGEL, 1959), entretanto diverge das três rotas conhecidas (succnil CoA, acetil CoA, Ddh) (HUDSON et al., 2006).

No outro ramo da via, o β- aspartato semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) na presença da coenzima NADH ou NADPH. Em seguida, a homoserina é fosforilada a o-fosfohomoserina (OPH) pela ação da homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) na presença de ATP. Esta reação é comum para a biossíntese de treonina, isoleucina e metionina. A partir deste ponto ocorre a segunda bifurcação da via (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

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

A metionina é sintetizada no outro ramo da via, a partir de OPH em três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationinaγ -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).

O S-adenosilmetionina (SAM) é sintetizado a partir de metionina em uma reação enzimática catalisada pela S-adenosilmetionina sintase (SAMS, EC 2.5.1.6).

As enzimas lisina cetoglutarato redutase (LKR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são consideradas integrantes da via metabólica do ácido aspártico, pois participam da degradação da lisina. A LKR é a primeira enzima desta via, a qual condensa lisina e cetoglutarato para formar sacaropina, que por sua vez é hidrolisada em ácido aminoadípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela enzima SDH (Figura 3) (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

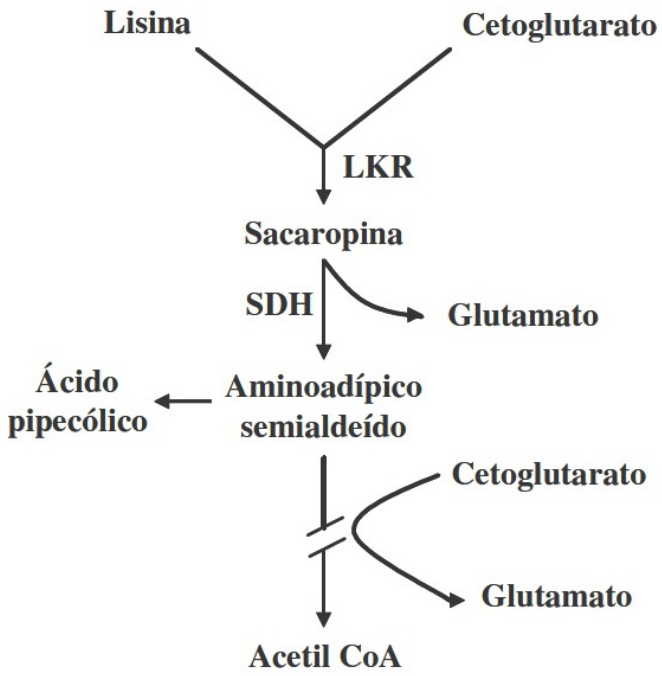

Figura 3 - Via de degradação da lisina e metabólitos derivados desta rota. LKR, lisina cetoglutarato redutase; SDH, sacaropina desidrogenase (STEPANSKY et al., 2006)

2.3 Enzimas chaves envolvidas na síntese de lisina

Em vias metabólicas multienzimáticas, na qual o produto de uma enzima se torna substrato da próxima, a primeira enzima da sequência normalmente atua como reguladora da velocidade de todo o sistema. Entretanto na via metabólica do acido aspártico, Giovanelli e colaboradores (1980) concluíram que a primeira enzima da via (AK) não é o principal fator regulador do fluxo através da via, já que as demais enzimas que estão nos pontos de ramificação também exercem função regulatória.

A regulação das enzimas chave de vias multienzimáticas, chamadas de enzima reguladoras, ocorre através da ativação/inibição por seus produtos finais (YOSHIDA et al., 2010), processo chamado de retroalimentação positiva/retroalimentação negativa, que desempenha papel fundamental para a regulação da via e consequentemente na síntese dos seus aminoácidos produtos. Desta forma, as enzimas AK, HSDH e DHDPS têm sido extensivamente estudadas em diversos organismos, com objetivo de conhecer suas propriedades e os mecanismos que regem sua regulação.

2.3.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase

A aspartato quinase (AK) é a primeira enzima envolvida na via metabólica do ácido aspártico e catalisa a fosforilação do aspartato utilizando ATP para formar o β-aspartil fosfato (GALILI, 1995).

Os primeiros estudos com AK foram realizados em microorganismos, principalmente em *Escherichia coli*. Posteriormente em diversas espécies vegetais, como *Arabidopsis thaliana* (HEREMANS; JACOBS, 1995) cevada (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982), cenoura (RELTON et al., 1988), milho (DOTSON; SOMERS; GENGENBACH, 1989; AZEVEDO et al., 1992; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992), arroz (TEIXEIRA et al., 1998), tabaco (FRANKARD; GHISLAIN; JACOBS, 1992), coix (LUGLI et al., 2002) e sorgo (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006).

Pelo menos duas isoenzimas têm sido relatadas em plantas (GALILI, 1995). Uma monofuncional sensível a inibição por lisina e outra que está presente como um polipeptídio bifuncional apresentando um domínio de AK e outro de HSDH, sendo sensível a inibição por treonina (AK-HSDH) (ROGNES et al., 2003; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A isoenzima sensível a inibição por lisina normalmente é responsável por cerca de 60-80% da atividade total de AK e está envolvida na regulação geral da via (AZEVEDO; LEA, 2001) além de ser sinergicamente inibida por SAM (ROGNES; LEA; MIFLIN, 1980). A isoenzima sensível a inibição por treonina contabiliza cerca de 10-20% da atividade total de AK, com raras exceções, como por exemplo, em Coix, em que esta iseonzima é predominante e é responsável por 55-70% da atividade total de AK dependendo do tecido e estágio de desenvolvimento (LUGLI et al., 2002). Além disso, a isoenzima sensível a inibição por treonina faz parte de um polipeptídio

bifuncional que apresenta domínios de AK e HSDH, previamente observado em microrganismos (COHEN; SAINT-GIRON, 1987).

Em folhas de cevada, três isoenzima de AK foram identificadas utilizando-se cromatografia de troca iônica e filtração em gel. AKI sensível a treonina, AKII sensível a lisina e AKIII sensível a lisina mais SAM (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982). Em milho, duas isoenzimas da AK sensível a lisina foram eluídas em colunas de cromatografia de troca iônica, e uma terceira sensível a inibição por treonina identificada por filtração em gel, confirmando a hipótese da existência de três isoenzimas de AK em vegetais superiores (AZEVEDO et al., 1992).

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

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

Em *E.coli* foram identificadas três isoenzimas de AK, sendo que duas dessas apresentam atividade de HSDH. O gene *thrA* codifica a isoenzima AKI-HSDHI a qual é sensível a inibição por treonina. A isoenzima AKII-HSDHII é codificada pelo gene *metL* e sensível a inibição por metionina. A terceira isoenzima AKII contém apenas atividade de aspartato quinase sensível a inibição por lisina, e é codificada pelo gene *lysC* (STADTMAN; COHEN; LEBRAS, 1961; COHEN; SAINT-GIRON, 1987).

A primeira evidência da presença de um polipeptídio bifuncional contendo os domínios de AK e HSDH em vegetais foi proposta por Aarnes e Rognes (1974) em plantas de ervilha, posteriormente a existência deste polipeptídio foi confirmada por Wilson et al (1991) em células de cenoura, a qual está estreitamente relacionada com a isoenzima AKI-HSDHI de *E. coli* e por

Azevedo et al. (1992) em células de milho através da co-purificação de AK sensível a treonina e HSDH.

Além das evidências bioquímicas, importantes resultados para a confirmação da existência deste polipeptídio bifuncional, bem como a função e a regulação dos genes que codificam para as enzimas AK e AK-HSDH, foram obtidos através do uso de técnicas da genética molecular, principalmente com o advento das ferramentas de clonagem. O gene que codifica para a isoenzima bifuncional AK-HSDH foi clonado em diversas espécies de plantas como, por exemplo, cenoura (WEISEMANN; MATTHEWS, 1993), soja (GEBHARDT; WEISEMANN; MATTHEWS, 1993), *A. thaliana* (GHISLAIN et al., 1994) e milho (MUEHLBAUER; SOMERS et al., 1994).

O primeiro trabalho com esse foco foi relatado por Weisemann e Matthews (1993) os quais utilizaram oligonucleotídeos deduzidos a partir de sequências de aminoácidos como *primers* em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar fragmentos de DNA usando mRNA de cultura de células de cenoura como modelo. O produto de amplificação foi radiomarcado e utilizado como sonda para identificar clones a partir de uma biblioteca de cDNAs de cultura de células e raízes de cenoura. Dois clones parcialmente sobrepostos foram isolados. Juntos, esses clones representam a codificação de quadro aberto de leitura (do inglês, *ORF-open reading frame*) de 921 aminoácidos, incluindo uma proteína madura e um longo peptídeo sinal para cloroplasto. Essa sequência de aminoácidos tem alta homologia com as proteínas de *E. coli* AKI-HSDHI e AKII-HSDHII, e assim, conclui-se que os genes de cenoura isolados também codificam para uma enzima bifuncional AK-HSDH, confirmando as evidências bioquímicas sugeridas em outros estudos.

O primeiro clone genômico sequenciado de AK-HSDH de plantas foi isolado de *Arabidopsis thaliana* por Ghislain e colaboradores (1994) a partir de uma biblioteca genômica, na qual utilizou-se cDNA de AK-HSDH de cenoura como sonda. Neste estudo a comparação da sequencia de aminoácidos da enzima bifuncional AK-HSDH entre *A. thaliana* e cenoura, *A. thaliana* e *E. coli* AKI-HSDHI e AKII-HSDHII revelou uma identidade de 80%, 37,5% e 31,4% respectivamente, sugerindo que o gene *ak-hsdh* em plantas é homólogo ao gene *thrA* que codifica a isoenzima AKI-HSDHI a qual é sensível a inibição por treonina.

Posteriormente, foi relatado o isolamento de um cDNA de AK-HSDH de *A. thaliana* pelo complemento funcional de um mutante de levedura. As sequencias de nucleotídeos e

aminoácidos diferiram consideravelmente das relatadas previamente por Ghislain et al (1994), sugerindo que há pelo menos dois genes diferentes que codificam esta enzima nesta espécie (AZEVEDO et al., 1997). Em *A. thaliana* também foram isolados três diferentes cDNAs que codificam para a isoenzima monofuncional de AK sensível a inibição por treonina (FRANKARD; VAUTERIN; JACOBS, 1997; TANG; ZHUSHIMONI et al., 1997; YOSHIOKA; KUREI; MACHIDA, 2001).

Muehlbauer e colaboradores (1994) identificaram três genes que codificam para enzima AK-HSDH em milho, os quais codificam sequência de aminoácidos semelhantes àquelas relatadas para procariotos, leveduras, cenoura e *A. thaliana*. A análise dos cDNAs pAKHSDH1 e pAKHSDH2. Neste trabalho, os autores revelaram a presença completa da região codificadora da enzima bifuncional AK-HSDH, enquanto que o cDNA pAKHSDH3 apresentou apenas a sequência parcial do gene.

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

Um locus de caráter quantitativo (QTL) que afeta os níveis de aminoácidos livres no endosperma, principalmente aqueles derivados da via do ácido aspártico, foi identificado no braço longo do cromossomo 2 em milho. Este locus ocorre na região do genoma onde está mapeado o gene *ask2*, que codifica uma isoenzima monofuncional de AK, sendo que este, possivelmente contribui fortemente para presença do QTL (WANG; STUMPF; LARKINS, 2001). Em um trabalho subsequente, os genes *ask1* e *ask2* de duas linhagens de milho (Oh545o2 e Oh51Ao2) foram clonados e a sequência de nucleotídeos determinada, revelou que o gene *ask2* está fortemente ligado ao QTL no cromossomo 2 e associado aos altos níveis de lisina no

endosperma. A análise da sequência de nucleotídeos dos alelos de Ask2 mostrou que estes diferem em um único aminoácido na região carboxi-terminal, e sugeriu-se um novo mecanismo de regulação para a isoenzima AK monofuncional, pelo qual esta região da enzima possa desempenhar papel fundamental na regulação da sua atividade básica (WANG et al., 2007). Por outro lado, o gene *ask1* não corresponde ao locus ask1 e ainda não foi clonado, mas com o aumento do número de ESTs disponíveis e trabalhos científicos neste sentido, será possível também clonar este gene e elucidar ainda mais as propriedades destas enzimas, assim como seus mecanismos de regulação.

2.3.2 Dihidrodipicolinato sintase

A DHDPS é a primeira enzima do ramo da via do ácido aspártico que leva exclusivamente a síntese de lisina, catalisando a reação de condensação do piruvato e dβ -aspartato semialdeído (ASA) para produção de 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Esta enzima foi isolada, purificada e caracterizada em diversas espécies de plantas, como por exemplo, espinafre (WALLSGROVE; MAZELIS, 1981), trigo (KUMPAISAL; HASHIMOTO; YAMADA, 1987), tabaco (GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1990), milho (FRISCH; GENGENBACH et al., 1991) e ervilha (DEREPPE et al., 1992).

Diferentemente das enzimas AK e HSDH, que possuem isoformas distintas, a enzima DHDPS é encontradaem uma única forma altamente sensível a inibição por baixas concentrações de lisina. Em *Nicotiana sylvestris* a estrutura da enzima com e sem a ligação de lisina foi determinada por cristalografia e revelou uma nova estrutura quaternária quando comparada com *E. coli*, a qual é 100 vezes menos sensível a inibição por lisina. A molécula é composta por um homotetrâmetro formado por dois dímeros, que em presença de lisina sofre um rearranjamento desses dímeros, o que explica a forte inibição da atividade da enzima causada por este aminoácido em plantas (BLICKLING et al., 1997).

As enzimas isoladas de diferentes espécies foram descritas como enzimas oligoméricas, todas formadas por quatro subunidades idênticas. A determinação da massa molecular revelou pequena variação entre as diferentes espécies estudadas. Foram estimados valores de 115 kDa, 123 kDa, 127 kDa, 130 kDa e 167 kDa para espinafre, trigo, ervilha, milho e tabaco, respectivamente (AZEVEDO; LEA, 2001).

O gene que codifica para a enzima DHDPS foi isolado pela primeira vez em cultura de células de trigo por Kaneko e colaboradores (1990), os quais utilizaram oligonucleotídeos a partir da sequência de aminoácidos da enzima como sonda hibridizadora em bibliotecas genômicas. Dois cDNAs foram clonados, os quais codificam duas subunidades da enzima, uma de 35,737 kDa e outra de 35,776 kDa, e representaram uma homologia de 94% na sequência de aminoácidos**.**

Através da seleção genética direta utilizando-se E. coli dapA auxotrófica Frisch e colaboradores (1991) isolaram a sequência completa de um cDNA que codifica para a enzima DHDPS em milho e observaram homologia de 86 a 88% na sequência de aminoácidos quando comparada com a sequência de trigo. Além disso, a massa molecular de 35,854 kDa deduzida a partir da sequência de aminoácidos foi semelhante àquela determinada por eletroforese (SDS-PAGE) a partir da enzima purificada, que foi de 38 kDa (FRISCH; GENGENBACH et al., 1991).

Ghislain e colaboradores (1995) utilizaram mutagênese e seleção direta em meio de cultura contendo o análogo da lisina, S-aminoetilcisteína (AEC), para obter plantas de tabaco (*N. sylvestris*) menos sensíveis a inibição por este aminoácido. A substituição de um único aminoácido (asparagina por isoleucina) na proteína madura, que representa uma mutação dinucleotídica, resultou na resistência da enzima a inibição por lisina e consequentemente, numa superprodução deste aminoácido em folhas e sementes. Posteriormente, Shaver e colaboradores (1996) utilizaram abordagens semelhantes, e obtiveram mutantes de milho que expressam a enzima DHDPS insensível à inibição por lisina, resultado este também causado pela alteração de um único aminoácido na proteína madura.

Em *A. thaliana* o gene *dhdps-1* que codifica para a enzima DHDPS foi inicialmente isolado. Um fragmento de DNA composto por 900 pares de base *upstream* à região codificadora do gene da DHDPS foi utilizado para construção de um vetor, contendo também o gene repórter GUS. Os estudos de expressão em *A. thaliana e N. sylvestris* revelaram que a expressão é do tipo célula-específica, principalmente em células de crescimento rápido onde as taxas de síntese da proteína são altas (VAUTERIN; FRANKARD; JACOBS, 1999). Em seguida, um segundo gene que codifica para DHDPS foi isolado de *A. thaliana* (*dhdps-2*) o qual mostrou homologia de 84% com o primeiro cDNA clonado *dhdps-1* (CRACIUN; JACOBS; VAUTERIN, 2000; SARROBERT et al., 2000). A expressão do gene *dhdps-2* foi semelhante ao observado para o gene *dhdps-1*(CRACIUN; JACOBS; VAUTERIN, 2000), por outro lado estudos bioquímicos

revelaram que a enzima DHDPS2 foi menos sensível a inibição por lisina quando comparada com a enzima DHDPS1 (SARROBERT et al., 2000).

O gene de DHDPS foi isolado em outras espécies, como soja (SILK et al., 1994), álamo (VAUTERIN; JACOBS, 1994), coix (DANTE et al., 1999), em um tipo de arroz selvagem (*Zizania latifolia* Griseb) (KONG et al., 2009) e arroz (SIKDAR; KIM, 2010). Todos os clones de cDNA de DHDPS apresentaram os peptídeos sinais para plastídios, confirmando a localização da enzima nos cloroplastos, com exceção para *Z. latifolia* que não contém este peptídeo sinal. Através de estudos de expressão com uso do gene repórter GUS, pôde-se verificar que a localização da enzima DHDPS em *Z. latifolia* difere das demais espécies, uma vez que foi encontrada no citoplasma. Entretanto, a expressão do gene de ZlDHDPS foi semelhante ao observado para as demais espécies estudadas, sendo considerada expressão tecido específica, além dos maiores níveis ocorrerem em tecidos de crescimento rápido (KONG et al., 2009).

2.4 Regulação da síntese de lisina

A regulação da via metabólica do ácido aspártico ocorre em determinados pontos chaves, através da regulação das enzimas que catalisam estes pontos. Várias destas enzimas são reguladas por retro-inibição/ativação pelos aminoácidos resultantes da via ou seus análogos (AZEVEDO et al., 2003) e por interações gênicas (BRENNECKE et al., 1996).

Na via de síntese do aminoácido lisina o principal controle é exercido pelas enzimas aspartato quinase (AK) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS).

Embora ocorra retro-inibição pela lisina em ambas as enzimas, a DHDPS é a principal enzima limitante para a síntese de lisina, pois apresenta maior sensibilidade a este aminoácido (Ki 5-50 µM) quando comparada com a AK (Ki 200-600 µM) (GALILI, 1995; GALILI, 2002). A observação de que plantas que expressam DHDPS insensível à inibição por lisina apresentaram uma superprodução de lisina, enquanto que plantas expressando AK insensível à inibição por lisina levou a um aumento na produção de treonina, corroboraram com a hipótese da existência de uma função regulatória mais importante no ponto da via catalisado pela DHDPS (GALILI, 1995; GALILI, 2002). A superprodução de lisina em plantas expressando DHDPS insensível a inibição por lisina está geralmente associada com níveis reduzidos de treonina, sugerindo que a DHDPS e HSDH competem pelo mesmo substrato, o β-aspartato-semialdeído (ASA) (GALILI, 1995; GALILI, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Além disso, Sarrobert e

colaboradores (2000) em um estudo com mutantes que apresentavam menor atividade da DHDPS observaram mudanças na síntese dos aminoácidos, com pequena redução na lisina acumulada e principalmente, grande acúmulo de treonina nesses mutantes, sugerindo também que as enzimas DHDPS e HSDH competem pelo mesmo substrato, entretanto os mecanismos de como diferentes rotas regulam e distribuem o ASA de acordo com as necessidades de síntese de cada aminoácido ainda não são conhecidos.

Craciun e colaboradores (2000) sugerem que a simples inibição alostérica pela lisina ou treonina das principais enzimas da via do ácido aspártico não poderia explicar os altos níveis de treonina acumulados sugerindo a existência de outros mecanismos, como por exemplo, a formação de complexos protéicos que modulam a suscetibilidade dos sítios alostéricos, capazes de controlar o fluxo de carbono entre as diferentes rotas da via. Evidências encontradas a partir de estudos com bactérias e fungos suportam esta hipótese e sugerem que a inibição da atividade das enzimas por aminoácidos pode requerer a assistência de chaperonas moleculares. Em leveduras, análises genéticas sugerem que a inibição da enzima AK por treonina pode ser mediada pela chaperona FKBP12 (ALARCON; HEITMAN, 1997). O papel regulatório desta interação nas propriedades de retro-inibição de AK pela treonina foi verificado através de estudos com mutantes que não codificam a chaperona FKBP12 (*fpr1*), os quais foram resistentes ao análogo tóxico de treonina (ALARCON; HEITMAN, 1997). O trabalho sugere que a proteína FKBP12 induz a alterações conformacionais na enzima AK durante o processo de inibição pelo aminoácido, reduzindo assim a atividade da enzima. Em bactérias e fungos, a sensibilidade da enzima a lisina ou treonina está associada a domínios específicos aos quais estes aminoácidos se ligam e uma região onde podem ocorrer interações, como por exemplo, a proteína FKBP12 em leveduras. Estes domínios estão localizados na região C-terminal da isoenzima monofuncional ou na porção intermediária entre os domínios de AK e HSDH na isoenzima bifuncional (VIOLA, 2001). Outro exemplo da interação de chaperonas com as enzimas da via de síntese de lisina foi verificado por McLennan e Masters (1998) em que a enzima DHDPS pode ser modulada pela chaperona GroE em bactérias, mas se esta proteína afeta a enzima diretamente ou indiretamente através da regulação da expressão do gene *dapA* não está elucidado.

Em plantas, a chaperona GroE é encontrada em grandes quantidades nos plastídios, o que indica uma possível regulação da atividade da enzima DHDPS através desta proteína, similarmente a sua função em bactérias. Entretanto, a possível regulação de AK em plantas

através da chaperona FKBP12 é questionável, pois nenhum homólogo desta proteína foi identificado nos plastídios (GALILI, 2002).

Em milho, Muehlbauer e colaboradores (1994) verificaram que a enzima bifuncional AK-HSDH contém uma sequência conservada semelhante à encontrada nos módulos de comunicação dos sistemas regulatórios de dois componentes que controla a expressão de vários genes em procariotos. Assim, sugeriu-se que esses elementos podem estar envolvidos na regulação da atividade da enzima AK-HSDH através de interações com os domínios que reconhecem a treonina para inibição da enzima. É importante salientar que estudos genéticos mostraram que os mecanismos que regulam as enzimas AK e AK-HDSH podem ser distintos (GALILI, 2002).

2.5 Enzimas envolvidas na degradação de lisina e sua regulação

Duas enzimas estão envolvidas na degradação de lisina em animais, microorganismos e plantas. A enzima lisina α-cetoglutarato redutase (LKR), também conhecida como lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR) catalisa a condensação da lisina e do cetoglutarato para formar sacaropina, que em seguida, é hidrolisada a ácido glutâmico e ácido α-aminoadípico através da enzima sacaropina desidrogenase (SDH) (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Em plantas, o catabolismo de lisina foi inicialmente estudado em trigo, milho e cevada em experimentos utilizando ^{14}C-lisina, e observou-se que a radioatividade foi incorporada no glutamato e no ácido α-aminoadípico, sugerindo que este aminoácido é oxidativamente degradado através da sacaropina (SODEK; WILSON, 1970; BRANDT, 1975).

As enzimas LOR e SDH foram isoladas e caracterizadas em inúmeras espécies de plantas, como por exemplo, milho (GONCALVES-BUTRUILLE et al., 1996), arroz (GAZIOLA et al., 1997), soja (MIRON et al., 2000), coix (LUGLI et al., 2002), feijão (CUNHA LIMA et al., 2003) e sorgo (FORNAZIER et al., 2005).

Na maioria das espécies estudadas a atividade de LOR e SDH está em um único polipeptídio bifuncional (LOR-SDH), entretanto, a forma monofuncional de ambas as enzimas também foi encontrada (ZHU; TANG; GALILI, 2000; TANG et al., 2002).

O gene que codifica para a enzima bifuncional LOR-SDH foi clonado pela primeira em *A. thaliana* por Tang e colaboradores (1997). Posteriormente, foi verificado que o locus lor-sdh além de codificar para esta enzima, também codifica para a forma monofuncional de SDH através de um gene autônomo localizado no interior da região codante e na região 3' UTR (região não

codante) do gene *lor-sdh* (TANG et al., 2000). Além disso, um estudo que utilizou plantas de algodão revelou que o locus lor-sdh pode também expressar a forma bifuncional da enzima LOR-SDH e a forma monofuncional de LOR através do término da transcrição em um íntron localizado na região intermediária das regiões codantes das enzimas LOR e SDH (TANG et al., 2002). É importante ressaltar que nem todos os loci de lor-sdh necessariamente codificam três polipeptídios distintos, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, colza, algodão e tomate, possuem o gene autônomo que codifica a forma monofuncional de SDH, enquanto que em milho e soja não foi relatado (KEMPER et al., 1999; MIRON et al., 2000).

Estudiosos questionam a necessidade de isoformas monofuncionais dessas enzimas em plantas, entretanto as respostas ainda são especulativas, e podem estar relacionadas às propriedades bioquímicas do polipeptídio bifuncional.

A atividade máxima de LOR ocorre em pH neutro enquanto que a atividade máxima de SDH ocorre em pH 9,0 ou valores superiores. Como o polipeptídio bifuncional está localizado no citoplasma (ZHU; TANG; GALILI, 2000), onde o pH é neutro, a atividade do domínio SDH pode ser limitante, desta forma uma enzima monofuncional adicional de SDH pode ser requerida para manter em níveis eficientes o fluxo de degradação da lisina (STEPANSKY et al., 2006). Esta hipótese é suportada pelo trabalho proposto por Stepansky e colaboradores (2005), no qual verificaram que os níveis de mRNA da enzima monofuncional SDH e também da proteína madura em *A. thaliana* sempre foram encontrados em excesso quando comparada com o polipeptídio bifuncional. Além disso, em um trabalho com canola transgênica (expressando AK e DHDPS insensíveis à inibição por lisina) que contém a forma monofuncional de SDH, foi observado acúmulo do ácidoα -aminoadípico, enquanto que plantas que não contém esta forma adicional de SDH acumulam sacaropina (ARRUDA et al., 2000).

A regulação da atividade do polipeptídio bifuncional de LOR ocorre pela interação funcional com o domínio de SDH, a qual é mediada pela região intermediária de ligação dos dois domínios (ZHU; TANG; GALILI, 2002), desta forma, a atividade de LOR no polipeptídio bifuncional é menos eficiente quando comparada com a forma monofuncional, a qual apresenta K_m para lisina 10 vezes menor. Assim, a forma monofuncional de LOR pode ser amplamente sintetizada em casos onde o fluxo muito eficiente do catabolismo de lisina é necessário, como por exemplo, na zona de abscisão em algodão (TANG et al., 2002).

A regulação do catabolismo de lisina ocorre não apenas pelos produtos finais do gene *lor-sdh*, mas também pelo padrão de sua expressão. Análise da sequência do gene *lor-sdh* de milho e Arabidopsis revelaram a presença da sequência CCAAT e TATA box na região promotora e na região interna do gene, a qual possivelmente controla a expressão da forma bifuncional LOR-SDH e monofuncional da enzima SDH. Além disso, sequências do tipo GCN4, a qual está envolvida na transcrição dos genes relacionados com metabolismo de nitrogênio em fungos e plantas, foram encontradas na região *upstream* do promotor e na região interna do gene em milho, e na região promotora interna em Arabidopsis. Entretanto, sítios de ligação para o fator de transcrição opaco-2 estão presentes na região *upstream* do promotor e na região interna do gene de Arabidopsis, mas somente na região *upstream* do promotor em milho. A ausência do sítio de ligação do fator opaco-2 na região interna do gene *lor-sdh* em milho pode explicar porque esta espécie expressa somente a enzima bifuncional LOR-SDH.

Em milho, os genes que codificam para as zeínas e para a enzima LOR-SDH estão sobre o controle do mesmo fator de transcrição opaco-2, assim, com o aumento da taxa de síntese das zeínas, através da ativação dos genes pelo fator opaco-2 há também um incremento na atividade de LOR-SDH, resultando na degradação de lisina. Esses resultados foram obtidos através de estudos moleculares e bioquímicos do milho mutante opaco-2, que apresenta o gene *o2* homozigoto recessivo, resultados esses, que representaram avanços significativos no entendimento sobre a regulação do catabolismo de lisina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). O mutante opaco-2 é caracterizado por uma alta concentração de lisina nas sementes quando comparado com o milho normal, característica esta causada pela alteração na distribuição das proteínas de reserva e grande acúmulo de lisina na forma solúvel (GAZIOLA et al., 1999). Estes estudos com o mutante opaco-2 revelaram que houve uma redução nos níveis de mRNA (superior a 90%), na proteína madura LOR-SDH e também da atividade da enzima, e confirmaram o papel do fator de transcrição opaco-2 no catabolismo de lisina (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992; GAZIOLA et al., 1999; KEMPER et al., 1999).

Estudos da regulação pós traducional de LOR e SDH realizados com diferentes espécies de plantas revelaram que as enzimas são diferentemente moduladas através de cascata de sinalização intracelular, envolvendo principalmente Ca^{2+}, fosforilação-desfosforilação e força iônica (KARCHI et al., 1995; KEMPER et al., 1998; GAZIOLA et al., 2000). Karchi e colaboradores (1995) observaram em sementes de tabaco que a atividade de LOR pode ser

estimulada através de lisina exógena, e que este efeito estimulador foi significativamente reduzido quando as sementes foram tratadas com EGTA, um quelante de Ca^{2+}. Além disso, verificou-se que este efeito inibitório foi superado pela adição de Ca^{2+}, mas não por Mg^{2+} sugerindo que a ativação da LOR pela lisina requer Ca^{2+}. Em milho, Kemper e colaboradores (1998) também observaram que a atividade de LOR foi modulada por Ca^{2+}, enquanto que para a atividade de SDH essa modulação não ocorreu. Além disso, quando foram testados dois diferentes inibidores estruturais de calmodulina sobre a atividade da enzima LOR dependente de Ca^{2+}, ocorreu praticamente inibição total de sua atividade. Em um trabalho subsequente, o mesmo grupo de pesquisa relatou evidências para o efeito do Ca^{2+} no estado de oligomerização de LOR-SDH em milho, em que a atividade de LOR foi estimulada por Ca^{2+} através da dimerização apenas do domínio LOR (KEMPER et al., 1999). Em arroz, resultados semelhantes foram observados, em que apenas o domínio da LOR foi modulado por Ca^{2+} e força iônica (GAZIOLA et al., 2000).

Também verificou-se que o polipeptídio LOR-SDH de soja, milho e Arabidopsis pode ser fosforilado *in vitro* através da subunidade catalítica da caseína quinase II, entretanto as consequências *in vivo* desta fosforilação ainda não foram elucidadas (ARRUDA et al., 2000). É possível que esta proteína (caseína quinase II) esteja envolvida na regulação da transcrição dos genes *lor-sdh* (GALILI et al., 2001).

2.6 Estratégias para aumentar lisina em cereais

A enorme quantidade de informações geradas através dos estudos bioquímicos, genéticos e moleculares da via metabólica do ácido aspártico e das proteínas de reserva, aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias da engenharia genética e transformação de plantas constitui a base para a melhoria da qualidade nutricional nos grãos de diferentes cereais (MATTA; SINGH.; KUMAR., 2009).

As estratégias da engenharia genética são empregadas com a finalidade de aumentar o conteúdo de proteína total e a composição de aminoácidos, os quais incluem a exploração de mutantes naturais para alta lisina e/ou transformação de plantas para a alteração no padrão das proteínas de reserva, e na via metabólica do ácido aspártico, visando aumentar o pool de aminoácidos livres (SHEWRY, 2007).

Em uma revisão publicada recentemente Azevedo e Arruda (2010) apontam algumas contribuições fundamentais dos estudos realizados com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional de cereais, principalmente em milho. A revisão engloba desde o primeiro relato da existência de um mutante para alta lisina (opaco-2) até os dias atuais, e discutem os avanços alcançados durante mais de quatro décadas de pesquisa. Além desta, inúmeras outras revisões são encontradas na literatura (SUN; LIU, 2004; BEAUREGARD; HEFFORD, 2006; UFAZ; GALILI, 2008; MATTA; SINGH.; KUMAR., 2009), que mostra a grande importância destes estudos.

2.6.1 Mutantes para alta lisina

2.6.1.1 Milho

O isolamento de mutantes naturais foi a primeira alternativa que apresentou progressos significativos em estudos com o intuito de incrementar lisina em cereais. Em 1964, Mertz e colaboradores relataram a ocorrência de uma linhagem de milho mutante para alta lisina, chamada opaco-2, que apresentava conteúdo de lisina 69% superior ao milho normal (MERTZ; BATES; NELSON, 1964). Posteriormente, uma série de mutantes espontâneos de milho foi identificada visualmente através do fenótipo diferenciado causado por alterações nas reservas de carboidratos do endosperma. Tais mutações conferem um endosperma uniforme e amiláceo e maior conteúdo de lisina nos grãos. Estes mutantes podem ser recessivos (*opaque*), semi-dominantes (*floury*), dominantes (*Mucronate - Mc*) e *Defective Endosperm B30* (*DE-B30)* (GIBBON; LARKINS, 2005).

O mutante recessivo opaco-2 é caracterizado pelos altos níveis de lisina, resultado da alteração no padrão das proteínas de reserva, com redução das zeínas e aumento das não-zeínas que contêm maior conteúdo de lisina e triptofano (HUNTER et al., 2002). Além disso, neste mutante ocorre a alteração das proteínas e enzimas relacionadas ao metabolismo do açúcar e nitrogênio no endosperma (HABBEN; KIRLEIS; LARKINS, 1993).

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

colaboradores (1999) mostraram que a atividade das enzimas envolvidas no catabolismo da lisina é reduzida de forma drástica quando compara-se entre a do milho opaco-2 com as variedades comerciais, de acordo com o exposto no tópico anterior.

No entanto, os mutantes para alta lisina descritos para todos os cereais apresentam limitações para integração em programas de melhoramento comercial, pois estão associados com efeitos negativos sobre o rendimento da cultura e a característica indesejável do endosperma farináceo que causa maior susceptibilidade ao ataque de insetos e doenças e maiores teores de umidade. Inúmeros esforços foram realizados na tentativa de incorporar essas fontes genéticas para alta lisina em variedades comerciais com rendimentos aceitáveis e características desejáveis dos grãos, mas os resultados foram decepcionantes (SHEWRY, 2007).

De fato, o único gene para alta lisina que foi incorporado com sucesso em linhagens comerciais foi o gene *o2*, em um intensivo trabalho de melhoramento realizado no "International Maize and Wheat Improvement Center" (CIMMYT) no México, em que a característica farinácea do mutante opaco-2 foi alterada através da introdução de genes modificadores do endosperma (*mo*), resultando em variedades de milho QPM "Quality Protein Maize" que possuem características nutricionais do mutante opaco-2 e níveis de produtividade, bem como textura do endosperma idêntica ao milho normal (PRASANNA et al., 2001).

A identidade molecular dos genes modificadores de endosperma (*mo*) introduzidos no mutante opaco-2 ainda não é totalmente conhecida e deve envolver diversos loci, mas foi demonstrado que o gene *sugary2* que codifica a enzima amido sintase está envolvido neste contexto (ZHANG et al., 2004). Análises bioquímicas das linhagens QPM demonstraram que ocorre uma redução do conteúdo de α-zeínas de 22 kDa, como ocorre no mutante opaco-2, acompanhado pelo aumento de outro grupo de zeínas, as γ-zeína de 27 kDa (GEETHA et al., 1991), o que sugere a sua contribuição nas modificações do endosperma tornando-o mais duro devido, provavelmente, a uma compactação dos corpos protéicos ricos na γ-zeína de 27 kDa ou formando uma rede de ligações cruzadas de amilopectina na superfície dos grânulos de amido (DANNENHOFFER et al., 1995; GIBBON; WANG; LARKINS, 2003).

2.6.1.2 Cevada

Em cevada, a seleção visual de grãos pelo fenótipo não foi possível, assim Munck e colaboradores (1970) utilizaram um método de triagem direta baseado na capacidade de ligação a

um corante. Esta avaliação resulta numa estimativa da quantidade de aminoácidos básicos (incluindo lisina), e identificou um único mutante espontâneo para alta lisina, a linhagem Etíope Hiproly, entre 2.500 acessos da coleção mundial de cevada (SHEWRY, 2007). Em seguida, a análise de populações mutantes possibilitou a identificação de 20 novas mutações em cevada para alta lisina, geradas por mutações induzidas por agentes mutagênicos químicos e físicos, realizado no laboratório nacional de Risø, na Dinamarca. Embora estes genes mutados variam em seus mecanismos de ação, a maioria destes resulta na diminuição da síntese das proteínas pobres em lisina (hordeínas) e num aumento compensatório das frações protéicas ricas em lisina.

Em cevada, a atenção dos pesquisadores tem sido concentrada em três mutantes: o mutante natural Hiproly (MUNCK et al., 1970), o mutante Risø 1508 resultado de uma mutação quimicamente induzida com etileno imina na cultivar Bomi (INGVERSEN; KØIE; DOLL, 1973) e o mutante Risø 56 resultado da mutação física gerada pela exposição ao raio γ da cultivar Carlsberg II (DOLL, 1980).

O fenótipo do mutante Hiproly é determinado por um único gene recessivo (*lys1*) localizado no braço longo do cromossomo 5H. A linhagem original apresenta conteúdo de lisina 30% superior as cultivares comerciais, mas apenas 30% do seu rendimento. Apesar dos inúmeros esforços em programas de melhoramento, não foi possível a produção de linhagens comerciais viáveis, devido aos efeitos pleiotrópicos do gene *lys* no acúmulo de amido no endosperma. Interessantemente, a quantidade de hordeína neste mutante apresentou uma redução de apenas 10 a 20% e nenhum efeito na composição dos polipeptídios de hordeínas foi observado, sendo que, aproximadamente a metade do incremento no conteúdo de lisina do mutante Hiproly é resultado de aumentos específicos de quatro proteínas ricas em lisina, β-amilase (5 g% de lisina), proteína Z (inibidor de proteases) (7,1 g%), CI-1 (inibidores de quimotripsina) (9,5 g%) e CI-2 (11,5 g%) que juntas contabilizam cerca de 17% do total de globulinas comparada com apenas 7% em cultivares normais (BRANDT, 1976; HEJGAARD; BOISEN, 1980; WILLIAMSON; FORDE; KREIS, 1988).

O mutante Risø 1508 é caracterizado pelo gene *lys3*, que está localizado na região do centrômero também do cromossomo 5H, no entanto não está ligado ao gene *lys*. O gene *lys3* é o que confere aos mutantes os maiores incrementos de lisina e ocorrem na forma de três alelos, *lys3a*, *lys3b* e *lys3c* (EGGUM; BRUNSGAARD; JENSEN, 1995). Inicialmente este mutante despertou grande interesse nos pesquisadores devido a observação de incrementos significativos

no conteúdo de lisina (36%) combinado com modesta redução do rendimento (23%) e massa de mil sementes (12%). Assim como o mutante Hiproly, o aumento do conteúdo de lisina no mutante Risø 1508 não é devido a alterações qualitativas das hordeínas, mas apenas relacionado a alterações quantitativas, em que o gene *lys3a* confere uma redução de 70% no conteúdo de hordeínas em relação a sua linhagem parental a cultivar Bomi, sendo este o resultado do incremento de quatro vezes o conteúdo das D hordeínas e a redução de 80 e 93% das frações C e B hordeínas, respectivamente. Também foram observadas alterações nas proteínas de baixo peso molecular (KLEMSDAL; OLSEN; RORVIK, 1987).

O mutante Risø 56 é caracterizado por uma longa deleção no locus hor2, o qual codifica para as B hordeínas, sendo o gene mutado denominado *hor2ca* (KREIS et al., 1983). A perda deste grande grupo de proteínas resultou em aumentos compensatórios da fração C hordeína e em outras proteínas ricas em lisina, conferindo o fenótipo de alta lisina. Esta é a única mutação entre os fenótipos para alta lisina que afeta estruturalmente os genes que codificam as hordeínas, enquanto que os demais mutantes descritos são ditos como genes reguladores, uma vez evidenciados seus efeitos pleiotrópicos.

2.6.2 Alteração no metabolismo de lisina

Os estudos básicos dos mecanismos regulatórios que controlam a via metabólica do ácido aspártico e o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos, regeneração de plantas e mutagênese de sementes permitiram a seleção de mutantes, em meio de cultura, contendo altas concentrações dos aminoácidos da via e seus análogos. Este tipo de experimento foi desenvolvido para obter materiais que possuíssem enzimas menos sensíveis ou resistentes a inibição pelos seus aminoácidos produtos, levando ao incremento na biossíntese de lisina e consequentemente o acúmulo deste aminoácido em plantas (AZEVEDO, 2002). Entretanto os resultados obtidos por inúmeros pesquisadores não foram promissores no seu objetivo final, mas as informações geradas acrescentaram o entendimento dos mecanismos regulatórios da via (AZEVEDO; ARRUDA, 2010).

Posteriormente, as técnicas da engenharia genética forneceram novas oportunidades de avanço nos estudos sobre a manipulação da via do ácido aspártico. A primeira tentativa foi a transformação de tabaco para expressar a enzima AK de *E. coli* menos sensível a inibição por lisina, porém, os resultados obtidos foram semelhantes aqueles encontrados nos mutantes

bioquímicos para AK, em que ocorre uma superprodução e acúmulo de treonina, mas incremento significativo nos níveis de lisina não foram observados (SHAUL; GALILI, 1992b), o que mostra papel regulatório central da enzima DHDPS na síntese de lisina, como previamente discutido. Desta forma, os trabalhos subsequentes concentraram-se na expressão de formas alteradas desta enzima. Shaul e Galili (1992a) relataram o primeiro trabalho de expressão constitutiva da enzima DHDPS de *E. coli* menos sensível a inibição por lisina em tabaco transgênico, e observaram um incremento na produção de lisina cerca de 100 vezes superior ao material selvagem. Posteriormente, esta forma de DHDPS foi expressa em canola e soja (FALCO et al., 1995), cevada (BRINCH-PEDERSEN et al., 1996), milho (MAZUR; KREBBERS; TINGEY, 1999), arroz (LEE et al., 2001) e Arabidopsis (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994), de maneira constitutiva ou com uso de um promotor tecido específico, mas na maioria dos casos o incremento de lisina foi acompanhado de efeitos anormais e deletérios no fenótipo das plantas, os quais variaram de acordo com a espécie.

Para contornar este problema, em Arabidopsis o gene de DHDPS de bactéria insensível a inibição por lisina foi expresso sob controle de um promotor específico, a faseolina, cuja expressão ocorre especificamente nas sementes. Neste trabalho foi observado que as sementes durante o estágio de desenvolvimento continham altos níveis de lisina, mas quando o teor deste aminoácido foi analisado em sementes maduras não foram observadas diferenças significativas entre as plantas transformadas e não transformadas. Este resultado inesperado foi associado ao aumento do catabolismo de lisina observado nas sementes desses materiais transgênicos, em que o acúmulo de lisina estimula a atividade das enzimas envolvidas na sua degradação (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994). Assim, essas respostas observadas para o catabolismo da lisina em sementes, geradas a partir de diferentes experimentos, sugere que estratégias para aumentar o teor de lisina nos grãos podem requerer a sua redução ou eliminação juntamente com a expressão da enzima DHDPS menos sensível ou resistente a inibição por lisina. No entanto, o procedimento exato para manipular este processo depende se esse é um processo essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta (GALILI; HOFGEN, 2002).

Zhu e Galili (2003) expressaram DHDPS bacteriana insensível a inibição por lisina sob controle do promotor semente-específico em um tipo selvagem de Arabidopsis, bem como em plantas mutantes que apresentavam redução na expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas no catabolismo de lisina. Os resultados deste trabalho mostraram que a combinação

destas duas alterações causa um efeito sinergístico destas, em que o nível de lisina solúvel nas sementes foi até 80 vezes maior comparada com o controle, entretanto, as sementes apresentaram germinação e desenvolvimento retardado.

Em um trabalho subsequente, os mesmos autores testaram se a inibição do crescimento das plântulas era devido ao efeito fisiológico negativo do excesso de lisina na maturação das sementes ou ocasionado por um defeito no catabolismo da lisina pós-germinação. Para responder este questionamento, Zhu e Galili (2004) utilizaram a técnica do RNA interferente (RNAi) para suprimir o catabolismo da lisina e co-expressaram uma sequência dupla fita originada do domínio LKR da enzima LKR/SDH com um promotor para expressão nas sementes com enzima DHDPS bacteriana. Os resultados sugeriram que um possível defeito do catabolismo de lisina pós-germinação pode ter sido o responsável pela inibição do crescimento de plântulas. Além disso, foram observados aumentos nos níveis de lisina solúvel de 0,29-0,39 mol% nas sementes controle para 0,21-2,11 mol% nas sementes transformadas (ZHU; GALILI, 2004). Recentemente, análises do metabolismo primário dessas sementes que acumulam altos níveis de lisina mostraram que ocorreu efeito negativo nos níveis de uma série de metabólitos do ciclo de Krebs e a importância do catabolismo de lisina no equilíbrio energético das plantas e consequentemente no aparecimento do processo fotossintético associado ao processo pós-germinativo (ANGELOVICI et al., 2011).

Em milho também foram obtidos aumentos nos níveis de lisina solúvel de 30 ppm para 500-700 ppm quando se utilizou a técnica do RNAi , em que foi realizada a transformação da planta com uma construção IR-*SDH* (sequência repetida invertida do domínio SDH da LKR/SDH) sob controle de um promotor endosperma específico (HOUMARD et al., 2007). Frizzi e colaboradores (2008) utilizaram um método de expressão simultânea da enzima DHDPS de *Corynebacterium glutamicum* (CordapA), insensível a inibição por lisina, e RNAi para reduzir o catabolismo de lisina, através de um único cassete de expressão, em que a sequência repetida invertida de LKR/SDH (IR-LKR/SDH) foi inserida em um íntron no transgene que expressa CordapA. Essa combinação resultou em aumentos nos níveis de lisina solúvel acima de 4000 ppm nas sementes transgênicas, comparado com apenas 100 ppm no controle não transformado.

No trabalho mais recente neste sentido, Reyes e colaboradores (2009) também utilizaram a técnica do RNAi para reduzir o catabolismo no embrião e no endosperma de sementes de milho, e observaram efeito sinergístico quando foi induzida a supressão da LKR-SDH em ambos

os tecidos, em que a supressão no embrião resultou num acúmulo de 0,2 $mg.g^{-1}$ matéria seca (MS) de lisina solúvel em sementes maduras, 0,90 $mg.g^{-1}$ MS no endosperma e na combinação de 1,60 $mg.g^{-1}$ MS.

2.6.3 Alteração das proteínas de reserva

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter proteínas de reserva estáveis, ricas no aminoácido de interesse e com alto acúmulo nas sementes.

No caso da transformação da planta com proteínas ricas em lisina, três estratégias têm sido abordadas por diferentes grupos de pesquisa: 1) a utilização de peptídeos sintéticos ou a alteração dos aminoácidos de uma proteína endógena; 2) a transformação com uma proteína heteróloga e 3) a mudança no perfil das proteínas de reserva utilizando a técnica do RNAi. Alguns exemplos de cada estratégia estão citados abaixo, mas inúmeros outros resultados importantes estão descritos em revisões sobre o assunto (SHEWRY, 2007; MATTA; SINGH.; KUMAR., 2009; AZEVEDO; ARRUDA, 2010).

A compreensão da estrutura, função, dobramento e topologia das proteínas permitiu a síntese de genes que codificam uma nova proteína, com características desejáveis, e também a inserção ou substituição de aminoácidos de uma proteína existente (SUN; LIU, 2004). Neste contexto, Keeler e colaboradores (1997) projetaram uma nova proteína com uma conformação α-hélice, CP 3-5, contendo 31% de lisina e 20% de metionina. Esse novo peptídeo foi expresso em tabaco transgênico sob controle de um promotor endosperma-específico, em que resultou num aumento de 2% no conteúdo total de proteína e consequentemente, no incremento dos níveis de lisina nas sementes. Torrent e colaboradores (1997) modificaram uma proteína endógena do milho, a γ-zeína com resíduos de lisina. A proteína modificada, rica em lisina acumulou-se em altos níveis em corpos protéicos e foi co-localizada com a proteína endógena α e γ -zeína nos endospermas transformados. Entretanto, esta nova proteína sofre modificações pós-traducionais em plantas transgênica de Arabidopsis, resultando num endereçamento para secreção na parede celular, enquanto que a γ-zeína normal foi corretamente endereçada para o reticulo endoplasmático (ALVAREZ et al., 1998).

A utilização da transformação de plantas utilizando um gene que codifica uma proteína heteróloga também tem sido utilizada como estratégia promissora para incrementar o valor nutricional da espécie de interesse. Roesler e Rao (1999) utilizaram a proteína CI-2 (inibidor de

quimotripsina em cevada que possui 11,5 mol% de lisina) para projetar inúmeras proteínas com qualidade nutricional superior, em que uma dessas apresentou onze substituições de lisina, cinco de metionina, dois de triptofano, um de glicina e três de treonina na mesma proteína. Assim, esta proteína resultou num peptídeo com 14 resíduos de lisina num total de 83 aminoácidos. A adição de uma única ponte dissulfeto foi suficiente para estabilizar de maneira semelhante à proteína original, indicando que formas altamente substituíveis da proteína CI-2 pode ser adequada para expressão em plantas transgênicas (ROESLER; RAO, 2000). Entretanto até o presente está proteína ainda não foi expressa em plantas, apesar de ser um resultado promissor. Estudos similares foram realizados com outra proteína de cevada rica em lisina, a hordotionina, em que formas mutantes dessa proteína apresentaram até 27% de resíduos de lisina. A forma HT12 (contem 12 resíduos de lisina) quando expressas em sorgo, resultaram em aumentos de 50% no conteúdo total de lisina dos grãos (ZHAO et al., 2003). Uma proteína específica de grãos de pólen de batata (*Solanum berthaultii*), chamada sb401, rica em lisina, foi expressa em milho sob controle do promotor da α-zeína de 19 kDa e aumentou os teores de lisina de 16,1% para 54,8% e a proteína total aumentou de 11,6% para 39% (% do peso do grão), comparando-se as plantas transformadas com o controle não transformado (YU et al., 2004). O milho transgênico Y642 obtido neste trabalho foi submetido a testes toxicológicos, e foram fornecidos na dieta de ratos durante 90 dias e, comparados com a linhagem QPM (Nongda 108) não transgênica. Os resultados não mostraram qualquer efeito negativo aos ratos alimentados com este milho transgênico, concluindo que este é um alimento nutritivo e seguro, assim como a linhagem QPM (HE et al., 2009). Em milho, além da expressão de proteínas de outras espécies vegetais, também foi relatado a expressão de uma proteína animal. A proteína do leite, α-lactoalbumina foi expressa no endosperma e resultou em incrementos de 29 a 47% nos níveis de lisina (BICAR et al., 2008).

A tecnologia do RNAi tem sido utilizada como uma ferramenta para melhorar a qualidade nutricional de plantas (TANG; GALILI, 2004). Huang e colaboradores (2004) utilizaram esta técnica para modificar a composição das proteínas de reserva de milho, tendo como alvo a α-zeína de 19 kDa Diferentes fragmentos isolados por PCR do gene da α-zeína de 19 kDa, foram inseridos num cassete de expressão na orientação senso e antisenso e utilizados para transformar embriões imaturos de milho através de bombardeamento. Os eventos transgênicos obtidos apresentaram redução de 30% no conteúdo da α-zeína de 19 kDa, resultando em incrementos nos aminoácidos metionina, lisina, triptofano e ácido aspártico e decréscimo de prolina e leucina.

Este trabalho sugere que os incrementos no conteúdo de aminoácidos essenciais são devido à redução das proteínas pobres nestes aminoácidos e a um possível efeito pleiotrópico do aumento das frações protéica ricas em aminoácidos essenciais, as não zeínas, uma vez que estas podem drenar o excesso de lisina para sua síntese. Firmando-se nesta hipótese, Huang e colaboradores (2006) em um trabalho subsequente, utilizaram novas construções expressando RNA fita dupla (dsRNA) a fim de aumentar a eficiência da supressão do gene e inseriram, além da α-zeína de 19 kDa, sequências da α-zeína de 22 kDa. Os resultados mostraram redução de ambas proteínas e aumento dos níveis de lisina e triptofano em função do aumento de síntese das proteínas não-zeínas, as quais apresentam conteúdo de aminoácidos balanceado. Os níveis de aminoácidos totais determinados no HPLC mostram valores de 5003 ppm e 4533 ppm em dois eventos de transformação, enquanto o genótipo não transformado apresentou valores de 2438 ppm. Este trabalho sugere que a inibição da síntese de zeínas pode ter aumentado a síntese e/ou transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento, porém, nenhuma análise complementar foi desenvolvida para investigar o aumento das outras proteínas de reserva, uma vez que houve redução das zeínas mais abundantes no endosperma e não houve alteração no conteúdo de proteína total do grão. Estes resultados seriam interessantes se utilizados para melhor compreender as alterações observadas e consequentemente, para futuras manipulações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para o presente trabalho, foram utilizadas sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) de seis linhagens geneticamente modificadas para a supressão da fração protéica C-hordeína, denominadas AsHorC (LANGE et al., 2007), obtidas e cedidas pelo "Danish Institute of Agricultural Sciences", Dinamarca; a cultivar Golden Promise que deu origem as linhagens transgênicas; um mutante para alta lisina Risø 1508 e a cultivar BRS Sampa, uma cultivar nacional fornecida pela EMBRAPA Trigo (Passo Fundo/RS).

Os materiais foram cultivados e multiplicados em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ-USP, Piracicaba, nos anos de 2009 e 2010.

A primeira etapa do trabalho foi a multiplicação e produção de sementes maduras para análise de proteínas de reserva e perfil de aminoácidos. Os materiais foram semeados em solo fértil com substrato orgânico inerte, na proporção 3:1, em vasos de 20 litros, contendo 5 sementes cada (Figura 4). Durante o estágio inicial de desenvolvimento foram selecionadas 3 plântulas para permanecerem no vaso. Foram utilizados 5 vasos para cada material distribuídos inteiramente ao acaso na casa de vegetação, uma vez que a espécie é uma planta tipicamente autógama, e apresenta taxa de fecundação cruzada menor que 0,01%. Foi realizada adubação de cobertura em 2 parcelas (40 e 55 dias após semeadura- início e final de perfilhamento), com sulfato de amônio totalizando 3 g por vaso, o equivalente a 63 Kg nitrogênio por hectare. A cultivar nacional BRS Sampa atingiu o ponto de colheita aproximadamente aos 120 dias, e os demais materiais entre 150 e 160 dias.

Nesta primeira etapa, também foram coletadas sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento, a partir da cultivar BRS Sampa, denominadas Estágios 1, 2 e 3, que representam na Escala de Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974) grão em leite fraco (código 73), grão leitoso pastoso (código 77) e grão em pasta média (código 85), respectivamente (Figura 5). As sementes foram colocadas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e armazenadas em freezer -70°C, para extração das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina com objetivo de determinar o estágio com maior atividade, para cada enzima estudada na espécie *Hordeum vulgare* L.

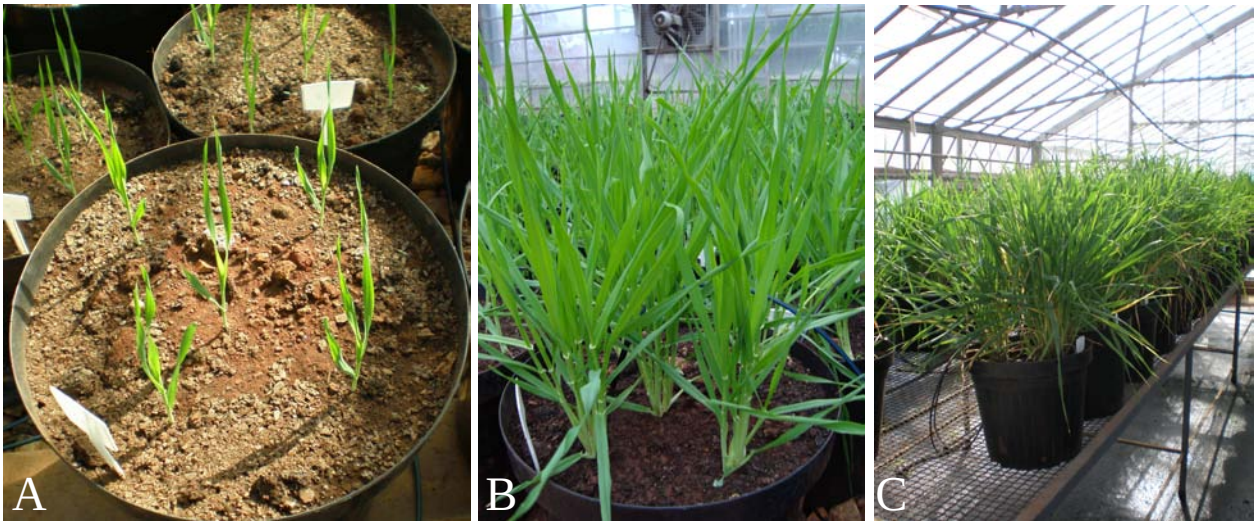

Figura 4 - Produção do material vegetal durante período vegetativo. A. Plântulas de cevada (15 dias após semeadura); B. Início do perfilhamento (40 dias após a semeadura); C. Final do perfilhamento (55 dias após semeadura)

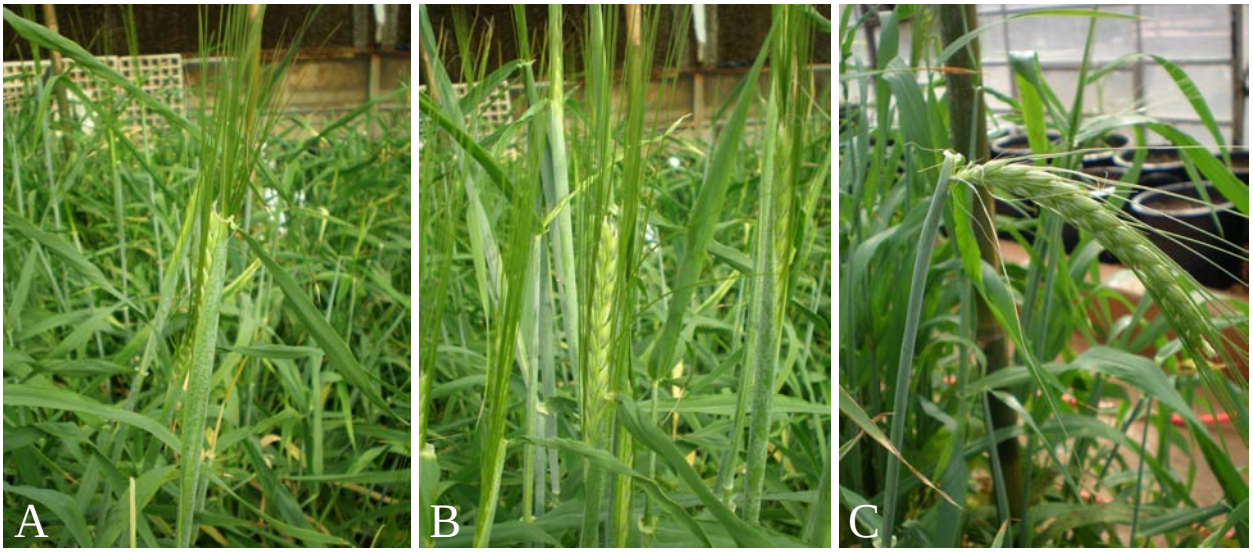

Figura 5 - Cultivar BRS Sampa durante o período de florescimento. A. Estágio 1 (grão em leite fraco); B. Estágio 2 (grão leitoso pastoso); C. Estágio 3 (grão em pasta média)

Na segunda etapa do trabalho, após determinado o estágio de desenvolvimento da semente adotado para as extrações enzimáticas, foram cultivados todos os materiais e sementes imaturas no Estágio 2 foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70°C até o momento da utilização. O cultivo do material vegetal nesta etapa foi conduzido como descrito anteriormente e utilizados 10 vasos para cada material distribuídos inteiramente ao acaso dentro da casa de vegetação.

3.2 Proteína total

Sementes maduras e completas (endosperma, embrião e casca) foram liofilizadas e trituradas para a obtenção de uma farinha fina e homogênea, a qual foi utilizada para análise de proteína total, proteínas de reserva e perfil de aminoácidos.

A determinação de proteína total foi realizada no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas na ESALQ/USP, com uso de 100 mg de farinha, com duas repetições. O método utilizado foi segundo Kjehdahl (AOAC, 1995), determinada o teor de nitrogênio total contido na amostra o qual se baseia na transformação do nitrogênio orgânico em sulfato de amônio através da digestão sulfúrica e posterior destilação na presença de hidróxido de sódio com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada através do processo de neutralização (MARTINS; REISSMANN, 2007). A correlação entre o teor de N total e a concentração de proteína da amostra foi feita através do uso de um fator de conversão, em que a % Proteína = conteúdo de N × 6,25 (AOAC, 1995).

3.3 Proteínas de reserva

3.3.1 Extração de proteínas de reserva

Para extração das proteínas de reserva, foi utilizado o método de Landry e Damerval (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000) descrito para milho, entretanto, utilizado para cevada (HELM et al., 2004).

Para a extração foram utilizados 100 mg de farinha, com 2 repetições. As amostras foram tratadas com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, deixadas para secar overnight. O hexano foi utilizado para solubilizar os lipídeos presentes na farinha e impedir que estes pudessem interferir na extração protéica.

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

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

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

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

A última fração protéica, a glutelina, foi obtida pela extração do pellet anterior com 1 mL de solução 0,5% (p/v) SDS, pH 10, contendo 0,6% 2-mercaptoetanol por 30 minutos à temperatura ambiente, repetido três vezes. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram misturados e armazenados.

3.3.2 Quantificação de proteínas

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

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

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante

comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto (LAEMMLI, 1970).

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

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

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

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

Para a coloração dos géis foi utilizado nitrato de prata. Após a corrida, o gel foi colocado em solução fixadora overnight contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético glacial, completando o volume para 50 mL com água destilada. Posteriormente, o gel foi colocado em solução incubadora por 15 minutos, contendo 3,4 g de acetato de sódio trihidratado, 15 mL de etanol, 0,2 g de tiossulfato de sódio e 260 μL de glutaraldeído 25%, completando o volume para 50 mL. Posteriormente o gel foi lavado por 45 minutos (3 x 15 minutos) com água destilada e incubado em solução de prata por 15 minutos, contendo 0,05 g de nitrato de prata e 10 μL de formaldeído, completando o volume para 50 mL com água destilada. O gel foi colocado em solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio e 5 μL de formaldeído, completando o volume para 50 mL de água destilada até aparecerem as bandas e posteriormente colocados em solução stop (0,73 g de EDTA em 50 mL de água destilada) para parar a reação de coloração

(BLUM; BEIER; GROSS, 1987). Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.3.4 Extração de aminoácidos de cada fração das proteínas de reserva

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

Para a hidrólise, foi utilizado 100 µg de proteína de cada fração protéica, com 2 repetições, e 40 µL de HCl 6 N, cálculo este realizado em função da proporção determinada de 4 mL de HCl para cada 10 mg de proteína. A mistura foi colocada em eppendorf de 1,5 mL e o volume foi completado com nitrogênio líquido para retirada do oxigênio. Os tubos foram colocados em banho seco a 110 ^{o}C durante 22 horas.

A proteína hidrolisada foi centrifugada a 9.000g durante 20 minutos, e o sobrenadante foi liofilizado. As amostras foram ressuspendidas em água Milli-Q, para posterior quantificação dos aminoácidos presentes no hidrolisado protéico, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.3.5 Separação e análise da composição de aminoácidos de cada fração protéica em HPLC

Os aminoácidos presentes nos hidrolisados protéicos foram separados e analisados em HPLC de fase reversa.

Para a separação dos aminoácidos foi utilizado uma coluna Spherisorb ODS-2 (C18) e um gradiente linear de eluição formados pelos tampões A (50 mM Na_2HPO_4 e 50 mM CH_3COONa pH 7,5 (ajustado com acido acético glacial) acrescidos de 20 mL de tetrahidrofurano, 20 mL de metanol para um volume final de 1 L) e tampão B (metanol 65%) num fluxo de 0,8 mL.min^{-1}. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção do tampão B em relação ao tampão A, de 20-100%.

Previamente a separação, os aminoácidos foram derivatizados com o reagente o-ofitdialdeído (OPA) (MARUR; SODEK; MAGALHÃES, 1994) e detectados na coluna por fluorescência.

Foram utilizados para a derivatização 10 μL do hidrolisado protéico e 30 μL do reagente OPA. Após exatamente 2 minutos foi injetado manualmente com auxílio de uma seringa 10 μL da mistura (aminoácidos + OPA) no HPLC.

Foi preparada uma solução estoque do reagente OPA-borato, contendo 50 mg de o-ofitdialdeído , 1 mL de metanol e 6,5 mL de tampão borato (ácido bórico 2,4% p/v) pH 9,5 (ajustado com NaOH). A solução de derivatização foi preparada adicionando somente na hora do uso 4 μL de 2-mercaptoetanol em 500 μL da solução estoque de OPA-borato.

A detecção dos derivados aminoácidos-OPA pelo monitor de fluorescência (Shimadzu RF350) foi feita ajustando-se o aparelho para o comprimento de onda de excitação de 250 nm e para o comprimento de onda de emissão de 480 nm.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparado-as aos picos de um padrão, (Amino Acid Standard Solution Sigma AA-S-18) calibrados para uma concentração de 125 $\eta mol.mL^{-1}$ de cada aminoácido que o compõe (aspartato, glutamato, serina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina).

3.4 Aminoácidos solúveis totais

3.4.1 Extração de aminoácidos solúveis totais

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

3.4.2 Dosagem de aminoácidos solúveis totais

A concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada segundo o método descrito por Yemm e Cocking (1955). A reação para a quantificação foi realizada em tubos de ensaio, os quais foram adicionados 1 mL da amostra (extração descrita anteriormente) previamente diluída em água destilada, 0,5 mL de tampão citrato de sódio 0,2 M (pH 5,0), 0,2 mL de reativo de ninidrina 5% em metilglicol e 1 mL de KCN 0,0002 M. Os tubos de ensaio foram tampados com bolas de vidro, para evitar perdas por evaporação e deixados em banho-maria a 100 °C por 20 min. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e adicionado 1,3 mL de etanol 60% em um volume final de 4 mL.

As concentrações de aminoácidos solúveis totais foram determinadas utilizando-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de leucina (40, 80, 120, 160 e 200 $\mu mol.mL^{-1}$) por regressão linear.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Perkin Elmer – Lambda 40) a 570 nm.

3.5 Enzimas envolvidas no metabolismo de lisina

Para cada enzima foi utilizado 25 g de sementes imaturas provenientes de uma amostragem composta, constituída por inflorescências (espigas) oriundas de plantas e vasos distintos. As inflorescências foram trituradas em moinho, com nitrogênio líquido para manter as amostras congeladas, até obtenção de um material com aspecto de farinha fina e homogênea. Para manter a homogeneidade do tamanho das partículas do material, todas as amostras foram moídas de maneira uniforme durante 1 minuto.

3.5.1 Enzimas envolvidas na síntese de lisina

3.5.1.1 Extração da AK

As sementes imaturas previamente moídas foram homogeneizadas com tampão de extração na proporção 1:2 (25 g de material para 50 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo. Foi utilizado tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM L-lisina, 2 mM L-treonina, 10% (v/v) glicerol, 0,1 mM PMSF e 5% (p/v) PVPP (AZEVEDO et al., 2003). Os extratos foram centrifugados a 9.000 g por 30 minutos. Os restos celulares precipitados foram descartados, o sobrenadante, denominado de

extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio. Todo o processo de extração foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.2 Precipitação com sulfato de amônio

O sulfato de amônio é um sal neutro freqüentemente utilizado para precipitação de proteínas, sendo um clássico de "*salting out*" (insolubilidade das proteínas em altas concentrações de sal). Partindo-se deste princípio de ação, a precipitação com sulfato de amônio é utilizada como primeiro passo de purificação de proteínas para remover grandes quantidades de proteínas contaminantes e concentrar proteínas em soluções diluídas, com a vantagem de não ter efeito adverso sobre a atividade enzimática.

Para este procedimento, sulfato de amônio sólido foi adicionado vagarosamente ao extrato enzimático e homogeneizado por agitação lenta (em agitador magnético) durante aproximadamente 30 minutos, até a completa dissolução do sal e posteriormente centrifugadas a 9.000 g durante 30 minutos. Todo o processo foi conduzido a 4 ^{o}C. O precipitado obtido foi armazenado em freezer a -70 ^{o}C.

Para o experimento de determinação de qual estágio de desenvolvimento da semente imatura obtinha-se maior atividade da enzima, foi utilizado extrato enzimático da cultivar BRS Sampa com faixa de saturação de 0-60% de sulfato de amônio. Depois de estabelecido o estágio, duas novas extrações idênticas (de um único estágio) foram realizadas. O extrato bruto de cada extração foi precipitado sequencialmente com quantidades crescentes de sulfato de amônio, em duas sequências distintas: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 0-30%, 30-50%, 50-70% de saturação.

3.5.1.3 Dessalinização das amostras

O precipitado obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 25 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT, 0,1 mM L-lisina, 0,1 mM L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

Foram utilizadas colunas Sephadex G-25 equilibradas com 5 vezes o volume da coluna com tampão de eluição. As amostras coletadas desta coluna foram utilizadas para a determinação da atividade específica de AK. Todo o processo foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.4 Ensaio enzimático da AK

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

O ensaio da atividade da AK foi conduzido num volume final de 500 µL de acordo com a metodologia de Teixeira et al (1998). A mistura do ensaio foi composta por 100 µL 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT e 20% (v/v) glicerol, 100 µL 250 mM ácido aspártico (pH 7,4), 50 µL 125 mM sulfato de magnésio, 50 µL 200 mM ATP (pH 7,4), 50 µL hidroxilamina 4 M (pH 7,4), 50 µL água destilada, 100 µL extrato enzimático. Controles contendo 50 µL L-lisina 100 mM, 50 µL L-treonina 100 mM e 50 µL L-lisina e L-treonina 100 mM, foram adicionados no ensaio para identificar possíveis isoenzimas sensíveis a lisina e treonina. Para o branco o substrato da enzima (ácido aspártico) foi substituído por água destilada. O ensaio foi iniciado pela adição do ATP e incubado por 60 minutos a 35 ^{o}C. A reação foi finalizada pela adição de 500 µL de cloreto férrico 670 mM contendo 370 mM HCl e 20% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). Para remoção dos precipitados protéicos formados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm (Perkin Elmer – Lambda 40), com três repetições.

3.5.1.5 Cálculo da atividade da AK

A quantidade de hidroxamato formado foi determinada em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de DL-aspartato-β-hidroxamato, por regressão linear, baseado na leitura em espectrofotômetro (Perkin Elmer – Lambda 40) a 505 nm. A atividade específica da enzima em $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ proteína, foi obtida dividindo-se a quantidade de hidroxamato formada na reação pela quantidade de proteína da amostra e pelo tempo de ensaio em minutos.

3.5.1.6 Extração da HSDH

As sementes imaturas previamente moídas foram homogeneizadas com tampão de extração na proporção 1:2 (25 g de material para 50 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo. Foi utilizado tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 mM L-treonina, 10% (v/v) glicerol, 0,1 mM PMSF e 5% (p/v) PVPP (AZEVEDO et al., 2003).

Os extratos foram centrifugados a 9.000 g por 30 minutos. Os restos celulares precipitados foram descartados, o sobrenadante, denominado de extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, seguindo exatamente o procedimento descrito para enzima AK (item 3.4.1.2). Todo o processo de extração foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.7 Dessalinização das amostras

O precipitado obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 mM L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

Foram utilizadas colunas Sephadex G-25 equilibradas com 5 vezes o volume da coluna com tampão de eluição. As amostras coletadas desta coluna foram utilizadas para a determinação da atividade específica de HSDH. Todo o processo foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.8 Ensaio enzimático da HSDH

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

A mistura de ensaio num volume final de 1 mL foi conduzido como descrito por Teixeira el al (1998). Foi utilizado 800 µL Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) contendo 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 100 µL homoserina 200 mM, 100 µL $NADP^+$ 4,8 mM e 100 µL extrato enzimático. Controle contendo 10 µL treonina 500 mM (concentração final de 5 mM) foi adicionado no ensaio para verificar o efeito deste aminoácido na atividade da enzima. No ensaio denominado branco, foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do $NADP^+$ sem a adição do substrato da enzima (homoserina) o qual foi substituído pelo tampão de ensaio Tris-HCl (pH 9,0).

A reação foi iniciada pela adição do co-fator $NADP^+$ e a absorbância a 340 nm determinada imediatamente após o início da reação (tempo inicial) e posteriormente incubadas por 30 minutos a 30 ^oC, e realizada novamente a leitura de absorbância após a incubação (tempo final). A atividade da enzima foi verificada pelo aumento na absorbância a 340 nm. O ensaio de cada amostra foi feito com 3 repetições.

3.5.1.9 Cálculo da atividade da HSDH

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

3.5.1.10 Extração da DHDPS

As sementes imaturas previamente moídas foram homogeneizadas com tampão de extração na proporção 1:2 (25 g de material para 50 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo. Foi utilizado tampão de extração 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1,4% (p/v) ácido ascórbico e 5% (p/v) PVPP. Os extratos foram centrifugados a 9.000 g por 30 minutos. Os restos celulares precipitados foram descartados, o sobrenadante, denominado de extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, seguindo

exatamente o procedimento descrito para enzima AK (item 3.4.1.2). Todo o processo de extração foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.11 Dessalinização das amostras

O precipitado obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 2 mM EDTA e 1,4% (p/v) ácido ascórbico. O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

Foram utilizadas colunas Sephadex G-25 equilibradas com 5 vezes o volume da coluna com tampão de eluição. As amostras coletadas desta coluna foram utilizadas para a determinação da atividade específica de DHDPS. Todo o processo foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.1.12 Ensaio enzimático da DHDPS

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

durante 10 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 520 nm (Perkin Elmer – Lambda 40), com três repetições.

3.5.1.13 Síntese do β-aspartato semialdeído (ASA)

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

3.5.1.14 Cálculo da atividade da DHDPS

A atividade da DHDPS foi determinada em unidades.mg^{-1} proteína, sendo que 1 unidade da atividade da enzima foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima que produz uma alteração na absorbância a 520 nm de 0,001.min^{-1}.mg^{-1} de proteína (WALLSGROVE; MAZELIS, 1980).

3.5.2 Enzimas envolvidas na degradação de lisina

3.5.2.1 Extração da LOR e SDH

As sementes imaturas previamente moídas foram homogeneizadas com tampão de extração na proporção 1:2 (25 g de material para 50 mL de tampão), em almofariz com auxílio de um pistilo. Foi utilizado tampão de extração 100 mM fosfato de potássio (pH 7,0), contendo 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10% (v/v) glicerol e 5% (p/v) PVPP (GAZIOLA et al., 1997). Os extratos foram centrifugados a 9.000 g por 30 minutos. Os restos celulares precipitados foram descartados, o sobrenadante, denominado de extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, seguindo exatamente o procedimento descrito para as enzimas de síntese de lisina (item 3.4.1.2). Todo o processo de extração foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.2.2 Dessalinização das amostras

O precipitado obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspendido em tampão de eluição 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT, 1 mM EDTA e 10% (v/v) glicerol. O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

Foram utilizadas colunas Sephadex G-25 equilibradas com 5 vezes o volume da coluna com tampão de eluição. As amostras coletadas desta coluna foram utilizadas para a determinação da atividade específica de LOR e SDH. Todo o processo foi conduzido a 4 ^{o}C.

3.5.2.3 Ensaio enzimático da LOR

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

O ensaio foi conduzido para um volume final de 900 µL, como descrito por Gaziola et al (1997). A mistura do ensaio foi composta por 720 µL 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 60 µL L-lisina 300 mM, 30 µL ácido α-cetoglutárico 300 mM (neutralizado com KOH), 30 µL NADPH 4,2 mM e 60 µL do extrato enzimático. A atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica da NADPH foi medida pelo ensaio sem adição do substrato lisina (branco). A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático e a absorbância a 340 nm foi determinada em espectrofotômetro (Milton Roy, Genesys 5) foi determinada imediatamente após o início da reação (tempo inicial) e posteriormente depois de incubadas por 15 minutos a 30 ^{o}C (tempo final). A atividade da enzima foi verificada pela queda na absorbância a 340 nm. O ensaio de cada amostra foi feito com 3 repetições.

3.5.2.4 Cálculo da atividade da LOR

Para obter a atividade da enzima foi calculada a diferença entre a absorbância no tempo inicial e absorbância no tempo final (após 15 minutos de incubação), descontando-se o branco. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de

1 ηmol de NADPH.min^{-1}, que representa uma queda na absorbância a 340 nm de 0,00622. A atividade específica da enzima foi descrita em ηmol de NADPH oxidado.min^{-1}.mg^{-1} de proteína, dividindo a quantidade de NADPH oxidado pelo tempo reação em minutos e pela quantidade de proteína presente na amostra.

3.5.2.5 Ensaio enzimático da SDH

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

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

3.5.2.6 Cálculo da atividade da SDH

O cálculo da atividade da SDH segue o mesmo procedimento descrito para LOR, descrito no item 3.4.2.4. A atividade específica da enzima foi descrita em ηmol de NAD^+ reduzido.min^{-1}.mg^{-1} de proteína.

3.5.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-denaturantes (PAGE)

A enzima SDH também foi estudada através de eletroforese em sistemas de tampão descontínuos e não desnaturantes, utilizando-se o sistema de mini-gel (Mini Protein II) da BioRad, como descrito no item 3.2.3 (LAEMMLI, 1970), com exceção do uso de SDS. A

concentração foi de 10% de poliacrilamida. Uma corrente constante de 15 mA foi aplicada a cada gel mantendo-se uma temperatura de 4 °C.

Após a corrida, o gel foi deixado em tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,4) a 4°C, até o momento da revelação. Uma solução de tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,4), contendo 4 mM de sacaropina; 2 mM de NAD^{+}, 0,05% (p/v) NBT (tetrazólio nitro-azul) e 0,1 mM de fenazina metassulfato foi utilizada para a incubação do gel, sob suave agitação, no escuro, por 30 minutos a 30 °C (GAZIOLA et al., 1997). A visualização da banda é devido à reação do NADH formado durante a atividade da enzima, com os sais de tetrazólio originando a formazona de coloração azul-avermelhada. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

4 RESULTADOS

4.1 Proteína Total

A extração das proteínas foi realizada com sementes maduras completas provenientes de um *pool* com aproximadamente 50 sementes, com duas repetições. Os materiais transgênicos (L1, L2, L3, L4, L5, L6) representam seis diferentes eventos de transformação e encontravam-se na geração T2. O controle não transformado (C) é a cultivar Golden Promise, uma cultivar de cevada amplamente cultivada nos países de clima frio. O mutante natural para alta lisina é Risø 1508 (M), caracterizado pela presença do alelo *lys3a* que reduz em 70% o conteúdo de hordeínas. A cultivar BRS Sampa (BRS) é um material de cevada adaptado e recomendado para as condições climáticas do estado de São Paulo e foi utilizada em todas as análises bioquímicas preliminares.

A Figura 6 apresenta o teor de proteína total em % ($g.100g^{-1}$ de matéria seca), em que os dados variaram entre 14,51 a 22,48% para L4 e o controle não transformado, respectivamente. Todos os materiais transgênicos apresentaram redução no teor de proteína total comparado com o controle não transformado. A cultivar BRS Sampa apresentou o menor teor com 13,48%.

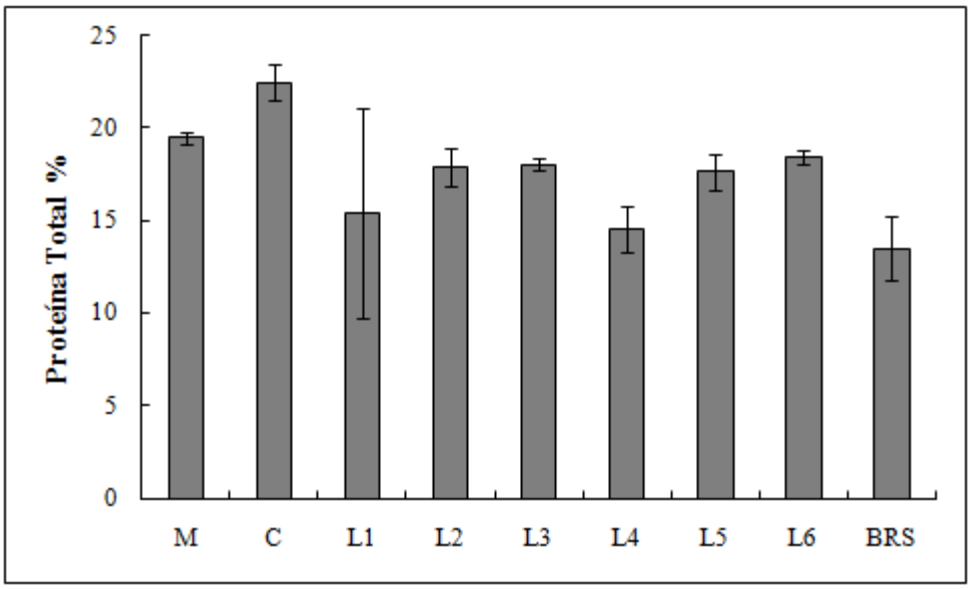

Figura 6 - Teor de proteína total expresso em %. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

4.2 Proteínas de Reserva

Para a extração das proteínas de reserva foi utilizado farinha proveniente do mesmo *pool* de sementes da análise anterior.

A concentração total de proteínas foi maior no mutante Risø 1508 (4,96 $mg.mL^{-1}$), seguido pelo controle não transformado (3,39 $mg.mL^{-1}$), os materiais transgênicos (3,03 a 3,33 $mg.mL^{-1}$) e a cultivar BRS Sampa (2,62 $mg.mL^{-1}$) (Tabela 3).

Em relação à distribuição das proteínas de reserva, foram analisados os valores relativos. A maior diferença observada foi na fração das prolaminas I. No mutante Risø 1508 esta fração representa apenas 5,22% do total de proteínas de reserva, enquanto que no controle não transformado essa fração chegou a 24,63%. Em relação aos materiais transgênicos essa proporção variou de 20,11 a 23,18%, valores inferiores ao encontrado para o controle não transformado. A segunda fração que apresentou grandes diferenças foi a glutelina, que representa 59,12% no mutante Risø 1508 e 47,77% no controle não transformado. Todos os materiais transgênicos apresentaram valores superiores ao controle não transformado para as glutelinas, variando de 48,80 a 50,88%. A fração globulina também aparece em maiores proporções no mutante Risø 1508 (24,79%) quando comparada com o controle não transformado (14,32%), entretanto, apenas os eventos L1, L2 e L4 apresentaram valores superiores (15,60%, 16,60% e 15,73%, respectivamente). A fração prolamina II apresentou pouca variação nos materiais, com menor valor para o mutante Risø 1508 (7,01%) e o maior para BRS Sampa (10,62%). Os materiais transgênicos e o controle não transformado apresentaram variação dentro desta faixa e mostraram valores próximos entre si. A fração albumina variou de 3,29% (BRS) a 5,43% (L5). Todos os materiais transgênicos apresentaram valores inferiores ao controle não transformado (4,68%) com exceção para L5.

Tabela 3 - Concentração das proteínas de reserva de sementes maduras de cevada expressos em $mg.mL^{-1}$ e a proporção relativa em %. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Globulina		Albumina		Prolamina I		Prolamina II		Glutelina		Total
	$mg.mL^{-1}$	%	$mg.mL^{-1}$	%	$mg.mL^{-1}$	%	$mg.mL^{-1}$	%	$mg.mL^{-1}$	%	$mg.mL^{-1}$
M	1,23	24,79	0,19	3,86	0,26	5,22	0,35	7,01	2,93	59,12	4,96
C	0,49	14,32	0,16	4,68	0,84	24,63	0,29	8,60	1,62	47,77	3,39
L1	0,51	15,60	0,14	4,21	0,71	21,76	0,27	8,38	1,64	50,04	3,27
L2	0,55	16,60	0,13	3,90	0,67	20,11	0,31	9,23	1,67	50,16	3,33
L3	0,45	13,70	0,13	4,02	0,74	22,76	0,31	9,32	1,64	50,19	3,27
L4	0,48	15,73	0,12	4,10	0,68	22,54	0,27	8,83	1,48	48,80	3,03
L5	0,41	12,91	0,17	5,43	0,70	21,71	0,30	9,51	1,62	50,44	3,20
L6	0,47	14,14	0,13	3,86	0,78	23,18	0,27	7,94	1,71	50,88	3,36
BRS	0,51	19,54	0,09	3,29	0,52	20,01	0,28	10,62	1,22	46,54	2,62

4.3 Perfil protéico por SDS-PAGE

A análise do perfil protéico realizada por SDS-PAGE e revelou alterações no padrão de proteínas em todas as frações protéicas (presença e ausência de bandas) entre o mutante Risø 1508, o controle não transformado e a cultivar BRS Sampa. Entretanto, quando comparou-se o controle não transformado com as linhagens transgênicas, apenas diferenças na intensidade das bandas foram observadas, o que significada que pode ter ocorrido uma superexpressão ou inibição de proteínas específicas.

Na fração globulina foi possível visualizar proteínas com massas moleculares variando entre 9,80 kDa e 120 kDa (Figura 7). Esta fração apresentou as menores diferenças entre os materiais estudados. O controle não transformado e os materiais transgênicos apresentaram o maior número de bandas, totalizando 31. A proteína próxima de 41 kDa e 61 kDa apresentaram diminuição na intensidade nos materiais transgênicos. O mutante Risø 1508 apresentou a inibição de seis bandas (próximas de 95 kDa, 70 kDa, 61 kDa, 36 kDa, 26 kDa e 14 kDa) e a cultivar BRS Sampa quatro bandas (próximas de 68 kDa, 36 kDa, 32 kDa e 26 kDa).quando comparados com o controle não transformado.

A fração albumina apresentou proteínas com massa molecular variando entre 10 kDa e 73 kDa totalizando 23 polipeptídios (Figura 8). O controle não transformado e os materiais transgênicos exibiram 17 bandas. Foi observada maior intensidade nas bandas próximas de 10 kDa, 15 kDa, 40 kDa, 46 kDa e 49 kDa em L2, L3, L4 e L5. O mutante Risø 1508 totalizou 19

proteínas, mas com perfil de expressão diferenciado. As bandas próximas de 64 kDa, 62 kDa, 40 kDa e 16 kDa aparecem no mutante, e as bandas próximas de 60 kDa, 57 kDa, 39 kDa, 37 kDa, 25 kDa e 17kDa aparecem no controle não transformado e nos materiais transgênicos. A cultivar BRS Sampa também apresentou 19 proteínas com variação nas proteínas presentes.

O grupo das prolaminas I (Figura 9) e II (Figura 10) apresentou a maior variabilidade de expressão entre o mutante Risø 1508 e os demais materiais. No mutante Risø 1508, as alterações nesta fração protéica, tanto quantitativas, (alteração na intensidade da banda) e qualitativas (ausência e presença de bandas) podem explicar parcialmente o acúmulo de lisina nesses materiais, uma vez que as prolaminas são pobres em lisina e são as principais proteínas presentes nos grãos de materiais normais.

A fração prolamina I apresentou o menor número de bandas. Foram observadas cinco para a cultivar BRS Sampa, quatro para o mutante Risø 1508 e três para os demais materiais, variando entre 15 kDa e 50 kDa. Esta fração englobou os subgrupos B e C hordeínas (Figura 9). É interessante ressaltar que as proteínas presentes no mutante Risø 1508 diferem completamente daquelas presentes nos demais materiais. As bandas próximas de 50 kDa, 38 kDa, 17 kDa e 15 kDa são encontradas apenas presentes no mutante, enquanto que as bandas de 48 kDa, 39 e 35 kDa estão presentes no demais materiais. Nos materiais transgênicos, observou-se maior intensidade nas bandas próximas de 48 kDa e 35 kDa, que são proteínas pertencentes ao subgrupo das B hordeínas. Na cultivar BRS Sampa foi possível visualizar 5 proteínas, três presentes no controle não transformado (48 kDa, 39 kDa, 35 kDa) e duas presente no mutante Risø 1508 (17 kDa e 15 kDa). Essas proteínas de baixo peso molecular pertencem ao subgrupo γ hordeínas.

Nas prolaminas II (Figura 10) foi possível visualizar 10 bandas no mutante Risø 1508, 13 no controle não transformado e nos materiais transgênicos, 11 na cultivar BRS Sampa, com polipeptídios variando entre 15 kDa a 100 kDa. Esta fração englobou todas os subgrupos das prolaminas, as γ hordeinas representadas por proteínas de baixo peso molecular (10 kDa a 16 kDa), as B hordeínas que são aquelas de 30 a 46 kDa, as C hordeínas que variam de 50 kDa a 80 kDa e as D hordeínas que apresentam massa molecular em torno de 100 kDa. Além disso, algumas proteínas podem pertencer à fração globulina que não foram solubilizadas no seu extrator, uma vez que este não possui um agente capaz de romper ligações fortes que mantém a proteína em uma estrutura não passível de solubilização, como por exemplo, pontes dissulfeto. Já

no extrator das prolaminas II além da solução salina este agente faz parte da sua composição. No mutante foi observado a ausência das bandas de 100 kDa, 60 kDa, 48 kDa e 32 kDa. As bandas de 65 kDa e 70 kDa foram inibidas nos materiais transgênicos em relação ao controle não transformado segundo com Lange e colaboradores (2007). Entretanto, essa diferença de intensidade no presente trabalho não foi claramente visualizada (Figura 10), possivelmente devido à composição do extrator, as condições de corrida, ou até mesmo a farinha obtida para a extração, uma vez que foi utilizada a semente inteira (com casca retirando apenas o excesso), diferentemente do trabalho citado, em que apenas o endosperma foi utilizado. A cultivar BRS Sampa apresentou grande variação de perfil comparada com os demais materiais, tanto na intensidade quanto na ausência/presença de bandas apesar do número de bandas ser muito semelhante aos demais materiais.

A fração glutelina (Figura 11) foi composta por nove proteínas no mutante Risø 1508, 14 no controle não transformado e nos materiais transgênicos, 13 na cultivar BRS Sampa, com massas moleculares variando entre 10 kDa e 100 kDa. As bandas de 80 kDa, 58 kDa, 49 kDa, 40 kDa e 33 kDa estão ausentes no mutante Risø 1508 e presentes nos demais materiais. A banda de 39,5 kDa (presente no mutante Risø 1508) e a banda de 57 kDa (presente na cultivar BRS Sampa) estão ausentes no controle não transformado e nos materiais transgênicos. As bandas de 70 kDa e 19 kDa estão ausentes na cultivar BRS Sampa e no mutante Risø 1508. As demais proteínas são comuns a todos os materiais. Os materiais transgênicos exibiram maior intensidade nas bandas de 100 kDa, 70 kDa e 19 kDa em relação ao controle não transformado, interessantemente, as mesmas bandas ausentes no mutante Risø 1508.

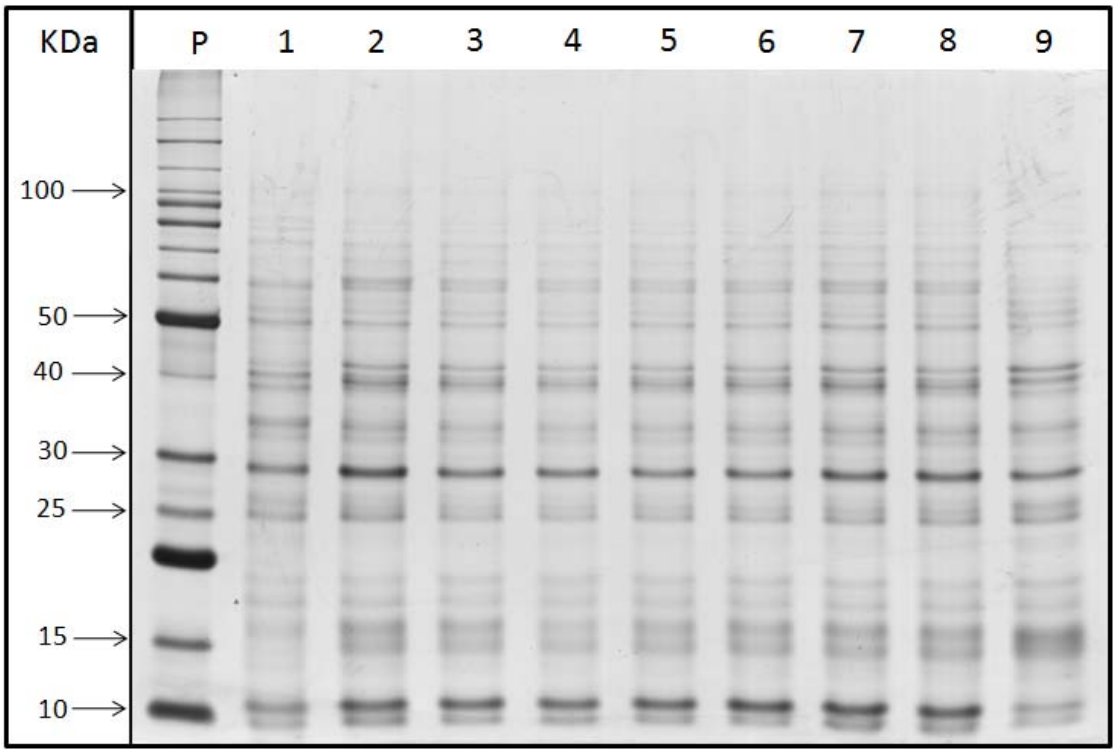

Figura 7 - SDS-PAGE da fração Globulina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa

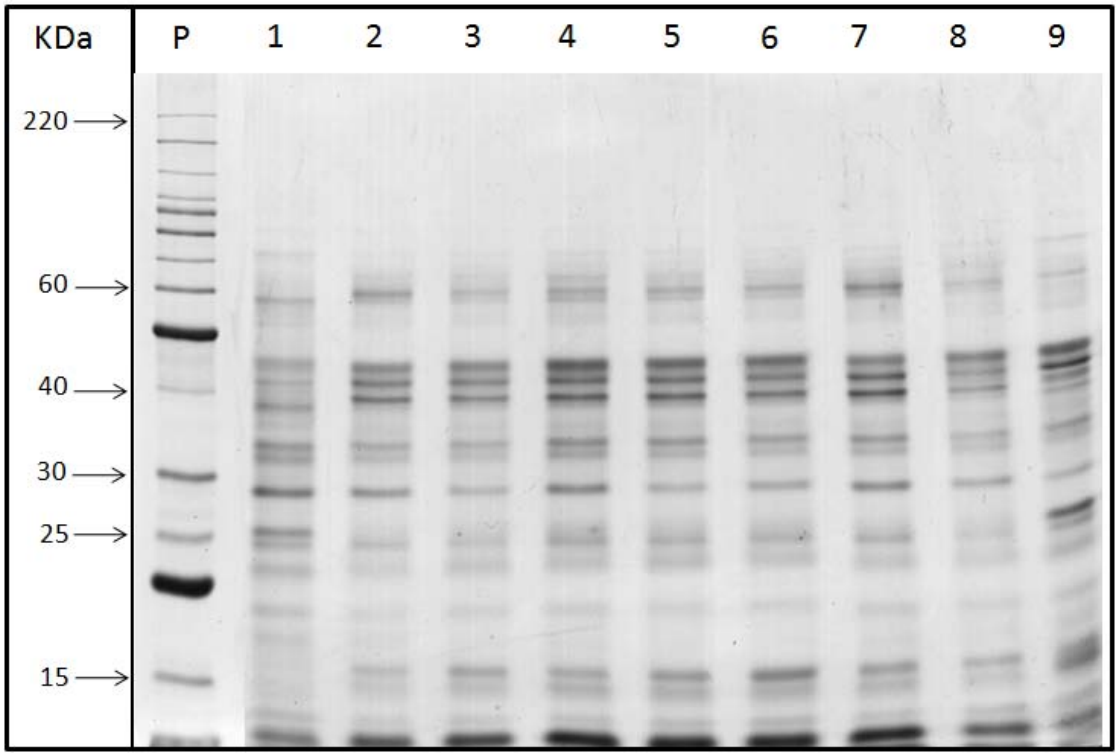

Figura 8 - SDS-PAGE da fração Albumina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa

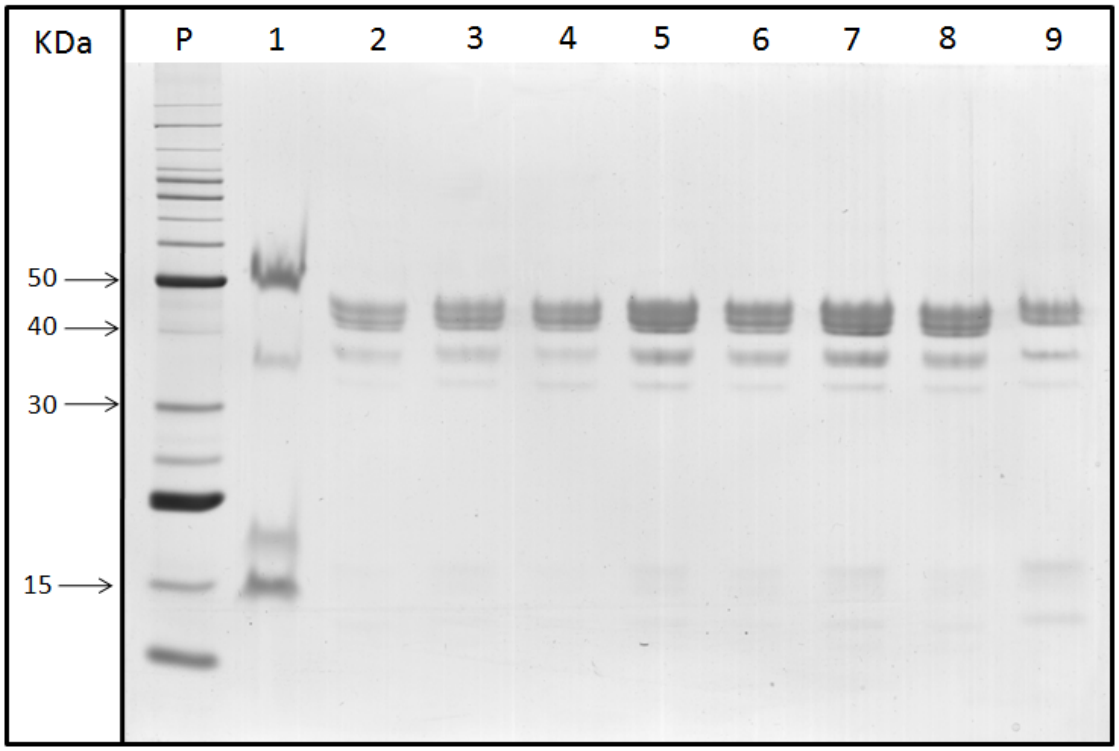

Figura 9 - SDS-PAGE da fração Prolamina I. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa

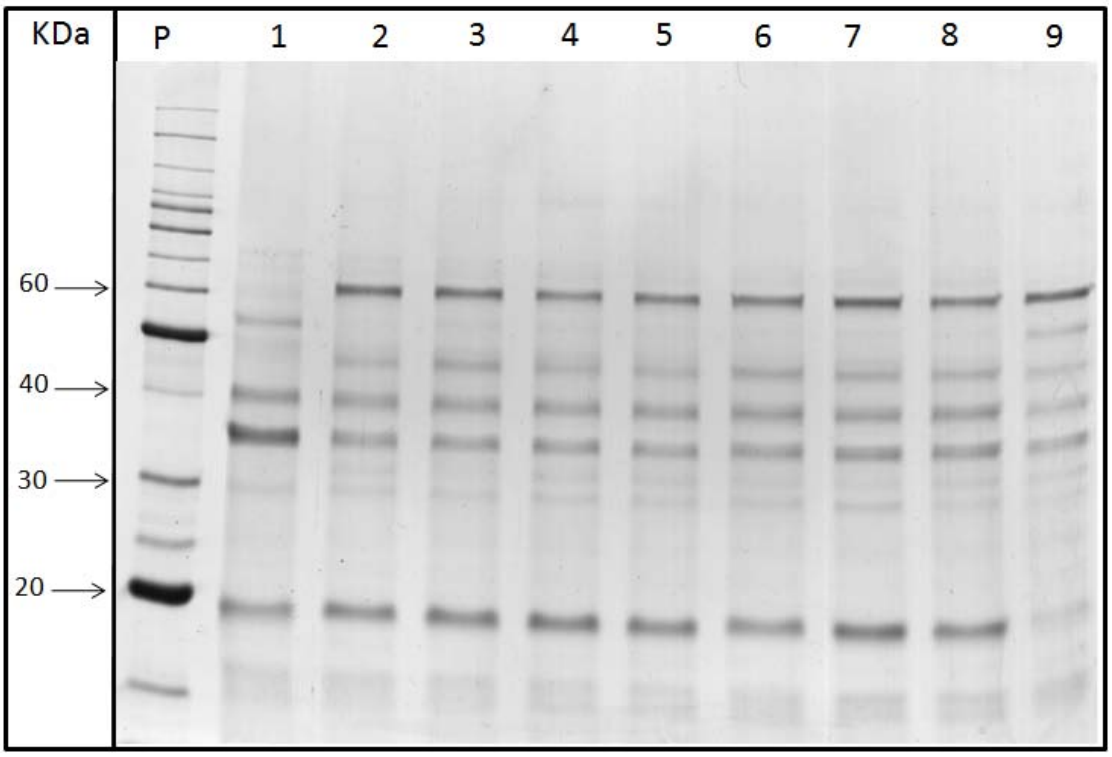

Figura 10 - SDS-PAGE da fração Prolamina II. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa

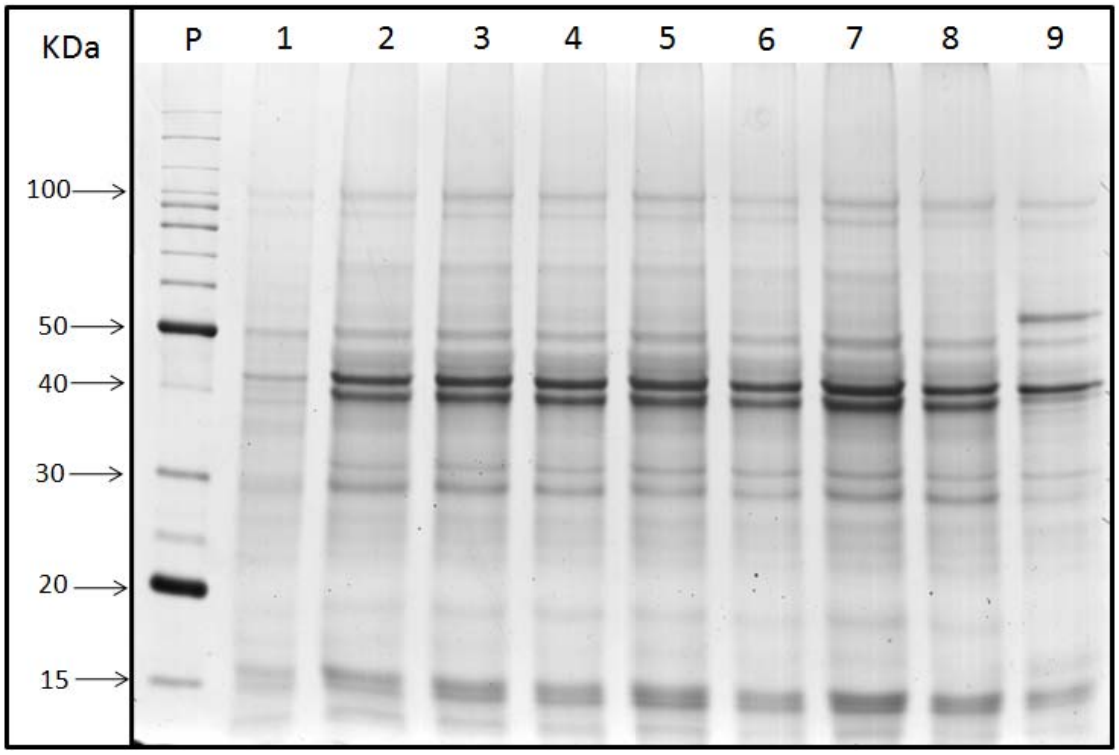

Figura 11 - SDS-PAGE da fração Glutelina. P. Padrão BSA; 1. Mutante Risø 1508; 2.Controle não transformado; 3-8. Linhagens transgênicas AsHorC; 9. Cultivar nacional BRS Sampa

4.4 Composição de aminoácidos em cada fração protéica

Foi observada variação na composição de aminoácidos entre as frações protéicas e também entre os diferentes materiais estudados. As frações globulina, albumina e glutelina contêm altos níveis de lisina, por outro lado as prolaminas são ricas em aminoácidos não essenciais principalmente glutamato/glutamina.

Na fração globulina os aminoácidos predominantes foram o aspartato/asparagina, glutamato/glutamina e arginina (Tabela 4). O conteúdo total de aminoácidos variou de 52,88 a 91,59 $mg.g^{-1}$ de proteína, na cultivar BRS Sampa e no mutante Risø 1508, respectivamente. O maior conteúdo de aminoácidos encontrado no mutante foi devido a observação que quantidades superiores de todos os aminoácidos, principalmente de lisina, que apresentou valores 24,11%, 34,68% e 53,74% superior no mutante quando comparado com o controle não transformado, os materiais transgênicos e a cultivar BRS Sampa, respectivamente. O controle não transformado apresentou conteúdo total de aminoácidos de 73,53 $mg.g^{-1}$ de proteína, valor este inferior a todos os materiais transgênicos. Os incrementos observados foram causados principalmente pelo aminoácido metionina, que apresentou aumentos de até 142,56% nos materiais transgênicos. Os

demais aminoácidos da via metabólica do ácido aspártico (lisina, treonina e isoleucina) não apresentaram alterações significativas.

Os aminoácidos glutamato/glutamina, aspartato/asparagina, arginina, lisina e alanina apresentaram as maiores proporções na fração albumina (Tabela 5). Esta fração contabilizou concentração total de aminoácidos superior a fração globulina, com valores de 84,71 $mg.g^{-1}$ de proteína a 151,19 $mg.g^{-1}$ de proteína na cultivar BRS Sampa e no mutante Risø 1508, respectivamente. Comparando-se todos os materiais com o mutante Risø 1508 foi possível identificar que os aminoácidos arginina, lisina e aspartato/asparagina foram os principais responsáveis pelo maior conteúdo de aminoácidos no mutante, com incrementos de 57,74-73,59%, 50,33-69,28% e 23,51-28,84%, respectivamente, e incrementos menores foram observados nos demais. A cultivar BRS Sampa apresentou o menor conteúdo para todos os aminoácidos. O controle não transformado apresentou conteúdo total de aminoácidos de 109,67 $mg.g^{-1}$ de proteína, enquanto que nos materiais transgênicos os valores foram inferiores, variando de 86,80 a 104,17 mg.g-1 de proteína, exceto para o evento L5. Essa redução foi ocasionada principalmente pela diminuição no conteúdo de serina, arginina, alanina, tirosina, e os aminoácidos da via do ácido aspártico, treonina (neste caso contabilizado juntamente com a glicina), isoleucina e metionina. No entanto, o conteúdo de lisina nos materiais transgênicos aumentou de 29,90% a 101,04 %.

Na composição de aminoácidos da fração prolamina I predominam os aminoácidos glutamato/glutamina, fenilalanina, leucina, tirosina e serina (Tabela 6). Esta fração é a mais pobre em lisina com teores que não ultrapassam 2,88 $mg.g^{-1}$ de proteína, concentração esta podendo ser até 10 vezes menor quando comparado com a fração glutelina, que será discutida posteriormente. O conteúdo total de aminoácidos foi de 71,11 a 116,24 mg.g-1 de proteína, no mutante Risø 1508 e na linhagem transgênica L6, respectivamente O menor conteúdo total de aminoácidos no mutante Risø 1508 foi devido aos menores níveis de todos os aminoácidos, inclusive lisina. Entretanto, o baixo nível de lisina nesta fração é compensado com incrementos em todas as demais frações, e também de lisina livre, mas esta fração ocorre em pequenas proporções no conteúdo total de proteínas de reserva, não afetando os altos níveis de lisina encontrados nesses materiais. Na cultivar BRS Sampa, mais uma vez o conteúdo de todos os aminoácidos foi menor, com exceção de alguns aminoácidos comparando-se com o mutante, porém em pequenas proporções. Todas as linhagens transgênicas apresentaram maior conteúdo total de aminoácidos,

comparado com o controle não transformado. Além deste incremento, observou-se uma melhoria na qualidade desta fração protéica, com aumento dos quatro aminoácidos essenciais formados a partir da via metabólica do ácido aspártico: isoleucina, treonina, metionina e lisina. Diferentemente da fração albumina, em que nos materiais transgênicos ocorreram grandes incrementos no conteúdo de lisina e a redução nos outros três aminoácidos da via, nas prolaminas houve um aumento dos quatro aminoácidos, porém em menores proporções quando avaliados individualmente: 2,96 a 14,77% para isoleucina, 5,04 a 22,60% para treonina, 13,57 a 45,38% para metionina e 1,79 a 49,13% para lisina. Além disso, nesses materiais foram observados pequenos incrementos nos aminoácidos glutamato/glutamina, serina e glicina.

A fração prolaminas II apresentou maiores teores de lisina quando comparada com as prolaminas I. Isso ocorreu porque a extração das prolaminas I solubiliza principalmente B e C hordeínas, que são os subgrupos mais pobres em lisina (Tabela 2), enquanto que nas prolaminas II a extração engloba todas as hordeínas, principalmente um grande número de γ hordeínas que é o subgrupo que apresentam o maior conteúdo de lisina (oito vezes superior a C hordeína, e 3,2 vezes superior a B hordeína) e possivelmente algumas proteínas pertencentes à fração globulina, resultando em maiores níveis de lisina. Os aminoácidos predominantes nesta fração foram glutamato/glutamina, arginina e aspartato/asparagina. O conteúdo total de aminoácidos variou de 60,51 a 95,30 $mg.g^{-1}$ de proteína, na linhagem transgênica L6 e no controle não transformado, respectivamente (Tabela 7). O menor conteúdo total de aminoácidos nas linhagens transgênicas foi ocasionando principalmente por reduções nos teores de isoleucina, fenilalanina, tirosina, arginina e leucina, ao redor de 15% a 47 %. Os demais aminoácidos sofreram alterações em menores proporções entre as linhagens transgênicas, como por exemplo, a lisina teve redução de 7,45% a 25,47%, nas linhagens transgênicas L1 e L3, respectivamente. A cultivar BRS Sampa mais uma vez apresentou os menores teores de aminoácidos essenciais, principalmente lisina com teores cerca de 50% menores quando comparado com os demais materiais.

A fração glutelina exibiu maior conteúdo total de aminoácidos, com valores variando entre 132,15 e 351,83 $mg.g^{-1}$ de proteína para o mutante Risø 1508 e para a linhagem transgênica L1, respectivamente. Além disso, foi observado os maiores níveis de lisina (em torno de 20 $mg.g^{-1}$ de proteína) e outros aminoácidos essenciais (Tabela 8). As linhagens transgênicas apresentaram alterações no conteúdo total de aminoácidos quando comparados com o controle não transformado, mas essas foram divergentes entre os diferentes materiais. As linhagens L1 e

L5 apresentaram aumento de 6,22% e 34,61%, respectivamente, por outro lado as demais linhagens apresentaram redução, variando de 2,84% a 18,87%. De maneira semelhante os teores de lisina foram alterados para os diferentes transgênicos (exceto L2), porém não nas mesmas proporções. L1 apresentou aumento de 46,47%, enquanto que para as linhagens L2 e L5 ocorreram incrementos mais discretos, 5,97% e 5,04% respectivamente. As linhagens L3, L6 e L4 apresentaram redução nos teores de lisina de 7,18%, 12,01% e 19,52%, respectivamente. Além disso, os outros três aminoácidos da via do ácido aspártico, a isoleucina, metionina e treonina acompanharam as alterações que ocorreram no aminoácido lisina em proporções muito semelhantes, com exceção para L5 para metionina e L3 para treonina. A cultivar BRS Sampa apresentou conteúdo total de aminoácidos semelhante ao controle não transformado e os materiais transgênicos.

É interessante salientar que apesar da enorme diferença no conteúdo total de aminoácidos desta fração (cerca de três vezes menor) no mutante Risø 1508, este material é rico em lisina devido ao balanço de aminoácidos essenciais/não essenciais em todas as cinco frações protéicas estudadas, apresentando sempre elevados níveis de lisina, portanto, sem haver a necessidade de efeitos compensatórios em outras frações. A qualidade nutricional deste material é facilmente observada nas prolaminas, em que os teores dos aminoácidos não essenciais, como a serina são cinco vezes menores, a tirosina é três vezes menor e os aminoácidos glutamato/glutamina, aspartato/asparagina, arginina, alanina são em torno de duas vezes menores que os demais materiais.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos totais na fração Globulina expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Globulina																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asx[1]	10,84	±0,27	8,53	±1,47	9,16	±0,50	9,64	±0,61	8,41	±0,12	8,69	±0,81	8,77	±0,66	8,68	±0,71	7,12	±1,06
Glx[2]	12,93	±0,11	11,75	±1,06	11,82	±0,41	12,35	±0,46	12,61	±0,29	12,74	±0,47	11,72	±0,68	11,97	±0,06	9,34	±1,32
Ser	3,80	±0,35	3,06	±1,27	3,28	±0,64	3,69	±0,69	3,24	±0,52	3,48	±0,16	2,95	±0,43	3,26	±0,39	2,33	±0,58
His	3,28	±0,22	1,80	±0,57	2,19	±0,45	2,92	±0,33	2,26	±0,09	2,42	±0,83	1,92	±0,23	2,24	±0,06	1,12	±0,16
Gly	5,78	±0,16	4,82	±1,03	5,64	±0,14	5,28	±0,82	4,57	±0,21	5,11	±0,55	5,50	±0,93	5,51	±0,84	3,51	±0,86
Treo	4,30	±0,57	4,01	±0,85	3,78	±0,72	3,72	±0,42	4,04	±0,16	4,07	±0,03	3,67	±0,73	4,24	±0,22	2,92	±0,71
Arg	11,75	±0,37	7,41	±2,34	7,45	±0,90	8,17	±0,67	7,92	±0,84	8,93	±0,57	7,32	±1,24	7,82	±0,48	5,01	±1,12
Ala	7,07	±0,04	6,69	±0,51	6,75	±0,24	7,12	±0,20	7,45	±0,25	7,85	±0,14	6,86	±0,47	7,01	±0,14	5,18	±1,13
Tyr	3,11	±0,01	2,61	±0,66	2,78	±0,20	2,77	±0,04	2,83	±0,42	2,99	±0,59	2,65	±0,32	2,79	±0,08	2,08	±0,47
Met	1,20	±0,24	0,63	±0,11	1,29	±0,25	0,84	±0,31	1,53	±0,16	0,62	±0,07	1,14	±0,16	0,94	±0,05	0,50	±0,04
Val	5,12	±0,03	4,09	±1,11	4,53	±0,58	4,88	±0,42	4,09	±0,17	4,43	±0,74	4,28	±0,59	4,53	±0,61	2,50	±0,48
Phe	6,42	±0,10	4,95	±1,20	3,58	±0,47	4,09	±0,25	4,84	±0,07	4,95	±0,94	4,55	±1,02	5,02	±0,28	2,87	±0,51
Ile	3,28	±0,02	2,45	±0,86	2,63	±0,51	2,86	±0,31	2,14	<0,01	2,29	±0,56	2,48	±0,36	2,72	±0,57	1,51	±0,25
Leu	7,14	±0,07	6,49	±1,39	6,76	±0,66	7,32	±0,58	6,91	±0,44	7,19	±0,21	6,52	±0,82	6,97	±0,48	4,31	±0,88
Lys	5,58	±0,31	4,23	±0,58	3,82	±0,49	3,64	±0,13	4,94	±0,41	4,91	±0,56	3,93	±0,91	4,95	±0,05	2,58	±0,30
Total	91,59		73,53		75,47		79,28		77,78		80,66		74,25		78,66		52,88	

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamato

Tabela 5 - Composição de aminoácidos totais na fração Albumina expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Albumina																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asx[1]	20,26	±0,68	14,42	±0,21	14,77	±1,60	15,34	±0,48	13,38	±4,40	15,12	±0,57	14,95	±0,40	15,49	±1,42	14,53	±2,15
Glx[2]	26,40	±1,19	25,27	±1,74	21,96	±2,09	24,17	±2,82	22,94	±2,53	22,64	±0,24	23,99	±2,04	25,68	±2,90	20,69	±1,72
Ser	9,17	±2,45	7,01	±1,23	4,90	±0,88	5,91	±2,23	5,60	±0,74	5,32	±0,55	7,00	±2,06	6,21	±1,34	4,59	±0,13
His	5,94	±0,82	4,11	±0,44	2,93	±0,11	3,92	±0,99	4,02	±0,75	3,88	±0,78	4,44	±0,77	3,37	±0,14	3,03	±0,80
Gly+Treo	7,81	±0,50	6,94	±0,81	4,91	±0,77	6,04	±0,96	5,67	±1,45	5,72	±0,15	6,78	±0,96	6,20	±0,67	5,22	±0,47
Arg	21,03	±1,95	8,89	±1,41	5,55	±0,69	6,71	±2,13	6,25	±1,83	6,17	±0,29	7,06	±0,53	6,98	±0,75	5,55	±0,33
Ala	11,31	±1,33	8,57	±0,39	6,30	±1,18	6,82	±1,40	7,26	±1,28	7,16	±0,26	8,64	±1,80	7,75	±0,99	6,12	±0,28
Tyr	7,94	±0,31	6,09	±0,49	4,39	±0,52	5,39	±1,81	4,58	±2,23	5,06	±0,31	4,58	±0,64	5,44	±0,17	4,71	±0,85
Met	1,43	±0,38	1,22	±0,10	0,61	±0,01	0,87	±0,18	0,90	±0,30	0,98	±0,14	1,16	±0,29	0,89	±0,05	0,95	±0,04
Val	6,72	±1,92	4,09	±0,95	3,30	±0,39	4,13	±1,49	4,39	±0,31	3,67	±0,22	5,18	±1,77	4,10	±0,18	2,82	<0,01
Phe	8,39	±1,63	6,00	±0,34	5,53	±0,37	8,67	±2,91	7,84	±1,84	6,48	±0,50	9,12	±2,73	6,75	±1,47	5,05	±0,14
Ile	3,10	±0,44	2,46	±0,73	2,09	±0,12	2,90	±1,09	2,95	±0,27	2,47	±0,35	3,49	±1,23	2,59	±0,27	2,00	±0,06
Leu	12,06	±2,61	9,81	±0,22	7,28	±1,21	8,87	±2,99	8,70	±1,31	7,96	±0,26	10,37	±2,90	9,05	±0,52	6,50	±0,20
Lys	9,63	±1,50	4,78	±0,23	2,28	±0,39	4,17	±0,18	4,58	±0,52	3,89	±0,05	4,48	±0,36	3,66	±0,27	2,96	±0,96
Total	151,19		109,67		86,80		103,92		99,07		96,51		111,24		104,17		84,71	

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamato

Tabela 6 - Composição de aminoácidos totais na fração Prolamina I expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Prolamina I																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asx[1]	5,05	±0,41	3,75	±1,77	4,37	±0,01	5,18	±1,21	4,83	±0,26	4,23	1±,84	4,84	±0,57	5,10	±0,10	3,67	±1,55
Glx[2]	13,10	±0,05	13,20	±5,06	16,06	±0,19	16,51	±1,13	15,85	±0,17	14,93	±2,37	14,86	±1,55	16,63	±0,26	14,23	±2,79
Ser	6,06	±0,46	6,23	±2,77	8,34	±0,66	8,77	±0,84	7,22	±0,29	7,02	±2,60	8,11	±0,32	9,01	±0,39	6,08	±3,14
His	1,70	±0,23	3,47	±0,81	3,69	±0,64	4,35	±0,72	3,63	±0,20	3,50	±1,41	3,58	±0,08	4,43	±0,48	2,41	±1,32
Gly	5,74	±0,19	3,62	±0,22	4,46	±0,86	5,17	±0,71	4,89	±0,50	4,44	±1,01	5,18	±1,14	5,70	±0,60	3,92	±0,95
Treo	2,96	±0,45	4,96	±1,77	5,50	±0,43	6,08	±0,46	5,77	±0,27	5,21	±1,69	5,67	±0,14	6,14	±0,23	4,01	±1,94
Arg	4,53	±0,52	7,30	±1,44	7,89	±1,48	8,96	±1,47	8,08	±0,28	7,32	±2,32	8,14	±0,62	9,59	±1,15	5,69	±2,22
Ala	3,99	±0,30	5,72	±0,13	5,14	±0,81	5,82	±0,76	5,77	±0,24	5,37	±1,04	5,73	±0,79	5,89	±0,49	4,07	±1,34
Tyr	3,99	±0,82	8,20	±0,65	8,65	±0,72	8,69	±0,74	8,52	±0,38	7,98	±1,08	8,51	±0,26	9,12	±0,31	6,72	±1,99
Met	2,50	±1,12	1,90	±0,04	2,60	±0,44	2,32	±0,37	2,16	±0,04	1,78	±0,06	2,44	±0,10	2,76	±0,36	1,16	±0,06
Val	3,09	±0,75	6,22	±0,81	6,39	±0,03	6,93	±0,44	6,48	±0,11	6,06	±0,93	6,68	±0,03	6,94	±0,08	5,01	±1,48
Phe	4,33	±0,82	10,78	±0,51	11,22	±0,23	11,22	±0,72	10,35	±0,15	10,00	±0,55	10,54	±0,19	11,72	±0,13	11,22	±0,14
Ile	6,06	±0,78	8,15	±1,11	9,36	±0,31	9,09	±0,54	8,40	±0,35	8,50	±1,29	8,69	±0,27	9,22	±0,04	6,87	±2,85
Leu	6,48	±0,48	9,84	±0,69	10,37	±0,40	10,56	±0,64	10,22	±0,22	9,86	±1,17	10,22	±0,18	10,78	±0,24	8,85	±1,51
Lys	1,55	<0,01	2,15	±0,05	2,88	±0,09	2,71	<0,01	2,48	±0,08	2,79	±0,45	2,19	±0,25	3,21	±0,13	1,72	±0,46
Total	71,11		95,49		106,95		112,37		104,65		98,99		105,39		116,24		85,62	

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamato

Tabela 7 - Composição de aminoácidos totais na fração Prolamina II expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Prolamina II																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asx[1]	6,69	±0,65	7,79	±0,02	6,89	±0,72	5,80	±1,08	6,37	±1,12	7,11	±0,55	7,50	±0,11	5,64	±1,32	7,48	±0,85
Glx[2]	12,03	±0,67	14,06	±0,15	13,30	±0,74	12,30	±1,25	12,46	±1,46	12,86	±0,46	13,34	±0,46	11,74	±1,22	12,64	±0,31
Ser	5,22	±1,17	7,34	±0,37	6,54	±0,80	5,60	±1,43	5,68	±1,63	6,20	±0,19	6,72	±0,05	4,54	±1,17	5,68	±0,81
His	3,19	±0,26	4,26	±0,37	3,49	±0,71	2,94	±0,86	2,99	±1,14	3,05	±0,28	3,49	±0,13	2,42	±1,13	3,18	±0,86
Gly+Treo	4,86	±0,43	5,74	±0,09	5,42	±0,39	4,88	±0,61	5,01	±0,54	5,43	±0,16	5,51	±0,15	4,29	±0,33	4,76	±0,08
Arg	10,39	±2,44	11,30	±0,61	9,44	±1,99	7,22	±2,40	7,94	±3,02	8,70	±0,71	9,56	±0,02	5,79	±1,21	8,95	±1,79
Ala	4,75	±0,95	6,21	±0,33	5,48	±0,83	4,57	±1,25	4,65	±1,42	5,30	±0,22	5,68	±0,04	3,69	±0,99	5,18	±0,84
Tyr	4,79	±1,19	8,67	±0,58	6,84	±1,54	5,42	±1,94	5,91	±2,15	7,08	±0,71	7,45	±0,22	4,57	±0,04	5,42	±0,45
Met	1,45	±0,23	3,30	±0,09	2,55	±0,68	2,03	±0,88	1,82	±0,66	2,81	±0,33	2,29	±0,10	1,69	±0,49	2,66	±0,72
Val	3,12	±0,69	4,78	±0,35	3,64	±0,70	2,91	±0,62	3,48	±1,30	3,49	±0,41	4,15	±0,47	2,61	±0,29	3,44	±0,86
Phe	4,22	±0,89	6,32	±0,35	5,10	±0,98	3,58	±1,75	4,65	±1,56	4,83	±0,68	5,55	±0,51	3,21	±0,05	3,69	±1,18
Ile	1,67	±0,32	2,46	±0,05	1,85	±0,37	1,50	±0,26	1,74	±0,57	1,76	±0,32	2,16	±0,58	1,36	±0,11	1,75	±0,50
Leu	5,96	±1,21	8,57	±0,21	7,38	±1,04	6,06	±1,68	6,52	±1,97	7,21	±0,50	7,80	±0,39	5,24	±0,63	6,58	±1,52
Lys	3,45	±0,68	4,51	±0,17	4,17	±0,61	4,21	±0,42	3,36	±1,02	3,45	±0,29	3,65	±0,23	3,74	±0,37	2,17	±0,48
Total	71,80		95,30		82,10		69,04		72,58		79,28		84,84		60,51		73,56	

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamato

Tabela 8 - Composição de aminoácidos totais na fração Glutelina em expressos em mg.g^{-1} proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Glutelina																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asx[1]	13,41	±0,83	28,71	±0,02	27,22	±1,40	26,15	±1,67	28,40	±1,85	24,07	±1,53	29,90	±0,64	28,47	±0,57	25,95	±0,21
Glx[2]	17,95	±1,43	41,90	±0,78	42,29	±1,41	40,88	±1,35	39,89	±3,77	36,14	±0,54	42,37	±0,18	40,67	±1,22	38,46	±0,41
Ser	5,02	±0,43	25,20	±0,24	25,40	±1,38	23,43	±2,53	23,45	±4,07	17,47	±0,22	25,99	±1,22	24,13	±0,73	20,08	±0,94
His	3,84	±0,10	12,18	±2,17	13,14	±1,74	11,27	±1,77	10,70	±1,97	7,01	±0,76	11,50	±1,02	11,18	±0,14	8,39	±0,15
Gly	10,40	±0,60	21,13	±0,84	22,37	±0,23	21,62	±0,95	16,56	±2,31	17,08	±1,44	22,27	±0,92	19,12	±0,43	18,91	±0,59
Treo	8,50	±0,49	17,27	±0,68	18,29	±0,18	17,67	±0,78	19,07	±2,45	14,92	±0,80	18,19	±0,74	15,63	±0,35	16,87	±0,38
Arg	10,42	±0,21	26,32	±2,62	29,67	±3,12	25,27	±3,67	24,75	±5,53	17,91	±0,69	27,74	±1,81	23,48	±1,21	22,20	±0,67
Ala	12,05	±0,33	23,10	±0,07	24,21	±1,39	21,74	±1,85	22,49	±2,47	17,93	±0,11	23,90	±0,43	22,22	±0,68	20,70	±0,31
Tyr	6,62	±0,41	21,62	±2,17	20,77	±1,54	19,29	±2,11	19,28	±5,58	14,65	±0,17	22,26	±1,13	18,90	±0,40	15,61	±0,24
Met	1,12	±0,21	5,10	±0,09	5,49	±0,44	4,43	±0,96	4,45	±0,46	3,95	±2,41	4,75	±0,06	4,05	±0,42	4,44	±0,13
Val	5,24	±0,50	18,63	±1,01	18,78	±0,88	18,15	±1,28	17,87	±2,51	13,37	±1,19	18,81	±0,92	17,46	±0,03	16,41	±0,58
Phe	8,27	±0,31	26,81	±0,48	28,45	±1,46	26,54	±2,61	24,54	±5,92	19,02	±1,03	28,02	±0,84	22,71	±2,28	22,50	±0,84
Ile	4,28	±0,32	13,95	±3,28	15,15	±1,18	14,14	±1,67	12,98	±2,84	9,28	±0,91	13,44	±0,25	11,24	±0,78	12,73	±0,57
Leu	10,51	±0,74	27,63	±1,38	28,87	±0,43	26,97	±1,37	26,86	±3,12	22,45	±0,45	28,22	±0,07	26,06	±0,56	25,96	±0,34
Lys	14,52	±0,87	21,66	±2,14	31,73	±0,12	22,96	±2,93	20,11	±5,22	17,44	±0,16	22,76	±0,58	19,06	±1,46	21,32	±1,10
Total	132,15		331,23		351,83		320,52		311,42		252,66		340,10		304,37		290,52	

[1] Refere-se aos aminoácidos aspartato e asparagina
[2] Refere-se aos aminoácidos glutamato e glutamato

4.5 Aminoácidos solúveis totais

4.5.1 Sementes Maduras

Os aminoácidos solúveis foram quantificados de duas formas distintas, nas sementes maduras. A Figura 12 apresenta a concentração de aminoácidos solúveis totais, determinada por espectrofotômetro, como descrito previamente no item 3.3.2. Este método utiliza uma curva padrão de leucina e através da regressão linear obtêm-se a concentração de todos os aminoácidos presentes nas amostras. O mutante Risø 1508 apresentou a maior concentração de aminoácidos solúveis (0,0701 mmol.g^{-1} de proteína) e o material transgênico L6 apresentou a menor concentração (0,0121 mmol.g^{-1} de proteína). O controle não transformado apresentou uma concentração de 0,0131 mmol.g^{-1} de proteína, que foi inferior à todos os materiais transgênicos exceto para L6. O maior incremento foi observado em L1 com concentração 66,35% superior, seguido de L5, L3, L4 e L2, entretanto nesses materiais os aumentos foram mais discretos e variaram entre 20,03 e 4,45%. A cultivar BRS Sampa também apresentou concentração superior ao controle não transformado, com 40,68% de aumento.

Os aminoácidos solúveis também foram quantificados individualmente por HPLC, apresentados na Tabela 9.

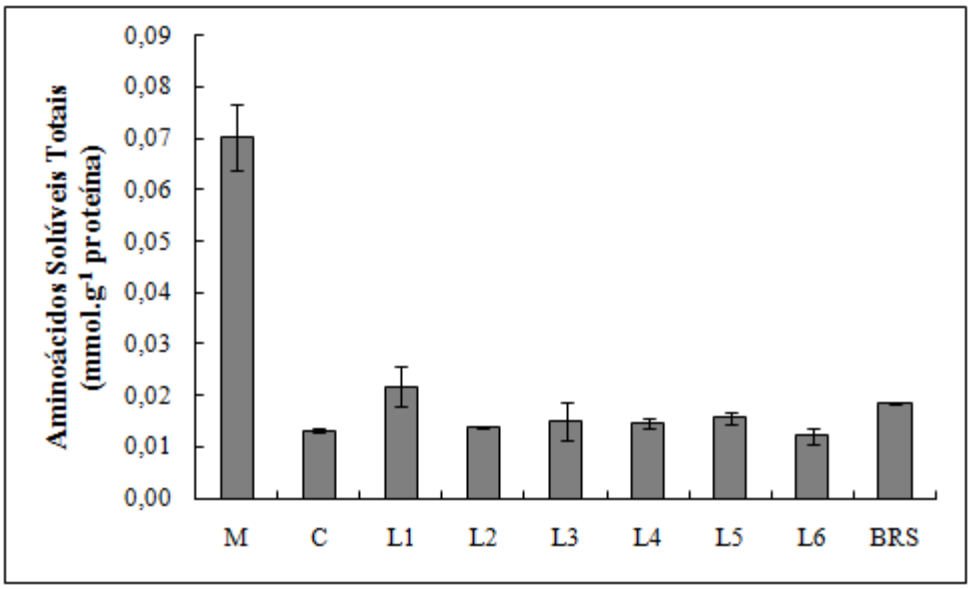

Figura 12 - Concentração de aminoácidos solúveis totais de sementes maduras expressos em mmol.g^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

Tabela 9 - Composição de aminoácidos livres em sementes maduras expressos em $mg.g^{-1}$ proteína ± desvio padrão. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC; BRS. Cultivar nacional BRS Sampa

	Aminoácidos Solúveis																	
Aa	M		C		L1		L2		L3		L4		L5		L6		BRS	
Asp	0,024	±0,001	0,013	<0,001	0,008	<0,001	0,012	±0,002	0,006	±0,001	0,010	±0,003	0,011	±0,001	0,010	±0,001	0,024	±0,001
Glu	0,038	<0,001	0,028	<0,001	0,038	±0,001	0,030	±0,002	0,027	±0,003	0,034	±0,004	0,032	±0,002	0,027	±0,001	0,037	±0,001
Ser	0,018	±0,001	0,007	<0,001	0,011	±0,001	0,007	<0,001	0,003	±0,001	0,009	±0,003	0,006	±0,001	0,004	±0,001	0,008	<0,001
His	0,034	±0,001	0,008	±0,001	0,027	±0,001	0,010	<0,001	0,005	±0,001	0,005	±0,002	0,006	±0,001	0,005	±0,001	0,019	±0,001
Gly	0,017	±0,001	0,005	<0,001	0,014	±0,002	0,008	±0,001	0,005	±0,001	0,008	±0,001	0,008	±0,002	0,006	±0,001	0,011	<0,001
Treo	0,015	<0,001	0,007	<0,001	0,010	<0,001	0,007	±0,001	0,004	±0,001	0,007	±0,003	0,007	±0,002	0,005	±0,001	0,009	<0,001
Arg	0,059	±0,001	0,024	±0,002	0,048	±0,001	0,025	±0,002	0,014	±0,004	0,018	±0,005	0,024	±0,005	0,018	±0,003	0,035	±0,001
Ala	0,026	<0,001	0,014	<0,001	0,037	<0,001	0,020	<0,001	0,014	±0,003	0,025	±0,003	0,020	±0,003	0,018	±0,001	0,025	<0,001
Tyr	0,031	<0,001	0,012	±0,001	0,027	<0,001	0,014	<0,001	0,007	±0,002	0,013	±0,003	0,014	±0,003	0,012	±0,001	0,019	<0,001
Met	0,035	<0,001	0,022	<0,001	0,049	±0,001	0,039	<0,001	0,027	±0,003	0,045	±0,002	0,034	±0,003	0,029	±0,002	0,048	±0,001
Val	0,022	<0,001	0,013	<0,001	0,019	<0,001	0,018	±0,001	0,010	±0,002	0,018	±0,002	0,017	±0,003	0,013	±0,001	0,020	<0,001
Phe	0,032	<0,001	0,010	±0,001	0,020	±0,004	0,021	<0001	0,008	±0,002	0,011	±0,002	0,015	±0,003	0,009	±0,001	0,022	<0,001
Ile	0,020	±0,001	0,007	<0,001	0,009	±0,001	0,013	±0,001	0,005	±0,001	0,009	±0,002	0,009	±0,003	0,006	<0,001	0,010	<0,001
Leu	0,023	<0,001	0,008	<0,001	0,009	±0,001	0,010	±0,001	0,004	±0,001	0,008	±0,002	0,009	±0,003	0,006	±0,001	0,013	<0,001
Lys	0,049	±0,006	0,003	±0,001	0,009	<0,001	0,005	±0,001	0,003	±0,001	0,005	±0,001	0,003	<0,000	0,003	<0,001	0,008	±0,001
Total	0,442		0,180		0,336		0,238		0,142		0,226		0,215		0,173		0,308	

Os aminoácidos solúveis predominantes foram glutamato/glutamina, arginina, metionina, alanina, aspartato/asparagina e tirosina, para todos os materiais exceto para o mutante Risø 1508. Neste, os aminoácidos arginina, lisina, glutamato/glutamina, histidina, metionina e fenilalanina foram predominantes. Além do balanço de aminoácidos essenciais/não essenciais observados nas diferentes frações protéicas, o mutante Risø 1508 apresentou altos níveis de aminoácidos solúveis essenciais, e baixos níveis de aminoácidos solúveis não essenciais. O conteúdo total de aminoácidos foi de 0,4422 $mg.g^{-1}$ de proteína e representou o maior valor entre todos os materiais. Além disso, o teor de todos os aminoácidos essenciais encontrado neste material foi superior aos demais, enfatizando o conteúdo de lisina que chegou a 0,049 mg.g-1 de proteína, sendo aproximadamente 15 vezes superior ao controle não transformado (0,003 $mg.g^{-1}$ de proteína). O menor conteúdo total de aminoácidos foi observado no material transgênico L3 com 0,142 $mg.g^{-1}$ de proteína. Os materiais transgênicos, (exceto para L3 e L6) apresentaram incrementos no conteúdo total de aminoácidos. Em L1 foi observado aumento de 86,79%, L2 de 32,02%, L4 de 25,39% e L5 de 19,42%, Assim L1 demonstrou ter o conteúdo total de aminoácidos próximo ao encontrado no mutante Risø 1508. Foram observados incrementos na ordem de duas a três vezes dos aminoácidos essenciais histidina, lisina, fenilalanina e metionina, e nos aminoácidos não essenciais alanina, arginina e tirosina. A cultivar BRS Sampa apresentou valores semelhantes aos materiais transgênicos L2, L3, L4 e L5.

4.5.2 Sementes Imaturas

Os aminoácidos solúveis totais também foram determinados em sementes imaturas da cultivar BRS Sampa em três diferentes estágios de desenvolvimento (grão em leite fraco, grão leitoso pastoso e grão em pasta média) e nas sementes maduras (Figura 13). Os resultados indicam que o conteúdo de aminoácidos solúveis reduz a cada fase de desenvolvimento da semente, e atingem o menor valor quando as sementes alcançam a maturidade fisiológica. Isso ocorre devido a demanda desses aminoácidos para síntese de proteínas de reserva necessárias para constituir o endosperma, além de alguns aminoácidos livres serem requeridos para outras funções celulares, até mesmo serem degradados por vias metabólicas específicas de catabolismo. O conteúdo de 0,00635 $mmol.g^{-1}$ de matéria seca obtido no primeiro estágio de desenvolvimento foi reduzido para 0,00248 $mmol.g^{-1}$ de matéria seca na semente madura, o que representa cerca de 60,92% de redução.

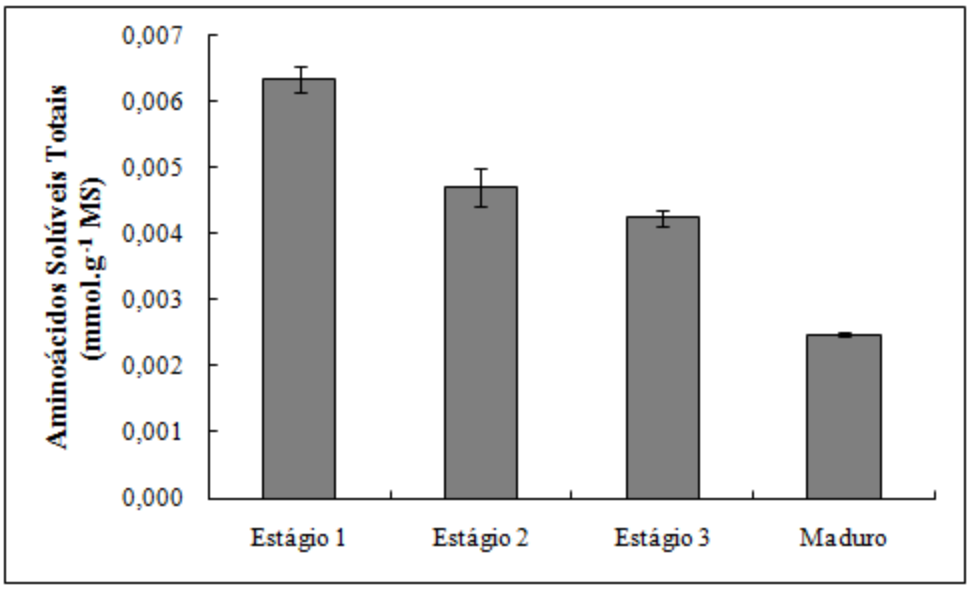

Figura 13 - Concentração de aminoácidos solúveis totais em três estágios de desenvolvimento das sementes e nas sementes maduras da cultivar BRS Sampa, expressos em $mmol.g^{-1}$ matéria seca

Para os demais materiais o conteúdo de aminoácidos solúveis totais foi determinado no estágio 2 (Figura 14). Interessantemente o mutante Risø 1508 apresentou menor conteúdo de aminoácidos solúveis totais nas sementes imaturas do que em sementes maduras, na ordem de 3,5 vezes. Isso pode ocorrer em função do balanço de aminoácido livres e incorporados neste material, previamente descrito como divergente do que ocorre nos demais materiais estudados. Além disso, esse resultado pode estar associado à regulação e atividade das enzimas envolvidas nas vias de biossíntese e catabolismo dos aminoácidos, como por exemplo, a degradação do excesso de aminoácidos livres nos estágios finais do desenvolvimento da semente, que provavelmente seriam catabolizados pode não ocorrer em proporções semelhantes aos materiais normais. Os materiais transgênicos apresentaram grande variação no conteúdo de aminoácidos solúveis totais, que em L1 e L3 o conteúdo foi 6,17% e 11,74% menor que para o controle não transformado, enquanto que para os demais materiais, observaram-se aumentos de 10,86% a 69,09%. Todavia, como descrito no item anterior, o conteúdo de aminoácidos solúveis totais nas sementes maduras entre os materiais transgênicos não apresentou grandes diferenças.

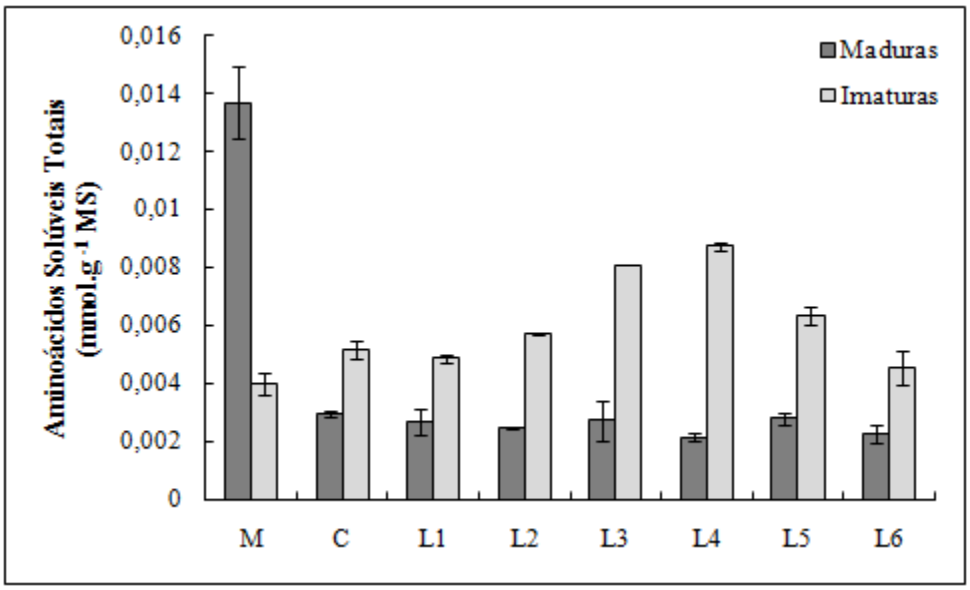

Figura 14 - Concentração de aminoácidos solúveis totais em sementes imaturas no estágio de desenvolvimento 2 expressos em mmol.g^{-1} matéria seca. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

4.6 Enzimas envolvidas na síntese de lisina

Para a realização dos estudos referentes às enzimas de síntese e catabolismo de lisina, foram utilizadas sementes imaturas dos 3 estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. Para cada uma das enzimas de síntese (AK, HSDH, DHDPS) e degradação (LOR e SDH) foi determinado o estágio que se observava a maior atividade enzimática em cevada, uma vez que não há dados descritos na literatura. Para esta determinação a extração foi procedida utilizando-se as proteínas obtidas da precipitação com 0-60% de sulfato de amônio.

A cultivar BRS Sampa também foi utilizada para o fracionamento de proteínas por precipitação com sulfato de amônio, para cada uma das enzimas, dados estes também não disponíveis na literatura para cevada, porém de grande importância, pois trata-se da primeira etapa de purificação de uma proteína.

Após a determinação do estágio de desenvolvimento da semente e a faixa de precipitação com sulfato de amônio para cada enzima, as análises dos demais materiais foram conduzidas de acordo com os resultados obtidos para a cultivar BRS Sampa, em um único estágio de desenvolvimento e em uma única faixa de precipitação.

4.6.1 Determinação da atividade da AK durante o desenvolvimento da semente

A atividade de AK foi detectada durante todo o processo de desenvolvimento da semente, com maior atividade no estágio 2 (grão leitoso pastoso), como apresentado na Figura 15. Os resultados dos ensaios com tratamentos com os aminoácidos treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM demonstraram que estes aminoácidos causaram a inibição da atividade da enzima AK nos três estágios testados, sugerindo a presença de isoformas de AK sensível a cada um destes aminoácidos durante todo o desenvolvimento da semente. O padrão de inibição encontrado demonstra que, em todos os estágios a lisina provocou maior inibição da atividade total de AK (Tabela 10), indicando a predominância da isoforma sensível á lisina. A inibição causada pela presença dos dois aminoácidos juntos mostrou um efeito aditivo, isto é, houve a soma da inibição de cada aminoácido separadamente

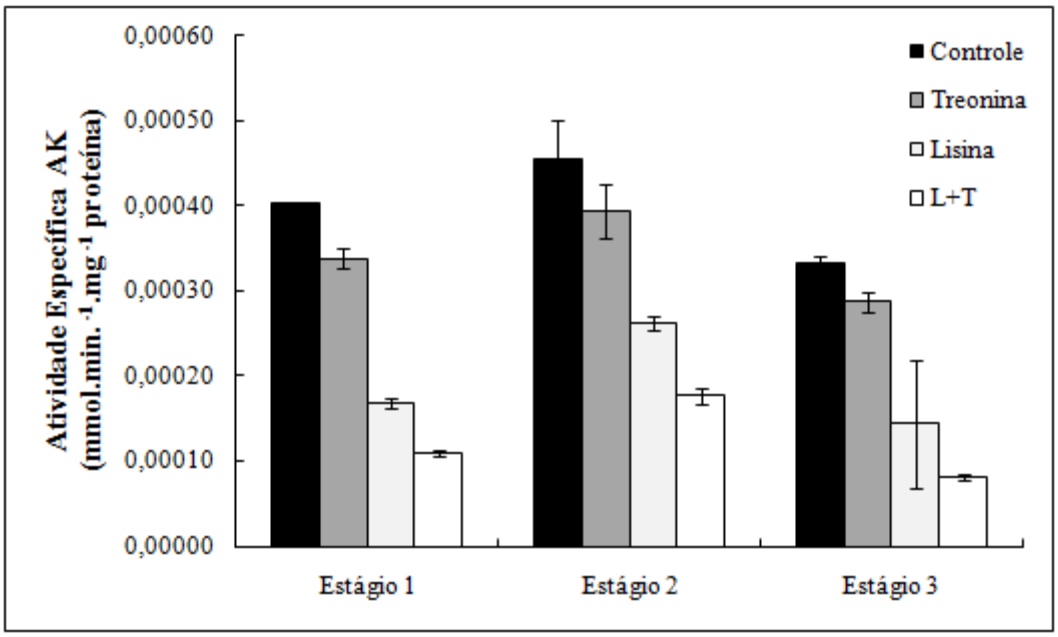

Figura 15 - Atividade específica AK em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina)

Tabela 10 - Inibição da atividade da AK por treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM durante o desenvolvimento das sementes da cultivar BRS Sampa. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

Fase de desenvolvimento	% Inibição		
	Treonina	Lisina	L+T
Estágio 1	15,88	58,11	72,81
Estágio 2	13,44	42,40	61,06
Estágio 3	13,46	56,57	75,50

4.6.2 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima AK

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado com sementes da cultivar BRS Sampa, no estágio 2 (que apresentou maior atividade de AK) em duas séries diferentes de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 0-30%, 30-50%, 50-70%) para detectar em qual faixa se concentra a atividade da enzima. De acordo com o observado na Figura 16, a atividade de AK foi detectada em todas as faixas de saturação com sulfato de amônio. A primeira série de fracionamento (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) as faixas de 20-40% e 40-60% apresentaram aumento na absorbância de 46,56% e 8,47% em relação ao extrato bruto, o que demonstra que nesta faixa de saturação com sulfato de amônio se concentra a atividade da enzima. Na segunda série do fracionamento a precipitação com 30-50% com sulfato de amônio mostrou absorbância 2,17 vezes maior que o extrato bruto. Juntos os resultados sugerem que a melhor faixa de saturação para determinar a atividade específica da enzima foi de 30-60% de saturação com sulfato de amônio. A precipitação com sulfato de amônio foi o primeiro passo de purificação eliminando proteínas que precipitam com menos de 30 e mais que 60% de sal.

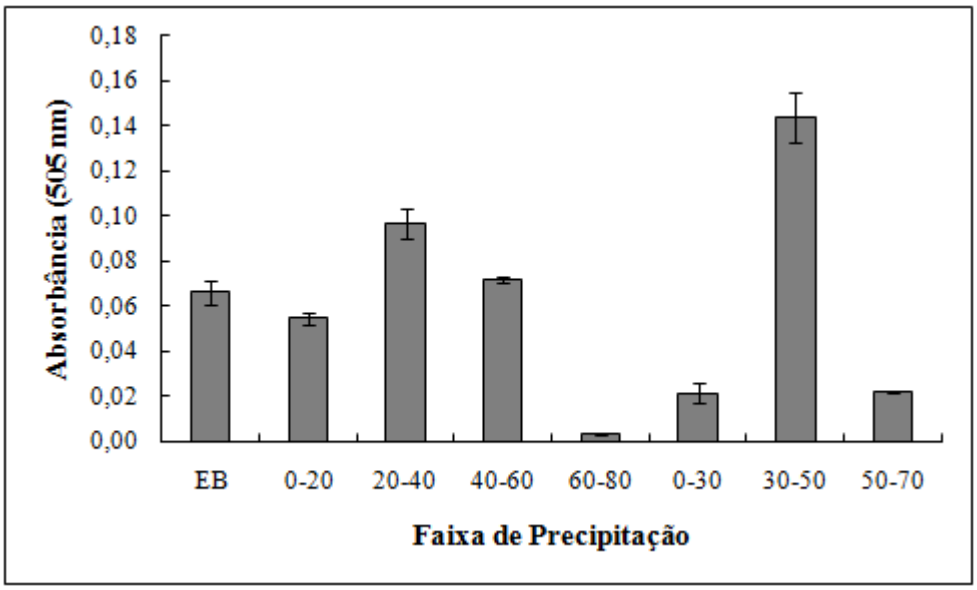

Figura 16 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima AK (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 505 nm

4.6.3 Determinação da atividade específica da AK

Para a determinação da atividade específica de AK nos demais materiais, a extração foi realizada no estágio 2 e com as proteínas obtidas da precipitação de 30-60% de sulfato de amônio. Os resultados estão apresentados na Figura 17 e indicam alterações na atividade de AK entre entre o materiais estudados. O material transgênico L1 apresentou a maior atividade (0,00066 mmol.min.$^{-1}$ .mg^{-1} proteína), representando um incremento de 47,27% em relação ao controle não transformado. Os demais materiais transgênicos tiveram aumento na atividade, porém em porcentagens menores (4,44 a 10,57%), com exceção para L6 que apresentou redução de 8,14%. O mutante Risø 1508 e o controle não transformado revelaram atividades bastante semelhantes, 0,00043 e 0,0045 mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, respectivamente.

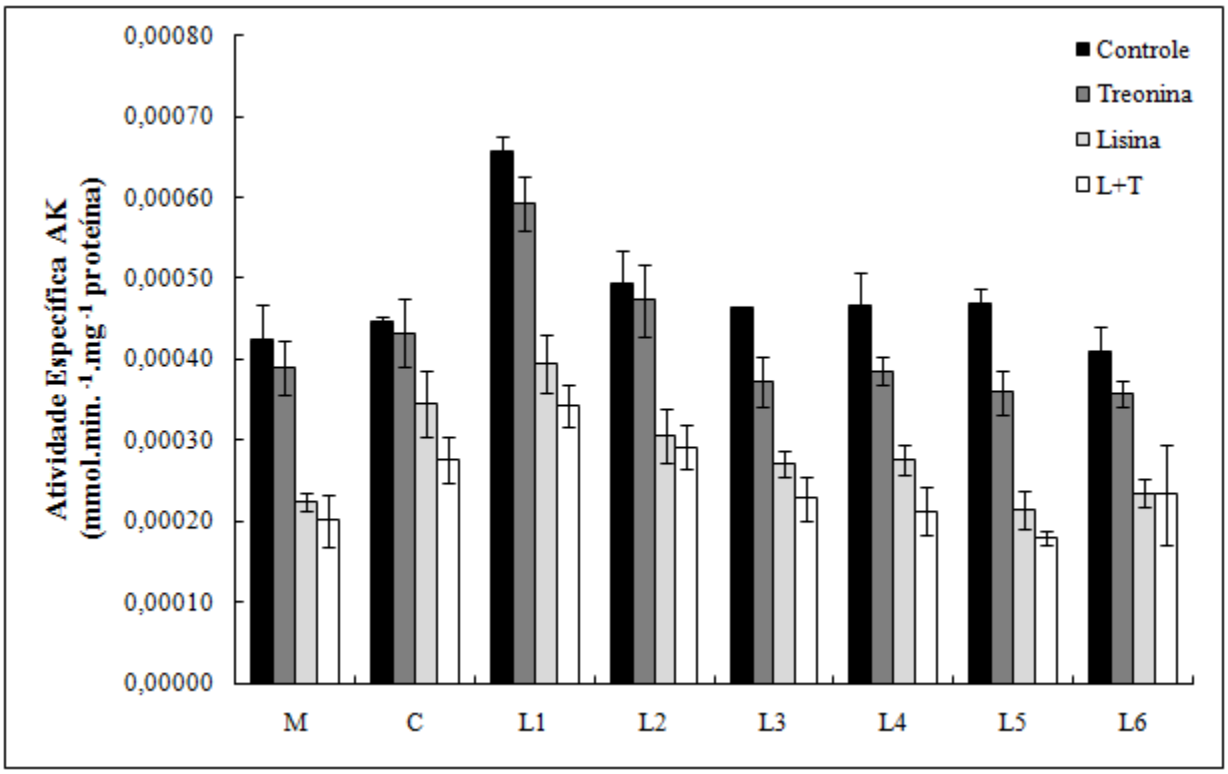

Figura 17 - Atividade específica AK em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos na concentração de 5 mM (L+T= lisina e treonina). M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

A inibição causada pelos tratamentos com os aminoácidos treonina, lisina e lisina + treonina nos diferentes materiais estudados estão apresentados na Tabela 11. O controle não transformado apresentou um padrão de inibição inferior aos demais materiais para os três tratamentos. A lisina causou maior inibição (22,54%) e a treonina a menor inibição (2,94%), sendo que a inibição por lisina foi aproximadamente oito vezes superior a inibição causada por treonina. Quando ambos foram combinados ocorreu efeito sinergístico e a inibição chegou a 38,29%. O padrão de inibição do material transgênico L2 foi muito semelhante ao controle não transformado, entretanto L3, L4, L5 e L6 revelaram inibições superiores, sendo a maior em L5. Além disso, nesses materiais foi observado que a razão entre a inibição causada por lisina e a inibição causada por treonina foi por volta de dois (muito menor do que a encontrada para o controle não transformado que foi oito), sugerindo que nesses materiais ocorreu indução da expressão da isoforma sensível a treonina, quando comparada com o controle não transformado e L2. O material transgênico L1 apresentou inibições intermediárias ao controle não transformado e aos materiais transgênicos (L3, L4, L5 e L6), em que a inibição causada por lisina foi 4 vezes

superior a inibição causada por treonina, mas com atividade enzimática específica superior em todos os ensaios realizados. O mutante Risø 1508 exibiu inibições semelhantes a L1, em que a inibição causada por lisina foi 5 vezes superior a inibição causada por treonina, e a inibição causada pela interação de ambos aminoácidos foi resultado da soma de ambos atuando individualmente. Além disso, observou-se que a atividade de AK sem tratamento é muito semelhante ao controle não transformado, mas o padrão de inibição causado pelos aminoácidos é divergente.

Tabela 11 - Inibição da atividade da AK por treonina, lisina e lisina + treonina na concentração de 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

	% Inibição		
	Treonina	Lisina	L+T
M	8,18	47,14	52,71
C	2,94	22,54	38,29
L1	9,77	39,98	47,82
L2	4,13	37,99	40,94
L3	19,87	41,79	50,79
L4	17,15	40,84	54,34
L5	23,52	54,56	61,90
L6	12,76	42,66	43,05

4.6.4 Determinação da atividade da HSDH durante o desenvolvimento da semente

A atividade de HSDH foi detectada em níveis muito semelhante durante todo o processo de desenvolvimento da semente, variando entre 1,56 e 1,59 mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína (Figura 18). Além disso, em todos os estágios foi observada a inibição causada pelo aminoácido treonina na concentração de 5 mM, sendo maior no estágio 3 (Tabela 12) . Estes resultados sugerem a presença de uma isoforma sensível à inibição por treonina com predominância no final do desenvolvimento das sementes.

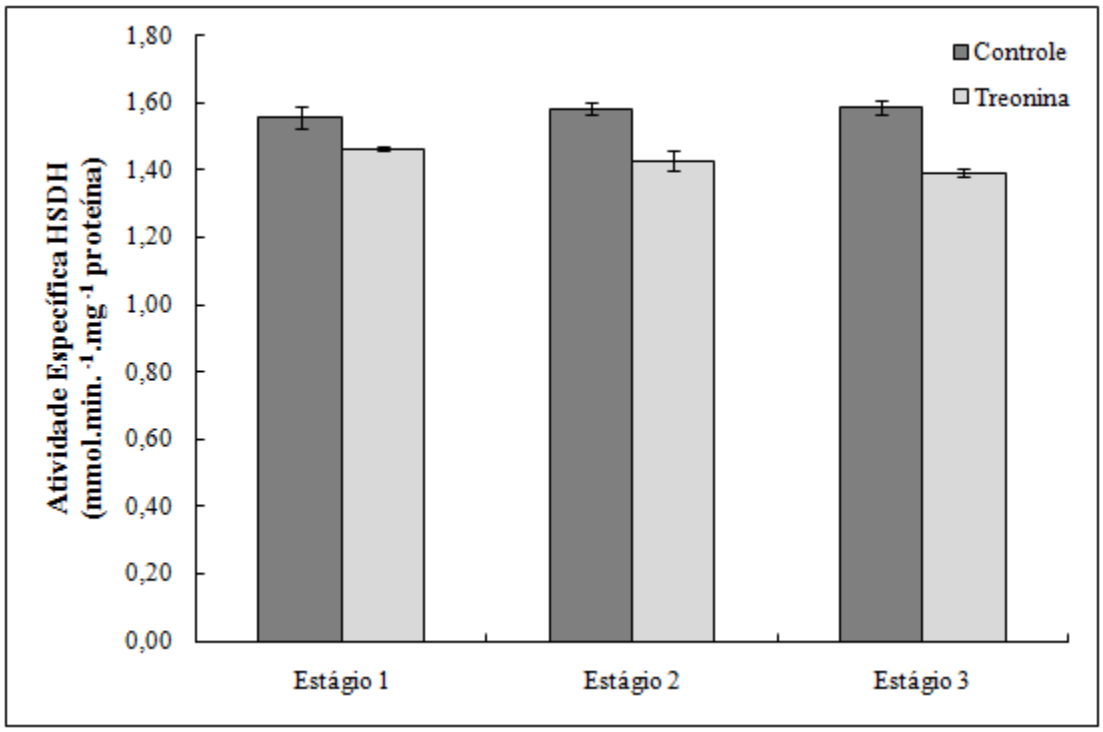

Figura 18 - Atividade específica HSDH em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. O tratamento inclui a presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM

Tabela 12 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM durante o desenvolvimento das sementes da cultivar BRS Sampa. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

Fase de desenvolvimento	% Inibição Treonina
Estágio 1	5,87
Estágio 2	9,77
Estágio 3	12,20

4.6.5 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima HSDH

Como todos os estágios de desenvolvimento apresentaram atividade de HSDH muito semelhantes, o estágio 2 foi selecionado, uma vez que este foi o estágio de maior atividade para a outra enzima de síntese da lisina, a AK. Além disso, utilizando-se o mesmo estágio, torna-se possível a comparação de atividade entre diferentes enzimas estudadas.

Assim como para a AK, para a enzima HSDH o fracionamento com sulfato de amônio foi realizado com sementes da cultivar BRS Sampa em duas séries diferentes de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 0-30%, 30-50%, 50-70%) para detectar em qual faixa se concentra a

atividade da enzima. De acordo com a Figura 19, a atividade de HSDH foi detectada em todas as faixas de saturação com sulfato de amônio, com os menores valores encontrados nas faixas com maior saturação (50-70% e 60-80%).

Na primeira série de fracionamento (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) apenas as faixas de 20-40% e 40-60% apresentaram aumento na absorbância de aproximadamente quatro e seis vezes em relação ao extrato bruto. Na segunda série do fracionamento a precipitação com 30-50% com sulfato de amônio mostrou absorbância oito vezes superior ao extrato bruto sugerindo que a maior concentração da enzima HSDH ocorre nesta faixa de saturação. Diante desses resultados, definiu-se que a faixa ideal de concentração da enzima HSDH é de 30-50% de saturação com sulfato de amônio, embora da mesma forma que para a enzima AK a melhor faixa de saturação para determinar a atividade específica da enzima foi de 30-60%. A precipitação com sulfato de amônio foi o primeiro passo de purificação eliminando proteínas que precipitam com menos de 30 e mais que 60% de sal. Os incrementos na atividade da enzima nessas faixas de saturação em relação ao extrato bruto para a enzima HSDH foram muito mais significativos quando comparados com os aumentos observados para AK nestas mesmas faixas, sugerindo que a primeira fase de purificação (precipitação em sal) é mais eficiente para concentrar a enzima HSDH.

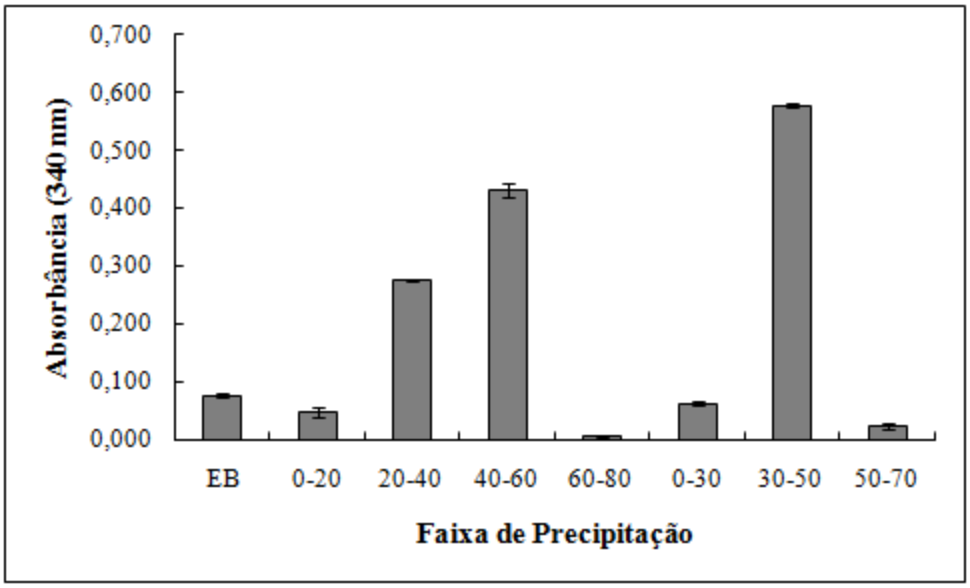

Figura 19 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima HSDH (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm

4.6.6 Determinação da atividade específica da HSDH

Para a determinação da atividade específica da HSDH nos demais materiais, a extração foi realizada no estágio 2 e com as proteínas obtidas da precipitação de 30-60% de sulfato de amônio. Os resultados estão apresentados na Figura 20, e mostram pequenas variações entre os diferentes materiais, mas todos os materiais transgênicos apresentaram redução na atividade desta enzima em relação ao controle não transformado. L1 e L4 exibiram maior queda na atividade, 28,80 e 18,50%, respectivamente. Porém, os demais materiais apresentaram reduções mais discretas, variando de 3,36 a 8,66%, com exceção de L2 que revelou um incremento na atividade de 5,98%.

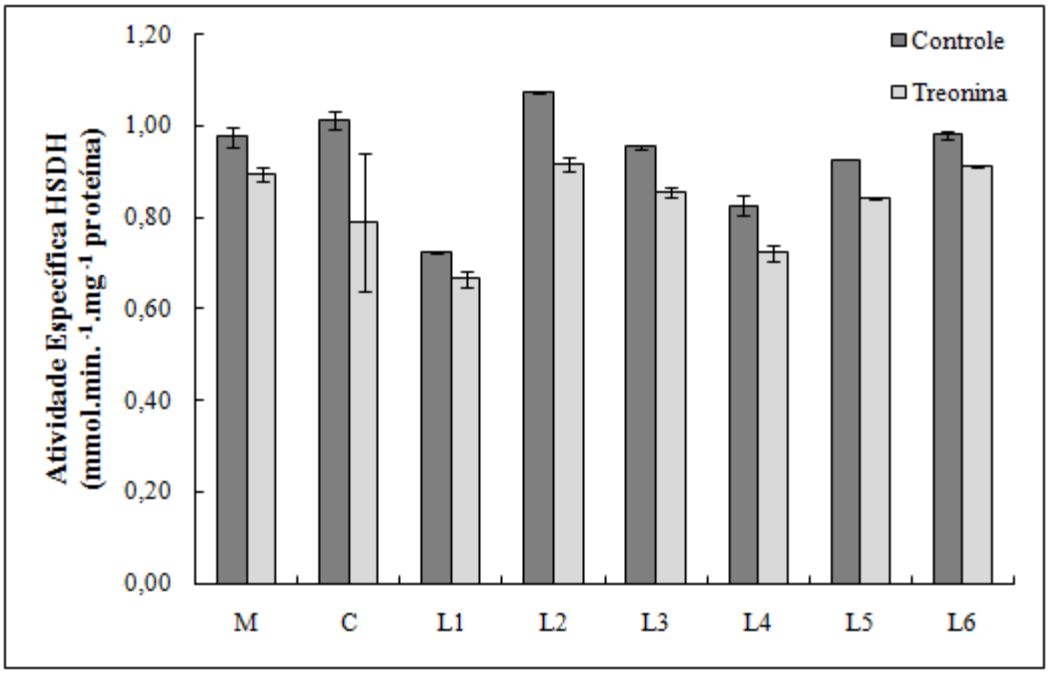

Figura 20 - Atividade específica HSDH em mmol.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. O tratamento corresponde a presença do aminoácido treonina na concentração de 5 mM. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

Em todos os materiais o aminoácido treonina causou inibição da atividade da enzima HSDH, sugerindo a presença de uma isoforma sensível a este aminoácido. O percentual de inibição está apresentado na Tabela 13, e mostra variabilidade de reposta entre os diferentes materiais, sendo que em todos os transgênicos a inibição foi menor (6,99 a 14,72%) que o controle não transformado (22,34%). Sugere-se que nestes materiais a isoforma de HSDH sensível a treonina mostrou-se menos sensível à inibição por este aminoácido, principalmente em

L6 e L1. O mutante Risø 1508 apresentou inibição de 8,38%, sendo o mesmo percentual de inibição encontrado na enzima AK.

Tabela 13 - Inibição da atividade da HSDH por treonina na concentração de 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

	% Inibição Treonina
M	8,38
C	22,34
L1	7,83
L2	14,72
L3	10,41
L4	12,56
L5	9,04
L6	6,99

4.6.7 Determinação da atividade da DHDPS durante o desenvolvimento da semente

A atividade da enzima DHDPS foi detectada durante todo o desenvolvimento da semente, e apresentou discretas reduções a cada estágio (0,5936 0,4686 e 0,4412 unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína para os estágios 1, 2 e 3 respectivamente), sugerindo assim que nas fases tardias do desenvolvimento das sementes essa atividade foi menor (Figura 21). Além disso, foi observado que em todos os estágios a presença do aminoácido lisina e seu análogo, o aminoetilcisteína (AEC), em concentrações de 1 mM e 5 mM causaram inibição da atividade da enzima (Tabela 14). O aminoetilcisteína causou menores porcentagens de inibição em ambas as concentrações quando comparado com a lisina. Mesmo em baixas concentrações (1 mM) a atividade da enzima DHDPS foi muito inibida, variando de 35,68 a 74,76%, podendo atingir até 94, 68% quando altas concentrações de lisina estavam presentes, o que demonstra o quanto esta enzima é mais sensível ao aminoácido lisina quando comparada com a enzima AK (Tabela 10). As taxas de inibição foram maiores para todos os tratamentos no estágio 1 (exceto para AEC 1 mM, que foi maior no estágio 3), seguido pelo estágio 3 e estágio 2. Desta forma, na presença do aminoácido lisina, a atividade da DHDPS foi maior no estágio 2. Assim, este foi o estágio selecionado para dar continuidade às análises nos demais materiais, e também devido este ter sido o estágio escolhido para as outras enzimas.

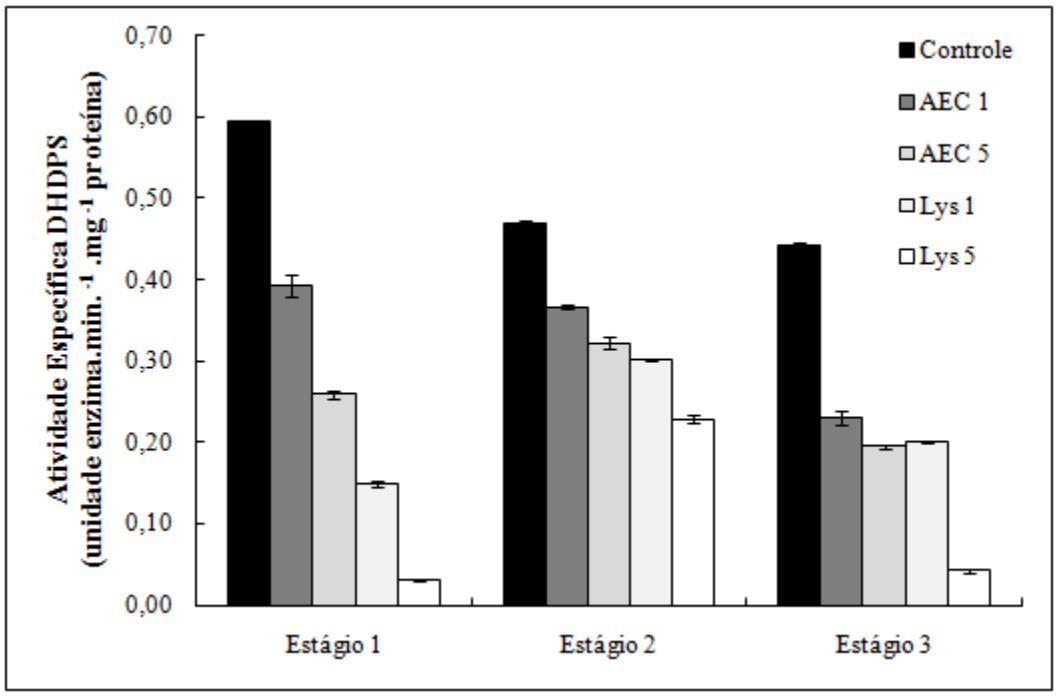

Figura 21 - Atividade específica DHDPS em unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa. Os tratamentos incluem a presença dos aminoácidos lisina (Lys) e S-aminoetilcisteína (AEC) na concentração de 1 mM e 5 mM

Tabela 14 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S-aminoeilcisteína na concentração de 1 e 5 mM em três diferentes estágios de desenvolvimento das sementes. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

Fase de desenvolvimento	% Inibição			
	AEC 1 mM	AEC 5 mM	Lys 1 mM	Lys 5 mM
Estágio 1	33,85	56,37	74,76	94,68
Estágio 2	21,81	31,23	35,68	51,19
Estágio 3	47,82	55,86	54,67	90,38

4.6.8 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima DHDPS

Assim como para as demais enzimas, o fracionamento com sulfato de amônio foi realizado com sementes da cultivar BRS Sampa no estágio 2, em duas séries diferentes de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60% e 0-30%, 30-50%, 50-70%) para detectar em qual faixa de saturação se concentra a atividade da enzima. A Figura 22 mostra que foi detectada atividade da enzima DHDPS em todas as faixas, com os menores valores encontrados nas faixas iniciais (0-20%, 20-40% e 0-30%).

Como a atividade da DHDPS não foi determinada no extrato bruto, é difícil inferir a respeito da eficiência desta primeira etapa de purificação da proteína, entretanto foi possível selecionar a faixa em que ocorre a maior atividade da enzima, que neste caso, foi maior a partir de 30% e continua em valores altos até 70% de saturação com sulfato de amônio. Entretanto, como para as demais enzimas foi selecionada a faixa de 30-60% de saturação, e para esta enzima, observamos que não houveram perdas relevantes nesta faixa, a determinação da atividade específica de DHDPS para os demais materiais foi realizado com as proteínas obtidas na faixa de 30-60% de saturação com sulfato de amônio

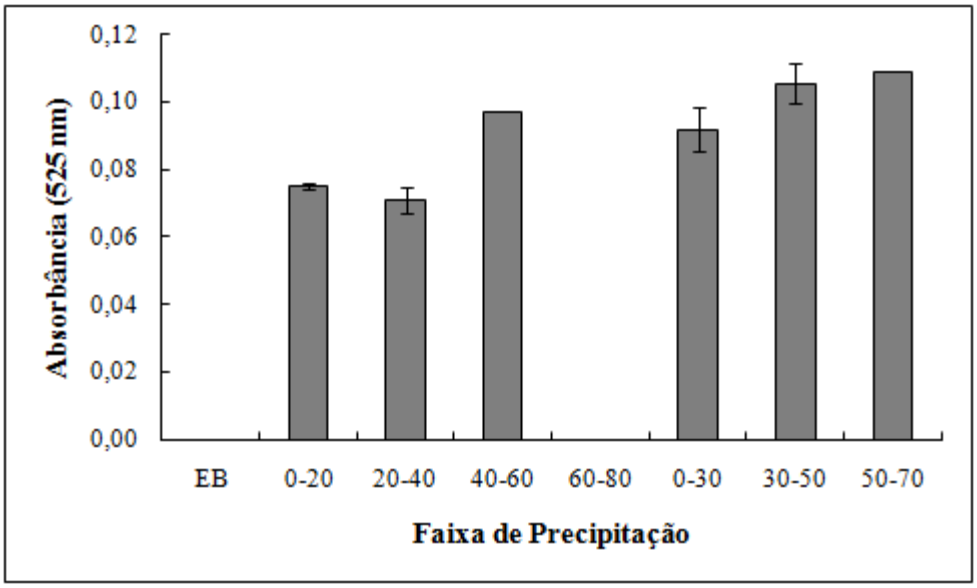

Figura 22 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima DHDPS (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 525 nm

4.6.9 Determinação da atividade específica da DHDPS

Os resultados da atividade específica da DHDPS estão apresentados na Figura 23, e mostram atividades variando entre 0,1467 e 0,2441 unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, para o controle não transformado e para o transgênico L2, respectivamente. É interessante salientar que as atividades específicas observadas para cultivar BRS Sampa nos diferentes estágios, com saturação de 0-60% com sulfato de amônio atingiram valores muito superiores (Figura 21) daqueles encontrados para os demais materiais que passaram pela saturação de 30-60%, em que concentra mais a enzima (Figura 22). Mas esses resultados podem ser explicados, pois quando avaliadas apenas as absorbâncias a 525 nm, foi verificado menores valores quando comparadas

com as faixas de saturação de 40-60%, 30-50%, e 50-70% para os demais materiais estudados. Além disso, o teor de proteína na cultivar BRS Sampa nos três estágios foi em média três vezes inferior aqueles encontrados nos demais materiais, desta forma reduziu a atividade específica da enzima. Todas essas avaliações foram realizadas tomando-se a atividade da enzima DHDPS no controle (sem tratamento com aminoácidos) e no estágio 2.

Todos os materiais transgênicos apresentaram incrementos na atividade específica da DHDPS em relação ao controle não transformado, com aumentos de 1,50 a 66,32% para L3 e L2, respectivamente (Figura 23). A atividade desta enzima no mutante Risø 1508 foi de 0,1780 unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, valor este superior ao controle não transformado e semelhante aos materiais transgênicos, exceto par L2 que apresentou a maior atividade (0,2441 unidades da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína).

A presença de lisina e S-aminoetilcisteína em concentrações de 1 mM e 5 mM causou inibição da atividade da DHDPS em todos os materiais, em proporções distintas dependendo do material e da concentração do aminoácido (Tabela 15). As menores inibições, variando de 16,85 a 45,76% foram observadas na presença de 1 mM de AEC. Com o aumento da concentração de AEC para 5 mM essas taxas também foram incrementas, variando entre 15,83 a 56,97%, com exceção para L2 que a inibição se manteve praticamente estável (16,85 e 15,83%). Os transgênicos L2 e L3 e o mutante Risø 1508 foram menos sensíveis à inibição causada por AEC, com taxas menores que 20% e 30% para a concentração de 1 e 5 mM, respectivamente. Com exceção de L1, em todos os transgênicos a DHDPS foi menos sensível à inibição por AEC quando comparada com o controle não transformado. A menor inibição causada por lisina foi observada em L2 e L3 em ambas as concentrações, sendo que a inibição causada por 1 mM e 5 mM de lisina não sofreu grandes alterações nestes dois materiais. Por outro lado, nos demais materiais o aumento na concentração do aminoácido levou a incrementos nas taxas inibitórias, variando entre 46,97 a 58,39% para 1 mM e 65,94 a 87,63% para 5 mM. Assim como para AEC, com exceção de L1, todos os materiais transgênicos foram menos sensíveis à inibição causada por lisina.

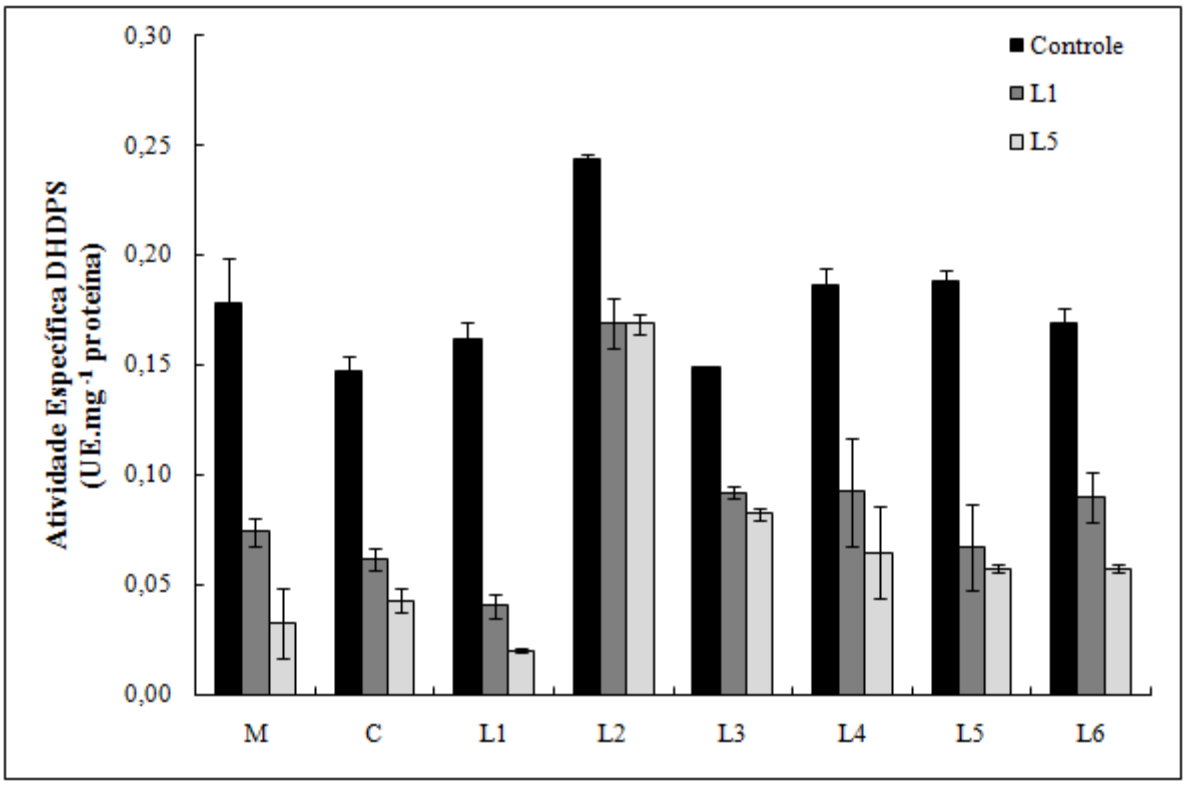

Figura 23 - Atividade específica DHDPS em unidade da enzima.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. O tratamento corresponde a presença do aminoácido lisina (Lys) nas concentrações de 1mM e 5 mM. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

Tabela 15 - Inibição da atividade da DHDPS por lisina e S- aminoetilcisteína nas concentrações de 1 mM e 5 mM em diferentes materiais de cevada. Porcentagem relativa ao controle do ensaio. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

	% Inibição			
	AEC 1 mM	AEC 5 mM	Lys 1 mM	Lys 5 mM
M	19,38	29,38	58,39	81,95
C	42,25	56,97	58,01	70,91
L1	45,76	49,00	75,09	87,63
L2	16,85	15,83	30,87	30,87
L3	19,23	25,64	38,27	44,75
L4	28,07	34,65	50,45	65,40
L5	33,99	48,27	64,28	69,42
L6	32,39	34,90	46,97	65,94

4.7 Enzimas envolvidas na degradação de lisina

4.7.1 Determinação da atividade da LOR durante o desenvolvimento da semente

A atividade de LOR foi detectada apenas nos estágios 2 e 3, sendo de 0,3882 e 0,3351 ηmol NADPH oxidado.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, respectivamente, mostrando uma redução no estágio mais avançado de desenvolvimento de 13,68% (Figura 24). No estágio 1 não foi observada atividade da enzima.

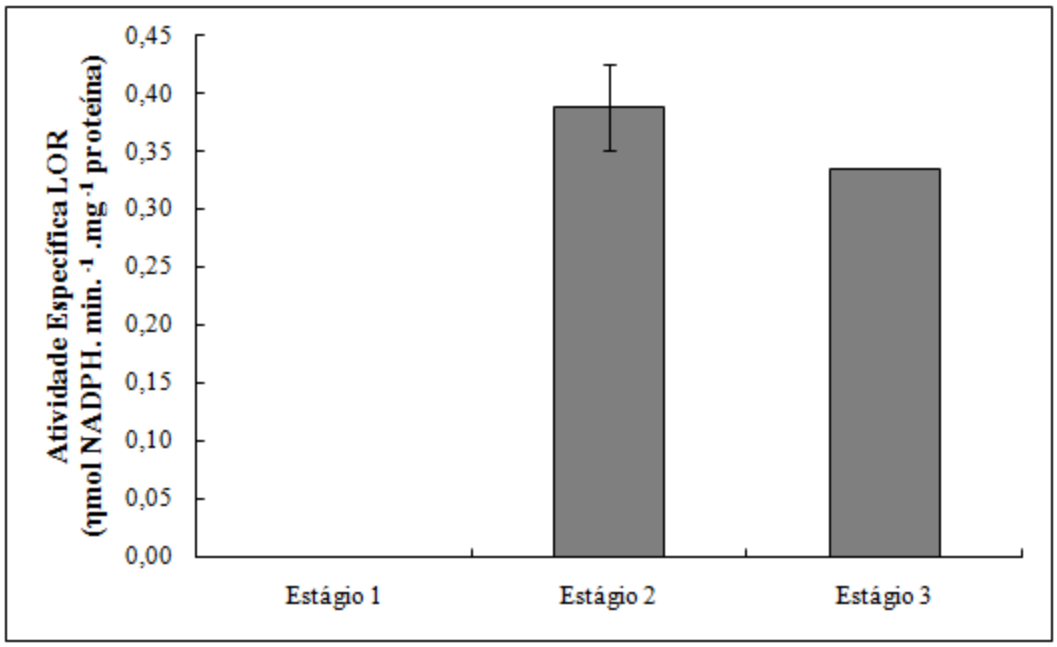

Figura 24 - Atividade específica LOR em ηmol NADPH.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa

4.7.2 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima LOR

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado em duas séries distintas (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 0-30%, 30-50%, 50-70%), como apresentado na Figura 25. A atividade de LOR não foi detectada no extrato bruto e na faixa de 0-30% de saturação. A faixa de 40-60% apresentou a maior concentração da enzima. Da faixa de 0-20% para 20-40% observou-se um incremento na absorbância de aproximadamente cinco vezes, e incremento de quase duas vezes desta última para a faixa de 40-60%, que é a faixa de maior atividade totalizando assim, aumento de oito vezes. Esta taxa pode ser ainda maior se for considerada a atividade no extrato bruto, mas

como esta não foi possível detectar, utilizou-se como base a primeira faixa que foi verificada atividade. Na segunda série do fracionamento os valores encontrados foram sobrepostos aqueles encontrados na primeira, mostrando que os limites para atingir máxima eficiência de concentração da enzima LOR está entre 30 e 60%. Desta forma, os demais materiais foram submetidos a esta faixa de precipitação, com sementes no estágio 2, que foi o que apresentou maior atividade.

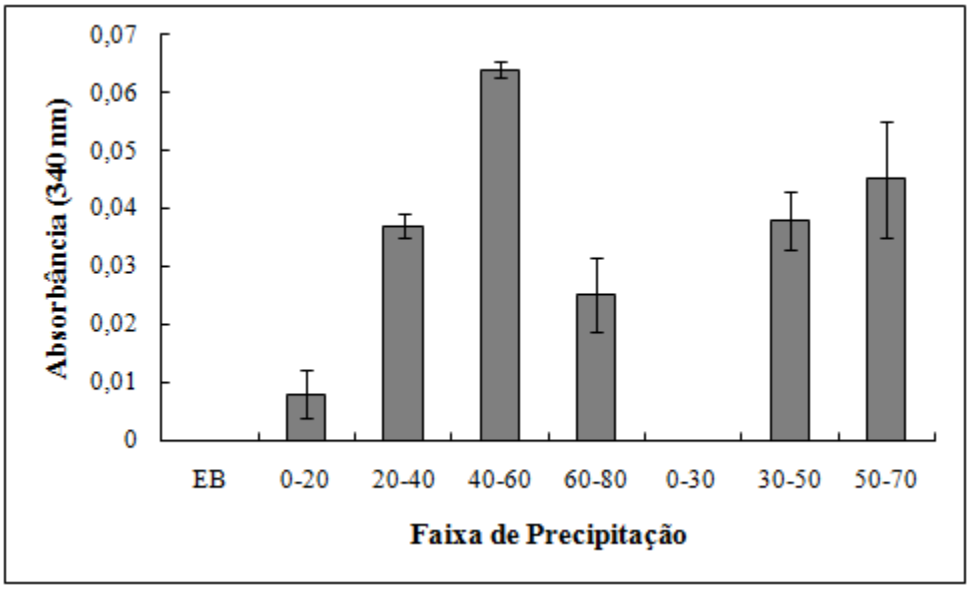

Figura 25 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima LOR (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm

4.7.3 Determinação da atividade específica da LOR

A atividade específica da LOR (Figura 26) variou de 0,099 a 0,210 ηmol NADPH oxidado.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, no mutante Risø 1508 e no transgênico L2, respectivamente. Os materiais transgênicos exibiram grande variabilidade de reposta em relação ao controle não transformado, o qual apresentou atividade de 0,180 ηmol NADPH oxidado.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. Os transgênicos L1, L3 e L6 apresentaram redução em relação ao controle não transformado de 56,16, 40,90 e 1,25%, respectivamente. Por outro lado, L2, L5 e L4 exibiram aumentos na atividade em relação ao controle não transformado de 19,16, 8,82 e 7,78% respectivamente.

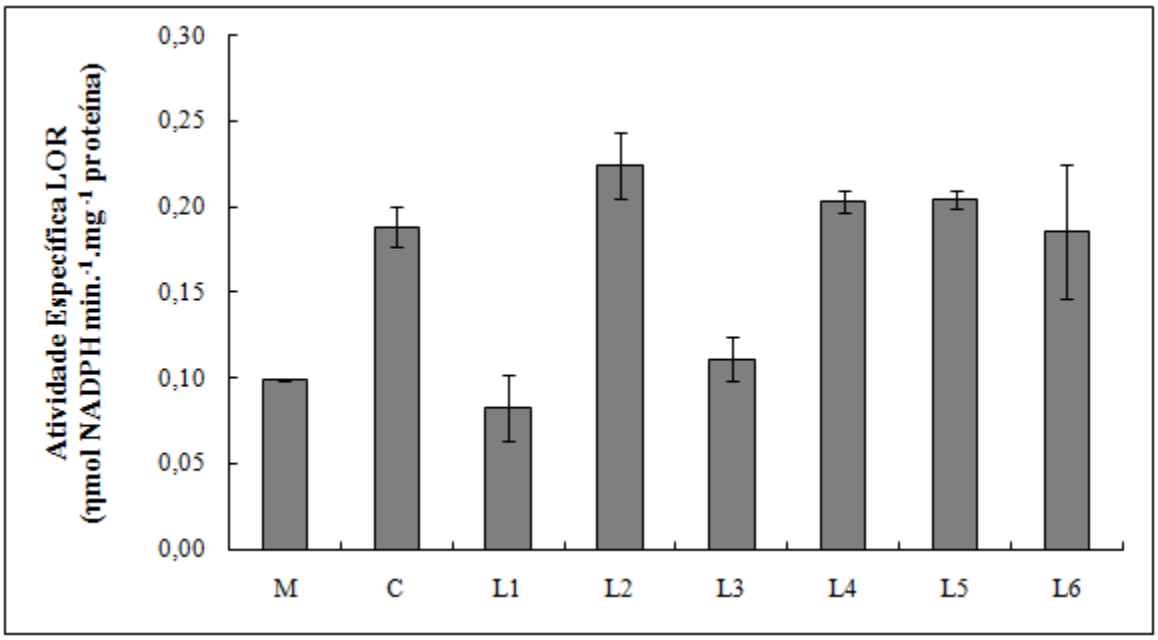

Figura 26 - Atividade específica de LOR em ηmol NADPH.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

4.7.4 Determinação da atividade da SDH durante o desenvolvimento da semente

A atividade da enzima SDH foi detectada durante todo o desenvolvimento das sementes, com valores de 2,221, 2,274 e 2,188 ηmol NAD reduzido.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína para os estágios 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 27). Assim, ambas as enzimas da via de catabolismo de lisina apresentaram maior atividade na mesma fase de desenvolvimento das sementes, o que era esperado, pois fazem parte de um polipeptídio bifuncional e que atuam de forma sequencial para desempenhar suas funções.

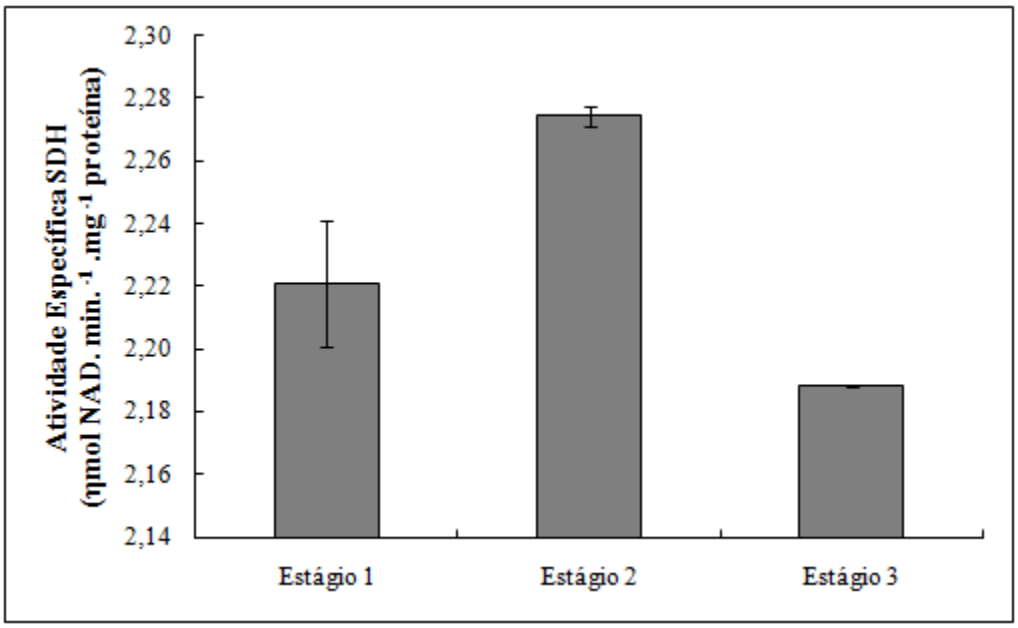

Figura 27 - Atividade específica de SDH emηmol NAD .min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína de sementes imaturas em três estágios de desenvolvimento da cultivar BRS Sampa

4.7.5 Fracionamento com sulfato de amônio para enzima SDH

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado em duas séries, assim como para as demais enzimas descritas, e está apresentando na Figura 28. Foi possível detectar atividade de SDH em todas as faixas de saturação, com absorbâncias maiores do que aquelas encontradas para enzima LOR.

Na primeira série de fracionamento (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) apenas as faixas de 20-40% e 40-60% apresentaram aumento na absorbância de aproximadamente de duas e seis vezes em relação ao extrato bruto. Na segunda série do fracionamento as faixas de 30-50% e 50-70% apresentaram absorbância seis e três vezes maiores que o extrato bruto. Assim a faixa ideal para concentrar a enzima SDH é de 30-60% de saturação com sulfato de amônio, pois a partir de 30% é que há grande concentração da enzima e até 60% em que é o limite para que inicie uma queda dessa concentração. Estes resultados mostram que a eficiência de purificação nesta primeira etapa para as enzimas LOR e SDH é muito semelhante, além de ocorrer maior concentração da enzima na mesma faixa de saturação.

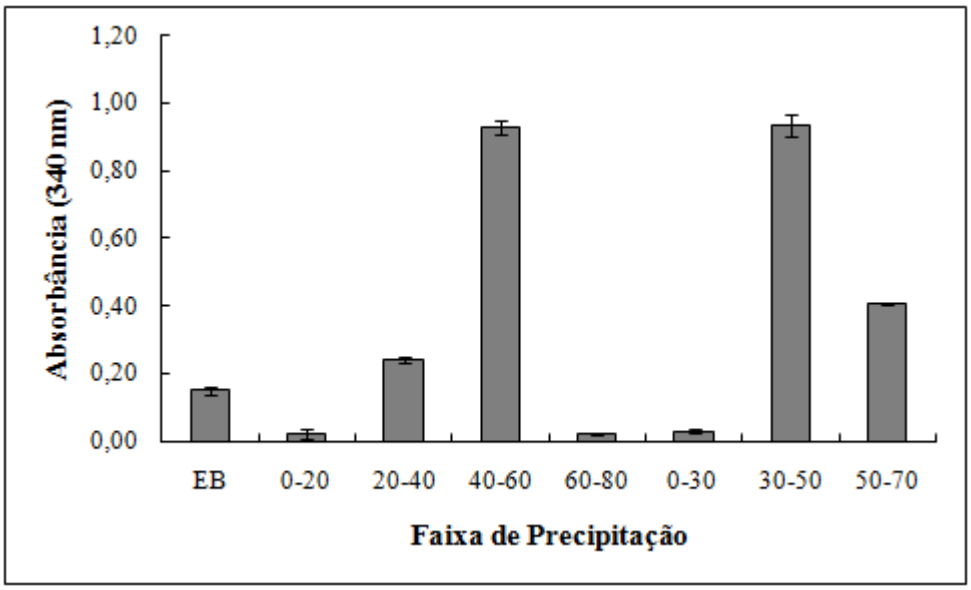

Figura 28 - Fracionamento com sulfato de amônio para enzima SDH (cultivar BRS Sampa no estágio 2). Os valores representam a absorbância a 340 nm

4.7.6 Determinação da atividade específica da SDH

A atividade específica de SDH variou de 1,87 a 3,97 ηmol NAD reduzido.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína, de acordo com a Figura 29. Os materiais transgênicos exibiram grande variabilidade de reposta em relação ao controle não transformado, que apresentou atividade de 3,02 ηmol NAD reduzido.min.$^{-1}$.mg^{-1} de proteína. Os transgênicos L1, L3, L5 e L6 apresentaram redução em relação ao controle não transformado de 37,96, 35,27, 10,03 e 2,11 % respectivamente. Por outro lado, L2 e L4 exibiram aumentos na atividade de 31,38 e 13,97%, respectivamente. Esses resultados são compatíveis com aqueles encontrados para LOR, entretanto sendo duas a três vezes maiores para SDH, exceto para L5 que a atividade da SDH apresentou um aumento discreto de atividade, mas para LOR a atividade foi reduzida. A atividade específica de SDH foi superior à atividade específica de LOR para todos os materiais estudados. O mutante Risø 1508, que apresentou a menor atividade de LOR, aparece com atividade maior que o controle não transformado (3,40 ηmol NAD reduzido.min.$^{-1}$.mg^{-1}). A razão SDH/LOR entre os transgênicos (exceto L1) e o controle não transformado foi muito semelhante, variando entre 13,29 a 17,72 para L5 e L2, respectivamente. Por outro lado, esta razão foi muito maior em L1 e o mutante Risø 1508 (22,75 e 34,73, respectivamente). O grande número de isoformas de SDH (Figura 30) pode explicar a grande atividade desta enzima em relação à atividade de LOR para todos os materiais.

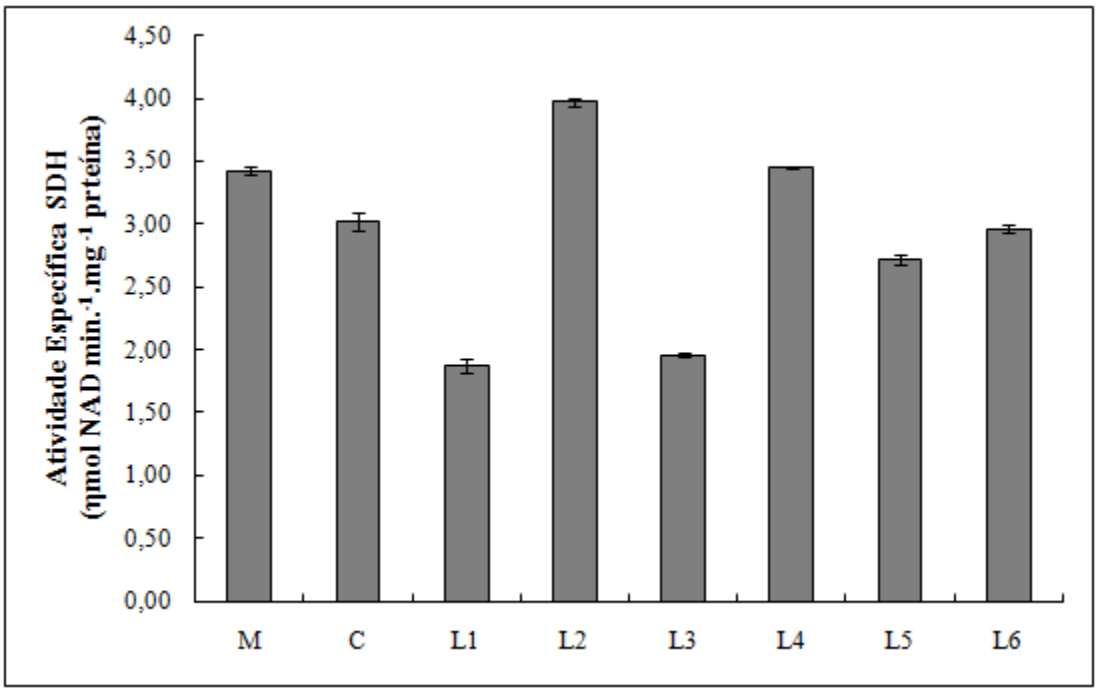

Figura 29 - Atividade específica de SDH em ηmol NAD.min.$^{-1}$.mg^{-1} proteína. M. Mutante Risø 1508; C. Controle não transformado; L1-L6. Linhagens transgênicas AsHorC

4.7.7 Análise qualitativa da enzima SDH

A análise qualitativa da enzima SDH foi realizada com as amostras procedentes da precipitação com sulfato de amônio de 30-60% do estágio 2 de cada material, sendo aplicados no gel 200 µg de proteína. Cinco isoformas de SDH foram observadas no controle não transformado e nos materiais transgênicos, enquanto que no mutante Risø 1508 apenas quatro isoformas foram encontradas, e com menor intensidade quando comparada com os demais materiais, sugerindo que este é um fator chave para o acúmulo de lisina neste material (Figura 30). Esta hipótese se torna válida, pois as análises do milho mutante opaco-2 apresentam redução na atividade das enzimas de degradação de lisina, além de outros fatores.

Além disso, é possível observar que apenas duas isoformas que ocorrem em cevada são compatíveis com aquelas que aparecem em milho. Esse resultado para cevada é particularmente interessante, pois nenhum dado neste sentido está presente na literatura.

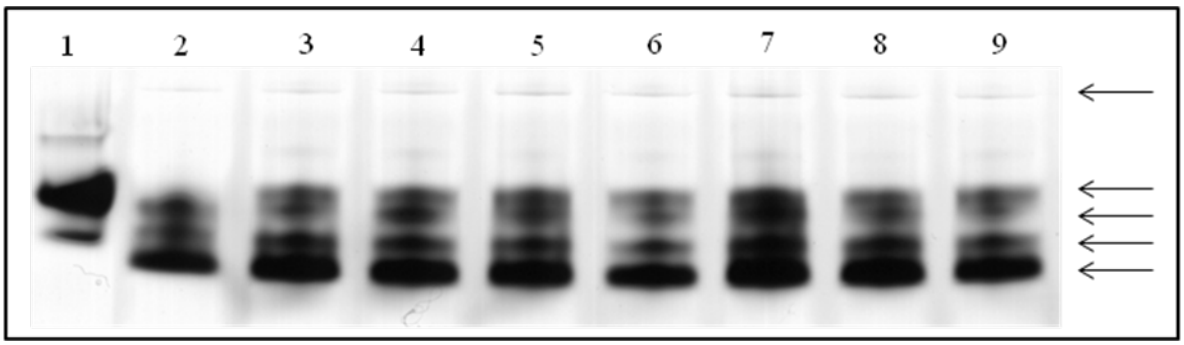

Figura 30 - Análise qualitativa da enzima SDH em gel não desnaturante PAGE. 1. Milho normal; 2. Mutante Risø 1508; 3. Controle não transformado; 4-9. Linhagens transgênicas AsHorC. As setas indicam diferentes isoformas da enzima

5 DISCUSSÃO

Atualmente, uma das estratégias mais promissoras para melhorar o valor nutricional de proteínas de cereais é a alteração das proporções relativas das principais proteínas de reserva do endosperma, através da tecnologia do RNA interferente (RNAi) (SEGAL; SONG; MESSING, 2003; HUANG et al., 2004; TANG; GALILI, 2004; HANSEN et al., 2007).

Lange e colaboradores (2007) exploraram as diferenças significativas entre as prolaminas ricas (B, D e γ hordeínas) e as pobres (C hordeína) em enxofre, com objetivo de interromper ou reduzir a expressão do subgrupo C hordeína através da tecnologia do RNAi. A integração no genoma de cevada de uma sequência antisenso do gene que codifica para as C hordeínas com intuito de silenciar os genes dessas proteínas pós-transcricionalmente, permitiu a geração de linhagens transgênicas de cevada com perfil de proteínas de reserva alterado.

Através do método que utiliza *Agrobacterium* para a transformação de plantas, foram geradas trinta e cinco linhagens transgênicas, sendo que este número representa uma frequência de transformação de 5,4% (LANGE et al., 2007). A geração T1 das trinta e cincos linhagens transgênicas obtidas passou por uma triagem que selecionou seis materiais que apresentaram as maiores alterações no subgrupo das hordeínas, principalmente com redução no conteúdo das C hordeínas.

Análise por RT-PCR revelou que todos os seis materiais selecionados expressaram a sequência antisenso do gene da C hordeína em folhas, o qual está de acordo com a forte expressão constitutiva do promotor ubiquitina de milho, sendo que este promotor foi utilizado, pois confere uma forte expressão em grãos de cevada. Além disso, a análise de Southern blot revelou que duas linhagens apresentaram um único sítio de integração do transgene, em L1 e L4, uma linhagem apresentou dois sítios de integração, em L2 e quatro sítios de integração foram identificados em L3, L5 e L6. Ainda foi observado que linhagens L1, L2, L3 e L5 podem conter rearranjos e/ou deleções (LANGE et al., 2007). Esses resultados podem ocorrer em função do método de transformação utilizado, pois com uso da *Agrobacterium* é possível obter uma integração mais precisa de um menor número de cópias do transgene, com um maior grau de estabilidade deste transgene na planta transformada (SHRAWAT; LORZ, 2006).

Os resultados referentes ao perfil protéico mostraram linhagens transgênicas com redução no conteúdo total de hordeínas e relativa redução no subgrupo C hordeína e ganhos nos demais (B, D e γ hordeínas) com aumentos compensatórios nas demais frações protéicas (albuminas,

globulinas e glutelinas). Alterações no perfil de aminoácidos também foram encontradas, com incrementos nos aminoácidos essenciais, lisina, metionina, treonina, isoleucina, leucina e valina obtendo-se incrementos na ordem de 16%, 13,2%, 10,7%, 6,6%, 8,1% e 17,1% respectivamente, além de redução nos teores de glutamina, prolina e fenilalanina, sendo estas coerentes com a redução do subgrupo C hordeína, que contêm valores expressivos destes aminoácidos (LANGE et al., 2007).

Desta forma o presente trabalho utilizou as seis linhagens transgênicas para desenvolvimento de estudos bioquímicos com enfoque na via metabólica do ácido aspártico e seus mecanismos de regulação, para melhor elucidar os incrementos nos teores de aminoácidos essenciais nestes materiais de cevada e responder a seguinte pergunta: **A alteração do perfil das proteínas de reserva ocasionou alterações bioquímicas no metabolismo da lisina?** A pergunta é válida sob vários aspectos, mas o principal deles é baseado no fato de que se existe a necessidade de mais lisina para incorporação na proteína de reserva, então será que as enzimas que controlam o metabolismo desse aminoácido foram alteradas para permitir esse excesso necessário para incorporação nas proteínas de reserva? O caso do mutante opaco-2 de milho é bem característico e suporta esta hipótese, pois já foi demonstrado que o gene *o2* é regulador de genes que codificam algumas das enzimas do metabolismo de lisina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

As análises desses materiais transgênicos foram procedidas na geração T2, sendo que algumas análises já realizadas pelo grupo de pesquisa que cedeu os materiais foram realizadas novamente (determinação de proteína total e proteínas de reserva), com uso de outras técnicas, para obtenção de um conjunto de dados homogêneos capazes de elucidar a pergunta chave deste trabalho.

Os teores de proteína total determinado nos materiais transgênicos apresentaram ampla variação (15,38 a 18,46%), mas inferior ao observado no controle não transformado (22,48%) (Figura 6). Esses resultados foram ligeiramente superiores aos relatados por Lange e colaboradores (2007), que encontraram teores variando de 12,8 a 15,7% para os materiais transgênicos e 17,1% para o controle não transformado. Essa diferença pode ter ocorrido em função do estágio fisiológico e os componentes das sementes utilizados para esta determinação, uma vez que os autores deste trabalho utilizaram apenas o endosperma após as sementes serem submetidas ao processo germinativo e retirando assim os embriões após o período de

estabelecimento do sistema radicular. A semente seca de cevada é composta por aproximadamente 10% de casca e pericarpo, 14% de testa e aleurona, 73% de endosperma e 3% de embrião (NOVACK, 2010). O embrião é relativamente rico em proteínas (25%), assim como a camada de aleurona, os quais não foram removidos para determinação de proteína total neste trabalho e podem ter acarretado em valores superiores. Apesar dessa diferença encontrada nos teores de proteína total, esses valores são similares aos encontrados por Oscarsson e colaboradores (1996) que encontraram valores de 9,3 a 21,9% ao avaliarem 16 linhagens de cevada utilizadas na alimentação e por Helm e colaboradores (2004) que encontraram valores de 13,06 a 16,02% em seis cultivares de cevada nua que são utilizadas para alimentação.

O mutante Risø 1508 apresentou teor de proteína de 19,49% (Figura 6), sendo que este teor se encontra dentro ampla faixa de variação encontrada por Åman e Newman (1986) quando caracterizaram bioquimicamente seis mutantes de cevada para alta lisina e encontraram teores de proteína total entre 11,7 a 21%, dependendo do background genético.

A cultivar BRS Sampa apresentou o menor conteúdo de proteína total (13,48%) dos materiais estudados, o que foi esperado, pois se trata de uma cultivar cervejeira em que se buscam teores de proteína menores para melhorar a qualidade do malte. Resultados semelhantes foram relatados por Mayer (2007) que avaliou cultivares brasileiras de cevada cervejeira e teores variando de 11,72 a 14,30% foram observados, assim como Yalçin e colaboradores (2007) que encontram teores de 10 a 16%.

O nitrogênio afeta drasticamente o metabolismo das plantas (MEDICI et al., 2004) e pode ter sido a causa da ampla variação no conteúdo de proteína total observada nos materiais transgênicos, consequentemente pode afetar a avaliação das proteínas de reserva, bem como a composição de aminoácidos entre as diferentes linhagens transgênicas estudadas. O subgrupo das B e principalmente das C hordeínas atuam como dreno para o excesso de nitrogênio, sendo este processo acentuado quando há deficiência na fertilização de enxofre, em que as proporções das C hordeínas (que são proteínas pobres em enxofre) aumentam ainda mais. Em contraste, o conteúdo de glutelinas é relativamente pouco alterado em função da fertilização nitrogenada (QI; ZHANG; ZHOU, 2006; SAVIN; PRYSTUPA; ARAUS, 2006). Além disso, o incremento no teor de nitrogênio e consequentemente o aumento no teor de proteína total nas sementes acarreta em decréscimo no teor de lisina nas proteínas (SHEWRY, 1993).

O perfil de proteínas de reserva dos materiais transgênicos exibiu redução na proporção das prolaminas e incrementos compensatórios na fração glutelina, e ainda aumentos discretos da fração globulina, porém não para todas as linhagens transgênicas (Tabela 3), sendo que estes resultados foram muito semelhantes aos obtidos por Lange e colaboradores (2007).

A redução na proporção das prolaminas mostra o efeito da transformação para supressão da fração C hordeína, entretanto essa redução não atingiu maiores dimensões, em função dos diferentes resultados da eficiência transcricional do transgene inserido (LANGE et al., 2007). Além disso, o número de genes que codificam para este subgrupo de proteínas (C hordeína) é relativamente alto, existem mais de 30 genes no locus *Hor1*, sendo que 34 polipeptídios diferentes de C hordeínas foram identificados através de eletroforese bidimensional (SHEWRY et al., 1985). Outra hipótese está relacionada com o teor de proteína total que pode afetar a expressão das C hordeínas. Bleidere e Grunte (2009) relacionaram o teor de proteína total e o perfil de hordeínas, e observaram que qualitativamente não há alteração neste subgrupo de proteínas, porém variedades que apresentaram menor teor de proteína, também exibiram menor intensidade nas bandas das C hordeínas, corroborando a hipótese de que a redução nas C hordeínas não foi mais intensa devido os materiais transgênicos manterem níveis relativamente altos de proteínas totais, o qual está associado à adubação nitrogenada em excesso, o que ocorre frequentemente em cultivos em casa de vegetação.

Além disso, alterações na regulação transcricional dos genes que codificam as hordeínas foram observadas. Hansen e colaboradores (2007) através da técnica de microarranjo e validação da técnica por RT-PCR, identificaram que os genes que codificam para as B e γ hordeínas tiveram sua expressão aumentada nestes materiais transgênicos de cevada, por outro lado, os genes que codificam as C e D hordeínas tiveram sua expressão suprimida. Além disso, foi observada a indução da expressão do gene que codifica o fator de transcrição BPBF (*barley prolamine-binding factor*) que regula a expressão dos genes que codificam as B hordeínas (MENA et al., 1998).

A alteração no padrão de proteínas de reserva foi relatada em inúmeros trabalhos na literatura, tanto em mutantes naturais como também em materiais transgênicos. Em todos os casos foi verificado que a redução de uma determinada fração protéica ocasionou incrementos compensatórios em um ou mais grupos protéicos, de acordo com os resultados do presente trabalho (Tabela 3).

Azevedo e colaboradores (2003) ao estudarem o genótipo selvagem de milho Oh43+ e as mutações *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* neste background genético, observaram que todas as mutações levaram a redução das prolaminas (zeínas) e aumentos na fração glutelina de até 2,5 vezes no mutante Oh43*o2*. As frações albuminas e globulinas apresentaram incrementos muito pequenos em todas as mutações, sendo valores de magnitude semelhantes ao tipo selvagem. Resultados semelhantes foram observados para o tipo selvagem W22+ e as mutações W22*o10*, W22*o11* e W22*o13* neste background genético, em que ocorreram aumentos de até 1,7 vezes na fração glutelina (AZEVEDO et al., 2004).

Huang e colaboradores (2006) utilizaram a técnica do RNAi para modificar a composição das proteínas de reserva de milho, tendo como alvo de supressão as proteínas α-zeína de 19 kDa e α-zeína de 22 kDa. Os resultados mostraram redução na proporção de zeínas e consequentemente aumento na fração glutelina em maiores proporções, e nas frações albumina/globulina em menores proporções. Em um trabalho subsequente com esses materiais transgênicos de milho, Frizzi e colaboradores (2010) mostraram que a substituição das α-zeína de 19 e 22 kDa, que são proteínas pobres em lisina, por frações protéicas que apresentam um conteúdo de aminoácidos balanceado e maior proporção de lisina em sua composição, como as globulinas, albuminas e glutelinas foram responsáveis pelos incrementos no conteúdo de lisina e triptofano nas sementes.

Kawakatsu e colaboradores (2010) produziram diferentes linhagens transgênicas de arroz com padrão de proteínas de reserva alterado. Os genes que codificam as glutelinas, globulinas ou prolaminas foram suprimidos separadamente, através da técnica do RNAi. Em todos os casos, a redução da expressão de um determinada proteína de reserva acarretou em incrementos compensatórios de outras proteínas, tanto nos transcritos de mRNA quanto nos níveis de proteínas acumulados. Alterações significativas no conteúdo de aminoácidos essenciais foi observado principalmente nas plantas que apresentaram redução na prolamina de 13 kDa, em que aumentos de até 56% nos níveis de lisina nas sementes foram observados em relação ao controle não transformado. Os autores sugerem que este incremento foi resultado do maior conteúdo de proteínas ricas em lisina em substituição da prolamina de 13 kDa que é pobre neste aminoácido.

Em todos os trabalhos mencionados, inclusive nos materiais transgênicos de cevada estudados no presente trabalho, a alteração nas proporções de proteínas de reserva ocasionou incrementos no conteúdo de lisina total nas sementes.

Além do aumento da proporção das frações protéicas ricas em lisina, foi verificado nos materiais transgênicos de cevada que todas as frações protéicas apresentaram incrementos no conteúdo de aminoácidos essenciais em relação ao controle não transformado. Na fração globulina foram identificados incrementos principalmente de metionina (Tabela 4), na fração albumina foram observados aumentos principalmente em lisina (Tabela 5), nas prolaminas (Tabela 6) e glutelinas (Tabela 8) esses incrementos foram identificados nos quatro aminoácidos da via do ácido aspártico (isoleucina, treonina, metionina e lisina), mas com proporções variadas e algumas exceções como previamente apresentando.

No mutante de cevada para alta lisina (Hiproly) os altos níveis de lisina são explicados por aumentos específicos de quatro proteínas ricas em lisina, β -amilase (5 g% de lisina), proteína Z (inibidor de proteases) (7,1 g%), CI-1 (inibidores de quimotripsina) (9,5 g%) e CI-2 (11,5 g%) que juntas contabilizam cerca de 17% do total de globulinas comparada com apenas 7% em cultivares normais (BRANDT, 1976; HEJGAARD; BOISEN, 1980; WILLIAMSON; FORDE; KREIS, 1988). Essas proteínas pertencem as frações protéicas albuminas/globulinas e podem explicar a alteração da composição de aminoácidos nessas frações protéicas. Está hipótese é precisamente válida, pois Hansen e colaboradores (2007) através da análise de microarranjo verificaram que os genes que codificam inibidores de quimotripsina (CI-2A), o inibidor de α-amilase e o fator tripsina XIIA, tiveram sua expressão aumentada. A proteína Z é pertence à classe das albuminas e apresenta massa molecular de 40 kDa (RASMUSSEN et al., 1984). A análise por SDS-PAGE da fração albumina (Figura 8) confirma a presença desta proteína com maior intensidade nos materiais transgênicos em relação ao controle não transformado. Além dessa proteína, as proteínas de 10, 15, 46 e 49 kDa também foram mais intensas nos materiais transgênicos. Entretanto, na fração globulina não foi observado diferenças na intensidade dos polipeptídios (Figura 7).

Além das alterações na composição de aminoácidos das diferentes frações protéicas, também foram observados incrementos no conteúdo total de aminoácidos livres em todos os materiais transgênicos (exceto L6) (Figura 12). Os incrementos ocorreram na ordem de duas a três vezes nos aminoácidos essenciais histidina, lisina, fenilalanina e metionina, e nos aminoácidos não essenciais alanina, arginina e tirosina (Tabela 9).

Esses resultados mostram que pode ter ocorrido uma redistribuição dos aminoácidos entre as proteínas de reserva, mas ainda assim a demanda desses para incorporação nas proteínas foi

aumentada, pois proteínas pobres em lisina (C hordeínas) foram substituídas por proteínas ricas em lisina (glutelinas, globulinas e albuminas) e somente a redistribuição ou o balanço entre o pool de aminoácidos livres e incorporados não poderiam explicar tais aumentos. Portanto, a pergunta que permanece é se as enzimas da via do ácido aspártico que são responsáveis pela síntese de quatro aminoácidos essenciais foram alteradas para permitir esse excesso de aminoácidos necessários para a incorporação nas proteínas?

A aspartato quinase é a primeira enzima envolvida na via do acido aspártico. A atividade desta enzima é determinada pela ação de pelo menos duas isoenzimas separadas, uma que é sensível a inibição causada por lisina e outra que é sensível a inibição causada por treonina (AZEVEDO et al., 1997). Além disso, em plantas superiores normalmente a isoforma sensível a inibição por lisina representa de 50-80% a atividade total de AK, exceto para o endosperma de coix que a isoforma sensível a inibição por treonina é predominante (LUGLI et al., 2002).

Em cevada o aminoácido lisina causou a maior inibição da atividade de AK, sugerindo que a isoforma sensível a inibição por lisina é predominante. A atividade desta enzima foi superior em todos os materiais transgênicos (4,44 a 47,27%) (Figura 17) corroborando a hipótese de que há a necessidade de alteração no metabolismo de aminoácidos para suprir a demanda para incorporação no novo padrão de proteínas de reserva destes materiais transgênicos. Entretanto a sensibilidade de ambas as isoformas de AK foi alterada, sendo os materiais transgênicos mais sensíveis a inibição causada pelos aminoácidos lisina e treonina, portanto sofreram maior inibição (Tabela 11). Além disso, foi observado alteração na distribuição das isoformas predominantes.

Alguns trabalhos com mutantes naturais de milho para alta lisina mostram alterações tanto na atividade de AK quanto na sensibilidade a inibição causada pelos aminoácidos produtos da via, mas em relação à sensibilidade, esses trabalhos mostram exatamente o oposto do que ocorreu com os transgênicos de cevada, sugerindo que se a sensibilidade não fosse alterada ou se fosse reduzida, incrementos ainda maiores poderiam ser obtidos nestes materiais. Esse resultado sugere que a planta busca um equilíbrio nos níveis de lisina nas células.

Azevedo e colaboradores (2003) avaliaram as enzimas envolvidas no metabolismo de lisina no milho selvagem Oh43+ e as mutações *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* neste background genético e observaram que a isoforma sensível a lisina é a predominante em todos os materiais, independente da mutação. Nestes materiais mutantes a sensibilidade das isoformas de AK foi alterada. A inibição causada pelo aminoácido treonina foi baixa em todos os mutantes, mas as

mutações *o2* e *fl1* causaram uma inibição ainda menor. No entanto a inibição causada pela lisina sofreu uma redução substancial em todos os mutantes. Além disso, outras mutantes foram avaliadas, e a mutação *o11* introduzida no background genético do tipo selvagem W22+ interessantemente exibiu ativação de 30% na atividade da enzima AK na presença de treonina, enquanto que a mutação *o13* exibiu uma inibição muito baixa (2,83%) comparado com o tipo selvagem W22+ (AZEVEDO et al., 2004).

Wang e colaboradores (2001) também observaram alteração na sensibilidade das isoformas de AK em diferentes linhagens em que a mutação *o2* foi inserida. Além disso, esses autores identificaram a presença de muitos loci de caráter quantitativo (QTL) para aminoácidos solúveis totais. Um desses QTL associado aos altos níveis de lisina no endosperma está fortemente ligado ao gene *ask2* que codifica a isoforma monofuncional de AK no cromossomo 2 de milho. A análise da sequência de nucleotídeos dos alelos de *ask2* mostrou que estes diferem em um único aminoácido na região carboxi-terminal, sugerindo um novo mecanismo de regulação para a isoenzima AK monofuncional, sendo que esta região da enzima pode desempenhar papel fundamental na regulação da sua atividade básica (WANG et al., 2007). Além disso, Gutiérrez-Rojas e colaboradores (2010) identificaram inúmeros QTLs relacionados com o conteúdo de aminoácidos em milho, os quais juntos explicam 39% da variação no conteúdo total de aminoácido. Para os aminoácidos triptofano, metionina e lisina foram identificados seis, quatro e três QTLs respectivamente, os quais explicam 49,1, 57,3 e 32,1% da variação no conteúdo desses aminoácidos. Em cevada não há relatos neste sentido na literatura, entretanto QTL como estes encontrados em milho possam estar atuando na regulação das enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos, como o caso da enzima monofuncional de AK.

A homoserina desidrogenase (HSDH) é a primeira enzima envolvida na síntese de treonina e metionina. Duas isoenzimas de HSDH têm sido observadas, uma sensível e a outra resistente a inibição por treonina, sendo que esta última aparece como uma isoforma monofuncional, encontrada no citoplasma, cuja função é ainda desconhecida (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992).

A determinação da atividade de HSDH revelou a presença de duas isoformas desta enzima, uma sensível e outra resistente à inibição causada pelo aminoácido treonina, sendo esta última a isoforma predominante. Todos os materiais transgênicos apresentaram menor atividade desta enzima, exceto L2 (Figura 20). Além disso, os materiais transgênicos apresentaram uma

inibição muito inferior da atividade da enzima comparado com o controle não transformado, sugerindo que a distribuição das isoformas de HSDH nos transgênico foi alterada (Tabela 13).

Alguns resultados divergentes são encontrados na literatura. Por exemplo, a atividade da enzima HSDH foi estimulada na presença de treonina no mutante Oh43*o1* e no W22*o11* previamente citados, porém nenhuma outra alteração foi observada nos demais mutantes estudados (Oh43*o2*, Oh43*fl1*, Oh43*fl2*, W22*o10* e W22*o13*), sugerindo que esta enzima não está relacionada diretamente com a síntese de lisina, entretanto se encontrada no ponto de ramificação da via do ácido aspártico, em que esta enzima e a DHDPS competem por um substrato comum (ASA), o qual pode ser um ponto chave na determinação do fluxo de carbono da via que leva a síntese de lisina ou treonina (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004). Além disso, nenhum incremento no conteúdo de treonina e metionina solúveis foi observado nesses mutantes naturais.

A enzima DHDPS é a primeira enzima relacionada diretamente com a síntese de lisina. Todos os materiais transgênicos de cevada apresentaram incrementos na atividade específica da enzima DHDPS em relação ao controle não transformado (Figura 23), com aumentos de 1,50 a 66,32%. Além disso, a sensibilidade da enzima à inibição causada por lisina foi reduzida nesses materiais (Tabela 15). Em relação a expressão gênica avaliado por ensaio de microarranjo, foi verificado que o gene que codifica a enzima diaminopimelato epimerase 2 (DAP2) também apresentou uma expressão superior nos materiais transgênicos (HANSEN et al., 2007). Essa enzima está envolvida nas etapas finais da síntese de lisina na via denominada via do ácido diaminopimélico (DAP) (HUDSON et al., 2005; HUDSON et al., 2006). Entretanto nenhum gene relacionado com a via do ácido aspártico apresentou alterações na regulação transcricional, sugerindo que os incrementos nesses aminoácidos ocorreram em função de uma regulação pós transcricional, como o aumento da tradução destes transcritos, e possivelmente pós traducional, que pode envolver alterações nos sítios alostéricos das enzimas, diminuindo ou aumentando a afinidade da enzima pelo seu inibidor (*Ki*). É importante ressaltar que o estágio fenológico das sementes utilizados para as análises bioquímicas e microarranjo foram diferentes. No ensaio de microarranjo foram utilizadas sementes no estágio 3 (Escala de Zadoks código 85) e para análise das enzimas foi utilizado estágio 2 (Escala de Zadoks código 77), entretanto a atividade das enzimas entre os diferentes estágios de desenvolvimento das sementes em cevada foi estável

(Figuras 15,18 e 21). Mas outro agravante foi que esses materiais foram cultivados em condições ambientais diferentes.

Varisi e colaboradores (2007) isolaram e avaliaram a atividade da enzima DHDPS em diferentes mutantes de milho para alta lisina (Oh43*o1*, Oh43*o2*, Oh43*fl1* e Oh43*fl2*) e observaram que a atividade desta enzima é fortemente inibida na presença do aminoácido lisina em todos os materiais. Além disso, foi observado que a atividade específica desta enzima não apresentou diferenças significativas entre os diferentes mutantes estudados, sugerindo que o acúmulo de lisina nestes materiais é mais dependente das demais enzimas da via do ácido aspártico do que propriamente da DHDPS. A via de degradação de lisina nesses materiais é drasticamente alterada, o que explica os altos níveis de lisina solúvel nas sementes destes materiais. Além disso, os autores sugerem que há uma redistribuição dos aminoácidos entre os diferentes grupos de proteínas de reserva, resultando assim num saldo positivo deste aminoácido na forma solúvel, mas a composição de aminoácido de cada fração protéica não foi determinada.

Entretanto, a importância do papel regulatório da enzima DHDPS na síntese de lisina foi confirmada por inúmeros trabalhos utilizando mutantes bioquímicos e plantas transgênicas que apresentam as enzimas AK e DHDPS alteradas, bem como as enzimas envolvidas na degradação de lisina (VARISI et al., 2007).

Huang e colaboradores (2005) expressaram o gene *cordapA* que codifica a enzima DHDPS de *Corynebacterium glutamicum* insensível a inibição por lisina em sementes de milho, e observaram elevados níveis de lisina solúvel, sendo até 43 vezes superior ao controle não transformado. Além disso, quando essas linhagens foram combinadas com materiais transgênicos com reduzido teor de zeínas observou-se um efeito sinergístico de ambas as transformações, resultando nu conteúdo de lisina de até 67 vezes maior que o controle não transformado. Frizzi e colaboradores (2008) utilizaram um método de expressão simultânea da enzima DHDPS de *Corynebacterium glutamicum* (CordapA), insensível a inibição por lisina, e RNAi para reduzir o catabolismo de lisina, através de um único cassete de expressão, em que a sequência repetida invertida de LKR/SDH (IR-LKR/SDH) foi inserida em um íntron no trangene que expressa CordapA. Essa combinação resultou em aumentos nos níveis de lisina solúvel acima de 4000 ppm nas sementes transgênicas, comparado com apenas 100 ppm no controle não transformado. Estes resultados confirmam a importância da enzima DHDPS no controle da síntese de lisina e

indicam que esta enzima provavelmente necessita ser desregulada para permitir incrementos no acúmulo de lisina.

O trabalho de Huang et al. (2005), assim como inúmeros outros encontrados na literatura, mostram também a importância da via de degradação de lisina para o acúmulo deste aminoácido nas sementes. Duas enzimas estão envolvidas na degradação de lisina em animais, microorganismos e plantas. A enzima lisina α-cetoglutarato redutase (LKR), também conhecida como lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR) catalisa a condensação da lisina e do cetoglutarato para formar sacaropina, que em seguida é hidrolisada a ácido glutâmico e ácidoα -aminoadípico através da enzima sacaropina desidrogenase (SDH) (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Os resultados para essas enzimas nos materiais transgênicos de cevada foram bastante variáveis. Os transgênicos L1, L3 e L6 apresentaram redução na atividade de LOR (Figura 26) e SDH (Figura 29), enquanto que L2, L4 exibiram aumento na atividade de ambas as enzimas, e ainda L5 apresentou pequenas variações mantendo-se praticamente igual ao controle não transformado. Tais variações são encontradas na literatura para diferentes mutações que levam ao acumulo de lisina, e sugerem que estas enzimas podem ou ser ponto chave no acúmulo de lisina nas sementes.

Estudos realizados por Gaziola e colaboradores (1999) mostraram que houve uma redução nos níveis de mRNA (superior a 90%), proteína madura e também da atividade da enzimas LOR e SDH, confirmando o papel do fator de transcrição opaco-2 no catabolismo de lisina. Além deste trabalho, as mutações *o2*, *fl1* e *fl2* inseridas no background genético Oh43+ apresentaram atividade dessas enzimas drasticamente reduzidas, sendo até seis vezes menor na mutação *o2*. A atividade de SDH nesses materiais acompanhou diminuições semelhantes à LOR (AZEVEDO et al., 2003). As mutações *o10* e *o13* inseridas no background do tipo selvagem W22+ apresentaram resultados muito semelhantes, com redução na atividade de LOR de 4,5 e 5,6 vezes respectivamente. Porém para a enzima SDH a diminuição da atividade não foi tão drástica (AZEVEDO et al., 2004). Por outro lado, esses resultados mostraram exceções, em que os mutantes W22*o11* e Oh43*o1* apresentaram incremento na atividade de LOR e SDH em relação ao tipo selvagem, sugerindo que o acúmulo de lisina nas mutações *o11* e *o1* não são determinadas pela redução da sua degradação.

Hournard e colaboradores (2007) utilizaram a técnica do RNAi , em que foi realizada a transformação da planta com uma construção IR-*SDH* (sequência repetida invertida do domínio SDH da LKR/SDH) sob controle de um promotor endosperma específico e obtiveram aumentos nos níveis de lisina solúvel de 30 ppm para 500-700 ppm. Em um trabalho subsequente utilizando-se a mesma tecnologia do RNAi para reduzir o catabolismo de lisina no embrião e no endosperma de sementes de milho, Reyes e colaboradores (2009) observaram efeito sinergístico quando foi induzida a supressão da LKR-SDH em ambos os tecidos, em que a supressão no embrião resultou num acúmulo de 0,2 $mg.g^{-1}$ matéria seca (MS) de lisina solúvel em sementes maduras, 0,90 $mg.g^{-1}$ MS no endosperma e na combinação de 1,60 $mg.g^{-1}$ MS. Entretanto este trabalho revelou que os aumentos de lisina solúvel não ocasionaram aumento na síntese de proteínas ricas em lisina, sugerindo que a disponibilidade de aminoácidos livres não é o fator limitante para que estes sejam incorporados em proteínas.

Nos materiais transgênicos de cevada além dos incrementos de lisina solúvel e incorporada em proteínas, foram observados também incrementos no conteúdo dos outros aminoácidos da via, principalmente metionina (Tabela 8, 9), o que é um resultado inesperado, pois as enzimas DHDPS e HSDH competem pelo mesmo substrato, entretanto os mecanismos de como diferentes rotas regulam e distribuem o (ASA) de acordo com as necessidades de síntese de cada aminoácido ainda não são conhecidos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Zhu e Galili (2003) ao expressaram DHDPS bacteriana insensível a inibição por lisina em um tipo selvagem de Arabidopsis e também em plantas mutantes que apresentam o catabolismo de lisina suprimido. A combinação destas duas alterações causou um efeito sinergístico em que o nível de lisina solúvel nas sementes foi até 80 vezes superior ao controle não transformado. Além disso, foi observada uma redução progressiva no conteúdo de treonina solúvel, o que era um resultado esperado, pois para a síntese desses dois aminoácidos as enzimas DHDPS e HSDH competem pelo mesmo substrato (ASA). Entretanto, foi observado que existe uma correlação positiva entre o conteúdo de lisina e o conteúdo de metionina solúvel, um resultado inesperado, pois a síntese de metionina também compete com a síntese de lisina.

Desta forma, esses autores sugerem que o metabolismo de lisina desempenha um papel regulatório central no metabolismo de aminoácidos nas sementes, particularmente daqueles que contêm o grupo amida e da metionina. Como o glutamato é precursor imediato para o aspartato e

também o principal produto final da via de degradação de lisina, estes três compostos formam este mecanismo regulatório de forma cíclica, sendo o fluxo deste ciclo fortemente regulado através da sensibilidade da enzima DHDPS à inibição causada por lisina e também através do estímulo da via de degradação da lisina por ela mesma (GALILI et al., 2001; GALILI, 2002). Assim, este possível mecanismo de controle atuaria não apenas para manter em níveis estáveis o conteúdo de lisina na célula, mas também para manter o balanço entre os níveis de glutamato e aspartato, que são dois importantes reguladores do metabolismo de aminoácidos em plantas cujos níveis que devem ser rigorosamente regulados (STITT et al., 2002).

Para elucidar a relação entre a síntese de lisina e metionina, Hacham e colaboradores (2007) cruzaram duas linhagens transgênicas de tabaco: uma que superexpressa a enzima DHDPS bacteriana insensível a inibição causada por lisina e apresenta elevados níveis de lisina, e a outra que superexpressa a enzima cistationina γ-sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtCGS), a primeira e única enzima ligada a síntese de metionina. Os resultados deste cruzamento mostraram aumentos nos níveis de metionina maiores do que nas plantas expressando apenas a AtCGS, por outro lado, os níveis de lisina permaneceram estáveis ao encontrado nas plantas superexpressando apenas a enzima DHDPS bacteriana. Os autores sugerem que os elevados níveis de lisina levam a uma redução dos transcritos que codificam a enzima S-adenosilmetionina sintase (SAMS), que leva a uma redução no composto S-adenosilmetionina (SAM), que por sua vez regula de forma negativa os transcritos da enzima CGS. A expressão da CGS é aumentada e, consequentemente, a síntese de metionina.

Mas, os dados obtidos nos experimentos de microarranjo dos materiais transgênicos de cevada avaliados neste trabalho revelaram que os genes que codificam as enzimas sulfito redutase, catalase e S-adenosilmetionina sintase (SAMS) tiveram sua expressão aumentada (HANSEN et al., 2007). A enzima sulfito redutase catalisa a redução do sulfito a sulfeto o qual é posteriormente catalisado juntamente com o-acetilserina pela enzima cisteína sintase para formar cisteína (WIRTZ; HELL, 2006). Esse aminoácido não foi quantificado neste trabalho devido o método de derivatização utilizado, mas essa enzima de maneira geral é de extrema importância para assimilação de átomos de enxofre para produção tanto de cisteína como de metionina, o que pode explicar os aumentos de metionina observados. A metionina pode ser convertida a S-adenosilmetionina através de uma reação reversa pela enzima S-adenosilmetionina sintase (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006), enfatizando que esta enzima mostrou ter sua expressão

aumentada nos materiais transgênicos de cevada que foi um resultado o oposto do que foi observado no trabalho anteriormente citado.

Portanto, sugere-se mecanismo regulatório existente entre a síntese de lisina e metionina proposto por Hacham e colaboradores (2007) não aconteceu desta forma nos materiais transgênicos de cevada, pois se tratam de transformações distintas, uma que alterou diretamente as enzimas envolvidas na síntese dos aminoácidos, e a outra alterou o padrão de proteínas de reserva, o qual pode desencadear modificações no metabolismo de aminoácidos através de outro mecanismo, como por exemplo, fatores transcricionais de regulação da expressão gênica. Além disso, a proteína que foi suprimida nos transgênicos de cevada (C hordeína) é pobre em aminoácidos sulfurados, como metionina e a cisteína, e foi substituída por frações ricas nestes aminoácidos, o que acarretou na necessidade de incrementar a síntese destes para suprir a demanda para incorporação em proteínas de reserva.

Diante de todos os resultados, sugere-se que mecanismos de regulação pós transcricionais e pós traducionais estão atuando nesses materiais transgênicos de cevada, como por exemplo, alterando a atividade (em função do aumento da tradução dos transcritos) e a sensibilidade das enzimas a inibição causada por seus aminoácidos produto, como foi mostrado para todas as enzimas envolvidas na via do ácido aspártico. Além disso, existem inúmeros fatores de transcrição que atuam tanto na regulação das proteínas de reserva, como também nas enzimas da síntese e degradação de aminoácidos, principalmente lisina, uma vez que o padrão de proteínas de reserva foi alterado. Em cevada existem pelo menos cinco tipos de fatores de transcrição que controlam a expressão dos genes que codificam hordeínas, os quais são divididos em três classes: bZIP, DOF e MYB. Todos interagem com o promotor do gene *hor2* durante o desenvolvimento das sementes.

Em arroz, por exemplo, a enzima bifuncional OsLOR-SDH é diretamente regulada através de reguladores transcricionais das proteínas de reserva das sementes: o fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP) RISBZ1, e o fator de transcrição que apresenta domínios de ligação ao DNA com um “dedo” (DOF), RPBF. O RPBF reconhece o promotor do gene que codifica as prolaminas “*prolamin box*” (AAAG) e o RISBZ1 reconhece motivos GCN4 que atua como elemento *cis* importante para expressão adequada de OsLOR-SDH como também dos genes que codificam proteínas de reserva (KAWAKATSU, T.; TAKAIWA, F., 2010).

O presente trabalho mostrou que existe uma rede interconectada de mecanismos regulatórios que controlam a síntese de aminoácidos e o balanço entre aqueles que permanecem livres e os que são incorporados em proteínas, ocasionando assim uma tendência ao equilíbrio no fluxo de carbono na via do ácido aspártico no ponto de ramificação que leva a síntese de treonina, isoleucina e metionina ou para síntese de lisina. Como foi observados nos dados presentes na literatura que são muito variáveis sugere-se que tais mecanismos são desencadeados em função do tipo de alteração ocasionada na planta e também da espécie em questão, pois cada uma tem sua característica peculiar.

6 CONCLUSÕES

- A redução de uma fração protéica consequentemente ocasiona aumentos compensatórios de outras frações;
- A supressão do subgrupo das C hordeínas ocasionou alterações na composição de aminoácidos nas prolaminas e globulinas, com incrementos no conteúdo de aminoácidos essenciais livres e incorporados em proteínas;
- Foram observadas alterações nas principais enzimas da via do ácido aspártico;
- A enzima aspartato quinase (AK) apresentou aumentos na atividade (4,44 a 47,27%), entretanto, foi mais sensível a inibição causada por lisina;
- A enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) também apresentou incremento na atividade (1,50 a 66,32%), mas diferente da AK, foi menos sensível à inibição causada por lisina.
- A enzima homoserina desidrogenase (HSDH) exibiu redução na atividade (3,36% a 28,80%) e foi menos sensível a inibição causada por treonina;
- As enzimas de degradação de lisina foram alteradas, porém os resultados foram variáveis entre os diferentes eventos de transformação.

REFERÊNCIAS

AARNES, H.; ROGNES, S. E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, New York, v. 13, n. 12, 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, n. 10, p. 5968-5975, 1997.

ALVAREZ, I.; GELI, M. I.; PIMENTEL, E.; LUDEVID, D.; TORRENT, M. Lysine-rich gamma-zeins are secreted in transgenic Arabidopsis plants. **Planta**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 420-427, 1998.

ÅMAN, P.; NEWMAN, C. W. Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A. **Journal of Cereal Science**, London, v. 4, n. 2, p. 133-141, 1986.

AMIR, R.; HACHAM, Y.; GALILI, G. Cystathionine gamma-synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 153-156, 2002.

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**, Warwick, v. 145, n. 1, p. 25-40, 2004.

ANGELOVICI, R.; FAIT, A.; FERNIE, A. R.; GALILI, G. A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down Arabidopsis seed germination. **New Phytologist**, Cambridge, v. 189, n. 1, p. 148-159, 2011.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Arlington: Association of official analytical chemists, 1995. 394 p.

ARRUDA, P.; KEMPER, E. L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 324-330, 2000.

ATIENZA, S. G.; SATOVIC, Z.; MARTIN, A.; MARTIN, L. M. Genetic diversity in *Hordeum chilense* Roem. et Schult. germplasm collection as determined by endosperm storage proteins. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 52, n. 2, p. 127-135, 2005.

AZEVEDO, R.; ARRUDA, P. High-lysine maize: the key discoveries that have made it possible. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 4, p. 979-989, 2010.

AZEVEDO, R. A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, Wien, v. 22, n. 3, 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**, Limerick, v. 70, n. 1, 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**, New York, v. 46, n. 3, p. 395-419, 1997.

AZEVEDO, R. A.; BLACKWELL, R. D.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize
Phytochemistry, New York, v. 31, n. 11, p. 3725-3730, 1992.

AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P. J.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A. A.; GAZIOLA, S. A.; BERDEJO, B. D. A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 24, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LEA, P. J.; LANDRY, J.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A. A.; GAZIOLA, S. A.; VARISI, V. A.; GRATAO, P. L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, n. 4, p. 339-348, 2004.

AZEVEDO, R. A.; LANCIEN, M.; LEA, P. J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, Wien, v. 30, n. 2, p. 143-162, 2006.

AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, Wien, v. 20, n. 3, p. 261-279, 2001.

AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 11, p. 3731-3734, 1992.

BEAUREGARD, M.; HEFFORD, M. A. Enhancement of essential amino acid contents in crops by genetic engineering and protein design. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 561-574, 2006.

BERNARDO, A.; LUQUE, A.; CUADRADO, A.; NEGRO, A.; JOUVE, N.; SOLER, C. The assessment of genetic variation in Spanish primitive cultivars of barley, *Hordeum vulgare* L., by a combination of isozymes and hordeins. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 217-226, 1997.

BICAR, E. H.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; SANGTONG, V.; PETERSON, J. M.; YANG, S. S.; LEE, M.; SCOTT, M. P. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 1, p. 59-71, 2008.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BLACK, S.; WRIGHT, N. G. Aspartic beta-semialdehyde dehydrogenase and aspartic beta-semialdehyde. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 213, n. 1, p. 39-50, 1955.

BLEIDERE, M.; GRUNTE, I. Hordein diversity in spring barley genotypes related to crude protein content. **LLU Raksti**, Jelgava, v. 22, n. 317, p. 89-99, 2009.

BLICKLING, S.; BEISEL, H.-G.; BOZIC, D.; KNÄBLEIN, J.; LABER, B.; HUBER, R. Structure of dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* reveals novel quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 274, n. 4, p. 608-621, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDT, A. Endosperm protein formation during kernel development of wild-type and a high-lysine barley mutant. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 53, n. 6, p. 890-901, 1976.

BRANDT, A. B. In vivo incorporation of lysine-C14 into the endosperm of wild type and high lysine barley. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 52, p. 288-291, 1975.

BRENNECKE, K.; NETO, A. J. S.; LUGLI, J.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Aspartate kinase in the maize mutants ASK1-LT19 and opaque-2. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 3, p. 707-712, 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, n. 3-4, p. 229-243, 1982.

BRINCH-PEDERSEN, H.; GALILI, G.; KNUDSEN, S.; HOLM, P. B. Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 32, n. 4, p. 611-620, 1996.

BROCHETTO-BRAGA, M. R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, n. 3, p. 1139-1147, 1992.

COHEN, N. G.; SAINT-GIRON, I. Biosynthesis of threonine, lysine and methionine. In: NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella typhimurium:** Cellular and Molecular Biology. Washington: American Society for Microbiology, 1987. chap.3, p. 429-444.

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, n. 2, p. 234-238, 2000.

CUNHA LIMA, S. T.; 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* L. **Amino Acids**, Wien, v. 24, n. 1, p. 179-186, 2003.

DANNENHOFFER, J. M.; BOSTWICK, D. E.; OR, E.; LARKINS, B. A. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1931-1935, 1995.

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, n. 4, 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**, Washington, v. 98, n. 3, p. 813-821, 1992.

DOLL, H. A nearly non-functional mutant allele of the storage protein locus Hor2 in barley. **Hereditas**, Lund, v. 93, n. 2, p. 217-222, 1980.

DOTSON, S. B.; SOMERS, D. A.; GENGENBACH, B. G. Purification and characterization of lysine-sensitive aspartate kinase from maize cell cultures. **Plant Physiology**, Washington, v. 91, n. 4, p. 1602-1608, 1989.

ECHART-ALMEIDA, C.; CAVALLI-MOLINA, S. Hordein variation in Brazilian barley varieties (*Hordeum vulgare* L.) and wild barley (*H. euclaston* Steud. and *H. stenostachys* Godr.). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 425-433, 2000.

EGGUM, B. O.; BRUNSGAARD, G.; JENSEN, J. The nutritive value of new high-lysine barley mutants. **Journal of Cereal Science**, London, v. 22, n. 2, p. 171-176, 1995.

ENTWISTLE, J.; KNUDSEN, S.; MULLER, M.; CAMERONMILLS, V. Amber codon suppression - the in vivo and invitro analysis of 2 C-hordein genes from barley. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, n. 6, p. 1217-1231, 1991.

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, n. 6, p. 577-582, 1995.

FERREIRA, R. R.; MEINHARDT, L. W.; AZEVEDO, R. A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: characterization of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 149, n. 1, 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, n. 7, 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**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1791-1798, 2005.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 826, n. 2, p. 109-134, 1998.

FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris* **Plant Physiology**, Washington, v. 99, n. 4, p. 1285-1293, 1992.

FRANKARD, V.; VAUTERIN, M.; JACOBS, M. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 233-242, 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**, Washington, v. 96, n. 2, p. 444-452, 1991.

FRISCH, D. A.; TOMMEY, A. M.; GENGENBACH, B. G.; SOMERS, D. A. Direct genetic selection of a maize cdna for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia coli* dapA-auxotroph. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 228, n. 1-2, p. 287-293, 1991.

FRIZZI, A.; CALDO, R. A.; MORRELL, J. A.; WANG, M.; LUTFIYYA, L. L.; BROWN, W. E.; MALVAR, T. M.; HUANG, S. Compositional and transcriptional analyses of reduced zein kernels derived from the opaque2 mutation and RNAi suppression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 73, n. 4-5, p. 569-585, 2010.

FRIZZI, A.; HUANG, S.; GILBERTSON, L. A.; ARMSTRONG, T. A.; LUETHY, M. H.; MALVAR, T. M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 13-21, 2008.

GALILI, G. Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 899-906, 1995.

_____. 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.; HOFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic Engineering**, San Diego, v. 4, n. 1, p. 3-11, 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, n. 3, p. 261-266, 2001.

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**, Easton, v. 47, n. 3, 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**, Copenhagen, v. 110, n. 2, 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**, Berlin, v. 247, n. 1, p. 364-371, 1997.

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

GEETHA, K. B.; LENDING, C. R.; LOPES, M. A.; WALLACE, J. C.; LARKINS, B. A. *opaque-2* modifiers increase γ-zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 11, p. 1207-1219, 1991.

GHISLAIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. Dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* a chloroplast-localized enzyme of the lysine pathway. **Planta**, Berlin, v. 180, n. 4, p. 480-486, 1990.

_____. A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 5, 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, n. 6, p. 835-851, 1994.

GIBBON, B. C.; LARKINS, B. A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 227-233, 2005.

GIBBON, B. C.; WANG, X.; LARKINS, B. A. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15329-15334, 2003.

GONCALVES-BUTRUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 110, n. 3, p. 765-771, 1996.

GU, Y. Q.; ANDERSON, O. D.; LONDEORE, C. F.; KONG, X. Y.; CHIBBAR, R. N.; LAZO, G. R. Structural organization of the barley D-hordein locus in comparison with its orthologous regions of wheat genomes. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 6, p. 1084-1097, 2003.

GUTIÉRREZ-ROJAS, A.; BETRAN, J.; SCOTT, M. P.; ATTA, H.; MENZ, M. Quantitative trait loci for endosperm modification and amino acid contents in quality protein maize. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 3, p. 870-879, 2010.

HABBEN, J. E.; KIRLEIS, A. W.; LARKINS, B. A. The origin of lysine-containing proteins in opaque-2 maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 825-838, 1993.

HACHAM, Y.; SONG, L.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. Lysine enhances methionine content by modulating the expression of S-adenosylmethionine synthase. **The Plant Journal**, Washington, v. 51, n. 5, p. 850-861, 2007.

HAN, Z.; WU, F.; DENG, G.; QIAN, G.; YU, M.; JIA, Y. Structural and expressional analysis of the B-hordein genes in Tibetan hull-less barley. **Genetica**, Dordrecht, v. 138, n. 2, p. 227-239, 2010.

HANSEN, M.; LANGE, M.; FRIIS, C.; DIONISIO, G.; HOLM, P. B.; VINCZE, E. Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 14, p. 3987-3995, 2007.

HE, X. Y.; TANG, M. Z.; LUO, Y. B.; LI, X.; CAO, S. S.; YU, J. J.; DELANEY, B.; HUANG, K. L. A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 425-432, 2009.

HEISEL, S. E.; PETERSON, D. M.; JONES, B. L. Identification of United States barley cultivars by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis of hordeins. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 63, n. 6, p. 500-505, 1986.

HEJGAARD, J.; BOISEN, S. High-lysine proteins in Hiproly barley breeding: Identification, nutritional significance and new screening methods. **Hereditas**, Lund, v. 93, n. 2, p. 311-320, 1980.

HELM, C. V.; DE FRANCISCO, A.; GAZIOLA, S. A.; FORNAZIER, R. F.; POMPEU, G. B.; AZEVEDO, R. A. Hull-less barley varieties: storage proteins and amino acid distribution in relation to nutritional quality. **Food Biotechnology**, New York, v. 18, n. 3, p. 327-341, 2004.

HEREMANS, B.; JACOBS, M. Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh with an altered aspartate kinase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 146, n. 3, p. 249-257, 1995.

HOUMARD, N. M.; MAINVILLE, J. L.; BONIN, C. P.; HUANG, S.; LUETHY, M. H.; MALVAR, T. M. High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 605-614, 2007.

HOURNARD, N. M.; MAINVILLE, J. L.; BONIN, C. P.; HUANG, S.; LUETHY, M. H.; MALVAR, T. M. High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 605-614, 2007.

HUANG, S.; FRIZZI, A.; FLORIDA, C. A.; KRUGER, D. E.; LUETHY, M. H. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 525-535, 2006.

HUANG, S. S.; ADAMS, W. R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K. P.; VOYLES, D. A.; ANTHONY, J.; KRIZ, A. L.; LUETHY, M. H. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 7, p. 1958-1964, 2004.

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, n. 6, 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 G: General Subjects**, Amsterdam, v. 1721, n. 1-3, 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**, Washington, v. 140, n. 1, 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. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 10, p. 2591-2612, 2002.

INGVERSEN, J.; KØIE, B.; DOLL, H. Induced seed protein mutant of barley. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 29, n. 9, p. 1151-1152, 1973.

JANDER, G.; JOSHI, V. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 54-65, 2010.

JOSHI, V.; LAUBENGAYER, K. M.; SCHAUER, N.; FERNIE, A. R.; JANDER, G. Two Arabidopsis threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 12, p. 3564-3575, 2006.

KANAZIN, V.; ANANIEV, E.; BLAKE, T. Variability among members of the Hor2 multigene family **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 3, p. 397-403, 1993.

KANEKO, T.; HASHIMOTO, T.; KUMPAISAL, R.; YAMADA, Y. Molecular cloning of wheat dihydrodipicolinate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, n. 29, p. 17451-17455, 1990.

KANG, J.-H.; WANG, L.; GIRI, A.; BALDWIN, I. T. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3303-3320, 2006.

KARCHI, H.; MIRON, D.; BEN-YAACOV, S.; GALILI, G. The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein phosphorylation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 11, p. 1963-1970, 1995.

KARCHI, H.; SHAUL, O.; GALILI, G. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p. 2577-2581, 1994.

KAWAKATSU, T.; HIROSE, S.; YASUDA, H.; TAKAIWA, F. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. **Plant Physiology**, Washington, v. 154, n. 4, p. 1842-1854, 2010.

KAWAKATSU, T.; TAKAIWA, F. Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 939-953, 2010.

_____. Differences in transcriptional regulatory mechanisms functioning for free lysine content and seed storage protein accumulation in rice grain. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 12, p. 1964-1974, 2010.

KEELER, S. J.; MALONEY, C. L.; WEBBER, P. Y.; PATTERSON, C.; HIRATA, L. T.; FALCO, S. C.; RICE, J. A. Expression of de novo high-lysine α-helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 15-29, 1997.

KEMPER, E. L.; CORD-NETO, G.; CAPELLA, A. N.; GONCALVES-BUTRUILE, M.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme-lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 253, n. 3, p. 720-729, 1998.

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. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 1981-1994, 1999.

KLEMSDAL, S. S.; OLSEN, O. A.; RORVIK, K. A. The barley high lysine genes of mutants 1508 and 527 alter hordein polypeptide composition quantitatively, but not qualitatively. **Hereditas**, Lund, v. 107, n. 1, p. 107-114, 1987.

KONG, F.; JIANG, S.; MENG, X.; SONG, C.; SHI, J.; JIN, D.; JIANG, S.; WANG, B. Cloning and characterization of the DHDPS gene encoding the lysine biosynthetic enzyme dihydrodipocolinate synthase from *Zizania latifolia* (Griseb). **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 27, n. 2, p. 199-208, 2009.

KREIS, M.; FORDE, B. G.; RAHMAN, S.; MIFLIN, B. J.; SHEWRY, P. R. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 183, n. 3, p. 499-502, 1985.

KREIS, M.; SHEWRY, P. R.; FORDE, B. G.; RAHMAN, S.; MIFLIN, B. J. Molecular analysis of a mutation conferring the high-lysine phenotype on the grain of barley (*Hordeum vulgare*). **Cell**, Cambridge, v. 34, n. 1, p. 161-167, 1983.

KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension-cultures. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, n. 1, p. 145-151, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating alpha-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 620-626, 2000.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of glutelins of corn seeds - selective extraction and composition of amino acids of 3 isolated fractions. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**, Paris, v. 52, n. 10, p. 1021, 1970.

LANGE, M.; VINCZE, E.; WIESER, H.; SCHJOERRING, J. K.; HOLM, P. B. Suppression of C-hordein synthesis in barley by antisense constructs results in a more balanced amino acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 15, p. 6074-6081, 2007.

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

LEE, S. I.; KIM, H. U.; LEE, Y.-H.; SUH, S.-C.; LIM, Y. P.; LEE, H.-Y.; KIM, H.-I. Constitutive and seed-specific expression of a maize lysine-feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase gene leads to increased free lysine levels in rice seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 75-84, 2001.

LESS, H.; ANGELOVICI, R.; TZIN, V.; GALILI, G. Principal transcriptional regulation and genome-wide system interactions of the asp-family and aromatic amino acid networks of amino acid metabolism in plants. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 4, p. 1023-1028, 2010.

LESS, H.; GALILI, G. Coordinations between gene modules control the operation of plant amino acid metabolic networks. **BMC Systems Biology**, London, v. 3, n. 14, p. 1-18, 2009.

LINKO, R.; LAPVETELAINEN, A.; LAAKSO, P.; KALLIO, H. Protein composition of a high-protein barley flour and barley grain. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 66, n. 6, p. 478-482, 1989.

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, n. 1, p. 25-32, 2002.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Laboratory routine for chemical and analytical procedures on plant tissues. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2007.

MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A. C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, p. 103-108, 1994.

MATSUOKA, K.; BEDNAREK, S. Y. Protein transport within the plant cell endomembrane system: an update. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 6, p. 463-469, 1998.

MATTA, N. K.; SINGH., A.; KUMAR., Y. Manipulating seed storage proteins for enhanced grain quality in cereals. **African Journal of Food Science**, Nairobi, v. 3, n. 13, p. 439-446, 2009.

MAYER, E. T. **Caracterização bromatológica de grãos de cevada e efeito da fibra alimentar na resposta fisiológica de ratos**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. Disponível em:<http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=899>. Acesso em: 10 mar. 2011.

MAZUR, B.; KREBBERS, E.; TINGEY, S. Gene discovery and product development for grain quality traits. **Science**, Washington, v. 285, n. 5426, p. 372-375, 1999.

MCCAUSLAND, J.; WRIGLEY, C. W. Identification of australian barley cultivars by laboratory methods - gel electrophoresis and gel isoelectric focusing of endosperm proteins. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 17, n. 89, p. 1020-1027, 1977.

MCLENNAN, N.; MASTERS, M. GroE is vital for cell-wall synthesis. **Nature**, London, v. 392, n. 6672, p. 139-139, 1998.

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**, Cambridge, v. 142, p. 535-541, 2004.

MELZER, J.; KLEINHOFS, A. Molecular Genetics of Barley Endosperm Proteins. **Barley Genetics Newsletter**, Pullman, v. 17, p. 13-24, 1987.

MENA, M.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; SCHMIDT, ROBERT J.; CARBONERO, P. An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. **The Plant Journal**, Washington, v. 16, n. 1, p. 53-62, 1998.

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, n. 3629, p. 279-280, 1964.

MIRON, D.; BEN-YAACOV, S.; RECHES, D.; SCHUPPER, A.; GALILI, G. Purification and characterization of bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase from developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 2, p. 655-664, 2000.

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**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 767-774, 1994.

MUEHLBAUER, G. J.; SOMERS, D. A.; MATTHEWS, B. F.; GENGENBACH, B. G. Molecular genetics of the maize (*Zea mays* L.) aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family. **Plant Physiology**, Washington, v. 106, n. 4, p. 1303-1312, 1994.

MUNCK, L.; KARLSSON, K. E.; HAGBERG, A.; EGGUM, B. O. Gene for improved nutritional value in barley seed protein. **Science**, Washington, v. 168, n. 3934, p. 985-987, 1970.

NOVACK, M. M. E. **Avaliação nutricional de grãos de cevada submetidos a diferentes processamentos**. 2010. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. Disponível em:<http://jararaca.ufsm.br/websites/ppgcta/download/Dissertaco/Mariana.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2011.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B.; FERRY, E. L.; WAKEMAN, A. J. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 18, n. 1, p. 1-16, 1914.

OSCARSSON, M.; ANDERSSON, R.; SALOMONSSON, A. C.; ÅMAN, P. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. **Journal of Cereal Science**, London, v. 24, n. 2, p. 161-170, 1996.

PECHERE, J. F.; CAPONY, J. P. On colorimetric determination of acyl phosphates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 22, n. 3, p. 536-539, 1968.

PRASANNA, B. M.; VASAL, S. K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality protein maize. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.

QI, J. C.; ZHANG, G. P.; ZHOU, M. X. Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. **Journal of Cereal Science**, London, v. 43, n. 1, p. 102-107, 2006.

RADOVIC, D.; VAPA, L. Hordein composition of Yugoslav barley cultivars. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 24, n. 3, p. 331-337, 1996.

RAHMAN, S.; SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J. Differential protein accumulation during barley grain development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 717-728, 1982.

RASMUSSEN, S.; HOPP, H.; BRANDT, A.; SVENDSEN, I. B.; HEJGAARD, J. A cDNA clone for protein Z, a major barley endosperm albumin. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 49, n. 3, p. 385-390, 1984.

RELTON, J. M.; BONNER, P. L. R.; WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension culture. **Biochimica et Biophysica Acta: International Journal of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 953, n. 1, p. 48-60, 1988.

REYES, A. R.; BONIN, C. P.; HOUMARD, N. M.; HUANG, S.; MALVAR, T. M. Genetic manipulation of lysine catabolism in maize kernels. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 1-2, p. 81-89, 2009.

RHODES, A. P.; GILL, A. A. Fractionation and amino acid analysis of the salt-soluble protein fractions of normal and high-lysine barleys **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 31, n. 5, p. 467-473, 1980.

ROESLER, K. R.; RAO, A. G. Conformation and stability of barley chymotrypsin inhibitor-2 (CI-2) mutants containing multiple lysine substitutions. **Protein Engineering**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 967-973, 1999.

_____. A single disulfide bond restores thermodynamic and proteolytic stability to an extensively mutated protein. **Protein Science**, New York, v. 9, n. 9, p. 1642-1650, 2000.

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, n. 2, p. 281-294, 2003.

ROGNES, S. E.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. S-adenosylmethionine - a novel regulator of aspartate kinase. **Nature**, London, v. 287, n. 5780, p. 357-359, 1980.

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. **The Plant Journal**, Washington, v. 24, n. 3, p. 357-368, 2000.

SAVIN, R.; PRYSTUPA, P.; ARAUS, J. L. Hordein composition as affected by post-anthesis source-sink ratio under different nitrogen availabilities. **Journal of Cereal Science**, London, v. 44, n. 1, p. 113-116, 2006.

SCHMIDT, R. J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M. J.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 6, p. 689-700, 1992.

SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A New opaque variant of maize by a single dominant RNA interference inducing transgene. **Genetics**, Austin, v. 165, n. 1, p. 387-397, 2003.

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

_____. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, n. 3, p. 1157-1163, 1992b.

SHAVER, J. M.; BITTEL, D. C.; SELLNER, J. M.; FRISCH, D. A.; SOMERS, D. A.; GENGENBACH, B. G. Single amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1962-1966, 1996.

SHEWRY, P. R. Barley seeds proteins. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. (Ed.). **Barley: Chemistry and Technology**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1993. chap.3, p. 131-197.

_____. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 239-250, 2007.

SHEWRY, P. R.; BUNCE, N. A. C.; KREIS, M.; FORDE, B. G. Polymorphism at the *Hor1* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Biochemical Genetics**, New York, v. 23, n. 5-6, p. 391-405, 1985.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002.

SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J.; KASARDA, D. D. The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B - Biological Sciences**, London, v. 304, n. 1120, p. 297-308, 1984.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins - structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.

SHEWRY, P. R.; PRATT, H. M.; MIFLIN, B. J. Varietal identification of single seeds of barley by analysis of hordein polypeptides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 29, n. 7, p. 587-596, 1978.

SHEWRY, P. R.; SMITH, S. J.; LEW, E. J.-L.; KASARDA, D. D. Characterization of prolamins from meadow grasses: homology with those of wheat, barley and rye. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 633-639, 1986.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds - structure and evolution. **Biochemical Journal**, London, v. 267, n. 1, p. 1-12, 1990.

SHRAWAT, A. K.; LORZ, H. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 575-603, 2006.

SIKDAR, M. S. I.; KIM, J. S. Characterization of a gene encoding for dihydrodipicolinate synthase from rice. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 4, n. 6, p. 461-466, 2010.

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, n. 3, p. 989-993, 1994.

SODEK, L.; WILSON, C. M. Incorporation of ^{14}C-leucine and ^{14}C-lysine into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 140, n. 1, p. 29-38, 1970.

STADTMAN, E. R.; COHEN, G. N.; LEBRAS, G. Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Echerichia coli*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 94, n. 3, p. 952-959, 1961.

STEIN, N. Triticeae genomics: advances in sequence analysis of large genome cereal crops. **Chromosome Research**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 21-31, 2007.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, Wien, v. 30, n. 2, p. 121-125, 2006.

STEPANSKY, A.; YAO, Y.; TANG, G.; GALILI, G. Regulation of lysine catabolism in Arabidopsis through concertedly regulated synthesis of the two distinct gene products of the composite AtLKR/SDH locus. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 412, p. 525-536, 2005.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W. R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

SUN, S.; LIU, Q. Transgenic approaches to improve the nutritional quality of plant proteins. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 2, p. 155-162, 2004.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 463-469, 2004.

TANG, G.; ZHU, X.; GAKIERE, B.; LEVANONY, H.; KAHANA, A.; GALILI, G. The bifunctional LKR/SDH locus of plants also encodes a highly active monofunctional lysine-ketoglutarate reductase using a polyadenylation signal located within an intron. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 1, p. 147-154, 2002.

TANG, G. L.; MIRON, D.; ZHUSHIMONI, J. X.; GALILI, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 8, p. 1305-1316, 1997.

TANG, G. L.; ZHU, X. H.; TANG, X. H.; GALILI, G. A novel composite locus of Arabidopsis encoding two polypeptides with metabolically related but distinct functions in lysine catabolism. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

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, n. 2, p. 287-293, 1997.

TEIXEIRA, C. M. G.; GAZIOLA, S. A.; LUGLI, J.; AZEVEDO, R. A. Isolation, partial purification and characterization of isoenzymes of aspartate kinase from rice seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 153, n. 3-4, p. 281-289, 1998.

TORRENT, M.; ALVAREZ, I.; GELI, M. I.; DALCOL, I.; LUDEVID, D. Lysine-rich modified γ-zeins accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 139-149, 1997.

UFAZ, S.; GALILI, G. Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. **Plant Physiology**, Washington, v. 147, n. 3, p. 954-961, 2008.

VARISI, V. A.; MEDICI, L. O.; VAN DER MEER, I.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Dihydrodipicolinate synthase in opaque and floury maize mutants. **Plant Science**, Limerick, v. 173, n. 4, p. 458-467, 2007.

VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana dhdps* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, n. 4, 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, n. 3, p. 545-550, 1994.

VIOLA, R. E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 34, n. 5, p. 339-349, 2001.

VITALE, A.; GALILI, G. The Endomembrane System and the Problem of Protein Sorting. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 1, p. 115-118, 2001.

VOGEL, H. J. On biochemical evolution - lysine formation in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 45, n. 12, p. 1717-1721, 1959.

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, n. 2, p. 189-192, 1980.

_____. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. **Phytochemistry**, New York, v. 20, n. 12, p. 2651-2655, 1981.

WANG, X.; LOPEZ-VALENZUELA, J. A.; GIBBON, B. C.; GAKIERE, B.; GALILI, G.; LARKINS, B. A. Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 10, p. 2653-2660, 2007.

WANG, X.; STUMPF, D. K.; LARKINS, B. A. Aspartate kinase 2. A candidate gene of a quantitative trait locus influencing free amino acid content in maize endosperm. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 4, p. 1778-1787, 2001.

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, n. 2, p. 301-312, 1993.

WILLIAMSON, M. S.; FORDE, J.; KREIS, M. Molecular cloning of two isoinhibitor forms of chymotrypsin inhibitor 1 (CI-1) from barley endosperm and their expression in normal and mutant barleys. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 10, n. 6, p. 521-535, 1988.

WILSON, B. J.; GRAY, A. C.; MATTHEWS, B. F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities **Plant Physiology**, Washington, v. 97, n. 4, p. 1323-1328, 1991.

WIRTZ, M.; HELL, R. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 3, p. 273-286, 2006.

XU, J. H.; MESSING, J. Amplification of prolamin storage protein genes in different subfamilies of the Poaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 8, p. 1397-1412, 2009.

YALÇIN, E.; ÇELIK, S.; AKAR, T.; SAYIM, I.; KÖKSEL, H. Effects of genotype and environment on beta-glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 171-176, 2007.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YOSHIDA, A.; TOMITA, T.; KUZUYAMA, T.; NISHIYAMA, M. Mechanism of concerted inhibition of alfa 2, beta 2-type heterooligomeric aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 35, p. 27477-27486, 2010.

YOSHIOKA, Y.; KUREI, S.; MACHIDA, Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression. **Genes & Genetic Systems**, Shizuoka, v. 76, n. 3, p. 189-198, 2001.

YU, J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of a lysine rich protein sb401 gene significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2004.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. Decimal code for growth stages of cereals. **Weed Research**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 415-421, 1974.

ZHANG, X.; COLLEONI, C.; RATUSHNA, V.; SIRGHIE-COLLEONI, M.; JAMES, M.; MYERS, A. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 865-879, 2004.

ZHAO, Z. Y.; GLASSMAN, K.; SEWALT, V.; WANG, N.; MILLER, M.; CHANG, S.; THOMPSON, T.; CATRON, S.; WU, E.; BIDNEY, D.; KEDEBE, Y.; JUNG, R. Nutritionally improved transgenic sorghum. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Plant Biotechnology 2002 and Beyond**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. chap.9, p. 413-416.

ZHU, X.; GALILI, G. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in Arabidopsis seeds. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 4, p. 845-853, 2003.

_____. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, n. 1, p. 129-136, 2004.

ZHU, X.; TANG, G.; GALILI, G. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite AtLKR/SDH locus of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 3, p. 1363-1372, 2000.

ZHU, X. H.; TANG, G. L.; GALILI, G. The activity of the Arabidopsis bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is regulated by functional interaction between its two enzyme domains. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 51, p. 49655-49661, 2002.