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

**Estudo da via do ácido aspártico descrevendo uma variedade de
técnicas de engenharia genética e bioquímicas**

Amerivan Cirqueira Nazareno

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

**Piracicaba
2013**

Amerivan Cirqueira Nazareno
Bióloga

**Estudo da via do ácido aspártico descrevendo uma variedade de técnicas de
engenharia genética e bioquímicas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Nazareno, Amerivan Cirqueira

Estudo da via do ácido aspártico descrevendo uma variedade de técnicas de engenharia genética e bioquímicas /Amerivan Cirqueira Nazareno.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
145 p: il.

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

1. Ácido aspártico 2. Aspartato quinase 3. Homoserina desidrogenase
4. Dihidropicolinato sintase 5. Aminoácidos essenciais 6. Cereais I. Título

CDD 633.1
S586i

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

Ao meu querido Deus

O único que é digno de toda honra, glória e louvor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A imensa gratidão a DEUS, autor da minha fé, que me concedeu o privilégio de ser aprovada no Programa de Genética da ESALQ/USP, para a concretização de mais um dos meus sonhos, o qual tem me sustentado com a sua destra fiel. Meu Porto Seguro! Que tem colocado em meu coração o desejo supremo: VENCER!

Aos meus pais: Américo e Joanice por se preocuparem comigo e cuidarem de mim, principalmente, a minha mãe pelos princípios e valores apresentados que têm contribuído com grande eficácia para o meu aprendizado e crescimento espiritual, pessoal e profissional. E o grande apoio nos momentos de incerteza.

A minha irmã e amiga Aérica pelo convite estendido de vir para Piracicaba por acreditar no meu potencial, pelo companheirismo, pelo carinho, pela ajuda e pelo estímulo nos momentos conflitantes de choro e cheios de desafios (Muito obrigada, maninha!).

Ao meu irmão e amigo Jairo César pelo carinho, bondade e confiança no meu potencial.

A minha amiga Rísia Lacerda pela amizade sincera, bondade, pelas palavras motivadoras, pela credibilidade e o grande apoio nos momentos mais difíceis desta jornada.

A minha amiga Gisele Lacerda que me apresentou o Departamento de Genética da ESALQ/USP.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao corpo docente do programa, especialmente ao meu querido professor e orientador, Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, por abrir as portas da ESALQ, a quem sou grata pela compreensão, bondade e ensinamentos. Por ser responsável pelo meu crescimento profissional.

À Biblioteca Central e seus funcionários pelo auxílio e informação prestados.

À Dra. Salete Gaziola pelos auxílios prestados nas horas que precisei.

À colega Daiana Schmidt pelos auxílios prestados.

Aos meus colegas de Pós-Graduação pela boa convivência, especialmente à querida Iradenia Sousa.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório Genética e Bioquímica de Plantas: Aline, Berenice, Daniel, Flávia, Fernando, Filipe, Geórgia, Giselle, Leila, Lucas, Lucélia, Mariana, Manuella, Milca, Mônica, Paula, Priscila, Roberta, Rogério, Sandra e Vanessa pela convivência.

Não poderia esquecer a amiga Dr^a. Lígia Borges pela convivência familiar, dos nossos almoços, confraternização e companheirismo (Êta, nós!).

Aos amigos de fé: Alda, Antônio, Edson, Enaide, Humberto, Jacira, Jorge Wagner, Jôse, Juca, Lenice, Luciana, Rafael e Sônia pelo carinho e amizade.

Aos amigos e colegas contemporâneos e novatos: Aderbal, Antônio, Danilo, Janaina, João, Jussálvia, Pedro Giongo e Sérgio pela convivência e agradáveis momentos de confraternização.

Enfim, obrigada Piracicaba pelos 3 anos que serão a linha divisória para o meu êxito!

“Está surgindo aí um novo vencedor, ele é alguém do Coração de Deus, um novo nome ouvirá sobre essa terra, quem sabe, este nome seja o seu. Esse alguém que o Senhor vai levantar, talvez, seja o menor que está aqui, de repente, ele seja o último a sentar à mesa como fez Davi. E esse novo vencedor que vai surgir tem no peito um coração cheio de amor, capaz de perdoar quem o feriu, e de amar alguém que só o desprezou. Ele é exatamente igual a você, o seu perfil é de alguém que já sofreu Deus está anunciando um novo nome, tem grande chance de esse nome ser o seu! Você se sente tão pequeno, em um vale escuro e frio, seu gemido dói à alma. Traz à pele um arrepio. Você se sente tão pequeno, nessa terra de gigante, onde doce fica amargo, porque agora é incessante! onde o grande pisa no pequeno, sem olhar se está ferindo ou se está matando, onde a escada do sucesso é tão alta que os degraus se sobe escalando, mas é nessa terra de gigante, dentro desse vale escuro, que Deus vai fazer você brilhar, você pode se sentir tão pequeno, mas, teu Deus é grande pra te levantar Deus vai bradar, anunciar em alta voz pra o universo ouvir, eis que o novo, eis que a glória está chegando aí, e vai impactar o mundo com a sua história. Ele surgiu do anonimato dentro de um vale escuro e frio, cresceu na terra de gigantes, grandes desafios, foi provado e aprovado, agora é só vitória, agora é só vitória, agora é só vitória Agora é só vitória, só vitória. A prova acabou, a luta foi embora, agora é só vitória, só vitória.”

Damares

“Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja vacas: todavia eu me alegrarei no Senhor: exultarei no Deus da minha salvação.”

Habacuque 2: 17 e 18

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURA	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Etapas do estudo	23
2.2 Processo de execução da pesquisa bibliográfica	23
2.2.1 Critérios de inclusão	23
2.2.2 Parâmetros linguísticos	24
2.2.3 Parâmetro cronológico	24
2.2.4 Fontes bibliográficas	24
2.3 Estratégias de buscas	25
2.3.1 Estratégia de busca no <i>Google Scholar</i>	25
2.3.2 ISI Web of Knowledge	25
2.3.3 Portal CAPES	26
Referências	26
3 ESTUDO DA VIA DO ÁCIDO ASPÁRTICO E SEUS AMINOÁCIDOS DERIVADOS EM PLANTAS SUPERIORES NO PERÍODO DE 1970 A 1997	27
Resumo	27
Abstract	27
3.1 Introdução	28
3.2 Revisão bibliográfica	29
3.2.1 A via metabólica do ácido aspártico	29
3.2.2 Enzima da via do ácido aspártico	32
3.2.2.1 Aspartato quinase	32
3.2.2.2 Homoserina desidrogenase	33
3.2.2.3 Aspartato semialdeído desidrogenase	34
3.2.3 Biossíntese de metionina	35
3.2.4 Biossíntese de treonina	35
3.2.5 Enzimas da biossíntese de metionina e treonina	36
3.2.5.1 Homoserina quinase	36

3.2.5.2 Cistationina β -liase.....	37
3.2.5.3 Metionina sintase.....	38
3.2.6 Biossíntese de isoleucina	39
3.2.6.1 Treonina desaminase.....	40
3.2.6.2 Ácido acetohidroxi sintase.....	40
3.2.6.3 Ácido acetohidroxi isomero-redutase.....	41
3.2.6.4 Ácido dihidroxi desidratase.....	42
3.2.6.5 Aminotransferase.....	43
3.2.7 Metabolismo de lisina.....	43
3.2.7.1 Dihidro-dipicolinato sintase.....	43
3.2.7.2 Catabolismo de lisina.....	44
3.2.8 Regulação da via metabólica do ácido aspártico	46
3.2.9 Mutantes bioquímicos.....	48
3.3 Conclusões parciais	50
Referências	50
4 ESTUDO DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO ASPÁRTICO NO PERÍODO DE 1970 A 2006	677
Resumo	677
Abstract	677
4.1 Introdução.....	67
4.2 Revisão bibliográfica.....	69
4.2.1 A via metabólica do ácido aspártico	699
4.2.2 Enzimas da via do ácido aspártico.....	699
4.2.2.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase.....	69
4.2.2.2 Aspartato semialdeído desidrogenase.....	71
4.2.2.3 Homoserina quinase.....	72
4.2.3.4 Treonina sintase e cistationina γ -sintase.....	72
4.2.3.5 Cistationina β -liase, metionina sintase, S-adenosilmetionina sintase.....	73
4.2.3.6 Enzimas envolvidas na síntese de isoleucina.....	75
4.2.3.6.1 Treonina desaminase.....	75
4.2.3.6.2 Ácido acetohidroxi sintase.....	76
4.2.3.6.3 Ácido acetohidroxi redutoisomerase.....	77
4.2.3.6.4 Ácido dihidroxi desidratase.....	78
4.2.3.6.5 Aminotransferase de cadeia ramificada.....	78

4.2.3.6.6 Enzimas envolvidas na síntese de lisina.....	79
4.2.3.6.6.1 Dihidrodipicolinato sintase.....	79
4.2.3.6.7 As etapas finais da síntese de lisina.....	80
4.2.3.6.8 Degradação de lisina.....	81
4.2.3.6.9 Mutantes bioquímicos.....	83
4.3 Conclusões parciais.....	855
Referências.....	855
5 ESTUDOS DE ESTRATÉGIAS INTERESSANTES PARA AUMENTAR O NÍVEL DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DA VIA DO ÁCIDO ASPÁRTICO EM PLANTAS NO PERÍODO DE 2006 ATÉ O MOMENTO.....	97
Resumo.....	97
Abstract.....	97
5.1 Introdução.....	98
5.2 Revisão bibliográfica.....	100
5.2.1 A via metabólica do ácido aspártico.....	100
5.2.2 Enzimas da via do ácido aspártico.....	101
5.2.2.1 Aspartato quinase.....	102
5.2.2.2 Homoserina desidrogenase.....	104
5.2.2.3 Aspartato semialdeído desidrogenase.....	105
5.2.2.4 Homoserina quinase.....	106
5.2.2.5 Treonina sintase e cistationina γ sintase.....	108
5.2.3 Metabolismo de lisina.....	110
5.2.3.1 Enzimas chave da biossíntese de lisina.....	115
5.2.3.1.1 Dihidrodipicolinato sintase.....	115
5.2.3.1.2 Enzimas da degradação de lisina.....	116
5.2.4 Metabolismo de metionina.....	117
5.2.4.1 Enzimas chaves da biossíntese de metionina.....	118
5.2.4.1.1 Cistationina β -lyase, metionina sintase e S-adenosilmetioninasintase.....	118
5.2.5 Biossíntese de treonina.....	119
5.2.6 Biossíntese de isoleucina.....	120
5.2.6.1 Enzimas chaves da biossíntese de isoleucina.....	120
5.2.6.1.1 Treonina desaminase.....	120
5.2.6.1.2 Ácido acetohidroxi sintase.....	121
5.2.6.1.3 Ácido acetohidroxi isomeroreductase.....	122

5.2.6.1.4 Aminotransferase.....	123
5.3 Conclusões parciais	126
Referências	126
6 CONCLUSÕES FINAIS	145

RESUMO

Estudo da via do ácido aspártico descrevendo uma variedade de técnicas de engenharia genética e bioquímicas

Esta pesquisa bibliográfica teve o propósito de elucidar a via do ácido aspártico, apontando como fonte deste estudo os cereais. O objetivo principal desta pesquisa consistiu em estudar a via do ácido aspártico, visando descrever uma variedade de técnicas de engenharia genética e bioquímicas que podem ser empregadas para aumentar a qualidade nutricional de cereais, podendo, assim, compreender o que acarreta o aumento do acúmulo de lisina, metionina e treonina nos grãos para suprir essa necessidade na formação de uma proteína balanceada nutricionalmente. Foi realizada uma busca exaustiva em bases de dados *Google Scholar*, Portal Capes, *ISI web of Science*, no período de publicação de 1970 a 2012. Foram adotados textos de referência internacional e nacional. Esta pesquisa foi dividida em três etapas: via do ácido aspártico e seus aminoácidos derivados em plantas superiores de 1970 a 1997, via metabólica do ácido aspártico no período de 1997 a 2006 e estratégias interessantes para aumentar o nível dos aminoácidos essenciais da via do ácido aspártico em plantas no período de 2006 até o momento. A primeira etapa foi desenvolvida relatando o ácido aspártico como precursor dos aminoácidos essenciais: metionina, lisina, treonina e isoleucina. Entre os essenciais, a lisina é um dos mais estudados devido à escassez em muitos cereais, o que contribuiu para o estudo extensivo da via do ácido aspártico, revelando, assim, a importância da aspartato quinase (AK), homoserina desidrogenase (HSDH) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) como enzimas chaves para a regulação da síntese de lisina. A aspartato quinase (AK) exerce um controle sobre via do ácido aspártico. A enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) regula a síntese de lisina. Na segunda etapa foi apresentada a importância dos aminoácidos sintetizados nas plantas através de complexas vias metabólicas que são controladas por enzimas, intermediários, substratos e aminoácidos. Este estudo também relata os aspectos importantes para uma melhor compreensão da síntese e o acúmulo de aminoácidos solúveis e incorporados em proteínas. A terceira etapa foi apresentar estratégias interessantes para utilização em estudos, visando aumentar o nível de aminoácidos essenciais através da manipulação de genes já existentes, como também a introdução de genes estranhos nas plantas. Devido à importância nutricional, essa via tem sido extensivamente estudada, utilizando técnicas de engenharia genética e bioquímica. Pesquisadores têm apresentado esforços considerados no estudo desta via a fim de contribuir para futuras manipulações genéticas, cujo objetivo é produzir plantas com alto conteúdo de lisina, metionina e treonina.

Palavras-chave: Ácido aspártico; Aspartato quinase; Homoserina desidrogenase; Dihidrodipicolinato sintase; Aminoácidos essenciais; Cereais

ABSTRACT

The study of aspartate metabolic pathway: a description of various biochemical and genetic engineering techniques

The aim of this research was to elucidate the aspartate metabolic pathway using grains of cereal as a source of study. Therefore, it was necessary to understand the aspartate metabolic pathway in order to depict various biochemical and genetic techniques which can be used to enhance the nutritional value in cereals. After studying these issues, it was possible to understand the results of having cereals with a high lysine, methionine, and threonine content, so that grains can have balanced protein content. For that reason, an exhaustive research was done by using international and national scientific data published in 1970 to 2012. These data were found in *Google Scholar*, Portal Capes, and *ISI Web of Science*. This research was divided in three parts: studies of aspartate metabolic pathway and their essential amino acids derived from plants published in 1970 to 1997, studies of aspartate metabolic pathway published in the period of 1997 to 2006, and interesting strategies to enhance the level of essential amino acids of the aspartate metabolic pathway in plants from 2006 to this moment. Firstly, this investigation reported about the aspartic acid as a precursor of essential amino acids such as methionine, lysine, threonine, and isoleucine. Among the essential amino acids, lysine has been the most researched due to its lack in many kinds of grains. Needless to say, it has contributed to the intensive study showing the relevancy of aspartate kinase (AK), homoserine dehydrogenase (HSDH), dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), as key enzymes for lysine regulation. The aspartate kinase (AK) has an important role on the aspartate metabolic pathway, meanwhile the dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) is intrinsically involved on lysine synthesis regulation. Secondly, this investigation presented the importance of the amino acids which are synthesized by plants through metabolic pathways that are controlled by enzymes, intermediates, substrates, and amino acids. In addition, this research reported relevant aspects whereby scientists can improve their understanding about the synthesis and accumulation of soluble amino acids which are incorporated in proteins. Finally, the third part showed interesting strategies which can be used in future researches in order to increase not only the level of essential amino acids by manipulating genes, but also the introduction of odd genes in plants. Given the nutritional relevancy, this pathway has been extensively investigated by using techniques used by biochemical and genetic engineering. Hence, researchers have demonstrated a considerable effort on this matter contributing for future genetic manipulations, so that plants with high lysine, methionine, and threonine content can be produced.

Keywords: Aspartate; Aspartate kinase; Homoserine dehydrogenase; Dihydrodipicolinate synthase; Essential amino acids; Cereals

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Via metabólica do ácido aspártico, adaptado de Bryan (1990) e Azevedo et al. (1997)	31
--	----

1 INTRODUÇÃO

O perfil da produção científica nacional e os impactos de cada texto na comunidade têm contribuído para um vasto número de publicações por ano nas ciências agrárias, apesar de ainda serem insuficientes por causa da sua grande importância para o Brasil (MENEGBEL et al., 2007).

Relatos mostram que, em épocas passadas, os pesquisadores enfatizavam que eventos ou fenômenos relacionados somente poderiam ser mensurados de forma direta, sendo que a pesquisa qualitativa é tão antiga quanto as Ciências Sociais. Dessa forma, no século XX, as obras metodológicas passaram a surgir em diferentes áreas, tais como medicina, ciências sociais, agrárias e outras. Entretanto, com um único objetivo comum, analisar uma gama de estudos de grande importância e ao mesmo tempo verificar tendências (TESCH, 1990).

Através de análises de um determinado tema e também por meio de recuperação de informações de anos anteriores e escolha de protocolos de análise e ainda a leitura crítica, torna-se possível desenvolver uma atividade mais próxima da realidade. Com isso, a pesquisa bibliográfica passa a dimensionar as características e delimitar os perfis da área, tendo o tempo como fator relevante para a análise das bases bibliográficas de estudo (LIMA; MIOTO, 2007). Um estudo bibliográfico é definido através de uma metodologia a fim de conhecer as contribuições científicas sobre determinado tema e sendo determinado como Pesquisa Qualitativa, por causa da necessidade de ressaltar características que não são observadas em uma Pesquisa Quantitativa (SIQUEIRA; FERNANDES, 2009). No entanto, comumente pode-se verificar que a Pesquisa Qualitativa não é precisamente definida em confrontando a Pesquisa Quantitativa (GUNTHER, 2006). Provavelmente, o surgimento da Ciência da Informação e organização de bancos de dados disponíveis no *World Wide Web* possibilitará conhecer uma diversidade de textos científicos, que têm contribuído para um arsenal de informação em várias áreas de interesse. Atualmente, essas informações têm sido enfatizadas como a base para a direção de projetos presentes como projetos futuros de pesquisas, cujo propósito seria a melhoria de vida para a sociedade. Dentre esses projetos, podem ocorrer organização e discussão em conjunto, podendo auxiliar na produção de conhecimento de grande utilidade e aplicabilidade, colocando ainda o pesquisador em contato com novos referenciais para o estudo de interesse (KONDO, 1998; DOUGLAS et al., 2008).

Por este motivo foi realizada esta revisão com propósito de elucidar a via do ácido aspártico, apontando como fonte deste estudo os cereais. Diante desse contexto, pesquisas evidenciam que os cereais representam a cultura de maior importância no mundo com uma

produção estimada de 600 milhões de toneladas no ano de 2012 (FAO, 2012). Anteriormente, Carneiro et al. (2000) relataram que uma grande demanda dos cereais ocasiona movimentações anuais no mercado, em torno de US\$ 40 bilhões, sendo divididos em indústrias de alimentos e matéria-prima para diversos produtos industrializados. Dentre os cereais mais importantes, estão: arroz, trigo, milho, centeio, sorgo e cevada (SCOLARI, 2006).

Os grãos, devido a sua grande importância na nutrição humana e animal, como enorme fonte de energia metabolizável na forma de amido, boas fontes de fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais e outros nutrientes, são também extensivamente utilizados como fonte de proteína, apesar de seu baixo teor proteico (8-14%), quando comparados com os grãos de leguminosas (20%-40%). Entretanto, essas proteínas apresentam baixo valor nutricional ocasionado pela composição de aminoácidos, as quais apresentam deficiência principalmente de lisina, treonina e triptofano, sendo a composição de aminoácidos um parâmetro importante para determinar a qualidade nutricional de proteínas (MOLINA et al., 2001).

Os aminoácidos conhecidos em sua totalidade são vinte. No entanto, nove (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, leucina, valina e histidina) são conhecidos como essenciais (FERREIRA et al., 2005).

Inúmeras estratégias do melhoramento genético de plantas Mertz; Bates; Nelson (1964) usam as técnicas da engenharia genética, que podem envolver a alteração das proteínas, bem como as rotas metabólicas de aminoácidos essenciais e seu acúmulo, tendo sido utilizados para aumentar a qualidade nutricional de cereais (ZHU et al., 2007). Estudos têm revelado que, através do melhoramento genético, é possível a alteração da composição de aminoácidos em determinada proteína, para torná-la adequada de acordo com cada organismo que exige um requerimento ideal. Este tipo de estudo é importante principalmente em países pobres, onde a população subsiste em grande parte com milho – que tem deficiência em aminoácidos essenciais como lisina e triptofano – ou outros cereais, e não consomem quantidades adequadas de outros alimentos (tais como leguminosas, carne ou leite), que forneceriam os aminoácidos em falta (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988).

Estudos têm mostrado que crianças desnutridas que foram alimentadas com variedades de milho (“*Quality Protein Maize*” – QPM) com alta lisina obtiveram melhoria em diferentes características como ganho de peso e altura, quando comparadas com as crianças alimentadas com o milho convencional (GRAHAM et al., 1980; ORTEGA et al., 2008).

Com o progresso da biologia molecular, atualmente torna-se possível abranger os mecanismos bioquímicos e genéticos oferecendo estratégias interessantes de melhoramento

através da transformação genética. Com isso, o milho, o arroz e cevada têm sido de grande relevância para manipulação genética.

Desta forma, o objetivo principal desta pesquisa consistiu em estudar a via do ácido aspártico, visando descrever uma variedade de técnicas de engenharia genética e bioquímicas que podem ser empregadas para aumentar a qualidade nutricional de cereais, podendo, assim, compreender o que acarreta o aumento do acúmulo de lisina, metionina e treonina nos grãos para suprir essa necessidade na formação de uma proteína balanceada nutricionalmente.

Sendo os objetivos específicos:

- estudar a via do ácido aspártico e seus aminoácidos derivados em plantas superiores no período de 1970 a 1997;
- estudar a via metabólica do ácido aspártico no período de 1997 a 2006;
- estudar estratégias interessantes para aumentar o nível dos aminoácidos essenciais da via do ácido aspártico em plantas no período de 2006 até o momento.

Referências

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N.P.; CARVALHO, C.H.S.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E.; LOPES, M.A. Milho transgênico: melhoria da qualidade nutricional do grão. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. Brasília, v. 3, n.15, 2000. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/milho-pdf> Acesso em: 24 maio 2011.

DOUGLAS, A.C.; MILLS, J.E; NIANG, M.; STEPCHENKOVA, S.; BYUN, S.; RUFFINI, C.; LOUTFI, J.; LEE, J.K.; ATALLAH, M.; BLANTON, M. Internet addiction: Meta-synthesis of qualitative research for the decade 1996–2006. **Computers in Human Behavior**, New York, v.24, p.3027-3044, 2008.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/wfs-home/csdb/en/>. Acesso em: 4 Apr. 2013.

FERREIRA, R.R.; VARISI, V.A.; MEINHARDT, L.W.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Are high-lysine cereal crops still a challenge? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.38, p.985-994, 2005.

GRAHAM, G.G.; GLOVER, D.V; ROMANA, G.L.; MORALES, E.; MACLEAN, W.C. Nutritional value of normal, opaque-2 and sugary-2, opaque-2 maize hybrids for infants and children. I. Digestibility and utilization. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.110, n.5, p.1061-1069, 1980.

GUNTHER, H. Pesquisa qualitativa versus pesquisa quantitativa: esta é a questão? **Psicologia, Teoria e Pesquisa**, Brasília, v.22, n.2, p.201-210, 2006.

KONDO, E.K. Desenvolvendo indicadores estratégicos em ciência e tecnologia: as principais questões. **Ciência da Informação**, Brasília, v.27, n.2, p.128-133, 1998.

LIMA, T.C.S. de; MIOTO, R.C.T. Procedimentos metodológicos na construção do conhecimento científico: a pesquisa bibliográfica. **Revista Katálise**, Florianópolis, v. 10, n.esp., p.37-45, 2007.

MENEGHEL, S.M.; THEIS, I.M.; ROBL, F.; WASSEM, J. Produção do conhecimento no contexto Brasileiro: Perspectiva de instituições emergentes. **Atos de Pesquisa em Educação**, Blumenau, v.2, n.3, p.444-460, 2007.

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.

MOLINA, S.M.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J, AZEVEDO, R.A. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina em sementes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.205-211, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Quality – protein maize**. Washington: National Academy Press, 1988. 120 p.

ORTEGA ALEMÁN EDEL, C.; COULSON ROMERO, A.J.; ORDÓÑEZ -ARGUENTA, L. I.; PACHÓN, H. The effect of consuming quality protein maize or conventional maize on the growth and morbidity of malnourished Nicaraguan children 1 to 15 years of age. **Archives of Latinoamerica Nutrition**, New York, v. 58, n. 4, p. 85-377, 2008.

SCOLARI, D.D. G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **Revista da Fundação Milton Campos**, Brasília, n.25, p.9-86, 2006.

SIQUEIRA, J.R.M. de; FERNANDES, F.S. Balanços sociais no Brasil: Uma análise crítica das práticas corporativas. **Revista de Contabilidade do Mestrado em Ciências Contábeis da UERJ**, Rio de Janeiro, v.14, n.2, p.18-31, 2009.

TESCH, R. **Qualitative research: analysis types and software tools**. London: The Falmer Press, 1990. 330p.

ZHU, C.; NAQVI, S.; GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. **Trends in plant Science**, Oxford, v.12, n. 12, p. 548-555, 2007.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Etapas do estudo

Esta pesquisa foi realizada de acordo com os aspectos concernentes de cada texto de referência. Este método descrito é decorrente de várias estratégias para formar uma pesquisa qualitativa, com propósito de alcançar o objetivo da presente pesquisa.

Inicialmente, para os meios de buscas sistematizadas, é preciso um teste em uma base de dados abrangente, com descritores, ou palavras chave, conhecidos pelo pesquisador usuário. Por meio da verificação, quais os textos que condizem com a necessidade da pesquisa proposta (DE LA TORRE-UGARTE-GUANILO, 2008). O processo de investigação ocorre através da identificação de alguns parâmetros que restringem a área que abrange os textos de interesse Lima e Miotto (2007), por exemplo: critérios de inclusão (especificidades dos textos que almeja analisar); parâmetro linguístico (idiomas); fontes bibliográficas (bases de dados); parâmetro cronológico (período de recuperação dos textos).

2.2 Processo de execução da pesquisa bibliográfica

Esta pesquisa bibliográfica foi realizada por meio das definições e protocolo de ações relacionadas na leitura dos diversos autores citados.

2.2.1 Critérios de inclusão

Foi realizada uma seleção categórica dos textos científicos adotando os seguintes critérios:

- os estudos foram relacionados à via do ácido aspártico e seus derivados em plantas, sendo divididos em três capítulos:

capítulo 1 - estudos da via do ácido aspártico e seus aminoácidos derivados em plantas superiores no período de 1970 a 1997. O período foi escolhido, visto que o primeiro artigo publicado com plantas foi em 1970, e em 1997 saiu uma completa revisão sobre o assunto publicado pelo orientador desta dissertação;

capítulo 2- estudos da via metabólica do ácido aspártico no período de 1997 a 2006. Em 2006 uma nova revisão completa pelo orientador desta dissertação foi publicada;

capítulo 3 - estudos sobre estratégias interessantes para aumentar o nível dos aminoácidos essenciais da via do ácido aspártico em plantas no período de 2006 até o

momento. Estes capítulos apresentaram as técnicas aplicadas nas devidas fontes citadas e sua importância.

- os textos selecionados foram trabalhos científicos publicados em periódicos e congressos;
- os artigos dão ênfase a pesquisas empíricas que apresentam objetivos, métodos e resultados que são direcionados a mostrar informações quantitativas acerca da via do ácido aspártico e seus derivados.

2.2.2 Parâmetros linguísticos

Foram adotados textos nas línguas Portuguesa, Inglesa e Espanhola.

2.2.3 Parâmetro cronológico

Como já descrito, dois períodos foram baseados em revisões extensas sobre o assunto, mas as datas de publicação dos textos foram de origens na grande maioria de pesquisas internacionais, e algumas brasileiras pertencentes ao período de 1970 a 2012 com objetivo de buscar o perfil dos últimos 42 anos da pesquisa na área. Para este estudo de referência, o período adotado foi durante todo o ano de 2012 a fim de comparar à evolução do perfil das pesquisas. As buscas sistematizadas em banco de dados foram realizadas de janeiro até dezembro de 2012. Qualquer progresso científico e tecnológico na área, publicado a partir desta data, não se encontra nesta pesquisa.

2.2.4 Fontes bibliográficas

As bases de dados representam as fontes bibliográficas ou documentais que são diferenciados durante o processo de seleção de dados (LIMA; MIOTO, 2007). Foram utilizadas 3 bases de dados, caracterizadas conforme informações disponíveis em seus *sites*.

Google Scholar: uma biblioteca virtual que permite busca de literatura acadêmica abrangendo artigos científicos e técnicos, livros, teses, dissertações, apresentações, pesquisadores, instituições de pesquisa e outras informações acadêmicas.

ISI Web of Knowledge: portal que oferece acesso a diversas bases de dados de referência bibliográfica, dentre estas são destacadas a *Web of Science*, *Current Contents Connect* e *Journal Citation Reports*, sendo o mais importante para esta pesquisa a *Web of*

Science que abrange pesquisa de referências citadas como *Cited Reference Search* representado por um conjunto de bases de dados de citações, que estão indexadas no ISI (*Science Citation Index do Institute for Scientific Information*), aproximadamente 8 mil títulos periódicos, divididos em três grandes áreas: *Science Citation Index Expanded*, *Social Sciences Citation Index* e *Arts & Humanities Citation Index*. Além disso, é disponibilizado o h-índice (índice de Hirsch) que faz menção da produtividade e qualidade da atividade científica de um autor ou instituição (TARGINO; GARCIA, 2000).

Portal CAPES: uma biblioteca virtual que permite acesso a textos selecionados em mais de 31 mil publicações periódicas internacionais e nacionais às instituições de ensino e pesquisa no Brasil, um acervo que apresenta as mais renomadas publicações de resumo, abrangendo todas as áreas do conhecimento científico e tecnológico.

2.3 Estratégias de buscas

2.3.1 Estratégia de busca no *Google Scholar*

As estratégias de buscas foram realizadas de acordo com as bases de dados *Google Scholar*, que oferece acesso a textos completos *online*, os quais estão disponíveis na forma de *link*. Através da forma booleana, foram utilizadas as palavras entre aspas, acrescentando o operador *AND* entre elas, os quais acabam unindo e restringindo dois ou mais termos, resultando em citações e textos nos diversos formatos (doc, pdf, html). A utilização das aspas contribui para aperfeiçoar as buscas, contribuindo para melhores resultados da pesquisa.

2.3.2 ISI Web of Knowledge

Nesta base de dados são utilizados operadores booleanos *AND*, *OR* e *NOT* para as limitações precisas dos assuntos escolhidos. São utilizadas as aspas (""") para a busca de frases precisas, podendo ser inseridas as palavras em campos diferentes de maneira que se possa encontrar textos que apresentem títulos, nomes de autores, tópicos e outras peculiaridades. Os textos encontrados são apresentados em ordem cronológica, dos mais atuais aos mais antigos, dentro do período cronológico que foi inserido inicialmente no espaço da busca. Desde que estejam registradas na base de dados, todas as referências de cada texto podem ser acessadas. Nesta pesquisa foram utilizados vários indexadores que são encontrados em versão para a

língua inglesa. Por ser uma referência internacional, não foi possível obter busca na língua portuguesa.

2.3.3 Portal CAPES

O Portal CAPES oferece busca com recuperação de textos completos, podendo ser analisados por periódicos, bases, pesquisa simples ou avançada. O processo de busca funciona através da inserção de palavras chave, sendo composta por operadores booleanos E, OU e NÃO, mostrando opções de recuperação por campos de autor, ano, título, assunto. Foram utilizados os indexadores para a busca nesta base, por meio da escolha de dois termos ou mais determinantes para a busca. Os indexadores de buscas foram em português e inglês.

Referências

DE LA TORRE-UGARTE-GUANILO, M.C. **Vulnerabilidade feminina ao HIV:** metassíntese. 2008. 215p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOOGLE SCHOLAR. Disponível em:
<<http://scholar.google.com/intl/en/scholar/about.html>>. Acesso em: 4 apr. 2013.

ISI - WEB OF KNOWLEDGE. Disponível em: <<http://www.fc.ul.pt/pt/pagina/3703/isi-%E2%80%93-web-knowledge>>. Acesso em: 4 apr. 2013.

LIMA, T.C.S. de; MIOTO, R.C.T. Procedimentos metodológicos na construção do conhecimento científico: a pesquisa bibliográfica. **Revista Katálise**, Florianópolis, v. 10, n.esp., p.37-45, 2007.

PORTAL CAPES. Disponível em:
<http://novo.periodicos.capes.gov.br/?option=com_phome&Itemid=68>. Acesso em: 4 apr. 2013.

TARGINO, M.G.; GARCIA, J.C.R. A ciência brasileira na base de dados do Institute for Scientific Information (ISI). **Ciência da Informação**, Brasília, v. 29, n.1, p.103-117, 2000.

WEB OF KNOWLEDGE. Disponível em: <<http://isiwebofknowledge.com/>>. Acesso em: 4 apr. 2013.

3 ESTUDO DA VIA DO ÁCIDO ASPÁRTICO E SEUS AMINOÁCIDOS DERIVADOS EM PLANTAS SUPERIORES NO PERÍODO DE 1970 A 1997

Resumo

As proteínas são formadas através da ligação em sequência de aminoácidos codificados pelo DNA. Estes aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais. O ácido aspártico é o precursor dos aminoácidos essenciais: metionina, lisina, treonina e isoleucina. Entre os essenciais, a lisina é um dos mais estudados devido à escassez em muitos cereais, o que contribuiu para o estudo extensivo da via do ácido aspártico, revelando, assim, a importância da aspartato quinase (AK), homoserina desidrogenase (HSDH) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) como enzimas chaves para a regulação da síntese de lisina. Por meio da caracterização bioquímica em plantas e microorganismos, foi observado que a enzima aspartato quinase (AK) exerce um controle central sobre via do ácido aspártico. Já a enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) é o ponto chave para a regulação da síntese de lisina. Por meio de estudos bioquímicos da via de degradação do aminoácido lisina em cereais foi concluído que a manipulação da degradação seria tão importante quanto a biossíntese de lisina, levando por consequência ao acúmulo deste aminoácido nos grãos de cereais. A descoberta do mutante *opaco 2* com alta concentração de lisina em milho foi outro ponto fundamental para compreender melhor o controle da regulação da via do ácido aspártico.

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

Abstract

Proteins are formed by a sequence of amino acids which are codified by DNA. These molecular structures are classified in essential and non-essential amino acids. Aspartate is the common precursor of the essential amino acids lysine, threonine, methionine and isoleucine. Among the essentials amino acids, lysine is the most researched due to the lack of its presence in a lot of cereals. Thus, it contributed to an extensive study on the aspartate pathway leading to the relevancy of some enzymes such as aspartate kinase (AK), homoserine dehydrogenase (HSDH), dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), which are the key enzymes involved in the synthesis of lysine. In regard of biochemical characterization in plants as well as in microorganisms, it has been shown that aspartate kinase (AK) presents a major control upon the aspartate pathway. Therefore, dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) is the responsible enzyme for lysine synthesis regulation. Biochemical studies on lysine degradation in cereals showed that the degradation of manipulation would be as important as lysine biosynthesis, considering the accumulation of this amino acid in cereals. Findings of *opaco 2* mutant and others with a high concentration of lysine in maize were another relevant issue to be considered for a better understanding of the aspartate metabolic pathway.

Keywords: Aspartate kinase; Homoserine dehydrogenase; Dihydrodipicolinate synthase

3.1 Introdução

As proteínas são formadas através da ligação em sequência de aminoácidos codificados pelo DNA. Dentre os vinte aminoácidos incorporados em proteínas, nove deles são considerados essenciais, por não serem sintetizados por animais monogástricos nos quais está incluída a espécie humana. Entre os aminoácidos essenciais, a lisina é um dos mais estudados devido à escassez em muitos cereais.

Para Millward (1999), os cereais são consumidos principalmente em países pobres ou em desenvolvimento, pois estes alimentos de origem vegetal são fontes básicas de proteínas para estas populações, enquanto os de origem animal são as principais fontes de proteínas para pessoas de países desenvolvidos. No entanto, estes alimentos derivados de cereais são deficientes em alguns aminoácidos essenciais como lisina e triptofano.

A via de biossíntese da lisina faz parte da via metabólica do ácido aspártico, pela qual outros aminoácidos como treonina, metionina e isoleucina também são sintetizados. Durante trinta anos, foi dada uma grande importância ao estudo da via do ácido aspártico, devido a falta de aminoácido lisina e treonina serem limitantes nos cereais, e a metionina em leguminosas.

Nas décadas de 70 e 80 foram estudados esses aminoácidos a partir do desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e regeneração de plantas. Já na década de 90 foram aplicadas técnicas para a transformação de plantas e mutagênese de sementes, que permitiram a obtenção de plantas transgênicas e mutantes bioquímicos, apresentando alterações específicas nos passos metabólicos chaves, que, conseqüentemente, levariam à superprodução e acúmulo principalmente de lisina em vários tecidos das plantas.

Por meio de estudos bioquímicos da via de degradação do aminoácido lisina em cereais, foi concluído que a manipulação da degradação seria tão importante quanto a biossíntese de lisina, levando ao acúmulo deste aminoácido nos grãos dos cereais. A descoberta do mutante de milho *opaco 2* contendo alta concentração de lisina Mertz; Nelson; Bates (1964) foi fundamental para compreender melhor a via do ácido aspártico. Entretanto esse material de milho não foi bem aceito no mercado, por apresentar características agrônomicas indesejáveis, como, por exemplo, menor densidade de grãos, maior susceptibilidade ao ataque de pragas, doenças e baixa produtividade (ORTEGA; BATES, 1983; VILLEGAS; VASAL; BJARNASON, 1992). Essas características estão relacionadas ao alelo recessivo do gene *opaco-2* que causa modificações na síntese das proteínas de reserva, acarretando alterações na estrutura física do endosperma (MERTZ; NELSON;

BATES, 1964; NELSON; MERTZ; BATES, 1965). Com intuito de solucionar essas deficiências, pesquisadores do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), por meio de inúmeros retrocruzamentos e seleção recorrente, combinaram com o gene *opaco-2* os genes modificadores de endosperma levando à supressão do fenótipo opaco dos grãos, aumentando a produtividade, mas mantendo a alta concentração de lisina e triptofano do mutante (VASAL et al., 1980). Estes genótipos *opaco-2* modificados foram denominados de “Quality Protein Maize” ou QPM.

3.2 Revisão bibliográfica

3.2.1 A via metabólica do ácido aspártico

Entre os vinte aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, onze são sintetizados por humanos e animais monogástricos e nove são chamados de essenciais, pois não são sintetizados. Sendo eles: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, histidina e valina, os quais devem ser fornecidos pela dieta alimentar (AZEVEDO et al., 1997).

As plantas e a maioria das bactérias e fungos têm a capacidade de sintetizar os vinte aminoácidos previstos para a síntese de proteínas (AZEVEDO et al., 1997). Estes são classificados em famílias, conforme o precursor da via de biossíntese (GIOVANELLI; MUDD; DATKO, 1989).

Os cereais são deficientes em lisina e treonina Bright e Shewry (1983); Shewry; Napier; Tatham (1995) enquanto as leguminosas são deficientes em metionina Tabe et al. (1993); Gatel (1994). A partir das técnicas de mutagênese em plantas, tornou-se viável aumentar os teores desses aminoácidos de forma significativa, melhorando o valor nutricional desses cereais (FULLER; MENNIE; CROFTS, 1979). Devido à deficiência destes aminoácidos observada neste grupo vegetal, a via metabólica do ácido aspártico tem sido estudada, principalmente os ramos que levam a conversão do aspartato em lisina, treonina e metionina (SCHLOSS; AULABAUGH, 1990; STIDHAM, 1991).

O aspartato é o composto inicial da via metabólica do ácido aspártico (Figura 1). O aspartato atua como precursor comum em duas vias metabólicas. A primeira conduz à síntese do aminoácido asparagina, cuja função é transportar nitrogênio. (SIVASANKAR; ROTHSTEIN; OAKS, 1997). A segunda conduz à síntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 1997).

Estudos têm revelado a importância das enzimas aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52) como enzimas chave envolvidas na síntese da lisina Bryan et al. (1970); Brennecke et al. (1996); Mills; Lea; Mifflin (1980); Bryan (1990); Cheshire e Mifflin (1975), enquanto as enzimas lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são enzimas chave envolvidas na via de degradação da lisina (MARKOVITZ; CHUANG, 1987; GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996).

Anexo à via do ácido aspártico, pela sua importância, em plantas, o catabolismo de lisina (Figura 1) foi inicialmente descrito por Sodek e Wilson (1970). O catabolismo de lisina ocorre através de duas reações enzimáticas sucessivas com a participação da enzima LOR, a qual catalisa a formação de sacaropina que, em seguida, é hidrolisada em glutamato e em ácido α -aminoadípico por meio da atividade da enzima SDH (MARKOVITZ; CHUANG, 1987; GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996).

1 Aspartato Quinase; 2 Aspartato Semialdeído Desidrogenase; 3 Dihidrodipicolinato Sintase; 4 Dihidrodipicolinato Redutase; 5 Piperidina Dicarboxilase Acilase; 6 Acildiaminopimelato Aminotransferase; 7 Acildiaminopimelato Deacilase; 8 Diaminopimelato Epimerase; 9 Diaminopimelato Descaboxilase; 10 Lisina Oxoglutarato Redutase; 11 Sacaropina Desidrogenase; 12 Homoserina Desidrogenase; 13 Homoserina Quinase; 14 Treonina Sintase; 15 Treonina Desidratação; 16 Acetolato Sintase; 17 Acetohidroxato Redutoisomerase; 18 Dihidroxiato Desidratação; 19 Aminotransferase de Cadeia Ramificada; 20 Cistationa-γ-Sintase; 21 Cistationa-β-Liase; 22 Metionina Sintase; 23 Metionina Adenosil Transferase.

Figura 1 – Via metabólica do ácido aspártico, adaptado de Bryan (1990) e Azevedo et al. (1997)

3.2.2 Enzima da via do ácido aspártico

3.2.2.1 Aspartato quinase

A aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4) é a primeira enzima da via metabólica do ácido aspártico que age catalisando a fosforilação do aspartato em β -aspartil fosfato (Figura 1). Os primeiros estudos desta enzima foram realizados em microorganismos, como por exemplo, *Escherichia coli*. Stadtman; Cohen; Lebras (1961) e, posteriormente, em espécies vegetais, decorridos, portanto cerca de cinquenta anos de estudos com a enzima aspartato quinase e pouco mais de quarenta anos de seu isolamento em plantas. A primeira caracterização da enzima AK em plantas superiores foi descrita por Bryan et al. (1970). Neste trabalho, a AK foi isolada e parcialmente purificada a partir de brotos de milho (*Zea mays*). A atividade era dependente de ATP na presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} , que catalisa a conversão do ácido aspártico para β -aspartil fosfato. Em plantas, AK apresenta uma complexa relação entre atividade e a concentração do ácido aspártico, sendo extremamente sensível à inibição por lisina.

Em plantas foram encontradas duas isoenzimas distintas da AK, uma monofuncional sensível à inibição por lisina Rognes; Lea; Miflin (1980) e a outra isoenzima em trabalhos posteriores, mostrou que está presente como um polipeptídeo bifuncional contendo um domínio de AK e outro de HSDH, sendo sensível à inibição por treonina (AK-HSDH) (AARNES; ROGNES, 1974; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992).

A presença e/ou distribuição das isoenzimas da AK variam conforme o tecido e o estágio de desenvolvimento da planta (LEA; MILLS; MIFLIN, 1979; BRYAN, 1990). Normalmente, a isoenzima monofuncional, sensível à lisina, representa aproximadamente 80% do total da atividade da AK em plantas, exceto em *Coix lacryma-jobi* Lugli e Azevedo (1994) na qual a isoenzima bifuncional sensível à inibição por treonina foi considerada predominante. Para cotilédone, calos de soja Matthews e Widholm (1979) e raízes de cenoura Sakano e Komamine (1978); Mathews e Widholm (1978), a isoenzima sensível à inibição por treonina também foi responsável por 60-70% da atividade da AK.

Pesquisa com folhas de cevada demonstrou três picos de atividade da enzima aspartato quinase através da eluição em coluna DEAE-celulose. Estes picos apresentaram as isoenzimas AKI, sensível à inibição por treonina, AKII, sensível à inibição por lisina e AKIII, sensível à inibição por lisina mais SAM (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982).

No caso de milho, uma planta na qual a AK foi bastante estudada, a purificação em células em suspensão de milho foi realizada em cinco etapas, as quais incluíram precipitação

com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica, filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida corroborando, então, a hipótese da presença de três isoenzimas em plantas superiores. Dentre essas, duas isoenzimas da aspartato quinase, sensíveis à inibição por lisina e uma sensível à inibição por treonina puderam ser bem caracterizadas principalmente em colunas cromatográficas de troca iônica e filtração em gel (DOTSON; SOMERS; GENGENBACH, 1989; AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992).

O estabelecimento preciso da massa molecular de AK tem causado muitas discussões. AK em cenoura apresenta uma massa molecular que variou quando determinada por diferentes métodos de 100 kDa a 253 kDa (RELTON et al., 1988). Dotson, Somers e Gengenbach (1989) encontraram massas moleculares de 104 kDa, 124 kDa e 140 kDa para a isoenzima sensível à inibição por lisina em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e de 254 kDa por cromatografia de filtração em gel. Ainda em milho Azevedo; Smith; Lea (1992) reportaram diferentes valores de massa molecular para essa mesma isoenzima, variando de 139 kDa em PAGE e 150 kDa em cromatografia de filtração em gel. A AK de milho sensível à inibição por lisina é composta de subunidades de 49 kDa e 60 kDa determinada por SDS-PAGE. Azevedo, Smith e Lea (1992) propuseram a massa molecular de 180 kDa para a isoenzima da AK sensível à inibição por treonina, em milho, que foi determinada por meio de cromatografia de filtração em gel. Atividade cinética de AK foi relada para *Z. mays*, com valor de K_m 0,5 (plântula) e K_m 1,5 (endosperma) Bryan et al. (1970), enquanto K_m 1,04 para Dotson et al. (1990), *Lemma paucicostata*, K_m 10 Giovanelli; Mudd; Datko (1989) e *Daucus carota* K_m 2,35 Relton et al. (1988).

3.2.2.2 Homoserina desidrogenase

A homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) é a primeira enzima envolvida na síntese de treonina e metionina, a qual catalisa a conversão do aspartato semialdeído a homoserina com a participação de NAD ou NADPH (BRYAN, 1980).

A enzima HSDH possui duas isoenzimas, sendo uma sensível e a outra resistente à inibição por treonina, sendo que esta última apresenta uma isoforma monofuncional no citoplasma, mas pouco se sabe a respeito da função desta enzima (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992). A isoenzima sensível à inibição por treonina é encontrada nos plastídios, ela é responsável pela maior parte da atividade total de HSDH, podendo ainda ser de importante função para a síntese de treonina (WALTER et al., 1979; KRISHNASWAMY; BRYAN, 1986). De acordo com Walter et al. (1979), estas isoenzimas apresentam massas moleculares

distintas, sendo que a isoenzima sensível à inibição por treonina representa um homodímero com massa molecular de 190 kDa e um valor de K_m de 250 μ M e a isoenzima resistente à inibição por treonina com massa de 70 kDa, com K_m de 150 μ M.

A existência de um polipeptídeo bifuncional, contendo os domínios de AK e HSDH, foi primeiramente sugerida por Aarnes e Rognes (1974) trabalhando com ervilhas. No entanto, a existência deste polipeptídeo contendo as atividades de AK e HSDH sensíveis à inibição por treonina foi corroborada por Wilson, Gray, Matthews (1991) em células de cenoura e em células de milho (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992).

Pesquisadores nas décadas de 80 e 90 apresentaram dados de grande relevância sobre a regulação e a função dos genes que codificam as enzimas AK e HSDH em plantas através de abordagens moleculares. Por exemplo, o gene que codifica a isoenzima bifuncional da AK e HSDH foi clonado em diversas espécies como cenoura Weisemann e Matthews (1993), soja Gebhardt; Weiseman; Matthews (1993) e milho Muehlbauer et al. (1994). Utilizando como sonda um cDNA da AK-HSDH de cenoura Ghislain et al. (1994), de uma biblioteca genômica de *Arabidopsis thaliana*, o primeiro clone genômico do gene *aktthr 1* da AK-HSDH foi identificado. Em seguida três diferentes cDNAs de *A. thaliana* que codificam a enzima monofuncional da AK sensível à inibição por treonina foram identificados (FRANKARD; VAUTERIN; JACOBS, 1997; TANG et al., 1997a). Em milho três cDNAs foram isolados que codificam a AK- HSDH (MUEHLBAUER et al., 1994).

3.2.2.3 Aspartato semialdeído desidrogenase

A Aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11) catalisa a redução de aspartato semialdeído para β -aspartil fosfato dependente de NADPH. A enzima tem sido pouco caracterizada em plantas superiores e foi inicialmente detectada em plântulas de ervilha (BRYAN, 1980). Gengenbach et al. (1978) mediram a atividade enzimática na parte aérea do milho, raiz, grão, calo por meio de extratos de cultura em suspensão. Nesse caso, a aspartato semialdeído isolada a partir de células de cultura em suspensão de milho não foi inibida por retroinibição com 10 mM de lisina, treonina ou isoleucina, embora alguma sensibilidade à metionina tenha sido detectada (GENGENBACH et al., 1978). A enzima em *E. coli*, tem uma massa molecular nativa de 77,5 kDa e subunidade com massa molecular de 38 kDa a 40 kDa determinado por SDS-PAGE ou clonagem de genes (HAZIZA; STRAGIER; PATTE, 1982). O mecanismo cinético da reação enzimática foi estudado detalhadamente em *E. coli* que requer um resíduo de cisteína essencial (KARSTEN; VIOLA, 1992). O gene *asd* que codifica

a enzima tem sido isolado a partir de um número de bactérias e mostrado fazer parte do operon *dap* em *Bacillus subtilis* Chen et al. (1993), mas não em *Streptomyces* Le; He; Vining (1996).

3.2.3 Biossíntese de metionina

A metionina é sintetizada a partir do composto *O*-fosfohomoserina em três reações enzimáticas com a participação das enzimas cistationina γ -sintase (CGS, EC 4.9.99.9), cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8) e metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13) (AZEVEDO et al., 1997).

A metionina é um aminoácido abundante em proteínas de plantas e animais, sendo a principal fonte de átomos sulfurados das proteínas. A biossíntese de metionina ocorre a partir da transferência do grupo sulfidril da metionina para cisteína e homoserina. A metionina é catalizada pela enzima metionina-adenosiltransferase (MAT) para formar um composto de alta energia, S-adenosilmetionina (AdoMet/SAM). SAM transfere o grupo metil ligado ao átomo de enxofre, para distintos receptores, para formar S-adenosilhomocisteína. SAM é o principal doador de grupo metil em todos os organismos (STIPANUK, 1986).

Devido à importância nutricional dos aminoácidos que contêm enxofre, esforços consideráveis têm sido realizados para aumentar os níveis em plantas (TABE; HIGGINS, 1998). Como a metionina é um aminoácido sulfurado, pode, então, ser convertida para cisteína em células humanas e de animais (MITCHELL; BENEVENGA, 1978; TABE; HIGGINS, 1998). Sendo a cisteína considerada o segundo aminoácido que limita a qualidade nutricional das plantas Tabe e Higgins (1998), estudos têm sido concentrados em aumentar o nível de metionina, uma vez que pode fornecer o requisito total de aminoácidos sulfurados na dieta (MITCHELL; BENEVENGA, 1978; TABE; HIGGINS, 1998).

3.2.4 Biossíntese de treonina

A treonina é sintetizada a partir da via metabólica do ácido aspártico em cinco passos com a participação de quatro compostos intermediários: β -aspartil fosfato, β -aspartil semialdeído (ASA), homoserina e *O*-phosphohomoserina (OPH). Os dois primeiros passos são catalisados pela AK e pela aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11), passos esses que são comuns para a síntese de lisina, treonina, isoleucina e metionina. A etapa de redução de ASA para homoserina e homoserina fosforilada faz parte também da síntese da

metionina em plantas, sendo que a ramificação ocorre a partir da OPH. A última reação é catalisada pela treonina sintase (TS), uma vez que o último passo envolve a conversão irreversível de OPH em treonina (AZEVEDO et al., 1997). A treonina sintase está localizada no cloroplasto (WALLSGROVE; MAZELIS, 1981). Provavelmente, a característica mais importante da treonina sintase em plantas é que a enzima é estimulada por SAM (MADISON; THOMPSON, 1976; THOEN; ROGNES; AARNES, 1978; GIOVANELLI et al., 1984).

3.2.5 Enzimas da biossíntese de metionina e treonina

3.2.5.1 Homoserina quinase

Em plantas a homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) foi isolada e parcialmente purificada de preparações brutas de folhas e plântulas de ervilha, de folhas de rabanete e folhas de cevada (AZEVEDO et al., 1997). A primeira HK foi purificada e caracterizada em semente de trigo (RIESMEIER; KLONUS; PHOLENZ, 1993). Em *Arabidopsis* a enzima HK é codificada por um único gene (LEE; LEUSTEK, 1999). Em plantas, a enzima HK se apresenta na forma de um dímero de 75 kDa e requer íons de potássio (K^+) para sua atividade (RIESMEIER; KLONUS; PHOLENZ, 1993).

A HK catalisa uma reação comum para síntese de treonina, isoleucina e metionina, em que a homoserina é convertida na presença de ATP em *O-fosfohomoserina* e ADP. A HK junto com AK, HSDH e treonina sintase (TS) estão localizadas no cloroplasto (WALLSGROVE; LEA; MIFLIN, 1983; MUHITCH; WILSON, 1983). Como a HK é considerada um ponto de ramificação metabólica, este pequeno número de relatos, comparado a outras enzimas regulatórias da via, tem exibido muitos resultados inconsistentes. Muhitch e Wilson (1983) identificaram atividade de HK associada aos tilacóides em cloroplasto de ervilha, mas foram incapazes de distinguir isoenzimas. Contudo, outros trabalhos relataram evidências para a existência de isoenzimas de HK (THOEN; ROGNES; AARNES, 1978; AARNES, 1976; RIESMEIER; KLONUS; POHLENZ, 1993). Arnes (1976) relatou que a HK purificada de germe de trigo não foi significativamente influenciada por qualquer um dos aminoácidos derivados do aspartato e por SAM, sendo este conhecido como um metabólito regulador da via metabólica. Baseados nos relatos da literatura, Riesmeier, Klonus e Pohlenz (1993) sugeriram que, em monocotiledôneas, a HK não é uma enzima reguladora da via do ácido aspártico. No entanto, em estudos com plântulas de ervilha, observou-se que a HK é sensível à inibição pelos aminoácidos isoleucina, valina, ornitina e SAM, enquanto a treonina,

metionina e lisina livre, ou em combinação, mostraram diferenças pouco significativas (THOEN; ROGNES; AARNES, 1978).

A partir de estudos com plantas que utilizaram cromatografia por filtração em gel foram observadas grandes diferenças em relação à massa molecular da enzima HK (THOEN; ROGNES; AARNES, 1978). Para plântulas de ervilha, dois picos da atividade da HK, sendo um correspondendo a 240 kDa e o outro a 127 kDa foram observados, enquanto em plântulas de cevada a massa molecular foi de cerca de 150 kDa (AARNES, 1976). Em ambos os casos, a massa molecular referente à enzima foi muito superior do que em bactérias (MIYAJIMA; SHIIO, 1972; THÉZE; KLEIDMAN; SAINT-GIRONS, 1974) em que valores ao redor de $5,5 \times 10^4$ foram relatados. A enzima purificada a partir do gérmen de trigo apresentou uma massa molecular de 75 kDa que é um homodímero com subunidade de 36 kDa. Mas, além disso, foi determinado o valor para K_m de 0,24 μ M (RIESMEIER; KLONUS; POHLENZ, 1993).

Foram isolados genes que codificam para enzima HK a partir de bactérias Miyajima e Shiio (1972); Clepet et al. (1992) e levedura Mannhaupt et al. (1990); Schultes et al. (1990), nos quais foram observadas similaridades entre as sequências.

3.2.5.2 Cistationina β -liase

Cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8) catalisa a conversão de homocisteína em cistationina, desempenhando, assim, um papel essencial na síntese de metionina em plantas. Essa confirmação é dada através do isolamento e da análise de metionina em um mutante, a partir de culturas de protoplastos em *Nicotiana plumbaginifolia* (NEGRUTIU et al., 1985).

A CBL catalisa duas reações diferentes, a primeira envolve a síntese de metionina (DROUX; RAVANEL; DOUCE, 1995). A segunda reação forma cisteína. Esta enzima catalisa essas reações com os valores de K_m de 0,15 mM (DROUX; RAVANEL; DOUCE, 1995).

Em espinafre foram mostradas duas formas diferentes de CBL (DROUX; RAVANEL; DOUCE, 1995). Uma isoforma cloroplastídica e outra citosólica. Esta enzima cloroplastídica foi purificada mais de 16 vezes em folhas de espinafre, com massa molecular de 170 kDa e constituída por quatro subunidades idênticas de 44 kDa. Esta enzima é dependente de fosfato piridoxal (PLP) e mantém a extensa atividade, com um pH otimizado entre 8,3 e 9,0, confirmando, assim, o que Staton e Mazelis (1991) identificaram na CBL em folha de

espinafre com massa molecular de 210 kDa, composta de quatro subunidades idênticas de 53 kDa.

Em *Arabidopsis* foi evidenciada a existência de apenas um gene que codifica a CBL (MATTHEWS, 1999). A complementação de *E. coli* e da metionina auxotrofo GUC41, foi observada a partir da clonagem de *Arabidopsis*, evidenciando, assim, a necessidade da atividade CBL (RAVANEL; DROUX; DOUCE, 1995). O clone de cDNA com tamanho de 1,7 kb codifica um peptídeo de 464 aminoácidos, com massa de aproximadamente 50,372 kDa. Provavelmente, o peptídeo maduro pode mostrar uma sequência de 22% semelhante à de *E. coli*, a qual contém um peptídeo de trânsito putativo de 70 aminoácidos no cloroplasto (MATTHEWS, 1999).

3.2.5.3 Metionina sintase

A última etapa na síntese de metionina é catalisada pela enzima metionina sintase (MS, EC 2.1.1.14), que transfere o grupo metil de 5-metiltetrahidrofolato da homocisteína para produzir metionina. Em plantas superiores foram descritos a clonagem e caracterização da expressão de MS, tendo como fonte de estudos o *Catharanthus roseus* Eichel et al. (1995), com valores de K_m para 5-metiltetrahydropteroiltriglutamato de 28 μM , sendo o de homoserina, menos de 10 μM . MS requer a forma de triglutamato e metiltetrahidrofolato como doador de metil, entretanto, não a forma monoglutamato. SAM e cobalamina não são necessários para a realização da atividade enzimática. A proteína é um pouco ácida (pH 6,05) e está localizada no citosol (MATTEWS, 1999).

O cDNA que codifica uma proteína em *C. roseus* com 765 aminoácidos, com massa molecular 85 kDa sem peptídeo sinal reconhecido, o qual tem se referido o homólogo de levedura Met, tendo sido identificado 50% dos aminoácidos, a partir do gene metE em *E. coli* que codifica para cobalamina independente de MS. O cDNA foi expresso em *E. coli* como MS funcional (EICHEL et al., 1995).

Com a técnica de Immunoblots utilizaram um anticorpo específico para o MS que revelou uma única banda de proteína de 85 kDa em extratos de *C. roseus*, soja e cravo, que continham uma única banda imunorreativa, um pouco menor do que em *C. roseus*. (MATTEWS, 1999).

A metionina sintase tem sido detectada em folhas de ervilha Cossins (1980) e de cenoura Fedec e Cossins (1976) e parcialmente purificada em sementes de ervilha Dodd e Cossins (1970). Keith et al. (1993) clonaram dois cDNA a partir do mRNA em folha de milho

e foram identificadas similaridades para MS, sendo que a similaridade do clone 239-bp da extremidade 5' da MS (AA030695), e a do clone 433-bp, com similaridade com o extremo 3' (AA054818), foram encontradas no GenBank.

Embora existam três outras enzimas que podem transformar a homocisteína em metionina, utilizando os doadores do grupo metil (SAM, S-metilmetionina e metiltioadenosina), apenas a reação catalisada pela CGS representa um aumento na síntese de metionina (MADISON, 1990).

3.2.6 Biossíntese de isoleucina

A primeira etapa da biossíntese de isoleucina é a desidratação e desaminação da treonina para formar os compostos 2-oxobutirato e amônia, catalisada pela enzima treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16) (SINGH; SCHMITT, 1989). A enzima ácido acetohidroxi sintase (AHAS, EC 4.1.3.18) (também conhecida como acetolactato sintase, ALS) participa da biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina em microrganismos e plantas Eberlein et al. (1997) envolvida na fase inicial do processo metabólico que catalisa uma reação de condensação, que consiste na fusão de duas moléculas de piruvato, formando o acetolactato (produto final valina e leucina), ou na condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato, formando 2-aceto-2-hidroxi-butirato (produto final isoleucina), sendo esta a primeira etapa da biossíntese de isoleucina (EBERLEIN et al., 1997; SCHLOSS, 1990; SINGH; SCHMITT, 1989).

Logo após, cada produto é convertido por outras três reações que são catalisadas pelas enzimas ácido acetohidroxi reduto isomerase (AHRI, EC 1.1.86), também conhecida como ácido ketol reduto isomerase (KARI), dihidroxiácido desidratase (EC 4.2.1.9) e aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (BCAT, EC 2.6.1.42), resultando em valina e isoleucina. Para a biossíntese da leucina, o precursor da valina 2-acetolactato é transformado para 2,3-dihidroxi-isovalerate em uma série de quatro reações que envolvem as enzimas 2-isopropilmalato sintase, isopropilmalato isomerase, desidrogenase e aminotransferase (CHUNDRU; MRACHKO; CALVO, 1989; SCHLOSS; AULABAUGH, 1990).

Os compostos químicos inibidores eficazes de AHAS são as sulfonilureias, imidazolinonas, pirimidiloxitiobenzoato e triazolopirimidinas sulfoanilidas. Esses compostos são herbicidas que causam a inibição da síntese de aminoácidos essenciais como a leucina, isoleucina e valina, interrompendo a síntese protéica e, conseqüentemente, interferindo no crescimento celular, causando assim, a morte da planta (LA ROSSA; VAN DYK; SMULSKI,

1987). Além desses, é citado o uso do ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA), inibidor da enzima cetoácido reductoisomerase (KARI), que catalisa a segunda reação da enzima ácido acetohidroxi sintase (AHAS) na via de síntese de aminoácidos (DUMAS et al., 1994).

Na década de 80 foram introduzidos no mercado os herbicidas inibidores da síntese de aminoácidos (SAARI; COTTERMAN; THILL, 1994). Os grupos de herbicidas citados anteriormente atuam inibindo a enzima AHAS e KARI (DUMAS et al., 1994), sendo empregados para controle seletivo de plantas invasoras em culturas como soja, trigo, cevada e arroz (SWEESTER; SCHOW; HUTCHISON, 1982). O mecanismo de ação destes herbicidas corresponde à inibição não competitiva da enzima AHAS na biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Os herbicidas inibidores de AHAS são muito usados por apresentarem alta eficiência em doses muito baixas, baixa toxicidade para mamíferos, alta seletividade para culturas de grande importância econômica (HESS, 1994; AHRENS; EDWARDS, 1994). Esses grupos de herbicidas conhecidos como inibidores de aminoácidos transformaram-se em uma ferramenta de avanço para a agricultura por representar alta eficiência, além de reduzir o impacto ambiental (SAARI; COTTERMAN; THILL, 1994).

3.2.6.1 Treonina desaminase

Treonina desaminase (TD) é a primeira e única enzima na via de biossíntese de isoleucina. O requisito absoluto para a TD para síntese de isoleucina foi demonstrado pela primeira vez por meio do isolamento de plantas mutantes que são auxotróficas para biossíntese de isoleucina devido à carência da atividade desta enzima (SIDOROV; MENCZEL; MALIGA, 1981; NEGRUTIU et al., 1985; WALLSGROVE et al., 1986a). Posteriormente, foi confirmado pela complementação por uma deficiência de TD no mutante *Nicotiana plumbaginifolia*, com o gene *ilv1* da *Sacharomyces cerevisiae* que codifica a enzima (COLAU et al., 1987). Em microorganismo há duas formas da enzima treonina desaminase, sendo uma inibida por treonina, conhecida como biossintética. A outra forma não sofre inibição e é chamada de biodegradativa (UMBARGER, 1978).

3.2.6.2 Ácido acetohidroxi sintase

Ácido acetohidroxi sintase (AHAS) realiza uma série de reações paralelas na via de biossíntese de isoleucina para produzir valina e leucina. Na via de produção de valina e leucina, a AHAS é catalisada nos cloroplastos (MIFLIN, 1974).

Todas as partes da planta contêm AHAS, e esta pode ser medida pela quantificação do mRNA Ouellet; Rutledge; Miki (1992); Keeler et al. (1993), da proteína, e da atividade enzimática Singh et al. (1990); Schmitt e Singh (1990); Stidham e Singh (1991). Os níveis de mRNA de AHAS1 e AHAS3 em *B. napus* foram comparáveis nos diferentes órgãos (OUELLET; RUTHEDGE; MIKI, 1992). De acordo com as observações feitas com os níveis de mRNA, a variação dos níveis de proteína AHAS e a atividade da enzima em diferentes órgãos de feijão de lima eram pequenos (SCHMITT; SINGH, 1990).

Estudos anteriores demonstraram a clonagem dos genes (*Sura* e *Surb*) em *Nicotiana tabacum* apresentando o nível de transcrição do gene *Surb* mais elevado do que o gene *Sura* (KEELER et al., 1993). Isto então demonstrou um mecanismo comum de regulamentação da enzima AHAS. Esses níveis de expressão confirmam o requisito para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada nas áreas de crescimento da planta (ENDRIZZI; TURCOTTE; KOHEL, 1985; KEELER et al., 1993).

A atividade de AHAS é regulada pela retroinibição da valina, leucina e isoleucina, os produtos finais da via (MIFLIN, 1971; MIFLIN; CAVE, 1972; RELTON et al., 1986; SINGH et al., 1988, 1990). Cada um dos três aminoácidos inibe a atividade da enzima em uma pequena proporção, sendo a leucina, o inibidor mais potente (MIFLIN, 1971).

No entanto, a inibição sinérgica da enzima por baixas concentrações de leucina, valina, parece ser bastante comum em plantas (MIFLIN, 1971; MIFLIN; CAVE, 1972). Estudos têm determinado que a regulação de AHAS ocorre por retroinibição pelos produtos finais que regula o fluxo de carbono através desta via (SINGH, 1999).

A forma ativa de AHAS é um dímero formado pela associação de duas subunidades de tal maneira que domínio 1 de uma subunidade e domínio 2 e 3 de uma outra subunidade se apresentem de forma bem próximo de modo bem alinhado. Muitas mutações nos genes AHAS foram criadas para produzir proteínas em *E. coli* e plantas transgênicas insensíveis à inibição causada por vários herbicidas inibidores de AHAS (SINGH, 1999).

3.2.6.3 Ácido acetohidroxi isomeroreductase

A enzima ácido acetohidroxi isomeroreductase (AHRI, EC 1.1.1.86), também é conhecida como ácido ketol reduto isomerase (KARI). Esta é a segunda enzima da via, isomeriza e, em seguida, reduz os acetohidroxiácidos da etapa anterior para produzir dihidroxiácidos (CHUNDURU; MRACHKO; CALVO, 1989, 1990; DUMAS et al., 1992).

KARI foi purificada em espinafre e cevada (DUMAS; JOYARD; DOUCE, 1989; DURNER; KNORZER; BOGER, 1993; DURNER et al., 1993). As enzimas purificadas de espinafre e cevada apresentaram uma subunidade de massa molecular de 59 kDa. Em espinafre, a enzima foi isolada, e a forma nativa apresentava possivelmente forma de tetrâmero (DUMAS; JOYARD; DOUCE, 1989). Estudos subsequentes revelaram a forma de dímero para a enzima (DUMAS et al., 1992).

Durner et al. (1993) relataram que esta enzima purificada mostrou similaridade tanto na massa molecular quanto na especificidade para os substratos (AL, AHB, e NADPH), como também um pH otimizado entre as espécies de cevada e ervilha. A partir de espinafre KARI mostrou um valor K_m de 5 μ M (DUMAS et al., 1992). Diferentemente, a enzima em bactérias apresentou um K_m de 420 μ M (CHUNDURU; MRACKO; CALVO, 1989).

O gene que codifica para KARI tem sido isolado em plantas e somente um gene por genoma haploide foi encontrado em espinafre e *Arabidopsis* (DUMAS; LEBRUN; DOUCE, 1991; DUMAS et al., 1993; CURIEN; DUMAS; DOUCE, 1993).

Em espinafre foi isolado o cDNA que codifica para a KARI, sendo utilizado para expressar a enzima em *E. coli* (DUMAS et al., 1992).

3.2.6.4 Ácido dihidroxi desidratase

A enzima ácido dihidroxi desidratase (DHAD, EC 4.2.1.9) catalisa a quarta etapa na síntese de isoleucina, que envolve a desidratação e tautomerização de 2,3-dihidroxi metilvalerato para produzir 2-oxo-etilvalerato. A enzima foi purificada e homogeneizada das folhas do espinafre e mostrou ser um dímero com uma subunidade de 62 kDa (Pirrung; Ha; Holmes (1989) e 63 kDa Flint e Emptage (1988)). A DHAD contém um aglomerado de [2Fe-2S], sendo que este aglomerado é uma nova descoberta para as enzimas da classe hidrolase (FLINT; EMPTAGE, 1988). A enzima foi purificada independentemente do espinafre, a qual possui uma subunidade de 62 kDa. Uma série de compostos novos foram desenvolvidos e sintetizados como inibidores potenciais. O 4-fluoro-2,3-ácido dihidroxiisovalérico mostrou ser o mais potente, além de apresentar atividade herbicida (PIRRUNG; HA; HOLMES, 1989). Um mutante da *Datura innoxia*, dependente da isoleucina e valina para o seu crescimento, apresentou uma carência da DHAD (WALLSGROVE et al., 1986b).

3.2.6.5 Aminotransferase

A etapa final da biossíntese da isoleucina é a transaminação de 2-oxo-3-metilvalerato, embora o ácido oxo também possa estar envolvido na síntese de ácidos graxos de cadeia média (KROUMOVA; XIE; WAGNER, 1994). Duas formas de aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (BCAT, EC 2.6.1.42) foram detectadas em cevada Aarnes (1981) e soja Pathre et al. (1987). Na cevada foram observadas duas formas que possui a mesma massa molecular nativa (95 kDa). Já em soja, a massa molecular é de 69 kDa e 93 kDa, enquanto que na cevada usando o glutamato como doador de amino, a utilização comparativa foi de 2-oxoisocaproato>2-oxo-3-metilvalerato>2-oxoisovalerato (WALLSGROVE, 1990).

3.2.7 Metabolismo de lisina

3.2.7.1 Dihidrodipicolinato sintase

A dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) é a primeira enzima do ramo da via do ácido aspártico, cuja função é a síntese de lisina, catalisando a reação de condensação do piruvato e do β -aspartato semialdeído (ASA) para dihidrodipicolinato (BRYAN, 1990; CHESHIRE; MIFLIN, 1975; GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1990). O papel principal da DHDPS é o controle na regulação na síntese de lisina, porque (1) DHDPS é mais sensível à inibição por lisina, e (2) a superprodução de lisina em mutantes de tabaco e milho, expressando uma DHDPS, é insensível à inibição por lisina. Nas plantas transgênicas também expressavam DHDPS insensíveis à inibição por lisina, mostrando aumento no nível de lisina livre.

A DHDPS foi isolada, purificada e caracterizada em várias espécies de plantas, como por exemplo, o milho (CHESHIRE; MIFLIN, 1975; FRISCH et al., 1991), trigo (KUMPAISAL; HASHIMOTO; YAMADA, 1987) espinafre, (WALLSGROVE; MAZELIS, 1981), ervilha (DEREPPE et al., 1992) e tabaco (GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1990).

A molécula da enzima DHDPS é formada por um homotetrâmero, composto por dois dímeros. A estrutura da DHDPS em *Nicotiana sylvestris* foi determinada por cristalografia, na presença de lisina, sendo que a estrutura da enzima sofre um rearranjo desses dímeros que elucidam a forte inibição da atividade desta enzima causada por este aminoácido em plantas (BLICKLING et al., 1997). A DHDPS foi isolada em trigo, milho, *Nicotiana sylvestris* e espinafre, sendo descrita como enzima oligomérica apresentando a respectiva massa molecular de 123 kDa, 130 kDa, 164 kDa e 115 kDa.

Esta enzima apresenta apenas uma forma fortemente sensível à inibição por baixas concentrações de lisina, diferentemente das enzimas AK e HSDH que possuem isoenzimas diferentes. Em estudos cinéticos foi demonstrado que o piruvato se liga alostericamente à enzima, enquanto o aspartato semialdeído se liga de maneira não alostérica (DEREPPE et al., 1992). Em milho, a DHDPS atua através de um mecanismo de pingue-pongue que primeiramente, o piruvato se liga a esta enzima (FRISCH et al., 1991). O valor de K_m de DHDPS para aspartato semialdeído varia entre 0,6 e 1,4 mM entre diferentes espécies (KUMPAISAL; HASHIMOTO; YAMADA, 1987; FRISCHE et al., 1991; DEREPPE et al., 1992). Atividade DHDPS é competitivamente inibida por retroinibição em relação à lisina e aspartato semialdeído (MATTHEWS; WIDHOLM, 1978; WALLSGROVE; MAZELIS, 1981; BRYAN, 1990; DEREPPE et al., 1992). É a etapa principal que controla a regulação da síntese de lisina. Por exemplo, em *Nicotiana*, a lisina inibe fortemente a atividade de DHDPS com um K_i de 15 μ M (NEGRUTIU et al., 1984; GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1995; FRANKARD et al., 1992). Em ervilha a DHDPS é altamente específica para os substratos: piruvato e aspartato- β -semialdeído, cuja atividade cinética, o piruvato e aspartato- β -semialdeído apresentam valores constantes de K_m 1,70 e 0,40 mM, respectivamente (DEREPPE et al., 1992).

Kaneko et al. (1990) demonstraram que os genes que codificam a enzima DHDPS foram isolados pela primeira vez em cultura de células de trigo e posteriormente em espécies como soja Silk et al. (1994), *A. thaliana* Vauterin e Jacobs (1994) e *Coix* Dante et al. (1999). Em milho, com recurso da mutagênese, tornou-se possível alterar um único aminoácido na proteína madura que acarretou importantes alterações na estrutura da enzima, possibilitando a eliminação da sensibilidade da DHDPS à inibição por lisina (SHAVER et al., 1996). Em plantas, um mutante para alta produção de lisina em folhas e sementes de tabaco (*N. sylvestris*) foi obtido por seleção em meio de cultura, contendo o análogo da lisina, o composto S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), como agente seletivo. A sequência de aminoácidos demonstrou que resistência da enzima à inibição por lisina foi perdida como resultado da substituição do aminoácido asparagina por leucina na posição 104 da proteína madura (GHISLAIN; FRANKARD; JACOBS, 1995).

3.2.7.2 Catabolismo de lisina

Apesar de não fazer parte da via metabólica do ácido aspártico, a importância do entendimento da degradação de lisina é tão importante quanto auxiliar no entendimento da

própria síntese de lisina e compreender muitas das estratégias utilizadas para a seleção dos mutantes e plantas transgênicas que foram produzidos nos últimos 10 anos. Esta via foi estudada em plantas, primeiramente em trigo, milho e cevada, através do uso da lisina ^{14}C , com a radioatividade sendo incorporada no ácido α -amino adípico e ácido glutâmico, indicando que este aminoácido é oxidativamente degradado através da sacaropina (LAWRENCE; GRANT, 1964; NIGAM; MACCONNEL, 1963; BRANDT, 1975; MOLLER, 1976; SODEK; WILSON, 1970). As duas enzimas desta via de degradação têm sido estudadas em detalhe em animais e microorganismos e posteriormente em plantas. A lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8; também conhecida como LKR) é a primeira enzima desta via, a qual condensa lisina e 2-oxoglutarato para formar sacaropina, que é hidrolisada em ácido α -amino adípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela enzima sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) (AZEVEDO et al., 1997). Em milho, arroz, feijão, *Coix* e soja, a enzima mostrou ser endosperma-específica e bifuncional com a atividade de LOR e SDH residindo em um mesmo polipeptídeo. Posteriormente foi também demonstrada uma enzima SDH monofuncional, além da presença da enzima bifuncional também em *Arabidopsis* (TANG et al., 1997ab) e canola (FALCO et al., 1995). Já em *A. thaliana* o primeiro gene que codifica a enzima bifuncional LKR-SDH foi clonado (TANG et al., 1997ab) e posteriormente também outras espécies como milho (KEMPER et al., 1999). Em cereais, as enzimas LOR e SDH são específicas do endosperma, mostrando massas moleculares entre 200 e 260 kDa (GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996; GAZIOLA et al., 1997). Atividade cinética para LOR e SDH foi determinada e apresenta K_m de 4,5 mM e 0,032 mM, respectivamente em arroz (GAZIOLA et al., 1997).

A LOR /SDH de mamíferos na forma nativa é um homotetrâmero de 460 kDa, composto de quatro subunidades de 115 kDa Markovitz e Chuang (1987), enquanto a enzima em vegetal é um homodímero de 260 kDa constituída por duas subunidades de 125 kDa (GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996). A LOR e SDH de leveduras e fungos são monômeros de 49 kDa e 73 kDa que são codificados por dois genes separados, *lys1* e *lys9*, respectivamente (RAMOS; DUBOIS; PIÉRARD, 1988; BORELL; URRESTARAZU; BHATTACHARJEE, 1984). A soma dos tamanhos de LOR e SDH em levedura correspondem aos tamanhos dos polipeptídeos bifuncionais de mamíferos e de plantas.

As atividades de LOR e SDH em bovino e milho residem como domínios adjacentes, num polipeptídeo bifuncional (MARKOVITZ; CHUANG, 1987; GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996). A existência de dois domínios covalentemente ligados num polipeptídeo, catalisando passos sequenciais de uma reação, tem muitas vantagens

fisiológicas, por exemplo, a produção de quantidades equimolares dos produtos da tradução. O substrato canalizado permite que o produto da primeira etapa da reação seja direcionado mais rápido para o segundo domínio catalítico, em vez de ser libertado para o meio (TRAUT; JONES, 1977).

Os domínios ativos de LOR e SDH podem ser obtidos por proteólise limitada, o que sugere que os domínios que contêm cada uma das atividades de enzima são independentemente dobrados (MARKOVITZ; CHUANG, 1987; GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996). Esta conformação aparentemente independente pode explicar porque Ca^{2+} ativa o domínio LOR, mas não afeta o domínio da enzima SDH milho. O papel fisiológico da ativação da LOR em milho por Ca^{2+} é desconhecida. Além disso, o efeito de Ca^{2+} na enzima de mamíferos é diferente do observado para a enzima de milho. A LOR / SDH de fígado de rato é induzido por tratamento glucagon (DENTON; McCORMACK, 1985). Embora glucagon seja conhecida por aumentar a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial, Ca^{2+} não afeta a atividade de LOR de fígado bovino e de rato (SCISLOWSKI; FOSTER; FUELLER, 1994).

3.2.8 Regulação da via metabólica do ácido aspártico

Estudos com enzimas do ácido aspártico mostraram evidências diretas de regulação positiva ou negativa por retroinibição em suas etapas chaves (LEA; BLACKWELL; AZEVEDO, 1992; AZEVEDO et al., 1997). Na biossíntese do aminoácido lisina o principal controle é exercido pelas enzimas AK e DHDPS. Estas duas enzimas são inibidas através da retroinibição por lisina. A enzima DHDPS é fundamental na síntese de lisina devido à função de catalisador para a fusão do piruvato e aspartato semialdeído em dihidrodipicolinato, que demonstra o papel chave na regulação nesta ramificação da via. Estudos têm revelado que a DHDPS possui maior sensibilidade à lisina do que a isoenzima monofuncional da AK à inibição por lisina (AZEVEDO et al., 1997).

Pesquisas realizadas com plantas encontraram duas formas das enzimas AK e DHDPS menos sensíveis à inibição por lisina. Este fato confirmou a hipótese da função regulatória sua mais importante no ponto da via catalisada por DHDPS (AZEVEDO et al., 1997; GALILI, 1995). Pelo menos duas isoenzimas distintas da AK podem ocorrer em plantas superiores. Uma isoenzima monofuncional sensível à inibição por lisina que está envolvida na regulação da via pode ser sinergicamente também inibida por SAM (ROGNES; LEA; MIFLIN, 1980).

A outra isoenzima é bifuncional (AK e HSDH) e sensível à inibição por treonina Azevedo et al. (1997) proteína proposta pela primeira vez por Aarnes e Rognes (1974).

Apesar de avanços em estudos bioquímicos, ainda não é muito compreendido o mecanismo envolvido na regulação por retroinibição das enzimas AK e DHDPS em todas as espécies de plantas. Pesquisas com bactérias e fungos mostraram uma sensibilidade de AK e DHDPS para lisina ou treonina, estando associados a pontos chave específicos os quais estes aminoácidos são ligados. Trabalhos com leveduras apontam, por meio de análises genéticas, que a inibição da AK por treonina pode ser mediada pela proteína chaperona FKP12. Dessa forma, foi observada, em mutantes que não codificam a chaperona FKP12 (*fpr1*), uma resistência ao análogo tóxico de treonina, demonstrando, assim, o papel regulatório dessa interação nas propriedades de retroinibição de AK pela treonina (ALARCON; HEITMAN, 1997). Uma segunda abordagem foi demonstrada por McLennan e Masters (1998) em que é apresentada a interação das proteínas chaperonas com as enzimas da via da biossíntese de lisina, sendo mostrado que a DHDPS pode ser modulada através da GroE em *E. coli*. Entretanto, ainda é pouco elucidado se a chaperona afeta de forma direta ou indireta por meio da regulação da expressão do gene *dapA*.

No caso da lisina, o processo de degradação não faz parte da via metabólica do ácido aspártico. Esta rota de degradação é regulada pela ação de duas enzimas, LOR e SDH. Em diversas espécies de plantas foi observado o acúmulo de lisina que expressou uma DHDPS insensível à inibição por lisina, associado à ação da LOR dando origem a uma cascata de sinalização envolvendo então a participação de cálcio e fosforilação-desfosforilação Karchi et al. (1995); Kemper et al. (1998) na regulação da ação da LOR, ou seja, influenciando a regulação da degradação da lisina. Ainda, a regulação da transcrição da enzima LOR/SDH está relacionada com a regulação dos níveis de lisina (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992).

O padrão de atividade de LOR no desenvolvimento de endosperma de milho é coordenado com a taxa de acumulação de zeína (armazenamento de proteínas mais abundante do endosperma) e nitrogênio total (ARRUDA; DA SILVA, 1983; BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992). Além disso, a mutação do *opaco-2*, que reduz a acumulação de polipeptídeos específicos de zeína BURR e BURR (1982); SOAVE et al. (1976), também afeta o catabolismo de lisina. A [¹⁴C]-lisina é degradada em menor nível no mutante *opaco-2* do que no endosperma normal (SODEK; WILSON, 1970). A quantidade de atividade enzimática foi de duas a três vezes mais baixa no mutante do que no endosperma normal (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992). Além disso, o padrão de redução de

LOR foi correlacionado com o padrão de redução na síntese de zeína no endosperma do *opaco-2*. Uma vez que o gene *opaco-2* codifica uma proteína *tbZIP* que regula a transcrição de vários genes de zeína (SCHMIDT et al., 1992; CORD NETO et al., 1995), é possível que o gene LOR poderia também estar sob o controle desse fator de transcrição.

Quando o gene *dAp*, que codifica a DHDPS de *E. coli*, foi expresso em sementes de tabaco, não havia evidência, somente de uma pequena acumulação transitória de lisina no desenvolvimento da semente (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994). Este aumento transitório na lisina foi relacionado com um aumento da atividade de LOR nas sementes das plantas transgênicas (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994). Atividade de LOR também pode ser aumentada em plantas de tipo selvagem através da aplicação de lisina na vagem em desenvolvimento. Nas folhas de tabaco, em que a lisina pode acumular em concentrações muito elevadas Shaul e Galili (1992a); Shaul e Galili (1992b), a atividade de LOR não pôde ser detectada nas plantas controle ou transgênicas (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994). Nas experiências de Falco et al. (1995), a concentração elevada de lisina foi obtida nas sementes de soja e canola transgênica, expressando o gene *C. glutamicum*. Embora a atividade de LOR não tenha sido medida nessas plantas, evidência do catabolismo da lisina foi obtida nas mesmas. A canola transgênica acumulou o ácido α -aminoadípico, enquanto a soja acumulou sacaropina. As diferenças no catabolismo de lisina entre as duas espécies não está elucidadas.

Os dados apresentados acima indicam um aumento no *pool* de lisina solúvel nas sementes das plantas, podendo aumentar a atividade das enzimas envolvidas na via catabólica. É possível que esta indução de lisina dependente de LOR-SDH seja mediada por íons Ca^{2+} . No milho, a indução da lisina dependente de LOR-SDH pode ser explicada pela presença de concentrações relativamente elevadas de lisina livre translocadas de outros tecidos para o endosperma em desenvolvimento (ARRUDA; SILVA, 1979). As zeínas, que são proteínas mais abundantes acumuladas no endosperma, são desprovidas de resíduos de lisina, e a demanda desse aminoácido no desenvolvimento do endosperma seria muito baixa. Considerando que a síntese e a translocação dariam mais lisina que o necessário, o excesso de lisina poderia servir para indução de LOR-SDH. Assim, a atividade mais baixa de LOR-SDH pode ser responsável pelo elevado teor de lisina no endosperma do *opaco-2*.

3.2.9 Mutantes bioquímicos

O mutante *opaco-2* (*o2*) em milho foi descoberto em 1963, gerando uma grande expectativa entre os pesquisadores da época como sendo a solução do problema da baixa

qualidade nutricional do grão de milho. No entanto, após este período houve um período de decepção, pois apesar de aumentar o valor nutricional do grão, este mutante tinha associado ao aumento da lisina e triptofano características agrônômicas indesejáveis, como por exemplo, a queda de produção, aspecto farináceo dos grãos e alta suscetibilidade a patógenos (MERTZ; NELSON; BATES, 1964).

Logo após, outros mutantes como *floury-2* foram isolados com características semelhantes ao *opaco-2* Mertz; Nelson; Bates (1964), além do *hiproly* de cevada também com alta lisina (MUNCK et al., 1970). A partir disso, a seleção de mutantes foi apresentada como uma ferramenta importante na melhoria da qualidade nutricional de plantas (GREEN; PHILLIPS, 1974; MIFLIN et al., 1982). Foram isolados diversos mutantes por meio da técnica de cultura de tecidos, que revelaram padrões alterados de regulação de enzimas que são menos sensíveis ou insensíveis à retroinibição ao produto final ou análogo aos aminoácidos (AZEVEDO et al., 1997). Na caracterização bioquímica dos mutantes de cevada foi demonstrada uma ligação em relação às propriedades metabólicas de duas isoenzimas da AK, que seria uma resistente à lisina e a outra à treonina nos respectivos mutantes selecionados R3004, R2501 e R3202 apresentando padrões diferentes de inibição (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982). No mutante R3004, a AKIII era menos insensível à inibição por lisina enquanto AKII era insensível à inibição por lisina no R2502 e R3202 (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982; ARRUDA et al., 1984; ROGNES; BRIGHT; MIFLIN, 1983). As mutações levaram à superprodução de treonina e, em menor quantidade na concentração de lisina. A análise genética mostrou que os dois genes denominados *Itr1* e *Itr2* são locos estruturais para AKII e AKIII (BRIGHT; MIFLIN; ROGNES, 1982).

Em milho foram selecionados os mutantes dominantes LT19 e LT20 Hibberd e Green (1982) responsáveis pela superprodução de treonina e serina (HIBBERD; GREEN, 1982; DIEDRICK; FRISCH; GENGEBACH, 1990). Os genes *ask1* e *ask2* são, respectivamente, os genes alterados nos mutantes LT29 e LT20 da AK de milho, os quais foram mutados para as isoenzimas da AK sensíveis à lisina, tornando-as insensíveis à inibição pela lisina (DOTSON et al., 1990). Uma análise dos mutantes duplos LT19/*opaque-2* mostrou que o gene *ask1* pode regular o gene *opaque-2* na síntese de aminoácidos e também na síntese de proteínas do endosperma do milho (AZEVEDO; ARANA; ARRUDA, 1990).

Em *Arabidopsis thaliana*, dois mutantes resistentes à lisina mais treonina (RLT 40 e RL 4) também acumularam treonina de 4 e 8 vezes mais, respectivamente. Estes mutantes, assim como aqueles de milho, mostraram AK insensível à retroinibição causada pela lisina (HEREMANS; JACOBS, 1994; HEREMANS; JACOBS, 1995). Um fato interessante é que a

regulação da síntese de treonina em *Arabidopsis thaliana* apresenta atividade menor do que em outras espécies de plantas (TZCHORI; PERL; GALILI, 1996).

3.3 Conclusões parciais

- Por meio da caracterização bioquímica em plantas e microorganismos foi descrito que a enzima aspartato quinase (AK) exerce um controle sobre via do ácido aspártico.

- A enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) é o ponto chave para a regulação da síntese de lisina;

- A utilização de mutantes contribuiu de forma significativa para a compreensão dos fatores de regulação da via do ácido aspártico.

Referências

AARNES, H. Branched-chain amino-acid aminotransferase in barley seedlings. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.102, n.1, p.81, 1981.

AARNES, H. Homoserine kinase from barley seedlings. **Plant Science Letters**, Dordrech, v.7, n.3, p.187, 1976.

AARNES, H.; ROGNES, S.E. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 2717-2724, 1974.

AHRENS, W.H.; EDWARDS, M.T. **Herbicide handbook**. 7th ed. Champaign: Weed Science Society of America, 1994. 352p.

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.

ARRUDA, P.; Da SILVA, W.J. Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize: its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.2, p.2687, 1983.

ARRUDA, P.; SILVA, W.J. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. **Phytochemistry**, Oxford, v.18, n.3, p. 409, 1979.

ARRUDA, P.; BRIGHT, S.W.J.; KUEH, J.S.H.; LEA, P.J.; ROGNES, S.E. Threonine. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, n.2, p.442-446, 1984.

- 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.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, p.3735-3737, 1992a.
- AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, New York, v.31, n.11, p.3731-3734, 1992b.
- AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.46, p.395-419, 1997.
- AZEVEDO, R.A.; BLACKWELL, R.D.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Three aspartate kinase isoenzymes from maize. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, n.11, p.3725-3730, 1992.
- 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.
- BORELL, C.W.; URRESTARAZU, L.A.; BHATTACHARJEE, J.K. Two unlinked lysine genes (LYS9 and LYS14) are required for the synthesis of saccharopine reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.159, n.1, p.429, 1984.
- BRANDT, A.B. In vivo incorporation of lysine-C14 into the endosperm of wild type and high lysine barley. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 288-291, 1975.
- BRENNECKE, K.A.; SOUZA NETO, J.A.; LUGLI, J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *Opaque-2*. **Phytochemistry**, Oxford, v.41, n. 1, 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.
- BRIGHT, S.W.J.; SHEWRY, P.R. Improvement of protein-quality in cereals. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.1, n.1, p.49-93, 1983.
- BROCHETTO-BRAGA, M.R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1139-1147, 1992.
- BRYAN, J.K. Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In: MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1990. v.16, chap.5. p. 161-195.

BRYAN, J.K. Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In: MIFFLIN, B. J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v.5. chap. 11, p.403.

BRYAN, P.A.; CAWLEY, R.D.; BRUNNER, C.E.; BRYAN, J.K. Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 41, p. 1211-1217, 1970.

BURR, F.A.; BURR, B. Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: a comparison of zein polypeptides, in vitro synthesis and processing, mRNA levels, and genomic organization. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 94, n.1, p.201, 1982.

CHEN, N.Y.; JIANG, S.W.; KLEIN, D.A.; PAULUS, H. Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 13, p. 9448, 1993.

CHESHIRE, R.M.; MIFLIN, B.J. Control of lysine biosynthesis in maize. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 695-698, 1975.

CHUNDURU, S.K.; MRACHKO, G.T.; CALVO, K.C. Mechanism of ketol acid reductoisomerase. Steady-state analysis and metal ion requirement. **Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 486-493, 1989.

CHUNDURU, S.K.; MRACHKO, G.T.; CALVO, K.C. Mechanism studies of ketol acid reductoisomerase from *Escherichia coli* **Biochemistry**, Washington, v. 29, n. 8, p. 2194-2195, 1990.

CLEPET, C.; BOURNE, F.; KRISHNAPILLAI, V.; BAIRD, C.; PATTE, J.C.; CAMI, B. Isolation, organization and expression of the *Pseudomonas aeruginosa* threonine genes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 21, p. 3109-3119, 1992.

COLAU, D.; NEGRUTIU, I.; Van MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J.P. Complementation of a threonine dehydratase deficient *Nicotiana plumbaginifolia* mutant after *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of the *Saccharomyces cerevisiae* ILV1 gene. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 7, n.7, p. 2552-2557, 1987.

CORD NETO, G.; YUNES, J.A. VETTORE, A.L.; Da SILVA, M.J.; ARRUDA, P.; LEITE, A. The involvement of *Opaque 2* on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, n. 5, p. 1015, 1995.

COSSINS, E.A. One-carbon metabolism. In: DAVIES, D.D. **The Biochemistry of Plants**, New York: Academic Press, 1980. v. 2. chap. 9. p. 365-418.

CURIEN, G.; DUMAS, R.; DOUCE, R. Nucleotide sequence and characterization of a cDNA encoding the acetohydroxy acid isomeroreductase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, n. 4, p. 717-722, 1993

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.

DENTON, R.M.; MCCORMACK, J.G. Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 249, n. 6, p. E543-554, 1985.

DEREPPE, C.; BOLD, G.; GHISALBA, O.; EBERT, E.; SCHAR, H.P. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 813-821, 1992.

DIEDRICK, T.J.; FRISCH, D.A.; GENGENBACH, B. G. Tissue-culture isolation of a 2nd mutant locus for increased threonine accumulation in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 79, n. 2, p. 209-215, 1990.

DODD, W.A.; COSSINS, E.A. Homocysteine-dependent transmethyases catalyzing the synthesis of methionine in germinating pea seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 201, n. 3, p. 461-470, 1970.

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

DOTSON, S.B.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Lysine-insensitive aspartate kinase in two threonine-overproducing mutants of maize. **Planta**, Berlin, v. 182, n. 4, p. 546, 1990.

DROUX, M.; RAVANEL, S.; DOUCE, R. Methionine biosynthesis in plants. II Purification and characterization of cystathionine β -lyase from spinach chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.316, p. 585-595, 1995.

DUMAS, R.; LEBRUN, M.; DOUCE, R. Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts. **Biochemistry Journal**, New York, v. 277, p. 469-475, 1991.

DUMAS, R.; JOYARD, J.; DOUCE, R. Purification and characterization of acetohydroxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts. **Biochemistry Journal**, New York, v. 262, n. 3, p. 971-976, 1989.

DUMAS, R.; CURIEN, G.; DEROSE, R.T.; DOUCE, R. Branched-chain amino acid biosynthesis in plants – molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). **Biochemistry Journal**, New York, v. 294, n. 3, p. 821-828, 1993.

DUMAS, R.; CORNILLON-BERTHAND, C.; GUIGUE JALET, P.; GENI, P.; DOUCE, R.; JOB, D. Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroreductase with reaction intermediate analogues: correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects. **Biochemistry Journal**, New York, v.301, n.3, p.813-820, 1994.

DUMAS, R.; JOB, D.; ORTHOLAND, J-Y.; EMERIC, G.; GREINER, A.; DOUCE, R. Isolation and kinetic properties of acetohydroxy acid isomeroreductase from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts overexpressed in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, London, v. 288, n. 3, p. 865-874, 1992.

DURNER, J.; KNORZER, O.C.; BOGER, P. Ketol-acid reductoisomerase from barley (*Hordeum vulgare*) – purification, properties, and specific inhibition. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.903–910, 1993.

DURNER, J.; WEI, B.P.; KNORZER, O.; BOGER, P. Ketol-acid reductoisomerase from plants: extraction and enzymatic assay. In: BOGER, P.; SANDMANN, G. **Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds**. Lewis: Boca Raton, 1993. p.137-141.

EBERLEIN, C.; GUTTIERE, M.J.; THILL, D.C.; BAERG, R.J. Altered acetolactate synthase activity in ALS - inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, Champaign, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.

EICHEL, J.; GONZÁLEZ, J.C.; HOTZE, M.; MATTHEWS, R.G.; SCHRÖDER, J. Vitamin-B12 independent methionine synthase from higher plant (*Catheranthus roseus*). Molecular characterisation, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 230, n. 3, p. 1053-1058, 1995.

ENDRIZZI, J.E.; TURCOTTE, E.L.; KOHEL, R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. **Advances in Genetics**, New York, v. 23, p. 271–375, 1985.

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

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; FEDEC, P.; COSSINS, E. A. Effects of gibberellic acid and L-methionine on C₁ metabolism in aerated carrot disk. **Phytochemistry**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 819-1823, 1976.

FLINT, D.H.; EMPTAGE, M.H. Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 263, n. 8, p. 3558-3564, 1988.

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**, Rockville, v. 96, p. 444-452, 1991.

FULLER, M.F.; MENNIE, I.; CROFTS, R.M.J. Amino-acid supplementation of barley for the growing-pig 2 optimal addition of lysine and threonine for growth. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.41, n.2, p.333-340, 1979.

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

GATEL, F. Protein-quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.45, n.3/4, p. 317-348, 1994.

GAZIOLA, S.A.; TEIXEIRA, C.M.G.; LUGLI, J.; SODEK, L.; AZEVEDO, R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds: Isolation, characterization and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 247, p. 364-371, 1997.

GEBHARDT, J.S.; WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.F. Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene family in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, n.1, p. 69-69, 1993.

GENGENBACH, B.G.; WALTER, T.J.; GREEN, C.E.; HIBBERD, K.A. Feedback regulation of lysine, threonine, and methionine biosynthetic enzymes in corn. **Crop Science**, Madison, v.18, p.472-476, 1978.

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.

GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H.; DATKO, A.H. Regulatory structure of the biosynthetic pathway for the aspartate family of amino-acids in *Lemna paucicostata* Hegelm 6746, with special reference to the role of asparto kinase **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n.4, p. 1584-1599, 1989.

GIOVANELLI, J.; VELUTHAMBI, K.; THOMPSON, G. A.; MUDD, S. H.; DATKO, A. H. Threonine synthase of *Lemna paucicostata* Hegelm 6746. **Plant Physiology**, Rockville, v.76, n.2, p.285-292, 1984.

GONÇALVES-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**, Rockville, v. 110, p. 765-771, 1996.

GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Potential selection system for mutants with increased lysine, threonine and methionine in cereal crops. **Crop Science**, Madison, v.14, n.6, p.827-830, 1974.

HAZIZA, C.; STRAGIER, P.; PATTE, J.C. Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal. **Embo Journal**, Oxford, v.1, n.3, p.379-384, 1982.

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

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.

HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: **Herbicide action course, West Lafayette. Summary of lectures**. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.

HIBBERD, K.A; GREEN, C.E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Biological Sciences**, Washington, v.79, n.2, p. 559-563, 1982.

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.

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.

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.

KARSTEN, W.E.; VIOLA, R.E. Identification of an essential cysteine in the reaction catalyzed by aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta G: General Subjects**, Amsterdam, v.1121, n.1/2, p.234-238, 1992.

KEELER, S.J.; SANDERS, P.; SMITH, J.K.; MAZUR, B.J. Regulation of Tobacco Acetolactate Synthase Gene Expression. **Plant Physiology**, Rockville, v.102, n.3, p.1009-1018, 1993.

KEITH, C.S.; HOANG, D.O.; BARRETT, B.M.; FEIGELMAN, B.; NELSON, M.C.; THAI, H.; BAYSDORFER, C. Partial sequence analysis of 130 randomly selected maize cDNA clone. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.329-332, 1993.

KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; CAPELLA, A.N.; GONCALVES-BUTRUILE, M.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P. Structure and regulation of the bifunctional enzyme-lysineoxoglutarate 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. **Plant Cell**, Rockville, v.11, p.1981-1993, 1999.

KRISHNASWAMY, S.; BRYAN, J.K. Use of monoclonal antibodies for the purification and characterization of the threonine-sensitive isozyme of maize homoserine dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.246, n.1, p.250-262, 1986.

KROUMOVA, A.B.; XIE, Z.; WAGNER, G.J. A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, n.24, p.11437, 1994.

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

LA ROSSA, R.A.; VAN DYK, T.K.; SMULSKI, D.R. Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.1372-1378, 1987.

LAWRENCE, J.M.; GRANT, D.R. Incorporation of lysine- C^{14} into the developing grain of wheat. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.104, n.1, p.73, 1964.

LE, Y.Z.; HE, J.Y.; VINING, C. *Streptomyces akiyoshiensis* differs from other gram-positive bacteria in the organization of a core biosynthetic-pathway gene for aspartate family amino-acids. **Microbiology**, London, v.142, n.4, p.791, 1996.

LEA, P. J.; BLACKWELL, R.D.; AZEVEDO, R.A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In, SHEWRY, P.R. **Barley, genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International. 1992. p.181-208.

LEA, P. J.; MILLS, W.R.; MIFLIN, B.J. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. **Febs Letters**, Amsterdam, v.98, p.165-168, 1979.

LEE, M.; LEUSTEK, T. Identification of the gene encoding Homoserine Kinase from *Arabidopsis thaliana* and characterization of the recombinant enzyme derived from the gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.372, p.135-142, 1999.

LUGLI, J.; AZEVEDO, R.A. Partial purification of aspartate kinase from *Coix lacryma-jobi*. In: Annual Meeting of the Society for Experimental Biology, Swansea. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.58, 1994.

MADISON, J.T. Sulfur metabolism. F. Enzymes involved in the synthesis of methionine. In: LEA, P. J. **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1990. v.3. p.361–369.

MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. Threonine synthase from higher plants: stimulation by S-adenosylmethionine and inhibition by cysteine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.71, n. 2, p.684–691, 1976.

MANNHAUPT, G.; POHLENZ, H-D.; SEEFLUTH, A.K.; PILZ, U.; FELDMANN, H. Yeast homoserine kinase. Characteristics of the corresponding gene, THR1, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of threonine metabolism. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.191, p.115-122, 1990.

MARKOVITZ, P.J.; CHUANG, D.T. The bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase in lysine degradation. Separation of reductase and dehydrogenase domains by limited proteolysis and column chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.262, n.19, p.9353-9358, 1987.

MATTHEWS, B.F.; WIDHOLM, J.M. Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. **Planta**, Berlin, v.141, n.3, p.315-321, 1978.

MATTHEWS, B. Lysine, threonine and methionine biosynthesis. In: SINGH, B.K. **Plant amino acids**. New York: Marcel Dekker. 1999. p.205–225.

MATTHEWS, B.F.; WIDHOLM, J.M. Expression of aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthase and homoserine dehydrogenase during growth of carrot cell suspension cultures on lysine and threonine supplemented media. **Zeitschrift Naturforsch**, Wiesbaden, v. 34, n. 12, p.1177-1185, 1979.

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

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

MIFLIN, B.J. Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthase by leucine, isoleucine, and valine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.146, n. 2, p. 542-550, 1971.

MIFLIN, B.J. The Location of Nitrite Reductase and Other Enzymes Related to Amino Acid Biosynthesis in the Plastids of Root and Leaves, **Plant Physiology**, Rockville, v.54, n.4, p.550-555, 1974.

MIFLIN, B.J.; CAVE, P.R. The control of leucine, isoleucine and valine biosynthesis in a range of higher plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.23, n.75, p.511-516, 1972.

MIFLIN, B.J.; BRIGHT, S.W.J.; ROGNES, S.E.; KUEH, J.S.H. Amino acids, nutrition and stress: the role of biochemical mutants in solving problems of crop quality. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. **Genetic engineering of plants: an agricultural perspective**. New York: Plenum Press, 1982. p.391-414.

MILLS, W.R.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Photosynthetic Formation of the Aspartate Family of Amino Acids in Isolated Chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 6, p. 1166-1172, 1980.

MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.58, n. 2, p.249-260, 1999.

MITCHELL, A.D.; BENEVENGA, N.J. Role of transamination in methionine oxidation in rat. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.108, n.1, p.67-78, 1978.

MIYAJIMA, R.; SHIIO, I. Regulation of Aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.71, n. 2, p.219-226, 1972.

MOLLER, B. L. Lysine catabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.57, n.5, p.687-692, 1976.

MUEHLBAUER, G.J.; GENGENBACH, B.G.; SOMERS, D.A.; DONOVAN, C.M. Genetic and amino acid analysis of two maize threonine overproducing, lysine-insensitive aspartate kinase mutants. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.89, n. 6, p.767-774, 1994.

MUHITCH, M.J.; WILSON, K.G. Chloroplast are the subcellular location of both soluble and membrane-associated homoserine kinases in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Germany, v.110, p.39-46, 1983.

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.

NEGRUTIU, I.; CATTOIRREYNEARTS, A.; VERBRUGGEN, I.; JACOBS, M. Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana glauca* (Spegazzini and Comes). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 68, n.1/2, p. 11-20, 1984.

NEGRUTIU, I.; De BROUWER, D.; DIRKS, R.; JACOBS, M. Amino acid auxotrophs from protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Molecular & General Genetics**, Viviani, v.199, n.2, p.330-337, 1985.

NELSON, O.E.; MERTZ, E.T.; BATES, L.S. Second mutant gene affecting amino acid pattern of maize endosperm proteins. **Science**, Washington, v.150, n. 3702, p.1469-1470, 1965.

NIGAM, S.N.; McCONNELL, W.B. Studies on wheat plants using carbon-14 compounds 19 observations on metabolism of lysine-c14. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.41, n.6, p.1367, 1963.

ORTEGA, E.I.; BATES, L.S. Biochemical and agronomic studies of two modified hard endosperm opaque-2 maize (*Zea mays* L.) populations. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.60, n.2, p.107-111, 1983.

OUELLET, T.; RUTLEDGE, R.G.; MIKI, B.L. Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. **The Plant Journal**, Oxford, v.2, n.3, p.321-330, 1992.

PATHRE, U.; SINGH, A.K.; VISWANATHAN, P.N.; SANE, P.V. Purification and properties of leucine aminotransferase from soybean seedlings. **Phytochemistry**, New York, v.26, n.11, p.2913-2917, 1987.

PIRRUNG, M.C.; HA, H.J.; HOLMES, C.P. Purification and inhibition of spinach a,b-dihydroxyacid dehydratase. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v.54, n. 7, p.1543-1548, 1989.

RAMOS, F.; DUBOIS, E.; PIÉRARD, A. Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.171, n.1/2, p.171-176, 1988.

RAVANEL, S.; RUFFET, M.L.; DOUCE, R. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cystathionine β -lyase by functional complementation in *Escherichia coli*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.29, n.4, p.875-882, 1995a.

RAVANEL, S.; DROUX, M.; DOUCE, R. Methionine biosynthesis in higher plants. I. Purification and characterisation of α -cystathionine synthase from spinach chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.316, p.572-584, 1995b.

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.

RELTON, J.M.; WALLSGROVE, R.M.; BOURGIN, J.P.; BRIGHT, S.W.J. Altered feedback sensitivity of acetohydroxyacid synthase from valine resistant mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Planta**, New York, v.169, n.1, p.45-50, 1986.

RIESMEIER, J.; KLONUS, A.K.; PHOLENZ, H.D. Purification to homogeneity and characterization of Homoserine Kinase from wheat germ. **Phytochemistry**, Oxford, v.32, n. 3, 581-584, 1993.

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.

ROGNES, S.E.; BRIGHT, S.W.J.; MIFLIN, B.J. Feedback-insensitive aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to lysine plus threonine. **Planta**, New York, v.157, n. 1, p.32-38, 1983.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D. C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. **Herbicide Resistance in Plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, p.83-140. 1994.

SAKANO, K.; KOMAMINE, A. Change in the proportion of two asparto kinases in carrot root tissue in response to *in vitro* culture. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, n.1, p.115-118, 1978.

SCHLOSS, J.V. Acetolactate synthase, mechanism of action and herbicide binding-site. **Pesticide Science**, Oxford, v.29, n.3, p.283-292, 1990.

SCHLOSS, J.V.; AULABAUGH, A. Acetolactate synthase and ketol-acid reducto isomerase: a search for a reason and a reason for a search. In: BARAK, D.C.Z.; CHIPMAN, D.M.; SCHLOSS, J.V. **Biosynthesis of branched chain amino acids**, Weinheim: VCH, 1990. p. 329-356.

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. **Plant Cell**, Rockville, v.4, n.6, p.689-700, 1992.

SCHMITT, G.K.; SINGH, B.K. Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of lima bean. **Pesticide Science**, Oxford, v.30, p.418-419, 1990.

SCHULTES, N.P.; ELLINGTON, A.D.; CHERRY, J.M.; SZOSTAK, J.W. *Saccharomyces cerevisiae* homoserine kinase is homologous to prokaryotic homoserine kinases. **Gene**, Amsterdam, v.96, n.2, p.117-180, 1990.

SCISLOWSKI, P.W.D.; FOSTER, A.R.; FULLER, M.F. Regulation of oxidative-degradation of L-lysine in rat-liver mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v. 300, pt. 3, p.887-891, 1994.

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

SHAUL, O.; GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, Rockville, 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.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins - structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.945-956, 1995.

SIDOROV, V.; MENCZEL, L.; MALIGA, P. Isoleucine requiring Nicotiana plant deficient in threonine deaminase. **Nature**, London, v.294, p.8788, 1981.

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.

SINGH, B.K. Biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine. In: SINGH, B. K. (Ed.). **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Academic Press, 1999. chap.3, p.227-247.

SINGH, B.K.; NEWHOUSE, K.E.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Acetohydroxyacid synthase-imidazolinone interaction. In: BARAK, Z. D.M. CHIPMAN, D.M.; SCHLOSS, J. V. (Ed.). **Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids**. Weinheim: VCH, 1990. p.357-372.

SINGH, B.K.; SCHMITT, G.K. Flavin adenine-dinucleotide causes oligomerization of acetohydroxyacid synthase from black mexican sweet corn cells. **Febs Letters**, Amsterdam, v.258, n.1, p.113-115, 1989.

SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Separation and characterization of two forms of acetohydroxyacid synthase from black mexican sweet corn cells. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.444, p.251-261, 1988.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n.4, p. 1571-1575, 1997.

SOAVE, C.; RIGHETTI, P.G.; LORENZONI, C.; GENTINETTA, E.; SALAMINI, F. Expressivity of the *opaque-2* gene at the level of zein molecular components. **Maydica**, Bergamo, v.21, n.2, p.61-75, 1976.

SODEK, L.; WILSON, C.M. Incorporation of leucine-C14 into protein in the developing 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 aspartate kinase activity in *Escherichia coli*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.94, n.3, p.952, 1961.

STATON, A.L.; MAZELIS, M. The C-S lyases of higher plants: homogeneous β -cystathionase of spinach leaves. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.290, n.1, p.46-50, 1991.

STIDHAM, M.A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. **Weed Science**, Urbana, v.39, n.3, p.428-434, 1991.

STIDHAM, M.A.; SINGH, B.K. Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In: SHANER, D.L.; O'CONNOR, S.L. (Ed.). **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.71-90.

STIPANUK, M.H. Metabolism of the sulfur-containing amino acids. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.6, p.179-209, 1986.

SWEESTER, P.B.; SCHOW, G.S.; HUTCHISON, J.M. Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Duluth, v.17, n. 1, p.18-23, 1982.

TABE, L.; HIGGINS, T.J.V. Engineering plant protein composition for improved nutrition. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.3, n.7, p.282-286, 1998.

TABE, L.M.; HIGGINS, C.M.; MCNABB, W.C.; HIGGINS, T.J.V. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. **Genetica**, Dordrecht, v.90, n.2/3, p.181-200, 1993.

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, 1997a.

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

THÉZE, J.; KLEIDMAN, L.; GIRON, S. Homoserine Kinase from *Escherichia coli* K-12: Properties, inhibition by L-Threonine, and regulation of biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.118, n. 12, p.577-581, 1974.

THOEN, A.; ROGNES, S.E.; ARNES, H.A. Biosynthesis of Threonine from Homoserine in Pea seedlings: II Threonine Synthase. **Plant Science Letters**, Clare, v.13, n. 2, p.113-119, 1978.

TRAUT, T.W.; JONES, M.E. Kinetic and conformational studies of the orotate phosphoribosyltransferase: orotidine-5'-phosphate decarboxylase enzyme complex from mouse Ehrlich ascites cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.252, n.21, p.8374-8381, 1977.

TZCHORI, I.B.T.; PERL, A.; GALILI, G. Lysine and threonine metabolism are subject to complex patterns of regulation in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.32, n.4, p.727-734, 1996.

UMBARGER, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, New York, v. 47, p. 533-606, 1978.

VASAL, S.K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, W.G.; PHILLIPS, R.H. (Ed.). **Improvement of quality traits of maize grain and silage use**. London, Martinus Nijhoff, 1980. p.37-73.

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.

VILLEGAS, E.; VASAL, S.K.; BJARNASON, M. Quality protein maize: what is it and how was it developed? In: National Research council. **Quality protein maize**. Washington: Academy Press, 1992. 90p.

WALLSGROVE, R.M. Enzymes of primary metabolism. In: LEA, P.J. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1990. v. 3. p.325-333.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase – partial purification and characterization. **Phytochemistry**, Oxford, v. 20, p. 2651-2655, 1981.

WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n.4, p.780-784, 1983.

WALLSGROVE, R.; RISOTT, R.; NEGRUTIU, I.; BRIGHT, S. Biochemical characterization of *Nicotiana plumbaginifolia* auxotrophs that required branched chain amino acids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.3, n. 3, p.223-226, 1986a.

WALLSGROVE, R.M.; RISIOTT, R.; KING, J.; BRIGHT, S. W. J. Biochemical characterisation of an auxotroph of *Datura innoxia* requiring isoleucine and valine. **Plant Science**, Limerick, v.43, n.2, p.109-114, 1986b.

WALTER, T.J.; CONNELLY, J.A.; GENGENBACH, B.G.; WOLF, F. Isolation and characterization of two homoserine dehydrogenases from maize suspension cultures. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 254, n. 4, p. 1349-1355, 1979.

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.

WILSON, B.J.; GRAY, A.C.; MATTHEWS, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities **Plant Physiology**, Rockville, v. 7, n. 4, p.1323-1328, 1991.

4 ESTUDO DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO ASPÁRTICO NO PERÍODO DE 1970 A 2006

Resumo

O ácido aspártico é o precursor comum dos aminoácidos essenciais lisina, metionina, treonina e isoleucina em plantas superiores. Os aminoácidos são sintetizados nas plantas através de complexas vias metabólicas que são controladas por enzimas, intermediários, substratos e aminoácidos. Os cereais são a fonte de proteína vegetal mais consumida em todo o mundo, os quais representam aproximadamente 50%. Contudo as sementes deste grupo vegetal são nutricionalmente deficientes em aminoácidos essenciais como lisina, treonina e triptofano, uma situação que despertou aos pesquisadores o interesse de melhorar o valor nutritivo das sementes dos cereais. Outro interesse nesta via seria os precursores que ela fornece para a biossíntese de outros metabólitos essenciais, por exemplo, *S*-adenosilmetionina (SAM) e etileno para as plantas. Pesquisas com cereais e leguminosas apontam que é possível ser alterada a regulação da via do ácido aspártico, a fim de aumentar a concentração de determinados aminoácidos.

Palavras-chave: Ácido aspártico; Aminoácidos; Cereais; *S*-adenosilmetionina; Etileno

Abstract

Aspartate is the common precursor of the essential amino acids lysine, threonine, methionine and isoleucine in high plants. Amino acids are synthesized in plants through many complex metabolic pathways that are controlled by enzymes, intermediates, substrates, and amino acids. Cereals are the source of vegetable protein. It is the most consumed food worldwide and represents around 50% of consumption, even though seeds lack essential amino acids such as lysine, threonine, and tryptophan. For that reason, researchers have been developing ways of improving the nutritional value in cereals. Also, another aspect is related to the pathway responsible for other essential metabolic in plants such as *S*-adenosylmethionine and ethylene. Researches in cereals and leguminous plants have demonstrated the possibility of modifying the aspartate metabolic pathway in order to increase the concentration of some specific amino acids.

Keywords: Aspartate; Amino acids; Cereals; *S*-adenosylmethionine; Ethylene

4.1 Introdução

Os aminoácidos são os principais constituintes das proteínas Medici et al. (2004a e b) e desempenham uma função importante de transportadores de nitrogênio para a planta Azevedo; Lancien; Lea (2006); Todd e Polacco (2006), podendo ser ainda, sintetizados em resposta ao estresse, com a possibilidade de que alguns desses aminoácidos venham atuar como agentes inseticidas e fungicidas (LEA; AZEVEDO, 2003). Exercem ainda um papel de grande importância na área de nutrição, medicina e agricultura. São também atuantes como intermediários em vias metabólicas, tais como, ornitina, homoserina e cistationina

(FERREIRA et al., 2005). Os aminoácidos são sintetizados nas plantas através de complexas vias metabólicas que são controladas por enzimas, intermediários, substratos e aminoácidos (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Dentre os vinte aminoácidos que constituem as proteínas, nove são considerados essenciais, pois não são sintetizados por humanos e animais monogástricos, sendo então adquiridos por meio da alimentação Fornazier et al. (2005). Do ponto de vista nutricional, a qualidade proteica está relacionada à composição e à metabolização dos aminoácidos essenciais que compõem determinada proteína (FERREIRA et al., 2005).

Estudos relatados por Ferreira et al. (2005) mostraram que a desnutrição é um dos problemas que mais atinge a maioria da população mundial. Cerca de 30% das pessoas dos países em desenvolvimento sofrem de algum tipo de desnutrição, contudo as deficiências protéicas são as que causam maiores danos ao organismo.

Os cereais são a fonte de proteína vegetal mais consumida em todo o mundo, os quais representam aproximadamente 50%, contudo as sementes deste grupo vegetal são nutricionalmente deficientes em aminoácidos essenciais como lisina, treonina e triptofano Helm et al. (2004), uma situação que despertou aos pesquisadores o interesse de melhorar o valor nutritivo das sementes dos cereais.

Dos aminoácidos essenciais, quatro: lisina, metionina, treonina e isoleucina, são sintetizados através de uma via fortemente regulada, a via do aspartato (LEFÈVRE et al., 2002; TORO et al., 2003). Podendo ser uma forma de melhorar a qualidade nutricional, a biossíntese dos aminoácidos derivados do aspartato tem sido extensivamente estudada. Outro interesse nesta via seria nos precursores que ela fornece para a biossíntese de outros metabólitos essenciais, por exemplo, *S*-adenosilmetionina e etileno para as plantas (JOSHI et al., 2006).

Sendo assim, pesquisadores de vários países têm realizado estudos bioquímicos, genéticos e moleculares que têm proporcionado identificação de determinados mecanismos que estão envolvidos na regulação da via metabólica do ácido aspártico, os quais comprovaram que várias enzimas são reguladas por retroinibição pelos aminoácidos produtos finais ou seus análogos (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Segundo Azevedo, Lancien e Lea (2006) as enzimas AK, DHDPS e LKR-SDH são de grande importância para o acúmulo de lisina em sementes, por este motivo, foram empregadas diferentes estratégias para o estudo da via metabólica do ácido aspártico. Estas abordagens

apresentam o uso de mutantes bioquímicos, plantas transgênicas e mutantes naturais da série *opaco (o)* e *floury (fl)* (AZEVEDO, 2002).

4.2 Revisão bibliográfica

4.2.1 A via metabólica do ácido aspártico

O aspartato é o precursor da via metabólica do ácido aspártico (Figura 1). A sua formação é por meio do processo de transaminação do ácido oxaloacético, provindo do ciclo de Krebs ou do citoplasma pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (LEA et al., 2001; FERREIRA et al., 2005). Essa via leva à biossíntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO, 2002). Estudos apontam que as enzimas envolvidas na síntese dos aminoácidos derivados da via do ácido aspártico são encontradas nos cloroplastos das folhas ou nos plastídeos de órgãos não fotossintéticos, por exemplo, sementes e raízes (LEA; AZEVEDO, 2003).

Conforme descrito no capítulo 1, onde se procurou destacar os aspectos gerais da via metabólica do ácido aspártico e os avanços iniciais até o ano de 1997, após este período, houve uma transição importante que levou a novas alternativas metodológicas e, conseqüentemente, a novas informações sobre o assunto. Neste sentido, este segundo capítulo visa adicionar dados importantes obtidos de 1997 a 2006.

4.2.2 Enzimas da via do ácido aspártico

4.2.2.1 Aspartato quinase e homoserina desidrogenase

Em plantas e bactérias, a primeira e terceira etapas da biossíntese de metionina e treonina são catalisadas por isoenzimas bifuncionais AK-HSDH. Em *E. coli* a expressão de uma destas isoenzimas bifuncionais é inibida por metionina e a outra por treonina. A isoenzima sensível à inibição por treonina foi extensivamente caracterizada em bactérias. Esta isoenzima é de forma homotetrâmera, contendo dois sítios de ligação de treonina por monômero. Embora estes sítios de ligação ainda não tenham sido identificados nas bactérias, estudos revelam que o domínio de regulação desta enzima se apresenta localizado na região intermediária (segmento de 316-447 aminoácidos) entre o domínio catalítico de AK e o domínio (segmento de 448-812 aminoácidos) de HSDH. Foram realizadas também

comparações de sequências internas desta enzima em *E. coli*, indicando que a região intermediária correspondente ao domínio de regulação é composto por dois subdomínios homólogos (316-366 e 397-447) (PARIS et al., 2002a, 2003).

Em *Arabidopsis*, a estrutura da proteína da isoenzima bifuncional AK-HSDH apresenta 66 aminoácidos na região terminal e 276 aminoácidos no domínio de AK e no domínio intermediário de regulação pela treonina apresenta 246 aminoácidos e 328 aminoácidos na região C-terminal de HSDH. O mecanismo de regulação do domínio intermediário entre os domínios de AK e HSDH ocorre devido à isoenzima bifuncional ser sensível à treonina. Este domínio contém dois subdomínios semelhantes por exibir esta estrutura comum *loop- α -helix-loop- β -strand-loop- β -strand*, análoga da forma da TD (PARIS et al., 2003).

Paris et al. (2003) realizaram uma série de mutações com resíduos de glutamina e foi proposta a região de ligação da treonina. Ensaios cinéticos das enzimas em espécie selvagem e mutantes mostraram que cada domínio regulatório dos monômeros de AK-HSDH possui dois sítios de ligação não similares para treonina, constituídos em parte por Gln⁴⁴² e Gln⁵²⁴. Desta forma, mostraram a interação da treonina com Gln⁴⁴² para conduzir a inibição da atividade de AK, facilitando, assim, uma segunda ligação da treonina com Gln⁵²⁴. A interação desta segunda ligação conduz a inibição da atividade de HSDH.

Um novo cDNA de AK-HSDH foi clonado em *A. thaliana* denominado de *akthr2*, que é uma complementação funcional de um gene da HSDH (*hom6*) em um mutante de uma linhagem *Saccharomyces cerevisiae*. O padrão de expressão do gene *akthr2* foi estudado em plantas transgênicas de *Arabidopsis* em comparação (ROGNES et al., 2003) com o gene *akthr1* de tabaco (SHAUL; GALILI, 1992ab), mostrando serem expressos em células meristemáticas, folhas e estames. A principal diferença entre os dois genes em questão é vista na expressão em curto período ou na ausência do gene *akthr2* em estruturas da planta como a haste, o gineceu e durante formação da semente, enquanto *akthr1* foi menos expresso nas raízes (ROGNES et al., 2003).

Inicialmente, dois diferentes cDNAs (*ak* e *lys*) que codificam uma AK monofuncional sensível à lisina, foram isolados de *A. thaliana* (FRANKARD et al., 1997; TANG et al., 1997a). A partir de uma biblioteca genômica, foi isolado o terceiro gene (*lys3*) em *Arabidopsis* que codifica uma AK monofuncional sensível à lisina, que foi altamente expressa no xilema de folhas, hipocótilos e raízes. Este gene também foi expresso de forma significativa em tricomas. Uma leve expressão do gene *lys3* foi detectada em feixes vasculares e em células do mesofilo no caule e nas folhas, na inflorescência, nas sépalas, nas

pétalas e nos estigmas. Estes resultados indicaram que o gene *lys3* não é expresso uniformemente em todas as estruturas da planta (YOSHIOKA; KUREI; MACHIDA, 2001).

Uma planta de espécie forrageira (*Medicago sativa*) transgênica superexpressando a AK insensível à inibição pela lisina de *E.coli* apresentou nível elevado de treonina livre e treonina incorporada à proteína, a qual foi encontrada em algumas linhas transgênicas acompanhadas por redução significativa em aspartato e glutamato. Esse dado sugere que em alfafa, a AK não seria o único fator limitante para a biossíntese de treonina e que a concentração da treonina solúvel pode limitar a incorporação deste aminoácido dentro da proteína (GALILI et al., 2000). Alguns trabalhos têm apresentado o aumento da concentração de metionina em sementes de leguminosas através da enzima AK alterada na sua sensibilidade à retroinibição (DEMIDOV et al., 2003), podendo, assim, apresentar aumento nos aminoácidos produtos finais (LEA; BLACKWELL; AZEVEDO, 1992).

Estudos sobre grão de bico (*Cicer arietinum* L.) transgênico têm revelado que o gene da AK alterada na sua sensibilidade à retroinibição tem sido usado como marcador de seleção para a produção desta planta. A partir disso, foi detectado o aumento da atividade de AK que contribuiu para aumentar o nível de lisina e treonina nas plantas selecionadas do que nas plantas não transformadas (plantas controle) (TEWARI-SINGH et al., 2004).

Em seus estudos com arroz, Lugli, Gaziola e Azevedo (2000) realizaram ensaios com duas isoenzimas de AK na presença de cálcio, inibidores de calmodulina, SAM, S-2-aminoetil- cisteína, metionina, valina, e meios com elevadas concentração de sais, sendo que estes compostos não produziram alteração significativa na atividade da AK sensível à treonina. No entanto, a atividade de AK sensível à lisina, induzida pela presença de cálcio mostrou um aumento pouco significativo. Entretanto, o aumento na atividade não foi observado quando o EGTA foi acrescentado em combinação com o cálcio. Todavia, o SAM foi capaz de inibir em 12%, e uma inibição exacerbada de AK foi causada por lisina. Esta observação não foi vista na mesma extensão com lisina e S-2-aminoetil-cisteína, mas indicou que a AK é sensível à lisina e também sinergicamente inibida por SAM, embora o aumento da atividade de AK tinha sido observado na presença de cálcio, sendo que esta alteração não foi suficiente para indicar o papel regulatório do cálcio sobre a AK.

4.2.2.2 Aspartato semialdeído desidrogenase

O β -aspartil fosfato produzido pela reação catalisada por AK, que é a primeira enzima da via do ácido aspártico, é então convertido para β -aspartil semialdeído (ASA) pela ação da

enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11) em uma reação dependente de NADPH (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Após isso, a via é dividida em dois ramos, um que leva à formação de lisina e outro ramo é dividido para formar dois sub-ramos. Um destes leva à síntese de treonina e o outro da metionina.

Esta enzima da qual praticamente nada se sabia até 10 anos, mantém-se como uma enzima de aparente pouca importância na regulação da via. A ASADH ainda não foi bem caracterizada em plantas, sendo a primeira caracterização apenas relatada por Paris et al. (2002b), os quais isolaram a sequência de cDNA que codifica ASADH nos plastídios de *A. thaliana*. Em microorganismos, principalmente *E. coli*, a enzima ASADH apresentou uma forma homodimérica e tamanho de aproximadamente 36 kDa (PARIS et al., 2002b).

4.2.2.3 Homoserina quinase

O composto β -aspartato semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima HSDH na presença de NADH ou NADPH (FERREIRA et al., 2005). Em seguida, a homoserina é fosforilada a O-fosfomoserina (OPH) pela ação da enzima homoserina quinase (HK, E.C 2.7.1.39) e convertida em treonina pela treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2). A HK é a quarta enzima da via do aspartato, a qual pertence a uma única grande classe da superfamília quinase GHMP (ZHOU et al., 2000). De modo análogo à aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11), a enzima HK tem sido caracterizada em bactérias. A estrutura da HK foi determinada através da cristalografia de raio X, apresentando um novo sítio de ligação de nucleotídeos e altamente específica (KRISHNA et al., 2001).

Contrariamente à ASADH, alguns trabalhos já haviam sido realizados para HK em plantas, e nesta fase mais recente mais alguns estudos foram realizados. No estudo em que a HK foi superexpressa em *A. thaliana*, nenhum efeito na concentração de OPH, metionina e treonina solúvel foi observado. Entretanto, a adição de homoserina estimulou o acúmulo destes aminoácidos e do OPH, indicando que a taxa da síntese de homoserina é o maior fator limitante (LEE et al., 2005a).

4.2.2.4 Treonina sintase e cistationina γ -sintase

O O- fosfomoserina (OPH) produzido pela ação da enzima HK é um intermediário importante da via do ácido aspártico, já que este é o ponto de ramificação em que a síntese de metionina e treonina diverge. O OPH pode ser convertido em treonina pela enzima alostérica

treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2), que é a quinta enzima envolvida na síntese de treonina do ácido aspártico. O OPH pode também formar cistationina pela ação da enzima cistationina y-sintase (CGS, EC 4.9.99.9), que é a primeira enzima envolvida na biossíntese de metionina (HESSE et al., 2004). Além disso, foi observado que a TS e CGS apresentam eficiências cinéticas similares no contexto metabólico considerado, sendo o primeiro na ordem para o substrato OPH (CURIEN; RAVANEL; DUMAS, 2003).

Como visto no capítulo anterior, a enzima TS foi bem estudada. A enzima CGS já recebeu maior atenção nesta fase mais atual, tendo ambas sido muito bem caracterizadas em microrganismos e plantas, principalmente nos últimos anos. Estas enzimas têm um impacto significativo sobre biossíntese de treonina e metionina, as quais desempenham papéis importantes no metabolismo celular. A enzima TS é encontrada em microrganismos Garrido-Franco et al. (2002); Omi et al. (2003) e plantas (THOMAZEAU et al., 2001). Talvez a característica principal da TS em plantas, quando comparada com as bactérias, seja a sua regulação por SAM, considerado um ativador alostérico para esta enzima. Sendo SAM capaz de estimular drasticamente a atividade de TS Hesse et al. (2004), podendo ainda ser também inibida por monofosfato de adenosina (AMP) (CURIEN; RAVANEL; DUMAS, 2003).

Em contraste com outras enzimas reguladoras na via do aspartato, a CGS não é alostérica e não está sujeita à inibição por retroinibição pela metionina ou qualquer um de seus metabólitos (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Giovanelli, Mudd e Datko (1989) estudaram extensivamente a enzima CGS com a planta *Lemna paucicostata*, e corroboraram a hipótese. Posteriormente, esta ideia foi confrontada por outros pesquisadores que estabeleceram que CGS fosse regulada ao nível de transcrição e pós-transcrição em algumas plantas. Esse fato foi observado através da atividade reduzida da enzima CGS em *A. thaliana* devido ao fato de a metionina ter sido alterada na região MTO1 da sequência do mRNA que dava a origem a uma nova cadeia polipeptídica da enzima. (CHIBA et al., 2003; LAMBEIN et al., 2003).

4.2.2.5 Cistationina β -liase, metionina sintase, S-adenosilmetionina sintase

As biossínteses de metionina e de SAM estão intrinsecamente ligadas devido ao papel fundamental na regulação da síntese de metionina. As três enzimas envolvidas são a cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8), metionina sintase (MS, EC 2.1.1.14) e S-adenosilmetionina sintase (SAM-S, EC 2.5.1.6) (HESSE et al., 2004).

Maimann et al. (2000) propuseram estudar detalhadamente a enzima CBL para verificar se havia alguma função relevante na síntese dos aminoácidos. Em batata utilizaram o RNA anti-sense para a produção de batatas transgênicas. Observaram uma redução nos níveis da CBL que expressava um fenótipo extremamente atrofiado. Essa característica contribuiu para a redução no teor de metionina e aumento no teor de cistationina, cisteína, homoserina e, inesperadamente, em homocisteína. Os resultados demonstraram que a enzima CBL apresentava um papel central na síntese de metionina e no crescimento da planta. Por outro lado, a superexpressão da CBL resultou no aumento da transcrição e da atividade dessa enzima. Dessa forma, não houve alteração no crescimento da planta (MAIMANN; HOEFGEN; HESSE, 2001). Em contrapartida, outro grupo de pesquisadores realizou uma pesquisa com atividade da enzima CBL, mostrou um aumento de 4 vezes nas plantas transgênicas, contudo, não houve alteração nos teores de metionina, cisteína e treonina. Baseados nesses relatos, os autores concluíram que a CBL não desempenha papel fundamental na regulação do fluxo na via de síntese de metionina (GAKIÈRE et al., 2002). A conversão da homocisteína a metionina é catalisada pela metionina sintase, usando o N5-metiltetrahidrofolato como o doador de metila. A enzima MS purificada a partir de espécies de plantas apresentou uma estrutura cristalina complexada com o zinco, homocisteína e metiltetrahidrofolato em *Arabidopsis* (FERRER et al., 2004).

Em batata, foi observado que o gene da metionina sintase (MS) é expresso diferentemente nos diversos tecidos da planta, sendo que o maior teor se encontra nas flores e menor nos estames. A expressão de MS nas folhas foi induzida pela luz, sacarose e produtos derivados da sacarose (ZEH et al., 2002). Na cevada a MS foi altamente expressa no pericarpo e menos expressa no endosperma (SREENIVASULU et al., 2002).

A maioria dos estudos tem indicado que o passo final na síntese de metionina ocorre no citoplasma e a homocisteína é transportada para fora do cloroplasto. Entretanto, estudos conduzidos por Ravanel et al. (2004) mostraram evidências para existência de uma forma de MS separada no cloroplasto.

Em *A. thaliana* foram identificados três genes que codificam as isoenzimas da MS. Dentre esses genes, dois (*atms1* e *atms2*) estavam no citoplasma e um (*atms3*) no cloroplasto. Os três mRNAs diferentes foram detectados em raízes, caules, folhas, flores e sementes em *Arabidopsis* e demonstraram que os genes *atms1*, *atms2* e *atms3* eram transcricionalmente ativos. Entretanto, o mRNA do *atms1*, foi o mais abundante transcrito em todos os órgãos, sendo que o maior teor encontrado foi nas flores e o menor, nas raízes. O mRNA do *atms2* é de 4 a 10 vezes menos abundante do que o do *atms1* em todos os órgãos da planta, exceto nas

flores. O gene *atms3* demonstrou um nível de expressão baixo nos caules, folhas e flores. Nesses órgãos o mRNA da isoforma MS plastidial foi de 65 a 430 vezes menos abundante do que o mRNA das isoformas citosólicas. O baixo nível da expressão do *atms3* pode explicar a inabilidade de detectar a enzima nos cloroplastos da folha (RAVANEL et al., 2004). A partir desse estudo, Ravanel et al. (2004) propuseram que a isoenzima plastidial é necessária para a metilação da homocisteína que é sintetizada novamente, sugerindo que os plastídeos são os únicos sítios de síntese de metionina nas células das plantas. As outras isoenzimas MS presentes no citosol estão provavelmente envolvidas na regeneração de metionina a homocisteína, que é produzida nas reações de metilação dependente de SAM. A isoenzima plastidial é provavelmente mais necessária para a metilação de homocisteína sintetizada de novo. Assim, sugere que os plastídios são o único sítio de síntese de metionina a partir da homocisteína produzida em reações dependentes da metilação por SAM.

A conversão da metionina para SAM é catalisada por SAM-S em uma reação dependente de ATP. Como foi descrito anteriormente, agora fica evidente que o último passo da síntese de metionina pode ocorrer nos cloroplastos. Todavia, todas as evidências indicam que a SAM é sintetizada somente no citosol. Entretanto, há uma demanda de SAM dentro do cloroplasto considerável para um grande número de reações de metilação, incluindo a síntese de clorofila, tocoferol, plastoquinona e muitas proteínas de membranas tilacóides e de estroma. Assim, o SAM é transportado para dentro dos cloroplastos por um carreador facilitador do processo de difusão (RAVANEL et al., 2004).

Em *A. thaliana* foram identificados quatro genes para SAM (SHEN; LI; TARCZYNSKI, 2002). Para mostarda (*Brassica juncea*) foram isolados clones genômicos e cDNA de SAM-S. Com a aplicação exógena de vários compostos, incluindo poliaminas, NaCl e transcritos de SAM-S, observaram que as poliaminas inibiram a produção de etileno na mostarda, sendo regulada em parte por SAM-S (LIM; LIU; PUA, 2002). De modo análogo, em plantas de salsa (*Suaeda*) houve aumento da regulação de SAM-S na transcrição e na atividade enzimática (MA et al., 2003).

4.2.2.6 Enzimas envolvidas na síntese de isoleucina

4.2.2.6.1 Treonina desaminase

A treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16) é a única enzima na via metabólica da isoleucina que catalisa a desaminação e desidratação da treonina para produzir 2-cetobutirato

e amônia (SINGH, 1999). A enzima TD encontrada na *A. thaliana* é um tetrâmero composto de subunidades idênticas de 59,6 kDa (HALGAND et al., 2002). A síntese de TD foi identificada como a maior proteína solúvel em flores de tomate, em que um gene que codifica um peptídeo de 55 kDa foi isolado e caracterizado (SAMACH et al., 1991).

A transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com tipo selvagem e de formas da enzima TD insensível à inibição por isoleucina de *E. coli* (*ilvA*) originou plantas com concentrações elevadas de isoleucina, das quais, a maioria mostrou um crescimento atrofiado (EBMEIER et al., 2004). A mutagênese química do sítio de ligação nas duas regiões regulatórias da TD da *A. thaliana* permitiu a construção de formas não sensíveis à isoleucina. As plantas de *A. thaliana*, transformadas com genes TD mutantes em um sítio, exibiram um aumento 2 a 15 vezes na concentração de isoleucina. No entanto, um aumento de 106 vezes na concentração de isoleucina foi demonstrado em um mutante duplo que afetou ambos os sítios da enzima TD mutante, o que poderia ser usado como um novo marcador de seleção para transformação de plantas (GARCIA; MOURAD, 2004).

4.2.2.6.2 Ácido acetohidroxi sintase

A enzima ácido acetohidroxi sintase (AHAS/ALS, EC 4.1.3.18) conduz uma série de reações paralelas necessárias para a biossíntese de leucina, valina e isoleucina. Na via que produz a isoleucina, a enzima catalisa a condensação de piruvato com 2-cetobutirato para formar 2-aceto-2-hidroxi-butirato. Na reação que produz valina e leucina, AHAS catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato para formar 2-acetolactato.

A enzima requer pirofosfato de tiamina (TPP), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e de um cátion divalente, para ambas as reações de condensação (AZEVEDO et al., 1997). A AHAS é o alvo de uma variedade de herbicidas potentes de baixa dose e, por esta razão, a enzima tem sido objeto de intenso estudo, especialmente em relação às mudanças da sequência de aminoácidos da proteína que conferem resistência aos herbicidas (KIM et al., 2004; PANG; GUDDAT; DUGGLEBY, 2004; McCOURT et al., 2005).

Uma característica incomum de AHAS das plantas é que a enzima é inibida por todos os três aminoácidos de cadeia ramificada, ao contrário da maioria das enzimas bacterianas e fúngicas que são sensíveis somente à valina. Além disso, a enzima da planta é também sujeita à inibição sinérgica pela combinação de leucina mais valina. Inicialmente, houve certa confusão quanto à localização do sítio de ligação do feedback do inibidor dos produtos finais dos aminoácidos, até que se tornou evidente que as plantas nativas com a enzima AHAS, além de

conter uma subunidade catalítica, também possui uma pequena subunidade reguladora (LEE; DUGGLEBY, 2001). Em um modelo molecular da subunidade de AHAS reguladora em *A. thaliana* foi proposto que a sequência de aminoácidos contém dois domínios criados por uma duplicação interna, com uma ligação valina e isoleucina, ou outra com a leucina. A evidência para um local específico em leucina é que a reconstituição da subunidade catalítica com o domínio de uma subunidade reguladora produz uma enzima que é inibida por leucina, mas não por valina ou isoleucina. O segundo domínio é incapaz de se ligar à leucina porque saturação com leucina iria suprimir os efeitos da valina (ou isoleucina), da mesma forma se observa que a saturação com leucina aumenta a afinidade para com a valina (LEE; DUGGLEBY, 2002). Recentemente foi determinado por cristalografia que a estrutura da subunidade catalítica de AHAS de levedura apresenta um tamanho de 0,28 nM (KIM et al., 2004). As plantas superiores possuem um número variável de genes de AHAS, principalmente em função do nível de ploidia. O diploide *A. thaliana* tem uma cópia constitutiva Mazur; Chui; Smith (1987), o alotetraplóide *N. tabacum* tem dois loci ALS não ligados, cujos genes são expressos de uma forma coordenada, em todos os órgãos da planta tabaco. O milho tem sido definido como um alopoliplóide críptico que possui dois genes AHAS similares. A *Brassica napus*, um amfidiplóide de *B. campestris* e *B. oleracea* tem cinco genes AHAS com isoformas diferentes, onde seu desenvolvimento é regulado em um tecido de maneira específica (SINGH, 1999).

Nenhum íntron foi encontrado em genes AHAS, enquanto os peptídeos sinais putativos em cloroplastos foram identificados em todos os clones de cDNA sequenciados, confirmando a localização da atividade de AHAS (MIFLIN, 1974). Diferentemente do gene TD, não há nenhuma evidência de que AHAS é superexpressa em flores. A maioria dos estudos mostrou um padrão geral de expressão constitutiva com os níveis mais elevados sendo detectados no tecido meristemático jovem (SINGH, 1999). Uma grande variedade de genes AHAS que conferem tolerância aos herbicidas foi descoberta em plantas através da mutagênese e seleção (KOCHEVENKO; WILLMITZER, 2003; JUNG et al., 2004; TAN et al., 2004).

4.2.2.6.3 Ácido acetohidroxi redutoisomerase

A enzima acetohidroxiácido isomeroreductase (AHRI/KARI, EC 1.1.1.86) é de grande interesse na pesquisa agroquímica porque está ausente em animais, tornando-o um alvo potencial para herbicidas e fungicidas (DUMAS et al., 2001; LEE et al., 2005b). A enzima

tem sido purificada de espinafre e cevada. Os estudos sobre a enzima do espinafre superexpressa em *E. coli* indicam que a enzima provavelmente existe como um dímero com subunidade de 59 kDa (WESSEL et al., 1998). A enzima tem uma elevada e semelhante afinidade com os dois substratos, que aparecem para competir com o mesmo sítio de ligação. No entanto, a $V_{\max}$ para as duas enzimas de plantas é 6 a 11 vezes mais elevada para 2-aceto-2-hidroxi-butirato do que para 2-acetolactato (DUMAS et al., 1992; DURNER; KNORZER; BOGER, 1993). Foi acompanhado pela técnica de Espectometria de Massa com Ionização por Eletrospray (ESI-MS) para estudos de troca H-D (hidrogênio-deutério), demonstrando ser uma ferramenta útil para obtenção da estrutura conformacional da proteína, como estabilidade e dinâmica da proteína, no estudo de dobramento de proteína e interações proteína-proteína. Além disso, os experimentos de troca H-D indicaram que íons Mg^{+2} e a ligação NADPH para AHRI resultaram em uma mudança conformacional inicial na interface entre os dois domínios de cada monômero, com a ligação dos dois co-fatores que alteram a estrutura do sítio ativo do promotor do substrato ou do inibidor de ligação (HALGAND et al., 1999). A estrutura da AHRI em planta complexada com o seu substrato, NADPH e íons Mn^{+2} foi determinado com uma resolução de 0,16 nM Thomazeau et al. (2000) e também com um inibidor (BIOU et al., 1997). Um gene que codifica a AHRI foi isolado de espinafre e *A. thaliana*, e somente uma cópia pode ser detectada pelo genoma haplóide. O gene de *A. thaliana*, que contém nove íntrons, codificou um precursor de proteína de 591 resíduos, incluindo um peptídeo sinal putativo de cloroplasto com 67 aminoácidos (DUMAS et al., 1993).

4.2.2.6.4 Ácido dihidroxi desidratase

A enzima ácido dihidroxi desidratase (DHAD, EC 4.2.1.9) conduz duas reações, nos quais 2,3-di-hidroxi-3-isovalerato ou 2,3-di-hidroxi-3-metilvalerato é desidratado para formar 2-oxoisovalerato ou 2-oxo-3-metilvalerato, respectivamente. Uma série de mutantes auxotróficos que requerem isoleucina, leucina e valina para o crescimento foram isoladas, o que indica que é provável que apenas uma cópia do gene esteja presente (SINGH, 1999).

4.2.2.6.5 Aminotransferase de cadeia ramificada

A etapa metabólica final da produção dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina é uma reação de transaminação catalisada pela aminotransaminase de cadeia ramificada (BCAT, EC 2.6.1.42). A estrutura da enzima de *E. coli* e o mecanismo de ligação de

substratos foram identificados por Goto et al. (2003). Em plantas, Hagelstein et al. (1997) isolaram duas formas diferentes de aminotransferases dos cloroplastos de espinafre, sendo que uma foi capaz de utilizar o 2-oxoisovalerato como um substrato e, assim, formar valina e uma outra que pôde utilizar 2-oxo-3-metilvalerato ou 2-oxoisocaproato como substrato para formar isoleucina e leucina, respectivamente. Dois cDNAs diferentes foram isolados de batata codificando BCAT (*BCAT1* e *BCAT2*). A análise de Southern indicou que os genes *BCAT1* e *BCAT2* não estavam em regiões idênticas do genoma e que *BCAT1* pode existir em cópias múltiplas. As sequências deduzidas de aminoácidos para ambos os cDNAs continham peptídeos sinais putativos para a localização plastidial ou mitocondrial. A análise da expressão do gene indicou uma indução do *BCAT1* em relação a *BCAT2* em culturas de calos e de folhas expostas ao tratamento com ácido naftaleno e 6-benzilaminopurina (CAMPBELL et al., 2001). Recentemente, sete genes putativos BCAT foram identificados em *A. thaliana* e seis das sequências de cDNA foram clonadas (DIEBOLD et al., 2002). As sequências deduzidas de aminoácidos apresentaram uma relação de identidade de 47,5% e 84,1%, e 30% para enzima homóloga de levedura. Análise da localização subcelular de BCATs em *A. thaliana* utilizando a técnica fusão proteína ao GFP (*Green fluorescent protein*), indicou que três genes codificaram as formas plastidiais e um gene codificou uma forma mitocondrial da enzima. A localização das enzimas codificadas pelos dois genes remanescentes não foram elucidados. Diebold et al. (2002) propuseram que as aminotransferases dos cloroplastos estão envolvidas nas reações de biossíntese e que uma via separada de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada ocorre nas mitocôndrias.

4.2.2.6.6 Enzimas envolvidas na síntese de lisina

4.2.2.6.6.1 Dihidrodipicolinato sintase

Como já revisado, a enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, E. C 4.2.1.52) é a primeira diretamente relacionada à síntese de lisina. Esta enzima catalisa a condensação de piruvato e aspartato β -semialdeído (ASA) em 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato nas plantas e microorganismos (AZEVEDO et al., 1997; LEE et al., 2001; DOBSON; VALEGARD; GERRARD, 2004). Estudos com *Nicotiana sylvestris* revelaram que a DHDPS é uma molécula homotetrâmera composta por dois dímeros fortemente ligados (BLICKLING et al., 1997; DOBSON; VALEGARD; GERRARD, 2004). Blickling et al. (1997) apresentam a hipótese de um possível mecanismo catalítico com uma tríade catalítica de resíduos de

aminoácidos, que por meio da análise cristalográfica, foram identificados na enzima DHDPS expressa em *E. coli* os seguintes resíduos: Tyr133, Thr44 e Tyr107. Para testar esta hipótese, Dobson, Valegard e Gerrard (2004) usaram a mutagênese dirigida para a produção de três enzimas mutantes: DHDPS-Y133F, DHDPS-T44V e DHDPS-Y107F. Cada um destes mutantes mostrou reduzida atividade enzimática de acordo com a hipótese da tríade catalítica. A partir de análise cristalográfica entre a enzima DHDPS e a DHDPS mutante, foi observada apenas pequena diferença na estrutura. Estes resultados demonstram que a tríade catalítica está em funcionamento na DHDPS, apresentando, assim, um papel importante na reação desta enzima.

Os genes que codificam a DHDPS foram estudados em diversas espécies de plantas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Em *Arabidopsis* foram isolados e identificados dois genes que codificam a DHDPS (VAUTERIN; FRANKARD; JACOBS, 1999; SARROBERT et al., 2000). O gene *dhdps1* da DHDPS1 que está localizado no cromossomo III e o gene *dhdps-2* da DHDPS2 no cromossomo II (SARROBERT et al., 2000; CRACIUM; JACOBS; VAUTERIN, 2000). A enzima DHDPS2 é menos sensível à inibição por lisina do que a DHDPS1 (SARROBERT et al., 2000). Em *E. coli*, a expressão do gene *dhdps-2* resultou em uma DHDPS2 funcional inibida fortemente pela lisina (CRACIUM; JACOBS; VAUTERIN, 2000).

Sarrobert et al. (2000) demonstraram diferenças na expressão do gene *dhdps-2* em plantas mutantes de *Arabidopsis* com predominância na zona de alongamento das pontas de raízes e grãos de pólen, levando ao questionamento se duas enzimas codificadas pelos dois genes poderiam desempenhar papéis diferentes no crescimento da planta. Baseado nisto, um mutante com um *knockout* do gene *dhdps-2* de *A. thaliana* mostrou um crescimento próximo ao normal, todavia com baixa concentração de lisina e elevada de treonina (CRACIUM; JACOBS; VAUTERIN, 2000; SARROBERT et al., 2000).

4.2.2.6.7 As etapas finais da síntese de lisina

A partir do composto β -aspartato semialdeído pela ação da enzima DHDPS ocorrem, então, mais seis reações enzimáticas consecutivas, necessárias para a síntese de lisina (TYAGI; HENKE; FARKAS, 1983; TYAGI; HENKE; FARKAS, 1982; KELLAND et al., 1985). No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre as outras enzimas envolvidas na síntese de lisina em plantas, ao contrário do que foi mostrado em bactérias (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Hudson et al. (2005) tentaram elucidar os últimos passos da síntese

de lisina com a preparação de extratos de milho, tabaco, soja e *Chlamydomonas* para análises enzimáticas. Nesses extratos, no entanto, não foi possível identificar as atividades das enzimas *N*- α -succinil-L,L-amino-acetopimelato-glutamato aminotransferase, *N*- α -succinil-L,L-diaminopimelato deacilase ou *N*- α -acetil-L,L-diaminopimelato deacilase. Em seguida, esses mesmos autores realizaram estudos com sequências de genes disponíveis em bancos de dados e genes ortólogos das enzimas dihidrodipicolinato redutase e diaminopimelato epimerase que foram localizados no genoma de *A. thaliana* a fim de corroborar os resultados bioquímicos. Dentre esses genes, dois codificam a dihidrodipicolinato sintase, três a dihidrodipicolinato redutase, quatro *N*- α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase, um a epimerase diaminopimelato e dois a descarboxilase diaminopimelato (HUDSON et al., 2006). Contudo, tetrahidrodipicolinato acilase e L,L-diaminopimelato aminotransferase não foram identificados.

Diante desse exposto, Hudson et al. (2005) colocaram em dúvida a função de *N*- α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase devido à ausência de um substrato, sendo que este tipo de proteína não poderia ser transportada para o cloroplasto, então provavelmente a via de tetrahidrodipicolinato para diaminopimelato em plantas superiores estaria sendo apresentada de maneira incorreta. Posteriormente, foi demonstrado em *A. thaliana* que a enzima LL-DAP aminotransferase codificada pelo locus At4g33680 seria capaz de complementar a atividade das enzimas *dapD* e *dapE* de *E. coli* (HUDSON et al., 2006).

4.2.2.6.8 Degradação de lisina

As enzimas LOR e SDH foram estudadas em diversas espécies de plantas (GAZIOLA et al., 1997; MIRON et al., 1997; LUGLI et al., 2002; CUNHA LIMA et al., 2003; FORNAZIER et al., 2005). As enzimas LOR e SDH estão presentes nas plantas como monofuncionais. No entanto, vários trabalhos têm mostrado que a maior parte da atividade de LOR e SDH é encontrada em um único polipeptídeo bifuncional (LOR-SDH) (GAZIOLA et al., 1997; ZHU; TANG; GALILI, 2000; TANG et al., 2002; GALILI, 2002; LIMA et al., 2003).

Em *Arabidopsis thaliana* foi clonado pela primeira vez o gene que codifica a enzima bifuncional LOR-SDH (TAG et al., 1997), sendo que o locus *lor-sdh* codifica o polipeptídeo bifuncional da LOR-SDH como também para a enzima monofuncional da SDH presente em um gene autônomo encontrado no interior da região codante e da região 3'UTR (3' não

traduzida) do gene *lor-sdh* (TANG et al., 1997; ZHU; TANG; GALILI, 2000; TANG et al., 2000; TANG et al., 2002).

Para LOR, a atividade máxima desta enzima é realizada por meio de um pH neutro enquanto na SDH com pH 9,0 ou acima deste valor (ZHU; TANG; GALILI, 2000). Em *Arabidopsis*, através de estudos bioquímicos, foi caracterizada a enzima monofuncional da LOR e a enzima bifuncional LOR-SDH, revelando, assim, que o K_m da enzima monofuncional para lisina foi aproximadamente 10 vezes maior do que para a isoenzima bifuncional (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Em arroz foi determinado o K_m da enzima LOR para lisina em 4,48 mM, 0,79 mM para o 2-oxoglutarato e 0,032 mM para o NADPH; para a enzima SDH o K_m para sacaropina foi de 0,130 a 0,023 mM para o NAD (GAZIOLA et al., 1997).

Estudos bioquímicos e moleculares com milho mostraram que a sacaropina é um inibidor competitivo de lisina e não competitivo do cetoglutarato. A partir disso foi proposto um mecanismo em que a lisina primeiramente interage com a enzima e logo após com o cetoglutarato e NADPH Fornazier et al. (2003), sendo o contrário com o arroz (GAZIOLA et al., 1997). Tem sido demonstrado também que, em diversas espécies de plantas, a lisina pode regular seu próprio catabolismo com as enzimas sendo moduladas de diversas formas por meio de uma cascata de sinais intracelular, envolvendo principalmente o cálcio e um processo de fosforilação-desfosforilação da proteína (KARCHI et al., 1995; KEMPER et al., 1998; GAZIOLA et al., 2000; AZEVEDO, 2002). Gaziola et al. (2000) caracterizaram as enzimas contidas no endosperma de arroz em relação à modulação dos íons cálcio e força iônica. Nesse estudo foi observado que o domínio LOR do polipeptídeo foi modulado não só pelos íons Ca^{2+} , mas também pela força iônica, enquanto o domínio SDH não apresentou a mesma atividade.

SAM não produziu nenhum efeito significativo sobre a atividade enzimática, indicando que apenas desempenha um papel na regulação da biossíntese de lisina. Todavia, o efeito da AEC como substrato e inibidor da atividade de LOR foi testado, sendo que a AEC foi parcialmente substituída pela lisina como um substrato para LOR, sendo que a mesma foi capaz de inibir a atividade de LOR, possivelmente por competir pelo sítio ativo da lisina (Gaziola et al., 2000).

4.2.2.6.9 Mutantes bioquímicos

O uso de mutantes bioquímicos conduziu a compreensão de mecanismos de grande relevância para a manipulação dessa via a apresentação de estratégias para a produção de cereais com alto teor de lisina, sendo que estas estratégias seriam o melhoramento genético, a identificação de mutantes naturais, por exemplo, *opaco* e *floury*, a indução de mutantes bioquímicos e a produção de plantas transgênicas (AZEVEDO; LEA, 2001).

Técnicas de cultura de tecidos e regeneração de plantas contribuíram para originar mutantes bioquímicos através da mutagênese e seleção em meios seletivos apresentando, assim, elevado teor de aminoácidos da via do ácido aspártico ou de análogos a estes aminoácidos (AZEVEDO, 2002).

Em cevada, milho, tabaco e *A. thaliana* foram selecionados e obtidos mutantes que mostraram resistência à lisina e treonina (AZEVEDO, 2002). Os mutantes selecionados do milho mostraram elevado teor de treonina, entretanto baixo teor de lisina no endosperma. Para os mutantes de cevada, foi revelada uma associação com propriedades metabólicas de duas isoenzimas da AK sensível à lisina. Dentre esses mutantes selecionados foram observados o aumento de 15 a 70 vezes de treonina solúvel (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002).

Já para os mutantes de *A. thaliana* foi mostrado que o mutante resistente à inibição por treonina e lisina aumentou 6 vezes o nível de treonina solúvel, sendo que isto está relacionado a não sensibilidade parcial da isoenzima da AK sensível à lisina. O outro mutante apresentou uma isoenzima de AK sensível à treonina alterada e um aumento pouco significativo de lisina. No entanto, a análise de um duplo mutante não mostrou aumento de lisina e treonina (AZEVEDO; LEA, 2001).

Além desses, outro recurso utilizado, a seleção de plantas resistentes à aminoetil cisteína (AEC), que contribuiu para que mutantes resistentes a este análogo de lisina fossem ainda descobertos em mutantes de cevada, *A. thaliana*, milho e tabaco (AZEVEDO; LEA, 2002). Durante as análises bioquímicas e genéticas observaram os mutantes de cevada, *A. thaliana* e milho, os quais mostraram resistência à AEC, por causa da baixa absorção deste composto pelas raízes, enquanto para o mutante tabaco observaram a forma da enzima DHDPS insensível à inibição por lisina, sendo então responsável pelo aumento do teor de lisina nas folhas (AZEVEDO; LEA, 2002).

Estes estudos com mutantes, mostrando alteração na sensibilidade da AK e DHDPS à lisina, treonina e AEC, foram de grande valia para compreender os mecanismos regulatórios que participam da via do ácido aspártico, principalmente os que estão envolvidos na regulação

das enzimas AK e DHDPS, consideradas específicas à síntese de lisina (AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO; LEA, 2002).

Zhu et al. (2001) esclarecem a importância da via de degradação para acumulação de lisina através da produção de plantas transgênicas de *A. thaliana* com *knockout* do gene LOR-SDH, em cujas sementes foi observado maior conteúdo de lisina. Depois disso, foi expresso em plantas selvagens e transgênicas de *A. thaliana*, o gene da DHDPS de bactéria para *knockout* da LOR-SDH (ZHU; GALILI, 2003).

Esses pesquisadores observaram a ocorrência na diminuição no processo de germinação das sementes, sendo que provavelmente estaria relacionado ao alto teor de lisina ou a efeitos pós-germinativos devido à redução do catabolismo de lisina. Para responder a estes quesitos, produziram plantas co-expressando o gene da DHDPS de bactéria com o gene da LOR-SDH silenciado sob o controle de um promotor específico para o desenvolvimento do endosperma. Então, concluíram que essas reduções estavam relacionadas ao bloqueio na via de degradação de lisina e não ao excesso de lisina nas plantas (ZHU; GALILI, 2004).

Os mutantes de milho, de acordo com as alterações no endosperma (aspecto opaco), são classificados em mutantes recessivos da série *opaco* (*o1*, *o2*, *o5*, *o7*, *o9-o11* e *o13-o17*), os mutantes semi-dominantes *floury* (*fl1*, *fl2* e *fl3*) e os mutantes dominantes *Mucronate* (*Mc*) (HUNTER et al., 2002; SEGAL; SONG; MESSING, 2003; HUANG et al., 2005).

Tem sido extensivamente estudado e utilizado o mutante *o2* e, em menor quantidade o mutante *fl2* e outros mutantes também começaram a ser pesquisados (HUNTER et al., 2002; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b).

Pesquisas realizadas com linhas isogênicas dos mutantes *W64Ao1*, *W64Ao2*, *W64Ao5*, *W64Ao9*, *W64Ao11*, *W64Afl1*, *Mucronate* (*Mc*) e endosperma defeituoso *B30* contribuíram para compreender as bases genéticas e bioquímicas, além da composição de aminoácidos e o perfil de transcritos de mRNA (HUNTER et al., 2002).

Azevedo et al. (2003) utilizaram os mutantes *Oh43o1*, *Oh43o2*, *Oh43fl1* e *Oh43fl2*, mais o genótipo selvagem *Oh43+* para estudar a regulação das enzimas AK, HSDH, LOR e SDH. Os mutantes *Oh43o1* e *Oh43fl2* mostraram um aumento significativo da atividade de AK. Por outro lado, os mutantes *Oh43o2* e *Oh43fl1* apresentaram redução na atividade enzimática em relação ao genótipo *Oh43+*. A atividade de LOR e SDH foi alterada de forma significativa nos mutantes *Oh43o2*, *Oh43fl1* e *Oh43fl2* quando comparada ao *Oh43+*.

Em estudo subsequente, AZEVEDO et al. (2004b) observaram alta concentração de lisina solúvel nos mutantes *o11* e *o13* em relação ao selvagem *W22+* enquanto o mutante *o10* mostrou baixa concentração de lisina. Além desses, outros estudos foram realizados com as

mutações *ol*, *o2*, *fl1*, *fl2*, *o5*, *o7*, *o10*, *o11* e *o13*, os quais apresentaram efeitos relevantes sobre o metabolismo de lisina e composição de aminoácidos.

De fato, a utilização de mutantes como metodologia tem sido de grande relevância para estudar as distintas vias metabólicas. Apesar de ser conhecida uma quantidade considerável de mutantes para diferentes espécies, pouco ainda se tem estudado a respeito da utilização destes materiais (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b; POMPEU et al., 2006).

4.3 Conclusões parciais

O uso de plantas transgênicas revelou-se uma importante metodologia para o estudo da via do ácido aspártico.

Por meio da estratégia de alterar a regulação de enzimas chave foram obtidas plantas transgênicas expressando vários genes bacterianos menos sensíveis à inibição por lisina ou treonina ou genes contendo alterações na composição de aminoácidos que tornaram as enzimas menos sensíveis à inibição por estes aminoácidos.

Este estudo também relata os aspectos importantes para uma melhor compreensão da síntese e o acúmulo de aminoácidos solúveis e incorporados em proteínas.

Por todas essas características, tem se dado uma grande atenção ao cultivo de cereais e leguminosas, sendo que diversos estudos têm abordado principalmente as qualidades nutricionais destas espécies.

Referências

AZEVEDO, R.A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, New York, v. 22, n.3, p. 217-230, 2002.

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

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

AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.46, n.3, p. 395-419, 1997.

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

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

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; VARISI, V.A.; GAZIOLA, S.A.; GRATÃO, P.L.; TORO, A.A. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the *opaque-5* and *opaque-7* maize mutations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.15, p.4865-4871, 2004b.

BIOU, V.; DUMAS, R.; COHEN-ADDAD, C.; DOUCE, R.; JOB, D.; PEBAY-PEYROULA, E. The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroreductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65Å^o resolution. **Embo Journal**, Oxford, v.16, n.12, p.3405-3415, 1997.

BLICKLING, S.; RENER, C.; LABER, B.; POHLENZ, H.D.; HALAK, T.A.; HUBER, R. Reaction Mechanism of *Escherichia coli* Dihydrodipicolinate Synthase Investigated by X-ray Crystallography and NMR Spectroscopy. **Biochemistry**, Washington, v.36, n.1, p.24-33, 1997.

CAMPBELL, M.A.; PATEL, J.K.; MEYERS, J.L.; MYRICK, L.C.; GUSTIN, J.L. Genes encoding for branched-chain amino acid aminotransferase are differentially expressed in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.39, n.10, p.855-860, 2001.

CHIBA, Y.; SAKURAI, R.; YOSHINO, M.; OMINATO, K.; ISHIKAWA, M.; ONOUCHI, H.; NAITO, S. S-adenosyl-L-methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathionine gamma-synthase gene in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, n.18, p.10225-10230, 2003.

CRACIUN, A.; JACOBS, M.; VAUTERIN, M. *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanism. **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.

CURIEN, G.; RAVANEL, S.; DUMAS, R. A kinetic model of the branch-point between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.270, n.23, p.4615-4627, 2003.

DEMIDOV, D.; HORSTMANN, C.; MEIXNER, M.; PICKARDT, T.; SAALBACH, I.; GALILI, G.; MUNTZ, K. Additive effects of the feed-back insensitive bacterial aspartate kinase and the Brazil nut 2S albumin on the methionine content of transgenic narbon bean (*Vicia narbonensis* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.11, n.3, p.187–201, 2003.

DIEBOLD, R.; SCHUSTER, J.; DASCHNER, K.; BINDER, S. The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n.2, p.540–550, 2002.

DOBSON, R.C.; VALEGARD, K.; GERRARD, J.A. The crystal structure of three site-directed mutants of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase: further evidence for a catalytic triad. **Journal of Molecular Biology**, London, v.338, n.2, p.329–339, 2004.

DUMAS, R.; CURIEN, G.; DEROSE, R.T.; DOUCE, R. Branched-chain amino acid biosynthesis in plants—molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). **Biochemical Journal**, London, v.294, pt.3, p.821–828, 1993.

DUMAS, R.; BIOU, V.; HAGLAND, F.; DOUCE, R.; DUGGLEBY, R.G. Enzymology, structure and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v.34, n.5, p.399–408, 2001.

DUMAS, R.; JOB, D.; ORTHOLAND, J.Y.; EMERIC, G.; GREINER, A.; DOUCE, R. Isolation and kinetic properties of acetohydroxy acid isomeroreductase from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast overexpressed in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, London, v.288, pt.3, p.865–874, 1992.

DURNER, J.; KNORZER, O.C.; BOGER, P. Ketol-acid reductoisomerase from barley (*Hordeum vulgare*) – purification, properties, and specific inhibition. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, n.3, p.903–910, 1993.

EBMEIER, A.; ALLISON, L.; CERUTTI, H.; CLEMENTE, T. Evaluation of the *Escherichia coli* threonine deaminase gene as a selectable marker for plant transformation. **Planta**, Berlin, v.218, n.5, p.751–758, 2004.

FERRER, J.L.; RAVANEL, S.; ROBERT, M.; DUMAS, R. Crystal structures of cobalamin-independent methionine synthase complexed with zinc, homocysteine, and methyltetrahydrofolate. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.279, n.43, p.44235–44238, 2004.

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

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.

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.

GAKIÈRE, B.; DENIS, L.; DROUX, M.; JOB, D. Over-expression of cystathionine γ -synthase in *Arabidopsis thaliana* leads to increased levels of methionine and S-adenosylmethionine. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, n.2, p.119–126, 2002.

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

GALILI, S.; GUENOUNE, D.; WININGER, S.; HANA, B.; SCHUPPER, A.; BEN-DOR, B.; KAPULNIK, Y. Enhanced levels of free and protein-bound threonine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing a bacterial feedback-insensitive aspartate kinase gene. **Transgenic Research**, London, v.9, n.2, p.137–144, 2000.

GARCIA, E.L.; MOURAD, G.S. A site-directed mutagenesis interrogation of the carboxy-terminal end of *Arabidopsis thaliana* threonine dehydratase=deaminase reveals a synergistic interaction between two effectors- binding sites and contributes to the development of a novel selectable marker. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.55, n.1, p.121–134, 2004.

GARRIDO-FRANCO, M.; EHLERT, S.; MESSERSCHMIDT, A.; MARINKOVIC, S.; HUBER R.; LABER, B.; BIURENKOV, G. P.; CLAUSEN, T. Structure and function of threonine synthase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v.277, n.14, p.12396–12405, 2002.

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.

GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H.; DATKO, A.H. Regulatory structure of the biosynthetic pathway for the aspartate family of amino acids in *Lemna paucicostata* Hegelm 6746, with special reference to the role of aspartokinase. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, n.4, p.1584–1599, 1989.

GOTO, D.B.; OGI, M.; KIJIMA, F.; KUMAGAI, T.; VAN WERVEN, F.; ONOUCHI, H.; NAITO, S. A single-nucleotide mutation in a gene encoding Sadenosylmethionine synthetase is associated with methionine overaccumulation phenotype in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Genetic Systems**, Shizuoka, v.77, n.2, p.89–95, 2002.

HAGELSTEIN, P.; SIEVE, B.; KLEIN, M.; JANS, H.; SCHULTZ, G. Leucine synthesis in chloroplasts: leucine/isoleucine aminotransferase and valine aminotransferases are different enzymes in spinach chloroplasts. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.150, n.1/2, p.23–30, 1997.

HALGAND, F.; WESSEL, P.M.; LAPREVOTE, O.; DUMAS, R. Biochemical and mass spectrometric evidence for quaternary structure modifications of plant threonine deaminase induced by isoleucine. **Biochemistry**, Washington, v.41, n.46, p.13767–13773, 2002.

HALGAND, F.; DUMAS, R.; BIOU, V.; ANDRIEU, J.P.; THOMAZEAU, K.; GAGNON, J.; DOUCE, R.; FOREST, E. Characterization of the conformational changes of acetohydroxy acid isomeroreductase induced by binding of Mg(2+) ions, NADPH, and a competitive inhibitor. **Biochemistry**, Washington, v.38, n.19, p.6025–6034, 1999.

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.

HESSE, H.; KREFT, O.; MAIMANN, S.; ZEH, M.; HOEFGEN, R. Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.404, p.1799–1808, 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.; SINGH, B.K.; LEUSTEK, T.; GILVARG, C. An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, n.1, p.292–301, 2006.

HUDSON, A.O.; BLESS, C.; MACEDO, P.; CHATTERJEE, S.P.; SINGH, B.K.; GILVARG, C.; LEUSTEK, T. Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. **Biochimica et Biophysica Acta G: General Subjects**, Amsterdam, v. 1721, n. 1/3, p.27–36, 2005.

HUNTER, B.G.; BEATTY, M.K.; SINGLETARY, G.W.; HAMAKER, B.R.; DILKES, B. P.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. **Plant Cell**, Berlin, v.14, n.10, p.2591–2612, 2002.

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.

JUNG, S.M.; LE, D.T.; YOON, S.S.; YOON, M.Y.; KIM, Y.T.; CHOI, J.D. Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxy acid synthase. **Biochemical Journal**, London, v.383, pt.1, p.53–61, 2004.

- 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.
- KELLAND, J.G.; PALCIC, M.M.; PICKARD, M.A.; VEDERAS, J.C. Stereochemistry of lysine formation by meso-diaminopimelate decarboxylase from wheat germ: use of proton-carbon-13 NMR shift correlation to detect stereospecific deuterium labeling. **Biochemistry**, Washington, v.25, n.13, p.3263–3267, 1985.
- KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; CAPELLA, A.N.; GONÇALVES-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**, Oxford, v.253, n.3, p.720–729, 1998.
- KIM, J.; BEAK, D.G.; KIM, Y.T.; CHOI, J.D.; YOON, M.Y. Effects of deletions at the C-terminus of tobacco acetohydroxyacid synthase on the enzyme activity and cofactor binding. **Biochemical Journal**, London, v.384, pt.1, p.59–68, 2004.
- KOCHEVENKO, A.; WILLMITZER, L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, n.1, p.174–184, 2003.
- KRISHNA, S.S.; ZHOU, T.; DAUGHERTY, M.; OSTERMAN, A.; ZHANG, H. Structural basis for the catalysis and substrate specificity of homoserine kinase. **Biochemistry**, Washington, v.40, n.36, p.10810–10818, 2001.
- LAMBEIN, I.; CHIBA, Y.; ONOUCHI, H.; NAITO, S. Decay kinetics of autogenously regulated CGS1 mRNA that codes for cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.44, n.9, p.893–900, 2003.
- LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Primary products: plant amino acids. In: THOMAS, B.; MURPHY, S.J.; MURRAY, B.G. (Ed.). **Encyclopaedia of Applied Plant Sciences**, Amsterdam: Elsevier. 2003. v.3. p. 871–883.
- LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; AZEVEDO, R.A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In: SHEWRY, P.R. (Ed.). **Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1992. p.181-208.
- LEA, P.J.; CHEN, Z.H.; LEEGOOD, R.C.; WALKER, R.P. Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism? **Amino Acids**, Wien, v.20, n.3, p.225–241, 2001.
- LEE, Y.T.; DUGGLEBY, R.G. Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. **Biochemistry**, Washington, v.40, n.23, p.6836–6844, 2001.
- LEE, Y.T.; DUGGLEBY, R.G. Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. **Febs Letters**, Amsterdam, v.512, n.1-3, p.180–184, 2002.

- LEE, M.; MARTIN, M.N.; HUDSON, A.O.; LEE, J.; MUHITCH, M.J.; LEUSTEK, T. Methionine and threonine synthesis are limited by homoserine availability and not the activity of homoserine kinase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v.41, n.5, p.685–696, 2005a.
- LEE, Y.T.; TA, H.T.; DUGGLEBY, R.G. Cyclopropane-1,1-dicarboxylate is a slow-, tight-binding inhibitor of rice ketol-acid reductoisomerase. **Plant Science**, Limerick, v.168, n.4, p.1035–1040, 2005b.
- 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 in rice seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.8, n.1, p.75–84, 2001.
- LEFÈVRE, A.; CONSOLI, L.; GAZIOLA, S.A.; PELLEGRINO, A.P.; AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C. Dissecting the *opaque-2* regulatory network using transcriptome and proteome approaches along with enzyme activity measurements. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, p.407–414, 2002.
- LIM, C.C.; LIU, J.Z.; PUA, E.C. Characterization of S-adenosylmethionine synthetase genes and its expression is associated with ethylene synthesis in mustard (*Brassica juncea*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.116, n.4, p.522–530, 2002.
- LIMA, S.T.C.; AZEVEDO, R.A.; SANTORO, L.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J. Isolation of the bifunctional enzyme lysine 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from *Phaseolus vulgaris*. **Amino Acids**, New York, v.24, n.1/2, p. 179–186, 2003.
- LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, Clare, v.150, n.1, p. 51–58, 2000.
- 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.
- MA, X.L.; WANG, Z.L.; QI, Y.C.; ZHAO, Y.X.; ZHANG, H. Isolation of S-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress. **Acta Botanica Sinica**, Peiping, v.45, n.11, p.1359–1365, 2003.
- MAIMANN, S.; WAGNER, C.; KREFT, O.; ZEH, M.; WILLMITZER, L.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Transgenic potato plants reveal the indispensable role of cystathionine beta-lyase in plant growth and development. **Plant Journal**, Oxford, v.23, n.6, p.747–758, 2000.
- MAIMANN, S.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Enhanced cystathionine beta-lyase activity in transgenic potato plants does not force metabolite flow towards methionine. **Planta**, Berlin, v.214, n.2, p.163–170, 2001.

MAZUR, B.J.; CHUI, C-F.; SMITH, J.K. Isolation and characterization of plant genes-coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, n.4, p.1110–1117, 1987.

McCOURT, J.A.; PANG, S.S.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Elucidating the specificity of binding of sulfonylurea herbicides to acetohydroxyacid synthase. **Biochemistry**, Washington, v.44, n.7, p.2330–2338, 2005.

MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.31, n.1, p.1-9, 2004a

MEDICI, L. O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge v.142, pt.5, p.535–541, 2004b.

MIFLIN, B.J. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.54, p.550–555, 1974.

MIRON, D.; BEN-YAACOV, S.; KARCHI, H.; GALILI, G. In vitro dephosphorylation inhibits the activity of soybean lysine-ketoglutarate reductase in a lysine-regulated manner. **Plant Journal**, Oxford, v.12, n. p.1453–1458, 1997.

OMI, R.; GOTO, M.; MIYAHARA, I.; MIZUGUCHI, H.; HAYASHI, H.; KAGAMIYAMA, H.; HIROTSU, K. Crystal structures of threonine synthase from *Thermus thermophilus* HB8 – Conformational change, substrate recognition, and mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.46, p.46035–46045, 2003.

PANG, S.S.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Crystallization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. **Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography**, Copenhagen, v.60, pt.1, p.153–155, 2004.

PARIS, S.; WESSEL, P.M.; DUMAS, R. Overproduction, purification, and characterization of recombinant bifunctional threonine-sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v.24, n.1, p.105–110, 2002a.

PARIS, S.; WESSEL, P.M.; DUMAS, R. Overproduction, purification, and characterization of recombinant aspartate semialdehyde dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v.24, n.1, p.99–104, 2002b.

PARIS, S.; VIEMON, C.; CURIEN, G.; DUMAS, R. Mechanism of control of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase-homoserine dehydrogenase by threonine. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.7, p.5361–5366, 2003.

POMPEU, G.B.; VENDEMIATTI, A.; GRATAO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Saccharopine dehydrogenase activity in the high-lysine *opaque* and *floury* maize mutants. **Food Biotechnology**, Philadelphia, v.20, n.1, p.55-64, 2006.

RAVANEL, S.; BLOCK, M.A.; RIPPET, P.; JABRIN, S.; CURIEN, G.; REBEILLE, F.; DOUCE, R. Methionine metabolism in plants: chloroplast are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.279, n.21, p.22548–22557, 2004.

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.

SAMACH, A.; HAREVEN, D.; GUTFIGER, T.; KEN-DROR, S.; LIFSCHITZ, E. Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure and up-regulation in floral organs. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.7, p.2678–2682, 1991.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M.C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. **Plant Journal**, Oxford, v.24, n.3, p.357–367, 2000.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, n.2, p. 203-209, 1992a.

SHAUL, O.; GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.3, p.1157–1163, 1992b.

SHEN, B.; LI, C.J.; TARCZYNSKI, M.C. High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. **Plant Journal**, Oxford, v.29, n.3, p.371–380, 2002.

SINGH, B.K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker. 1999. 648p.

SREENIVASULU, N.; ALTSCHMIED, L.; PANITZ, R.; HAHNEL, U.; MICHALEK, W.; WESCHKE, W.; WOBUS, U. Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.266, n.5, p.758–767, 2002.

TAN, S.; EVANS, R.R.; DAHMER, M.L.; SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v.61, n.3, p.246–257, 2004.

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.

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

TEWARI-SINGH, N.; SEN, J.; KIESECKER, H.; REDDY, V.S.; JACOBSEN, H. J.; GUHA-MUKHERJEE, S. Use of a herbicide or lysine plus threonine for non-antibiotic selection of transgenic chickpea. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.22, n.8, p.576–583, 2004.

THOMAZEAU, K.; CURIEN, G.; DUMAS, R.; BIOU, V. Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v.10, n.3, p.638–648, 2001.

THOMAZEAU, K.; DUMAS, R.; HALGAND, F.; FOREST, E.; DOUCE, R.; BIOU, V. Structure of spinach acetohydroxyacid isomeroreductase complexed with its reaction product dihydroxymethylvalerate, manganese and (phospho)-ADP-ribose. **Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography**, Copenhagen, v.56, pt.4, p.389–397, 2000.

TODD, C.D.; POLACCO, J.C. AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v.223, n.5, p.1108-1113, 2006.

TORO, A.A.; MEDICI, L.O.; SODEK, L.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Distribution of soluble amino acids in maize endosperm mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, p.91-96, 2003.

TYAGI, V.V.S.; HENKE, R.R.; FARKAS, W.R. Occurrence of diaminopimelic epimerase in maize. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.719, n.2, p.363–369, 1982.

TYAGI, V.V.S.; HENKE, R. R.; FARKAS, W.R. Partial purification and characterisation of dihydrodipicolinate reductase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.73, n.3, p.687–691, 1983.

VAUTERIN, M.; FRANKARD, V.; JACOBS, M. The *Arabidopsis thaliana* dhds gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.39, n.4, p.695–708, 1999.

- WESSEL, P.M.; BIOU, V.; DORCC, R.; DUMAS, R. A loop deletion in the plant acetohydroxy acid isomeroeductase homodimer generates an active monomer with reduced stability and altered affinity. **Biochemistry**, Washington, v.37, n.37, p.12753–12760, 1998.
- 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.
- ZEH, M.; LEGGEWIE, G.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cobalamin-independent methionine synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.48, n.3, p.255–265, 2002.
- ZHOU, T.; DAUGHERTY, M.; GRISHIN, N.V.; OSTERMAN, A.L.; ZHANG, H. Structure and mechanism of homoserine kinase: prototype for the GHMP kinase superfamily. **Structure**, Philadelphia, v.8, n.12, p.1247–1257, 2000.
- ZHU, X.H.; GALILI, G. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, Berlin, v.15, n.4, p.845–853, 2003.
- ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v.135, n.1, p.129–136, 2004.
- ZHU, X.H.; TANG, G.L.; GALILI, G. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite at AtLKR/SDH locus of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, n.3, p.1363–1371, 2000.
- ZHU, X. H.; TANG, G. L.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; GALILI, G. A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, n.4, p.1539–1545, 2001.

5 ESTUDOS DE ESTRATÉGIAS INTERESSANTES PARA AUMENTAR O NÍVEL DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DA VIA DO ÁCIDO ASPÁRTICO EM PLANTAS NO PERÍODO DE 2006 ATÉ O MOMENTO

Resumo

Os aminoácidos não são simplesmente constituintes principais das proteínas, mas também atuam como precursores para muitos metabólitos que são considerados essenciais para as plantas, como também de grande eficácia na qualidade nutricional das proteínas em sementes. A composição em aminoácidos é um fator importante, pois a mitigação da deficiência dos aminoácidos essenciais da via do ácido aspártico nas sementes de cereais passou a ser um alvo extremamente importante para o melhoramento de plantas, devido aos seres humanos e animais monogástricos serem incapazes de sintetizar os aminoácidos essenciais (lisina, metionina, treonina e isoleucina) desta via. Os cereais e leguminosas são fornecidos como sementes e forragem e estão entre as mais importantes fontes nutricionais de proteína para os seres humanos e animais de todo o mundo, mas contêm níveis limitados de vários aminoácidos essenciais. As proteínas presentes nas leguminosas apresentam deficiência em metionina e cisteína, enquanto nos cereais a limitação está nos aminoácidos lisina, treonina e triptofano. Ultimamente, a tecnologia de DNA recombinante, a cultura de tecidos de plantas e regeneração *in vitro* representam estratégias interessantes para utilização em estudos visando aumentar o nível de aminoácidos essenciais através da manipulação de genes já existentes, como também a introdução de genes estranhos nas plantas, além da utilização de peptídeos sintéticos, ou até mesmo alteração dos aminoácidos presentes em uma proteína endógena, como transformar proteína heteróloga e alterar o perfil dos aminoácidos nas proteínas de reserva por meio da técnica de RNAi. Além do mais, as enzimas da via de biossíntese do ácido aspártico são de grande relevância à área de biotecnologia, sendo o alvo para o desenvolvimento de novos compostos agroquímicos e farmacêuticos. Embora várias plantas incluindo cereais e leguminosas, sejam consideradas um grande desafio para eventos de transformação, esse potencial teve um aumento considerável durante esses anos de estudo. Pesquisas têm revelado que melhorar a qualidade nutricional de sementes de cereais e leguminosas tem sido de grande importância econômica para os países em desenvolvimento, onde uma única cultura pode ser responsável por 80-90% do consumo total de alimentos para animais monogástricos e seres humanos. Por este motivo tem havido um grande interesse por parte dos pesquisadores em todo o mundo para melhorar a qualidade nutricional das sementes das plantas.

Palavras-chaves: Ácido aspártico; Aminoácidos essenciais; Enzimas; Proteínas de reservas; Cereais e Técnicas de transformação em plantas

Abstract

Amino acids play central roles both as building blocks of proteins and as precursor of many intermediates in metabolism which are not only essential in plants, but also they are responsible to offer nutritional quality in seeds. Essential amino acids compounds are very relevant due to their importance for the body because it is necessary for nutrition, and they cannot be synthesized in the organism. For that reason, researchers have been studying about these amino acids that are synthesized through the aspartate metabolic pathway, in order to improve their quality in plants. Needless to say, monogastric animals and human beings are unable to synthesize these amino acids (lysine, threonine, and isoleucine) as well. Cereals and

leguminous plants are given to animals in seeds and fodder. Likewise, human beings also get their nourishment through seeds and grains. However, these cereals present a limited level of various essential amino acids. The proteins found in leguminous plants lack methionine and cysteine, while cereals have a deficiency in lysine, threonine, and tryptophan. Recently, strategies have been developed such as recombinant DNA technology, plant culture tissues, and regeneration *in vitro*, so that the level of essential amino acids can be enhanced not only by the manipulation of genes, but also by introducing genes from another species. Also, strategies as synthetic peptides can alter amino acids in an endogenous as well as in a heterologous protein; meanwhile, iRNA technique can change the amino acids profile in storage proteins. In addition, the enzymes derived from the aspartate pathway are extremely relevant to the biotechnology field, in which new drugs and agrochemicals can be developed. Thus, many plants as leguminous plants and cereals are targeted by scientists and their potential have been altered successfully. The improvement of nutritional quality in cereal seeds and leguminous plants has shown a great value in terms of economic importance for countries in development, whereby, sometimes, only one culture can be responsible for 80-90% of the total food consumption by monogastric animals and humans. Because of that, scientists have demonstrated an enormous interest in improving nutritional quality of plants seeds.

Keywords: Aspartate; Essential amino acids; Enzymes; Storage proteins; Cereals; Transformation technique in plants

5.1 Introdução

Os aminoácidos não são simplesmente constituintes principais das proteínas, mas também atuam como precursores para muitos metabólitos que são considerados essenciais para as plantas. Embora a via de biossíntese de aminoácidos tenha sido identificada em plantas, ainda se encontra a via de regulação, o catabolismo e os metabólitos eliminados, que não são completamente elucidados (JOSHI et al., 2006).

Estudos têm mostrado que além dos vinte aminoácidos que são normalmente formados e incorporados em proteínas, também foram encontrados e acrescentados mais de trezentos tipos de aminoácidos em plantas (FERREIRA et al., 2005). Os aminoácidos também desempenham um importante papel no transporte de nitrogênio para diversas estruturas das plantas Lea; Lancien; Azevedo (2006); Todd e Polacco (2006), atuam também como reguladores nos vários processos que estão envolvidos em resposta às diversas condições ambientais, como também de grande eficácia na qualidade nutricional das proteínas em sementes (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A qualidade nutricional e física da semente é uma característica agrônômica complexa, a qual é determinada por vários fatores como, por exemplo, a quantidade de compostos de armazenamento, aparência, textura e tamanho (KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010). Os três compostos de armazenagem mais importantes do endosperma são amido, proteína de

armazenamento da semente (SSP) e lipídeos (LANDRY et al., 2005; KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010). A composição em aminoácidos é um fator importante, pois a mitigação da deficiência dos aminoácidos essenciais nas sementes de cereais passou a ser um alvo extremamente importante para o melhoramento de plantas Kawakatsu e Takaiwa (2010) em função dos seres humanos e animais monogástricos serem incapazes de sintetizar os aminoácidos essenciais (HABBEN; LARKINS, 1995; KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010).

Em sementes de cereais, a maioria dos aminoácidos é geralmente incorporada em proteínas, especialmente de SSP, em contraste com os aminoácidos livres, que não são incorporados em proteínas (KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010). As proteínas presentes nas leguminosas apresentam deficiência em metionina e cisteína Habben e Larkins (1995), enquanto nos cereais a limitação está nos aminoácidos lisina, treonina e triptofano (HABBEN; LARKINS, 1995; KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010).

Uma vez que as enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e os seus mecanismos de regulação tenham sido elucidados, tornou-se possível manipular o metabolismo de aminoácidos através da engenharia genética. A deficiência no conteúdo de aminoácidos essenciais foi melhorada através da manipulação dos genes que codificam os principais passos da via de síntese de aminoácidos pela regulação positiva de resposta de enzimas insensíveis ou pela supressão do catabolismo (UFAZ; GALILI, 2008).

Ultimamente, a tecnologia de DNA recombinante, a cultura de tecidos de plantas e regeneração *in vitro* representam estratégias interessantes para utilização em estudos visando aumentar o nível de aminoácidos essenciais através da manipulação de genes já existentes, como também a introdução de genes exógenos nas plantas, além disso, a utilização de peptídeos sintéticos, ou até mesmo a alteração dos aminoácidos presentes em uma proteína endógena, como transformar proteína heteróloga e alterar o perfil dos aminoácidos nas proteínas de reserva por meio da técnica de RNAi (SHEWRY, 2007; MATTA; SING; KUMAR, 2009; AZEVEDO; ARRUDA, 2010). Embora várias plantas, incluindo cereais e leguminosas, têm sido consideradas um grande desafio para eventos de transformação, esse potencial teve um aumento considerável durante esses anos de estudo.

A quantidade de estudos recentes acerca da biossíntese dos aminoácidos essenciais da via do ácido aspártico em plantas é muito grande, de forma que seria quase impossível apresentar toda a informação pertinente, no âmbito deste capítulo. Assim sendo, o que se procurará fazer será simplesmente uma visão geral destes aminoácidos, com ênfase em novas descobertas que foram realizadas nesses últimos 6 anos.

5.2 Revisão bibliográfica

5.2.1 A via metabólica do ácido aspártico

Em plantas e microrganismos, a via metabólica do ácido aspártico é composta por ramos metabólicos distintos que conduzem a síntese de aminoácidos essenciais, tais como lisina, metionina, treonina e isoleucina (VIOLA, 2001; FAEHNLE et al., 2006; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006; FOYER et al., 2009; BAUWE; HAGEMANN; FERNIE, 2010; AZEVEDO; ARRUDA, 2010). Os aminoácidos servem para a produção de proteínas e atuam em diversas outras vias fundamentais como a fotorrespiração, metabólitos secundários e podem até mesmo serem usados como fonte de energia (GALILI, 2011). Os aminoácidos desempenham também funções diversas para o crescimento das plantas (LESS et al., 2010).

O ácido aspártico está estreitamente ligado à síntese de proteínas, além de desempenhar um papel fundamental no metabolismo nitrogenado das plantas Medici et al. (2004); Lucas-Reina; Suárez; Cánovas (2009), como precursor da síntese da asparagina, que é um aminoácido envolvido no armazenamento e transporte de nitrogênio (LEA; AZEVEDO, 2007; LEA et al., 2007; VARISI et al., 2008; ANDREWS et al., 2009; LUCAS-REINA; SUÁREZ; CÁNOVAS, 2009). O ácido aspártico é essencial para a sobrevivência das bactérias e assim apresenta um alvo em potencial para novos agentes antimicrobianos (KUMARASAMY et al., 2010). O ácido aspártico é sintetizado pela ação da enzima aspartato aminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1) fosfato piridoxal dependente (PLPP), que catalisa a reação reversível de transaminação entre aspartato e 2-oxoglutarato para formar oxaloacetato e glutamato. As plantas apresentam isoenzimas diferentes de AAT caracterizadas, associadas a diferentes compartimentos celulares como citosol, mitocôndrias, plastos e peroxissomas (LUCAS-REINA; SUÁREZ; CÁNOVAS, 2009).

Dentre os processos bioquímicos, a biossíntese de aminoácidos tem sido considerada de grande relevância, e tem sido extensivamente estudada no sistema biológico (LESS et al., 2010). Pesquisas com microrganismos têm demonstrado catabolismo dos aminoácidos da via do ácido aspártico dentro do ciclo de Krebs, embora pouca informação seja encontrada na área botânica. Em *A. thaliana*, estudos relacionados ao metabolismo da via do ácido aspártico e a fisiologia da planta foram descobertos devido às pesquisas realizadas para aumentar o nível de lisina em sementes (ZHU; GALILI, 2003, 2004).

Por meio de abordagens bioquímicas, usando a técnica acoplada de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS), foram submetidos a análises os níveis de

metabólitos primários de sementes do genótipo KD de *A. thaliana*, que apresentaram um desenvolvimento na germinação, evidenciando o catabolismo de aminoácidos canalizado para o ciclo de Krebs (ZHU; GALILI, 2003, 2004). Todavia, os níveis de metabólitos associados ao ciclo de Krebs foram reduzidos no processo de germinação e desenvolvimento das sementes (ANGELOVICI et al., 2009; ANGELOVICI et al., 2011).

Em plantas, tem sido relatado que a biossíntese do ácido aspártico nos cloroplastos é catalisada por duas diferentes enzimas Aspartato aminotransferase (AAT): um tipo eucariota previamente caracterizada e outro tipo procarionte (PT-AAT) semelhante a enzimas bacterianas e arqueobactérias. Baseadas em abordagens moleculares e cinéticas demonstraram que a AAT do tipo eucariota está envolvida na translocação de equivalentes redutores através da membrana plastídica, enquanto o PT-AAT poderia estar envolvido na biossíntese dos aminoácidos derivados do ácido aspártico dentro da organela (DE LA TORRE et al., 2006). Dessa forma, De La Torre et al. (2006) fizeram um modelo comparativo de enzima PT-AAT a partir da planta *Pinus pinaster* (PpAAT), sendo realizado por meio de raios X das estruturas de uma AAT bacteriana (*Thermus thermophilus*). Em planta, essa enzima apresenta uma estrutura tridimensional e homodimérica, a qual tem sido utilizada para estudar a importância funcional dos resíduos de aminoácidos no seu centro ativo. Esse modelo de estrutura é similar ao que foi descrito para outras enzimas de AAT a partir de organismos eucarioto e procarioto, com dois equivalentes sítios ativos, formado, cada um, por resíduos destas subunidades do homodímero.

5.2.2 Enzimas da via do ácido aspártico

As enzimas da via metabólica do ácido aspártico são de grande relevância à área de biotecnologia, sendo o alvo para o desenvolvimento de novos compostos agroquímicos, por exemplo, imazetapir, imazamox Ashigh e Tardif (2007); Sales et al. (2008); Walsh et al. (2012), flucarbazone, sulfosulfuron, Walsh et al., (2012), glifosato Sales et al. (2008), primisulfuron Ashigh e Tardif (2007) e farmacêuticos, por exemplo, florasulametriazolopirimidina (DÉLYE; PERNIN; SCARABEL, 2011). Cada tipo de herbicida é desenvolvido de acordo com as necessidades específicas de atuação e, por isso, atuam de forma a combater as plantas invasoras com eficácia (VIDAL, 1997; PETERSON et al., 2001; OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN, 2001).

Esses grupos de herbicidas agem de acordo com seu agente ativo ou mecanismo de ação: inibidores da síntese do tetrapirrole, inibidores de fotossíntese, inibidores de divisão

celular, mimetizadores da auxina, inibidores da síntese de lipídeos, inibidores da síntese de carotenoides e inibidores da síntese de aminoácidos (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008). Esses herbicidas são utilizados para inibir a atividade de uma enzima/proteína na célula e, conseqüentemente, desencadeiam diversos processos bioquímicos que matam ou paralisam o desenvolvimento da célula e ao mesmo tempo causando a inibição do crescimento da raiz e morte da planta (VIDAL, 1997; PETERSON et al., 2001; OLIVEIRA JUNIOR; CONSTANTIN, 2001).

Nas plantas, esta via é altamente controlada pelas enzimas alostéricas: aspartato quinase, (AK, EC 2.7.2.4); homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3); ácido acetohidroxi sintase (AHAS/ALS, EC 4.1.3.18); Dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52); Treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2); Treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006; MAS-DROUX et al., 2006). Dentre estas enzimas, AK, AK-HSDH, TD e AHAS possuem domínios de regulação que pertence à família de domínio ACT (Pfam 01842) (MAS-DROUX et al., 2006). De acordo com Aravind e Koonin (1999) e Anantharaman, Koonin e Aravind (2001), o domínio ACT (AK, corismato mutase e tirosina A) corresponde a uma ligação-ligante de domínio regulatório que foi fundido em uma grande variedade de proteínas durante a evolução da proteína.

5.2.2.1 Aspartato quinase

A enzima aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4) catalisa a fosforilação do grupo do β -carboxílico do composto aspartato em aspartil-fosfato na presença de ATP (ROBIN et al., 2010) que está envolvida na primeira reação dos aminoácidos derivados da via do ácido aspártico. A AK é a precursora da síntese de vários aminoácidos essenciais. Para controlar o fluxo de síntese nestas vias, os organismos desenvolveram uma série de estratégias, incluindo a criação de diversas enzimas alostéricas (CURIEN et al., 2005; CURIEN et al., 2008). Dentre estas enzimas alostéricas, a AK é a que demonstra as diferenças mais drásticas, tanto ao nível das suas propriedades alostéricas como ao de suas organizações estruturais (ROBIN et al., 2010).

Azevedo et al. (1997) relatam que a atividade da AK é determinada pela ação de duas isoenzimas separadas, uma sensível à inibição por lisina, enquanto a outra sensível à inibição por treonina. Sendo assim, a partir de estudos com *A. thaliana* foi observado em plantas um estado mais complexo devido à presença das três AKs monofuncionais, como AK1, AK2 e AK3 com mais duas bifuncionais da AK- HSDH que são as AKI-HSDHI e AKII-HSDHII. A

AK1 é sinergicamente inibida por lisina e S-adenosilmetionina (SAM) (CURIEN et al., 2007; MAS-DROUX et al., 2006), a AK2 e AK3 são inibidas apenas por lisina (CURIEN et al., 2007). As isoformas AK-HSDHI e AK-HSDHII são inibidas por treonina (GHISLAIN et al., 1994). Para Robin et al. (2010) em AK a subhomologia AK α e AK β depende da presença de uma sequência extra de cerca de 60 aminoácidos, que se encontra apenas no terminal-N de todos os de AK α .

Wang et al. (2007), após analisar a sequência de nucleotídeos do gene *ask2*, que codifica a isoforma monofuncional de AK presente no cromossomo 2 do milho, observaram que esses nucleotídeos diferem em um único aminoácido da região C-terminal, propondo assim, um novo mecanismo de regulação para a isoenzima AK monofuncional, com a possibilidade desta região desempenhar uma importante função na regulação da atividade básica desta enzima.

Entretanto, os microrganismos possuem uma organização mais simples, que é visto em algumas bactérias primitivas do tipo arqueobactérias como, por exemplo, a *Methanococcus jannaschi*. Somente a treonina é sintetizada pela *M. jannaschi* utilizando o aspartato e a enzima alostérica AK, que é sensível à treonina (FAEHNLE et al., 2006; LIU; PAVLOVSKY; VIOLA, 2008). Nas cianobactérias, as quais são mais evoluídas, como a *Synechocystis*, a via do ácido aspártico é a responsável pela síntese da treonina e lisina, sendo que as mesmas são controladas pela AK. Há duas estruturas na AK sendo que na *Synechocystis*, a estruturada AK β revela uma sequência complementar que é ligada no modo de dimerização das AKs. A ausência desta sequência em AK β leva à dimerização pelo domínio catalítico, ao invés de envolver os domínios ACT (Pfam 01842) (ROBIN et al., 2010). Os domínios ACT são pequenos domínios encontrados em enzimas alostéricas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e de moléculas de base purina. Esses domínios de sigla ACT são encontrados nas enzimas AK, corismato mutase e tirosina A, que apresentam uma estrutura secundária conhecida como $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, responsável pela regulação funcional das proteínas (CHIPMAN; SHAANAN, 2001).

O domínio catalítico da AK pertence aos aminoácidos da família quinase (Pfam 00696). Esse domínio é dividido em dois lobos, o lobo-N que é convertido em sítio de ligação do aspartato, e o lobo-C, responsável pela ligação de nucleotídeos de ATP (ROBIN et al., 2010).

Um aspecto extraordinário do domínio ACT é a sua capacidade de se ligar a diversos tipos de ligantes e exibir uma variedade de organizações de domínios (GRANT, 2006). Além do mais, a AK apresenta dois domínios de ACT em um único polipeptídeo sendo que o

domínio ACT2 está inserido no domínio ACT1 (FAEHNLE et al., 2006; MAS-DROUX et al., 2006; KOTAKA et al., 2006).

Desta forma, entende-se que a AK apresenta uma rede de enzimas alostéricas distintas entre os organismos (CURIEN et al., 2008). As duas situações anteriormente citadas demonstraram que arquitetura dos aminoácidos derivados da via do aspartato está intrinsecamente relacionada aos tipos de controle (CURIEN et al., 2008; CURIEN et al., 2009).

Assim sendo, baseada na descrição acima, a análise estrutural do *Synechocystis* AK β revelou um dímero com uma nova arquitetura. Os quatro domínios ACT de cada monômero interagem em conjunto, não apresentando contato com os do segundo monômero. A interação entre ACT1 e ACT4 ou entre ACT2 e ACT3 gera um sítio de ligação de treonina, e um local de ligação da lisina em cada interface. Desta maneira, é formado um total de oito sítios reguladores por dímero, permitindo um ajuste fino da atividade AK pelos produtos finais de treonina e lisina (ROBIN et al, 2010).

Além de sua importância científica, a AK é uma enzima promissora para os campos da agronomia, biotecnologia e farmácia. Os aminoácidos derivados da via do ácido aspártico estão ausentes nos animais monogástricos. Esses aminoácidos, conhecidos como essenciais devem ser enquadrados na dieta, e são adquiridos por meio de plantas e microrganismos (DUMAS et al., 2012).

5.2.2.2 Homoserina desidrogenase

A homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) catalisa a redução do aspartato β -semialdeído (ASA) em homoserina com a participação do composto NADH ou NADPH Curien et al. (2005); Qi et al. (2011), sendo, a primeira enzima do ramo que conduz à síntese de treonina e metionina Azevedo; Smith; Lea (1992); Azevedo; Lancien; Lea (2006), como também, compartilhando o mesmo substrato ASA com a enzima DHDPS (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Em plantas, a homoserina está presente em conjunto de polipeptídeo bifuncional de AK sensível à treonina. A inibição da atividade das enzimas HSDH I e II pela treonina é mais elevada do que a inibição ocorrida na AK. Dentre os seis efetores alostéricos da AK conhecidos, como alanina, cisteína, leucina, serina, valina e isoleucina, apenas a cisteína inibe a atividade da enzima HSDH (CURIEN et al., 2005).

Tem sido encontrado e relatado que diversas espécies de plantas apresentam a HSDH em duas formas de isoenzimas, uma sensível e outra resistente à inibição por treonina, sendo

que esta última se apresenta como uma isoforma monofuncional, encontrada no citoplasma, com a função desconhecida (AZEVEDO; SMITH; LEA, 1992; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Diante desta afirmação, em estudos com sementes imaturas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), foi observado que atividade da HSDH mostrou ser parcialmente inibida por treonina, enquanto uma parte da atividade foi resistente ao efeito inibidor, indicando a presença de duas isoenzimas, uma resistente e a outra sensível à inibição por treonina (VARISI et al., 2008). Estudos com plantas têm demonstrado que AK e HSDH são as principais enzimas reguladoras em pontos de ramificação na via do ácido aspártico e são inibidas por retroinibição pela treonina. Em plantas, as características bioquímicas das enzimas de AK e as bifuncionais AK-HSDH têm sido caracterizadas, mas as propriedades moleculares da isoforma de HSDH monofuncional permanecem sem análise (SCHROEDER et al., 2010). Para descobrir o papel dessa enzima, Schroeder et al. (2010) clonaram o cDNA que codifica o gene (GmHSD) da HSDH monofuncional da soja. Esse estudo confirmou que a enzima HSDH (K_i 160-240 mM) apresenta uma inibição por treonina, mais de 1000 vezes acima dos níveis fisiológicos. Por outro lado, as duas isoformas de AK-HSDH são sensíveis à inibição por treonina ($K_i \sim 150 \mu M$) em soja. Além disso, o gene GmHSD da HSDH não é inibido por outros aminoácidos derivados da via do ácido aspártico. A taxa de atividade de HSDH resistente à treonina para HSDH sensível à treonina em tecidos de soja varia, e provavelmente reflete demandas diferentes para a biossíntese de aminoácidos. Esta é a primeira clonagem e caracterização bioquímica pormenorizada de uma isoforma de HSDH monofuncional, sendo alterada na sua sensibilidade à retroinibição. A HSDH resistente à treonina é uma ferramenta útil da biotecnologia para a manipulação dos aminoácidos da via do ácido aspártico para aumentar a produção de treonina e metionina em plantas, melhorando o conteúdo nutricional.

5.2.2.3 Aspartato semialdeído desidrogenase

A enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, E.C 1.2.1.11) é altamente conservada, homodimérica e codificada pelo gene *asd* Paidhungat et al. (2000); Viola (2001), está envolvida na conversão do β -aspartil fosfato em β -aspartato semialdeído (ASA) com a participação de NADPH (PAIDHUNGAT et al., 2000; VIOLA, 2001; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Depois disso, o percurso é dividido em dois ramos, um que leva à formação de lisina, enquanto o outro ramo é dividido em dois sub-ramos, sendo um que conduz à síntese de treonina e o outro de metionina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

ASADH é uma enzima comum para a biossíntese dos aminoácidos essenciais lisina, treonina, metionina e isoleucina. Além de executar um passo chave na produção de ácido diaminopimélico (DAP) (PAIDHUNGAT et al., 2000; VIOLA, 2001). Diferentemente das enzimas encontradas nas etapas catalíticas, que estão rodeadas de ASADH, não há enzimas análogas que possam substituir a função catalítica de ASADH (VIOLA, 2001).

A estrutura desta enzima foi determinada a partir de bactérias (FAHENLE et al., 2006) e fungos (ARACHEA et al., 2010). O papel vital de ASADH em bactérias tem sido demonstrado através da criação de mutantes *Salmonella enterica* deficientes no gene *asd* (LOESSNER et al., 2006).

A enzima ASADH formou metabólito inicial na via de biossíntese de aminoácidos essenciais e moléculas *quorum sensing*. O estudo desenvolvido por Luniwal et al. (2012) encontrou novos inibidores micromolares de ASADH, cuja utilidade corrobora a identificação de novas classes de enzimas inibidoras. Essas enzimas em potencial foram encontradas através da técnica *screening* virtual de uma pequena biblioteca de compostos, que identificou novas estruturas de membranas que podem servir como inibidores de ASADH. A técnica molecular de *docking* foi utilizada para priorizar análogos dentro de cada classe para síntese e teste contra as formas representativas bacterianas de ASADH.

5.2.2.4 Homoserina quinase

A homoserina quinase (HK, E.C 2.7.1.39) é responsável por catalisar a formação de O-fosfohomoserina, a partir da homoserina levando assim, à síntese de treonina ou metionina (THOEN et al., 1978; BAUM; MADISON; THOMPSON, 1983; ZHOU et al., 2000; RINDER et al., 2008).

Rinder et al. (2008), com propósito de esclarecer a função da HK no metabolismo celular, utilizaram o gene ortólogo (gene que evolui de forma divergente entre as espécies) *thrB* da HK da *E. coli* que foi expresso em plantas de batata, sendo a proteína EcHSK encaminhada para o cloroplasto e citosol. Estas abordagens demonstraram em até 11 vezes o aumento da atividade enzimática total da HK. As plantas transgênicas apresentaram redução dos níveis de HK enquanto a treonina e a metionina não acumularam de forma significativa. No entanto, o precursor da cisteína e os intermediários da metionina tais como a cistationina e a homocisteína indicaram um fluxo acelerado de carbono nos produtos finais. Coincidentemente, plantas com níveis elevados da proteína *EcHSK* no citosol apresentaram uma redução nos níveis de transcrição da *HK* endógena, bem como da treonina

sintase (TS), cistationina β -liase (CBL) e metionina sintase (MS). Em todas as plantas, a expressão da cistationina γ -sintase (CGS) permaneceu relativamente inalterada em relação aos níveis do tipo selvagem, enquanto ocorreu o aumento na expressão da S-adenosilmetionina sintase (S-SAM). Estudos com a aplicação de HK exógena, estimulando síntese de metionina e treonina, mantiveram conservada a regulação da síntese destes aminoácidos em plantas selvagens. Estas análises indicaram que o excesso de atividade da HK nos plastídios não influenciou na nova síntese de metionina e treonina. No entanto, a expressão de HK no citosol resultou na diminuição da regulação da expressão dos genes das vias, provavelmente mediado através do OPHS.

Com intuito de compreender os mecanismos responsáveis pelo aumento da qualidade da proteína nas variedades QPM, Berdejo et al. (2009) estudaram a atividade de HK em sementes imaturas de milho. Essas sementes são da linhagem tipo selvagem *L161n* e linhagens de *Quality Protein Maize* (QPM), *L161q*, e *opaco L161o* colhidas com 14, 20 e 24 dias após a polinização (DAP). O maior nível de atividade de HK foi observado em *L161o*. A *L161q* apresentou o mesmo padrão de atividade de HK durante o desenvolvimento do endosperma. Sendo assim, foi adicionada uma quantidade de isoleucina que induziu fortemente a inibição da atividade da enzima em *L161n*. Atividade de HK foi significativamente inibida por treonina na *L161o* e *L161q*. Além deste aminoácido, adicionaram também SAM, o qual foi capaz de inibir atividade HK em *L161q*. No entanto, a adição de lisina e metionina ao ensaio de HK não apresentou qualquer efeito inibitório.

Dessa forma, Van Damme et al. (2009) estudaram a clonagem baseada no mapeamento que revelou que o gene *DMRI* (downy mildew resistant 1) codifica a enzima HK. Seis mutantes *dmr1* independentes carregando uma substituição de aminoácidos diferente na proteína HK foram estudados. A análise dos aminoácidos revelou que os mutantes *dmr1* contêm níveis elevados de homoserina, e em plantas do tipo selvagem esse aminoácido é indetectável. Além disso, o nível de aminoácidos encontrados na via metabólica do ácido aspártico não se apresentou reduzido nos mutantes *dmr1*. Foi também identificado que a homoserina exógena não afeta diretamente o crescimento do patógeno, mas induz à resistência, quando inserido em *Arabidopsis*. Sendo assim, os pesquisadores obtiveram evidências de que a acumulação de homoserina no cloroplasto está relacionada com uma nova forma de resistência ao mildew, que se apresenta independente de vias de defesa conhecidas.

5.2.2.5 Treonina sintase e cistationina γ sintase

A enzima treonina sintase (TS, E.C 4.2.3.1) catalisa o fosfato piridoxal (PLP) dependente de hidrólise de *S*-fosfohomoserina (OPH) para produzir treonina e fosfato inorgânico, em bactérias e plantas. A enzima TS foi estudada em uma variedade de espécies de microorganismos, incluindo fungos, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Thermus thermophilus*, e *Escherichia coli*, bem como a partir de várias espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Beta vulgaris* e *Lemna* (RAMOS; CALDERON, 1994; LABER et al., 1999). A enzima TS é limitada para plantas e bactérias, sendo um alvo atrativo para aplicações biotecnológicas, por exemplo, o desenvolvimento de compostos antimicrobianos e herbicidas, como também a manipulação da biossíntese de aminoácidos, sendo esta última, capaz de produzir variedades de culturas, com maior teor nutricional (THOMAZEAUS; CURIEN; DUMAS, 2001; COVARRUBIAS et al., 2008).

Morneau et al. (2012) desenvolveram um ensaio espectrofotométrico contínuo de TS, juntamente com o processo de purificação para o substrato OPH, apresentando assim, um método rápido e rigoroso para estudar os parâmetros cinéticos de TS. Dessa forma, as reações das enzimas treonina desaminase (TD) e a treonina sintase (TS) transformaram o produto da treonina para α -cetobutirato (α -KB), logo em seguida para 2-hidroxibutirato.

A cistationina γ -sintase (CGS) é a primeira enzima específica da via de biossíntese de metionina em tecidos vegetais. Esta enzima combina o fluxo de carbono com enxofre aos aminoácidos sulfurados derivados do ácido aspártico e desempenha um papel importante na regulação da síntese da metionina em plantas superiores (RAVANEL et al., 1998; BARTLEM et al., 2000; ZEH et al., 2001; AMIR et al., 2002; KIM et al., 2002; HESSE; HOEFGEN, 2003; AVRAHAM; AMIR, 2005; GALILI et al., 2005; LEE et al., 2005; ONOUCH et al., 2005; HACHAM et al., 2006; HACHAM et al., 2007; AMIR, 2010). Esta enzima é superexpressa em cloroplastos (RAVANEL et al., 1998).

Por meio de estudos de mutagênese com *Arabidopsis thaliana* foram observadas algumas alterações na enzima cistationina γ -sintase (AtCGS) nos mutantes *mtol* e *mtol2*, conduzindo a um alto teor de metionina (ONOUCHI et al., 2004). A superexpressão da enzima AtCGS em plantas como *Arabidopsis*, tabaco, batata e alfafa Kim et al. (2002); Di et al. (2003); Avraham et al. (2005); Hacham et al. (2006 e 2008) levou a um aumento significativo no conteúdo de metionina. Devido a metionina ser considerada de grande relevância para o metabolismo das plantas, a enzima cistationina γ -sintase (AtCGS) se

apresenta altamente regulada. O nível de transcrição dessa enzima é regulada pelo primeiro metabólito da biossíntese de metionina, SAM Chiba et al. (2003); Hacham et al. (2007) que pode ser devido a uma redução dos transcritos codificadores da S-adenosilmetionina sintase (SAMS) Hacham et al. (2007), enquanto a treonina, os derivados de SAM e o hormônio etileno podem também aumentar a transcrição do nível da enzima CGS (AVRAHAM et al., 2005 ; KATZ; GALILI; AMIR, 2006).

Após a realização de ensaios de imunodeteção e purificação da CGS em várias espécies de plantas, foi descoberto em *Arabidopsis* dois polipeptídeos codificados pelo mesmo gene (*CGSI*) com o transcrito *At3g01120* (RAVANEL et al., 1998; HACHAM et al., 2006). O primeiro polipeptídeo migrava com o tamanho de 53 kDa da CGS madura (MCGS), enquanto o segundo aparecia com aproximadamente 50 kDa. Baseado nos estudos de Hacham et al. (2006), o polipeptídeo de 50 kDa representa a tradução de um transcrito da CGS, com uma deleção 87 ou 90 nucleotídeos localizados na região N-terminal.

No transcrito cistationina γ -sintase (CGS) foram identificados dois subdomínios na região reguladora N-terminal. O primeiro, denominado MTO1, é uma região conservada, em que tanto a transcrição e os níveis da enzima CGS (*AtCGS*) são regulados indiretamente pela metionina e S-adenosilmetionina (SAM) (CHIBA et al., 1999, 2003; ONOUCHI et al., 2005). O outro domínio é 90 nt mais longo e está localizado dentro da região regulatória do transcrito CGS em *Arabidopsis* e tem um papel significativo na modulação do nível de transcritos CGS em resposta à metionina, uma vez que a deleção deste domínio de 90 nt anula a sensibilidade à metionina (HACHAM et al., 2006).

Para elucidar a relação do domínio N-terminal da cistationina γ -sintase com a síntese de metionina, Loizeau et al. (2007) induziram a deficiência de folato em células de *Arabidopsis* cultivadas em diferentes condições, usando inibidores antifolato, os quais removeram uma maquinaria proteolítica, causando então, uma remoção de 92 aminoácidos no N-terminal da CGS, acarretando, assim, a supressão da regulação da cistationina γ -sintase (CGS) e, conseqüentemente a síntese de metionina, como também, afetando a homeostase de vários metabólitos, associados ao metabolismo da metionina. O processo do domínio N-terminal da CGS está associado com a ausência de folatos Loizeau et al. (2007), sendo que estes estão envolvidos como cofatores nas chamadas “reações de transferência de carbono”, sendo de importância vital a todos os organismos vivos (SCOTT; RÉBEILLE; FLETCHER, 2000; TRUMBO et al., 2003).

Estudos revelam que o teor de metionina é controlado pelo nível de treonina sintase, como também da *AtCGS*. A treonina sintase compete com a CGS por seu substrato

comum, *O*-fosfohomoserina Amir et al. (2002), favorecendo o fluxo de carbono aos aminoácidos derivados do aspartato (AVRAHAM; AMIR, 2005; HACHAM et al., 2008). Além do mais, o nível de metionina solúvel também pode ser controlado pela taxa de catabolismo da metionina (RÉBEILLE et al., 2006; ROJE, 2006; GOYER et al., 2007).

5.2.3 Metabolismo de lisina

O metabolismo é uma das redes mais importantes e mais reconhecidas dentro dos sistemas biológicos (SWEETLOVE; FELL; FERNIE, 2008). Metabolismo de lisina mostrou ser regulado tanto pela taxa de síntese, como também pelo catabolismo deste aminoácido, através da via do ácido α -amino adípico (ZHU; GALILI, 2004; LESS; GALILI, 2009).

Para que as redes metabólica e transcricional, associadas com o metabolismo de lisina fossem elucidadas, Angelovici et al. (2009) utilizaram sementes de *Arabidopsis thaliana* em desenvolvimento como um sistema, no qual a síntese de lisina pode ser estimulada ao nível de desenvolvimento da planta sem aplicação de substâncias químicas e conectado com a inserção de um T-DNA silenciado que implica no catabolismo de lisina. Esta perturbação metabólica específica da semente estimulou o acúmulo de lisina a partir do início do acúmulo das proteínas de reserva. Os resultados mostraram que a resposta do metabolismo da semente à alteração induzida no metabolismo de lisina foi relativamente pequena.

Demonstraram, ainda, que o metabolismo de lisina está fortemente associado com a operação do ciclo do ácido tricarboxílico, quando desconectada das outras redes metabólicas. Em contraste, a alteração do metabolismo de lisina foi fortemente associada a uma rede de genes, estimulando a expressão de centenas de genes controladores de processos anabólicos que são associados com o desempenho e vigor da planta. O efeito mais evidente da alteração induzida do metabolismo de lisina foi uma indução de expressão de um grande conjunto de genes codificadores de proteínas ribossomais, assim como genes codificadores de fatores de iniciação e alongamento de fatores de transcrição, sendo que tudo isso está associado à síntese de proteína. Em relação à regulação metabólica, alteração de metabolismo de lisina induzida, foi primeiramente associada com a expressão de genes alterados pertencentes à rede de metabolismo dos aminoácidos e açúcares (ANGELOVICI et al., 2009).

A lisina apresenta um baixo teor nos cereais, os quais são uma das principais fontes de proteína na dieta dos animais monogástricos. Esse baixo teor é devido à consequência de processos complexos que envolvem a síntese Arruda et al. (2000), a incorporação em proteínas Arruda et al. (2000); Ferreira et al. (2005) e a degradação (ARRUDA et al., 2000).

O aminoácido essencial lisina é sintetizado em plantas superiores pela via metabólica do ácido aspártico Gaziola et al. (2007), contudo, não é a principal fonte deste aminoácido para o desenvolvimento das sementes, a qual representa cerca de 5% dos aminoácidos livres, que são translocados dos tecidos vegetativos para os tecidos do endosperma no decorrer do desenvolvimento da semente (ARRUDA; SILVA, 1979). A lisina corresponde aproximadamente a 1,5% para o completo desenvolvimento do endosperma (ARRUDA; SILVA, 1983). Desta forma, o excesso do aminoácido lisina é catabolizado para manter o teor de lisina livre em níveis que não inibem a atividade de outras enzimas ou a síntese proteica (ARRUDA; SILVA, 1983; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Além disso, o catabolismo de lisina desempenha um papel na regulação do nível de lisina livre durante o desenvolvimento das sementes (ARRUDA et al., 2000; GALILI, 2004; STEPANSKY et al., 2006).

Toro et al. (2007) realizaram um estudo para comparar a composição de proteínas de armazenamento em endosperma de semente de milho, através dos mutantes *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* com o tipo selvagem *Oh43+*. Análises de imagem mostraram diferenças na abundância (% volume maior do que 1,5X) e a presença ou ausência de proteínas, quando comparadas com *Oh43+*. O *o1* e *fl2* que apresentaram 10 proteínas expressas diferentes, enquanto *o2* e *fl1* apresentaram 16 e 15, respectivamente. Além disso, 7 proteínas foram encontradas em *o1*, 8 no *o2*, 6 no *fl1* e 10 no *fl2*. Este estudo levou a compreender que estas diferenças indicavam uma possível correlação com o aumento nos níveis de lisina nesses mutantes, sugerindo que, por meio do recurso da biotecnologia, se pode aumentar os níveis de lisina no milho.

Uma estratégia utilizada para incrementar o valor nutricional de uma espécie selecionada tem sido a transformação de plantas através de um gene codificador de uma proteína heteróloga. Isso, por exemplo, é demonstrado por Yu et al. (2004) com a descoberta do gene de uma proteína específica de grãos de pólen de batata (*Solanum berthaultii*) rica em lisina, denominada sb401 que foi expresso em milho sob o controle de um promotor da α -zeína de 19 kDa, aumentando a concentração de lisina de 16,1 para 54,8% e proteína total de 11,6% para 39% em comparação com as plantas transformadas com o controle não transformado, levando, assim, à produção do milho transgênico Y642. Posteriormente, He et al. (2009) analisando a composição das sementes do Y642, confirmaram que as concentrações de lisina e proteína total foram maiores do que com as sementes de milho produzidas a partir de uma linhagem QPM (Nongda 108) não transgênica. Esse milho transgênico Y642 foi submetido a testes de toxicologia. As sementes de milho de Y642 ou Nongda 108 foram incorporadas nas dietas de roedores com baixas (30%) ou elevadas (76%) concentrações,

durante 90 dias. Obtiveram-se resultados sem nenhuma diferença entre os ratos, o que demonstrou que o milho Y642 rico em lisina é tão seguro e nutritivo quanto o milho convencional qualidade da proteína (QPM).

De modo análogo a este trabalho, foi realizado por Zhou et al. (2012) com o arroz transgênico produzido pela fusão de genes que expressavam uma proteína rica em lisina em sementes germinativas de arroz. Análise de composição do arroz rico em lisina mostrou que a concentração absoluta de lisina foi significativamente superior em comparação com um arroz não-transgênico. Provavelmente, a lisina é o primeiro aminoácido essencial limitante no arroz. Devido a esta importância na qualidade nutricional, tem havido um interesse maior em melhorar o conteúdo de lisina em arroz. Os resultados desse estudo foram baseados na comparação de três gerações de ratos alimentados com o arroz transgênico com os outros alimentados com arroz convencional. Posteriormente, foram realizados testes toxicológicos nesses roedores. Os resultados deste estudo demonstraram que o arroz rico lisina é tão seguro quanto o arroz não-transgênico.

Ambrozevicius et al. (2009) produziram plantas transgênicas de milho, com a super expressão da proteína zeolina, a qual contém uma combinação da proteína faseolina do feijão mais a γ -zeína do milho sob controle de um promotor endosperma específico isolado da γ -kafirina de sorgo. Esta proteína apresentou vários resíduos de lisina que foram observados em quase 100 plantas entre 70% a 160% de aumento na fração de prolaminas e até 2,6 vezes no armazenamento de zeína.

Huang et al. (2006), trabalhando também com milho, utilizaram a técnica de RNAi, a fim de modificar a composição das proteínas de reserva, sendo o alvo a supressão das proteínas α -zeína de 19 kDa e α -zeína de 22 kDa. Sendo assim, foi demonstrada uma redução na proporção de zeínas, favorecendo o aumento da fração de glutelina em maior proporção enquanto nas frações albumina/globulina a proporção foi reduzida. De modo análogo, Frizzi et al. (2010) apresentaram que a substituição das α -zeína de 19 e 22 kDa, as quais apresentam proteínas com baixa concentração de lisina, por frações proteicas demonstrando uma quantidade de aminoácidos balanceados e com maior teor de lisina na composição dessas frações proteicas, tais como as globulinas, albuminas e glutelinas, as quais contribuíram para aumentar a concentração de lisina e triptofano nas sementes.

Estudos semelhantes a esses foram mostrados por Kawakatsu et al. (2010) com a produção de diferentes linhagens transgênicas com a cultura do arroz, apresentando o padrão de proteínas de reserva alterado. Utilizaram a técnica de RNAi para estudar a supressão separadamente dos genes codificadores das glutelinas, globulinas ou prolaminas. Foi

observada a redução de uma determinada proteína de reserva que contribuiu para um incremento compensatório de outras proteínas, tanto nos transcritos de mRNA quanto no acúmulo nos níveis de proteínas. Foram apresentadas, principalmente nas plantas que mostraram redução na prolamina de 13 kDa, alterações significantes no conteúdo de aminoácidos essenciais, com aumento de 56% nos teores de lisina nas sementes quando comparado ao controle não transformado. A partir disso, foi sugerido que esse incremento é devido a maior nível de proteínas com alta concentração de lisina em substituição de 13 kDa de prolamina que apresenta baixa concentração de lisina.

Outra abordagem utilizada foi a identificação de vários QTLs relacionados com o conteúdo de aminoácidos em milho. Esses QTLs representam 39% da variação ocorrida no conteúdo total de aminoácido. Identificaram-se seis QTLs com 49,1% da variação no conteúdo desses aminoácidos, quatro QTLs com 57,3% e três QTLs com 32,1%, respectivamente para os aminoácidos triptofano, metionina e lisina (GUTIÉRREZ-ROJAS et al., 2010).

Em estudos com cevada, Lange et al. (2007) observaram diferenças significativas entre as prolaminas ricas (B, D e γ hordeínas) e as pobres (C hordeína) em enxofre com propósito de interromper ou reduzir a expressão do subgrupo C hordeína por meio da técnica de RNAi. Realizaram a integração no genoma da cevada de uma sequência antisense do gene que codifica as C hordeínas, a fim de silenciar os genes dessas proteínas pós-transcricionalmente que contribuíram para a formação de linhagens transgênicas de cevada com o perfil da proteína de reserva alterado. Com o método via *Agrobacterium* para transformação de plantas foram produzidas 35 linhagens transgênicas. Dentre essas linhagens, 6 foram selecionadas expressando a sequência antisense do gene C hordeína em folhas, através da técnica RT-PCR, conforme a forte expressão constitutiva do promotor ubiquitina em milho. A escolha desse promotor foi devido à forte expressão em sementes de cevada. Outra técnica utilizada foi Southern blot, apresentando duas linhagens (L1 e L2) com um único sítio de integração do transgene, uma vez que a linhagem L2 mostrou também dois sítios de ligação de integração. Além desses, mais quatro sítios de integração foram identificados nas linhagens L3, L5 e L6. Notaram também que podem ser apresentados rearranjos e/ou deleções em L1, L2, L3 e L5.

Têm sido realizados inúmeros estudos abordando as bases moleculares das prolaminas. No entanto, ainda é preciso elucidar sobre a estrutura e evolução das regiões no genoma da cevada que apresentam os genes que codificam essas moléculas (STEIN, 2007; XU; MESSING, 2009; HAN et al., 2010).

Os estudos da genética molecular e bioquímica ultimamente têm evidenciado e sugerido que a síntese de lisina e o catabolismo são regulados por mecanismos complexos. A enzima DHDPS é primeira e única para a síntese de lisina, e existem provas substanciais de que esta enzima exerce um controle maior sobre a síntese desse aminoácido essencial (GAZIOLA et al., 2007). No entanto, a enzima bifuncional LOR-SDH que regula o catabolismo de lisina Arruda et al. (2000); Stepansky (2006); Gaziola et al. (2007); Reyes et al. (2009) tem sido alvo de pesquisa somente nos últimos anos (GAZIOLA et al., 2007).

Galili e Less (2007) relataram que a interação regulatória que ocorre entre as enzimas DHDPS e LOR-SDH e a sua relativa importância ainda é desconhecida.

Houmard et al. (2007) relatam que a supressão do catabolismo de lisina em milho transgênico com o recurso da técnica RNAi pela transformação da planta, segundo a construção *IR-SDH*, que representa uma sequência invertida do domínio SDH da enzima LOR-SDH, que está sob o controle do promotor endosperma específico, levou ao acúmulo de uma quantidade significativa de lisina solúvel no endosperma da semente. Logo após, Reyes et al. (2009), estudando também o catabolismo de lisina em plantas transgênicas de milho, descobriram que a supressão da LOR/SDH, durante o desenvolvimento do endosperma, induzia um aumento considerável de lisina livre, em 32 dias após a polinização. Posteriormente, durante as fases do desenvolvimento do grão, a maior parte da lisina livre foi encontrada no embrião juntamente com elevado nível de sacaropina. Por meio de cruzamentos, combinaram a supressão de LOR/SDH no endosperma com a supressão de LOR/SDH no embrião, causando, assim, redução no nível de sacaropina no embrião e resultando em um maior acúmulo no nível de lisina livre em sementes maduras.

Outro método para diminuir o catabolismo de lisina foi apresentado por Frizzi et al. (2008), os quais aplicaram a expressão simultânea de uma enzima insensível à inibição por lisina, a DHDPS de *Corynebacterium glutamicum* (*CordapA*) juntamente com a técnica de RNAi, que foi realizada por um cassete de expressão com uma sequência repetida invertida de LOR-SDH (*IR-LOR/SDH*) sendo inserida em um íntron do transgene que expressa a *CordapA*, proporcionando assim, elevados níveis de lisina solúvel. Por outro lado, a elevação significativa dos níveis de lisina em sementes de *Arabidopsis* pelo aumento da síntese e catabolismo bloqueado provocou um retardo no processo de germinação (ANGELOVICI, 2011).

Estudos têm confirmado que o metabolismo de lisina em plantas é principalmente regulado por dois componentes fundamentais: a enzima DHDPS, cuja atividade é dependente da retroinibição alostérica por lisina. O segundo seria o gene que codifica um polipeptídeo

bifuncional LOR-SDH (GALILI; LESS, 2007) que está envolvido nas duas reações enzimáticas do catabolismo de lisina (GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996; GAZIOLA et al., 1997; ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006; GALILI; LESS, 2007).

O processo de regulação das enzimas chave de vias multienzimáticas, denominadas enzimas reguladoras, acontece devido à ativação/inibição pelos seus produtos finais (YOSHIDA et al., 2010).

5.2.3.1 Enzimas chave da biossíntese de lisina

5.2.3.1.1 Dihidrodipicolinato sintase

A dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) é a primeira e única enzima que está diretamente relacionada à síntese de lisina, sendo altamente sensível à inibição por baixas concentrações de lisina (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). Os genes que codificam a DHDPS foram isolados em distintas espécies Azevedo (2002); Azevedo; Lancien; Lea (2006), por exemplo, soja Silk et al. (1994), álamo Vauterin e Jacobs (1994), arroz selvagem (*Zizania latifolia* Griseb) Kong et al. (2009) e arroz Silkdar e Kim (2010). Em bactéria, o gene *dapA* codifica a DHDPS, sendo considerado essencial para este procarioto. No entanto, DHDPS não é expressa em mamíferos (KOBAYASHI et al., 2003; DOGOVSKI et al., 2009; SIBARANI et al., 2010).

Ultimamente, tem havido um grande interesse em estudar a estrutura de DHDPS Dogovski et al. (2009), devido a esta enzima oligomérica ser considerada uma proteína de modelo adequado, para investigar a importância da estrutura quaternária para a função, a estabilidade e dinâmica da enzima (MIRWALDT et al., 1995; BLICKLING et al., 1997; DOBSON et al., 2005; GRIFFIN et al., 2008, 2010; BURGESS et al., 2008; VOSS et al., 2010).

Existe uma hipótese de que DHDPS evoluiu de uma unidade dimérica ancestral para formar um tetrâmero ou como estruturas caracterizadas conhecidas na maioria das DHDPS ou, possivelmente, como um dímero mais ajustado, como ocorre na DHDPS em *S. aureus*, sendo como um meio de reduzir a flexibilidade na interface do dímero (BURGESS et al., 2008; GRIFFIN et al., 2008, 2010). A estrutura quaternária da DHDPS é, portanto, importante na redução da dinâmica das proteínas e, por sua vez, aumentando a função catalítica (GRIFFIN et al., 2008; VOSS et al., 2010).

Clones de cDNA da DHDPS mostraram peptídeos sinais para plastídios, os quais confirmaram a presença da enzima nos cloroplastos, exceto o arroz selvagem (*Zizania latifolia*) que este peptídeo sinal é ausente. Foi verificado por meio de estudos de expressão, através do gene reporter GUS, a localização da DHDPS no citoplasma da *Z. latifolia*, diferenciando, assim, das outras espécies. No entanto, dentre as outras espécies estudadas foi mostrada semelhança à expressão do gene de *Z1DHDPS*, considerada como expressão tecido específica. Além do mais, os maiores níveis ocorreram nos tecidos de crescimento rápido (KONG et al., 2009).

Diversos estudos corroboram a relevância de DHDPS na regulação da síntese de lisina por meio da utilização de mutantes bioquímicos e plantas transgênicas, expressando genes que codificam a AK e DHDPS menos sensíveis à inibição causada pela lisina (STEPANSKY et al., 2006).

5.2.3.1.2 Enzimas da degradação de lisina

As enzimas Lisina α -cetoglutarato-redutase (LKR, EC 1.5.1.8) também conhecidas como Lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR) e Sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) estão envolvidas, como já descrito anteriormente, na degradação de lisina (ARRUDA; SILVA, 1983; BROCHETTO-BRAGA et al., 1992; GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996; ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006). Estas enzimas são conservadas em várias espécies, as quais apresentam atividades em um único polipetídeo bifuncional (LOR-SDH) Kemper et al. (1999); Zhu; Tang; Galili (2000); Arruda et al. (2000); Tang et al. (2002), sendo ainda atribuída a uma estrutura modular, composta de uma LOR semelhante à levedura LYS1, uma região específica entre os domínios SDH semelhante à levedura LYS9 em plantas (KEMPER et al., 1999). No entanto, encontraram também a forma monofuncional para estas enzimas (ZHU; TANG; GALILI, 2000; TANG et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que uma enzima bifuncional LOR-SDH é predominante nas sementes. Em arroz (*Oryza sativa* L.) observaram que a proteína bifuncional OsLOR-SDH é regulada diretamente pelos reguladores de transcrição dos genes da proteína de reserva da semente do tipo zíper de leucina (bZIP) RISBZ1 e o fator de transcrição, que é responsável em mostrar os domínios de ligação ao DNA com um “dedo” (DOF), RPBV. Análise de mutagênese em plantas mostrou que o fator RPBF atua reconhecendo o promotor do gene que codifica as prolaminas “*prolaminbox*” (AAAG) e o fator RISBZ1 responsável em reconhecer o motivo GCN4, o qual age como o elemento *cis*, sendo relevante para a expressão do gene

OsLOR-SDH e aos genes SSP da proteína de reserva. Apesar dos fatores de transcrição estarem envolvidos na regulação da transcrição da enzima, existem mecanismos diferentes que regulam os genes SSP e *OsLOR-SDH* (KAWAKATSU; TAKAIWA, 2010).

Estudos com plantas transgênicas de *A. thaliana* com knockout do gene da LOR-SDH revelaram a importância da via de degradação para alta concentração de lisina nas sementes (ZHU et al., 2001). Nas sementes de milho transgênico foi demonstrado que a degradação de lisina pode ser prevenida através da inibição das primeiras etapas da via enzimática de sacaropina através da construção de um RNAi alvo para a enzima LOR/SDH específica. Esta abordagem resultou em um maior acúmulo (0,65 mg/g) de lisina solúvel para os transgênicos do que para os do tipo selvagem (0,03 mg/g) (HOUMARD et al., 2007).

Em milho, a manipulação da degradação de lisina via sacaropina ocorreu por meio da supressão de LOR/SDH que levou ao acúmulo de lisina solúvel no endosperma (0,90 mg/g) e no embrião (0,2 mg/g). As supressões de LOR/SDH do embrião e do endosperma foram combinadas sob efeito sinérgico, causando um acúmulo de 1,6 mg/g lisina solúvel nas sementes maduras que está relacionado a uma redução do teor de sacaropina (REYES et al., 2009).

Gaziola et al. (2007) analisaram diferentes cultivares de arroz e determinaram o perfil da expressão do gene *dhps* para as enzimas LOR e SDH em sementes em desenvolvimento de arroz. Os resultados indicaram que tanto a biossíntese quanto o catabolismo de lisina são importantes para o acúmulo de lisina em sementes.

Em quinoa (*Chenopodium quinoa*), a análise do perfil de aminoácidos solúveis sugere que o aumento na concentração de lisina pode indicar que houve uma redução das atividades das enzimas LOR e SDH, levando a uma redução no catabolismo lisina Varisi et al. (2007), como tem ocorrido em outras espécies (ARRUDA et al., 2000; AZEVEDO et al., 2003; GAZIOLA et al., 1997; LIMA et al., 2003; STEPANSKY et al., 2006).

5.2.4 Metabolismo de metionina

A metionina é um aminoácido sulfurado, nutricionalmente essencial, todavia encontrado em baixo conteúdo nas plantas e sementes. As proteínas presentes nas leguminosas apresentam baixo valor nutricional devido à deficiência dos aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína (HABBEN; LARKINS, 1995; AMIR; HAN; MA, 2012). O nível de metionina limita o valor da planta como fonte de proteína para a dieta de humanos e animais monogástricos (MALITSKY et al., 2008). Recentemente, muitos estudos

têm sido realizados acerca do metabolismo de metionina em tecidos vegetais, sendo ainda pouco estudado em sementes (AMIR; HAN; MA, 2012).

Para elucidar os fatores que regulam o acúmulo de metionina nas sementes e aumentar a qualidade nutricional das sementes, utilizaram-se duas abordagens diferentes. Primeira foi a de expressar os genes que codificam as proteínas ricas em metionina de armazenamento em sementes e a outra foi de manipular a regulação da via de biossíntese de metionina para aumentar o nível de metionina solúvel (AMIR; HAN; MA, 2012).

Em tecidos vegetativos, a metionina é sintetizada pela união de porções de três vias diferentes. Primeira via seria o fluxo de carbono que favorece aos aminoácidos derivados do aspartato como a metionina, treonina, lisina e isoleucina. A segunda representa a parte de enxofre sendo derivada da cisteína, e a terceira acontece quando o grupo metil é obtido a partir de *N*-metil-tetra-hidrofolato (AMIR; HAN; MA, 2012).

O papel funcional do aminoácido metionina nas proteínas é aumentar a qualidade nutricional, além de ser responsável pela iniciação da tradução do mRNA. Sendo ainda utilizada como um precursor de metabólitos essenciais para as plantas, a metionina regula de forma indireta uma grande variedade de processos celulares, por exemplo, o precursor *S*-adenosilmetionina (SAM), doador do grupo metil Roje (2006), como também, doadora para muitos metabólitos secundários Hanson et al. (1994), por exemplo, os glucosinolatos, predominantes em plantas Brassicaceae, envolvidos na defesa de patógeno e de insetos (GIGOLASHVILI et al., 2007). Foi observado o efeito da metionina sobre a atividade das enzimas AK e HSDH em várias espécies vegetais (LUGLI; GAZIOLA; AZEVEDO, 2000; FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006). Durante o processo de germinação, parte da metionina origina um composto intermediário, o *S*-metilmetionina (SMM), considerado uma forma de mobilização e de armazenamento da metionina e SAM (KOCSIS et al., 2003; MUDD; DATKO, 1990).

5.2.4.1 Enzimas chaves da biossíntese de metionina

5.2.4.1.1 Cistationina β -lyase, metionina sintase e *S*-adenosilmetioninasintase

A L-cistationina é produzida pela cistationina- γ sintase (CGS) e clivada pela cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8), também conhecida como β -cistationase ou cisteína liase que é uma enzima dependente de fosfato piridoxal (PLP). Essa enzima catalisa a quebra

da L-cistationina em L-homocisteína, piruvato e amônia (AITKEN; KIRSCH, 2005; AITKEN; LODHA; MORNEAU, 2011).

A cistationina β -liase foi purificada a partir de várias plantas e bactérias, tais como *Arabidopsis thaliana* (BREITINGER et al., 2001; RAVANEL; JOB; DOUCE, 1996), *Escherichia coli* (LABER, 1996), *Salmonella enterica* (EJIM, 2004), *Bordetella avium* (GENTRY-WEEKS; KEITH; THOMPSON, 1993), e *Lactococcus lactis* (ALTING et al., 1995), *Bradyrhizobium elkanii* (OKAZAKI et al., 2007).

A metionina e ATP estão envolvidos na síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o qual é catabolizado pela enzima S-adenosilmetionina sintase (SAM-S, E.C 2.5.1.6) (TABOR; TABOR, 1984; MOFFATT; WERETILNYK, 2001; ZHANG et al., 2008) e codificado pelo gene *metK* (ZHANG et al., 2008), sendo que SAM desempenha um papel importante no metabolismo primário e secundário no interior das células (HUH et al., 2004; YOON et al., 2006). Estudos têm mostrado que a adição exógena de SAM aumentou a produção de antibióticos em *Streptomyces* spp (HUH et al., 2004; YOON et al., 2006).

Em plantas, S-adenosilmetionina (SAM) é um doador do grupo metil encontrado por toda parte e um precursor na biossíntese de etileno, poliaminas, biotina, e nicotinamina (TABOR; TABOR, 1984; MOFFATT; WERETILNYK, 2001; ROEDER et al., 2009). De acordo com Roeder et al. (2009), a informação acerca da síntese de SAM e sua concentração nos tecidos das plantas é muito limitada. Com base nisso, propuseram estudar as concentrações de SAM nas flores de *Nicotiana suaveolens*, as quais foram determinadas durante o ciclo dia/noite. Os níveis de SAM foram medidos no período da tarde e noite, o que corresponde ao momento em que o composto aroma floral, benzoato de metila, é sintetizado pela enzima SAM metiltransferase (NsBSMT) dependente, momento no qual esta enzima apresenta maior atividade.

A enzima SAM-S catalisa a produção de SAM em reações bioquímicas nas células como foi citado anteriormente. No entanto, pouco se sabe como SAM-S controla o desenvolvimento da planta (LI et al., 2011).

5.2.5 Biossíntese de treonina

A síntese de treonina ocorre a partir da via metabólica do ácido aspártico durante cinco passos que participam os intermediários: β -aspartilsemialdeído (ASA), homoserina e OPH. O β -aspartil semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima HSDH. Em seguida, a homoserina é fosforilada a O-fosfomoserina (OPH) por intermédio da ação

da enzima homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) ocorrendo, assim, a transformação de OPH em treonina, através da enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2) (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

Treonina é um dos poucos aminoácidos essenciais (EAAs) que limitam na indústria de ração animal, e seu nível pode afetar a produção de importantes fontes de carne, tais como suínos e aves (Qi et al., 2010). Treonina, bem como lisina e metionina são sintetizados pela via do ácido aspártico, como foi citado anteriormente. Qi et al. (2010) relataram o sucesso da estratégia para a produção de semente de soja de alta treonina livre através da identificação da enzima AK resistente à retroinibição, que pode ser superexpressa no desenvolvimento de semente de soja. A abordagem utilizada foi o processo de purificação e a caracterização bioquímica da AK, a partir da bactéria entérica *Xenorhabdus bovienii* (Xb). A mutagênese dirigida ao local de XbAK identificou dois principais resíduos reguladores Glu-257 e Thr-359 envolvidos na inibição por lisina. Foram gerados três alelos (XbAK_T359I, XbAK_E257K e XbAK_E257K / T359I) resistentes à retroinibição. Além disso, a expressão específica dos alelos resistentes à retroinibição XbAK_T359I XbAK_E257K nas sementes, resulta no aumento do nível de treonina livre de até 100 vezes em R1 de soja, quando comparado ao tipo selvagem.

5.2.6 Biossíntese de isoleucina

A síntese da isoleucina ocorre a partir da treonina em cinco etapas enzimáticas catalisadas através das enzimas treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16), ácido acetohidroxisintase (AHAS, EC 4.1.3.18), ácido acetohidroxiisomero redutase (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).

5.2.6.1 Enzimas chaves da biossíntese de isoleucina

5.2.6.1.1 Treonina desaminase

A via de biossíntese da isoleucina nas plantas começa com a conversão de treonina em 2-cetobutirato com a participação da treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16) em *Arabidopsis* (OMR1 ou At3g10050) (MOURAD; KING, 1995; JOSHI; JANDER, 2009).

5.2.6.1.2 Ácido acetohidroxi sintase

AHAS (EC 4.1.3.18), também conhecida como acetolactato sintase (ALS), é responsável por uma série de reações paralelas que levam a biossíntese de valina, leucina e isoleucina. Na via que leva à biossíntese de isoleucina, a AHAS catalisa a condensação de piruvato e 2-cetobutirato para formar aceto-2-hidroxiбутirato. A demanda de herbicidas nos cultivos agrícolas tem aumentado de forma progressiva. Por outro lado, tem havido uma maior preocupação com o meio ambiente, em relação aos impactos ambientais (PASQUALETTO et al., 1999; SHEN; LIAO, 2012).

Os herbicidas podem causar a morte da planta devido à inibição da enzima AHAS Mazur et al. (1987); Shimizu et al. (2008); Bonny (2011) que precisa do difosfato de tiamina (ThDP) para catalisar várias reações, incluindo o primeiro passo comprometido na via biossintética que conduz à produção de aminoácidos de cadeia ramificada, valina leucina e isoleucina (MAZUR et al., 1987; VYAZMENSKY et al., 2009; YUEFANG et al., 2012). AHAS é alvo de uma série de herbicidas em baixas doses e tem sido alvo de muitos estudos, especialmente em relação às alterações em sequências de aminoácidos de uma proteína que conferem resistência a herbicidas (AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A enzima AHAS resistente é capaz de manter a sua atividade catalítica, mesmo na presença de inibidores em concentrações celulares que são normalmente letais. Há muitos pontos diferentes de mutações no gene AHAS que codificam as enzimas resistentes. Dependendo da mutação selecionada, a resistência será limitada a uma das poucas classes de herbicidas, enquanto outras mutações favorecerão com um amplo espectro de resistência às ervas daninhas (TRANDEL; WRIGHT, 2002; WHALEY et al., 2007).

Estudos posteriores demonstraram que a enzima AHAS é composta de subunidades catalíticas e regulatórias. A enzima apresenta atividade total apenas quando a subunidade reguladora (RSU) se liga à subunidade catalítica (CSU). No entanto, a estrutura da holoenzima não foi relatada e a interação molecular entre a CSU e RSU é também desconhecida (VYAZMENSKY et al., 2009; YUEFANG et al., 2012).

Assim sendo, Vyazmensky et al. (2009) estudaram as interações que ocorrem entre as diferentes isoenzimas presentes em AHAS em *E. coli*. As três isoenzimas AHAS I, II e III são respectivamente codificadas pelos genes *ilvBN*, *ilvGM* e *ilvIH* que diferem nas propriedades cinéticas em resposta à valina. Estas isoenzimas são compostas por dois tipos de subunidades, sendo que as subunidades grandes (LSU-*ilvB*, *ilvG* e *ilvI*) são catalíticas com pesos moleculares de 60-62 kDa, têm apenas 0,05-15% da atividade correspondente da holoenzima.

A subunidade pequena (SSU-ilvN e ilvMilvH) é reguladora, com pesos moleculares de 9-17 kDa cada uma, associada com a correspondente subunidade grande que confere a atividade catalítica plena à valina e sensibilidade para a holoenzima (AHAS I e III). Desta forma, observaram os efeitos de cada uma das subunidades isoladas e descobriram que a AHAS II SSU-ilvM é capaz de ativar as subunidades grandes (LSUs) de todas as três isoenzimas, sendo que a AHAS III USAs ilvH-D86 e ilvH-D89 são capazes de ativar as LSUs das AHAS I e AHAS III. No entanto, a atividade das enzimas híbridas heterólogas não apresentou sensibilidade a retroinibição (VYAZMENSKY et al., 2009).

5.2.6.1.3 Ácido acetohidroxi isomeroreductase

A enzima acetohidroxi ácido isômero redutase (AHRI EC 1.1.1.86), também conhecida como KARI, catalisa o segundo passo comum na via de biossíntese de cadeia de aminoácidos ramificada Duggleby; Pan (2000); Liu et al. (2009) ocorrendo a conversão de 2-acetolactato em 2,3-di-hidroxi-3-isovalerato ou a conversão de 2-aceto-2-hidroxi-3-butanato em 2,3-di-hidroxi-3-metilvalerato. A KARI catalisa duas reações, redução e migração de alquila e requer Mg^{2+} e NADPH para a atividade (DUMAS et al., 2001; LEE; TA; DUGGLEBY, 2005; LIU et al., 2009). Estudos apontam que as únicas estruturas relatadas da enzima KARI são as do espinafre Mn^{2+} - (fosfo) ADP ribose 2,3-di-hidroxi-3- complexo metilvalerato e o espinafre complexo KARI Mg^{2+} -NADPH--*N*-hidroxi-*N*-isopropiloxamato em que *N*-hidroxi-*N*-isopropiloxamato é análogo, cujo estado de transição é previsto (CHUNDURU; MRACHKO; CALVO, 1989; DUMAS et al., 1992; LIU et al., 2009). Estes estudos demonstraram que a enzima consiste em dois domínios, o domínio N e o domínio C, com o sítio ativo na interface destes domínios (TAYLOR, 2000).

Em arroz, Leung e Guddat (2009) determinaram as estruturas dos complexos de arroz KARI- Mg^{2+} e KARI- Mg^{2+} -NADPH para as resoluções 1,55 Å e 2,80 Å, respectivamente. Comparando as estruturas de todos os complexos, várias diferenças foram observadas. Primeiramente, o domínio N tem um giro de até 15 ° relativo ao domínio C, expandindo o sítio ativo em até 4 Å. Em segundo lugar, um α -hélice no domínio C que inclui resíduos V510-T519, formando parte do movimento do sítio ativo por aproximadamente 3,9 Å sob ligação do NADPH. Em terceiro lugar, os 15 resíduos de aminoácidos C-terminal do complexo de arroz KARI- Mg^{2+} são desordenados. No complexo de arroz KARI- Mg^{2+} -NADPH e as estruturas de KARI em espinafre, muitos dos 15 resíduos se ligam ao NADPH e o domínio N, cobrindo o sítio ativo. Em quarto lugar, a localização dos íons metálicos no

interior do sítio ativo pode variar até 2,7 Å. Esse trabalho sugere que um mecanismo de ajuste induzido opera para permitir que o substrato entre no sítio ativo, para fechar sobre o sítio ativo durante a catálise, e abrir o sítio ativo para facilitar a liberação do produto.

Esta enzima é um importante alvo para modelo de drogas. Com base na estrutura no complexo do ácido redutoisomeraseketol-/N-hidroxi-N-isopropiloxamato (IpOHA), foi possível a técnica de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS –*throughput screening*) e triagem virtual (VS –*virtual screening*) para procurar novos inibidores de KARI, pela primeira vez. Alguns novos compostos foram encontrados para inibir KARI em arroz *in vitro* entre os 15 compostos adquiridos. Esse método pode fornecer informações úteis para outros modelos e descobertas de inibidores de KARI (LIU et al., 2010).

Wang et al. (2008) identificaram também o composto diamidinas em bio-ensaio *in vitro* como um possível inibidor da KARI, a partir da pesquisa da base de dados ACD baseado na estrutura tridimensional da KARI. Uma investigação nas interações de diaminas nos sítios ativos de KARI levou ao modelo e a síntese de 15 monoamidines. Alguns apresentaram melhor atividade biológica do que diamidinas em arroz KARI (*in vitro*) e testes com herbicidas em estufa (*in vivo*). A estrutura biológica relacionada à atividade foi investigada, o que fornece informações valiosas para um estudo mais aprofundado de inibidores potenciais de KARI.

Chen et al. (2007) verificaram que os íons Mg^{2+} no sítio ativo desempenham papéis importantes na determinação dos estados de ionização dos resíduos no sítio ativo, as propriedades eletrostáticas do sítio ativo e a ligação do ligante. Os inibidores em potencial são similares no modo de ligação da KARI, na população de orbitais de fronteira e nos potenciais eletrostáticos. Além disso, também identificaram os grupos carboxila ionizáveis como uma característica estrutural chave para a inibição da KARI. Além do mais, foi ainda deduzido que os inibidores em potencial provavelmente tiveram um grupo ionizável que pode libertar prótons e ser carregado negativamente. O trabalho fornece informações valiosas para a concepção de novos inibidores em potencial da KARI antes das sínteses.

5.2.6.1.4 Aminotransferase

Os aminoácidos valina, leucina e isoleucina contêm certos resíduos de hidrocarboneto ramificado curto, sendo classificado como cadeia de aminoácido ramificada (BCAT, EC 2.6.1.42). As BCAT são sintetizadas nas plantas Shaner (1995); Singh (1999); Binder; Knill; Schuster (2007) a partir do α -cetoácidos de cadeia ramificada (MALONEY et al., 2010). As

vias de biossínteses de BCATs têm sido extensivamente investigadas, e grande número de genes foi caracterizado em inúmeras espécies de plantas, como por exemplo, *Solanum tuberosum* (batata), *Arabidopsis* e *Hordeum vulgare* (cevada) (CAMPBELL et al., 2001; DIEBOLD et al., 2002; MALATRASI et al., 2006) devido às muitas enzimas presentes nessa via serem alvo de importantes herbicidas (SINGH, 1999). Entretanto, o seu metabolismo não é completamente compreendido (MALONEY et al., 2010). As transaminases de aminoácidos de cadeia ramificada (BCATs) desempenham um papel crucial na via metabólica da leucina, isoleucina e valina Gao et al. (2009), através da catalisação da última etapa de síntese e / ou a etapa inicial da degradação desses aminoácidos (BINDER; KNILL; SCHUSTER, 2007; GAO et al., 2009).

Devido à importância dos aminoácidos de cadeia ramificada na nutrição e na agricultura, a biossíntese de isoleucina, leucina e valina tem sido extensivamente estudada. Os seres humanos e outros animais não são capazes de sintetizar estes aminoácidos essenciais e devem obtê-los diretamente ou indiretamente, através dos vegetais (FERREIRA; MEINHARDT; AZEVEDO, 2006; AMIR, 2008). O aminoácido isoleucina é encontrado abundantemente entre as culturas mais importantes do mundo Lewis et al. (1982); Prakash (1996); Joshi e Jander (2009), sendo que uma única cultura pode representar 80% a 90% do consumo total de alimentos Tabe e Higgins (1998); Amir (2008) para animais monogástricos e humanos, por exemplo, milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*) (LEWIS et al, 1982;. PRAKASH, 1996; TABE; HIGGINS, 1998; AMIR, 2008). No entanto, esse aminoácido é considerado sub-ótimo para dieta de mamíferos (LEWIS et al., 1982; PRAKASH, 1996; JOSHI et al., 2009). Dessa forma, aumentar o teor de isoleucina nas sementes e outras partes dos vegetais tem sido de grande interesse para a biotecnologia agrícola, devido também ao fato de as enzimas do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada serem o papel alvo dos herbicidas. Várias classes de herbicidas comercialmente bem sucedidos inibem a enzima ALS, que é necessário para a biossíntese de todos os três aminoácidos de cadeia ramificada (SAARI et al., 1994; SINGH; SHANER, 1995).

Maloney et al. (2010) identificaram e caracterizaram seis genes BCAT em tomate (*Solanum lycopersicum*). Os genes SIBCAT1, SIBCAT2 (mitocôndrias), SIBCAT3 e SIBCAT4 (cloroplastos) foram expressos em vários tecidos das plantas, enquanto o SIBCAT5 (citossol) e SIBCAT6 (vacúolos) foram indetectáveis. O SIBCAT1, SIBCAT2, SIBCAT3 e SIBCAT4 foram capazes de restaurar o crescimento de células auxotróficas BCAT de *E. coli*, mas os SIBCAT1 e SIBCAT2 foram menos eficazes do que os SIBCAT3 e SIBCAT4 no restabelecimento do crescimento dessas células. Foi observado que todas as enzimas eram

ativas nas reações diretas (síntese de BCAA) e reversas (síntese de cadeia ramificada de α -ácidoaceto). Os SIBCAT3 e SIBCAT4 demonstraram uma preferência para a reação direta, enquanto os SIBCAT1 e SIBCAT2 foram mais ativos na reação reversa. Foi observada uma expressão do locus de característica quantitativa no cromossomo 3, associada à expressão amplamente maior de BCAT4 *Solanum pennellii*, que aumentaram significativamente os níveis de BCAA. Ao contrário, a redução mediada anti-senso de SIBCAT1 resultou em níveis mais elevados de BCAAs. Estes resultados remetem a um modelo, no qual a função mitocondrial de SIBCAT1 e SIBCAT2 ocorrem no catabolismo de BCAA, enquanto a função cloroplasmática em SIBCAT3 e SIBCAT4 ocorre na síntese de BCAA.

Gao et al. (2009) caracterizaram uma nova BCAT de *Nicotiana benthamiana* (*NbBCAT*) a partir de uma biblioteca genômica, na qual a sequência de aminoácidos deduzida apresenta uma porcentagem de identidade elevada de enzimas homólogas de *Solanum tuberosum* (StBCAT-2; 91,5%) e *Arabidopsis thaliana* (AtBCAT1-6; 56,4 a 68,6%). Outra maneira, um experimento complementar usando uma cepa de levedura de duplo *knockout* $\Delta bat1/\Delta bat2$ demonstrou atividade enzimática NbBCAT. A expressão ectópica de NbBCAT foi alvo predominantemente para os cloroplastos em protoplastos de tabaco. O gene indutor de vírus silenciador do gene *NbBCAT* resultou no desenvolvimento de folha anormal e perda de dominância apical. Em plantas com o silenciador *NbBCAT*, os genes *NTH15* e *NTH23* do tipo KNOTTED1, os quais são regulados, e acompanhados por alterações de diferentes hormônios, resultante da regulação transcricional de giberelina 20-oxidase (*Ntc12*) e da adenosina fosfato isopenteniltransferase. O trabalho sugere que NbBCAT, uma enzima na via metabólica de aminoácidos de cadeia ramificada, poderia estar envolvida na regulação de hormônios endógenos através do seu efeito sobre o gene *KNOX*.

Colón et al. (2011) pesquisaram a possibilidade de um suposto caráter bifuncional apresentado por um único aminoácido de cadeia ramificada aminotransferase em *K. lactis* ser distribuído nos dois genes parálogos (derivados de um gene ancestral) contidos em *S. cerevisiae*, e se essa conservação poderia impactar o metabolismo de *S. cerevisiae*. Foi observado que o KlBat1, ortólogos de BCAT, é uma enzima bifuncional, que participa da biossíntese e catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs). Esta dupla função tem sido distribuída nas proteínas parálogas *BAT1* e *bat2* da *S. cerevisiae*, dando base para o modelo de especialização produzido para explicar a evolução das duplicações de genes. Além disso, a expressão diferencial de *BAT1* e *bat2* e a realocização subcelular mostrou distribuição das funções de biossíntese e de catabolismo do BCAT ancestral em duas isoenzimas, melhorando o metabolismo das BCAAs.

5.3 Conclusões parciais

O estudo da via do ácido aspártico apresenta um interesse considerável em virtude de originar vários aminoácidos. Dentre esses, quatro aminoácidos essenciais são resultantes desta via.

Desta forma, a complexa regulação que existe nesta via para síntese dos diferentes aminoácidos, através de um precursor comum, e o acúmulo de lisina que também envolve a regulação de seu catabolismo, são pontos importantes a serem esclarecidos para um melhor entendimento da via do ácido aspártico em cereais.

Devido à importância nutricional, essa via tem sido extensivamente estudada, utilizando técnicas de engenharia genética e bioquímica.

Pesquisadores têm apresentado esforços considerados no estudo desta via, a fim de contribuir para futuras manipulações genéticas, cujo objetivo é produzir plantas com alto conteúdo de lisina, metionina e treonina.

Referências

AITKEN, S.M.; KIRSCH, J.F. The enzymology of cystathionine biosynthesis: strategies for the control of substrate and reaction specificity. **Archives Biochemistry and Biophysics**, New York, v.433, n.1, p.166–175, 2005.

AITKEN, S.M.; LODHA, P.L.; MORNEAU, D.J.K. The enzymes of the transsulfuration pathways: active-site characterizations, **Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v.1814, n.11, p.1511-1517, 2011.

ALTING, A.C.; ENGELS, W.J.M.; VAN SCHALKWIJK, S.; EXTERKATE, F. A.Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B78 and its possible role in flavor development in cheese. **Applied and Environ Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 4037–4042, 1995.

AMBROZEVICIUS, L.P.; MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; SCHMIDT, D.; ROLÃO, M. B.; PETERS, L.P.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. High-lysine maize lines expressing a new protein in the endosperm. In:INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, 11., 2009. New York2009. v.37 : Amino Acids, (Suppl 1). 127p.

AMIR, R. Towards improving methionine content in plants for enhanced nutritional quality. **Functional Plant Science and Biotechnology**, Kagawa, v.2, n.1, p.36–46, 2008.

AMIR, R. Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 4, p. 917–931, 2010.

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

AMIR, R.; HAN, T.; MA, F. Bioengineering approaches to improve the nutritional values of seeds by increasing their methionine content. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 915-924, 2012.

ANANTHARAMAN, V.; KOONIN, E.V.; ARAVIND, L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular smallmolecule-binding domains. **Journal of Molecular Biology**, London, v.307, n.1271-1292, 2001.

ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.155, n.1, p.1–13, 2009.

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**, London, v. 189, n. 1, p. 148–159, 2011.

ANGELOVICI, R.; FAIT, A.; ZHU, X.; SZYMANSKI, J.; FELDMESSER, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during *Arabidopsis* seed development. **Plant Physiology**, Washington, v.151, n.4, p.2058–2072, 2009.

ARACHEA, B.T.; LIU, X.; PAVLOVSKY, A.; VIOLA, R.E. Expansion of the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase family: the first structure of a fungal ortholog. **Acta Crystallographica. Section D. Biological. Crystallography**, Copenhagen, v.66, n.2, p.205-212, 2010.

ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.48, n.3, p.291-302, 1999.

ARRUDA, P.; SILVA, W.J. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. **Phytochemistry**, Oxford, v.18, n.3, p.409–410, 1979.

ARRUDA, P.; SILVA, W.J. Lysine ketoglutarate reductase activity in maize its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, n.12, p.2687–2689, 1983.

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.

ASHIGH, J.; TARDIF, F.J. An ala205val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, Urbana, v. 55, n. 6, p. 558-565, 2007.

AVRAHAM, T.; AMIR, R. Methionine and threonine regulate the branching point of their biosynthesis pathways and thus controlling the level of each other. **Transgenic Research**, London, v. 14, n. 3, p. 299-311, 2005a.

AVRAHAM, T.; BADANI, H.; GALILI, S.; AMIR, R. Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over expressing the *Arabidopsis* cystathionine gamma-synthase gene. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.3, n. 1, p.71-80, 2005b.

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

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

AZEVEDO, R.A.; 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.

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.

BARTLEM, D.L.; OKAMOTO, I.; ITAYA, T.; UDA, A.; KIJIMA, A.; TAMAKI Y.; NAMBARA E.; NAITO S. Mutation in the threonine synthase gene results in an over-accumulation of soluble methionine in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, p.101-110, 2000.

BAUM, H.J.; MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. Feedback inhibition of homoserine kinase from radish leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 22, n. 11, p. 2409–2412, 1983.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A.R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.15, n.6, p.330–336, 2010.

BERDEJO, B.D.A.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Biochemical aspects of homoserine kinase in quality protein maize. 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. **Amino Acids**, Wien, v.37, p.108, 2009.

BINDER, S.; KNILL, T.; SCHUSTER, J. Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.68-78, 2007.

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.

BONNY, S. Herbicide-tolerant Transgenic Soybean over 15 Years of Cultivation: Pesticide Use, Weed Resistance, and Some Economic Issues. The Case of the USA. **Sustainability**, Westport, v. 3, p. 1302-1322, 2011.

BREITINGER, U.; CLAUSEN, T.; EHLERT, S.; HUBER, R.; LABER, B.; SCHMIDT, F.; POHL, E.; MESSERSCHMIDT, A. The three-dimensional structure of cystathionine β -lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 631–642, 2001.

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

BURGESS, B.R.; DOBSON, R.C.J.; BAILEY, M.F.; ATKINSON, S.C.; GRIFFIN, M. D.W.; JAMESON, G.B.; PARKER, M.W.; GERRARD, J.A.; PERUGINI, M.A. Structure and Evolution of a Novel Dimeric Enzyme from a Clinically Important Bacterial Pathogen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.283, n.41, p.27598-27603, 2008.

CAMPBELL, M.A.; PATEL, J.K.; MEYERS, J.L.; MYRICK, L.C.; GUSTIN, J.L. Genes encoding for branched-chain amino acid aminotransferase are differentially expressed in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 10, p. 855-860, 2001.

CHIBA, Y.; SAKURAI, R.; YOSHINO, M.; OMINATO, K.; ISHIKAWA, M.; ONOUCHI, H.; NAITO, S. *S*-adenosyl-L-methionine is an effector in the post-transcriptional autoregulation of the cystathionine gamma-synthase gene in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 100, n. 18, p. 10225-10230, 2003.

CHIPMAN, D.M.; SHAANAN, B. The ACT domain family. **Current Opinion in Structural Biology**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 694–700, 2001.

COLON, M.; HERNANDEZ, F.; LOPES, K.; QUEZADA, H.; GONZALEZ, J.; LOPEZ, G.; ARANDA, C.; GONZALEZ, A. *Saccharomyces cerevisiae Bat1 and Bat2* Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. **Plos One**, San Francisco, v.6, n.1, p.1-13, 2011.

COVARRUBIAS, A.S.; HOGBOM, M.; BERGFORS, T.; CARROLL, P.; MANNERSTEDT, K.; OSCARSON, S.; PARISH, T.; JONES, T.A.; MOWBRAY, S.L. Structural, biochemical, and in vivo investigations of the threonine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*, **Journal of Molecular Biology**, London, v.381, n.3, p.622–633, 2008.

CURIEN, G.; LAURENCIN, M.; ROBERT-GENTHON, M.; DUMAS, R. Allosteric monofunctional aspartate kinases from *Arabidopsis*. **FEBS Journal**, Oxford, v. 274, n. 1, p.164–176, 2007.

CURIEN, G.; RAVANEL, S.; ROBERT, M.; DUMAS, R. Identification of six novel allosteric effectors of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase homoserine dehydrogenase isoforms: physiological context sets the specificity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.280, n.50, p.41178-41183, 2005.

CURIEN, G.; BASTIEN, O.; ROBERT-GENTHON, M.; CORNISH-BOWDEN, A.; CARDENAS, M. L.; DUMAS, R. Understanding the regulation of aspartate metabolism using a model based on measured kinetic parameters. **Molecular Systems Biology**, London, v. 5, n. 271, p. 271, 2009.

CHEN, P-Q.; LIU, X-H.; SUN, H-W.; WANG, B-L.; LI, Z-M.; LAI, C-M. Molecular simulation studies of interactions between ketol-acid reductoisomerase and its inhibitors. **Acta Chimica Sinica**, Weinheim, v. 65, n. 16, p. 1693-1701, 2007.

CHUNDURU, S.K.; MRACHKO, G.T.; CALVO, K.C. Mechanism of ketol acid reductoisomerase. Steady-state analysis and metal ion requirement. **Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 486–493, 1989.

CURIEN, G.; BIOU, V.; MAS-DROUX, C.; ROBERT-GENTHON, M.; FERRER, J-L.; DUMAS, R. Amino acid biosynthesis: new architectures in allosteric enzymes. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 3, p. 325-339, 2008.

DE LA TORRE, F.; De SANTIS, L.; SUÁREZ, M F.; CRESPILO, R.; CÁNOVAS, F.M. Identification and functional analysis of a prokaryotic-type aspartate aminotransferase: implications for plant amino acid metabolism. **The Plant Journal**, Oxford, v.46, n.3, p.414-425, 2006.

DÉLYE, C.; PERNIN, F.; SCARABEL, L. Evolution and diversity of the mechanism endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). **Plant Science**, Amsterdam, v.180, n.2, p. 333, 2011.

DI, R.; KIM, J.; MARTIN, M. N.; LEUSTEK, T.; JHOO, J.; HO, C. T.; TUMER, N. E. Enhancement of the primary flavor compound methional in potato by increasing the level of

soluble methionine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 19, p. 5695-5702, 2003.

DIEBOLD, R.; SCHUSTER, J.; DASCHNER, K.; BINDER, S. The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n. p.540-550, 2002.

DOBSON, R.C.J.; GRIFFIN, M.D.W.; JAMESON, G.B.; GERRARD, J.A. The crystal structure of native and (S)-lysine-bound dihydrodipicolinate synthase from *Escherichia coli* with improved resolution show new features of biological significance. **Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography**, Copenhagen, v.61, pt.8, p.1116-1124, 2005.

DOGOVSKI, C.; ATKINSON, S.C.; DOMMARAJU, S.R.; HOR, L.; DOBSON, R.C.J.; HUTTON, C.A.; GERRARD, J.A.; PERUGINI, M.A. Lysine biosynthesis in bacteria an uncharted pathway for novel antibiotic design. In: DOELLE, H. **Biotechnology medical biotechnology: fundamentals and modern development**. Oxford: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) Publishers. 2009. v. 11. p. 116–136.

DUGGLEBY, R.G.; PANG, S.S. Acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 33, n. 1, p. 1–36, 2000.

DUMAS, R.; BIOU, V.F.; DOUCE, H.R.; DUGGLEBY, R.G. Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. **Accounts of Chemical Research**, Easton, v. 34, n. 5, p. 399–408, 2001.

DUMAS, R.; COBESSI, D.; ROBIN, A.Y.; FERRER, J.-L.; CURIEN, G. The many faces of aspartate kinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 519, n. 2, p. 186-193, 2012.

DUMAS, R.; JOB, D.; ORTHOLAND, J.-Y.; EMERIC, G.; GREINER, A.; DOUCE, R. Isolation and kinetic properties of acetohydroxy acid isomeroreductase from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts overexpressed in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, London, v. 288, pt. 3, p. 865-874, 1992.

EJIM, L.J.; COSTA, V.M.D.; ELOWE, N.H.; LOREDO-OSTI, J.C.; MALO, D.; WRIGHT, G.D. Cystathionine β -lyases is important for virulence of *Salmonella enteric serovar Typhimurium*. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, n. 6, p.3310, 2004.

FAEHNLE, C.R.; LE COQ, J.; LIU, X.; VIOLA, R.E. Examination of key intermediates in the catalytic cycle of aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from a gram-positive infectious bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.281, n.41, p.31031–31040, 2006.

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.

FOYER, C.H.; BLOOM, A.J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.455–484, 2009.

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. 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, 2004.

GALILI, G.; LESS, H. o catabolic enzymes play major regulatory roles in plant amino acid metabolism? In:INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS AND PROTEINS, 10., 2007. (ICAAP). Washington. **Proceedings...** Washington: Amino Acids, 2007. v.33. p. I–LXX.

GALILI, G. The aspartate-family pathway of plants: linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v.6, n.2, p.192–195, 2011.

GALILI, G.; AMIR, R.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Improving the levels of essential amino acids and sulfur metabolites in plants. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 386, p. 817-831, 2005.

GAO, F.; WANG, C.; WEI, C.; LI, Y. A branched-chain aminotransferase may regulate hormone levels by affecting *KNOX* genes in plants. **Planta**, Berlin, v.230, n.4, p. 611-623, 2009.

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.

GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, M.S.; BERDEJO, B.D.A.; AZEVEDO, R.A. Lysine metabolism in rice seeds: expression profile of DHPS and LOR-SDH genes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS AND PROTEINS (ICAAP) AMINO ACIDS, 10., 2007 Washington. **Proceedings...** Washington: Amino Acids, 2007. v.33. p. I–LXX.

- GENTRY-WEEKS, C. R.; KEITH, J. M.; THOMPSON, J. Toxicity of *Bordetella avium* β -cystathionase toward MC3T3-E1 osteogenic cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, n. 10, p.7298–7314, 1993.
- 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.
- GIGOLASHVILI, T.; YATUSEVICH, R.; BERGER, B.; MÜLLER, C.; FLÜGGE, U. I. The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine - derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Washington, v. 51, n. 2, p. 247-261, 2007.
- GONCALVES-BUTRUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductasesaccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, n.3, p.765-771, 1996.
- GOYER, A.; COLLAKOVA, E.; SHACHAR-HILL, Y.; HANSON, A. D. Functional characterization of a methionine gamma-lyase in *Arabidopsis* and its implication in an alternative to the reverse *trans*-sulfuration pathway. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 48, n. 2, p. 232-242, 2007.
- GRANT, G.A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 45, p. 33825–33829, 2006.
- GRIFFIN, M.D.W.; DOBSON, R.C.J.; GERRARD, J.A.; PERUGINI, M.A. Exploring the dihydrodipicolinate synthase tetramer: how resilient is the dimer-dimer interface? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.494, n.1, p.58-63, 2010.
- GRIFFIN, M.D.W.; DOBSON, R.C.J.; PEARCE, F.G.; ANTONIO, L.; WHITTEN, A. E.; LIEW, C.K.; MACKAY, J.P.; TREWHELLA, J.; JAMESON, G B.; PERUGINI, M.A.; GERRARD, J.A. Evolution of quaternary structure in a homotetrameric enzyme. **Journal of Molecular Biology**, London, v.380, n.4, p.691-703, 2008.
- 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; LARKINS, B.A. Improving protein quality in seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker. 1995. p.791-810.
- HACHAM, Y.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. An *in vivo* internal deletion in the *N* terminus of cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis* results with decreased modulation of expression by methionine. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 955-967, 2006.

HACHAM, Y.; MATITYAHU, I.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. Overexpression of mutated forms of aspartate kinase and cystathionine gamma-synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 260-271, 2008.

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.

HANSON, A.D.; RIVOAL, J.; PAQUET, L.; GAGE, D.A. Biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia biflora* (L.) DC. Evidence that S-methylmethionine is an intermediate. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n. 1, p.103–110, 1994.

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.

HESSE, H.; HOFGEN, R. Molecular aspects of methionine biosynthesis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, n. 6, p. 259-262, 2003.

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

HUANG, S.; 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.

HUH, J.H.; KIM, D.J.; ZHAO, X.Q.; LI, M.; JO, Y.Y.; YOON, Y.M.; SHIN, S.K. Widespread activation of antibiotic biosynthesis by S-adenosylmethionine in Streptomyces. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 238, n.2, p.439–447, 2004.

JOSHI, V.; JANDER, G. Arabidopsis methionine gamma-lyase is regulated according to isoleucine biosynthesis needs but plays a subordinate role to threonine deaminase. **Plant Physiology**, Rockville, v.151, n.1, p.367-378, 2009.

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

KATZ, Y.S.; GALILI, G.; AMIR, R. Regulatory role of cystathionine gamma-synthase and de novo synthesis of methionine in ethylene production during tomato fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 1/2, p.255–268, 2006.

KAWAKATSU, T.; TAKAIWA, F. 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.

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

KEMPER, E.L.; 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.

KIM, J.; LEE, M.; CHALAM, R.; MARTIN, M.N.; LEUSTEK, T.; BOERJAN, W. Constitutive over expression of cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis thaliana* leads to accumulation of soluble methionine and S-methylmethionine. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 95-107, 2002.

KOBAYASHI, K.; EHRLICH, S.D.; ALBERTINI, A.; AMATID, G.; ANDERSEN, K.K.; ASAIG, K. Essential *Bacillus subtilis* genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, n.8, p.4678-4683, 2003.

KOCSIS, M.G.; RANOCHA, P.; GAGE, D.A.; SIMON, E.S.; RHODES, D.; PEEL, G.J.; MELLEMA, S.; SAITO, K.; AWAZUHARA, M.; LI, C.; MEELEY, R.B.; TARCZYNSKI, M.C.; WAGNER, C.; HANSON, A.D. Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, n. 4, p.1808-1815, 2003.

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 dihydrodipicolinate synthase from *Zizania latifolia* (Griseb). **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 27, n. 2, p. 199-208, 2009.

KOTAKA, M.; REN, J.; LOCKYER, M.; HAWKINS, A.R.; STAMMERS, D.K. Structures of R- and T-state *Escherichia coli* aspartokinase III: mechanisms of the allosteric transition and inhibition by lysine. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 42, p. 31544-31552, 2006.

KUMARASAMY, K.K.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C.G.; IRFAN, S.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D.L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; BHARGAVI, R.; UJJWAYINI, R.; SARMA, J.B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M.A.; TURTON, J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infectious Diseases**, Bethesda, v.10, n.9, p.597-602, 2010.

LABER, B.; CLAUSEN, T.; HUBER, R.; MESSERSCHMIDT, A.; EGNER, U.; MULLER-FAHRNOW, A.; POHLENZ, H.D. Cloning, purification, and crystallization of *Escherichia coli* cystathionine β -lyase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 379, n. 1, p. 94-96, 1996.

LABER, B.; MAURER, W.; HANKE, C.; GRAFE, S.; EHLERT, S.; MESSERSCHMIDT, A.; CLAUSEN, T. Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase, **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.263, n.1, p. 212–221, 1999.

LANDRY, J.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A.; DELHAYE, S. Effect of the *opaque* and *floury* mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 3, p. 549-556, 2005.

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.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.151, n.3, p.269–275, 2007.

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

LEE, Y.T.; TA, H.T.; DUGGLEBY, R.G. Cyclopropane-1,1-dicarboxylate is a slow-, tight-binding inhibitor of rice ketol-acid reductoisomerase. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 4, p. 1035, 2005.

LEE, M.; MARTIN, M.; HUDSON, A.O.; LEE, J.; MUHITCH, M.J.; LEUSTEK, T. Methionine and threonine synthesis are limited by homoserine availability and not the activity of homoserine kinase in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 685-696, 2005.

LEUNG, E.W.W.; GUDDAT, L.W. Conformational changes in a plant ketol-acid reductoisomerase upon Mg^{2+} and NADPH binding as revealed by two crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, London, v.389, n. 1, p. 167-182, 2009.

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

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.

LEWIS A.J.; BARNES M.B.; GROSBACH, D.A.; PEO, E.R JR. Sequence in which the amino acids on corn (*Zea mays*) become limiting for growing rats. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v.112, n.4, p.782–788, 1982.

- LIU, X-H.; ZHANG, C-Y.; GUO, W-C.; LI, Y-H.; CHEN, P-Q.; WANG, T.; DONG, W-L.; WANG, B-L.; SUN, H-W.; LI, Z-M. Synthesis, Bioactivity and SAR study of N0-(5-substituted -1,3,4-thiadiazol-2-yl)-N-cyclopropylformyl-thioureas as ketol-acid reductoisomerase Inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry**, Florence, v. 24, n. 2, p. 545-552, 2009.
- LI, W.; HAN, Y.; TAO, F.; CHONG, K. Knockdown of SAMS genes encoding S-adenosyl-l-methionine synthetases causes methylation alterations of DNAs and histones and leads to late flowering in rice. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.168, n.15, p.1837– 1843, 2011.
- LIMA, S.T.C.; AZEVEDO, R.A.; SANTORO, L.G. Improved procedures for extraction of lysine 2-oxoglutarate reductase=saccharopine dehydrogenase dehydrogenase (LOR=SDH) enzyme from *Phaseolus vulgaris* cultivars. **New Zeal Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 31, n. 3, p. 261–268, 2003.
- LOESSNER, H.; ENDMANN, A.; ROHDE, M.; CURTISS, R.; WEISS, S. Differential effect of auxotrophies on the release of macromolecules by *Salmonella enterica* vaccine strains. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v.265, n.1, p.81–88, 2006.
- LOIZEAU, K.; GAMBONNET, B.; ZHANG, G-F.; CURIEN, G.; JABRIN, S.; VAN DER STRAETEN, D.; LAMBERT, W.E.; REBEILLE, F.; RAVANEL, S. Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: The N-terminal regulatory domain of cystathionine γ - synthase is cleaved in response to folate starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 2, p. 491–503, 2007.
- LUCAS-REINA, E.; SUÁREZ, M.F.; CÁNOVAS, F.M. Análisis de las enzimas aspartato aminotransferases de plantas. In: BONETE, M. J.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R, M. (Coord.). **Avances en el metabolism del nitrógeno**. Editorial Club Universitario. 2009. chap.15, p.125.
- LUGLI, J.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. **Plant Science**, Clare, v. 150, n. 1, p. 51-58, 2000.
- LUNIWAL, A.; WANG, L.; PAVLOVSKY, A.; ERHARDT, P.W.; VIOLA, R.E. Molecular docking and enzymatic evaluation to identify selective inhibitors of aspartate semialdehyde dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v.20, n.9, p.2950-2956, 2012.
- MALATRASI, M.; CORRADI, M.; SVENSSON, J. T.; CLOSE, T. J.; GULLI, M.; MARMIROLI, N. A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from *Hordeum vulgare* is differentially regulated by drought stress. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, n.6, p.965–976, 2006.
- MALITSKY, S.; BLUM, E.; LESS, H.; VENGER, I.; ELBAZ, M.; MORIN, S.; ESHED, Y.; AHARONI, A. The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, n. 4, p. 2021-2049, 2008.

MALONEY, G.S.; KOCHVENKO, A.; TIEMAN, D.M.; TOHGE, T.; KRIEGER, U.; ZAMIR, D.; TAYLOR, M.G.; FERNIE, A.R.; KLEE, H.J. Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.153, n.3, p.925-936, 2010.

MARCHI, G.; MARCHI, E.C.S; GUIMARÃES, T.G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2008. 36p.

MAS-DROUX, C.; CURIEN, G.; ROBERT-GENTHON, M.; LAURENCIN, M.; FERRER, J. L.; DUMAS, R. A novel organization of ACT domains in allosteric enzymes revealed by the crystal structure of *Arabidopsis* aspartate kinase. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 7, p. 1681–1692, 2006.

MAZUR, B.J.; CHUI, C.F.; SMITH, J.K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, n.4, p.1110–1117, 1987.

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.

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, pt.5, p.535-541, 2004.

MIRWALDT, C.; KORNDORFER, I.; HUBER, R. The crystal structure of dihydrodipicolinate synthase from *Escherichia coli* at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, London, v.246, n.1, p.227-239, 1995.

MOFFATT, B.A.; WERETILNYK, E. A. Sustaining S-adenosyl-lmethionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.113, n.4, p.435–442, 2001.

MORNEAU, D.J.K.; ABOUASSAF, E.; SKANES, J.E.; AITKEN, S.M. Development of a continuous assay and steady-state characterization of *Escherichia coli* threonine synthase. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 423, n. 1, p.78-85, 2012.

MOURAD, G.; KING, J.L-O-Methylthreonine-Resistant Mutant of *Arabidopsis* Defective in Isoleucine Feedback Regulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 1, p. 43-52.

MUDD, S.H.; DATKO, A.H. The S-methylmethionine cycle in *Lemna paucicostata*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 623–630, 1990.

OKAZAKI, S.; SUGAWARA, M.; YUHASHI, K-I.; MINAMISAWA, K. Rhizobitoxine-induced chlorosis occurs in coincidence with methionine deficiency in soybeans. **Annals of Botany**, London, v.100, n.1, p.55–59, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária. 2001. 362p.

ONOUCHI, H.; NAGAMI, Y.; HARAGUCHI, Y.; NAKAMOTO, M.; NISHIMURA, Y.; SAKURAI, R.; NAGAO, N.; KAWASAKI, D.; KADOKURA, Y.; NAITO, S. Nascent peptide-mediated translation elongation arrest coupled with mRNA degradation in the CGS1 gene of *Arabidopsis*. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 15, p. 1799-1810, 2005.

ONOUCHI, H.; LAMBEIN, I.; SAKURAI, R.; SUZUKI, A.; CHIBA, Y.; NAITO S. Autoregulation of the gene for cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis*: post-transcriptional regulation induced by S-adenosylmethionine. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 32, pt. 4, 597-600, 2004.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, B.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.19, p.5505–5512.

PASQUALETTO, A.; ZITO, R. K.; RUIZ, H. A.; SILVA, A. A. Lixiviação de imazethapyr e imazamox em diferentes solos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.29, n.1, p.1-5, 1999.

PETERSON, D.E.; THOMPSON, C.R.; REGEHR, D.L.; AL-KHATIB, K. **Herbicide mode of action**. Topeka: Kansas State University, 2001. 24p.

PRAKASH, J. Rice bran proteins: properties and food uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.36, n.6, p.537–552, 1996.

QI, Q.; HUANG, J.; CROWLEY, J.; RUSCHKE, L.; GOLDMAN, B.S.; WEN, L.; RAPP, W.D. Metabolically engineered soybean seed with enhanced threonine levels: biochemical characterization and seed-specific expression of lysine-insensitive variants of aspartate kinases from the enteric bacterium *Xenorhabdus bovienii*. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.9, n.2, p.193-204, 2010.

RAMOS, C.; CALDERON, I.L. Biochemical evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* *THR4* gene encodes threonine synthetase, **Febs Letters**, Amsterdam, v.351, n.3, p.357–359, 1994.

RAVANEL, S.; JOB, D.; DOUCE, R. Purification and properties of cystathionine γ -lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 320, pt. 2, p.383–392, 1996.

RAVANEL, S; GAKIERE, B; JOB, D.; DOUCE, R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 13, p.7805–7812, 1998.

REBEILLE, F.; JABRIN, S.; BLIGNY, R.; LOIZEAU, K.; GAMBONNET, B.; VAN WILDER, V.; DOUCE R.; RAVANEL, R. Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a gamma-leavage process and leads to *S*-methylcysteine and isoleucine syntheses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 103, n. 42, p.15687-15692, 2006.

ROBIN, A.Y.; COBESSI, D.; CURIEN, G.; ROBERT-GENTHON, M.; FERRER, J-L.; DUMAS, R. A New Mode of Dimerization of Allosteric Enzymes with ACT Domains Revealed by the Crystal Structure of the Aspartate Kinase from Cyanobacteria. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 399, n. 2, p. 283-293, 2010.

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

RINDER, J.; CASAZZA, A.P.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Regulation of aspartate-derived amino acid homeostasis in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) by expression of *E. coli* homoserine kinase. **Amino Acids**, Wien, v.34, n.2, p. 213–222, 2008.

ROEDER, S.; DRESCHLER, K.; WIRTZ, M.; CRISTESCU, M. S.; van HARREN, F.J.M.; HELL, R. PIECHULLA, B. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. **Plant Molecular Biology**, Dodrecht, v.70, n.5, p.535–546, 2009.

ROJE, S. *S*-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. **Phytochemistry**, New York, v. 67, n. 15, p. 1686-1698, 2006.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D.C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Ed.). Herbicide resistance in plants. **Biology and Biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.141-170,

SALES, M.A.; SHIVRAIN, V.K.; BURGOS, N.R.; KUK, Y.I. Amino acid substitutions in the acetolactate synthase gene of red rice (*Oryza sativa*) confer resistance to imazethapyr. **Weed Science**, Urbana, v.56, n.4, p.485-489, 2008.

SCHROEDER, A.C.; ZHU, C.; YANAMADALA, S.R.; CAHOON, R.E.; ARKUS, K.A. J.; WACHSSTOCK, L.; BLEEKE, J.; KRISHNAM, H.B.; JEZ, J.M. Treonine-insensitive homoserine dehydrogenase from soybean genomic organization, kinetic mechanism, and in vivo activity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 2, p. 827-834, 2010.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, San Diego, v.80, n.7, p.795-824, 2000.

SHANER, D.L. Studies on mechanisms and genetics of resistance: their contribution to herbicide resistance management. **Brighton Crop Protection Conference**, Weeds, v.2, p.537-545, 1995.

SHEN, C.R.; LIAO, J.C. Photosynthetic production of 2-methyl-1-butanol from CO₂ in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 and characterization of the native acetohydroxyacid synthase. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 5, n. 11, p. 9574-9583, 2012.

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

SHIMIZU, M.; GOTO, M.; HANAI, M.; SHIMIZU, T.; IZAWA, N.; KANAMOTO, H.; TOMIZAWA, K-I.; YOKOTA, A.; KOBAYASHI, H. Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 4, p. 1976-1983, 2008.

SIBARANI, N.E.; GORMAN, M.A.; DOGOVSKI, C.; PARKER, M.W.; PERUGRINI, M. A. Crystallization of dihydrodipicolinate synthase from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications**, Copenhagen, v.66, pt. 1, p.32-36, 2010.

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.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Biosynthesis of branched-chain aminoacids from test-tube to Weld. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.935-944, 1995.

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

SWEETLOVE, L. J.; FELL, D.; FERNIE, A.R. Getting to grips with the plant metabolic network. **Biochemical Journal**, London, v.409, n.1, p.27-41, 2008.

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.

TABE, L.M.; HIGGINS, T. Engineering plant protein composition for improved nutrition. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.3, n.7, p.282-286, 1998.

TABOR, C.W.; TABOR, H. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, New York, v.56, p.251-282, 1984.

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 lysineketoglutarate reductase using a polyadenylation signal located within an intron. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, n.1, p.147-154, 2002.

TAYLOR, W.R. A deeply knotted protein structure and how it might fold. **Nature**, London, v. 406, n. 6798, p. 916-919, 2000.

THOEN, A.; ROGNES, S.E.; AARNES H. Biosynthesis of threonine from homoserine in pea-seedlings. 2. Threonine synthase. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.113–119, 1978.

TODD, C.D.; POLACCO, J.C. AtAAH encodes a protein with allantate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v. 223, n. 5, p. 1108-1113, 2006.

THOMAZEAU, K.; CURIEN, G.; DUMAS, R.; BIOU, V. Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Protein Science**, Cold Spring Harbo, v.10, n.3, p.638-648, 2001.

TORO, A.A.; BELLATO, C.M.; MESTRINELLI, F.; AZEVEDO, R.A. High-lysine maize endosperm mutants: proteomic analysis of glutelin storage proteins. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON AMINO ACIDS AND PROTEINS (ICAAP) AMINO ACIDS, 2007. Washington. **Proceedings...** Washington: Amino Acids, 2007. v.33. p.I–LXX.

TRAN, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Urbana, v.50, n.6, p.700–712, 2002.

TRUMBO, P.R.; YATES, A.A.; SCHLICKER-RENFRO, S.; SUITOR, C. Dietary reference intakes: revised nutritional equivalents for folate, vitamin e and provitamin a carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.16, n.3, p. 379-382, 2003.

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

VAN DAMME, M.; ZEILMAKER, T.; ELBERSE, J.; ANDEL, A.; MONIQUE DE SAIN-VAN DER VELDEN; ACKERVEKEN, G. V. D. Downy mildew resistance in *Arabidopsis* by mutation of homoserine kinase. **The Plant Cell**, Rockville, v.21, n.7, p.2179–2189, 2009.

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.

VARISI, V.A.; CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; CHRISTOFOLETI, R.M.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Lysine biosynthesis and nitrogen metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa*): study of enzymes and nitrogen-containing compounds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.46, n.1, p.11–18, 2008.

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.

VIDAL, R.A. **Herbicidas**: mecanismo de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Palotti. 1997. 165p.

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

VOSS, J.E.; SCALLY, S.W.; TAYLOR, N.L.; ATKINSON, S.C.; GRIFFIN, M.D.W.; HUTTON, C.A.; PARKER, M.W.; ALDERTON, M.R.; GERRARD, J.A.; DOBSON, R. C. J.; DOGOVSKI, C.; PERUGINI, M.A. Substrate-mediated stabilization of a tetrameric drug target reveals Achilles heel in anthrax. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.285, n.8, p.5188-5195, 2010.

VYAZMENSKY, M.; ZHERDEV, Y.; SLUTZKER, A.; BELENKY, I.; KRYUKOV, O.; BARAK, Z.; CHIPMAN, D.M. Interactions between large and small subunits of different acetohydroxyacid synthase isozymes of *E. coli*. **Amino Acids**, Wien, v.37, p.120, 2009.

WALSH, D.T.; BABIKER, E.M.; BURKE, I.C.; HULBERT, S.H. Camelina mutants resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p.1053-1053, 2012.

WANG, B.L.; LI, Y.H.; WANG, J.G.; MA, Y.; LI, Z.M. Molecular design, synthesis and biological activities of amidines as new ketol-acid reductoisomerase inhibitors. **Chinese Chemical Letters**, Beijing, v.19, n. 6, p. 651-654, 2008.

WANG, X.; LOPES-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.

WHALEY, C.M.; WILSON, H.P.; WESTWOOD, J.H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Urbana, v.55, n.2, p.83–90, 2007.

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.

YOON, G.S.; KO, K.H.; KANG, H.W.; SUH, J.W.; KIM, Y.S.; RYU, Y.W. Characterization of S-adenosylmethionine synthetase from *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 and its effect on antibiotic production. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.39, n.3, p.466–473, 2006.

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

YU, J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of 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.

YUEFANG, Z.; XIN, W.; CONGWEI, N.; Arginine 26 and Aspartic Acid 69 of the Regulatory Subunit are Key Residues of Subunits Interaction of Acetohydroxyacid Synthase Isozyme III from *E. coli*. **Chembiochem**, Weinheim, v. 13, n. 16, p. 2445-2454, 2012.

ZEH, M.; CASAZZA, A.; KREFT, O.; ROESSNER, U.; BIEBERICH, K.; WILLMITZER L.; HOEFGEN R.; HESSE, H. Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 3, p. 792-802, 2001.

ZHANG, X.; FEN, M.; SHI, X.; BAI, L.; ZHOU, P. Overexpression of yeast S-adenosylmethionine synthetase *metK* in *Streptomyces actuosus* leads to increased production of nosiheptide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.78, n.6, p.991-995, 2008.

ZHOU, T.; DAUGHERTY, M.; GRISHIN, N.V.; OSTERMAN, A.L.; ZHANG, H. Structure and mechanism of homoserine kinase: prototype for the GHMP kinase superfamily. **Structure**, London, v. 8, n. 12, p.1247–1257, 2000.

ZHOU, X.H.; DONG, Y.; WANG, Y.; XIAO, X.; XU, YONG.; XU, B.; XIN, L.; WEI, X. S.; LIU, Q.Q. A three generation study with high-lysine transgenic rice in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.50, n.6, p.1902-1910, 2012.

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.

ZHU, X.; GALILI G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, 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.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; GALILI, G. A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase= saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, n. 4, p.1539–1545, 2001.

6 CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com a metodologia pela qual foi realizada esta pesquisa, pode-se concluir que:

- o envolvimento e cooperação de diferentes profissionais e pesquisadores de outros países têm sido necessários para uma melhor compreensão da linha de pesquisa de interesse;
- as ciências agrárias brasileiras têm sido de grande importância, principalmente para o contexto social;
- estudos contínuos podem explorar as limitações das técnicas moleculares e bioquímicas com suas aplicações;
- a complexa regulação que existe entre as rotas para síntese dos diferentes aminoácidos, através de um precursor comum, e o acúmulo de lisina que também envolve a regulação de seu catabolismo, são pontos importantes a serem esclarecidos para um melhor entendimento da via do ácido aspártico em cereais.