

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**EFEITO DOS ÁCIDOS α -CETOISOCAPRÓICO,
 α -CETOISOVALÉRICO E α -CETO- β -METILVALÉRICO
SOBRE A INCORPORAÇÃO *IN VITRO* DE ^{32}P EM
FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Tatiana Branco

Orientadora:
Prof.a. Dra. Regina Pessoa Pureur

Co-orientador:
Prof. Dr. Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas- Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre
2000

Dedico este trabalho a minha mãe, ao meu irmão, a minha avó e à Beatris, por todo apoio, amor e companheirismo que me dedicaram ao longo desta caminhada.

Ao meu pai, que eu amo muito e mesmo distante, manteve-se sempre ao meu lado.

“Com amor, ao Daniel, pelo apoio e incentivo constantes que foram decisivos para superar as dificuldades. Por todo amor e paciência dedicados que foram os alicerces nesta caminhada”.

AGRADECIMENTOS

À Regina, pela orientação e dedicação ao nosso trabalho. Por toda a ajuda, confiança e oportunidade de crescimento no ambiente de pesquisa.

Ao Moacir, pela confiança e por ter corajosamente me aceito como co-orientada de mestrado. Pela amizade, incentivo e compreensão nos momentos difíceis.

Em especial, ao Salmo, pela amizade e pelo exemplo de persistência e coragem nos desafios da vida. Pela confiança depositada ao longo desta dissertação. Agradeço você a possibilidade desta conquista, alimentando sempre os meus ideais e incentivando-me a prosseguir na jornada superando os obstáculos.

As grandes amigas, Renata, Betânia e Ana Cristina, pela equipe brilhante e pela ajuda essencial neste trabalho. Pela amizade e apoio que tornaram estes dois anos em Porto Alegre inesquecíveis.

À querida Ângela, pela amizade e apoio. Por tudo que me ensinou e pelo enorme auxílio e dedicação neste trabalho.

A minha querida amiga Cibele, pela amizade e carinho. Pelo imenso apoio e incentivo que me foram muito importantes. Pelos bons momentos que tivemos juntas.

À querida Adriana, pela amizade, apoio e incentivo constantes que foram fundamentais nestes dois anos. Por estar sempre ao meu lado nas alegrias e tristeza.

À Beatris, ao Júnior e a Júlia, pela amizade, carinho, confiança e pelas boas horas que passamos juntos. Por terem me acolhido e pelo exemplo de companheirismo. Vocês são inesquecíveis!

À Luciana e aos grupos de Citoesqueleto e EIM, por todo auxílio e amizade.

As insubstituíveis, Alexandra e Márcia, por estarem sempre presentes e pela eterna amizade que nos une. Pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos do SGM do Hospital de Clínicas, pela amizade e por tudo que me ensinaram.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Deus, por iluminar meu caminho.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo que se caracteriza pela deficiência da atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, ocorrendo acúmulo tecidual dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, valina e isoleucina, bem como dos seus α -cetoácidos (CACR) correspondentes, ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -cetoisovalérico (CIV) e ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV). Este acúmulo está relacionado com manifestações severas como letargia, apnéia, hipotonia ou hipertonia, coma, convulsões, retardo mental, acidose metabólica e encefalopatia, entre outras. Os pacientes com DXB apresentam odor de açúcar queimado na urina atribuído aos CACR que se encontram elevados. A literatura aponta a leucina e o ácido α -cetoisocapróico como os principais agentes neurotóxicos da doença.

O citoesqueleto do Sistema Nervoso Central (SNC) é constituído por microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. O citoesqueleto é uma estrutura altamente dinâmica responsável pela forma e movimento celular, fornecendo também a maquinaria para os movimentos intracelulares como o transporte de organelas de um lugar a outro do citoplasma. A fosforilação protéica regula uma grande variedade de funções celulares no SNC, como a plasticidade das células e a remodelagem dinâmica da arquitetura citoesquelética.

Estudamos, no presente trabalho, o efeito do CIC, CIV e CMV sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P em filamentos intermediários (NF-M, NF-L, Vim e GFAP) de córtex cerebral de ratos de 17 dias.

Fatias do tecido cerebral foram incubadas com os metabólitos na presença de ^{32}P -ortofosfato. A fração citoesquelética foi extraída e a radioatividade incorporada nas subunidades dos filamentos intermediários foi medida em um cintilador líquido. Os resultados mostraram que o CIC aumenta de maneira dose-dependente a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas subunidades NF-M, NF-L, Vim e GFAP, enquanto que o CIV e o CMV não alteram este parâmetro.

Com o objetivo de verificar se o efeito do CIC é mediado pela PKA e PKCaM II, foram utilizados os inibidores específicos das quinases dependentes dos segundos mensageiros AMP cíclico e cálcio/calmodulina (PKA e PKCaM II) do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto de córtex cerebral de ratos jovens, KN-93 e H-89, respectivamente. Os resultados mostraram que o aumento da incorporação *in vitro* de ^{32}P causado pelo CIC é mediado pelas PKA e PKCaM II.

Considerando que o processo de fosforilação/desfosforilação é importante na regulação da interação do citoesqueleto neuronal, propomos que este efeito do CIC poderia estar relacionado com a disfunção cerebral da DXB.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. Citoesqueleto	1
1.1. Filamentos Intermediários	3
1.2. Microtúbulos	8
1.3. Microfilamentos	10
2. Fosforilação de Proteínas	13
2.1. Fosforilação de proteínas no SNC	14
2.2. Proteína Quinases	15
2.3. Proteína Fosfatases	18
2.4. Fosforilação de Proteínas do Citoesqueleto	19
3. Doença do Xarope do Bordo (DXB)	21
OBJETIVOS	28
ANEXO 1	29
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	34
PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS E TABELA DA INTRODUÇÃO

Figura 1.	Microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários no SNC	2
Figura 2.	Citoesqueleto axonal e dendrítico	3
Figura 3.	Representação esquemática de um modelo de formação de filamento intermediário	4
Figura 4.	Representação esquemática de um neurofilamento	6
Figura 5.	Representação esquemática de um microtúbulo	9
Figura 6.	Representação esquemática de um microfilamento	11
Figura 7.	Sistema fosforilante e desfosforilante de uma proteína	14
Figura 8.	Representação esquemática de via catabólica dos AACR	22
Tabela 1.	Classes de filamentos intermediários	5

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR	Áminoácidos de cadeia ramificada
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	3',5'-Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ⁺²	Íon cálcio
CACR	Cetoácidos de cadeia ramificada
CIC	Ácido α -cetoisocapróico
CIV	Ácido α -cetoisovalérico
CMV	Ácido α -ceto- β -metilvalérico
DAG	Diacilglicerol
DXB	Doença do Xarope do Bordo
EIM	Erros inatos do metabolismo
GABA	Ácido γ aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GMPc	3',5'-Guanosina monofosfato cíclico
H-89	Inibidor específico da PKA {N-[2-((p-bromocinamil)amino)etil]-5- isoquinolinasulfonamida, HCl}
I1	Inibidor 1 da fosfatase do tipo 1
I2	Inibidor 2 da fosfatase do tipo 2
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato

KN-93	Inibidor específico da PKCaM II. 2-[N-(2-hidroxietil)-N-(4-metoxibenzenosulfonil)]amino-N-(4-clorocinamil)-N-metilbenzilamino
MAPs	Proteínas associadas a microtúbulos
MARCKS	Substrato miristoilado de proteína quinase C rico em alanina
MTOC	Centro de organização de microtúbulos
NF-H	Subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos
NF-L	Subunidade protéica de 68 kDa dos neurofilamentos
NF-M	Subunidade protéica de 150 kDa dos neurofilamentos
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de Cálcio/Fosfolipídios
PKCaM	Proteína quinase dependente de Cálcio/Calmodulina
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PP1	Proteína fosfatase do tipo 1
PP2A	Proteína fosfatase do tipo 2
PP2B	Proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C	Proteína fosfatase do tipo 2C
SNC	Sistema nervoso central
Vim	Vimentina

INTRODUÇÃO

1. Citoesqueleto

A capacidade que as células eucarióticas possuem de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos protéicos que se estende por todo o citoplasma. Esta rede é chamada de citoesqueleto, sendo uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, divide-se ou responde a alterações do meio extracelular. O citoesqueleto também fornece a maquinaria para movimentos intracelulares como o transporte de organelas de um lugar a outro no citoplasma e a segregação dos cromossomos durante a mitose (Kirkpatrick & Brady, 1999; Alberts et al., 1994).

As diferentes atividades do citoesqueleto no Sistema Nervoso Central (SNC) dependem de três diferentes tipos de filamentos protéicos: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários (Fig. 1). Cada tipo de filamento é formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos: actina monomérica (actina G) nos microfilamentos, tubulina nos microtúbulos e uma família de proteínas fibrosas nos filamentos intermediários (Elson, 1988; Ingber, 1993; Alberts et al., 1994).

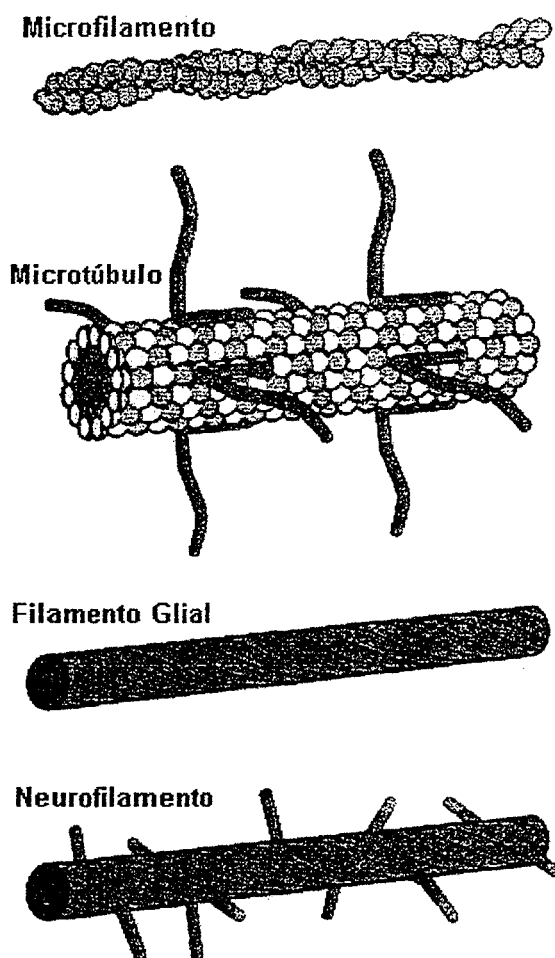


Figura 1. Microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários no SNC

(Adaptado de Kirkpatrick & Brady, 1999)

Os neurônios mostram variações nas dimensões e arquitetura de seus corpos celulares que determinam os padrões específicos das conexões sinápticas, onde dois processos fundamentais e distintos são responsáveis pelo fluxo direcionado de informações dentro da célula: dendritos e axônios. A organização citoesquelética do corpo celular difere da organização axonal e dendrítica, e estas duas extensões assimétricas diferem acentuadamente uma da outra (Fig. 2) (Shelanski et al., 1994). Os vários componentes do citoesqueleto neuronal estão envolvidos

diretamente com a formação, manutenção e modificação destas estruturas especializadas. Estes eventos requerem a plasticidade do citoesqueleto, de forma que o equilíbrio entre a polimerização e despolimerização altera-se em resposta a vários estímulos fisiológicos (Lasek, 1988).

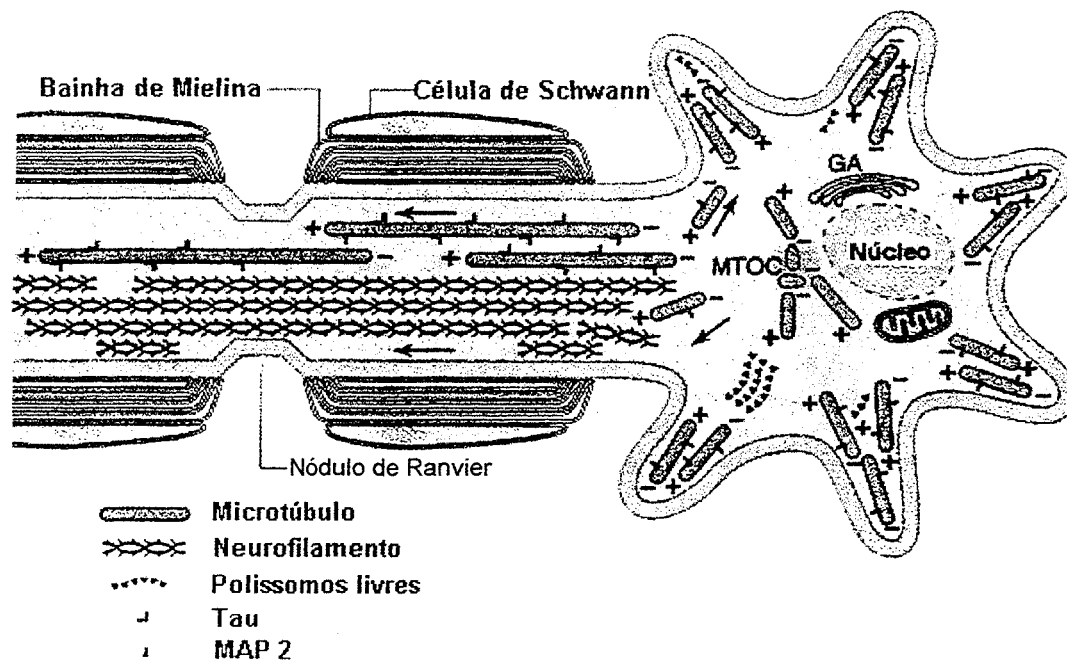


Figura 2. Citoesqueleto axonal e dendrítico

(Adaptado de Kirkpatrick & Brady, 1999)

1.1. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários são polímeros de proteínas fibrosas, com diâmetro aparente de 8-10 nm. Cada subunidade possui um domínio amino-terminal, um carbóxi-terminal e um central em α -hélice. A maioria das proteínas que formam os filamentos intermediários compartilham um domínio central que possui 310 aminoácidos de comprimento, assumindo uma forma de α -hélice estendida. A região central em α -hélice é bastante

conservada, enquanto que os domínios amino-terminal e carbóxi-terminal não formam α -hélice e variam bastante em tamanho e sequência de aminoácidos entre os diferentes filamentos intermediários (Alberts et al., 1994).

Na formação de um filamento intermediário, um monômero interage com outro monômero idêntico para formar um dímero, no qual os domínios em forma de bastão se alinham paralelamente enrolando-se em uma estrutura torcida. Dois dímeros alinham-se lado a lado para formar um tetrâmero antiparalelo com quatro cadeias polipeptídicas. Oito tetrâmeros enrolam-se para formar a estrutura do filamento intermediário com 10 nm de diâmetro (Fig. 3) (Alberts et al., 1994).

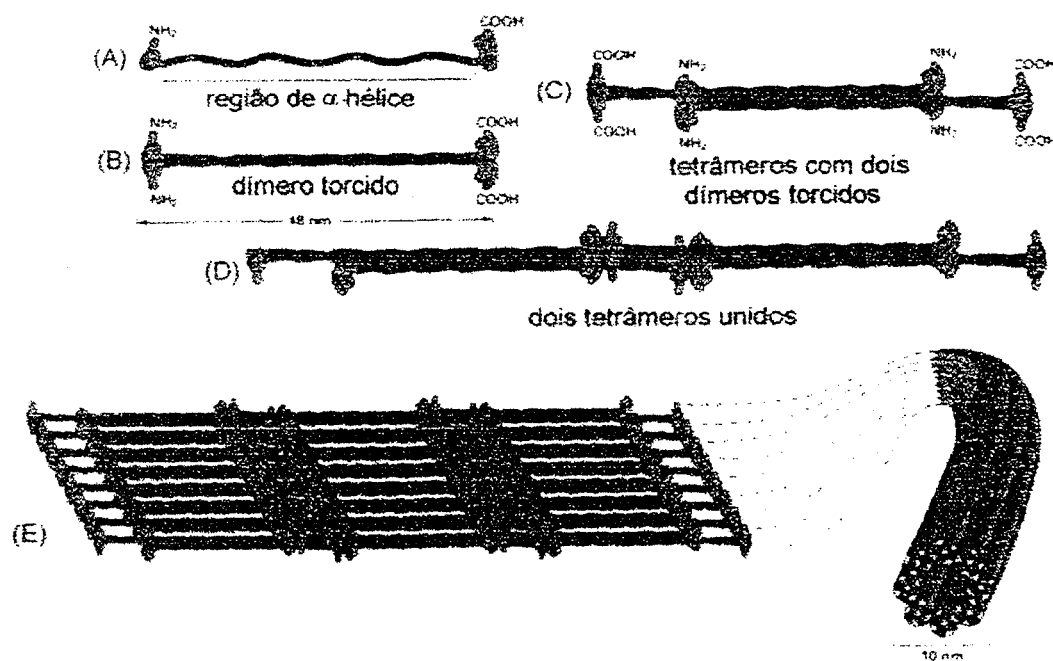


Figura 3. Representação esquemática de um modelo de formação de filamento intermediário

(A): monômero; (B) dímero; (C) tetrâmero , formado de dois dímeros dispostos paralelamente; (D) dois tetrâmeros unidos; (E) filamento intermediário com 10 nm de diâmetro (Adaptado de Alberts et al., 1994).

Os filamentos intermediários podem ser agrupados em 4 classes:

- 1) Filamentos de queratina
- 2) Vimentina e filamentos relacionados à vimentina
- 3) Neurofilamentos
- 4) Lâmina nuclear

Cada filamento é formado pela polimerização de subunidades protéicas específicas para cada tipo celular, como mostrado na tabela 1 (Alberts et al., 1994; Steinert & Roop, 1988).

Tabela 1: Classes de filamentos intermediários

Classes de Filamentos Intermediários	Subunidades Peso molecular	Localização celular
Queratinas	Tipo I (ácida) 40-70 kDa Tipo II (neutra/básica) 40-70 kDa	Células epiteliais
Vimentina e proteínas relacionadas à vimentina	Vimentina 54 kDa Desmina 53 kDa GFAP 50 kDa Periferina 66 kDa	Células de origem mesenquimal Células musculares Células gliais (Astrócitos e células de Schwann) Neurônios
Neurofilamentos	NF-L, NF-M, NF-H 68, 150, 200 kDa	Neurônios
Lâmina nuclear	Lâmina A, B e C	Lâmina nuclear de células eucarióticas

(Adaptado de Alberts et al., 1994)

Os neurofilamentos, filamentos intermediários encontrados exclusivamente em neurônios, são formados por três subunidades, NF-L, NF-M e NF-H, com massas moleculares aparentes de 68, 150 e 200 kDa, respectivamente. Enquanto as três subunidades possuem os mesmos 310 aminoácidos no domínio central, os neurofilamentos diferem entre si pelo seu domínio amino-terminal e carbóxi-terminal (Wong et al., 1995). Embora as três subunidades polimerizem contribuindo para a formação do filamento intermediário, as subunidades NF-M e NF-H contribuem também para a formação de projeções laterais (Fig. 4) (Kirkpatrick & Brady, 1999).

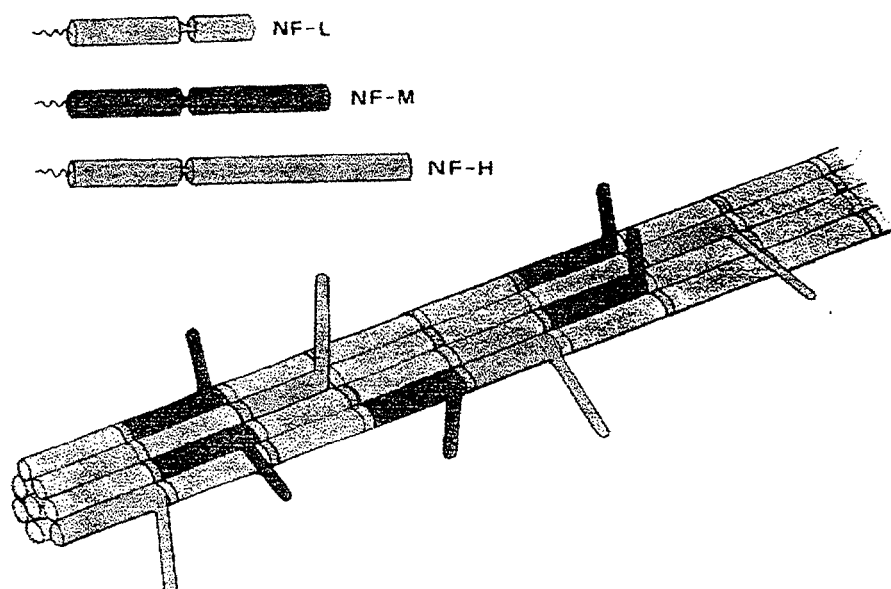


Figura 4. Representação esquemática de um neurofilamento
(Adaptado de Nixon & Sihag, 1991)

Os neurofilamentos sofrem várias modificações pós-traducionais, sendo que a fosforilação é a principal delas, estando diretamente relacionada com suas funções (Raabe et al., 1996). A população neuronal varia em número, em composição de polipeptídeos e nos níveis de fosforilação dos neurofilamentos, e tanto a expressão quanto a fosforilação das subunidades dos neurofilamentos são reguladas durante o

desenvolvimento, manutenção e regeneração neuronais (Brady, 1992; De Mattos et al., 1994a).

Os neurofilamentos determinam o calibre axonal, contribuem para a plasticidade do citoesqueleto, auxiliam na estabilidade da morfologia neuronal e participam do transporte axonal de metabólitos do corpo celular até a sinapse (Lasek, 1988; Mônaco et al., 1989; Hollenbeck, 1989; Brady, 1992).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma subunidade de filamento intermediário expressa exclusivamente em astrócitos, possuindo peso molecular de 50 kDa, sendo composta por três regiões distintas, como no caso de todas as subunidades dos filamentos intermediários (Feinstein et al., 1992; McLendon et al., 1994). A região amino-terminal é composta de 35 resíduos de aminoácidos e possui uma estrutura em “ β -turn” que contém oito resíduos de arginina, caracterizando esta região altamente básica. A região carbóxi-terminal contém cerca de 50 resíduos de aminoácidos, possuindo uma estrutura globular que pode estar envolvida com interações entre GFAP e outras proteínas (Steinert, 1985; Geisler, 1985; Inagaki, 1990; Feinstein, 1992; Inagaki, 1994).

A vimentina (Vim) é uma subunidade de filamento intermediário de 54 kDa e é a mais amplamente distribuída entre as proteínas dos filamentos intermediários, ocorrendo em muitas células de origem mesodérmica, incluindo fibroblastos, células endoteliais e glóbulos brancos, além disso, muitas células expressam vimentina de forma transitória durante o desenvolvimento (Alberts et al., 1994). Nos estágios iniciais de desenvolvimento do SNC, os filamentos intermediários de astrócitos imaturos são compostos de vimentina (Franke et al., 1978), perto do nascimento parte da vimentina é substituída pela GFAP. Depois, a

vimentina desaparece e é repostada pela GFAP em células astrogliais diferenciadas que coexpressam as duas proteínas (Pixley & de Vellis, 1984; Schnitzer et al., 1981). Entretanto, a vimentina e a GFAP podem ser expressas simultaneamente em células gliais especializadas, tais como em subpopulações de astrócitos fibrosos (de Vitry et al., 1981), em células de Bergmann (Lazarides, 1982), em células de Schwann (Yen & Fields, 1981) e em células reativas de Müller (Bignami, 1984).

1.2. Microtúbulos

Os microtúbulos são polímeros longos e rígidos que se estendem por todo o citoplasma e coordenam a localização intracelular das organelas e de outros componentes celulares. Um microtúbulo pode ser descrito como uma estrutura cilíndrica, com diâmetro de 25 nm, no qual os heterodímeros de tubulina α e β estão dispostos em 13 protofilamentos lineares. O microtúbulo é uma estrutura polar, uma vez que os protofilamentos estão paralelamente alinhados com a mesma polaridade (Fig. 5) (Alberts et al., 1994). Em alguns casos, projeções podem ser visualizadas na superfície do microtúbulo. Estas projeções parecem interagir com outros microtúbulos ou com outras estruturas, mas estas interações são de natureza transitória (Hirokawa, 1986).

Os microtúbulos neuronais são bioquimicamente e fisiologicamente diversos, com composições que variam de acordo com sua localização nos axônios ou dendritos. Mesmo dentro de um microtúbulo, existem domínios diferentes que variam na composição e graus de estabilidade. Enquanto domínios lábeis são capazes de despolimerizar, domínios estáveis são preservados em segmentos pequenos e podem servir para nuclear ou organizar os microtúbulos nos axônios, particularmente durante a regeneração (Brady, 1992; Brady, 1988).

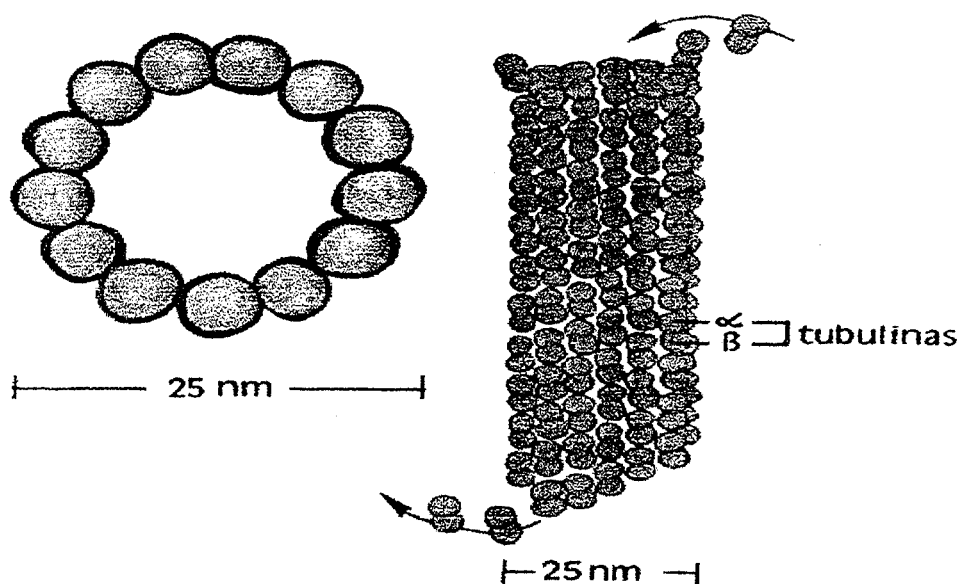


Figura 5. Representação esquemática de um microtúbulo

(Adaptado de Alberts et al., 1994)

Múltiplos genes existem para ambas as subunidades, tubulina α e β , incluindo isoformas específicas cerebrais. A expressão destes genes é regulada durante o desenvolvimento, a regeneração e em diferentes classes de neurônios (Sullivan, 1988; Luduena, 1993).

As tubulinas podem ser covalentemente modificadas após a polimerização e estas modificações podem resultar no aumento da estabilidade dos microtúbulos citoplasmáticos. Entre as modificações pós-traducionais, incluem-se a fosforilação, a ligação com outras proteínas [proteínas associadas (MAPs)]. Além destas modificações, a tubulina α também sofre acetilação em um resíduo de lisina específico e destirosinação da região carbóxi-terminal. A acetilação e a destirosinação ocorrem nos microtúbulos, mas não nas moléculas de tubulina livres,

fornecendo sítios de ligação para as MAPs, que mantêm a estabilidade do polímero (MacRae, 1992; Brady, 1992).

As MAPs interagem com os microtúbulos mantendo uma constante estequiometria com as moléculas de tubulina através de ciclos de polimerização e despolimerização. Algumas MAPs são distribuídas tanto em tecidos neuronais como não-neuronais. Duas principais classes de MAPs podem ser isoladas de cérebro em associação com microtúbulos: proteínas de alto peso molecular que incluem a MAP1 e a MAP2, cujos pesos moleculares variam de 200 kDa a 300 kDa, respectivamente, e as MAPs de baixo peso molecular, conhecidas como proteínas *tau*, com pesos moleculares de 55 a 62 kDa (Steward, 1992; Drechsel et al., 1992; Lee, 1993).

Os microtúbulos são os principais determinantes do tamanho e morfologia neuronais. Eles participam do transporte axonal no neurônio maduro através do ancoramento de duas proteínas motoras, a cinesina e a dineína, e também participam do desenvolvimento e crescimento neuronais (Lasek, 1988; Brady, 1992). A dinâmica dos microtúbulos envolve mudanças na sua composição e distribuição, as quais ocorrem durante o desenvolvimento neuronal, e estas mudanças estão diretamente relacionadas com o movimento direcionado dos cones de crescimento e com a neuritogênese (Avila et al., 1994; Díez-Guerra & Avila, 1995; Tanaka et al., 1995).

1.3. Microfilamentos

Os microfilamentos são filamentos de 8 nm de espessura, constituindo-se de uma dupla hélice compacta de moléculas de actina globular (actina G). A actina G é uma proteína com peso molecular de 43 kDa (Alberts et al., 1994). Os filamentos de actina são mais finos e mais

flexíveis do que os microtúbulos. Estes filamentos podem formar estruturas estáveis e lábeis nas células. Filamentos estáveis formam o núcleo das microvilosidades e constituem um componente crucial da maquinaria contrátil das células musculares. Muitos movimentos celulares, no entanto, dependem de estruturas lábeis constituídas a partir dos filamentos de actina (Fig. 6) (Alberts et al., 1994).

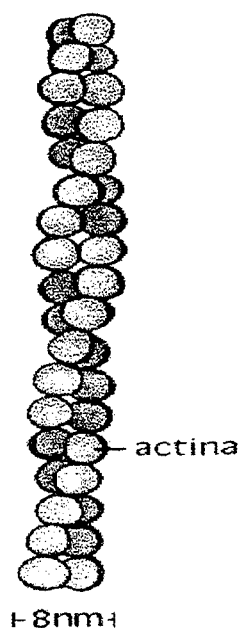


Figura 6. Representação esquemática de um microfilamento
(Adaptado de Alberts et al., 1994)

Os microfilamentos são encontrados nas células da glia e nos neurônios, onde estão concentrados nos terminais pré-sinápticos, nos espinhos dendríticos, nos cones de crescimento e no citoplasma adjacente à membrana plasmática. Geralmente os microfilamentos neuronais são pequenos e organizados em rede. No citoplasma axonal, os microfilamentos estão aparentemente ao lado dos microtúbulos e perto da membrana plasmática. Nos cones de crescimento, os microfilamentos são

mais longos e possuem uma organização mais elaborada (Smith, 1988; Brady, 1992; Lasek, 1988).

Várias proteínas que interagem com os microfilamentos têm sido descritas, tais como, por exemplo, a proteína motora miosina. Exemplos de proteínas associadas aos microfilamentos são a fodrina ou espectrina e as debrinas. Microfilamentos e proteínas associadas, como a espectrina, formam o complexo de sustentação da membrana plasmática, sendo importantes para interações célula-célula, para a forma celular e distribuição das proteínas de membrana. As espectrinas parecem estar relacionadas com a modulação da transmissão sináptica por sua associação com vesículas sinápticas (Johnson et al., 1991; Blomgren, 1995; Kirkpatrick & Brady, 1999). As debrinas são encontradas em altas concentrações nos espinhos dendríticos, em associação com os filamentos de actina, estando relacionadas com a plasticidade de compartimentos celulares e com a regulação intracelular da morfogênese neuronal (Shirao, 1995).

Os microfilamentos participam da interação do neurônio com a matriz extracelular e com as células vizinhas e regulam a plasticidade em compartimentos específicos no corpo celular e nos neuritos (Kirkpatrick & Brady, 1999; Smith, 1988; Shirao, 1995).

2. Fosforilação de Proteínas

A fosforilação de proteínas é de fundamental importância na regulação biológica. Todos os tipos de sinais extracelulares, tanto dentro como fora do SNC, são conhecidos por produzirem muitos dos diversos efeitos fisiológicos através da regulação do estado de fosforilação de fosfoproteínas específicas em células alvo (Wallas & Greengard, 1991).

Os sistemas de fosforilação e desfosforilação são extremamente dinâmicos e consistem de proteína quinases, proteína fosfatases e substrato protéico. O substrato protéico é convertido de sua forma desfosforilada para sua forma fosforilada por proteína quinases; e a sua forma fosforilada é convertida novamente para a respectiva forma desfosforilada por proteína fosfatases. As quinases são fosfotransferases que catalisam a transferência do fosfato γ do ATP para o grupo hidroxila de resíduos de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. As proteína fosfatases são fosfoesterases que catalisam a hidrólise do grupo fosfato do substrato protéico, permitindo a reversibilidade do mecanismo (Fig. 7) (Wallas & Greengard, 1991; Nestler & Greengard, 1994).

A fosforilação de uma proteína altera a sua carga, já que os grupos fosfato são altamente negativos, alterando a conformação da proteína e conseqüentemente causando uma mudança na sua atividade biológica. A mudança no estado de fosforilação de uma proteína é atribuída as alterações na atividade das quinases ou fosfatases, ou ainda nas propriedades da própria proteína como um substrato para distintas quinases ou fosfatases (Wallas & Greengard, 1991; Nestler & Greengard, 1994; Kirkpatrick & Brady, 1999).

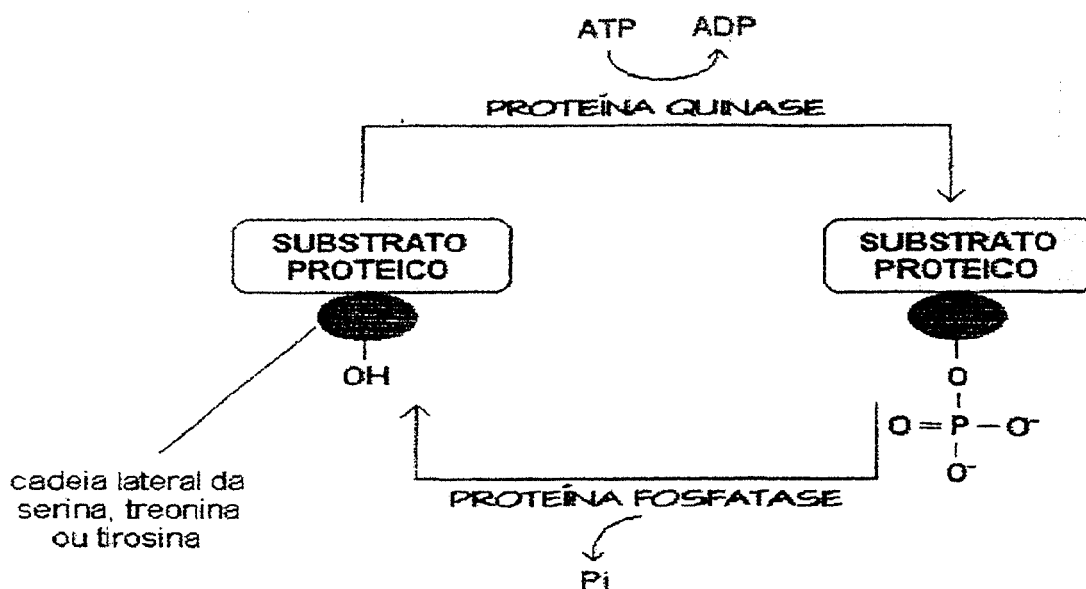


Figura 7. Sistema fosforilante e desfosforilante de uma proteína

2.1. Fosforilação de proteínas no SNC

A fosforilação protéica regula uma grande variedade de funções celulares no SNC. Este é bastante rico em sistemas fosforilantes responsáveis por modulações neuronais e gliais.

As fosfoproteínas importantes na função neuronal incluem enzimas envolvidas na biossíntese de neurotransmissores, na modulação de vários passos da transmissão sináptica, no ancoramento e no transporte de proteínas associadas às vesículas sinápticas e na modulação de receptores de neurotransmissores e na modulação de canais iônicos. A plasticidade das células no SNC e a remodelagem dinâmica da arquitetura citoesquelética também estão entre os mais importantes eventos regulados pela fosforilação protéica (Nixon & Shiag, 1991; Wallas & Greengard, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992; Nairn & Shenolikar, 1992; Pasqualotto & Shaw, 1996; Inagaki et al., 1994a).

2.2. Proteína Quinases

As proteína quinases são classificadas conforme os resíduos de aminoácidos que fosforilam. Podem ser divididas em dois grupos: serina/treonina quinases e tirosina quinases. A fosforilação das proteínas nos resíduos de serina ocorre em aproximadamente 95%, enquanto que apenas 3 a 4% da fosforilação ocorre nos resíduos de treonina e menos de 1% ocorre nos resíduos de tirosina (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994).

As serinas/treonina quinases são comumente ativadas via sistemas de segundos mensageiros, tais como, AMPc, GMPc, Ca^{2+} , DAG e IP_3 , entre outros. As tirosina quinases estão normalmente associadas a receptores e são ativadas diretamente pela ligação de primeiros mensageiros (Nestler & Greengard, 1994).

Proteína quinase dependente de AMPc (PKA):

Estas quinases são encontradas em todas as células eucarióticas e apresentam um amplo espectro de substratos, que inclui proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores, proteínas citoesqueléticas, proteínas formadoras de canais iônicos e inibidores endógenos de fosfatases (Greengard, 1987; Fuchs & Weber, 1994).

No estado inativo, a PKA é formada por um complexo protéico de duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. A ligação de quatro moléculas de AMPc as subunidades regulatórias altera a conformação destas e promove a liberação das subunidades catalíticas que se tornam capazes de fosforilar o substrato protéico (Nestler & Greengard, 1994). A atividade da PKA pode ser inibida pelo inibidor específico, H-89, que atua por competição com o ATP pela ligação com a enzima (Hidaka & Kobayashi, 1993).

Proteína quinase dependente de Cálcio/Calmodulina (PKCaM)

Existem várias classes de quinases dependentes de Ca^{+2} e calmodulina, todas elas ativadas pela ligação do complexo formado por uma molécula de calmodulina e quatro íons cálcio. Estas quinases estão presentes em vários tecidos, inclusive no cérebro, onde a PKCaM do tipo II é particularmente enriquecida e ativa. A concentração desta enzima em certas regiões do cérebro chega a 2% da proteína total existente (Bronstein et al., 1993).

Uma série de substratos para esta quinase têm sido descritos, refletindo a multifuncionalidade desta enzima: sinapsina I, proteínas associadas a microtúbulos (MAP-2 e tau), calcineurina, tirosina hidroxilase e proteínas constituintes de filamentos intermediários (GFAP, vimentina, desmina, neurofilamentos e tubulinas) (Tokui et al., 1990; Yano et al., 1994; De Freitas et al., 1995; De Freitas et al., 1997).

No SNC, esta enzima contém cerca de 10 a 12 subunidades autofosforiláveis. Cada subunidade possui um domínio catalítico, um domínio regulatório que liga a calmodulina e um domínio de associação (Wallas & Greengard, 1991; Bronstein et al., 1993; Schulman, 1995).

A atividade da PKCam II pode ser inibida pelo inibidor específico, KN-93, que atua por competição com a calmodulina pela ligação com a enzima (Hidaka & Kobayashi, 1993).

Proteína quinase dependente de Cálcio/Fosfolipídios (PKC)

A PKC é ativada pelo cálcio em associação com o diacilglicerol (DAG) e fosfatidilserina ou outros fosfolipídios de membranas. Múltiplas formas de PKC têm sido identificadas e, no mínimo, sete delas foram encontradas no cérebro. As várias formas de PKC apresentam diferentes distribuições celulares no cérebro e diferentes propriedades regulatórias.

No entanto, apresentam especificidade de substrato similares, sendo consideradas como isoformas (Nishizuka, 1989; Lint et al., 1995).

O mecanismo clássico de ativação da PKC consiste no fato de que, na presença de Ca^{+2} , a PKC transloca-se do citosol para a membrana onde liga-se à fosfatidilserina e ao DAG, provenientes da hidrólise do fosfatidilinositol de membrana. Tais fosfolipídios promovem o deslocamento do domínio inibitório da enzima, formando um complexo ativo associado à membrana plasmática (Nishizuka, 1989; Wallas & Greengard, 1991; Inagaki et al., 1994a).

Proteína quinase dependente de GMPc (PKG)

A PKG é um dímero de duas subunidades idênticas. Cada subunidade, com 75 kDa, contém um domínio regulatório que se liga ao GMPc, e um domínio catalítico (Nestler & Greengard, 1994; Lohmann et al., 1997). A PKG tem uma distribuição irregular nos tecidos, apresentando-se em altas concentrações no cerebelo, e em níveis muito baixos em outras regiões do cérebro. Na maioria dos tecidos, a PKG é predominante citosólica (Wallas & Greengard, 1991; Nairn, 1985).

Proteína quinases independentes de segundos mensageiros

O SNC apresenta uma série de serina/treonina quinases que aparentemente não são reguladas por segundos mensageiros e que possuem funções e mecanismos de ação ainda não bem conhecidos. Algumas representantes desta classe de quinases são: caseína quinase I e II; quinases associadas aos microtúbulos (MAP) I, II e III; rodopsina quinase, quinase de receptor β -adrenérgico, quinases ribossomais, cdc quinases e quinases associada a neurofilamentos (Nestler & Greengard, 1994).

Tirosina quinases

Estas quinases representam uma classe de enzimas que estão envolvidas em funções como o crescimento e a diferenciação celular em todos os tecidos. Embora estas quinases sejam responsáveis por uma pequena parcela no total da fosforilação de proteínas no cérebro, elas têm um importante papel na regulação da atividade do SNC, pois além de participarem do crescimento e proliferação, estão envolvidas na transdução de sinal (Greengard, 1987; Nestler & Greengard, 1994).

2.3. Proteína Fosfatases

Embora o processo de fosforilação protéica no SNC pareça ser regulado pela ativação de quinases, as fosfatases também constituem importantes alvos para agentes regulatórios. As fosfatases promovem a reversibilidade da ação quinásica. Seu papel na regulação do estado fosforilado/desfosforilado de proteínas tem sido cada vez mais evidente (Cohen, 1992; Hunter, 1995).

As fosfatases são classificadas como serina/treonina fosfatases ou tirosina fosfatases, baseando-se nos resíduos de aminoácidos que elas desfosforilam (Nestler & Greengard, 1994).

Serina/treonina Fosfatases

As serina/treonina fosfatases compreendem quatro classes principais de enzimas, as quais podem ser identificadas com base em sua especificidade de substrato, dependência de íons e sensibilidade a inibidores específicos. A fosfatase do tipo 1 (PP1) desfosforila a subunidade β da fosforilase quinase e é inibida por duas proteínas termoestáveis, o inibidor 1 (I1) e o inibidor 2 (I2). As fosfatases do tipo 2 (PP2A, PP2B e PP2C) desfosforilam seletivamente a subunidade α da

fosforilase quinase e são insensíveis aos inibidores termoestáveis (Ingebritsen & Cohen, 1983).

Tirosina Fosfatases

As fosfatases específicas para resíduos de fosfotirosina têm sido encontradas em diversos tecidos, apresentando diferentes isoformas, mas os mecanismos através dos quais sinais extracelulares e intracelulares regulam as atividades destas fosfatases não estão estabelecidos (Wallas & Greengard, 1991).

2.4. Fosforilação de Proteínas do Citoesqueleto

A fosforilação das subunidades dos filamentos intermediários e das tubulinas α e β está envolvida com a regulação de sua capacidade de polimerização.

As regiões amino e carbóxi-terminais das três subunidades dos neurofilamentos possuem sítios distintos de fosforilação, de tal forma que os padrões de fosforilação para cada subunidade são dinâmicos e envolvem várias quinases. Os sítios no domínio amino-terminal são fosforilados por quinases dependentes de segundo mensageiro e o domínio carbóxi-terminal possui sítios para quinases independentes de segundo mensageiro. A fosforilação na região amino-terminal está associada com a capacidade de polimerização do neurofilamento, enquanto a fosforilação na região carbóxi-terminal modula a capacidade de interação com outras proteínas (Nixon & Sihag, 1991). As fosfatases do tipo PP2A e PP1 parecem ser as principais envolvidas na desfosforilação destas proteínas (Veerana et al., 1995; Giasson et al., 1996).

A fosforilação das tubulinas ocorre na região carbóxi-terminal, inibindo a sua capacidade de polimerização. No entanto, a fosforilação das

tubulinas previamente incorporadas aos microtúbulos mantém a estabilidade dos mesmos. Esta regulação pela fosforilação poderia estar relacionada com as mudanças significativas que ocorrem no equilíbrio entre monômeros e polímeros de tubulina durante a diferenciação neuronal. A fosforilação de diferentes componentes dos microtúbulos por quinases dependentes de segundos mensageiros parece estar envolvida na morfogênese e plasticidade neuronais (Hargreaves et al., 1986; Wandosell et al., 1987; Díaz-Nido et al., 1990). As tubulinas parecem ser substratos para a PKA, PKCaM II e para a PP1 (Wallas & Greengard, 1991; De Freitas et al., 1995).

Estudos *in vitro* com GFAP de porco mostraram a presença de seis sítios fosforiláveis, cinco deles na porção amino-terminal e um na porção carbóxi-terminal. Estes sítios mostraram-se fosforiláveis pelas quinases PKA, PKCaM e PKC. Os sítios fosforiláveis em GFAP de rato ainda não foram identificados, mas a grande homologia entre os domínios amino-terminal de ambas espécies é suficiente para assumir que possivelmente estes sítios também estejam presentes na GFAP de rato e que neles atuem as mesmas quinases indicadas para GFAP de porco (Rodnight et al., 1997). A desfosforilação da GFAP em hipocampo de animais jovens mostrou ser catalisada pela fosfatase PP1 (Vinadé & Rodnight, 1996).

Estudos *in vitro* demonstram que a vimentina pode ser fosforilada pela PKA, PKC e PKCaM e desfosforilada de uma maneira dependente de Ca^{+2} (Evans, 1989; Lee et al., 1993).

Embora a fosforilação da actina não seja descrita na literatura, várias proteínas associadas, entre elas a MARCKS, B-50, a sinapsina I e a miosina de cadeia leve, quando fosforiladas ou desfosforiladas alteram a polimerização da actina (Fernandez et al., 1990; Wallas & Greengard, 1991; Ceccaldi et al., 1995).

3. Doença do Xarope do Bordo (DXB)

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é um distúrbio metabólico hereditário de transmissão autossômica recessiva, causado pela deficiência da atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, que atua no metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, valina e isoleucina. A deficiência deste complexo é responsável pelo acúmulo tecidual destes aminoácidos, bem como dos seus α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) correspondentes, ácido α -cetoisocapróico (CIC), α -cetoisovalérico (CIV) e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) (Schadewaldt, 1997; Chuang, 1998; Parrella et al., 1994).

Os AACR são transportados para o interior da célula através do sistema L de transporte Na^+ -independente na membrana plasmática, onde sofrem reações de transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação (Fig 8) (Oxender, 1963; Prentki, 1965).

A transaminação dos AACR, catalisada pelas aminotransferases dos AACR, produz os seus respectivos α -cetoácidos e pode ocorrer no citosol ou na mitocôndria. Quando ocorre no citosol, os α -cetoácidos são transportados para o interior da mitocôndria pelo transportador dos α -cetoácidos. A descarboxilação oxidativa dos CACR, catalisada pelo complexo α -cetoácido desidrogenase mitocondrial, gera isovaleril CoA, α -metibutiril CoA e isobutiril CoA dos α -cetoácidos CIC, CMV e CIV, respectivamente. Estas acil CoA de cadeia ramificada sofrem desidrogenação pelas desidrogenases acil CoA específicas. Após estas reações, a degradação de cada α -cetoácido diverge: a leucina produz acetil CoA e acetoacetato, a valina produz succinil CoA e a isoleucina produz acetil CoA e succinil CoA (Ichihara, 1984; Hutson, 1985; Ikeda, 1988).

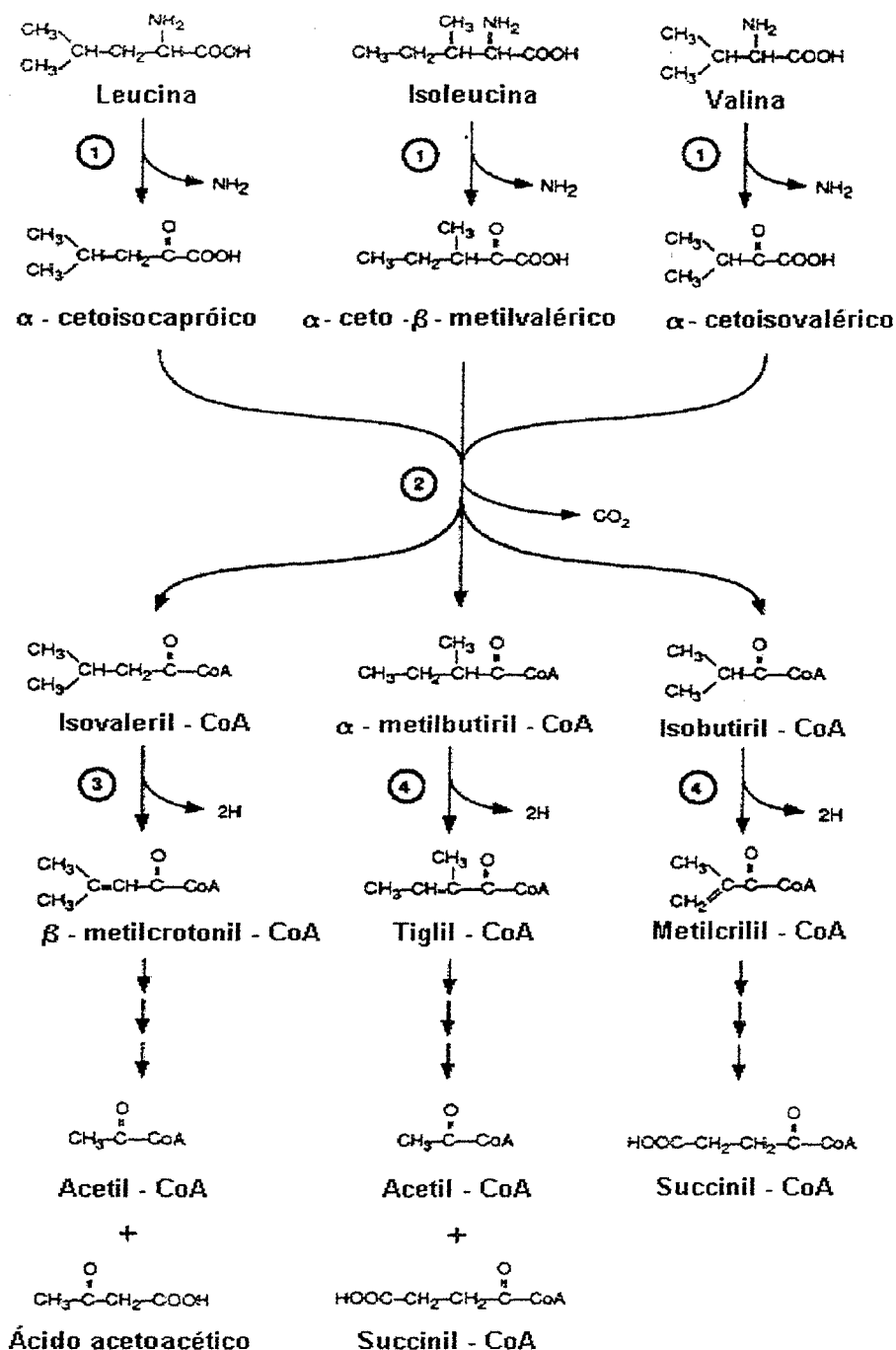


Figura 8. Representação esquemática da via catabólica dos AACR

As enzimas que catalisam as reações estão indicadas por números. (1) transaminação por aminotransferases, (2) descarboxilação oxidativa por um complexo α -desidrogenase, (3) desidrogenação pela isovaleril-CoA desidrogenase, (4) desidrogenação pela metilacil-CoA desidrogenase (**Adaptado de Scriver et al., 1995**).

Uma característica marcante dos pacientes com DXB é o odor de açúcar queimado na urina atribuído aos CACR encontrados em alta quantidade. Em geral, os pacientes apresentam manifestações severas, predominando a letargia, apnéia, hipotonia ou hipertonia, convulsões, coma, retardo mental, acidose metabólica, encefalopatia e atraso no desenvolvimento psicomotor (Zielke et al., 1996; Wendel et al., 1982; Huang et al., 1996; Nord et al., 1991; Chuang and Shih, 1995).

A literatura aponta a leucina e o CIC como os principais agentes neurotóxicos, visto que durante as crises de descompensação metabólica ocorre piora do quadro neurológico dos pacientes, acompanhado por aumento das concentrações destas substâncias que chegam a atingir 2 a 5 mM (Wendel et al., 1982; Korien et al., 1994). A concentração dos CACR descritos na DXB não tratada variam de 0,6 a 4,6 mM para o CIC, 0,2 a 1,5 mM para o CMV e 0,02 a 0,35 mM para o CIV (Tanaka et al., 1983).

Os pacientes com DXB podem ser classificados em 5 fenótipos, dependendo da apresentação clínica, da tolerância à leucina e da atividade residual da enzima medida *in vitro* em fibroblastos da pele ou células brancas (Schadewaldt et al., 1998).

1) Forma Clássica

É a mais comum e severa das formas de DXB. Os níveis de AACR, particularmente da leucina, estão aumentados no sangue, líquido cefaloraquidiano e urina. Na DXB clássica, 50% ou mais dos α -cetoácidos são derivados da leucina. A maioria dos pacientes morre nos primeiros meses de vida pelas crises metabólicas recorrentes e deterioração neurológica (Chuang and Shih, 1995).

2) Forma Intermediária

Os pacientes com a forma intermediária apresentam aumentos persistentes dos AACR, porém em níveis mais baixos que os da forma clássica. Geralmente não possuem sintomatologia aguda no período neonatal. A atividade residual da enzima é geralmente maior que aquela da forma clássica, encontrando-se em torno de 3 a 30% do normal (Chuang and Shih, 1995).

3) Forma Intermitente

Os pacientes com este fenótipo apresentam desenvolvimento normal, com crescimento e desenvolvimento cognitivo normais. Entretanto, eles têm um risco de descompensação metabólica aguda durante situações de estresse acentuado, tais como, infecções e cirurgia, quando os níveis dos AACR e CACR aumentam. A atividade da enzima se encontra em torno de 5 a 20% do normal. Os sintomas iniciais aparecem geralmente entre os 5 meses e os 2 anos de idade, usualmente associados à otite média ou a outras infecções. Quando assintomáticos, os dados laboratoriais, incluindo os níveis de AACR são normais (Chuang and Shih, 1995).

4) Forma Tiamina-responsíveis

Em geral, estes paciente não apresentam doença neonatal aguda. O distúrbio é detectado devido a um atraso no desenvolvimento psicomotor. A atividade da enzima está em torno de 30 a 40% do normal. A concentração dos AACR é cerca de 5 vezes maior que o normal, e estes níveis são abruptamente reduzidos para os normais com doses 10 a 1000 mg/dia de tiamina e com dieta restrita em proteínas (Chuang e Shih, 1995).

5) Forma di-hidrolipoil desidrogenase (E3)- deficiente

A deficiência de E3 é um distúrbio raro. Os fenótipos clínicos são similares a DXB clássica, mas acompanhada de acidose láctica severa. Os níveis de AACR estão levemente ou moderadamente aumentados no plasma, comparados com os pacientes com a forma clássica. Estes pacientes possuem uma deficiência combinada das desidrogenases do piruvato, α -cetoglutarato e AACR. Na presença de acidose láctica persistente, ocorre deterioração neurológica progressiva (Chuang and Shih, 1995).

O diagnóstico da DXB é feito pela identificação de altas concentrações séricas e urinárias de isoleucina, valina e leucina, através de cromatografia de aminoácidos. A cromatografia gasosa de ácidos graxos mostra os níveis sanguíneos elevados dos CACR e de seus hidróxi-derivados. A confirmação do diagnóstico é feita pela diminuição da atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada em fibroblastos (Naylor et al., 1980).

Para evitar danos neurológicos irreversíveis, o tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível e no período neonatal. Os pacientes recebem uma dieta pobre nos AACR, mas que supra as necessidades mínimas para manter o crescimento e desenvolvimentos normais. A terapia com tiamina (50 a 300mg/dia) deve ser usada por três semanas para se detectar pacientes com DXB tiamina-responsíveis (Elsas et al., 1981). Transplante de fígado também pode ser utilizado para os casos mais graves (Chuang and Shih, 1995).

Para o tratamento na fase aguda, freqüentemente causado por infecções ou outras formas de estresse e que pode levar a uma deterioração

cerebral aguda, três medidas são essenciais para o controle das crises metabólicas:

1) Remoção rápida dos metabólitos tóxicos;

2) Manter a nutrição adequada;

3) Minimizar o estado catabólico e/ou promover o anabolismo. No caso de altos níveis de leucina, a administração de glicose com ou sem administração de insulina pode ser empregado (Gaull et al., 1969; Thompson et al., 1990).

Alterações estruturais são detectadas freqüentemente no SNC de pacientes afetados por DXB, caracterizando atrofia cerebral por comprometimento da mielinização (Appel, 1966; Danner and Elsas, 1989).

Embora as principais manifestações da DXB sejam neurológicas, os mecanismos neurotóxicos dos AACR e dos CACR permanecem praticamente obscuros. Acredita-se que a severidade destas manifestações depende do grau e duração da exposição cerebral aos metabólitos, bem como do período do desenvolvimento do SNC em que isto ocorre (Chuang and Shih, 1995). Alguns estudos citam a deficiência de produção de energia, bem como a redução de neurotransmissores devido à elevadas concentrações de metabólitos acumulados na doença (Land et al., 1976; Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996; McKenna et al., 1998; Yuwiler et al., 1965; Tashian, 1961).

O CIC inibe a atividade da piruvato desidrogenase e da α -cetoglutarato desidrogenase em mitocôndrias de ratos e de seres humanos em concentrações semelhantes àsquelas observadas no sangue dos pacientes com DXB durante descompensação metabólica (Land et al., 1976).

Foi também demonstrado que a infusão de leucina e do CIC em cérebro de ratos resulta em uma diminuição dos neurotransmissores serotonina e dopamina (Huang et al., 1996; Zielke, 1996). Outros experimentos mostraram que uma dieta contendo 8% de leucina resulta em uma diminuição da serotonina cerebral em ratos (Yuwiler et al., 1965).

Por outro lado, o CIC, a leucina, o CIV, o ácido α -hidróxi-isovalérico e o ácido α -hidróxi-isocapróico inibem competitivamente a glutamato descarboxilase em homogenados de cérebros de ratos, reduzindo a formação de GABA (Tashian, 1961). Além disso, o CIC também altera o metabolismo do glutamato em astrócitos, provocando uma diminuição na conversão de esqueletos de carbono do glutamato para o aspartato e aumentando a sua conversão para o lactato (McKenna et al., 1998).

OBJETIVOS

Considerando a importância da fosforilação como mecanismo regulatório no SNC e levando em conta duas importantes evidências:

- ◆ que o estado de fosforilação das diferentes proteínas do citoesqueleto parece estar diretamente envolvido com a morfogênese e plasticidade do SNC;
- ◆ que os níveis elevados dos aminoácidos de cadeia ramificada e seus correspondentes α -cetoácidos estão relacionados com as alterações neurológicas observadas na DXB, os principais objetivos deste trabalho foram:

1) Verificar o efeito do CIC, do CIV e do CMV sobre a fosforilação de subunidades dos filamentos intermediários (NF-M, NF-L, GFAP e Vim) de córtex cerebral de ratos de 17 dias de idade.

3) Verificar o efeito dos α -cetoácidos sobre as quinases dependentes de segundo mensageiro (PKA e PKCaM II) do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto de córtex cerebral de ratos de 17 dias.

ANEXO I

Artigo:

**Alpha-ketoisocaproate acid increases the in vitro ³²P
incorporation into intermediate filaments from cerebral cortex of
young rats**

(Submetido à revista *Brain Research*)

TITLE: Alpha-ketoisocaproic acid increases the in vitro ³²P incorporation into intermediate filaments from cerebral cortex of young rats

AUTHORS: Tatiana Branco, Renata Meirelles, Betânia Bevilaqua da Rocha, Ângela de Mattos-Dutra, Moacir Wajner and Regina Pessoa-Pureur

AUTHOR'S ADDRESS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo
90035-003 Porto Alegre RS BRASIL
Fax: 5551 3165535 Tel: 5551 3165565

KEY WORDS: maple syrup urine disease, alpha -ketoacids, cytoskeleton, phosphorylation

RUNNING HEAD: Alpha-ketoisocaproate and cytoskeleton phosphorylation

CORRESPONDENCE ADDRESS: Dr Regina Pessoa Pureur
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo
90035-003 Porto Alegre RS BRASIL
Fax: 5551 3165535 Tel: 5551 3165565

ABSTRACT

In this study we investigated the effects of α -ketoisocaproic (KIC), α -ketoisovaleric (KIV) and α -ketomethylvaleric (KMV) acids on the phosphorylation of intermediate filament proteins of cerebral cortex of rats. Tissue slices were incubated with ^{32}P -orthophosphate in the presence or absence of the acids. The intermediate filament (IF) enriched cytoskeletal fraction was isolated and the radioactivity incorporated into neurofilament subunits (NF-M and NF-L), vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was measured. The results demonstrated that KIC significantly increased phosphorylation of the proteins studied. However, this effect was not observed for KIV or KMV. Experiments using protein kinase KN93 and H89 indicated that the effect of KIC was mediated by Ca^{2+} /calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases. This study provides consistent evidence that KIC, a key metabolite accumulating in maple syrup urine disease increases phosphorylation of IF proteins. Therefore, it is possible that an altered brain cytoskeletal metabolism could be related to the structural alterations of the CNS observed in this disorder.

INTRODUCTION

Maple syrup urine disease (MSUD), or branched-chain ketoaciduria, is an inborn error of metabolism caused by severe deficiency of the branched-chain L- α -ketoacid dehydrogenase complex activity (2). The inability of this enzyme complex to oxidize α -ketoisocaproic acid (KIC), α -keto- β -methylvaleric acid (KMV) and α -ketoisovaleric acid (KIV) leads to the accumulation of these metabolites and their precursor amino acids leucine, isoleucine and valine in the affected individuals, which is the biochemical hallmark of the disorder. Patients with MSUD present poor feeding, apnoea, ketoacidosis, convulsions, coma and psychomotor delay. The neurological dysfunction is the most predominant finding of the disturbance. CNS imaging reveals low density of white matter in the cerebral hemispheres and other brain structures corresponding to dysmyelination and atrophy. The disease is severe enough to cause a fatal outcome in a significant number of patients if not diagnosed and treated promptly. Those who survive present a variable degree of mental retardation (2).

The mechanisms underlying the neurotoxicity of this disorder are still obscure, but seem to be associated with increased concentrations of branched chain ketoacids, especially α -ketoisocaproate, which, similarly to leucine, reach plasma levels of the order of 5 mM during crisis (2). However some studies have demonstrated inhibition of mitochondrial energy generation (11, 17), demyelination (33, 34) and diminished GABA synthesis (39) caused by some of the metabolites accumulating in the disorder.

The cytoskeleton of eukariotic cells is a protein network formed mainly of intermediate filaments (IF), microtubules (MT) and microfilaments (MF).

Proteins of the cytoskeleton play a central role in the creation and maintenance of cell shapes in all tissues. They provide structural organization for the cytoplasm, serve as tracks for cellular transport and comprise the core framework of cellular morphologies (14), maintaining differentiated cellular functions.

Intermediate filaments play a structural or tension-bearing role in the cell. A variety of tissue-specific forms are known, which are often used as markers of cellular differentiation (1). Neurofilaments (NF) are the intermediate filaments of neurons. They are composed of three different polypeptides whose approximate molecular masses are 200, 160 and 68 kDa, commonly referred to as heavy (NF-H), medium (NF-M) and low (NF-L) neurofilament subunits (28). In mature myelinated axons, neurofilaments are assembled into parallel arrays of long polymers and constitute the most abundant cytoskeletal elements, (40). On the other hand, glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a 50 kDa subunit that constitutes the intermediate filament of mature astrocytes (6). Vimentin, a 54 kDa subunit, is the most widely distributed cytoplasmic intermediate filament protein, being present in many cells of mesodermal origin, including fibroblasts, endothelial cells, and white blood cells, as well as in a number of cell types in culture (1). Vimentin was also found in immature astrocytes, in certain mature astrocytes, such as the Bergmann glia of the cerebellum, and in an astrocyte subpopulation of the corpus callosum (6).

Intermediate filament proteins can be phosphorylated/dephosphorylated, both in vivo and in vitro, in their terminal regions, by different protein kinases and phosphatases, such as Ca^{2+} /calmodulin protein kinase (PKCaM), cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) (27, 4) and protein phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) (37, 29). Although the effect of phosphorylation of intermediate filament proteins is not yet well defined, it has been demonstrated that phosphorylation of cytoskeletal components may affect their assembly and organization (14). It has been reported that the phosphorylation level of neurofilaments is a major determinant in the regulation of the axonal caliber (21) and that phosphorylation/dephosphorylation regulates polymerization of GFAP (22) and vimentin (12). Phosphorylation of cytoskeletal proteins has also been linked to various neuropathological conditions (14) and to the action of several neurotoxicants such as aliphatic hexacarbonyls (18), β , β' -iminodipropionitrile (IDPN) (9), carbon disulfide (13) and acrylamide (8), which produce a central-

peripheral neuropathy resulting in the accumulation of neurofilaments proximal to the nodes of Ranvier (19).

In this work we studied the effect of α -keto- β -isocaproic, α -ketomethylvaleric and α -ketoisovaleric acids on the in vitro phosphorylation of the intermediate filament subunits NF-M, NF-L, GFAP and vimentin from cerebral cortex of rats in the hope to better elucidate the neuropathology of MSUD. The effect of these metabolites on the protein kinase activities associated with the intermediate filament proteins was also investigated.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats (16-17 days of age) were obtained from our breeding stock. Rats were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a constant temperature (22° C) colony room. On the day of birth the litter size was culled to eight pups. Litters smaller than eight pups were not included in the experiments. Water and a 20% (w/w) protein commercial chow were provided ad libitum.

Preparation and labelling of slices

Rats were killed by decapitation and the cerebral cortex was dissected onto Petri dishes placed on ice. Two 400 µm thick slices cut with a McIlwain chopper were initially pre-incubated at 30°C for 10 min in 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose, 1 mM CaCl₂ and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 µM leupeptin, 0.7 µM pepstatin, 0.7 µM chymostatin and 1 µM calpastatin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Incubation was carried out with 100 µl of the basic medium containing 80 µCi of [³²P] ortho-phosphate (8TBq/g) (CNEN, São Paulo, Brazil) with or without addition of the different drugs. Alpha-ketoisovalerate and α-ketomethylvalerate were used at the concentrations of 1, 2.5 and 5 mM, whereas α-ketoisocaproate was used at 0.5, 0.75, 1, 2.5 and 5 mM. The labelling reaction was normally allowed to proceed for 30 min at 30°C and stopped with 1 ml of cold buffer containing 150 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl (pH 6.5), and the protease inhibitors described above. Slices were then washed twice by decanting with the stop buffer to remove excess radioactivity.

Intermediate filament enriched cytoskeletal fraction from cerebral cortex slices

The cytoskeletal fraction was obtained as described by de Mattos et al. (3) with modifications. Briefly, after the labelling reaction, slices were homogenized in

400µl of ice-cold buffer containing 5 mM KH₂PO₄, 600 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 µM leupeptin, 0.7 µM pepstatin, 0.7 µM chymostatin and 1µM calpastatin (Sigma, St. Louis, MO, USA). The homogenate was centrifuged at 15,800 x g for 10 min at 4°C, in a Eppendorf centrifuge. The insoluble material was resuspended in 400 µl of the same buffer and centrifuged under the same conditions. The pellet was then washed in 400 µl of ice-cold low-salt buffer in the presence of the protease inhibitors described above, in order to remove excess of salts, and centrifuged under the same conditions. This pellet constituted the intermediate filament enriched fraction. The pellet was then dissolved in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and protein concentration was determined by the method of Lowry et al (20).

Assay of protein kinase activity

The standard assay system was essentially as described above. The assay for cyclic AMP- (PKA) or Ca²⁺/calmodulin-dependent (PKCaMII) protein kinase activities used the specific inhibitors, KN-93 and H-89 (Calbiochem-Novabiochem Corp, La Jolla, CA) respectively. Slices were pre-incubated with 50 µM KN-93 or 100 µM H89, as described above, for 20 min at 30°C. Incubation was carried out with 100 µl ³²P ortho-phosphate, in the presence of inhibitors and/or 1 mM α-ketoisocaproate for 30 min at 30°C. The reaction was stopped and the intermediate filament enriched cytoskeletal fraction was obtained as described above.

Immunoblotting analysis

Cytoskeletal fractions (60 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose according to the method of Towbin et al (32). The blot was then washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS) (0.5 M NaCl, pH 7.5, 20 mM Tris-HCl 5%) followed by a 2 h incubation in blocking solution (TBS plus defatted dry milk). After incubation the blot was washed twice for 5 min with blocking solution

plus 0.05% Tween-20 (T-TBS), and then incubated for 2 h in blocking solution containing one of the following monoclonal antibodies: anti NF-150 (clone NN-18) diluted 1:100, anti NF-68 (clone NR-4) diluted 1:300, anti vimentin (clone vim 13.2) diluted 1:400, anti GFAP (clone G-A-5) diluted 1:500 (Sigma, Chemical Company). The blot was then washed twice for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h in antibody solution containing peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted 1:4000. The blot was again washed twice for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS. NF-M, NF-L, vimentin and GFAP were developed using an ECL kit (Amersham).

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The cytoskeletal fraction was prepared as described above. Equal protein concentrations were loaded onto 10% polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE according to the discontinuous system of Laemmli (16). After drying, the gels were exposed to X-ray films (X-Omat XK1) at -70°C with intensifying screens and finally the autoradiograms were obtained. Cytoskeletal proteins were identified by alignment with the autoradiograph and excised from the gel. The amount of phosphorylated proteins in each gel piece was quantified by liquid scintillation.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the SPSS software and an IBM-PC compatible computer.

Results

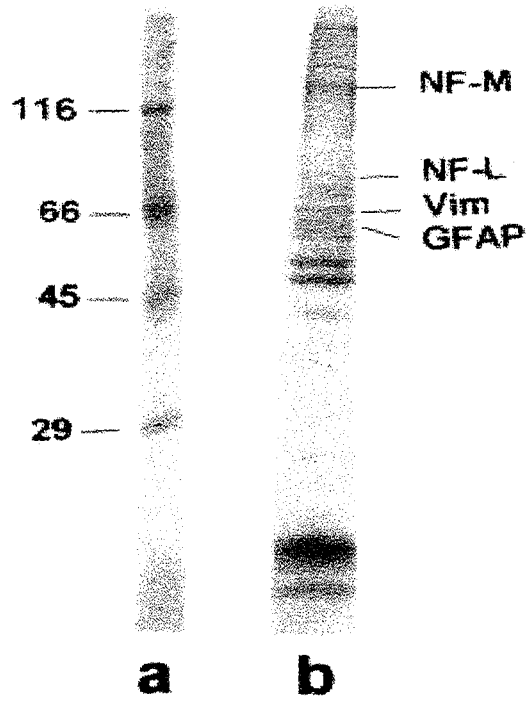
Figure 1A shows the electrophoretic pattern of the pellet containing the bulk of the intermediate filament proteins of the cerebral cortex, where bands of 200, 150, 68, 54, 50 and 43 kDa can be seen. We have previously characterized these proteins by two-dimensional gel electrophoresis as the subunits NF-M (150 kDa) and NF-L (68 kDa) from neurofilaments, vimentin and GFAP (24). The major contaminant of our preparations is a 43 kDa protein comigrating with actin (24). The bands of 150 kDa, 68 kDa, 54 kDa and 50 kDa are good substrates for the endogenous phosphorylation system. Figure 1B shows the autoradiograph of an over exposed nitrocellulose membrane containing the in vitro phosphorylated Triton insoluble fraction (a) and the corresponding immunoblotting (b, c, d and e), where the bands of 150 and 68 kDa are immunoreactive with NF-M and NF-L antibodies respectively, while the 54 kDa band was identified as vimentin and the 50 kDa band as GFAP.

In order to verify the effect of the α -ketoacids on the in vitro ^{32}P incorporation into the cytoskeletal proteins we incubated tissue slices with different concentrations of α -keto- β -methylvaleric, α -ketoisovaleric or α -ketoisocaproic acids. The results show that the first two acids at concentrations up to 5.0 mM were not effective in altering phosphorylation of neurofilament subunits, vimentin or GFAP (Figure 2). Conversely, α -ketoisocaproic acid significantly increased the in vitro phosphorylation of the same proteins in a dose-dependent manner, with a maximal stimulatory effect at 1.0 mM (Figure 3). The effect of α -ketoisocaproic acid on PKA and PKCaMII was also assayed by adding the specific protein kinase inhibitors H-89 and KN-93, respectively, to the preincubation system followed by incubation in the presence or absence of the ketoacid. We first verified that inhibition of PKA activity by H-89 (Figure 4A) and of CaMKII activity by KN93 (Figure 4B) prevented the activating effect of 1.0 mM α -ketoisocaproic acid on the in vitro ^{32}P incorporation into the cytoskeletal proteins. These results suggest that the stimulatory action of KIC on the in vitro phosphorylation of the proteins studied might be mediated by PKA and PKCaMII.

FIGURA 1

Figure 1A. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the IF-enriched cytoskeletal fraction from cerebral cortex of rats. a) Molecular weight standards (kDa). From top to bottom: β -galactosidase (116), bovine albumin (66), egg albumin (45), carbonic anhydrase (29) b) Coomassie blue stained SDS-PAGE. B. Immunoblotting of the IF-enriched fraction with anti IF monoclonal antibodies. a) Over exposed nitrocellulose membrane containing the ^{32}P phosphorylated cytoskeletal fraction transferred from the gel shown in A. b) Immunoblotting with anti-NF-150 (clone NN-18) diluted 1:100. c) Anti NF-68 (clone NR-4) diluted 1:300. d) anti vimentin (clone vim 13.2 diluted 1:400). e) anti GFAP (clone G-A-5) diluted 1:500. The blots were developed using an ECL kit.

A



B

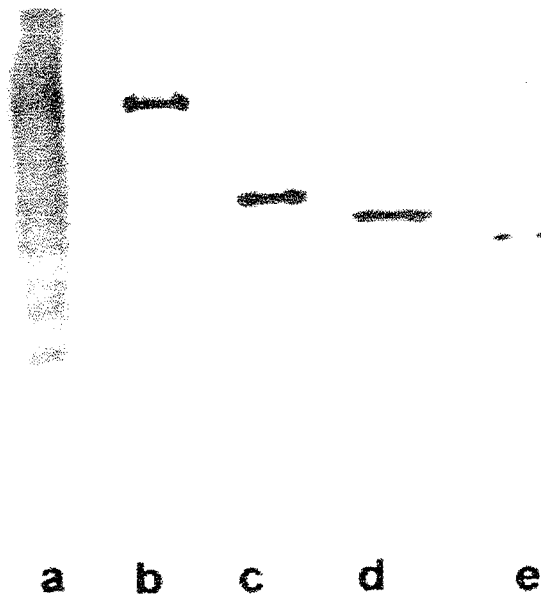
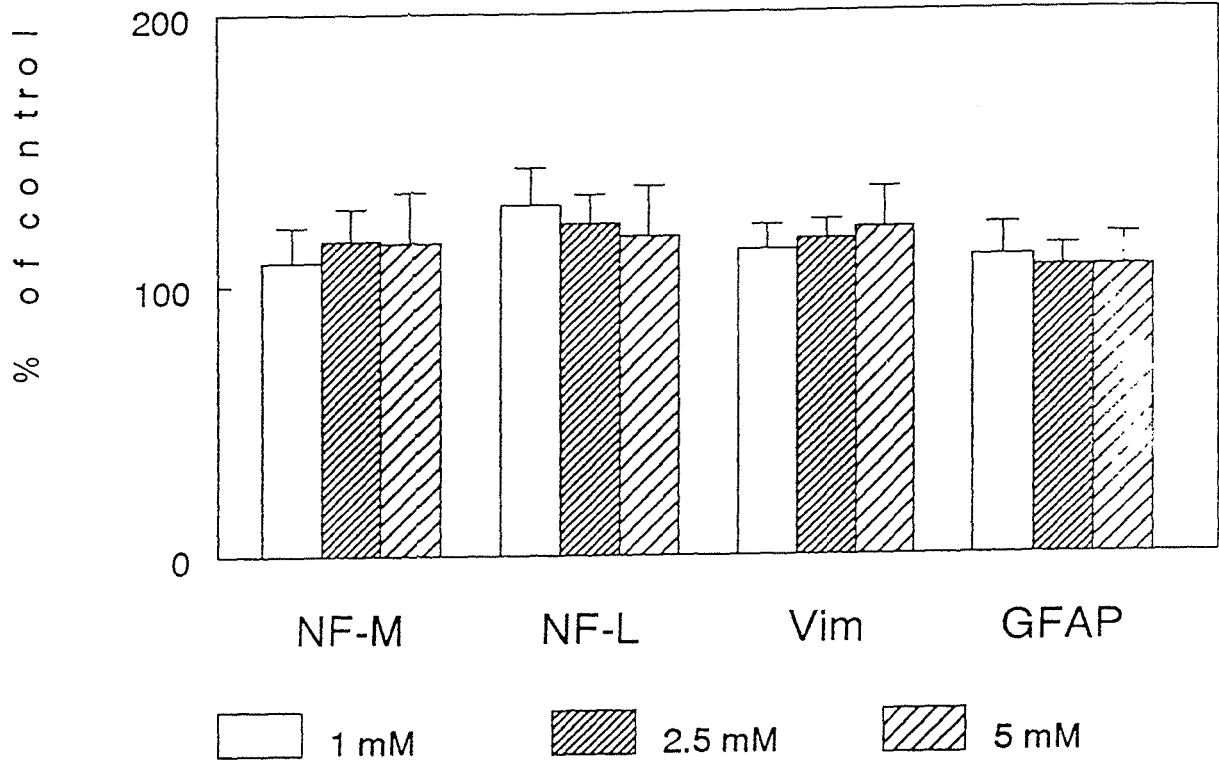


FIGURA 2

Figure 2. Effect of treatment of tissue slices with α -ketoacids on in vitro ^{32}P incorporation into the IF proteins. 150 kDa neurofilament subunit, NF-M; 68 kDa neurofilament subunit, NF-L; Vimentin, Vim; glial fibrillary acidic protein, GFAP. Tissue slices were incubated with ^{32}P -orthophosphate for 30 min at 30° C in the presence of 1.0, 2.5 and 5.0 mM α -ketomethylvaleric acid (A) or α -ketoisovaleric acid (B). The IF-enriched cytoskeletal fraction was extracted and in vitro ^{32}P incorporation measured as described in Material and Methods. Data are means \pm SEM of 3-4 experiments.

A



B

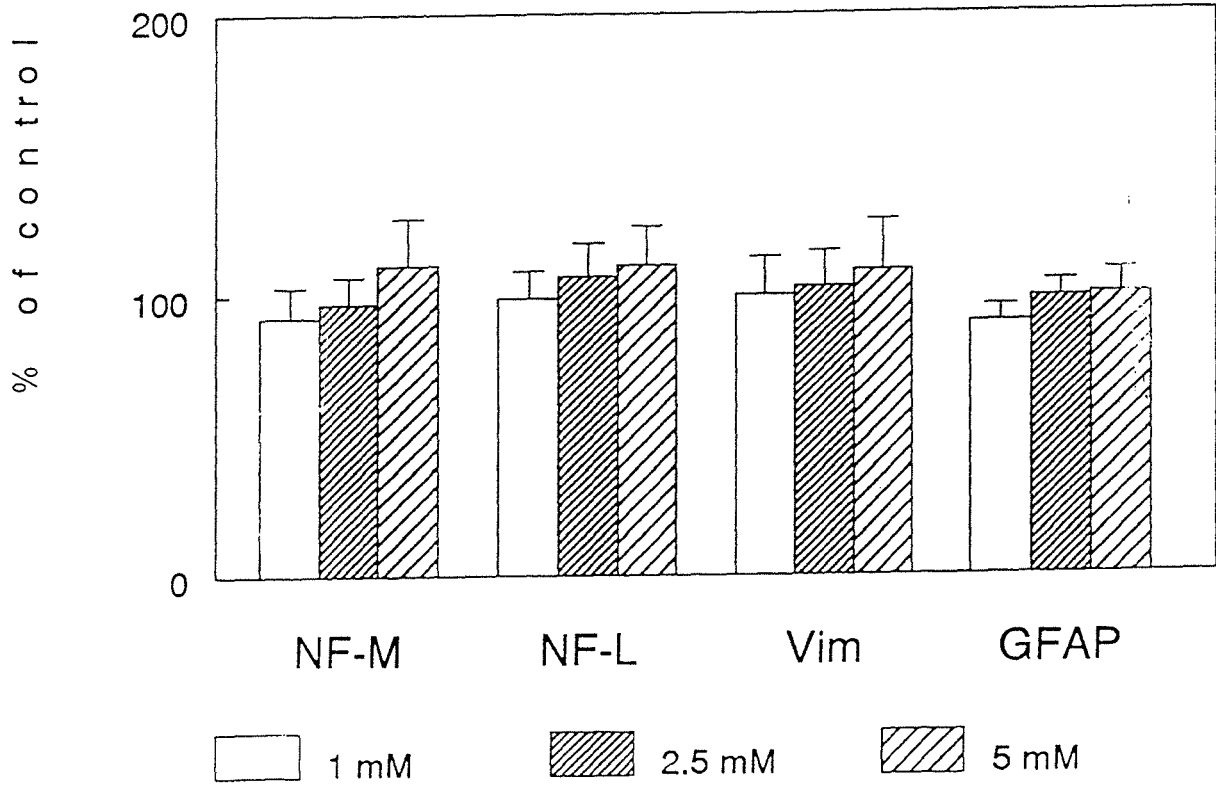
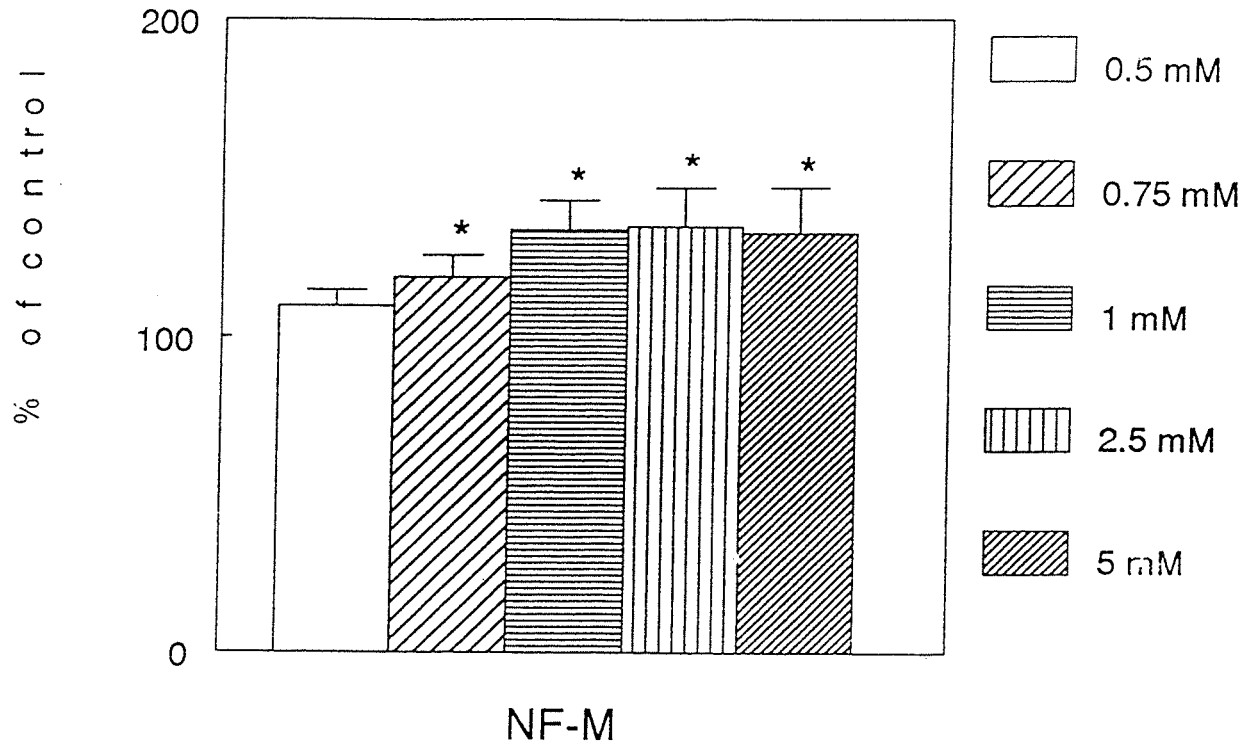


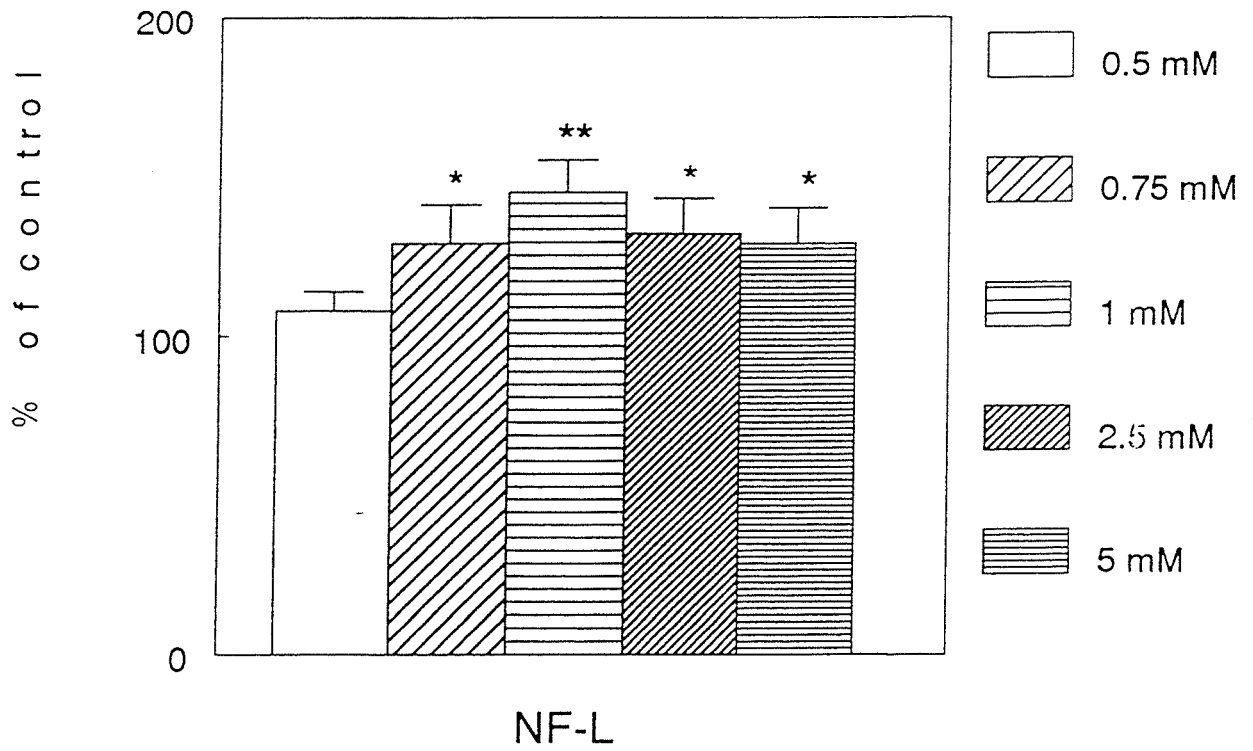
FIGURA 3

Figure 3. Effect of treatment of tissue slices with different concentrations of α -ketoisocaproic acid on in vitro ^{32}P incorporation into the IF proteins. Effect of the α -ketoacid on the in vitro phosphorylation of 150 kDa neurofilament subunit (NF-M) (A); 68 kDa neurofilament subunit (NF-L) (B); Vimentin (Vim), (C); glial fibrillary acidic protein (GFAP), (D). Tissue slices were incubated with ^{32}P -orthophosphate for 30 min at 30° C in the presence of 0.5, 0.75, 1.0, 2.5 and 5.0 mM α -ketoisocaproic acid. The IF-enriched cytoskeletal fraction was extracted and in vitro ^{32}P incorporation measured as described in Material and Methods. Data are means \pm SEM of 3-4 experiments. Statistically significant differences from controls, as determined by one way ANOVA, are indicated: **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

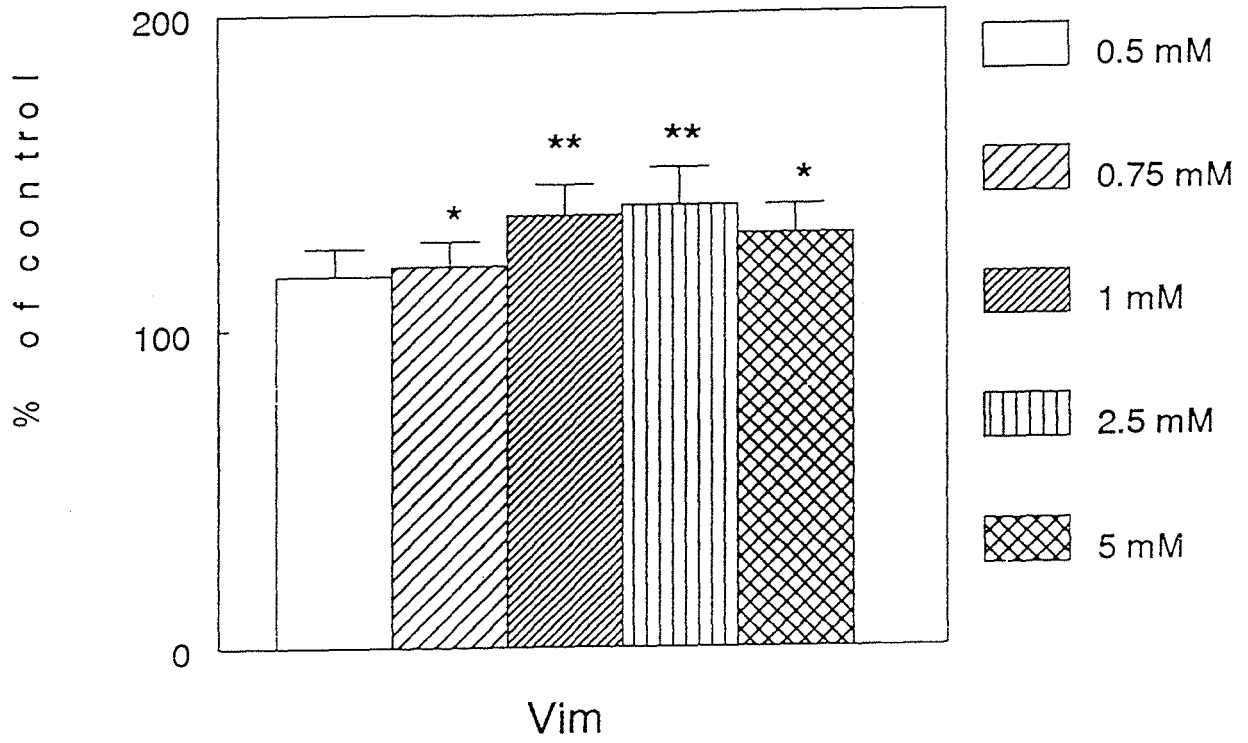
A



B



C



D

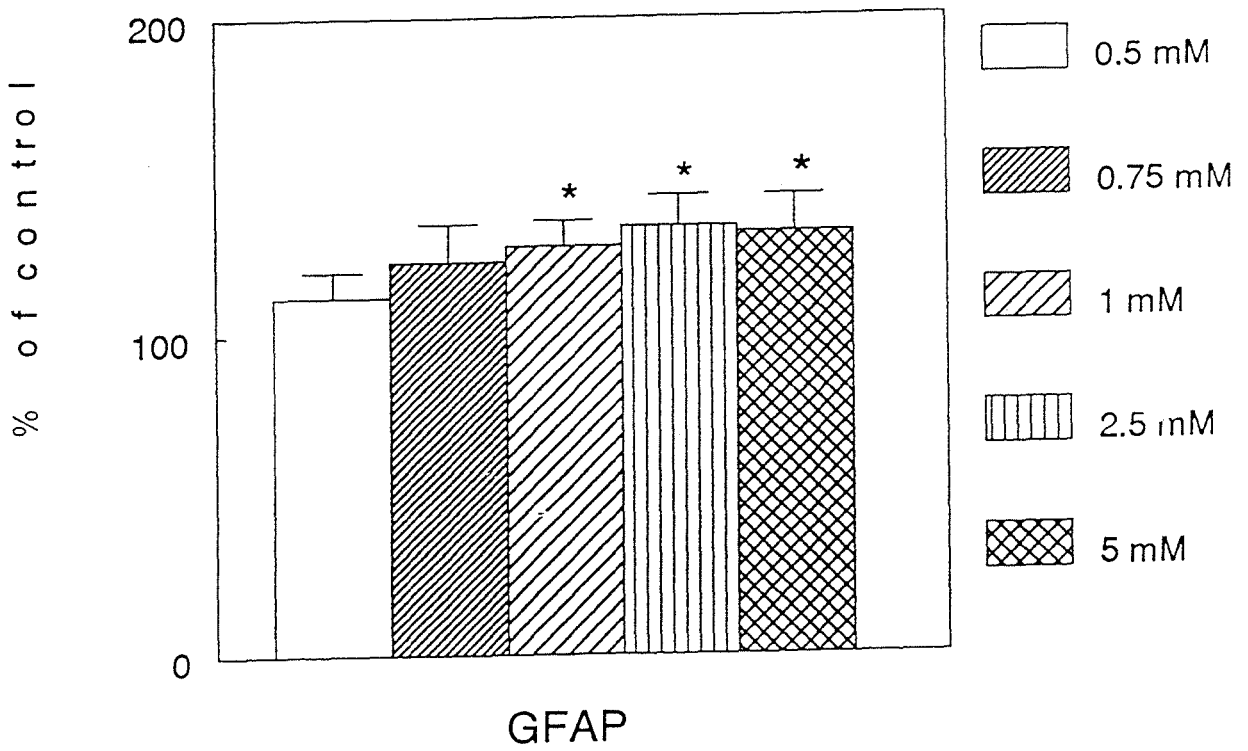
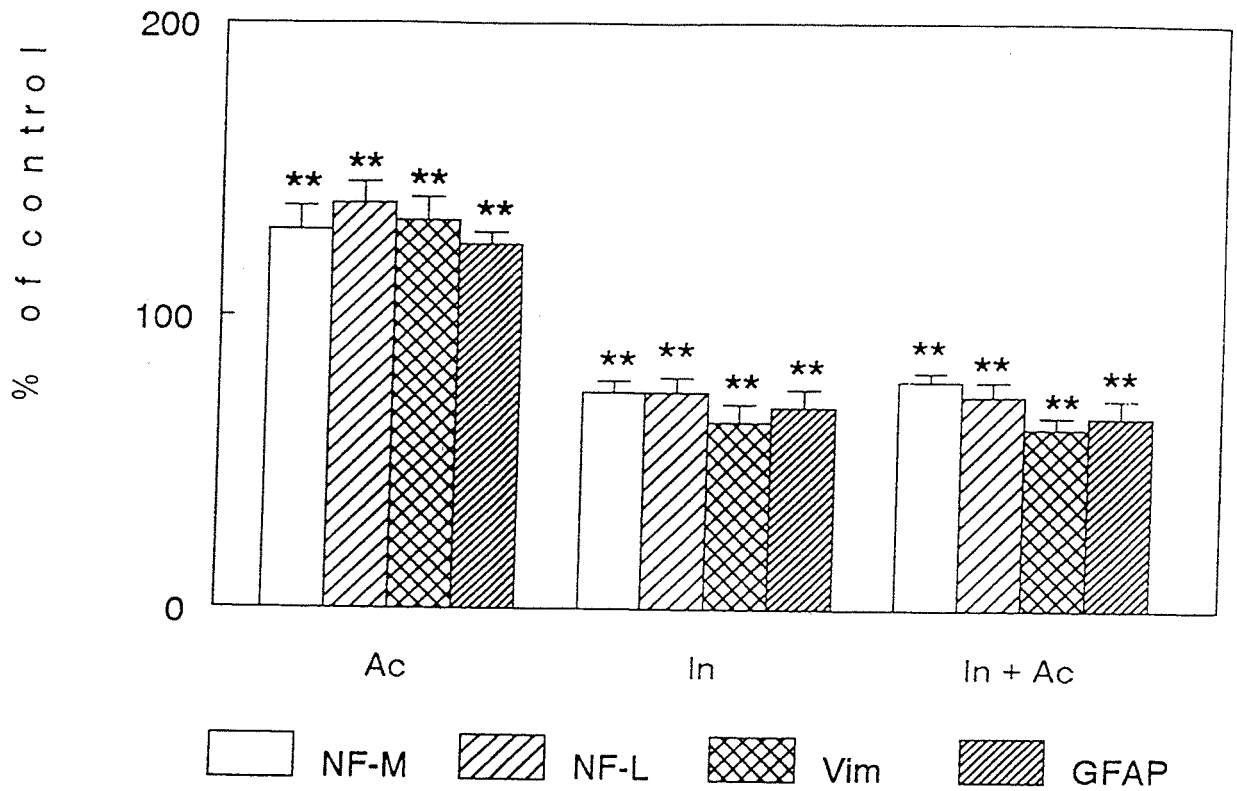


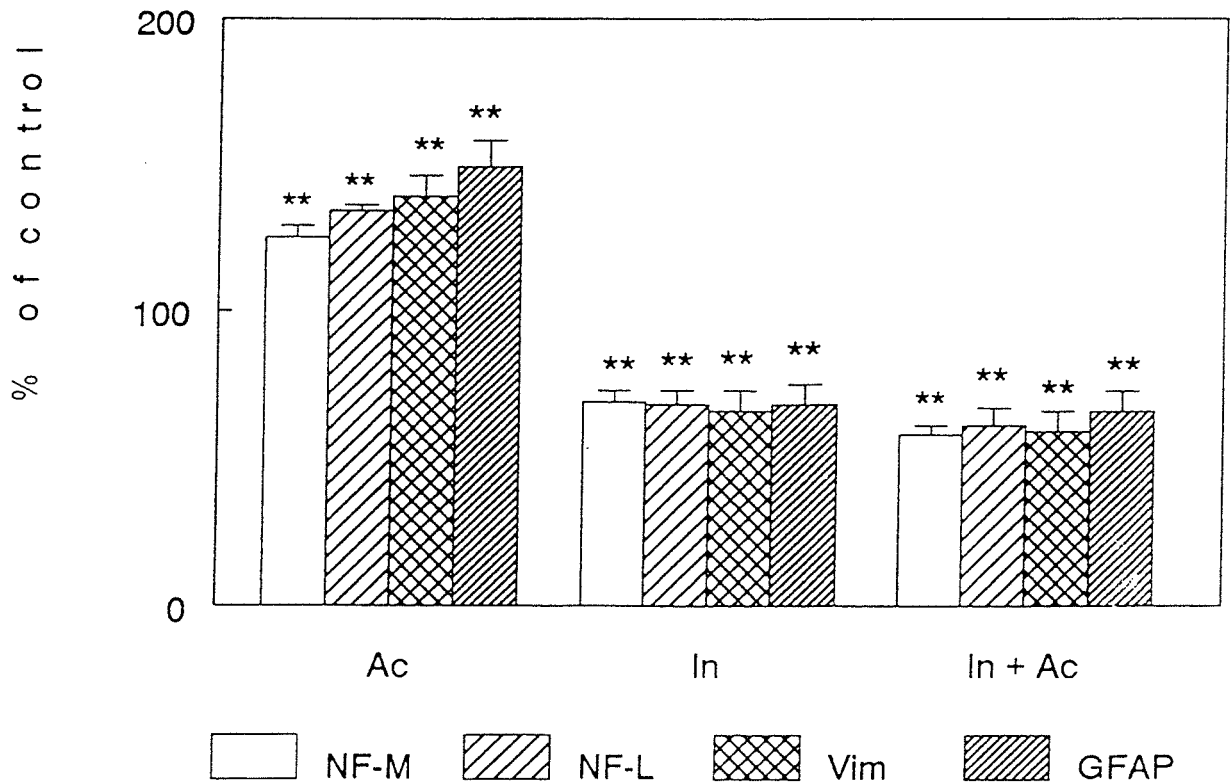
FIGURA 4

Figure 4. Effect of α -ketoisocaproic acid on cAMP- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent in vitro phosphorylation of IF proteins. 150 kDa neurofilament subunit, NF-M; 68 kDa neurofilament subunit, NF-L; vimentin, vim; glial fibrillary acidic protein, GFAP. Tissue slices were preincubated for 20 min at 30°C with 50 μM KN-93, a CaMKII inhibitor (A) or 100 μM H-89, a PKA inhibitor (B). Incubation was carried out in the presence of ^{32}P orthophosphate, the inhibitors and 1.0 mM KIC. Controls did not contain the drugs. The IF-enriched cytoskeletal fraction was extracted and in vitro ^{32}P incorporation measured as described in Material and Methods. Data are means \pm SEM of 3-4 experiments. Ac: α -ketoisocaproic acid; In: protein kinase inhibitors; In + Ac: protein kinase inhibitors + α -ketoisocaproic acid. Statistically significant differences from controls, as determined by one way ANOVA, are indicated: **, $P < 0.01$.

A



B



Discussion

The mechanisms responsible for the neurological dysfunction of MSUD are complex, although the neurologic symptomatology of MSUD patients is exacerbated mainly by elevations of leucine and α -ketoisocaproic acid, considered to be the main neurotoxic agents in this disease (33).

Previous studies demonstrated that KIC, KIV, α -hydroxyisocaproic and α -hydroxyisovaleric acids competitively inhibit the activity of glutamate decarboxylase in brain (31), and that KIC inhibits the transport of pyruvate into the mitochondria (11) as well as the activities of brain pyruvate deshydrogenase and L- α -ketoglutarate dehydrogenase in humans and rats (17).

On the other hand, the phosphorylation state of neurofilaments and other cytoskeletal proteins is tightly regulated, both temporally and spatially (23). Imbalance of protein kinase and/or phosphatase activities may lead to hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins, frequently associated with neurodegenerative diseases. In this context, it has been proposed that interference with phosphorylation at sites on the head domain of neurofilament subunits might promote inappropriate interactions of neurofilaments with cytoskeletal elements, thereby preventing their entry into axons and causing neurofibrillary lesions within perikarya (23). Hyperphosphorylation of tau in neurofibrillary tangles and neurofilament proteins in Lewy bodies are described in lesions associated with Alzheimer's disease and Lewy body dementia, respectively (26, 35).

Considering that alterations in the phosphorylating level of cytoskeletal proteins have been associated with the mechanisms involved in some neurodegenerative disorders (14), in this work we verified the effect of KIC, KIV and KMV, metabolites accumulating in MSUD, on the in vitro ^{32}P incorporation into IF proteins. For this purpose, tissue slices were incubated with the acids in the presence of ^{32}P -Na orthophosphate. The IF enriched cytoskeletal fraction was obtained and the radioactivity incorporated into NF-M, NF-L, vimentin and GFAP

was measured. Since intermediate filament proteins are known to be the high salt-insoluble components of the cytoskeleton (24), IF preparations were prepared from brain by extraction of the tissue slices with a high salt PBS solution containing 1% Triton X-100 in the presence of several protease inhibitors. Under these extraction conditions, the bulk of IF proteins is recovered in the insoluble material. Our results showed that KIC significantly activated the in vitro ³²P incorporation into the intermediate filament subunits NF-M, NF-L, vimentin and GFAP in a dose-dependent manner. Conversely, KIV and KMV were ineffective in causing such effect, pointing to a specific susceptibility of IF proteins to the effect of KIC on their phosphorylation. These results support and may explain the assumption that KIC is one of the main neurotoxic agents in MSUD. In addition, by using specific protein kinase inhibitors, we also demonstrated in this study that the effect elicited by KIC was mediated by PKA and CaMKII. On the other hand, the fact that the effect of KIC was only achieved with doses of 0.75 mM and higher, but not with the dose of 0.5 mM, may be related to the universally accepted concept that for a good treatment plasma levels of leucine in MSUD patients must be kept at or below 0.5 mM. Therefore, considering that plasma concentrations of leucine and KIC are nearly the same in MSUD patients, it is possible that plasma KIC levels should also be maintained at or below 0.5 mM in these patients to avoid neurologic damage. However, further in vivo studies on individuals affected with this disorder must firstly be carried out to test whether this postulate is correct.

On the other hand, what consequences increased phosphorylation of these IF proteins will have on the CNS is unknown. By looking at the data showing that phosphorylation of the head domains is responsible for disassembly of vimentin (15), GFAP (36), desmin (7), keratin (38), α -internexin (30), NF-L (10) and lamin (25), suggesting that organization of IFs may be regulated by phosphorylation (5), we presume that this mechanism might possibly underlie KIC neurotoxicity.

The literature describes similar effects of other toxins accumulating in some inherited metabolic disorders on the phosphorylating system of cytoskeletal proteins in brain (3,4). These findings, allied to the results of the present study,

support the view that alteration of the phosphorylation level of brain proteins may be an important mechanism underlying the neurologic symptomatology of those intoxicated with these substances.

Our results therefore provide further support for the involvement of IF proteins phosphorylation imbalance in a neurodegenerative disease.

In conclusion, we demonstrate in the present study that KIC, at doses found in blood, brain and other tissues of patients with MSUD, markedly affects the phosphorylating system associated with cytoskeletal proteins in rat cerebral cortex. Even though it is difficult to extrapolate our results to the human condition, if that is the case, we presume that interference with the phosphorylating system would probably lead to a deleterious action of KIC on the brain, a fact that might explain at least in part the pathogenesis of the severe neurological dysfunction of MSUD patients. Whether this abnormality or the other alterations previously reported caused by the metabolites accumulating in MSUD are the principal cause of the neurologic manifestation associated with MSUD remains an unanswered question.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESq-UFRGS).

REFERENCES

1- Albers, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1994. The cytoskeleton. Pages 787-862, *in* Albers, B., Bray,D., Lewis, J., Raff, M., Roberts,K., Watson, J.D. (eds), *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc, New York.

2-Chuang, D.T., Shih, V.E. 1995. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. Pages 1239-1277, *in* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.L., Valle, D. (Eds) *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York.

3-De Mattos, A. G., de Freitas, M.S., Camargo, M.M. and Pessoa-Pureur, R. Developmentally regulated in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins of the cerebral cortex of normal and malnourished rats. *Dev. Neurosci.* 16 (1994) 38-43.

4-De Mattos-Dutra, A., de Freitas, M.S., Schroder, N., Zilles, A.C., Wajner, M., and Pessoa-Pureur, R. Methylmalonic acid reduces the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in the cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 763 (1997) 221-231.

5-Evans, R.M.; and Fink, L.M. An alteration in the phosphorylation of vimentin-type intermediate filaments is associated with mitosis in cultured mammalian cells. *Cell* 29 (1982) 43-52.

6-Galou, M., Colucci-Guyon, E., Ensergueix, D., Ridet, J.-L., Gimenez y Ribotta, M., Privat, A., Babinet, C., and Dupouey, P. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.* 133 (1996) 853-863.

7-Geisler, N. and Weber, K. Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the amino terminal head domain. *EMBO J.* 7 (1988) 15-20.

8-Gold, B.G., Griffin, J.W. and Price, D.L. Slow axonal transport in acrylamide neuropathy: different abnormalities produced by a single dose and continuous administration, *J. Neurochem.* 5 (1985) 1755-1768.

9-Griffin, J.W., Hoffman, P.N., Clark, A.W., Carroll, P.T., and Price, D.L. 1978. Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment by β, β' -iminodipropionitrile administration. *Science* 202 (1978) 633-635.

10-Guan, R.J.; Hall, F.L. and Cohlberg, J.A. Proline-directed protein kinase (p34^{cdc2/p58cyclinA}) phosphorylates bovine neurofilaments. *J. Neurochem.* 58 (1992) 1365-1371.

11-Halestrap, A.P., Brand, M.D., Denton, R.M. Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproic. *Bio Bio Acta* 367 (1974) 102-108.

12-Harrison, B.C., and Mobley, P.L. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein and vimentin by cytoskeletal-associated intermediate filament protein kinase activity in astrocytes. *J. Neurochem.* 58 (1992) 320-327.

13-Juntunen, J., Haltia, M. and Linnvila, I. Histochemically demonstrable non-specific cholinesterase as an indicator of peripheral nerve lesion in carbon disulfide-induced polyneuropathy. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 29 (1974) 361-366.

14-Kirkpatrick, L.L. and Brady, S.T. 1998. Cytoskeleton of Neurons and Glia. Pages 155-173, in Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. and

Uhler, M.D. (eds.), Basic Neurochemistry, Lippincott-Raven Publishers, New York.

15-Kusubata, M., Tokui, T., Matsuoka, Y., Okumura, E., Tachibana, K., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Yasuda, H., Kamijo, M., Ohba, Y., et al. p13^{suc1} suppresses the catalytic function of p34^{cdc2} kinase for intermediate filament proteins, in vitro. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 20937-20942.

16-Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227 (1970) 680-685.

17-Land, J.M., Mowbray, J., Clark, J.B. Control of pyruvate and β -hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J. Neurochem.* 26 (1976) 823-830.

18-Lanning, C.L., Wilmarth, R. and Abou-Donia, M.B. In vitro binding of [¹⁴C]2,5-hexanedione to rat neuronal cytoskeletal proteins. *Neurochem. Res.* 19 (1994) 1165-1173.

19-Lapadula, D.M., Irwin, R.D., Suwita, E. and Abou-Donia, M.B. Cross-linking of neurofilament proteins of rat spinal cord in vivo after administration of 2,5 hexanedione. *J. Neurochem.* 46 (1986) 1843-1850.

20-Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-267.

21-Martin, R., Door, R., Ziegler, A., Warchol, W., Hahn, J., and Breitig, D. Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. *Neuroscience* 88 (1999) 327-336.

- 22-Nakamura, Y., Takeda, M. and Nishimura, T. Dynamics of bovine glial fibrillary acidic protein phosphorylation. *Neuroscience Letters* 205 (1996) 91-94.
- 23-Nixon, R.A. and Sihag, R.K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci.* 14 (1991) 501-506.
- 24-Paz, M.M., Valente, G.B., Tasca, C.I., de Mattos, A.G., and Pessoa-Pureur, R. Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. *J. Nutr.* 121 (1991) 1349-1354.
- 25-Peter, M., Sanghera, J.S., Pelech, S.L. and Nigg, E.A. Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34^{cdc2}. *Eur. J. Biochem* 205 (1992) 287-294.
- 26-Pollanen, M.S., Dickson, D.W., Bergeron, C. Pathology and biology of the Lewy body. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52 (1993) 183-191.
- 27-Saitoh, T., Shima, H., Osawa, Y., Nagao, M., Hemmings, B.A., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Neurofilament associated protein phosphatase 2A: Its possible role in preserving neurofilaments in filamentous states. *Biochemistry* 34 (1995) 7376-7384.
- 28-Soussan, L., Barzilai, A. and Michaelson, D.M. Distinctly phosphorylated neurofilaments in different classes of neurons. *J. Neurochem.* 62 (1994) 770-776.
- 29-Strack, S., Westphal, R.S., Colbran, R.J., Ebner, F.F., Wadzinski, B.E. Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associate with and dephosphorylate neurofilaments. *Mol. Brain Res.* 49 (1997) 15-28.

30-Tanaka, J., Ogawara, M., Ando, S., Shibata, M., Yatani, R., Kusagawa, M., Inagaki, M. Phosphorylation of a 62 KD porcine α -internexin, a newly identified intermediate filament protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 115-123.

31-Tashian, R.E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism* 10 (1961) 393-402.

32-Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: products and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (1979) 4350-4354.

33-Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino- oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; association with CNS dysmyelination. *J. Inher. Metab. Dis.* 15 (1992) 121-135.

34-Tribble, D.; Shapira, R. 1983. Myelin proteins: Degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Bio. Bio. Res. Commun.* 114 (1983) 440-446.

35-Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Ann. NY Acad. Sci.* 747 (1994) 92-109.

36-Tsujimura, K., Tanaka, J., Ando, S., Matsuoka, Y., Kusabata, M., Sugiura, H., Yamauchi, T., Inagaki, M. Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biochem.* 116 (1994) 426-434.

37-Vinadé, L. and Rodnight, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Res.* 732 (1996) 195-200.

38-Yano, T., Tokui, T., Nishi, Y., Nishizawa, K., Shibata, M., Kikuchi, K., Tsuiki, S., Yamauchi, T., Inagaki, M. . Phosphorylation of keratin intermediate filaments by protein kinase C, by calmodulin-dependent protein kinase and by cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem* 197 (1991) 281-290.

39-Yuwiller, A.; Geller, E. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature* 208 (1965) 83-84.

40-Wong, P.C., Marszlek, J., Crawford, T.O, Xu, Z., Hsieh, S.-T., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J. Cell Biol.* 130 (1995) 1413-1422.

DISCUSSÃO

Embora os sintomas neurológicos da DXB sejam predominantes no quadro clínico dos pacientes, a etiopatogenia da disfunção neurológica é pouco conhecida. Sabe-se, no entanto, que existe uma correlação entre o aumento dos níveis séricos de leucina e do CIC e a piora da sintomatologia neurológica (Treacy et al., 1992).

Estudos prévios demonstraram que o CIC, o CIV, o ácido α -hidróxi-isocapróico e o ácido α -hidróxi-isovalérico inibem competitivamente a atividade da glutamato descarboxilase no cérebro, levando, portanto, a menor síntese de GABA (Tashian et al., 1961). Além disso, o CIC inibe o transporte do piruvato para dentro da mitocôndria (Halestrap et al., 1974), como também inibe a atividade da piruvato desidrogenase e L- α -cetoglutarato desidrogenase em cérebro de humanos e ratos, prejudicando, desta forma, a produção da energia pelo cérebro (Land et al., 1976).

Por outro lado, o grau de fosforilação dos neurofilamentos e de outras proteínas cerebrais é altamente regulado por vários fatores intra e extracelulares e em diferentes compartimentos da célula (Nixon et al., 1991). Desequilíbrios na atividade de proteína quinases e/ou proteína fosfatases pode levar a uma hiperfosforilação das proteínas citoesqueléticas e são freqüentemente associados a doenças neurodegenerativas. Neste contexto, foi proposto que alterações da fosforilação em sítios da extremidade amino-terminal de subunidades de neurofilamentos podem interferir entre as interações dos neurofilamentos com outros elementos do citoesqueleto, dificultando sua entrada em axônios e causando lesões neurofibrilares no corpo celular (Nixon et al., 1991). A hiperfosforilação da proteína *tau* nos feixes neurofibrilares e dos neurofilamentos no corpúsculo de Lewi é descrita em lesões associadas com a doença de Alzheimer e a

demência do corpúsculo de Lewi, respectivamente (Pollanen et al., 1993; Trojanowski et al., 1994).

Considerando que alterações no grau de fosforilação de proteínas do citoesqueleto estão associadas com os mecanismos envolvidos em algumas doenças neurodegenerativas (Kirkpatrick and Brady, 1999), no presente trabalho investigamos o efeito do CIC, do CIV e do CMV, metabólitos acumulados na DXB, sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P em filamentos intermediários de córtex cerebral de ratos jovens. As fatias de tecido cerebral foram inicialmente incubadas com os ácidos na presença de ^{32}P -ortofosfato, a fração citoesquelética rica em filamentos intermediários foi isolada e a radioatividade incorporada nas subunidades NF-M, NF-L, Vim e GFAP medida em cintilador líquido. Tendo em vista que as proteínas dos filamentos intermediários são conhecidas por serem componentes insolúveis em tampões de alta concentração salina (Paz et al., 1991), os filamentos intermediários foram preparados por extração das fatias de córtex cerebral de ratos com uma tampão contendo 600 mM de KCl e 1% de Triton X-100, na presença de inibidores de proteases. Nestas condições, as proteínas dos filamentos intermediários são recuperadas no material insolúvel.

Nossos resultados mostraram que o CIC aumenta significativamente, de maneira dose-dependente, a incorporação *in vitro* de ^{32}P sobre as subunidades de filamentos intermediários NF-M, NF-L, Vim e GFAP. Este efeito não foi observado para o CIV e o CMV, indicando que apenas o CIC é capaz de alterar o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto de córtex cerebral de ratos jovens. Estes resultados reforçam a evidência clínica de que o CIC é um importante agente neurotóxico na DXB e elucidada pelo menos um dos mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica desta doença.

Verificamos também que o efeito causado pelo CIC é mediado pela ativação da PKA e da PKCaM II. Por outro lado, o fato deste efeito do CIC ser observado somente em doses iguais ou maiores que 0,75 mM pode indicar que os níveis plasmáticos deste metabólito devem estar abaixo de 0,5 mM para um tratamento eficiente da DXB. Considerando que as concentrações plasmáticas da leucina e do CIC são semelhantes e variam linearmente em pacientes com DXB, acredita-se que os níveis plasmáticos da leucina devam ser mantidos abaixo de 0,5 mM para evitar o dano neurológico. Entretanto, estudos em modelos animais devem ser realizados para testar esta hipótese.

Por outro lado, embora as consequências do aumento de fosforilação nos filamentos intermediários sobre o SNC não serem bem conhecidas, estudos prévios mostram que a fosforilação no domínio amino-terminal é responsável pela despolimerização da vimentina (Kusubata et al., 1992), da GFAP (Tsujimura et al., 1994), da desmina (Geisler et al., 1988), da queratina (Yano et al., 1996), da α -internexina (Tanaka et al., 1993), da subunidade NF-L (Guan et al., 1992) e da lâmina (Peter et al., 1992), sugerindo que a organização dos filamentos intermediários pode ser regulada pela fosforilação (Evans et al., 1982). Neste contexto, nossos achados mostrando um aumento de fosforilação dos filamentos intermediários causado pelo CIC pode representar pelo menos um dos mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade da doença.

Descrevemos previamente efeitos similares de outros metabólitos acumulados em alguns erros inatos do metabolismo (EIM) sobre o sistema de fosforilação/desfosforilação das proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos (De Mattos et al., 1994; De Mattos-Dutra et al., 1997). Estes resultados indicam que alterações nos níveis de fosforilação de proteínas cerebrais pode ser um importante mecanismo associado com a sintomatologia neurológica em pacientes com DXB e em outros EIM.

É também possível que nossos resultados contribuam para o esclarecimento do envolvimento da fosforilação de proteínas do tipo filamentos intermediários em outras doenças neurodegenerativas.

Em conclusão, demonstramos que o CIC, em doses encontradas no sangue, cérebro e outros tecidos de pacientes com DXB, afeta o sistema de fosforilação associado com as proteínas citoesqueléticas de córtex cerebral de ratos jovens. Apesar de ser difícil extrapolar nossos resultados para a condição humana, supomos que a interferência no sistema de fosforilação provavelmente levará a uma ação deletéria do CIC no cérebro, um fato que explica em parte a disfunção neurológica dos pacientes com DXB. Entretanto, permanece sem resposta se esta anormalidade ou outras alterações previamente descritas causadas pelos metabólitos acumulados na DXB são as principais causas das manifestações neurológicas associadas com esta doença.

CONCLUSÕES

- 1) O CIC aumenta a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas subunidades NF-M, NF-L, Vim e GFAP da fração citoesquelética em fatias de córtex cerebral de ratos de 17 dias, enquanto que o CIV e o CMV não alteram este parâmetro.
- 2) O efeito do CIC sobre o aumento da incorporação de ^{32}P nas proteínas do citoesqueleto é dose-dependente até a concentração de 1mM, quando atinge um *plateau*.
- 3) O aumento da incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas estudadas causado pelo CIC é mediado pela ativação das quinases dependentes de AMPc (PKA) e de Ca^{+2} /calmodulina (PKCaM II).

PERSPECTIVAS

Nossos resultados abrem as seguintes perspectivas de investigação a serem desenvolvidas futuramente:

- ❖ Caracterização do mecanismo de ação do CIC sobre o aumento da incorporação *in vitro* de P^{32} sobre as proteínas de filamentos intermediários do citoesqueleto neuronal;
- ❖ Estudo ontogenético do efeito do CIC sobre as proteínas de filamentos intermediários do citoesqueleto neuronal, com o objetivo de verificar se o efeito deste ácido varia com o desenvolvimento;
- ❖ Início de uma nova abordagem utilizando cultura de neurônios para verificar as alterações morfológicas provocadas pelo CIC sobre estas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. The cytoskeleton. In: **Molecular Biology of the Cell**. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; K. and Watson, J. D. (eds). 3 ed. New York: Garland Publishing, 1994. p. 787-847.
- APPEL, S. H. Inhibition of brain protein synthesis: an approach to a biochemical basis of neurological dysfunction in the amino-acidurias. **Proceedings of New York Academy Science 29**: 63-70, 1966.
- AVILA, J.; ULLOA, L.; GONZÁLEZ, J.; MORENO, F.; DÍAZ-NIDO, J. Phosphorylation of microtubule-associated proteins by protein kinase ck2 in neuritogenesis. **Cellular and Molecular Biology Research 40**: 573-579, 1994.
- BIGNAMI, A.; RAJU, T.; DAHL, D. Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. **Developmental Biology 91**: 286-295, 1982.
- BLOMGREN, K.; KAWASHIMA, S.; SAIDO, T. C.; KARLSSON, J. O.; ELMERED, A.; HAGBERG, H. Fodrin degradation and subcellular distribution of calpains after neonatal rat cerebral hypoxic-ischemia. **Brain Research 684**: 143-149, 1995.

BRADY, S. T. Axonal dynamics and regeneration. In: **Neuronal Regeneration**. Gorio, A. (ed). New York: Raven Press, 1992. p. 7-36.

BRADY, S. T. Cytotypic specializations of the neuronal cytoskeleton and cytomatrix: Implications for neuronal growth and regeneration. In: **Cellular and Molecular Aspects of Neuronal Development and Regeneration**. Haber, B.; Gorio, A.; Vellis, J. D.; Perez-Polo, J. R. (eds). New York: Springer-Verlag, 1988. p.311-322.

BRONSTEIN, J. M.; FARBER, D. B.; WASTERLAIN, C. G. Regulation of type II calmodulin kinase: Functional implications. **Brain Research** **18**: 135-147, 1993.

CECCALDI, P. E.; GROHOVAZ, F.; BENFENATI, F.; CHIERAGATTI, E.; GREENGARD, P.; VALTORTA, F. Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: An analysis by videomicroscopy. **The Journal of Cell Biology** **128**: 905-912, 1995.

CHUANG, D. T. Maple syrup urine disease: It has come a long way. **The Journal of Pediatrics** **132** (3): S17-S23, 1998.

CHUANG, D. T.; SHIH, V. E. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. Scriver, C. R.; Beaudet A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds). New York: Mc Graw Hill, 1995. p. 1239-1277.

COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends in Biochemical Science** **17**: 408-413, 1992.

DANNER, D. J.; ELSAS, L. J. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. Sciver, C. D.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds). New York: McGraw Hill, 1989. p. 671-692.

DE FREITAS, M. S.; MATTOS, A. G.; CAMARGO, M. M.; WANMACHER, C. M. D.; PUREUR, R. P. Cytoskeletal-associated protein kinase and phosphatase activities from cerebral cortex of young rats. **Neurochemical Research** 20: 951-956, 1995.

DE FREITAS, M. S.; MATTOS, A. G.; SCHRÖDER, N.; WANMACHER, C. M. D.; PUREUR, R. P. Effect of hyperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of developing rats. **Experimental Neurology** 143: 188-195, 1997.

DE MATTOS, A. G.; DE FREITAS, M. S.; CAMARGO, M. M.; PESSOA-PUREUR, R. Developmentally regulated *in vitro* phosphorylation of cytoskeletal proteins of the cerebral cortex of normal and malnourished rats. **Developmental Neuroscience** 16: 38-43, 1994a.

DE MATTOS-DUTRA, A.; DE FREITAS, M. S.; SCHRODER, N.; ZILLES, A. C.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Methylmalonic acid reduces the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in the cerebral cortex of rats. **Brain Research** 763: 221-231, 1997.

DE VITRY, F.; PICART, R.; JACQUES, C.; TIXIER-VIDAL, A. Glial fibrillary acidic protein: a cellular marker of tanycytes in the mouse hypothalamus. **Developmental Neuroscience** 4: 457-460, 1981.

DÍAZ-NIDO, J.; SERRANO, L.; HERNÁNDEZ, M. A.; AVILA, J. Phosphorylation of microtubule proteins in rat brain at different developmental stages: comparison with that found in neuronal cultures. **Journal of Neurochemistry** 54: 211-222, 1990.

DÍEZ-GUERRA, F. J.; AVILA, J. An increase *in vitro* phosphorylation of microtubule-associated protein 2 accompanies dendrite extension during differentiation of cultured hippocampal neurones. **European Journal of Biochemistry** 277: 68-77, 1995.

DRECHSEL, D. N.; HYMAN, A. A.; COBB, M. H.; KIRSCHNER, M. W. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. **The Molecular Biology of the Cell** 3: 1141-1154, 1992.

ELSAS, L.; DANNER, D.; LUBITZ, D.; FERNHOFF, P.; DEMBURE, P. Metabolic consequences of inherited defects in branched chain alpha-ketoacid dehydrogenases: Mechanism of thiamine action. In: **Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Ketoacids**. Walser, M.; Williamson, J. R. (eds). New York: Elsevier/North Holland, 1981. p.369-382.

ELSON, E. L. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structural and function. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry** 17: 397-430, 1988.

- EVANS, R. M. Phosphorylation of vimentin mitotically selected cells. In vitro cyclic AMP-independent kinase and calcium-stimulated phosphatase activities. **The Journal of Cell Biology** **108**: 67-78, 1989.
- EVANS, R. M.; FINK, L. M. An alteration in the phosphorylation of vimentin-type intermediate filaments is associated with mitosis in cultured mammalian cells. **Cell** **29**: 43-52, 1982.
- FEINSTEIN, D. L.; WEINMASTER, G. A.; MILNER, R. J. Isolation of cDNA clones encoding glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. **Journal Neuroscience Research** **32**: 1-4, 1992.
- FERNANDEZ, A.; BRAUTIGAN, D. L.; MUMBY, M.; LAMB, N. J. C. Protein Phosphatase Type I, not type 2A, modulates actin microfilament integrity and myosin light chain phosphorylation in living nonmuscle cells. **The Journal of Cell Biology** **111**: 103-112, 1990.
- FRANKE, W. W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proceedings of the National Academy of Science USA** **75**: 5034-5038, 1978.
- FUCHS, E.; WEBER, K. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease. **Annual Review of Biochemistry** **63**: 345-382, 1994.

- GAULL, G. E. Pathogenesis of maple syrup urine disease: Observation during dietary management and treatment of coma by peritoneal dialysis. **Biochemical Medicine** **3**: 130-138, 1969.
- GEISLER, N.; WEBER, K. Structural aspects of intermediate filaments, In: **Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton**. Shay, J. W. (ed). New York: Plenum Press, 1985. p. 41-68.
- GEISLER, N.; WEBER, K. Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the amino terminal head domain. **The EMBO Journal** **7**: 15-20, 1988.
- GLASSON, B. I.; CROMLISH, J. A.; ATHLAN, E. S.; MUSHYNSKI, W. E. Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in okadaic acid-treated neurons potentiates neurofilament fragmentation and stimulates phosphorylation of Ser2 in the low-molecular-mass neurofilament subunit. **Journal of Neurochemistry** **66**: 1207-1213, 1996.
- GREENGARD, P. Neuronal phosphoproteins: Mediators of signal transduction. **Molecular Neurobiology** **1**: 81-118, 1987.
- GUAN, R. J.; HALL, F. L.; COHLBERG, J. A. Proline-directed protein kinase (p34^{cdc2/p58cyclinA}) phosphorylates bovine neurofilaments. **The Journal of Neurochemistry** **58**: 1365-1371, 1992.
- HALESTRAP, A. P.; BRAND, M. D.; DENTON, R. M. Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproic. **Biochimica et Biophysica Acta** **367**: 102-108, 1974.

- HARGREAVES, A. J.; WANDOSELL, F.; AVILA, J. Phosphorylation of tubulin enhances its interaction with membranes. **Nature** **323**: 827-828, 1986.
- HIDAKA, H.; KOBAYASHI, R. Use of protein (serine/threonine) kinase activators and inhibitors to study protein phosphorylation in intact cells. In: **Protein Phosphorylation**. Hardie, D.G.; Rickwood, D.; Hames, B. D. (eds). New York: IRL Press, 1993. P. 87-107.
- HIROKAWA, N.; Quick-Freeze, deep-etch visualization of the axonal cytoskeleton. **Trends Neuroscience** **9**: 67-71, 1986.
- HOLLENBECK, P. J. The transport and assembly of the axonal cytoskeleton. **The Journal of Cell Biology** **108**: 223-227, 1989.
- HUANG, Y.; ZIELKE, H. R.; TILDON, J. T.; ZIELKE, C. L.; BAAB, P. J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: Leucine infusion. **Developmental Neuroscience** **18**: 415-419, 1996.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell** **80**: 225-236, 1995.
- HUTSON, S. M.; RANNELS, S. L. Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain α -keto acids. **Journal of Biological Chemistry** **260**: 14189-14195, 1985.

- ICHIARA, A. Aminotransferases of branched-chain amino acids. In: **Transaminases**. Christie, P.; Metzler, D. E. (eds). New York: John Wiley, 1984. p. 437-565.
- IKEDA, Y.; TANAKA, K. 2-Methyl branched-chain acyl-CoA dehydrogenase from rat liver. **Methods Enzymology** **166**: 360-373, 1988.
- INAGAKI, M.; GONDA, Y.; NISHIZAWA, K.; KITAMURA, S.; SATO, C.; ANDO, S.; TANABE, K.; KIKUCHI, K.; TSUIKI, S.; NISHI, Y. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. **Journal Biological Chemistry** **265**: 4722-4729, 1990.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T.; INAGAKI, N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. **Brain Pathology** **4**: 239-243, 1994.
- INAGAKI, N.; ITO, M.; NAKANO, T.; INAGAKI, M. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. **Trends in Biochemical Science** **19**: 448-452, 1994a.
- INGBER, D. E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. **Journal of Cell Science** **104**: 613-627, 1993.
- INGEBRITSEN, T. S.; COHEN, P. The protein phosphatases involved in cellular regulation. Classification and substrate specificities. **European Journal of Biochemistry** **132**: 255-261, 1983.

- JOHNSON, G. V. W.; LITERSKY, J. M.; JOPE, R. S. Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. **Journal of Neurochemistry** **56**: 1630-1638, 1991.
- KIRKPATRICK, L. L.; BRADY, S. T. Cytoskeleton of neurons and glia. In: **Basic Neurochemistry**. 6 ed. Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D. (eds). New York: Lippincott-Raven, 1999. p. 155-175.
- KORIEN, J.; SANSARICQ, C.; KALMIJN, M.; HONIG, J.; LANGE, B. Maple Syrup Urine Disease: clinical, EEG and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. **International Journal Neuroscience** **79**: 21-45, 1994.
- KUSUBATA, M.; TOKUI, T.; MATSUOKA, Y.; OKUMURA, E.; TACHIBANA, K.; HISANAGA, S.; KISHIMOTO, T.; YASUDA, H.; KAMIJO, M.; OHBA, Y., et al. p13^{suc1} suppresses the catalytic function of p34^{cdc2} kinase for intermediate filament proteins, in vitro. **The Journal of Biological Chemistry** **267**: 20937-20942, 1992.
- LAND, J. M.; MOWBRAY, J.; CLARK, J. B. Control of pyruvate and β -hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. **Journal of Neurochemistry** **26**: 823-830, 1976.
- LASEK, R. J. Studying the intrinsic determinants of neuronal form and function. In : **Intrinsic Determinants of Neuronal Form and Function**. Lasek, R. J.; Black, M. M. (eds). New York: Alan R. Liss Inc, 1988. p. 1-60.

- LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemical heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. **Annual Review of Biochemistry** **51**: 219-250, 1982.
- LEE, G. Non-motor microtubule-associated proteins. **Current Opinion of Cell Biology** **5**: 88-94, 1993.
- LEE, W. C.; YU, J. S.; YANG, S. D.; LAI, Y. K. Reversible hyperphosphorylation and reorganization of vimentin intermediate filaments by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells. **Journal of Cellular Biochemistry** **49**: 378-393, 1992.
- LINT, J. V.; SINNET-SMITH, J.; ROZENGURT, E. Expression and characterization of a PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry** **270**: 1455-1461, 1995.
- LOHMANN, S. M.; VAANDRAGER, A. B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, H. R. Distinct and specific functions of GMPC-dependent protein kinase. **Trends in Biochemical Science** **22**: 307-312, 1997.
- LUDUENA, R. F. Are tubulin isotypes functionally significant ? **The Molecular Biology of the Cell** **4**: 445-457, 1993.
- MACRAE, T. H. Towards an understanding of microtubule function and cell organization: an overview. **Biochemistry of Cell Biology** **70**: 835-841, 1992.

McKENNA, M. C.; SONNEWALD, U.; HUANG, X.; STEVENSON, J.; JOHNSEN, S.; SANDE, L. M.; ZIELKE, H. R. α -Ketoisocaproate alters the production of both lactate and aspartate from [U-¹³C]Glutamate in Astrocytes: A ¹³C NMR Study. **Journal of Neurochemistry** **70**: 1001-1008, 1998.

McLENDON, R. E.; BOGNER, D. D. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. **Brain Pathology** **4**: 221-228, 1994.

MÔNACO, S.; AUTELLO-GAMBETTI, L.; LASEK, R. J.; KATZ, M.; GAMBETTI, P. Experimental increase of neurofilament transport rate: decreases in neurofilament number and in axon diameter. **Journal of Neuropathology Experimental in Neurology** **48**: 23-32, 1989.

NAIRN, A. C.; HEMMINGS, H. C.; GREENGARD, P. Protein kinases in the brain. **Annual Review of Biochemistry** **54**: 931-976, 1985.

NAIRN, A. C.; SCHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. **Current Opinion in Neurobiology** **2**: 296-301, 1992.

NAYLOR, E. W. Newborn screening for maple syrup urine disease. Branched chain ketoaciduria. In: **Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism**. Brickel, H.; Guthrie, R.; Hamersen, G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, 1980. p.19-28.

NESTLER, E. J.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: **Basic Neurochemistry**, Siegel, G.; Agranoff, B. W.;

Alberts, R. W.; Molinoff, P. B. (eds). New York: Raven Press, 1994. p. 449-474.

NISHIZUKA, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature** **334**: 661-665, 1988.

NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. **Annual Review Biochemistry** **58**: 31-48, 1989.

NIXON, R. A.; SHLAG, R. K. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends in Neurochemical Science** **14 (11)**: 501-506, 1991.

NORD, A.; VAN DOORNINCK, W. J.; GREENE, C. Developmental profile of patients with Maple Syrup Urine Disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease** **14**: 881-889, 1991.

OXENDER, D. L.; CHRISTENSEN, H. N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. **Journal of Biological Chemistry** **238**: 3686-3895, 1963.

PARRELA, T.; SURREY, S.; IOLASCON, A.; SARTORE, M.; HEIDEREICH, R.; DIAMOND, G.; PONZONE, A.; GUARDAMAGNA, O.; BURLINA, A.; CERONA, R.; PARINI, R.; DIONISI-VICI, C.; RAPPAPORT, E.; FORTINA, P. Maple Syrup Urine Disease (MSUD): Screening for known mutations in Italian patients. **Journal of Inherited Metabolic Disease** **17**: 653-660, 1994.

PASQUALOTTO, B. A.; SHAW, C. A. Regulation of ionotropic receptors by protein phosphorylation. **Biochemical Pharmacology** **51**: 1417-1425, 1996.

PAZ, M. M.; VALENTE, G. B.; TASCA, C. I.; DE MATTOS, A. G.; PESSOA PUREUR, R. Malnutrition induces na increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. **Journal of Nutritional Biochemistry** **121**: 1349-1354, 1991.

PETER, M.; SANGHERA, J. S.; PELECH, S. L.; NIGG, E. A. Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34^{cdc2}. **European Journal of Biochemistry** **205**: 287-294, 1992.

PIXLEY, S. K.; DE VELLIS, J. Transition between radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. **Developmental Brain Research** **15**: 201-209, 1984.

POLLANEN, M. S.; DICKSON, D. W.; BERGERON, C.; Pathology and biology of the Lewy body. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** **52**: 183-191, 1993.

PRENTKI, M.; RENOLD, A. E. Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry** **58**: 14239-14244, 1983.

RAABE, T. D.; BITTNER, G. Phosphorylation of neurofilament proteins in isolated goldfish mauthner axoplasm. **Journal of Neurochemistry** **66 (3)**: 1214-1221, 1996.

RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S.; LEAL, R.
Control of the phosphorylation of astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 30: 325-338, 1997.

RODNIGHT, R.; WOFCHUK, S. T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. **Essays in Biochemistry** 27: 91-100, 1992.

SCHADEWALDT, P.; BODNER, A.; BRÖSICKE, H.; HAMMEN, H. W.; WENDEL, U. Assessment of whole body L-leucine oxidation by noninvasive L-[1-¹³C] leucine breath tests: A reappraisal in patients with maple syrup urine disease, obligate heterozygotes, and healthy subjects. **Pediatrics Research** 43 (5): 592-560, 1998.

SCHADEWALDT, P.; WENDEL, U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. **European Journal of Pediatric** 156: S62-S66, 1997.

SCHNITZER, J.; FRANKE, W. W.; SCHACHNER, M.
Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. **Journal Cell Biology**, 90: 435-447, 1981.

SCHULMAN, H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. **Current Opinion in Neurobiology** 5 (3): 375-381, 1995.

SCRIVER, C. R.; KAUFMAAN, S.; EISENSMITH, R. C.; WOO, S. L. C.
Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In:

The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds). New York: McGraw-Hill, 1995. p. 1239-1277.

SHELANSKI, M. L.; FRAPPIER, T.; GEORGIEFF, I.; TROY, C.; MELLADO, W. Cytoskeletons of central and peripheral neurons. **Journal of the Neurological Sciences** **124**: 33-36, 1994.

SHIRAO, T. The roles of microfilament-associated proteins, debrins, in brain morphogenesis: a review. **Journal of Biochemistry** **117**: 231-236, 1995.

SMITH, S. J. Neuronal cytomchanics: the actin-based motility of growth cones. **Science** **242**: 708-715, 1988.

STEINERT, P. M.; ROOP, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. **Annual Review of Biochemistry** **57**: 593-625, 1988.

STEINERT, P. M.; STEVEN, A. C.; ROOP, D. R. The molecular biology of intermediate filaments. **Cell** **42**: 411-419, 1985.

STEWART, O.; BANKER, G. A. Getting the message from the gene to the synapse: shoting and intracellular transport of RNA in neurons. **Trends in Neuroscience** **15**: 180-186, 1992.

SULLIVAN, K. F. Structure and utilization of tubulines isotypes. **Annual Rewiew of Cell Biology** **4**: 687-716, 1988.

- TANAKA, E.; HO, T.; KIRSCHNER, M. W. The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. **The Journal of Cell Biology** **128**: 139-155, 1995.
- TANAKA, J.; OGAWARA, M.; ANDO, S.; SHIBATA, M.; YATANI, R.; KUSAGAWA, M.; INAGAKI, M. Phosphorylation of a 62 KD porcine α -internexin, a newly identified intermediate filament protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **196**: 115-123, 1993.
- TANAKA, K.; ROSENBERG, L. E. Disorders of branched chain amino acid and organic acid metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. Stanbury, S. B.; Wyngarden, J. B.; Fredrickson, D.S.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (eds). New York: McGraw-Hill, 1983. p. 440-473.
- TASHIAN, R. E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, leucine and valine derivatives: A suggestion concerning the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain keto aciduria. **Metabolism** **10**: 393-400, 1961.
- THOMPSON, G. N.; BRESSON, J. L.; PACY, P. J.; BONNEFONT, J. P.; WALTER, J. H.; LEONARD, J. V.; SAUDUBRAY, J. M.; HALLIDAY, D. Protein and leucine metabolism in maple syrup urine disease. **American Journal Physiology** **258**: E654-660, 1990.
- TOKUI, T.; SHEPHERD, D.; CRAIG, E. J. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. **Science** **267**: 1510-1512, 1995.

TREACY, E.; CLOW, C. L.; READE, T. R.; CHITAYAT, D.; MAMER, O. A.; SCRIVER, C. R. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino-oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; association with CNS dysmyelination. **Journal of Inherited Metabolic Disease** **15**: 121-135, 1992.

TROJANOWSKY, J. Q.; LEE, V. M. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewi body dementias. **Annal New York Academy of Sciences** **747**: 92-109, 1994.

TSUJIMURA, J. Q.; TANAKA, J.; ANDO, S.; MATSUOKA, Y.; KUSUBATA, M.; DUGIURA, H.; YAMAUCHI, T.; INAGAKI, M. Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca⁺²-calmodulin-dependent protein kinase II. **The Journal of Biochemistry** **116**: 426-434, 1994.

VEERANNA, K. T.; SHETTY, W. T.; LINK, H. J.; WANG, J.; PANT, H. C. Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A. **Journal of Neurochemistry** **64**: 2681-2690, 1995.

VINADÉ, L.; RODNIGHT, R. The desphosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. **Brain Research** **732**: 195-200, 1996.

WALLAS, S. I.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. **Pharmacological Reviews** **43**: 299-349, 1991.

- WANDOSELL, F.; SERRANO, L.; AVILA, J. Phosphorylation of alpha-tubulin carboxy-terminal tyrosine prevents its incorporation into microtubules. **The Journal of Biological Chemistry** **262**: 8268-8273, 1987.
- WENDEL, U.; LAUGENBECK, U.; LOMBECK, I.; BREMER, H. J. Maple syrup urine disease – Therapeutic use of insulin in catabolic states. **European Journal of Pediatric** **139**: 172-175, 1982.
- WONG, P. C.; MARSZALEK, J.; CRAWFORD, T. O.; XU, Z.; HSIEH, S.; GRIFFIN, J. W.; CLEVELAND, D. W. Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. **The Journal of Cell Biology** **130**: 1413-1422, 1995.
- YANO, S.; FUKUNAGA, K.; USHIO, Y.; MIYAMOTO, E. Activation of Ca^{+2} /calmodulin-dependent protein kinase II and phosphorylation of intermediate filament proteins by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. **The Journal of Biological Chemistry** **269**: 5428-5439, 1994.
- YANO, S.; TOKUI, T.; NISHI, Y.; NISHIZAWA, K.; SHIBATA, M.; KIKUCHI, K.; TSUIKI, S.; YAMAUCHI, T.; INAGAKI, M. Phosphorylation of keratin intermediate filaments by protein kinase C, by calmodulin-dependent protein kinase and by cAMP-dependent protein kinase. **European Journal of Biochemistry** **197**: 281-290, 1991.

YEN, S. H.; FIELDS, K. L. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. **Journal of Cell Biology** **88**: 115-126, 1981.

YUWILER, A.; GELLER, E. Serotonin depletion by dietary leucine. **Nature** **208**: 83-83, 1965.

ZILKE, H. R.; HUANH, Y.; TILDON, J. T.; ZIELKE, C. L.; BAAB, P. J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: Alpha-ketoisocaproate infusion. **Developmental Neuroscience** **18**: 420-425, 1996.