

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/44523

IB/81631

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

P197c



OK



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Fábio Papes

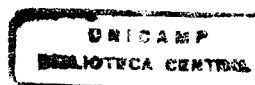
Caracterização molecular e funcional da degradação de lisina pela via da sacaropina em eucariotos superiores

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de concentração de Genética Vegetal e Melhoramento.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Fábio Papes</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>12/3/01</i>

Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

Campinas – SP
2001



UNIDADE IB/81631
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
P197c
V. Ex.
TOMBO BC/ 44523
PROC. 16-39210-1
C. 1
PREC. R\$ 11,00
DATA 16/05/01
N.º CPD

CM-00155185-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P197c **Papes, Fabio.**
Caracterização molecular e funcional da degradação de lisina pela via da sacaropina em eucariotos superiores / Fabio Papes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2000.
91f. : il. -

Orientador: Paulo Arruda.
Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Aminoácidos. 2. Sistema nervoso. 3. Genética. 4. Biologia molecular.
I. Arruda, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data: Campinas, 12 de março de 2001

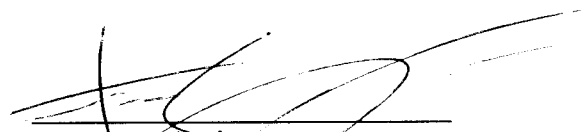
Prof. Dr. Paulo Arruda (orientador)


Assinatura

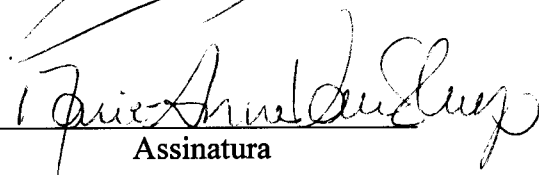
Profa. Dra. Christine Hackel


Assinatura

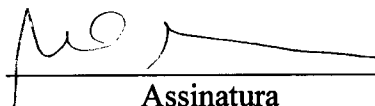
Prof. Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega


Assinatura

Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys


Assinatura

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles


Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Assinatura

APROVADA

“Problemas há cuja pesquisa vale só pelo exercício intelectual, e que ficam sempre fora da vida; outros investigam-se com prazer e com proveito se resolvem. Cabe a ti, à vontade, decidir se a indagação deve perseguir-se até ao fim, ou simplesmente limitar-se a uma encenação para ilustrar o rol dos divertimentos.”

Sêneca

*Dedico este trabalho às minhas avós, a
quem eu amo muito, na esperança de
reencontrá-las um dia, na Grande
Festa que Deus preparou para todos
nós.
Saudades...*

Gostaria de agradecer:

- à minha família, o meu porto-seguro. Mãe, pai, Antonio Carlos, tenham certeza de que, nestes anos todos, nunca encontrei pessoas maravilhosas como vocês. Obrigado, mãe e pai, pela paciência comigo, mesmo quando minha intransigência ou quietude incomodavam. Sem vocês, nada teria feito.
- à minha Grande Família, que eu amo tanto: Vó Nena e Vô Walter, Vó Idemer e Opa, Tio Fernando e Tia Cláudia (e o bebê que vai nascer), Tio Ari e Tia Mônica, Tio Waltinho e Tia Lê, Tia Mári, Tio Cláudio e Tia Zilá e meus primos, Giulliana, Bianca, Luciana, Gustavo, Júlio, Víviam e famílias. Especialmente ao Felipe, meu afilhado, o nenenzinho mais lindo do mundo.
- à D. Carlota, minha professora de piano, que é parte da minha família. Quantos anos!... Como esquecer das nossas aulas, repletas de amizade e da paz que só o nosso instrumento querido pode trazer? Onde estivermos, juntos estaremos...
- à Oma querida, minha terceira avó, e a meus padrinhos, que sempre torceram por mim.
- aos meus melhores amigos:
 - Germano, grande amigo. Você se lembra daquele garoto de óculos, tímido e exigente dos idos de 1995? É..... Quem diria! Os óculos se foram... A timidez e a chatice tamb... É... Mais ou menos. Mas de uma coisa eu tenho certeza: “Viver é muito perigoso”, mas vive-se na amizade para ter “um pouquinho de saúde, um descanso na loucura”.
 - Andréa, que às vezes fico sem ver durante um tempão, mas sei que está lá. Este tipo de amizade, aquela que nos dá a tranquilidade de saber que ela nunca acabará, mesmo na distância, só existe entre grandes amigos.
 - Adriana, que esteve sempre comigo na minha aventura CBMEGuiana. Vou sentir saudades dos nossos papos, almoços, jantares, pizzadas...
 - Susely, que eu conheço desde... Desde quando, Susy des? Nem sei mais... Qualquer palavra é fugaz perto deste tempo.
- aos meus amigos do laboratório: querido e saudoso Dante, Edsinha, Felipsco, Karenzita, Marrrrrcinho, Eneida e Leelão, Marcelo, Laurinha, Nathaly, Rodriguinho e André. E a todo o povo do CBMEG, que, ‘entre tapas e beijos’, conviveu comigo nos últimos seis anos.
- aos meus amigos da república: Serginho e Sílvia, Andrés e Flávia, Kelly Cristina, Louis, Ana Paula, Daniel e Tita (Tita mesmo!, porque ‘chita’, nem pensar!).
- à Nilda Dóris, pra quem eu reservei uma poltroninha lá no meu coração, uma lááááá atrás, perto do banheiro.
Brincadeirinha!! Fiz um item de agradecimento só pra você. Gostou?
Niilllllllida, cuidado!!! Assim você vai molhar a tese toda. :))
- aos professores Vera, Arconcher e Gualter, do Colégio Leonardo da Vinci, que inspiraram meu desejo pelo conhecimento científico; Louis Bernard, Nilce, Dra. Vilma e Alika, grandes figuras da minha formação acadêmica; e Luísa, a quem agora, finalmente, tenho um trabalho para dedicar.
- ao Francesco, amigo e companheiro de camundongocídios.
- aos meus orientadores espirituais, Pe. Toninho e Ir. Fátima.
- aos PETianos e aos meus colegas de faculdade, de modo especial Emília, Luíza e Gê.
- ao meu orientador, Prof. Paulo Arruda, que sempre acreditou muito mais nas minhas idéias do que eu mesmo.

-
- 
- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro aos trabalhos desenvolvidos nesta tese.
 - à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio concedido durante minha formação acadêmica como bolsista do PET.
 - aos colaboradores deste projeto de tese, Prof. Francesco Langone e Prof. José Roberto Trigo, que possibilitaram a execução deste trabalho.
 - aos membros das comissões pré-julgadora e julgadora desta tese, pela preocupação em torná-la melhor.

 - a Deus, que me sabe.

ÍNDICE GERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIACÕES	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A via da sacaropina	1
1.1.1. A via da sacaropina em plantas	1
1.1.2. A via da sacaropina em mamíferos	6
1.1.3. A via da sacaropina no reino Fungi	7
1.2. A via do ácido pipecólico	8
1.3. A enzima LOR/SDH: propriedades enzimáticas, localização subcelular e ativação por cálcio e fosforilação	10
1.4. A regulação da via da sacaropina	12
1.4.1. Em plantas	12
1.4.2. Em mamíferos	14
1.4.3. Em leveduras	15
1.5. Hiperlisinemias	16
1.6. O glutamato	17
1.6.1. A molécula de glutamato	17
1.6.2. Ingestão de glutamato e sua participação na gustação	19
1.6.3. Propriedades biológicas do glutamato	19
1.6.4. Compartimentalização do metabolismo de glutamato no sistema nervoso	22
2. APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS E OBJETIVOS	28
Artigo nº 1	31
Artigo nº 2	40
Artigo nº 3	45
3. DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÕES	62
BIBLIOGRAFIA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	As vias de degradação de lisina em eucariotos superiores	2
Figura 2:	Via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato em plantas	4
Figura 3:	Compartimentalização do metabolismo de glutamato entre neurônios e astrócitos no sistema nervoso central de mamíferos	23
Figura 4:	Comparação entre os genes <i>Lor/Sdh</i> humano e murino	60

ABREVIACÕES

ε	energia	EST	'expressed sequence tag'
AASA	semialdeído do ácido α -aminoadípico	GABA	ácido 4-aminobutírico
AASS	sintetase do semialdeído do ácido α -aminoadípico	GAD	glutamato desidrogenase
AK	aspartato quinase	GC-MS	cromatografia gasosa-espectrometria de massas
Ala	alanina	GCN	controle geral do metabolismo de aminoácidos em leveduras
ALS	esclerose amiotrófica lateral	GCN4	fator de transcrição da classe b-ZIP em leveduras
AMPA	amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato	Gln	glutamina
APE	excesso percentual de isótopos ('atom percent excess')	HF1	hiperlisinemia familiar do tipo I
ATP	trifosfato de adenosina	HF2	hiperlisinemia familiar do tipo II
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada	HSD	homoserina desidrogenase
BCAT	aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada	IP ₃	inositol trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato	LOR	lisina-2-oxoglutarato redutase
b-ZIP	classe de fatores específicos de transcrição caracterizados por domínio básico de ligação ao DNA e domínio 'zíper de leucinas'	Lys	lisina
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico	MND	doença motora neuronal
cDNA	DNA complementar	M_r	massa molecular relativa
CO ₂	dióxido de carbono	mRNA	RNA mensageiro
CoA	coenzima A	NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
DHDPS	dihidrodipicolinato sintetase	NADP ⁺ /NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
DIG	digoxigenina	NBT	'nitroblue tetrazolium'
DNA	ácido desoxirribonucleico	NMDA	N-metil-D-aspartato
EDTA	etilenodiamino-tetra-acetato	O ₂	lócus <i>Opaco2</i>
		<i>o2</i>	mutação no locus <i>Opaco2</i>
		O ₂	proteína <i>Opaco2</i>
		RNA	ácido ribonucleico
		RT-PCR	transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase
		SDH	sacaropina desidrogenase
		UMP	monofosfato de uridina

RESUMO

Em mamíferos e plantas, o principal caminho metabólico para a degradação do aminoácido **lisina** é a via da sacaropina. Merecem destaque as duas primeiras atividades enzimáticas desta rota, lisina-2-oxoglutarato redutase (**LOR**) e sacaropina desidrogenase (**SDH**), pois sobre elas recai grande parte do controle do catabolismo de lisina.

Em plantas, foi demonstrado o envolvimento da degradação de lisina com o desenvolvimento do endosperma de milho; em mamíferos, por outro lado, a via da sacaropina atua no fígado para a conversão de lisina em compostos energéticos, participando dos balanços de nitrogênio e carbono do organismo. Tanto em plantas como em mamíferos, as atividades de LOR e SDH residem estruturalmente num mesmo polipeptídeo bifuncional denominado LOR/SDH e estão sujeitas a processos regulatórios complexos, que envolvem controle da transcrição gênica, expressão de formas enzimáticas monofuncionais, fosforilação e multimerização.

Como parte dos trabalhos desenvolvidos nesta tese, isolou-se o gene que codifica a enzima LOR/SDH em murinos e no homem, estudando-se vários aspectos de suas funções no fígado, no rim e no sistema nervoso. Foi estudada a regulação transcricional da atividade de LOR/SDH no fígado pelos níveis corporais de lisina e em condições de jejum. Além disso, detectou-se no fígado e no rim um mRNA que provavelmente codifica uma forma enzimática monofuncional apenas com atividade de SDH, cujo papel fisiológico não foi elucidado. Os polipeptídeos LOR/SDH e SDH foram purificados parcialmente do fígado de camundongos, provando-se que, neste tecido, existe tanto a forma bifuncional LOR/SDH como a forma monofuncional SDH.

Além de estar envolvida na degradação de lisina, parece que LOR/SDH está intimamente relacionada a processos ontogenéticos, como tem sido indicado pelo estudo do desenvolvimento do endosperma de milho e do encéfalo de mamíferos. Sugeriu-se, nesta tese, que a via da sacaropina é responsável pela síntese de mensageiros intercelulares, em especial de glutamato, em processos que requerem comunicação célula-célula, como a neurotransmissão no sistema nervoso central de mamíferos.

ABSTRACT

In mammals and plants, the main metabolic route for lysine degradation is known as saccharopine pathway. The first two reactions of this pathway are catalyzed by the concerted activities of lysine-2-oxoglutarate reductase (LOR) and saccharopine dehydrogenase (SDH), upon which may rely the control of lysine catabolism.

In plants, this catabolism has been linked to maize kernel development. In mammals, on the other hand, the saccharopine pathway is thought to control the conversion of the carbon skeleton of lysine into acetyl-CoA and ketone bodies, thus participating in the nitrogen and carbon balances. In higher eukaryotes, LOR and SDH reside on a single bifunctional polypeptide (LOR/SDH), the expression of which is regulated by transcriptional and post-translational processes.

In the present thesis, we isolated LOR/SDH-encoding murine and human cDNAs, whose expression and functions were studied in various organs and tissues, including liver, kidney and brain. We detected an increase in LOR and SDH activities and LOR/SDH expression in the liver of animals under starvation or injected with lysine. We also found a monofunctional SDH-coding mRNA in liver and kidney and the corresponding SDH protein isoform. Moreover, we determined the involvement of the saccharopine pathway in generating the neurotransmitter glutamate in the mammalian central nervous system, raising the question of whether lysine is important for brain development and functioning. The possible roles of the saccharopine pathway in glutamate synthesis in plant tissues were also discussed.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A via da sacaropina

Duas vias bioquímicas atuam na degradação do aminoácido **lisina** em eucariotos: a **via da sacaropina** e a via do ácido pipecólico. A primeira é predominante em eucariotos superiores multicelulares, como plantas e mamíferos, e sendo foco de estudo desta tese será descrita inicialmente.

A via da sacaropina consiste em uma via catabólica na qual, primeiramente, o aminoácido lisina é condensado com 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), reação catalisada pela atividade enzimática de lisina-2-oxoglutarato redutase (LOR, também conhecida como LKR ou sintetase do semialdeído do aminoadipato [AASS]; Fig. 1). A sacaropina é então convertida em δ -semialdeído do ácido α -aminoadípico (AASA) e ácido glutâmico. Esta etapa é realizada pela atividade de sacaropina desidrogenase (SDH; Fig. 1). O resultado líquido destas duas reações, em termos químicos, é a transferência do grupamento ε -amino da lisina para o 2-oxoglutarato. Posteriormente, AASA é convertido em ácido α -aminoadípico, que sofre nova transaminação, resultando na remoção do grupamento α -amino e na geração do α -cetoácido equivalente denominado ácido α -cetoadípico. Este é então conduzido por uma série de reações enzimáticas até a formação de acetil-CoA.

Existem variações na constituição da via da sacaropina nos diferentes eucariotos superiores, sendo a principal diferença o destino final do esqueleto de carbono da lisina: em mamíferos, está bem estabelecida a condução do esqueleto de carbono para a formação de corpos cetônicos no fígado, mas em outros tecidos destes organismos e em plantas os compostos finais da via ainda não foram determinados. Entretanto, os dois primeiros passos, catalisados pelas atividades de LOR e SDH, ocorrem em todos os eucariotos estudados até o momento e, constituindo o ponto central de investigação desta tese, serão analisados em detalhe nos próximos itens.

1.1.1 – A via da sacaropina em plantas

Sodek e Wilson (1970), através do fornecimento de ^{14}C -lisina a plantas de milho e trigo, demonstraram incorporação de radioatividade no ácido α -aminoadípico, indicando que a lisina é catabolizada predominantemente pela via da sacaropina no reino vegetal. A

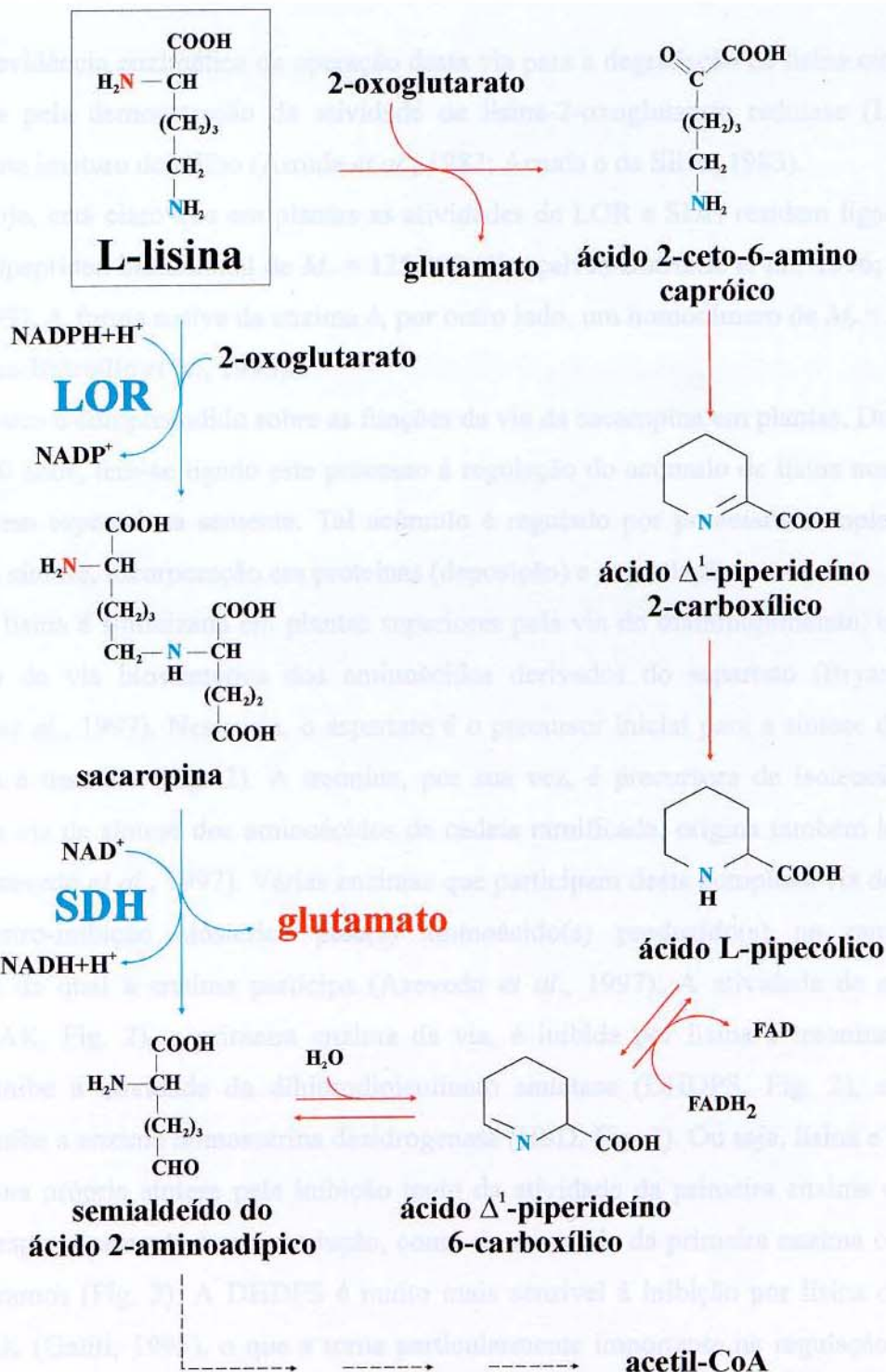


Figura 1: As vias de degradação de lisina em eucariotos superiores

As vias da sacaropina e do ácido pipecólico são as duas rotas para a degradação de lisina em animais e plantas. As reações específicas da via da sacaropina (em azul), catalisadas pelas atividades LOR e SDH, realizam a transferência do grupamento ϵ -amino (em azul) da lisina para o esqueleto do 2-oxoglutarato, gerando glutamato. Por outro lado, a via do ácido pipecólico (em vermelho) realiza a transferência do grupamento α -amino da lisina (em vermelho) para o 2-oxoglutarato, levando à produção de glutamato.

primeira evidência enzimática da operação desta via para a degradação de lisina em plantas foi obtida pela demonstração da atividade de lisina-2-oxoglutarato redutase (LOR) no endosperma imaturo de milho (Arruda *et al.*, 1982; Arruda e da Silva, 1983).

Hoje, está claro que em plantas as atividades de LOR e SDH residem ligadas num único polipeptídeo bifuncional de $M_r = 125.000$ (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996; Kemper *et al.*, 1999). A forma nativa da enzima é, por outro lado, um homodímero de $M_r = 260.000$ (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996).

Pouco é compreendido sobre as funções da via da sacaropina em plantas. Durante os últimos 20 anos, tem-se ligado este processo à regulação do acúmulo de lisina nos tecidos vegetais, em especial na semente. Tal acúmulo é regulado por processos complexos que envolvem síntese, incorporação em proteínas (deposição) e degradação.

A lisina é sintetizada em plantas superiores pela via do diaminopimelato, um ramo específico da via biossintética dos aminoácidos derivados do aspartato (Bryan, 1980; Azevedo *et al.*, 1997). Nesta via, o aspartato é o precursor inicial para a síntese de lisina, metionina e treonina (Fig. 2). A treonina, por sua vez, é precursora de isoleucina, que, através da via de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, origina também leucina e valina (Azevedo *et al.*, 1997). Várias enzimas que participam desta complexa via de síntese sofrem retro-inibição alostérica pelo(s) aminoácido(s) produzido(s) na ramificação específica da qual a enzima participa (Azevedo *et al.*, 1997). A atividade de aspartato quinase (AK, Fig. 2), a primeira enzima da via, é inibida por lisina e treonina. Lisina também inibe a atividade da dihidrodipicolinato sintetase (DHDPS, Fig. 2), enquanto treonina inibe a enzima homoserina desidrogenase (HSD, Fig. 2). Ou seja, lisina e treonina regulam sua própria síntese pela inibição tanto da atividade da primeira enzima do ramo que leva especificamente à sua produção, como da atividade da primeira enzima comum a todos os ramos (Fig. 2). A DHDPS é muito mais sensível à inibição por lisina do que a enzima AK (Galili, 1995), o que a torna particularmente importante na regulação fina da síntese de lisina.

Alguns estudos demonstraram que plantas mutantes de milho e cevada contendo AK insensível à retro-inibição por lisina superproduzem treonina mas exibem apenas aumentos pouco significativos no conteúdo de lisina (Bright *et al.*, 1982; Diedrick, 1990). Procurou-se então isolar mutantes contendo DHDPS insensível à inibição por lisina, resultando

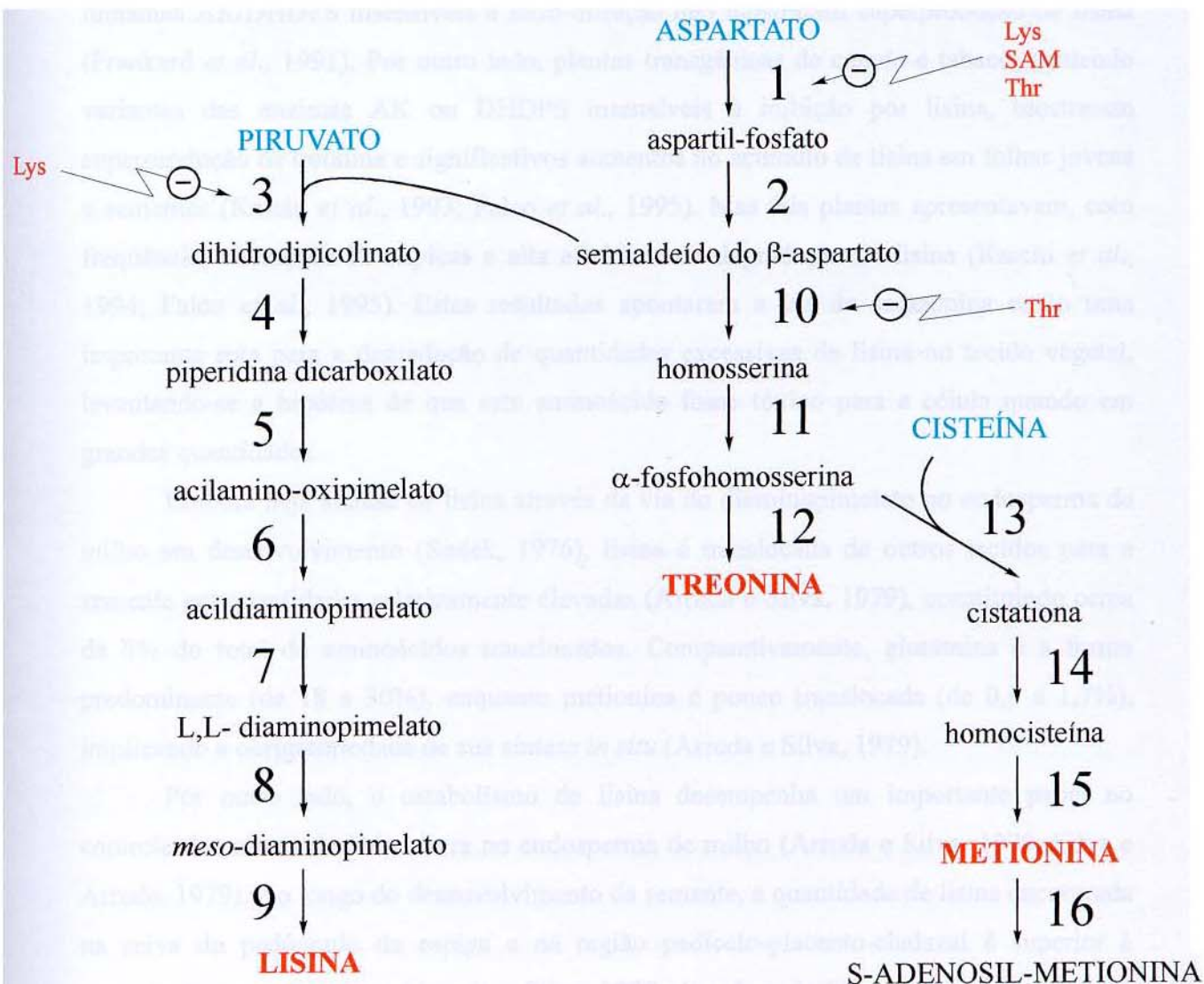


Figura 2: Via de síntese dos aminoácidos da família do aspartato em plantas.

Aminoácidos em azul indicam os compostos precursores. O símbolo $+$, acompanhado de uma seta apontando uma determinada enzima, indica que tal enzima é regulada por retroalimentação pelos compostos indicados ao lado da seta. Os números especificam as atividades enzimáticas: 1, aspartato quinase; 2, aspartato semialdeído desidrogenase; 3, dihidrodipicolinato sintetase; 4, dihidrodipicolinato redutase; 5, piperidina dicarboxilato acilase; 6, acildiaminopimelato aminotransferase; 7, acildiaminopimelato desacetilase; 8, diaminopimelato epimerase; 9, diaminopimelato descarboxilase; 10, homoserina desidrogenase; 11, homoserina quinase; 12, treonina sintetase; 13, cistationa γ -sintetase; 14, cistationa β -liase; 15, metionina sintetase; 16, S-adenosil-metionina sintetase (adaptado a partir de Azevedo *et al.*, 1997). Lys, lisina; Thr, treonina; SAM, S-adenosil-metionina.

também em pouco acúmulo deste aminoácido (Negruțiu *et al.*, 1994). Mesmo duplo-mutantes AK/DHDPS insensíveis a retro-inibição não mostraram superprodução de lisina (Frankard *et al.*, 1991). Por outro lado, plantas transgênicas de canola e tabaco, contendo variantes das enzimas AK ou DHDPS insensíveis à inibição por lisina, mostraram superprodução de treonina e significativos aumentos no acúmulo de lisina em folhas jovens e sementes (Karchi *et al.*, 1993; Falco *et al.*, 1995). Mas tais plantas apresentavam, com frequência, alterações fenotípicas e alta atividade de degradação de lisina (Karchi *et al.*, 1994; Falco *et al.*, 1995). Estes resultados apontaram a via da sacaropina como uma importante rota para a degradação de quantidades excessivas de lisina no tecido vegetal, levantando-se a hipótese de que este aminoácido fosse tóxico para a célula quando em grandes quantidades.

Embora haja síntese de lisina através da via do diaminopimelato no endosperma de milho em desenvolvimento (Sodek, 1976), lisina é translocada de outros tecidos para a semente em quantidades relativamente elevadas (Arruda e Silva, 1979), constituindo cerca de 5% do total de aminoácidos translocados. Comparativamente, glutamina é a forma predominante (de 18 a 30%), enquanto metionina é pouco translocada (de 0,8 a 1,7%), implicando a obrigatoriedade de sua síntese *in situ* (Arruda e Silva, 1979).

Por outro lado, o catabolismo de lisina desempenha um importante papel no controle dos níveis de lisina livre no endosperma de milho (Arruda e Silva, 1979; Silva e Arruda, 1979). Ao longo do desenvolvimento da semente, a quantidade de lisina encontrada na seiva do pedúnculo da espiga e na região pedicelo-placento-chalazal é superior à encontrada no endosperma (Arruda e Silva, 1979; Arruda e da Silva, 1983; Lyznik *et al.*, 1985). A quantidade de lisina translocada é aproximadamente duas a três vezes maior que a necessária para a síntese de proteínas (Arruda e da Silva, 1983), de modo que se esperaria um acúmulo de lisina livre no endosperma, o que não ocorre: o conteúdo de lisina é cerca de 1,5% do total de aminoácidos livres, condição que é mantida durante todo o desenvolvimento da semente (Arruda e da Silva, 1983). A quantidade de lisina livre no endosperma deveria, de fato, ser mantida baixa, uma vez que este aminoácido, em níveis elevados, inibiria a enzima AK, resultando em baixa produção de metionina. Considerando que metionina é pouco translocada para o endosperma, sua baixa produção poderia limitar a síntese de proteínas e ter efeitos seriamente adversos sobre o desenvolvimento do tecido.

Assim, para manter baixos os níveis de lisina livre, a degradação deste composto é necessária, o que tem sido proposto como uma das principais funções da via da sacaropina no endosperma de milho, em particular das atividades de LOR e SDH, altamente ativas neste tecido.

1.1.2 – A via da sacaropina em mamíferos

Em 1965, foi demonstrada a ocorrência da via da sacaropina no fígado de ratos pela determinação de que este órgão é capaz de realizar a conversão de lisina em sacaropina (Higashino *et al.*, 1965). Tal reação havia sido recentemente descoberta no reino Fungi (Turpin e Broquist, 1965; Jones e Broquist, 1965), operando, entretanto, no sentido inverso, para a síntese de lisina.

Em mamíferos, a via da sacaropina é utilizada para a degradação de lisina. Similarmente ao que ocorre em plantas, a lisina sofre uma redução seguida de uma desidrogenação, etapas catalisadas por enzimas LOR e SDH funcionalmente idênticas às encontradas no endosperma imaturo de milho (Higashino *et al.*, 1965; Hutzler e Dancis, 1968; Higashino *et al.*, 1971). O δ -semialdeído do ácido α -aminoadípico (AASA), produto destas reações, é então convertido em α -aminoadipato, o qual pode originar, após uma série de reações, acetil-CoA (Fig. 1).

Antes da publicação dos resultados apresentados nesta tese (Papes *et al.*, 1999), era ainda bastante controversa a hipótese de que, em mamíferos, as atividades de LOR e SDH residem em uma única unidade protéica bifuncional, como em plantas. Ao menos nos fígados bovino e de babuínos isto parecia ser verdadeiro, e a enzima bifuncional aí encontrada, denominada sintetase do semialdeído do ácido aminoadípico, foi descrita como um tetrâmero de $M_r = 460.000$ constituído de quatro subunidades idênticas de $M_r = 115.000$ (Markowitz *et al.*, 1984; Markowitz e Chuang, 1987). No fígado e na placenta humanos, os procedimentos cromatográficos padrão também não foram capazes de separar as duas atividades (Fjellstedt e Robinson, 1975a; Fjellstedt e Robinson, 1975b). Por outro lado, no fígado de ratos, dois polipeptídeos com atividades separadas de redutase e desidrogenase haviam sido descritos (Noda e Ichihara, 1978), sendo a enzima redutase um tetrâmero composto de polipeptídeos monofuncionais de 52.000 Da. Foi levantada a possibilidade de que estes resultados se deviam ao método de purificação empregado por Noda e Ichihara,

que poderia favorecer a separação dos domínios de LOR e SDH da proteína nativa, tal como havia sido observado para outras enzimas bifuncionais [UMP sintetase humana (Brown e O'Sullivan, 1977) e ácido graxo sintetase de leveduras (Lynen, 1964)].

A função da degradação de lisina pela via da sacaropina em mamíferos ainda não está totalmente elucidada, especialmente porque a via ocorre em diversos tecidos e órgãos, nos quais ela pode apresentar funções específicas. Tanto em humanos como em ratos e camundongos, as atividades enzimáticas de LOR e SDH estão presentes conspicuamente no fígado, rim e coração e, em menor quantidade, na pele, cérebro, placenta e glândulas endócrinas em geral (Hutzler e Dancis, 1968; Higashino *et al.*, 1971; Hutzler e Dancis, 1975; Fjellstedt e Robinson, 1975a; Rao *et al.*, 1992). Inferências sobre a função de LOR e SDH só têm sido feitas para o fígado, sobre o qual uma maior quantidade de dados foi acumulada. A degradação de lisina parece ser ativada nos hepatócitos sempre que ocorre um excesso na ingestão deste aminoácido essencial ou durante períodos de jejum prolongado (Scislowski *et al.*, 1994). Neste último caso, a degradação de lisina pela via da sacaropina vem acompanhada do acionamento das vias gliconeogênica e cetogênica, através das quais o glutamato e a acetil-CoA resultantes do catabolismo de lisina são, respectivamente, canalizados para a produção de glicose e corpos cetônicos (Voet e Voet, 1990). Estes compostos podem então suprir as demandas metabólicas de órgãos sensíveis aos níveis glicêmicos, como o cérebro. Deste modo, a via da sacaropina teria um papel tanto catabólico, visando à degradação do aminoácido lisina, como anabólico, visando à canalização do esqueleto de carbono deste aminoácido para a produção de compostos energéticos do metabolismo de carboidratos (glicose e corpos cetônicos).

Aspectos funcionais da via da sacaropina em mamíferos constituíram o foco central de estudo desta tese, especialmente no fígado e no rim (artigo nº 1: Papes *et al.*, 1999) e no cérebro (artigo nº 2: Papes *et al.*, 2001) e serão discutidos posteriormente.

1.1.3 – A via da sacaropina no reino Fungi

Em leveduras, conforme citado anteriormente, a via da sacaropina é utilizada no sentido inverso ao que ocorre em eucariotos superiores, para a biossíntese de lisina, sendo as duas últimas etapas catalisadas por enzimas equivalentes à LOR e à SDH de plantas e mamíferos, mas claramente associadas a dois polipeptídeos distintos de $M_r = 49.000$ e

73.000 (Jones e Broquist, 1965), codificados respectivamente pelos genes *Lys1* e *Lys9* (Ramos *et al.*, 1988). A razão para a existência de dois monômeros ao invés de um único polipeptídeo como em plantas e mamíferos é pouco compreendida até o momento unicamente à luz das propriedades bioquímico-fisiológicas destas enzimas.

1.2 – A via do ácido pipecólico

Hutzler e Dancis (1968), Higashino *et al.* (1971) e Chang (1976) detectaram pouca ou nenhuma formação de sacaropina a partir de ^{14}C -lisina no cérebro de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo*, levando à conclusão de que a via da sacaropina deveria ser minoritária no sistema nervoso, o que foi corroborado posteriormente pela demonstração da baixa atividade de LOR no cérebro humano (Hutzler e Dancis, 1975). Estes resultados abriram a possibilidade de que a degradação de lisina no tecido nervoso fosse realizada por outra via ainda desconhecida. Estudos examinando incorporação de radioatividade em catabólitos a partir de ^{14}C -lisina demonstraram que o ácido pipecólico, composto que havia sido descrito anteriormente como catabólito em plantas e no fígado do rato (Zacharias *et al.*, 1952; Rothstein e Miller, 1953), é um importante produto da degradação de lisina no cérebro (Chang, 1976). A partir de então, a via do ácido pipecólico tem sido considerada a única via degradativa importante para o catabolismo de lisina no sistema nervoso.

Embora tenha sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* a formação de ácido pipecólico a partir de lisina no tecido nervoso (Chang, 1976; Chang, 1978; Schmidt-Glenewinkel, 1977; Giacobini *et al.*, 1980), até o presente pouco avanço foi obtido rumo à identificação e ao isolamento das atividades enzimáticas envolvidas.

Na via do ácido pipecólico, as duas primeiras reações da via da sacaropina, catalisadas por LOR e SDH, são substituídas por reações que levam à formação de ácido pipecólico como intermediário, o qual é posteriormente degradado a semialdeído do ácido aminoadípico (Fig. 1). A partir deste ponto, as duas vias compartilham as demais reações, que levam à conversão deste semialdeído em acetil-CoA. Em termos químicos, o resultado destas reações é a transferência do grupamento α -amino da lisina para o esqueleto de carbono do 2-oxoglutarato, com consequente formação de glutamato, caracterizando uma reação clássica de transaminação (Fig. 1). A diferença fundamental em relação à via da

sacaropina é que, nesta última, ocorre primeiramente a transferência do grupamento ϵ -amino da lisina para o esqueleto do 2-oxoglutarato (Fig. 1).

Tem sido sugerido que o ácido pipecólico apresenta algum papel fisiológico no sistema nervoso além de ser um catabólito de lisina (Giacobini *et al.*, 1980). Uma das evidências para esta inferência é a de que foi descrito um sistema de transporte específico para ácido pipecólico na membrana de terminações sinápticas isoladas de cérebros de camundongo (Nomura *et al.*, 1980). Além disso, existe liberação de ácido pipecólico de terminações sinápticas isoladas (sinaptossomos) após indução com alta concentração de potássio, num processo dependente de cálcio, imitando a liberação de um neurotransmissor (Nomura *et al.*, 1979). Outra linha de evidências vem do estudo de pacientes humanos com alto conteúdo de ácido pipecólico circulante nos fluidos corporais (hiperpipecolatemia), que normalmente apresentam quadros clínicos envolvendo sérios distúrbios neurológicos progressivos, retardamento mental e malformação do sistema nervoso (Gatfield *et al.*, 1968).

A detecção de baixa quantidade de sacaropina em extratos de cérebro de mamíferos (Chang, 1976) não constitui evidência, entretanto, de que a via da sacaropina seja de fato minoritária no sistema nervoso, uma vez que mesmo no fígado, onde tal via é comprovadamente ativa e majoritária, a concentração de sacaropina é muito baixa e comumente não-detectável (Higashino *et al.*, 1971). Uma explicação para os resultados obtidos por Chang (1976) é o fato de que as enzimas LOR e SDH são unidas fisicamente em um único polipeptídeo bifuncional, o qual poderia rápida e eficientemente converter lisina em semialdeído do ácido aminoadípico, liberando apenas pequena quantidade do intermediário sacaropina no meio de reação. Mesmo a baixa atividade de LOR detectada no cérebro humano (Hutzler e Dancis, 1975) não pode ser tomada como evidência a favor de uma participação menos importante da via da sacaropina no sistema nervoso, já que as propriedades da forma enzimática cerebral podem diferir das da forma hepática, com base na qual todos os testes de dosagem enzimática foram realizados. Os resultados descritos na presente tese apontam para uma participação muito mais efetiva da via da sacaropina no sistema nervoso do que se pensava e sugerem um importante papel para esta via na síntese do neurotransmissor glutamato, como será detalhado posteriormente.

1.3 – A enzima LOR/SDH: propriedades enzimáticas, localização subcelular e ativação por cálcio e fosforilação

As enzimas LOR e SDH (ou LOR/SDH) de plantas, mamíferos, leveduras e fungos compartilham muitas propriedades, entre elas os valores de pH ótimos de atuação, neutro para LOR e básico para SDH (Higashino *et al.*, 1971; Hutzler e Dancis, 1975; Fjellstedt e Robinson, 1975b; Arruda *et al.*, 1982; Brochetto-Braga *et al.*, 1992). Por outro lado, os cofatores requeridos pelas enzimas diferem nos vários reinos. Em leveduras, a atividade de LOR, também conhecida como sacaropina desidrogenase-formadora de lisina, requer NAD^+ como cofator (Jones e Broquist, 1965), enquanto em plantas e mamíferos NADPH é fortemente preferido (Hutzler e Dancis, 1975; Fjellstedt e Robinson, 1975a; Arruda *et al.*, 1982), sendo a atividade da enzima de placenta humana reduzida a 9% quando NADH é utilizado ao invés de NADPH (Fjellstedt e Robinson, 1975a). Por outro lado, a atividade de SDH, também conhecida como sacaropina desidrogenase-formadora de glutamato em leveduras, requer NAD^+ em eucariotos superiores (Fjellstedt e Robinson, 1975b; Arruda *et al.*, 1982) e NADPH no reino Fungi (Jones e Broquist, 1965).

Tanto em mamíferos como em plantas, as atividades de LOR e SDH residem num mesmo polipeptídeo, mas em domínios separados, capazes de funcionar independentemente, segundo determinado por experimentos de proteólise limitada (Markowitz e Chuang, 1987; Gonçalves-Butruile *et al.*, 1996; Kemper *et al.*, 1998). O polipeptídeo de plantas é ligeiramente maior do que o de mamíferos e hoje está claro que isto se deve a uma pequena região entre os domínios LOR e SDH que está ausente na proteína de animais (Tang *et al.*, 1997; Epelbaum *et al.*, 1997; Kemper *et al.*, 1999). Esta região provavelmente está envolvida com a regulação do domínio LOR (Kemper *et al.*, 1998) e com as propriedades de ativação por cálcio da proteína LOR/SDH de plantas (Kemper *et al.*, 2000).

Em mamíferos, as atividades de LOR e SDH foram associadas às mitocôndrias dos hepatócitos (Higashino *et al.*, 1965; Fellows e Lewis, 1973; Blemings *et al.*, 1994; Papes *et al.*, 1999), em especial à fração que contém as enzimas da matriz mitocondrial. Até recentemente, não havia sido determinada a localização subcelular da enzima LOR/SDH de plantas, mas agora está claro que o polipeptídeo bifuncional se localiza no compartimento citossólico (Kemper *et al.*, 1999).

Muitos aspectos das propriedades regulatórias das enzimas LOR/SDH diferem entre os organismos estudados, como a capacidade de sofrer modulação/ativação após interação direta com cálcio. A enzima de plantas é claramente ativada por cálcio, o que foi tanto observado *in vitro*, com a enzima de *Zea mays* (Kemper *et al.*, 1998), como *in vivo*, após injeção de Ca^{2+} em sementes de tabaco em desenvolvimento (Karchi *et al.*, 1995). Além disso, apenas a atividade de redutase da enzima bifuncional LOR/SDH é de fato ativada por Ca^{2+} em milho (Kemper *et al.*, 1998). Recentemente, mostrou-se que o cálcio está envolvido indiretamente com a ativação da atividade de LOR, uma vez que ele induz a dimerização da enzima bifuncional e, com isso, a atividade de LOR (Kemper *et al.*, 2000).

Em mamíferos, os dados ainda não são conclusivos, mas pelo menos a enzima LOR/SDH de fígado bovino não interage diretamente com Ca^{2+} em experimentos *in vitro* (Kemper *et al.*, 1998). Entretanto, foi detectado aumento das atividades de LOR murina e bovina *in vivo* após tratamento com glucagon (Rao *et al.*, 1992), um hormônio pancreático que leva a incrementos nas concentrações citoplasmática e intra-mitochondrial de Ca^{2+} (Denton e McCormack, 1988; Pozzan *et al.*, 1994). Outras três enzimas da matriz mitochondrial de vertebrados são ativadas por cálcio: duas delas, NAD^+ -isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase, são ativadas diretamente (McCormack e Denton, 1979; Denton *et al.*, 1978), tal como a enzima LOR/SDH de milho; a terceira, piruvato desidrogenase, é ativada indiretamente, já que o Ca^{2+} age sobre uma fosfatase que regula o estado de fosforilação da desidrogenase (Denton *et al.*, 1972). Este resultado pode ser uma resposta para o aparente paradoxo entre falta de ativação por cálcio e ativação por glucagon da enzima LOR/SDH de fígado bovino. Ou seja, a influência do cálcio sobre a enzima pode não ser direta, mas sobre proteínas quinases e/ou fosfatases capazes de modular sua atividade.

Além de cálcio, recentemente foi mostrado que a atividade de LOR em sementes de tabaco é regulada por uma cascata de sinalização intracelular que envolve fosforilação (Karchi *et al.*, 1995). Dados obtidos em nosso laboratório sugerem que a enzima de milho também é regulada pós-traducionalmente por fosforilação/desfosforilação (Kemper *et al.*, 2000). A fosforilação da enzima de milho leva à ativação do domínio LOR, num processo dependente de lisina. Além disso, mostrou-se que o perfil de fosforilação da enzima LOR/SDH está alterado no endosperma *opaco2* (Kemper *et al.*, 2000), sugerindo que

mecanismos pós-traducionais possam estar participando da redução das atividades de LOR e SDH encontradas neste genótipo mutante (item 1.4.1).

1.4 – Regulação da via da sacaropina

As reações catalisadas pelas atividades de LOR e SDH são as primeiras do catabolismo de lisina pela via da sacaropina. Assim, tem sido dada muita ênfase ao seu estudo, já que o controle da taxa de degradação de lisina pode recair sobre estes passos iniciais da via. De fato, este parece ser o caso tanto em mamíferos como em plantas, leveduras e fungos.

1.4.1 – Em plantas

Em plantas, tem sido sugerido que a modulação da atividade de LOR/SDH seja realmente o fator limitante no processo de degradação de lisina (Karchi *et al.*, 1994). Plantas transgênicas de tabaco que superexpressam, de modo específico na semente, genes bacterianos de duas enzimas da biossíntese de lisina, DHDPS (dihidrodipicolinato sintetase) e AK (aspartato quinase), insensíveis a retro-inibição por lisina, produzem mais deste aminoácido na semente; entretanto, não ocorre acúmulo de lisina e as plantas apresentam maior atividade de LOR (Karchi *et al.*, 1994). Isto é, um excesso na produção de lisina na semente parece levar a uma indução do seu catabolismo pelo aumento da atividade de LOR. O mesmo ocorre se lisina for injetada na semente (Karchi *et al.*, 1994). Não se sabe até o momento se este efeito é devido a uma regulação da atividade da enzima *per se* e/ou se ele é decorrente de alterações na taxa de transcrição do gene que codifica LOR/SDH, mas os dados obtidos por nosso grupo com relação ao envolvimento de lisina e fosforilação na ativação de LOR em milho apontam o primeiro mecanismo como o mais plausível (Kemper *et al.*, 2000).

Outra evidência de que os níveis de lisina controlam sua própria degradação agindo sobre LOR/SDH vem do estudo do desenvolvimento do endosperma de milho. Durante este processo, conforme dito anteriormente, lisina é translocada de outros tecidos para o endosperma imaturo (Arruda e Silva, 1979); entretanto, uma vez que as zeínas, as principais proteínas do endosperma, não contêm resíduos de lisina (Dalby e Tsai, 1975), a demanda por este aminoácido deve ser baixa neste tecido. Esperar-se-ia que um excesso de lisina fosse acumulado no endosperma, o que não é o caso, posto que seus níveis são

mantidos baixos durante todo o desenvolvimento (Arruda e da Silva, 1983). Além disso, níveis excessivos de lisina no endosperma resultariam em inibição da AK, diminuindo a produção de metionina e prejudicando a síntese protéica, conforme descrito no item 1.1.1. À semelhança do que ocorre na semente de tabaco, o suprimento excessivo de lisina é acompanhado de elevação nas atividades de LOR e SDH: estas apresentam um padrão durante o desenvolvimento, surgindo e aumentando no endosperma imaturo, atingindo um pico em estágios intermediários e diminuindo à medida que o tecido chega à maturidade (Brochetto-Braga *et al.*, 1992; Arruda *et al.*, 1982; Kemper *et al.*, 1999).

O padrão de atividade de LOR no endosperma de milho é claramente paralelo ao padrão de acúmulo de zeínas (Shewry e Tatham, 1990). Os mecanismos que controlam a expressão das proteínas de reserva são bastante compreendidos e um dos pontos mais relevantes é que esta regulação é executada no nível transcricional (Kodrzycki *et al.*, 1989; Higgins, 1984). O gene *Opaco2* (*O2*) de milho foi o primeiro gene regulatório implicado no controle da expressão dos genes de proteínas de reserva. Ele codifica um fator específico de transcrição que possui um domínio básico do tipo 'zíper de leucina' (classe b-Zip) capaz de interagir com a porção regulatória de um subconjunto dos genes de zeínas (Schmidt *et al.*, 1990; Hartings *et al.*, 1989). Mutações no locus *Opaco2* (mutações *o2*) resultam em diversas alterações no desenvolvimento do endosperma, levando a uma redução geral de 50% a 70% no conteúdo de zeínas (Kodrzycki *et al.*, 1989).

Esta mutação também acarreta alterações no metabolismo de lisina. Desde sua descoberta, a mutação *o2* tem sido associada a uma maior porcentagem de lisina no endosperma (Mertz *et al.*, 1964), a qual é influenciada por dois componentes: o conteúdo de lisina livre e o conteúdo incorporado em proteínas não-zeínas. A maior parte da lisina provém destas proteínas não-zeínas: as albuminas, globulinas e glutelinas (Murphy e Dalby, 1971). Sabe-se hoje que muitas destas proteínas aumentam em quantidade no endosperma *o2*, mas não se determinou se este é um efeito direto da falta do fator de transcrição *Opaco2* ou decorrente de efeitos pleiotrópicos da mutação, em virtude da maior disponibilidade de lisina ou de outras alterações no balanço de nitrogênio no endosperma. De qualquer modo, não se poderia explicar o nível aumentado de lisina livre no endosperma *o2*, considerando a presença das atividades de LOR e SDH capazes de catabolizar este excesso. Na verdade, lisina é menos degradada no endosperma *o2*: Sodek e

Wilson (1970) e Brochetto-Braga *et al.* (1992) demonstraram que, no mutante, a atividade de LOR é duas a três vezes menor do que no milho normal. Estes dados apontam para um mecanismo de regulação comum entre o desenvolvimento do endosperma, a síntese das proteínas de reserva e a degradação de lisina, ou seja, uma regulação coordenada entre os metabolismos de carbono e nitrogênio na semente imatura. De fato, recentemente foi demonstrado o envolvimento do fator Opaco2 na regulação da transcrição do gene que codifica LOR/SDH em milho (Kemper *et al.*, 1999).

1.4.2 – Em mamíferos

Em mamíferos, o panorama é similar ao encontrado em plantas: uma concentração excessiva de lisina no organismo, decorrente da ingestão elevada de proteínas ou da aplicação exógena de lisina ao animal, leva a aumento na atividade de LOR/SDH (Foster *et al.*, 1993; Scislowski *et al.*, 1994; Blemings *et al.*, 1998). Ainda não é compreendido no momento se este efeito se dá em parte por modulação pós-traducional da atividade da proteína, mas os resultados descritos nesta tese apontam claramente para mecanismos transcricionais atuando neste caso (artigo nº 1: Papes *et al.*, 1999).

Grande parte dos estudos com as atividades de LOR e SDH em mamíferos focalizou a forma enzimática encontrada no fígado, especialmente no rato e no homem, dando-se ênfase ao papel metabólico do catabolismo de lisina na manutenção da homeostase do organismo. A localização das atividades de LOR e SDH nos hepatócitos (Higashino *et al.*, 1965; Hutzler e Dancis, 1975; Markowitz *et al.*, 1984) é condizente com a integração entre o catabolismo de lisina e as vias gliconeogênica e cetogênica. De fato, vários autores detectaram, em ratos, claros efeitos indutivos do hormônio hiperglicemiante glucagon e de glicocorticóides sobre a atividade de LOR hepática (Shinno *et al.*, 1980; Rao *et al.*, 1992). Os resultados apresentados nesta tese (Papes *et al.*, 1999) indicam integração entre a degradação de lisina e o metabolismo energético no organismo em jejum, corroborando as observações destacadas acima.

Até o momento, não há dados sobre possíveis fatores de transcrição que possam estar envolvidos na regulação da transcrição dos genes da via da sacaropina em animais, em especial do gene que codifica LOR/SDH. Entretanto, como será discutido no item 3, análises comparativas acuradas da estrutura dos genes *Lor/Sdh* murino e humano

futuramente lançarão luz sobre fatores *cis*- e *trans*-regulatórios atuando no controle da degradação de lisina.

1.4.3 – Em leveduras

Têm sido encontrados dois tipos de eventos regulatórios atuando sobre os genes das enzimas da via da sacaropina em leveduras e fungos (Hinnesbuch, 1988). O primeiro envolve o chamado ‘controle geral’ (GCN) da biossíntese de aminoácidos, em que ocorre uma derrepressão dos genes das enzimas envolvidas no metabolismo de lisina como resultado da falta de lisina ou de outros aminoácidos (Hinnesbuch, 1988). Hoje, sabe-se que tal regulação transcricional sobre os genes das enzimas da via da sacaropina depende do fator transativador GCN4, que reconhece elementos *cis*-regulatórios no promotor daqueles genes (Hinnesbuch, 1988).

A importância deste sistema de regulação de leveduras é que ele mostra semelhanças com os sistemas descritos em plantas. Recentemente, Mauri *et al.* (1993) demonstraram a capacidade de o fator Opaco2 de milho complementar a mutação *gcn4* em leveduras. Ambas as proteínas, Opaco2 e GCN4, são fatores transcricionais do tipo ‘zíper de leucina’ (classe b-Zip), capazes de transativar uma série de genes relacionados (Hinnesbuch, 1988; Hartings *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1990). Assim, fica claro que ambos os transativadores são funcionalmente equivalentes, de alguma forma envolvidos no controle do metabolismo de lisina.

Além deste ‘controle geral’ sobre a via da sacaropina em leveduras, existe uma regulação mais específica, dependente apenas dos metabólitos da via. Este controle é exercido sobre vários genes, em especial sobre os genes *Lys1* e *Lys9*, que codificam as enzimas LOR e SDH (Ramos *et al.*, 1988). O elemento central deste sistema é o fator transativador da classe Zn(II)₂Cys₆ codificado pelo gene *Lys14*, que regula a expressão dos dois genes acima sob indução do δ -semialdeído do ácido α -aminoadípico (Feller *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1988). Ainda não foi determinado se existe em plantas ou mamíferos um sistema de controle da degradação de lisina envolvendo fatores homólogos a *Lys14* capazes de regular a transcrição do gene *Lor/Sdh* e, conseqüentemente, as atividades de LOR e SDH.

1.5 – Hiperlisinemias

No homem, defeitos no funcionamento da via da sacaropina estão associados a doenças hereditárias humanas caracterizadas por acentuada hiperlisinemia (alta concentração de lisina circulante nos fluidos corporais, em especial no plasma). O primeiro caso desta doença foi descrito em 1964 (Woody, 1964) como resultado de uma seleção realizada em pacientes de uma clínica psiquiátrica em busca de anomalias bioquímicas plasmáticas e urinárias. Dancis *et al.* (1969) foram pioneiros ao relacionar o estado hiperlisinêmico, presente então em 10 casos relatados, com uma deficiência severa na atividade da recém-descrita LOR. Comumente, mas não sempre, tal sintoma bioquímico vinha acompanhado de severo retardamento mental e distúrbios neurológicos de vários tipos (Woody, 1964; Woody *et al.*, 1966; Ghadimi *et al.*, 1967; Armstrong e Rabinow, 1967; Woody *et al.*, 1967; Carson *et al.*, 1968; Dancis *et al.*, 1969; Dancis *et al.*, 1976; Yiannikas e Cordato, 1996).

Mais tarde ficou claro que em muitos dos casos descritos havia também uma grave deficiência nas atividades de SDH e sacaropina oxidorreductase e um quadro bioquímico em que apareciam conjuntamente hiperlisinemia, hiperlisinúria e sacaropinúria (Dancis *et al.*, 1976; Cederbaum *et al.*, 1979; Dancis *et al.*, 1979). Outros casos eram caracterizados apenas por sacaropinúria e atividade de SDH baixa ou virtualmente nula, mas atividade considerável de LOR (Carson *et al.*, 1968; Fellows e Carson, 1974), levantando a possibilidade de que se tratassem de duas doenças genéticas distintas. Dancis *et al.* (1979) sugeriram a terminologia a seguir para a diferenciação dos dois casos: a hiperlisinemia familiar do tipo I (HF1) é associada a uma deficiência combinada nas atividades das duas enzimas, lisina-oxoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase; já os portadores de hiperlisinemia familiar do tipo II (HF2) possuem apenas a atividade de SDH afetada.

Os resultados apresentados nesta tese (artigo nº 1: Papes *et al.*, 1999) quanto à caracterização molecular da enzima bifuncional LOR/SDH e do gene que a codifica estabeleceram as bases para o entendimento aprofundado destas doenças genéticas e de sua etiologia. É provável que na HF1 exista um defeito no polipeptídeo bifuncional LOR/SDH que resulta na perda de ambas as atividades ou uma deficiência na transcrição do gene que o codifica. Por outro lado, na HF2 é plausível que haja uma alteração apenas no domínio SDH da proteína bifuncional, sem comprometer a atividade de LOR.

1.6 – O glutamato

Diferentes evidências têm sugerido que a via da sacaropina desempenha importantes papéis além de levar à degradação de lisina (Cord-Neto, 1998; Kemper, 1999; Arruda *et al.*, 2000). O artigo nº 2, apresentado nesta tese (Papes *et al.*, 2001), analisa um destes papéis, a saber, a geração de glutamato no sistema nervoso central de mamíferos a partir de lisina. O estudo deste aspecto funcional, que envolve as atividades de LOR e SDH, foi um dos focos desta tese e será discutido oportunamente. Serão detalhadas a seguir, de forma introdutória, algumas características químicas, bioquímicas e funcionais da molécula de glutamato.

Nos parágrafos seguintes e na discussão geral (item 3), os termos glutamato e ácido glutâmico serão utilizados indistinta e intercambiavelmente, apesar da clara diferença quanto às espécies moleculares a que se referem.

1.6.1 – A molécula de glutamato

O glutamato é um dos aminoácidos mais abundantes na natureza e também um dos mais importantes tendo em vista sua participação em processos biológicos tão diversos como neurotransmissão, catálise enzimática, síntese protéica e transporte de nitrogênio (Young e Ajami, 2000). Em animais e plantas, a quantidade de glutamato é extremamente alta (Giacometti, 1979) e, na forma livre, é extremamente abundante em muitos alimentos, especialmente no tomate e em uma variedade de frutas (Giacometti, 1979). É também o principal ânion livre em *Escherichia coli*, onde serve como nutriente e osmólito (Cayley *et al.*, 1991). Alguns dos receptores de glutamato (metabotrópicos, item 1.6.3) utilizados em neurotransmissão no sistema nervoso central de mamíferos apresentam similaridade com proteínas bacterianas periplasmáticas envolvidas na captação de nutrientes (Stern-Boch *et al.*, 1994), sugerindo que o glutamato parece ter preservado múltiplos papéis durante o processo evolutivo, como nutriente, como mediador em sítios catalíticos e como molécula excitatória envolvida na comunicação célula-célula. Observações como esta reforçam teorias sobre a origem dos diferentes papéis que o glutamato assumiu nos vários reinos, mas não explica porque este aminoácido é tão abundante em sistemas biológicos.

Inferese-se que sua prevalência se deve às propriedades químicas versáteis da molécula de glutamato em si (Young e Ajami, 2000). O número ímpar de átomos de carbono diferencia o glutamato de seus homólogos, o ácido aminoadípico e o aspartato. Isto

orienta os grupamentos carboxila e amino em diferentes planos na molécula. No caso do glutamato, os átomos de oxigênio formam uma cavidade mais estreita do que nos outros dois ácidos dicarboxílicos, contribuindo para melhor solvatação e interação coordenada com cátions. Além disso, a molécula de glutamato possui um grupamento metileno adicional em relação ao aspartato, que lhe confere maior hidrofobicidade quando as carboxilas estão protonadas. Por outro lado, quando estes grupamentos estão desprotonados, sua hidrofiliabilidade é cerca de cinco vezes maior do que a da molécula de aspartato, de modo que o glutamato assume um caráter anfifílico único entre os aminoácidos polares (Young e Ajami, 2000).

A reatividade do glutamato também é bastante peculiar e distinta da dos demais aminoácidos, em especial da de seus homólogos aspartato e aminoadipato. Por exemplo, a estrutura de cinco carbonos da molécula de glutamato permite a formação de equilíbrios tautoméricos ceto-enólicos nas carboxilas, com concomitante compartilhamento de elétrons nas ligações entre os carbonos 2 e 3 e entre os carbonos 4 e 5, tornando a molécula muito reativa nestas posições (Young e Ajami, 2000). Esta configuração não é possível na molécula de aspartato, porque a proximidade das carboxilas (separadas por apenas 3 ligações carbono-carbono) impede a manutenção de estados de compartilhamento eletrônico no caso de uma tautomerização ceto-enólica (Young e Ajami, 2000). O carbono 2 é, então, muito mais reativo do que no aspartato, permitindo a ocorrência de reações de descarboxilação na posição 1 (formação de ácido 4-aminobutírico ou GABA), desaminação (formação de 2-oxoglutarato) e transaminação. O carbono 4 também é mais reativo, permitindo reações de carboxilação nesta posição (formação de resíduos de carboxiglutamato em proteínas dependentes de vitamina K) e reações de alquilação para a formação de compostos naturais alquilados derivados de glutamato (Young e Ajami, 2000). E por fim, o carbono 5 apresenta reatividade alta, permitindo a ocorrência de reações que levam à formação de ornitina e prolina. Tais propriedades de reatividade apresentadas por três de seus cinco carbonos tornam a molécula de glutamato especial e distinta dos demais aminoácidos polares encontrados em sistemas biológicos, o que pode ter sido um dos fatores que contribuiu para que este composto assumisse uma abundância ímpar na natureza (Young e Ajami, 2000).

1.6.2 – Ingestão de glutamato e sua participação na gustação

O ácido glutâmico é um aminoácido presente na maioria dos alimentos, seja na forma livre ou como parte de peptídeos e proteínas (Garattini, 2000). Um homem adulto de 70 kg tem uma ingestão diária de 28 g de glutamato, provenientes do alimento e da quebra de proteínas componentes do próprio sistema digestivo (Munro, 1979; Garattini, 2000). O 'turnover' diário de glutamato é de cerca de 48 g, embora a massa total deste composto circulante no plasma seja de apenas 20 mg, devido à sua rápida remoção do sistema sanguíneo e utilização pelos tecidos e órgãos, em especial pelo fígado e pelo músculo (Garattini, 2000). Nestes locais, o glutamato é utilizado para a síntese protéica e para a obtenção de energia, após conversão em alanina, glicose e lactato (Stegink *et al.*, 1979).

Na década de 70, estudos psicométricos estabeleceram que o glutamato, em especial seu sal monossódico, amplamente utilizado como condimento intensificador de sabor na alimentação humana, está associado à uma sensação gustativa única e distinta das demais sensações básicas (salgado, doce, azedo, amargo), denominada "umami" (Yamaguchi e Kimizuka, 1979). A percepção desta quinta sensação é encontrada também em canídeos e em algumas linhagens de camundongos, mas não em ratos (Kurihara e Kashiwayanagi, 2000). Dois mecanismos moleculares parecem estar envolvidos na codificação da sensação "umami": um envolve receptores iônicos de glutamato do tipo NMDA, semelhantes aos encontrados em sinapses no sistema nervoso; o outro envolve receptores do tipo metabotrópico mGluR₄, que utiliza IP₃ e cAMP como segundo-mensageiros intracelulares (Brand, 2000; Dingledine e Jeffrey Conn, 2000).

1.6.3 – Propriedades biológicas do glutamato no sistema nervoso

O glutamato é não somente o aminoácido mais abundante em sistemas biológicos, mas é particularmente abundante no sistema nervoso de animais (Young e Ajami, 2000). A ação excitatória do glutamato no cérebro de mamíferos e na medula espinhal é conhecida há 50 anos (Hayashi, 1952), mas apenas na década de 70 ele foi reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de vertebrados (Meldrum, 2000). Os neurotransmissores, a 'linguagem' para a transferência de informações entre neurônios, são liberados de um terminal pré-sináptico para uma fenda sináptica, onde se difundem até alcançar a célula pós-sináptica. Foi proposto que o glutamato age na célula pós-sináptica

sobre três famílias distintas de receptores, nomeados a partir de seus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) e cainato (revisados por Ozawa *et al.*, 1998; Meldrum, 2000). Todos estes receptores compreendem canais iônicos multiméricos permeáveis a cátions, embora a permeabilidade relativa a Ca^{2+} e Na^+ varie de acordo com a composição de subunidades do receptor (Ozawa *et al.*, 1998; Meldrum, 2000). Mais recentemente, foi proposto que há também receptores do tipo metabotrópico, ligados a proteína G, operando através de mensageiros secundários no interior da célula pós-sináptica ou pela modulação da dinâmica de canais iônicos na membrana desta célula (Ozawa *et al.*, 1998; Meldrum, 2000).

O glutamato é liberado das vesículas de neurotransmissor nos terminais pré-sinápticos por um mecanismo dependente de Ca^{2+} (Birbaumer *et al.*, 1994; Fillenz, 1995). A concentração de glutamato no interior de uma vesícula sináptica é de aproximadamente 100 mM e a liberação de uma única destas unidades na fenda sináptica é capaz de induzir a formação de um potencial de membrana excitatório na célula pós-sináptica (Meldrum, 2000). A liberação do conteúdo das vesículas é regulado por uma grande variedade de receptores na célula pré-sináptica, incluindo receptores de glutamato do tipo metabotrópico, receptores de acetilcolina, receptores de peptídeos opióides, de ácido 4-aminobutírico (GABA), de colecistoquinina e de neuropeptídeo Y (Meldrum, 1998; Meldrum, 2000).

Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato pode atuar na célula pós-sináptica sobre os receptores descritos anteriormente e depois ser recaptado por transportadores específicos. Cinco tipos de transportadores de glutamato foram descritos até o momento no sistema nervoso central de mamíferos (Seal e Amara, 1999; Attwell, 2000). Dois são expressos predominantemente na glia e os demais são específicos de neurônios. Todos são dependentes de Na^+ , sendo de fato ativados pelos gradientes de sódio e potássio na membrana da célula (Seal e Amara, 1999; Attwell, 2000). Os transportadores de glutamato gliais são mais eficientes do que os neuronais, levando à idéia de que a maior parte do glutamato liberado na fenda sináptica durante a neurotransmissão é recaptada pela glia, em especial pelos astrócitos (Clements *et al.*, 1992). O transporte de glutamato para dentro da vesícula sináptica segue uma dinâmica completamente diferente, sendo altamente específico para glutamato (ao contrário dos canais da membrana citoplasmática, que podem também transportar aspartato) e dependente de um gradiente de prótons (Meldrum, 2000).

O glutamato é de particular interesse em estudos neurobiológicos uma vez que ele está envolvido em traumas excitatórios neurotóxicos e em processos neurodegenerativos naturais (Ozawa *et al.*, 1998; Meldrum, 2000). Acredita-se que, agindo sobre receptores AMPA, NMDA e metabotrópicos, o glutamato possua um importante papel na morte celular subsequente a eventos como *status epilepticus* (Chapman, 2000), isquemia cerebral, asfixia perinatal e trauma encefálico (Michaelis, 1998; Meldrum, 2000). Quando o estresse imposto ao tecido nervoso durante estes eventos é severo, sucede-se morte celular por necrose, mas quando o trauma é brando, está envolvida a apoptose (Meldrum, 2000). O mecanismo primário envolvido na geração destes danos excitatórios agudos é um desequilíbrio iônico relacionado à excessiva entrada de Na^+ e Ca^{2+} dentro da célula através de canais iônicos, particularmente dos tipos NMDA e AMPA (Meldrum e Garthwaite, 1990). O Ca^{2+} que penetra na célula induz várias enzimas, contribuindo para o processo que leva à apoptose.

Por outro lado, três mecanismos foram propostos para explicar o envolvimento do glutamato nos processos de neurodegeneração. Um deles indica que o glutamato e outros compostos relacionados capazes de agir sobre os receptores de glutamato são ingeridos continuamente através dos alimentos, levando a danos lentos e progressivos ao sistema nervoso. A segunda hipótese aponta o próprio glutamato endógeno liberado durante pequenos episódios de isquemia como o causador dos danos excitatórios neurodegenerativos agudos que os acompanham. Por último, sugere-se que a ativação natural, geneticamente controlada, de receptores de glutamato contribua para o desenvolvimento de certas doenças neurodegenerativas, como a doença motora neuronal (MND), a esclerose amiotrófica lateral (ALS), o mal de Parkinson, a coreia de Huntington e o mal de Alzheimer (Meldrum, 2000).

Com base em vários modelos animais e em alguns dados obtidos em humanos, está claro hoje que as sinapses glutamatérgicas representam um alvo potencial de drogas utilizadas no tratamento de várias destas desordens neurológicas e psiquiátricas, incluindo epilepsias, amnésia, desordens motoras, derrame, desordens relacionadas a dor, ansiedade, psicose e depressão (Kristensen *et al.*, 1992; Gill, 1994; Banerjee *et al.*, 1995; Shors *et al.*, 1995; Lacomblez *et al.*, 1996; Meldrum e Chapman, 1999).

1.6.4 – Compartimentalização do metabolismo de glutamato no sistema nervoso

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de vertebrados e é também extremamente abundante neste sistema, o que impõe consideráveis problemas, uma vez que existe grande probabilidade de contaminação das transmissões neuronais por glutamato não-neurotransmissor, o que leva à degradação da razão sinal/ruído (Young e Ajami, 2000). Além disso, o excesso de glutamato é altamente neurotóxico, como mostrado anteriormente, e sua concentração extracelular deve, portanto, ser mantida muito baixa. Para reduzir o risco de degradação da razão sinal/ruído e a neurotoxicidade, o cérebro utiliza tanto barreiras físicas, para conter a difusão do glutamato, como uma compartimentalização do metabolismo desta substância, as quais não são encontradas em nenhum outro lugar do organismo (revisado por Hertz *et al.*, 1999).

A barreira hemato-encefálica, altamente seletiva em relação aos solutos que podem passar do sangue para o espaço extracelular do tecido nervoso, representa uma barreira física de controle, sendo praticamente impermeável ao glutamato circulante (Hertz *et al.*, 1999). Isto significa que todo o glutamato presente no interior do sistema nervoso tem origem no próprio tecido nervoso. Outra especialização física é desempenhada pelos astrócitos, cujos processos citoplasmáticos englobam completamente as fendas sinápticas glutamatérgicas, prevenindo, por um lado, a difusão do glutamato de uma fenda para a outra e, por outro, permitindo a rápida recaptação do neurotransmissor pelos astrócitos, que possuem nas membranas destes processos uma concentração elevada de transportadores de glutamato altamente eficientes (Hertz *et al.*, 1999; Attwell, 2000).

Por sua vez, a especialização metabólica entre neurônios e células da glia é altamente complexa, envolvendo compartimentalização das reações que levam à síntese de glutamato (Fig. 3). Esta está intimamente relacionada à compartimentalização dos metabolismos de glicose e de nitrogênio nos neurônios e nos astrócitos (Hertz *et al.*, 1999; Daikhin e Yudkoff, 2000).

A glicose é a principal fonte de energia do cérebro de mamíferos, sendo, via de regra, metabolizada tanto em neurônios como na glia através da glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Fig. 3; Erecinska *et al.*, 1988). O ciclo de Krebs é especial no sentido de que, a cada volta, dois átomos de carbono são incorporados ao ciclo via acetil-CoA e dois átomos de carbono são oxidados na formação de duas moléculas de CO₂, de

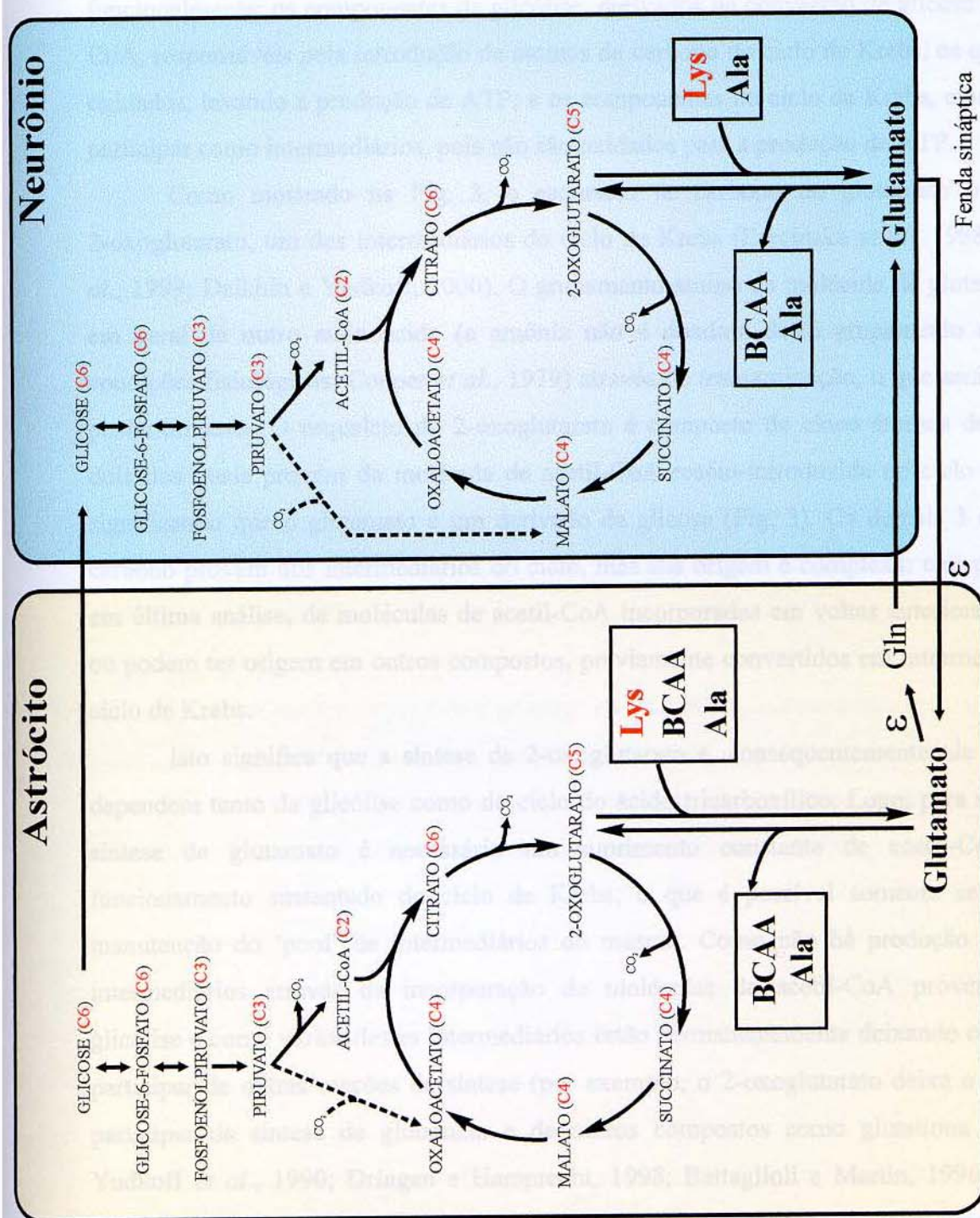


Figura 3: Compartimentalização do metabolismo de glutamato entre neurônios e astrócitos no sistema nervoso central de mamíferos
 O metabolismo do glutamato está representado no esquema, que mostra a via glicolítica e o ciclo de Krebs, geradores do esqueleto de carbono do 2-oxoglutarato, precursor de glutamato. A reação de síntese de glutamato está representada na parte de baixo do esquema, tanto no neurônio como no astrócito, com a participação da lisina (Lys), dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e da alanina (Ala). O ciclo glutamina-glutamato também está representado, onde a glutamina (Gln) sintetizada a partir do glutamato na glia é transferida para o neurônio, num processo que requer energia (ϵ).

modo que não existe produção líquida dos intermediários do ciclo (Fig. 3; Voet e Voet, 1990). Assim, os compostos envolvidos neste processo podem ser divididos funcionalmente: os componentes da glicólise, derivados da conversão de glicose em acetil-CoA, responsáveis pela introdução de átomos de carbono no ciclo de Krebs, os quais serão oxidados, levando à produção de ATP; e os componentes do ciclo de Krebs, cuja função é participar como intermediários, pois não são oxidados para a produção de ATP.

Como mostrado na Fig. 3, o esqueleto de carbono do glutamato provém do 2-oxoglutarato, um dos intermediários do ciclo de Krebs (Erecinska *et al.*, 1988; Hertz *et al.*, 1999; Daikhin e Yudkoff, 2000). O grupamento amino da molécula de glutamato vem em geral de outro aminoácido (a amônia não é doadora deste grupamento amino em condições fisiológicas; Cooper *et al.*, 1979) através de transaminação, o que será discutido posteriormente. O esqueleto do 2-oxoglutarato é composto de cinco átomos de carbono, dois dos quais provém da molécula de acetil-CoA recém-introduzida no ciclo de Krebs, significando que o glutamato é um derivado da glicose (Fig. 3). Os demais 3 átomos de carbono provém dos intermediários do ciclo, mas sua origem é complexa: eles podem vir, em última análise, de moléculas de acetil-CoA incorporadas em voltas anteriores do ciclo ou podem ter origem em outros compostos, previamente convertidos em intermediários do ciclo de Krebs.

Isto significa que a síntese de 2-oxoglutarato e, conseqüentemente, de glutamato dependem tanto da glicólise como do ciclo do ácido tricarboxílico. Logo, para sustentar a síntese de glutamato é necessário um suprimento constante de acetil-CoA e um funcionamento sustentado do ciclo de Krebs, o que é possível somente se houver a manutenção do 'pool' de intermediários do mesmo. Como não há produção líquida de intermediários através da incorporação de moléculas de acetil-CoA provenientes da glicólise e como vários destes intermediários estão permanentemente deixando o ciclo para participar de outras reações de síntese (por exemplo, o 2-oxoglutarato deixa o ciclo para participar da síntese de glutamato e de outros compostos como glutatona e GABA; Yudkoff *et al.*, 1990; Dringen e Hamprecht, 1998; Battaglioli e Martin, 1996), existe a necessidade da reintrodução de novos esqueletos de carbono integrantes permanentes do ciclo. Este processo é importante não somente para sustentar a síntese de glutamato a longo-prazo, mas também para sustentar o funcionamento do próprio ciclo oxidativo e a

geração de ATP (Hertz *et al.*, 1999). Esta reintrodução é feita de maneiras distintas em astrócitos e neurônios.

Em astrócitos, um dos processos para a reintrodução de esqueletos de carbono é a carboxilação do piruvato, ou seja, sua condensação com uma molécula de CO₂, formando oxaloacetato, numa reação catalisada pela enzima piruvato carboxilase (Fig. 3; Yu *et al.*, 1983; Shank *et al.*, 1985; Cesar e Hamprecht, 1995). Esta enzima é encontrada na maioria das células do organismo, mas no sistema nervoso ela é abundante em astrócitos e ausente em neurônios (Yu *et al.*, 1983). O oxaloacetato gerado pode então entrar novamente como constituinte do ciclo de Krebs, sustentando eventualmente a formação de glutamato nos astrócitos (Fig. 3; Swanson e Graham, 1994; Hertz *et al.*, 1999). O glutamato pode ser transferido para os neurônios através do ciclo glutamina-glutamato, que será discutido mais tarde. O oxaloacetato também pode ser indiretamente transferido para o neurônio, sendo primeiramente transformado em algum composto capaz de atravessar as membranas celulares: um dos mecanismos para isso é a conversão de malato em piruvato, que pode então ser transferido para o neurônio na forma de lactato, alanina ou piruvato (Bagley *et al.*, 1989; Hertz *et al.*, 1999).

Nos neurônios, a reintrodução de esqueletos de carbono ao ciclo de Krebs é feita pela enzima málica, que carboxila o piruvato da glicólise, transformando-o em malato, que pode então se reinserir no ciclo, sustentando o metabolismo oxidativo da glicose e a geração de glutamato (Fig. 3; Hassel e Brathe, 2000). Sugere-se que esta seja a principal rota para a síntese de glutamato nos neurônios (Hassel e Brathe, 2000).

Como dito anteriormente, o glutamato sintetizado nos astrócitos pode ser transferido para os neurônios através do ciclo glutamina-glutamato: o glutamato astrocítico é convertido primeiramente em glutamina (Norenberg e Martinez-Hernandez, 1979) e esta é transferida para os neurônios (Fig. 3; Schousboe *et al.*, 1979; Yudkoff *et al.*, 1989). Este processo tem a vantagem de que a glutamina, ao contrário do glutamato, não é ativa quando presente no meio extracelular (Hertz *et al.*, 1999). No interior dos neurônios, a glutamina é então reconvertida em glutamato (Schousboe *et al.*, 1979; Hogstad *et al.*, 1988). O destino do glutamato neuronal assim gerado ainda é bastante controverso. Alguns sugerem que ele é acumulado em vesículas sinápticas e utilizado como neurotransmissor, sendo liberado na fenda sináptica, de onde é recaptado pelos astrócitos (Attwell, 2000). Este ciclo de

conversão entre glutamato e glutamina do qual participam os neurônios e os astrócitos é conhecido como ciclo glutamina-glutamato, que é indiscutivelmente muito importante na síntese do glutamato neuronal (Pow e Robinson, 1994; Hertz *et al.*, 1999; Daikhin e Yudkoff, 2000). Uma desvantagem deste ciclo é que tanto a recaptação de glutamato da fenda sináptica pelos astrócitos como a conversão astrocítica de glutamato em glutamina requerem energia na forma de ATP (Fig. 3; Hertz *et al.*, 1999).

Outros estudos sugerem que o glutamato recebido dos astrócitos não é utilizado como neurotransmissor, mas para regenerar 2-oxoglutarato, o qual é reincorporado ao ciclo de Krebs (Yudkoff *et al.*, 1989; Erecinska *et al.*, 1990; McKenna *et al.*, 1996). Este novo esqueleto de carbono pode mesmo deixar o ciclo de Krebs via descarboxilação catalisada pela enzima málica (gerando piruvato), sendo então oxidado e gerando ATP (McKenna *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1998). Hertz *et al.* (1999) sugerem que este é o principal destino do glutamato recebido pelos neurônios dos astrócitos via glutamina: a produção de energia. De fato, depois da glicose, glutamato é o principal composto energético consumido pelo tecido nervoso (Erecinska *et al.*, 1988).

Foi dito que o glutamato provém da transaminação do 2-oxoglutarato. Em termos bioquímicos, qualquer aminoácido pode participar desta reação como doador do grupamento amino. Portanto, a curto-prazo, alanina (Peng *et al.*, 1991; Westergaard *et al.*, 1993; Jones e Bachelard, 1999), aspartato (Yudkoff *et al.*, 1987; Erecinska *et al.*, 1993) e outros aminoácidos (Yudkoff *et al.*, 1994) podem participar da síntese de glutamato (Fig. 3). Entretanto, os grupamentos amino do glutamato dentro do sistema nervoso estão sendo constantemente perdidos através da reação de desaminação do glutamato, catalisada pela glutamato desidrogenase (GAD), uma enzima extremamente abundante no cérebro (Williamson *et al.*, 1967; Yudkoff *et al.*, 1991). A amônia liberada desta reação não pode participar novamente da síntese de glutamato, porque o tecido nervoso não realiza aminação de 2-oxoglutarato em condições fisiológicas (Cooper *et al.*, 1979). Sendo assim, a longo-prazo, este tecido não é capaz de sustentar a produção de glutamato sem a introdução de novos grupamentos amino provenientes de uma fonte externa ao sistema (Hertz *et al.*, 1999; Daikhin e Yudkoff, 2000). Alanina e aspartato são pobres candidatos a exercer este papel porque são sintetizados dentro dos limites do sistema nervoso e, em última análise, seus grupamentos amino provêm de outros aminoácidos, fundamentalmente do glutamato

(Westergaard et al., 1993; Peng *et al.*, 1994). O doador de novos grupamentos amino deve ser capaz de atravessar rapidamente a barreira hemato-encefálica e atingir concentrações elevadas dentro do tecido nervoso. Dois candidatos surgem claramente no panorama de aminoácidos capazes de penetrar a barreira hemato-encefálica: os aminoácidos de cadeia ramificada, em especial a leucina, que é o que mais rapidamente atravessa a barreira para dentro do sistema nervoso a partir da corrente sanguínea (Smith, 2000); e a lisina, que ocupa o segundo lugar em termos da capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (Smith, 2000) e que é também o aminoácido mais abundante do tecido nervoso depois de glutamato, glutamina e glicina (Himwich e Agrawal, 1969; Velazquez *et al.*, 1993).

Recentemente, mostrou-se que a leucina participa da síntese *de novo* de glutamato neuronal, ou seja, da reintrodução de grupamentos amino no sistema (Fig. 3), sendo responsável pela síntese de aproximadamente um terço do glutamato cerebral (Yudkoff *et al.*, 1994). A reação de transaminação envolvida é catalisada pela enzima aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAT; Hutson *et al.*, 1995; Bledose *et al.*, 1997). Outros estudos mostraram que, dentro dos neurônios, a taxa de reaminação de leucina, ou seja, de re-transferência de grupamentos amino do glutamato para a leucina, catalisada pela mesma enzima BCAT, é maior do que a taxa de geração de glutamato a partir de leucina (Yudkoff *et al.*, 1996a; Yudkoff *et al.*, 1996b). Ainda não está claro se a reação de transaminação de leucina e a consequente formação de glutamato ocorrem nos astrócitos.

Por outro lado, a participação da lisina como doadora de grupamentos amino para a síntese *de novo* de glutamato foi objeto de estudo desta tese e os resultados obtidos estão reunidos no artigo nº 2 (Papes *et al.*, 2001) e serão discutidos no item 3.

2 – APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS E OBJETIVOS

Os trabalhos desenvolvidos nesta tese resultaram na publicação de três artigos, que serão apresentados a seguir. O primeiro artigo (Papes *et al.*, 1999) versa sobre o isolamento e a caracterização inicial de um clone de cDNA de fígado de camundongo que codifica a enzima bifuncional LOR/SDH, bem como sobre a análise de sua expressão em diversos tecidos murinos. Também foi realizada a purificação parcial, a partir de extratos de fígado, de uma proteína monofuncional com atividade de SDH e de uma enzima bifuncional com atividades de LOR e SDH. O segundo artigo (Papes *et al.*, 2001) trata da análise da expressão de LOR/SDH no sistema nervoso central de mamíferos e da caracterização da função da via da sacaropina como rota de síntese do neurotransmissor glutamato neste sistema. O terceiro artigo (Arruda *et al.*, 2000) constitui um artigo de revisão no qual são descritos muitos dos resultados obtidos nos artigos precedentes e por outros (Tang *et al.*, 1997; Epelbaum *et al.*, 1997; Kemper *et al.*, 1998; Kemper *et al.*, 1999; Kemper *et al.*, 2000) no que se refere à caracterização da enzima LOR/SDH, de seu gene e das funções da via da sacaropina em plantas.

Muitos dos dados reunidos nestes três trabalhos bem como parte da discussão que se segue (item 3) basearam-se em outros artigos desenvolvidos por nosso grupo, em especial:

- Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Papes, F., Martinez Moraes, K.C., Leite, A., e Arruda, P. (1999) The role of Opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell*, 11: 1981-1993.
- Kemper, E.L., Papes, F., Chiesse da Silva, A., Leite, A., e Arruda, P. (2000) Lysine-oxoglutarate reductase activity in maize endosperm is modulated by Ca^{2+} -mediated dimerization and lysine-dependent phosphorylation. (submetido a *Plant Journal*).
- Papes, F., Martinez Moraes, K.C., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Vettore, A., e Arruda, P. (2000) Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase genes in eukaryotes. (submetido a *DNA Sequence*).

Artigo n^o 1: Lysine degradation through the saccharopine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse.

Fabio Papes, Edson L. Kemper, Germano Cord Neto, Francesco Langone, e Paulo Arruda (1999) *Biochemical Journal*, **344**: 555-563.

Estudos anteriores eram contraditórios com relação à natureza das atividades de LOR e SDH em mamíferos. Alguns dados apontavam para um único polipeptídeo com ambas as atividades, enquanto outros sugeriam a existência de duas proteínas LOR e SDH distintas. Por outro lado, nenhum dado havia sido acumulado sobre a caracterização genético-molecular de LOR e SDH em mamíferos.

Foram resultados deste trabalho:

- a) o isolamento de um clone de cDNA que codifica um polipeptídeo com atividades de LOR e SDH em *Mus musculus*;
- b) a caracterização deste clone, determinando a existência de um mRNA que codifica um polipeptídeo com ambas as atividades de LOR e SDH;
- c) determinação do padrão de expressão espacial do gene correspondente em diferentes tecidos e órgãos do camundongo;
- d) purificação parcial das atividades de LOR e SDH a partir do fígado de camundongos para demonstração definitiva da existência de formas enzimáticas monofuncionais e bifuncionais neste tecido;
- e) análise inicial da regulação da expressão de LOR/SDH em condições de jejum, para determinação do envolvimento desta enzima e da via da sacaropina no balanço energético do organismo; e
- f) análise inicial da regulação da expressão de LOR/SDH após injeção intraperitonial de metabólitos da via da sacaropina, para determinação da regulação exercida pelos níveis destes compostos sobre a expressão de LOR/SDH.

Artigo n^o 2: The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system.

Fabio Papes, Marcelo J. Surpili, Francesco Langone, José R. Trigo, e Paulo Arruda (2001) *FEBS Letters* (no prelo).

Estudos anteriores haviam sugerido que a via da sacaropina não é importante para a degradação de lisina no sistema nervoso de mamíferos. Por outro lado, evidências derivadas de estudos em disciplinas tão diversas como genética humana, clínica médica, nutrição humana e animal, neurologia e psiquiatria apontavam para a lisina como um aminoácido essencial no desenvolvimento do tecido nervoso. Com base nos dados obtidos no artigo nº 1, objetivou-se:

- a) demonstrar, por uma combinação de métodos moleculares, a operação da via da sacaropina no sistema nervoso central de camundongos e do homem;
- b) analisar o padrão de expressão espacial do gene *Lor/Sdh* em diferentes regiões dos encéfalos humano e murino;
- c) verificar o envolvimento da via da sacaropina e, em particular, das atividades de LOR e SDH na geração do neurotransmissor glutamato no sistema nervoso a partir da degradação de lisina; e
- d) determinar a percentagem do total de glutamato sintetizado no cerebelo e no córtex cerebral de *Mus musculus* que tem como precursor (doador de nitrogênio) o aminoácido lisina.

Artigo nº 3: Regulation of lysine catabolism in higher plants.

Paulo Arruda, Edson L. Kemper, Fabio Papes, e Adilson Leite (2000) *Trends in Plant Science*, 5: 324-330.

Este artigo de revisão reúne os dados obtidos por nós e por outros grupos em relação ao catabolismo de lisina, principalmente em plantas, e de sua regulação. Os papéis da via da sacaropina e da enzima LOR/SDH no desenvolvimento da semente de cereais e em outros processos ontogenéticos em plantas superiores são discutidos.

Lysine degradation through the saccharopine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse

Fabio PAPES*, Edson L. KEMPER*, Germano CORD-NETO*, Francesco LANGONE† and Paulo ARRUDA*‡¹

*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, CEP 13083-970, SP, Brasil, †Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, CEP 13083-970, SP, Brasil, and ‡Departamento de Genética e Evolução, IB, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, CEP 13083-970, SP, Brasil

Lysine–oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase are enzymic activities that catalyse the first two steps of lysine degradation through the saccharopine pathway in upper eukaryotes. This paper describes the isolation and characterization of a cDNA clone encoding a bifunctional enzyme bearing domains corresponding to these two enzymic activities. We partly purified those activities from mouse liver and showed for the first time that both a bifunctional lysine–oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase and a monofunctional saccharopine dehydrogenase are likely to be present in this organ. Northern analyses indicate the existence of two mRNA species in liver and kidney. The longest molecule, 3.4 kb in size, corresponds to the

isolated cDNA and encodes the bifunctional enzyme. The 2.4 kb short transcript probably codes for the monofunctional dehydrogenase. Sequence analyses show that the bifunctional enzyme is likely to be a mitochondrial protein. Furthermore, enzymic and expression analyses suggest that lysine–oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase levels increase in livers of mice under starvation. Lysine-injected mice also show an increase in lysine–oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase levels.

Key words: amino acid, catabolism, cDNA, kidney, liver.

INTRODUCTION

The saccharopine pathway is thought to be the main metabolic route for lysine degradation in upper eukaryotes. This pathway has been described in plants [1–4] and mammals [5–10], and its first two reactions are catalysed by enzymic activities known as lysine–oxoglutarate reductase (LOR; EC 1.5.1.8) and saccharopine dehydrogenase (SDH; EC 1.5.1.9). The reductase activity condenses lysine and 2-oxoglutarate to form saccharopine [ϵ -N-(L-glutaryl-2)-L-lysine]. Saccharopine is subsequently oxidized by the dehydrogenase activity to produce α -amino adipic δ -semialdehyde and glutamic acid.

Characterization of LOR activity in the immature maize endosperm [1,11] gave evidence for the operation of this lysine degradation pathway in plants. Both LOR and SDH activities reside on a single bifunctional polypeptide whose native form is a homodimer composed of identical 117 kDa subunits [4]. Recently, cDNA and genomic sequences from maize (E. L. Kemper, G. Cord-Neto, F. Papes, K. C. M. Moraes, A. Leite and P. Arruda, unpublished work) and *Arabidopsis* [12,13] have been obtained. The proteins encoded by these clones bear regions exhibiting similarity to the corresponding separate LOR and SDH from yeast.

In mammals, the saccharopine pathway is important for lysine catabolism in the liver, and it involves LOR and SDH activities that are biochemically similar to those described in plants [6–10,14]. In baboon and bovine livers these two activities reside on a single polypeptide [14,15] and the bifunctional protein purified from these sources has been named aminoadipic semi-

aldehyde synthase. Its native form seems to be a tetramer of molecular mass 468 kDa composed of four identical bifunctional 115 kDa subunits [14]. A tetrameric form has also been observed in human liver and placenta [16,17]. However, non-linked LOR and SDH polypeptides have been isolated from rat liver [18].

Several aspects of the functional relevance of LOR and SDH in mammalian physiology should be considered. Firstly, these enzyme activities are responsible for lysine catabolism in the liver, contributing not only to the general nitrogen balance in the organism but also to the controlled conversion of lysine into ketone bodies [6,7,9,19,20]. Secondly, lysine is an essential amino acid and its supply is therefore required during embryonic development and early childhood. Moreover, lysine is frequently the first limiting amino acid in human and animal diets high in grain [21,22]. Hence, further knowledge about the enzymes and corresponding genes involved in lysine degradation is of special interest from the nutritional point of view. Thirdly, LOR activity has also been detected in rat brain mitochondria during embryonic development [23]. This opens the question of whether the degradation of lysine has any functional significance during brain development and puts a new focus on the nutritional requirements for lysine in gestation and infancy. Fourthly, LOR and/or SDH deficiencies seem to be involved in a human autosomal genetic disorder known as familial hyperlysinaemia, which is characterized by serious defects in the functioning of the nervous system [10,24,25].

Here we describe the isolation and characterization of a mouse liver cDNA clone encoding the bifunctional enzyme LOR/SDH. Northern blot analysis of the corresponding gene in a variety of

Abbreviations used: LOR, lysine–oxoglutarate reductase; PEG, poly(ethylene glycol); SDH, saccharopine dehydrogenase.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail parruda@turing.unicamp.br).

The nucleotide sequence data reported will appear in DDBJ, EMBL and GenBank Nucleotide Sequence Databases under the accession numbers AF003551 (maize LOR/SDH and AJ224761) (cDNA-LOR/SDH, encoding the mouse LOR/SDH bifunctional enzyme).

tissues along with the partial purification of LOR and SDH activities suggest that a bifunctional LOR/SDH and a mono-functional SDH are likely to be present in mouse. Furthermore, expression analyses and enzyme assays suggest that LOR/SDH levels increase in the liver of animals under starvation and in the liver of lysine-injected mice.

EXPERIMENTAL

Chemicals

L-Lysine, L-saccharopine, poly(ethylene glycol) (molecular mass 8000 Da) (PEG 8000), NADPH, NAD⁺, dithiothreitol, 2-oxoglutaric acid, Nitro Blue Tetrazolium, phenazine methosulphate, EDTA, paraformaldehyde, phenol, benzamidine, GTP and common buffer salts were purchased from Sigma. DEAE-Sephacel and proteins used in molecular mass calibration were obtained from Pharmacia Biotech.

Library screening and computer analysis

An *EcoRI/NotI* 1.2 kb fragment of a mouse liver expressed sequence tag clone (I.M.A.G.E. Consortium; I.D. 738285) was used as a probe to screen a normal liver cDNA library (6-week-old C57Bl6/CBA females; Stratagene). Screening procedures were performed as recommended in the manufacturer's protocol.

Nucleotide and predicted protein sequences were analysed on DNASIS Sequence Analysis software (Pharmacia/LKB). Amino acid sequence alignments were performed with CLUSTAL W software [26] and the BOXSHADE program, used remotely at the ISREC Bioinformatics Group WWW server (Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Epalinges, Switzerland).

Subcellular targeting computational analysis was performed remotely with the Claros and Vincens MitoProt II program [27] at the Ludwig-Maximilians University WWW server (Munich, Germany). Subcellular localization prediction was also performed at the PSORT II server at the University of Tokyo (Tokyo, Japan). First this engine runs a subprogram to predict the presence of signal sequences by the McGeoch method [28]. Next, PSORT applies von Heijne's method for signal sequence recognition [29]. Lastly, PSORT employs a discriminant method (called 'MITDISC') to recognize mitochondrial targeting [30].

DNA and RNA gel blot analyses

Genomic DNA from C57 Black 6 mice was extracted from tail tips, by the method of Hogan et al. [31]. DNA (10 µg) was digested with *EcoRI* and *BamHI* and analysed by electrophoresis in 0.8% agarose gel. Digests were transferred to Hybond N⁺ membrane (Amersham) with the use of standard procedures [32]. The membrane was hybridized with LOR- and SDH-specific probes, corresponding to nt 1–864 and 1410–2139 respectively of the isolated cDNA clone. Hybridization was performed at 65 °C in 5 × SSC (SSC is 0.15 M NaCl/0.015 M sodium citrate)/–5 × Denhardt's (Denhardt's solution is 0.02% Ficoll/0.02% polyvinylpyrrolidone/0.02% BSA)/1% (w/v) SDS. The blot was washed twice for 10 min at 65 °C in SSPE [0.15 M NaCl/–10 mM sodium phosphate/1 mM EDTA (pH 7.5)]/0.1% SDS, followed by two additional washes for 10 min at 65 °C in 0.1 × SSPE/0.1% SDS. Before hybridization with a different probe, the blot was stripped in boiling 0.5% SDS solution. Radioactive bands were detected by autoradiography.

For analysis of the tissue expression pattern, Northern blotting was performed with the Mouse Multiple Tissue Northern Blot (Clontech) by using the LOR- and SDH-specific probes. Hybridization was performed at 65 °C with the ExpressHyb hybridization buffer (Clontech). Radioactive bands were detected by

autoradiography. For the remaining Northern blot procedures, 20 µg of total RNA was analysed in formaldehyde-containing 1% (w/v) agarose gels as described by Sambrook et al. [32]. Hybridization conditions were the same as for the Southern blots, with the SDH-specific probe. Radioactive bands were quantified on a Storm 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics). RNA from each animal was processed and analysed separately.

Partial purification of LOR and SDH activities from mouse liver

LOR and SDH activities were partly purified from mouse liver (C57 Black 6) by using the method described by Gonçalves-Butruile et al. [4], with some modifications. Livers were removed surgically, fragmented and washed thoroughly in PBS cold solution (137 mM NaCl/2.7 mM KCl/4.3 mM Na₂HPO₄/–1.4 mM KH₂PO₄) to remove excess blood and were frozen immediately under liquid nitrogen. The following steps were performed at 4 °C. Semi-thawed tissue (15 g) was homogenized in 35 ml of buffer A [25 mM sodium phosphate (pH 7.4)/1 mM EDTA/5 mM dithiothreitol] containing 5 mM benzamidine and 100 µM leupeptin. The homogenate was filtered through eight layers of cheesecloth and centrifuged for 10 min at 19000 g in an SS-34 rotor (Sorvall Instruments). The pH of the supernatant was adjusted to 5.6 by the addition of solid NaH₂PO₄; PEG 8000 was then added to a 7.5% final concentration. The sample was mixed gently but thoroughly for 20 min and then centrifuged for 10 min at 19000 g. The supernatant was brought to a final concentration of 15% PEG 8000 and centrifuged again for 10 min at 19000 g. The pellet was resuspended in 9 ml of buffer A containing 100 µM leupeptin and dialysed overnight at 4 °C in 1 litre of buffer A. The dialysed sample was applied to a DEAE-Sephacel column (1.2 cm × 15 cm), previously equilibrated with buffer A. The column was washed with 30 ml of buffer A and the enzyme was eluted with a 50 ml linear NaCl gradient (0–500 mM) in buffer A. Fractions containing LOR and SDH activities were pooled, brought to 70% satn. with solid (NH₄)₂SO₄ and centrifuged at 4 °C for 15 min at 19000 g. The pellet was resuspended in a small volume of buffer B (buffer A containing 300 mM NaCl) and applied to a Superdex-200 HR column (Pharmacia Biotech) previously equilibrated with buffer B.

Enzyme assays

LOR activity was measured spectrophotometrically in the direction of NADPH to NADP⁺ at 37 °C. The reaction mixture had a final volume of 0.8 ml and contained 20 mM L-lysine, 0.1 mM NADPH, 10 mM 2-oxoglutaric acid (neutralized to pH 7.0 with KOH), 175 mM Tris/HCl, pH 7.4, and approx. 0.04 mg of total protein. SDH activity was also measured spectrophotometrically in the direction of NAD⁺ to NADH at 37 °C in 0.8 ml of reaction mixture containing 1 mM L-saccharopine, 2 mM NAD⁺, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, and approx. 0.04 mg of total protein. One enzyme unit was defined as 1 mmol NADPH oxidized or NAD⁺ reduced at 37 °C. Protein concentrations were determined by the method of Bradford [33] with the Bio-Rad protein dye reagent.

PAGE

Discontinuous PAGE was performed at 4 °C on 6% (w/v) slab gels. After electrophoresis, the gels were developed for SDH activity in 4 mM saccharopine (absent from the control gel)/–2 mM NAD⁺/0.1% Nitro Blue Tetrazolium/0.02 mM phenazine methosulphate/0.1 M Tris/HCl (pH 8.5)/15 mM 2-oxoglutarate/1 µM GTP at 37 °C for 30 min.

Histochemical detection of SDH activity in sectioned kidneys

Kidneys from 10-week-old C57 Black 6 animals were removed surgically and washed in cold PBS to remove excess blood. The organs were fixed rapidly in 0.4% paraformaldehyde, pH 7.0, for 30 min at 4 °C and then sectioned longitudinally with a razor blade. Sections were incubated in PBS at 4 °C for 3 days to remove endogenous substrates. Subsequently, sections were equilibrated in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, before being stained for 1 h in the SDH-staining solution described above, except that 2-oxoglutarate and GTP were not used. Control sections were incubated in the absence of saccharopine. Reaction was stopped by rinsing the organ in doubly distilled water.

Starving conditions and lysine and saccharopine injection protocols

For experiments involving starvation, 10-week-old C57 Black 6 animals were starved for 1 or 2 days. Livers were removed surgically, washed thoroughly in PBS to remove excess blood, then frozen under liquid nitrogen. For enzymic measurements of LOR or SDH, 0.5 g of semi-thawed tissue was homogenized in 5 ml of cold buffer A, centrifuged at 39000 *g* for 45 min at 4 °C in an SS-34 rotor to obtain a very clear extract. Approx. 1 mg of total protein was used for enzymic assays. For RNA extraction, 0.2 g of tissue was processed by the method of Chomczynsky and Sacchi [34].

For the injection experiments, L-lysine (0.5 ml of 1 M solution) or L-saccharopine (0.5 ml of 20 mM solution) were injected intraperitoneally and after 1 or 2 days, during which the animals were given free access to a laboratory chow diet, livers were processed as for the starvation experiments. Livers were always collected at the same time during the day so as to avoid influences of diurnal variations in LOR and SDH activities [35].

RESULTS

Isolation of a mouse liver cDNA encoding an LOR/SDH bifunctional protein

In yeast, the saccharopine pathway is used for lysine biosynthesis and involves reactions similar to those described for lysine degradation in mammals and plants [36]. The two final steps of the yeast pathway are catalysed by LOR and SDH encoded by separate genes, namely *Lys1* and *Lys9* [37,38]. We searched the GenBank looking for expressed sequence tags presenting similarity either to these yeast enzymes or to the maize LOR/SDH, whose gene had been cloned recently in our laboratory. Clone no. 738285, sequenced from a mouse normal liver cDNA library, showed significant similarity to the 3' end of the yeast SDH and to the SDH domain of the maize enzyme.

A restriction fragment of this clone was then used to screen a C57 Black 6 mouse liver cDNA library. Seven independent positive clones were obtained from a total of 10⁶. Three clones exhibiting inserts larger than 3.0 kb were sequenced and proved to represent the same transcript. The longest clone (cDNA-LOR/SDH), 3.3 kb in size, was chosen for further characterization; 5' rapid amplification of cDNA ends experiments confirmed that this cDNA was full-length (results not shown). cDNA-LOR/SDH has a single open reading frame encoding a protein of 926 amino acid residues with an expected molecular mass of 109 kDa, which is consistent with the 115 kDa determined for the bifunctional polypeptide purified from bovine and baboon livers [14]. Multiple amino acid sequence alignments of the obtained clone and the yeast LOR and SDH enzymes revealed that the cDNA-LOR/SDH clone predicts a protein similar to both LOR and SDH (results not shown). Regions

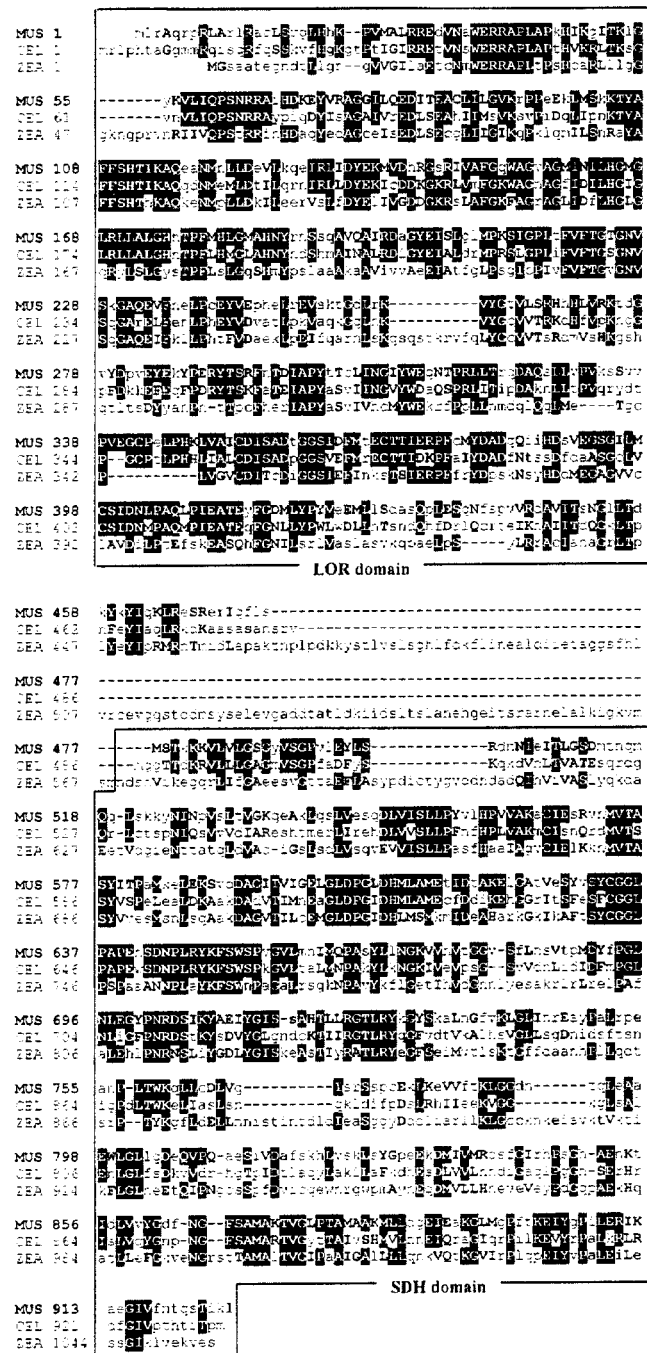


Figure 1 Alignment of various bifunctional LOR/SDH proteins

The mouse bifunctional enzyme LOR/SDH, predicted by translation of the isolated cDNA clone, is aligned with the maize and *C. elegans* proteins. Black boxes indicate amino acids that are identical between mouse (MUS) and maize (ZEA) or *C. elegans* (CEL). Capital bold letters indicate amino acids similar between mouse and maize or *C. elegans*. Lower case letters denote residues that are neither similar nor identical to the aligned residues in other sequences. The LOR and SDH domains, identified by sequence comparisons with the yeast enzymes (results not shown), are delimited by large boxes.

spanning residues 1–455 and 477–926 are similar to those in yeast LOR and SDH respectively (indicated by boxes in Figure 1). Moreover, the predicted protein exhibits 41.6% similarity to maize LOR/SDH, 62.3% similarity to the putative *Caenor-*

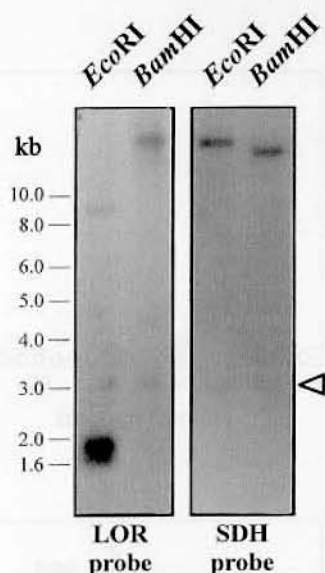


Figure 2 Genomic DNA gel blot analysis

A Southern blot of *Bam*HI- and *Eco*RI-digested mouse genomic DNA was hybridized with probes restricted either to the LOR domain or to the SDH domain. The open arrowhead denotes a 3.0 kb band that hybridized to both probes. The migration of size markers is indicated at the left.

habditis elegans LOR/SDH counterpart (Figure 1) and 44% similarity to the *Arabidopsis* LOR/SDH ([13], not shown). On the basis of these sequence similarities, we concluded that the isolated mouse cDNA codes for a bifunctional LOR/SDH protein.

The existence of a cDNA clone encoding a bifunctional protein strongly suggests that, as in plants, the *Lor* and *Sdh* genes are in fact fused in mammals.

DNA gel blot analysis

To analyse the organization of the gene(s) encoding LOR and SDH, genomic DNA from C57 Black 6 mice was digested with *Eco*RI and *Bam*HI and hybridized to probes corresponding either to the LOR or to the SDH domain of the cDNA-LOR/SDH clone (Figure 2). Both digests showed single strongly hybridizing bands with both probes, suggesting that *Lor* and *Sdh* are likely to be present as single-copy gene(s) in the mouse genome. Moreover, the digest produced with *Bam*HI exhibits an approx. 3.0 kb band when hybridized with both probes (Figure 2, open arrowhead). This indicates that this restriction fragment contains LOR and SDH regions, supporting the hypothesis that the *Lor* and the *Sdh* genes are fused in the mouse. We have recently obtained the genomic sequence of this gene (F. Papes, E. L. Kemper, K. C. M. de Moraes, F. R. da Silva, A. Vettore, A. Leite and P. Arruda, unpublished work) and concluded that it in fact represents a fused *Lor/Sdh* gene coding for a bifunctional LOR/SDH. We shall hereafter name this gene *Mus-Lor/Sdh*, solely to distinguish it from the isolated cDNA clone.

Mus-Lor/Sdh is expressed in adult mouse liver and kidney

The expression of *Mus-Lor/Sdh* was analysed by RNA gel blot hybridization of mRNA samples from a number of mouse adult tissues, with the LOR- and SDH-specific probes described for the Southern blot analysis. Hybridization with the LOR-specific probe revealed a strongly hybridizing band in the liver and

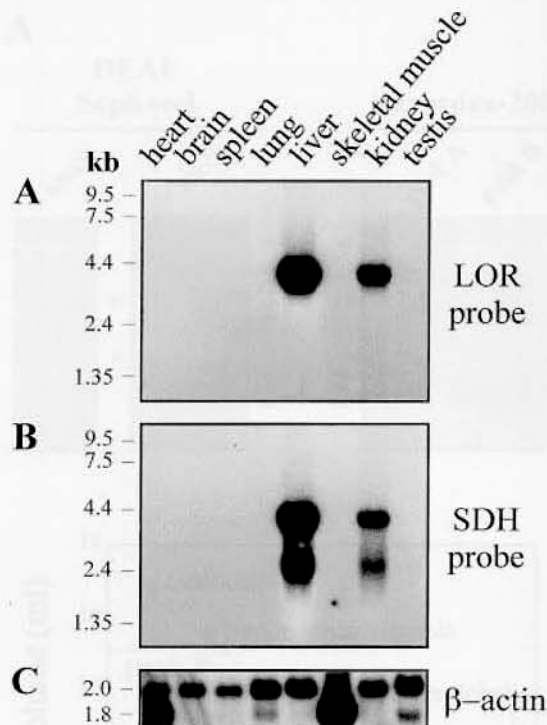


Figure 3 *Lor/Sdh* gene expression in mouse tissues

Expression of the *Mus-Lor/Sdh* gene was analysed in various mouse tissues. A commercial multiple-tissue Northern blot was sequentially hybridized with the LOR-specific probe (A) and the SDH-specific probe (B), and also a β -actin probe (C) as a loading control. The tissues of origin of the RNA are indicated at the top; the migration of size markers is shown at the left.

kidney RNA samples (Figure 3). Heart, brain, spleen, lung, skeletal muscle and testis showed only very faint bands after a prolonged exposure. The transcript detected by the LOR-specific probe was approx. 3.4 kb in size, in good agreement with the size of the isolated cDNA-LOR/SDH clone (3.3 kb).

Hybridization with the SDH-specific probe produced identical tissue expression patterns. However, this probe detected not only the 3.4 kb transcript but also a smaller 2.4 kb mRNA (Figure 3). This band was not as intense as the 3.4 kb main transcript band but the intensity ratio between the two bands was maintained in the liver and kidney. The 2.4 kb mRNA was not detected by the LOR-specific probe, even with exposure times exceeding 1 week, indicating that it contained only SDH-specific sequences.

Partial purification of LOR and SDH activities from mouse liver

The existence of a 2.4 kb SDH-only transcript in our Northern analyses opened the question of whether it encoded a mono-functional SDH enzyme in the mouse. In contrast, it was not clear yet whether the mouse liver contained a bifunctional LOR/SDH encoded by the cDNA-LOR/SDH clone. Other authors had found only non-linked LOR and SDH enzymes in the rat liver [18].

To determine whether a bifunctional LOR/SDH and mono-functional LOR or SDH polypeptides are present in mouse, both activities were partly purified from liver tissue. A single peak exhibiting both LOR and SDH activities was obtained after chromatography on a DEAE-Sephacel column (Figure 4A). The most active fractions from this peak were pooled, concentrated and dialysed against buffer A overnight. The dialysed sample was

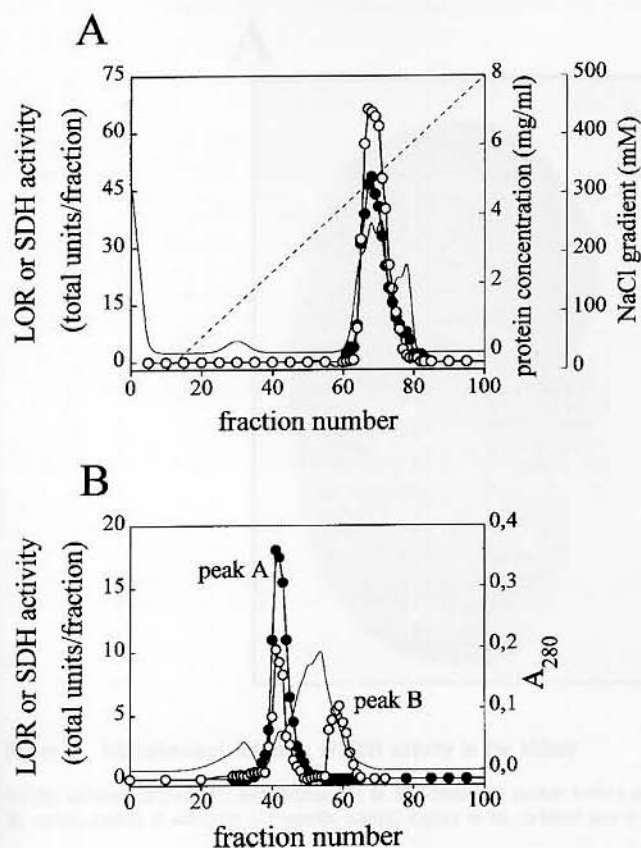


Figure 4 Chromatographic elution profiles of the partial purification of LOR and SDH activities from mouse liver

(A) Elution pattern of mouse LOR and SDH enzymic activities from the DEAE-Sephacel column. The column was eluted with a gradient of 0–500 mM NaCl in buffer A (broken line). Fractions of 0.75 ml were collected; assays for enzyme activities were performed on 50 μ l of each fraction. The protein concentration profile is indicated by the solid line. (B) Elution profile of LOR and SDH enzymic activities from the Superdex-200 HR column. The enzyme was eluted in 0.25 ml fractions; 50 μ l of each was used for enzyme assays. Protein concentration as measured by A_{280} is indicated by the solid line. Prominent peaks (A and B) are indicated. Symbols: ●, LOR; ○, SDH.

separated by non-denaturing gel electrophoresis and submitted to an in-gel staining procedure to detect SDH activity. GTP and 2-oxoglutarate were included in the staining solution (see the Experimental section) to inhibit glutamate dehydrogenases, which are abundant NAD^+ -utilizing enzymes in the partly purified liver extract (results not shown). Four specific SDH bands were detected in the sample from the DEAE column (Figure 5A, arrows), three of them migrating faster (F) and one showing slow migration (S) in the saccharopine-containing gel.

The combined DEAE-Sephacel fractions (Figure 4) were precipitated with 70%-satd. $(NH_4)_2SO_4$ and applied to a Superdex-200 HR gel-filtration column. Two peaks exhibiting LOR or SDH activities were recovered from this step, one presenting both activities (peak A) and the other possessing only the SDH activity (peak B; Figure 4B). The most active fractions of both peaks were combined separately, subjected to non-denaturing PAGE and stained for SDH activity, as done previously for the DEAE-Sephacel sample. The same set of four bands were specifically detected in this gel: peak A corresponded to the S band, whereas peak B yielded the three F bands (Figure 5A).

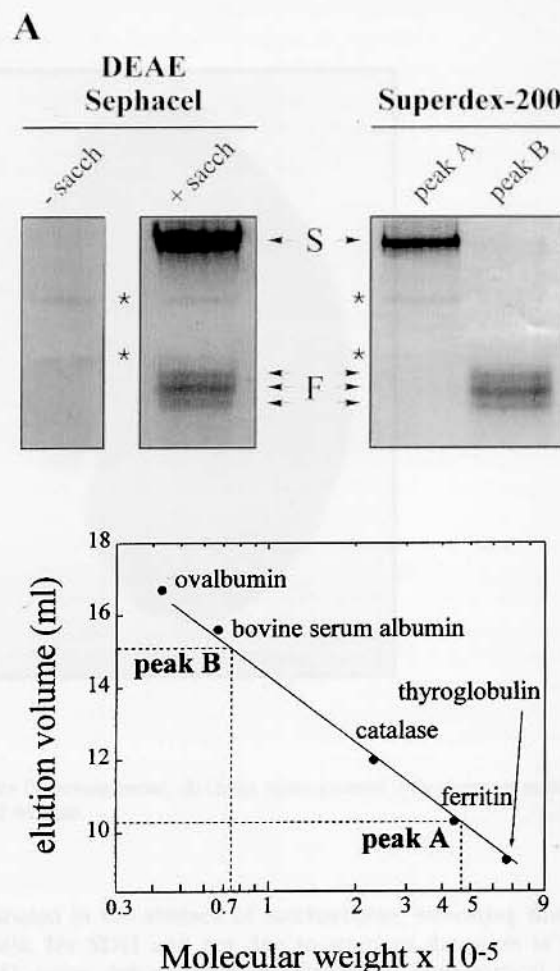


Figure 5 Gel analysis and molecular mass determination of partly purified LOR and SDH from mouse liver

(A) Pooled fractions from the DEAE-Sephacel column and from both peaks (A and B) of the Superdex-200 HR column (see Figure 4) were separated by native discontinuous gel electrophoresis and subsequently stained for SDH activity. The control gel, incubated in the absence of saccharopine, is labelled '– sacch'. The slowly migrating band is denoted S; the three fast-moving bands are indicated with F. Two very faint and clearly distinguishable bands were detected simultaneously in the saccharopine-containing and control gels (marked by asterisks); it was concluded that they represented persistent non-specific dehydrogenases (not SDH). (B) Molecular mass determination for LOR and SDH from peaks A and B of the Superdex-200 HR column. The column was calibrated with the following molecular mass standards: ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa), catalase (232 kDa), ferritin (440 kDa) and thyroglobulin (668 kDa). Elution volumes for these markers were monitored by measuring A_{280} . Broken lines indicate elution volumes corresponding to molecular masses of approx. 474 kDa (peak A; combined LOR and SDH activities) and 73 kDa (peak B; SDH-only activity).

The exclusion volumes from the Superdex-200 column (Figure 5B) enabled us to calculate the molecular masses of both peaks recovered from this column. Peak A corresponds to approx. 474 kDa, which is in good agreement with the 468 kDa of the tetrameric form of the bovine liver and human placenta bi-functional LOR/SDH enzymes [14,16]. Peak B has an estimated molecular mass of 73 kDa (Figure 5B). The fractions from both peaks were separately combined, concentrated and reapplied to the Superdex-200 column to confirm their previously attained elution volumes. Peaks A and B were eluted at the same volumes as in the first chromatographic run, strengthening the molecular mass assignments given before (results not shown).

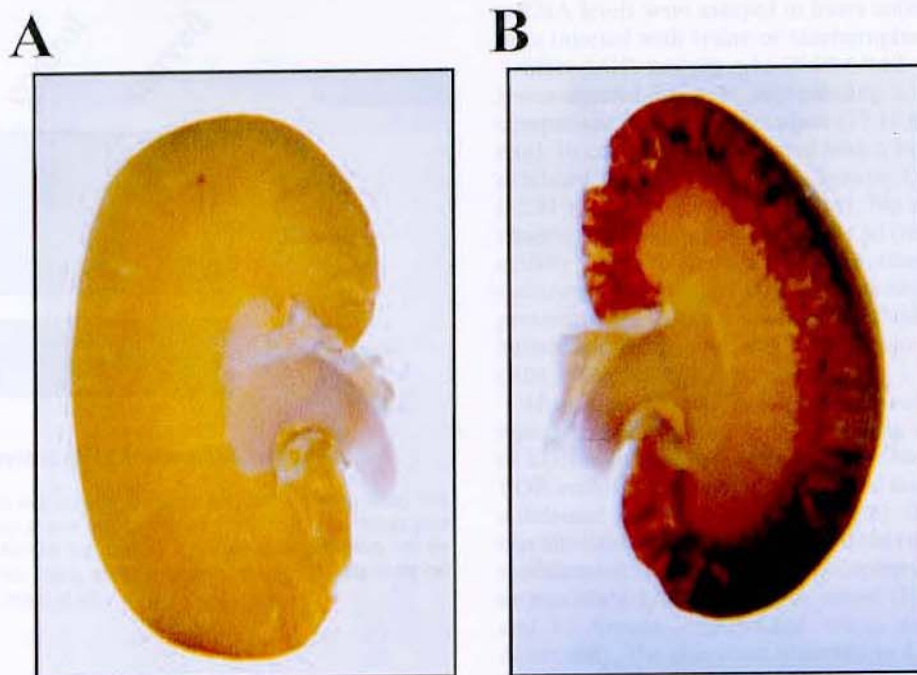


Figure 6 Histochemical detection of SDH activity in the kidney

Kidneys sectioned longitudinally were incubated in an SDH-developing reaction mixture as described in the Experimental section. (A) Control section incubated in the absence of saccharopine; (B) positive section, in which the SDH-specific staining appears as the darkened area in the periphery of the organ.

It is unlikely that the 73 kDa peak corresponds to a bifunctional monomer presenting only SDH activity, because its molecular mass is not similar either to that of the bifunctional monomer isolated from baboon and bovine livers (115 kDa) [14] or to that predicted for the LOR/SDH enzyme encoded by the cDNA clone isolated here (109 kDa). It is more reasonable that peak B corresponds to a monofunctional SDH monomer similar to the yeast monofunctional SDH, which in fact has a similar molecular mass (73 kDa) [38].

We were unable to separate the three F bands by standard chromatographic procedures. When run on a 7% (w/v) gel, these three bands separated as two bands. This distinct migration pattern in a more concentrated gel is likely to imply that the three isoforms have slightly distinct shapes. Nevertheless, given their nearly identical exclusion times from the Superdex column (results not shown), we concluded that the F bands have approximately the same molecular mass. Why these isoforms should migrate as three distinct bands is not known but it could be due to covalent modifications such as protein phosphorylation, as will be discussed later.

Taken together, the molecular and biochemical data presented in Figures 3, 4 and 5 support the existence of both bifunctional LOR/SDH and monofunctional SDH enzymes in the mouse liver.

Spatial distribution of SDH activity in the kidney

Northern analyses indicated that the *Mus-Lor/Sdh* gene is expressed in liver and kidney. To determine the role of LOR/SDH in the kidney, the enzyme location in this organ was analysed by histochemical staining for SDH activity *in situ*. As indicated in Figure 6, SDH activity was detected only in the cortical region of the kidney. The staining is not present in the control section

incubated in the absence of saccharopine, indicating that it is specific for SDH and not due to spurious detection of other NAD⁺-using dehydrogenases (Figure 6). This cortical distribution suggests that the enzyme could be located in the proximal and/or distal renal tubules, where most reabsorption processes take place.

LOR/SDH is induced by starvation or exogenous lysine administration

Lysine is a ketogenic amino acid and so its degradation can be coupled with the energetic balance in situations of limited carbon supply, such as starvation. Hence LOR and SDH activities along with *Mus-Lor/Sdh* gene expression were analysed to determine whether the lysine degradation was activated in the liver during starvation. In starved mice, LOR and SDH activities were 17.29 ± 0.64 and 9.39 ± 0.91 units/mg of protein respectively (means $\pm$ S.E.M. for four animals). These values represent statistically significant 52% and 47% increases in LOR and SDH activities in comparison with activity values in control animals (11.08 ± 0.04 and 6.48 ± 0.46 units/mg of protein respectively). These increases in LOR and SDH enzymic activities were paralleled by an 80% increase in *Mus-Lor/Sdh* mRNA levels (Figure 7). Increases in mRNA levels have also been observed during starvation for a number of amino-acid degrading enzymes, and transcriptional regulation of gene expression is likely to occur in these cases [39].

Not only starvation is able to affect lysine catabolism. Lysine and saccharopine have been shown to influence lysine degradation in yeast, plants and mammals. In tobacco, the injection of lysine *in vivo* into developing seeds promotes an increase in LOR activity [3]. The same occurs in lysine-overproducing plants, suggesting that the accumulation of this substrate leads to an

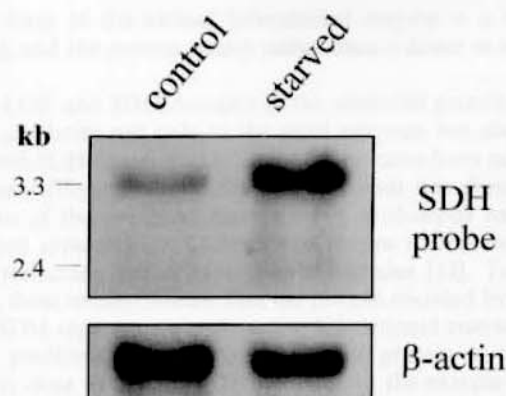


Figure 7 Effect of starvation on LOR/SDH mRNA levels

Mus-Lor/Sdh gene expression was analysed in starved and control mice by using RNA extracted from the same animals as were used for measuring enzymic activities (results given in the text). A representative Northern blot is shown. It was hybridized sequentially with the SDH-specific probe and with the β -actin probe (as a loading control). The sizes of the two prominent mRNA species are shown at left.

increase in the activity of its degrading enzyme [3]. In yeast, *Lys1* and *Lys9* genes, encoding the enzymes LOR and SDH, are transcriptionally regulated by the LYS14 activator, which in turn is modulated by a saccharopine derivative (amino adipate semi-aldehyde) [37,38]. In particular, high-lysine or high-protein diets seem to promote increases in LOR and SDH activities in the rat liver [40–43].

To study the effects of these substances in LOR/SDH enzymic activities and gene expression in mammals seems relevant because physiological or pathological lysine-accumulating or limiting conditions might seriously affect the lysine degradation pathway, leading to restricted or enhanced catabolism. To study those effects on the mammalian LOR/SDH, enzymic activity and

mRNA levels were assayed in livers collected from C57 Black 6 mice injected with lysine or saccharopine.

Liver LOR activity was 20.09 ± 0.62 units/mg of protein in lysine-injected animals, representing a significant increase in comparison with control values (17.17 ± 0.15 units/mg of protein). In contrast, mice injected with a low dose of saccharopine exhibited a 25% decrease in hepatic LOR activity after 48 h (12.61 ± 0.73 units/mg of protein). No significant increase was observed after a shorter period (24 h) (results not shown). SDH activity also increased after lysine administration (7.19 ± 0.52 units/mg of protein, in comparison with 5.57 ± 0.15 units/mg of protein in the control animals) but did not vary significantly between control and test in saccharopine-injected animals (5.08 ± 0.44 units/mg of protein).

Mus-Lor/Sdh mRNA levels increased in the liver of lysine-injected mice (Figure 8). This finding matched the induction of LOR activity in the same animals. Conversely, the decrease in LOR activity in saccharopine-injected mice was not paralleled by a decrease in mRNA levels (Figure 8). It is therefore likely that this alteration in LOR activity resulted from post-transcriptional modification. Indeed, protein phosphorylation has been shown to modulate LOR activity in maize (E. L. Kemper, F. Papes and P. Arruda, unpublished work) and *Arabidopsis* [44,45]. Alternately, the alteration observed in LOR activity in animals treated with saccharopine could be due to the inhibitory effect *in vitro* of endogenous saccharopine on the measurement of LOR activity [4,46]. However, we obtained the same decrease in LOR activity when endogenous saccharopine was eliminated from the sample by dialysis or precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ before the enzyme assay (results not shown). Additionally, this decrease was not observed if the sample was collected from animals killed after a short (24 h) post-injection period. Taken together, these results indicate that the LOR activity alteration in saccharopine-injected animals is the result of processes *in vivo*, probably protein phosphorylation, rather than of enzyme inhibition *in vitro*.

DISCUSSION

A previous study has described the existence of monofunctional, separate LOR and SDH (enzymes catalysing the first two steps of lysine degradation through the saccharopine pathway) in rat liver mitochondria [18]. Even so, other studies reported the isolation of a bifunctional LOR/SDH enzyme from the liver of other mammals [14,16]. In the present paper we provide biochemical and molecular evidence reconciling these apparently conflicting results, showing for the first time that both a bifunctional LOR/SDH and a monofunctional SDH are likely to be present in the murine liver.

We have isolated a cDNA clone from mouse adult liver that encodes a bifunctional polypeptide bearing domains similar to the yeast LOR and SDH enzymes (Figure 1). The bifunctional protein predicted to be encoded by this cDNA possesses 926 amino acid residues, divided into three distinct regions: an N-terminal domain, presenting similarity to LOR; a C-terminal domain similar to SDH; and an interposed short region connecting both domains that presents no similarity to other known protein sequences in the databases (Figure 1). This interposed domain is a distinctive feature of LOR/SDH bifunctional proteins from animals and plants because in mouse and *Caenorhabditis elegans* it is short (Figure 1), whereas in maize (Figure 1) and *Arabidopsis* (comparison not shown) it is longer. Its role in enzyme function or structure remains unknown as yet but the difference in its length between animal and plant sources might give rise to structural differences, eventually explaining why the

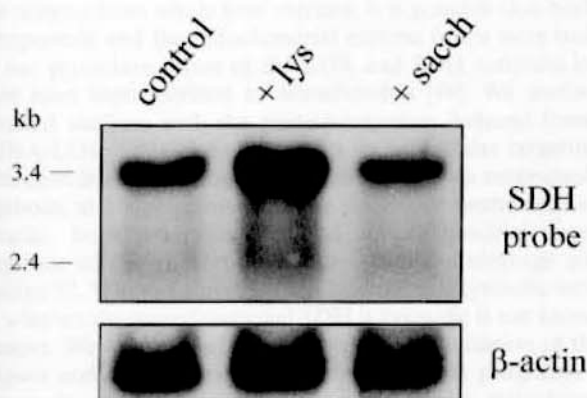


Figure 8 Effects of injections of lysine and saccharopine on *Mus-Lor/Sdh* gene expression

Mus-Lor/Sdh gene expression was analysed in the lysine-injected, saccharopine-injected and PBS-injected animals that were used for measuring enzymic activities (results given in the text). A representative Northern blot was hybridized sequentially with the SDH-specific probe and the β -actin probe (as a loading control). The sizes of the two prominent mRNA species are shown at left.

native form of the animal bifunctional enzyme is a tetramer ([14,16], and the present study) rather than a dimer as in plants [4].

The LOR and SDH domains of the predicted protein present strong similarity not only to the yeast enzymes but also to the LOR and SDH domains of bifunctional proteins from maize and *C. elegans* (Figure 1) and *Arabidopsis* (result not shown). The domains of the predicted protein from *Arabidopsis* have been expressed separately in bacteria and shown to represent fully active reductase and dehydrogenase domains [13]. Taken together, these results indicate that the protein encoded by cDNA-LOR/SDH represents a truly active bifunctional enzyme.

The predicted molecular mass of this protein is 109 kDa, which is close to the 115 kDa reported for the enzyme purified from bovine liver [14]. The partial purification of LOR and SDH activities from mouse liver led to the isolation of a protein with an estimated molecular mass of 474 kDa possessing both LOR and SDH activities (Figure 4B, peak A). This value matches that found for the tetrameric native enzyme isolated from other mammals (468 kDa) [14,16]. It is therefore likely that the 474 kDa protein is a tetramer of four bifunctional 109 kDa polypeptides, encoded by the isolated cDNA-LOR/SDH clone.

A second, less prominent, protein peak, presenting only SDH activity, was observed in the gel-filtration purification step (Figure 4B, peak B). Because this second peak has an estimated molecular mass of 73 kDa, which is similar to that of the SDH monofunctional enzyme from yeast, we hypothesize that it probably represents a monofunctional SDH. Our results agree in part with Noda and Ichihara [18], who showed the existence of non-linked LOR and SDH activities in rat liver. Nevertheless, we demonstrated that both bifunctional LOR/SDH and monofunctional SDH are likely to be present in this tissue, instead of completely separate activities as suggested by those authors.

We did not verify the precise subcellular localization of the isolated LOR/SDH and SDH. Perhaps these protein variants are differentially located in the cell. LOR activity can be detected in both mitochondrial and cytoplasmic fractions of mouse liver extracts [7]; this finding supports the idea of a widespread cellular distribution. Other amino acid-degrading enzymes exhibit this wide subcellular distribution, such as the branched-chain aminotransferases, which are present both in mitochondria and cytoplasm ([47], and references therein). Because we purified the enzyme from whole liver extracts, it is possible that both the cytoplasmic and the mitochondrial enzyme forms were isolated in our procedure. Most of the LOR and SDH activities in the liver have been ascribed to mitochondria [48]. We performed detailed analyses with the protein sequence deduced from the cDNA-LOR/SDH clone to predict its subcellular targeting. A mitochondrial localization was predicted by two computational methods, at a high probability (see the Experimental section for details). Both programs predicted a mitochondrial targeting sequence at the N-terminus, with a putative cleavage site at residue 32. Whether there is also a bifunctional cytosolic isoform or whether the monofunctional SDH is cytosolic is not known at present. We also predicted the subcellular localization of the *C. elegans* and maize enzymes by using the same programs. The nematode enzyme was also predicted to be a mitochondrial protein. Interestingly, the maize counterpart was assigned to the cytosol, in keeping with results obtained in our laboratory showing that the plant LOR/SDH is a cytosolic enzyme (E. L. Kemper, G. Cord-Neto, F. Papes, K. C. M. Moraes, A. Leite and P. Arruda, unpublished work).

The existence of both a bifunctional LOR/SDH and a monofunctional SDH in the mouse is supported by the Northern blot analyses presented in Figure 3. Two mRNA transcripts were

detected, 3.4 and 2.4 kb in size. Both transcripts were detected with a probe restricted to the SDH region of the cDNA-LOR/SDH clone but the shorter message was not detected by an LOR-specific probe, suggesting that it contains only SDH sequences (Figure 3). The 3.4 kb mRNA is likely to code for the bifunctional LOR/SDH because its length is in good agreement with one of the cDNA species described here. We have not sequenced the shorter (2.4 kb) transcript from mouse but have done so for the corresponding 2.4 kb mRNA from *Drosophila* (results not shown). This mRNA encodes a protein with a distinct N-terminal sequence with no similarity to any other protein in the databases and a C-terminal portion corresponding to a short part of the LOR domain, the interposed domain and the whole SDH domain of the LOR/SDH bifunctional enzyme. Because most of the LOR domain is absent from this predicted protein variant, it is likely that it encodes a monofunctional SDH. A similar short mRNA species (1.7 kb) encoding a monofunctional SDH protein has also been observed in *Arabidopsis* [13], but the SDH mRNA shown in this study codes for a protein comprising only the SDH domain and presents complete collinear identity with the longest LOR/SDH mRNA. It is more reasonable that this mRNA is an incomplete cDNA clone rather than a coding SDH-only message. Conversely, the size of 2.4 kb observed for the SDH mRNA described here is more compatible with the cited *Drosophila* short mRNA and with the molecular mass attained for the monofunctional SDH protein (73 kDa) isolated from mouse liver (Figures 3 and 5B).

The *Mus-Lor/Sdh* gene is likely to be present as a single-copy gene in the mouse genome (Figure 2) and so it is possible that the 2.4 kb mRNA is generated by alternative splicing or by the use of an alternative 5' exon from the same gene that encodes the 3.4 kb mRNA.

The *Mus-Lor/Sdh* gene is expressed conspicuously in liver and kidney (Figure 3) and this expression profile correlates well with the distribution of LOR and SDH enzymic activities in various human tissues [9]. In particular, the high expression level observed in the liver is consistent with the activity observed in this organ, not only in human but also in bovine, baboon and rat livers [14,18]. In the kidney, mRNA levels seem to be lower than in the liver (Figure 3); this parallels the LOR enzymic activity observed in rat kidney, which is only 10% lower than that found in liver [20].

In the liver, LOR/SDH is thought to participate in the nitrogen and energetic balances, by controlling the degradation of lysine into α -amino adipic semialdehyde, which is then converted into ketone bodies by several reactions. These energetic compounds can then be used in situations of limited carbon supply. We found that the enzymic activities of both LOR and SDH increased in starved mice in comparison with control non-starved animals. These increases in enzymic activity were accompanied by a significant increase in *Lor/Sdh* mRNA levels (Figure 7), suggesting that the induction in LOR/SDH under starvation might, at least in part, be the result of an increased transcription rate, as with a number of amino acid-degrading enzymes [39]. A previous paper showed a marked induction in rat liver LOR activity after the administration of glucagon [49]. This finding, together with our results on starved mice, points to an important involvement of LOR/SDH and lysine degradation itself in the energetic balance.

Increases in LOR/SDH activities and mRNA levels were also observed in animals given an intraperitoneal injection of lysine (Figure 8). A similar increase in rat liver LOR activity was previously reported in rats fed with a high-lysine diet [43]. Thus free lysine levels might reasonably be a signal to which the liver cells respond by modulating the LOR/SDH activities so as to

cope properly with the available circulating lysine. Moreover, high-protein diets result in increased lysine oxidation and LOR/SDH activity [40–42]. Blemings et al. [35] even showed an important diurnal variation in LOR and SDH activities and lysine oxidation after a protein-rich meal. Once again, the free lysine levels, derived from the degradation of available meal protein, might signal to the liver the need for enhanced degradation of lysine. In brief, the findings that both starvation and the injection of lysine alter LOR and SDH activities suggest that the lysine degradation pathway can respond promptly to and influence both the nitrogen and carbon balances in the organism.

Although the role of the liver enzyme is well understood, its function in the kidney is still unclear. Reports on the role of the kidneys in lysine degradation are in disagreement because some suggest a little participation [19], whereas others suggest an important role [50]. Our work supports the latter view. LOR/SDH might be involved in metabolic processes similar to those occurring in the liver but some distinct role in the kidney cannot be ruled out. One interesting observation favouring the first view is that LOR activity and *Lor/Sdh* mRNA levels also increase in kidneys of starved or lysine-injected animals (results not shown). Another possible role for LOR/SDH in the kidney is to influence the lysine reabsorption process in the tubule cells in some way. The precise tissue localization of SDH activity in this organ (Figure 6) can be seen as a good evidence in support of such a hypothesis.

This study therefore represents the starting point from which to assess the role of lysine-degrading activities in mammalian tissues and of the gene(s) encoding them. We focused mainly on liver and kidney but a number of aspects regarding the function of LOR and SDH in other tissues should be explored hereafter, mainly those concerning their involvement in genetic disorders such as familial hyperlysinaemias. Two types of familial hyperlysinaemia have been described so far: type I is associated with a combined deficiency of the two enzyme activities, LOR and SDH, whereas in familial hyperlysinaemia type II only the dehydrogenase activity is impaired [6,24,25]. A deficiency in the bifunctional LOR/SDH mRNA levels might explain, for example, why there is a combined deficiency in type I disease; a mutation in only the SDH domain might explain the type II disease. The present work therefore stands as the starting point of the characterization and molecular dissection of this inherited genetic disorder and the understanding of the coupling between the lysine degradation pathway and the carbon and nitrogen balances in the body.

We thank Dr. Michel Vincentz for his critical reading of this paper, and Dr. Adilson Leite for his help with sequence alignments. This work was supported by grants to P.A. from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP, PTE-90/3808-5. P.A. received research fellowships from CNPq. Postgraduate fellowships were granted by FAPESP to F.P. and E.L.K. and by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPEs to G.C.-N..

REFERENCES

- Arruda, P., Sodek, L. and da Silva, W. J. (1982) *Plant Physiol.* **69**, 988–989
- Brochetto-Braga, M. R., Leite, A. and Arruda, P. (1992) *Plant Physiol.* **98**, 1139–1147
- Karchi, H., Orit, S. and Galili, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2577–2581
- Gonçalves-Butruille, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A. and Arruda, P. (1996) *Plant Physiol.* **110**, 765–771
- Higashino, K., Tsukada, K. and Lieberman, I. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**, 285–290
- Hutzler, J. and Dancis, J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 62–69
- Higashino, K., Fujioka, M. and Yamamura, Y. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 606–614
- Fellows, F. C. I. and Lewis, M. G. R. (1973) *Biochem. J.* **136**, 329–334
- Hutzler, J. and Dancis, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 42–51
- Dancis, J., Hutzler, J., Woody, N. C. and Cox, R. P. (1976) *Pediatr. Res.* **10**, 686–691
- Arruda, P. and da Silva, W. J. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2687–2689
- Epelbaum, S., McDevitt, R. and Falco, S. C. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 735–748
- Tang, G., Miron, D., Zhu-Shimoni, J. X. and Galili, G. (1997) *Plant Cell* **9**, 1305–1316
- Markowitz, P. J., Chuang, D. T. and Cox, R. P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11643–11646
- Markowitz, P. J. and Chuang, D. T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9353–9358
- Fjellstedt, T. A. and Robinson, J. C. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 536–548
- Fjellstedt, T. A. and Robinson, J. C. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 191–196
- Noda, C. and Ichihara, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **525**, 307–313
- Noda, C. and Ichihara, A. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)* **80**, 1159–1164
- Shinno, H., Noda, C., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **633**, 310–316
- National Research Council (1988) *Nutrient Requirements of Swine*, p. 48, National Academy Press, Washington, DC
- National Research Council (1989) *Recommended Dietary Allowances*, 10th edn., pp. 70–71, National Academy Press, Washington, DC
- Rao, V. V., Pan, X. and Chang, Y.-F. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 221–224
- Dancis, J., Hutzler, J. and Cox, R. P. (1979) *Am. J. Hum. Genet.* **31**, 290–299
- Cederbaum, S. D., Shaw, K. N. F., Dancis, J., Hutzler, J. and Blaskovics, J. C. (1979) *Pediatrics* **95**, 234–238
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- Claros, M. G. and Vincens, P. (1996) *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–780
- McGeoch, D. J. (1985) *Virus Res.* **3**, 271–286
- von Heijne, G. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683–4690
- Nakai, K. and Kanehisa, M. (1992) *Genomics* **14**, 897–911
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Chomczynsky, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Blemings, K. P., Crenshaw, T. D. and Benevenga, N. J. (1998) *J. Nutr.* **128**, 2427–2434
- Jones, E. E. and Broquist, H. P. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 2531–2536
- Ramos, F., Dubois, E. and Piérard, A. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 191–196
- Feller, A., Dubois, E., Ramos, F. and Piérard, A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6411–6418
- Torres, N., López, G., De Santiago, S., Hutson, S. M. and Tovar, A. R. (1998) *J. Nutr.* **128**, 1368–1375
- Chu, S. and Hegsted, D. M. (1976) *J. Nutr.* **106**, 1089–1096
- Muramatsu, K., Takada, R. and Uwa, K. (1984) *Agric. Biol. Chem.* **48**, 703–711
- Blemings, K. P., Crenshaw, T. D., Swick, R. W. and Benevenga, N. J. (1990) *FASEB J.* **4**, A919
- Foster, A. R., Scislowski, P. W. D., Harris, C. I. and Fuller, M. F. (1993) *Nutr. Res.* **13**, 1433–1443
- Miron, D., Ben-Yaacov, S., Karchi, H. and Galili, G. (1997) *Plant J.* **12**, 1453–1458
- Karchi, H., Miron, D., Ben-Yaacov, S. and Galili, G. (1995) *Plant Cell* **7**, 1963–1970
- Ameen, M., Palmer, T. and Oberholzer, V. G. (1987) *Biochem. Int.* **14**, 589–595
- Bledsoe, R. K., Dawson, P. A. and Hutson, S. M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 9–13
- Blemings, K. P., Crenshaw, T. D., Swick, R. W. and Benevenga, N. J. (1994) *J. Nutr.* **124**, 1215–1221
- Scislowski, P. W. D., Foster, A. R. and Fuller, M. F. (1994) *Biochem. J.* **300**, 887–891
- Forsberg, N. E. and Austic, R. E. (1986) *Nutr. Res.* **6**, 191–202

Received 7 May 1999/29 July 1999; accepted 7 September 1999

The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system

Fabio Papes^a, Marcelo J. Surpili^a, Francesco Langone^b, Jose R. Trigo^c, Paulo Arruda^{a,d,*}

^a*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genetica, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

^b*Departamento de Fisiologia e Biofisica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

^c*Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

^d*Departamento de Genetica e Evolucao, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

Received 11 November 2000; revised 12 December 2000; accepted 12 December 2000

First published online

Edited by Guido Tettamanti

Abstract Lysine has long been recognized as an essential amino acid for humans and the lack or low supply of this compound in the diet may lead to mental and physical handicaps. Since lysine is severely restricted in cereals, the most important staple food in the world, the understanding of its biological roles must be a major concern. Here we show that lysine is an important precursor for de novo synthesis of glutamate, the most significant excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. We also show that the synthesis of glutamate from lysine, which is carried out by the saccharopine pathway, is likely to take place in neurons. © 2000 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Lysine; Saccharopine; Amino acid catabolism; Neurotransmitter; Brain

1. Introduction

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system [1]. Although some reactions leading to the synthesis of glutamate have been studied during the last decade, the sources of nitrogen and carbon atoms for de novo synthesis have remained elusive, as has the involvement of astrocytes and neurons in this process [2,3]. Glucose has been described as the main precursor of the carbon skeleton of glutamate [4], whereas the branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) have been suggested as donors of amino groups for the synthesis of ~25% of the glutamate produced within the brain, by the action of the branched-chain aminotransferase (BCAT) in astrocytes [5–8]. However, the amino acids which act as nitrogen donors for the remaining 75% of the glutamate pool have not been identified as yet.

On the other hand, several amino acids have been pointed out as short-term precursors of glutamate, such as glutamine [9], alanine [6,8–10] and aspartate [11]. Glutamine is synthesized from glutamate in astrocytes and oligodendrocytes and then transported into neurons, where it is reconverted to glu-

tamate [9], constituting the well-known glutamate–glutamine cycle.

The saccharopine pathway is the main route for lysine degradation in mammals [12–14] and plants [15,16], and its first two reactions (Fig. 1) are catalyzed by enzymatic activities known as lysine-oxoglutarate reductase (LOR) and saccharopine dehydrogenase (SDH), which reside on a single bifunctional polypeptide (LOR/SDH) [12,13]. LOR/SDH has been detected in a number of mammalian tissues, mainly in the liver and kidney, where it converts lysine into ketone bodies [12,13], and in the rat embryonic nervous system [17]. The net result of the sequential action of LOR and SDH is the transfer of the ϵ -amino group of lysine to glutamate (Fig. 1). This, together with the fact that lysine is present at a high concentration in the brain [18], suggested that the saccharopine pathway could be a putative glutamate-synthesizing route in the mammalian nervous system.

Here we show that the essential amino acid lysine, the availability of which is severely restricted in some of the world's major food staples, is an important precursor for de novo glutamate production in the mammalian central nervous system. We also show that the transfer of amino groups from lysine to glutamate, which occurs via the saccharopine pathway, is likely to take place in neurons.

2. Materials and methods

2.1. Tracing experiments with ¹⁵N-labeled precursors

[ϵ -¹⁵N]-L-lysine (99% atom percent excess), [α -¹⁵N]leucine (98% atom percent excess) and [α -¹⁵N]glutamate (99% atom percent excess) were purchased from Isotech Inc. Cerebellum and cerebral cortex slices from 2 months old C57/Black6 mice were prepared and incubated with ¹⁵N-labeled precursors according to previous studies [6]. Labeled leucine and glutamate were used at final concentrations of 300 μ M, as described by Yudkoff et al. [8]. Labeled lysine was also used at a final concentration of 300 μ M because its concentration in the central nervous system has been shown to be similar to that of leucine [18]. Sample preparation and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were performed as previously reported [8], using a Hewlett-Packard 5971 GC-MS system and a 12 m $\times$ 0.32 mm DB-5 capillary also from Hewlett-Packard. Ion ratios for glutamate and leucine were as detailed elsewhere [8] and different ion ratios were used for lysine (m/z 174/175, 317/318 and 431/432) to analyze its α - and ϵ -amino groups separately. The percentage ¹⁵N-enrichment ('atom percent excess' or APE), corrected for the natural abundances of the isotopes, was determined from those mass ratios [6]. The higher the APE of a given compound, the larger the percentage of its molecules which are labeled with ¹⁵N.

*Corresponding author. Fax: (55)-19-788 1089.
E-mail: parruda@unicamp.br

Abbreviations: LOR, lysine-2-oxoglutarate reductase; SDH, saccharopine dehydrogenase

2.2. RT-PCR and RNA gel blot analyses

Mouse brain and cerebellum RNAs were extracted from 2 months old C57/Black6 animals as previously described [12]. Reverse transcription (RT) was carried out with Superscript II (Gibco BRL), as recommended in the manufacturer's protocol. Oligonucleotides 5'-TAT GGG ACG GTG TTA AGT CGC-3' and 5'-AAA ATC TAT GGA CCC TCC CGT-3', which yield a 300 bp fragment of the mouse LOR/SDH cDNA (GenBank accession number NM013930), were used for the consecutive PCR (1 min at 94°C, 1.5 min at 62°C, 2 min at 72°C; 27 cycles). Oligonucleotides 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CGT-3' and 5'-GAG CCA CCG ATC CAC ACA GAG-3' were used to amplify β -actin as an internal control. Bands were quantified on a FLA-3000 Fluorescent Image Analyzer (Fujifilm). Human multiple tissue poly(A)⁺ Northern blots (Fig. 3b,c) containing RNA samples from donors of varying ages and sex were purchased from Clontech (#7755-1; #7756-1) and hybridized with an SDH-specific probe, corresponding to nucleotides 1540–2235 of the human LOR/SDH cDNA (GenBank NM005763).

2.3. In situ hybridization

Digoxigenin-labeled antisense and sense run-off transcripts were synthesized using a DIG-labeling kit (Boehringer-Mannheim) and a PCR fragment containing 300 bp of the mouse LOR/SDH cDNA (bases 800–1112), which was flanked by T3 and T7 RNA polymerase promoters. In situ hybridization was performed on freshly cut cryosections (10–12 μ m) of brain and cerebellum from C57/Black6 animals [19]. Probe concentrations were ~200 ng/ml of hybridization buffer. Hybridized labeled probes were visualized using alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin Fab fragments (Boehringer-Mannheim) with BCIP/NBT as substrate [19]. Light microscope images were acquired using Ektachrome slide film (Kodak), which was then scanned at high resolution on a SprintScan 35 Plus (Polaroid) and processed electronically for photo-quality hard printing using a KDS 8650 digital printer (Kodak).

3. Results

3.1. Lysine is the precursor of a large proportion of glutamate in the mouse nervous system

To definitely establish the occurrence of the saccharopine pathway in the mammalian brain and to verify which fraction of the glutamate pool in the nervous system is actually derived from lysine via the LOR/SDH-catalyzed reactions, slices of cerebral cortex and cerebellum were incubated with ¹⁵N-labeled lysine (Fig. 2). These incubations were done with lysine labeled in its ϵ -amino group so as to examine the fate of this group alone and, consequently, the participation of LOR/SDH (Fig. 1). In the cerebellum, as expected, labeled lysine was rapidly taken up by the slices: Its isotopic enrichment (APE) reached 40% after 1 h of incubation (Fig. 2a), decreasing afterwards due to the transfer of its ¹⁵N-label to other cellular compounds. Glutamate ¹⁵N-labeling rapidly reached a mean value of approximately 12% APE (Fig. 2a) and was already detectable after 10 min of incubation (Fig. 2a, inset). The results obtained for the cerebral cortex slices were similar (Fig. 2d), although the labeling of glutamate from lysine was lower than in slices from cerebellum (Fig. 2a). Since the incubations were done with lysine concentrations similar to those normally found in the brain extracellular fluid, these results indicate that approximately 33% (40/12) of all glutamate in the central nervous system is likely to be derived from lysine via LOR/SDH. This value could be an underestimate, since the transfer of the α -amino group from lysine to glutamate, which proceeds through the pipecolate pathway (Fig. 1) [20], was not assessed. Hence, lysine is probably a major nitrogen donor for glutamate synthesis in the mammalian central nervous system.

Cerebral cortex and cerebellum slices were also incubated

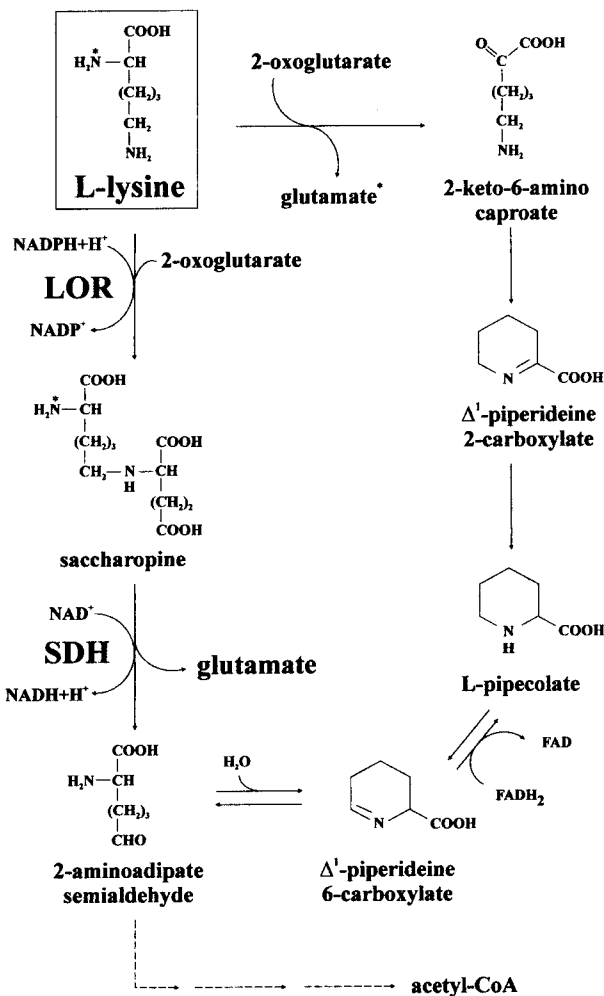


Fig. 1. Lysine catabolic routes in higher eukaryotes. The first two reactions of the saccharopine pathway (left) are catalyzed by the concerted activities of LOR and SDH, the net result of which is the transfer of the ϵ -amino group of lysine to 2-oxoglutarate, resulting in the synthesis of glutamate. The transfer of the α -amino group of lysine (marked by an asterisk) to glutamate occurs through the pipecolate pathway (right). The compound 2-aminoadipate semialdehyde, common to both routes, may be further degraded to acetyl-CoA through a series of reactions (broken lines), although the enzymatic activities involved have not been shown to occur in the brain yet.

with ¹⁵N-labeled glutamate to examine the reversibility of the LOR/SDH-catalyzed reactions (Fig. 2b,e). Although ¹⁵N-labeling of lysine at its α -amino group was detected (Fig. 2b,e), indicating reversibility of the reaction which catalyzes the conversion of lysine into 2-keto-6-aminocaproate in the pipecolate pathway (Fig. 1), no labeling of lysine at its ϵ -amino group was observed. This finding suggests that the reactions catalyzed by LOR and SDH speed the conversion of lysine into glutamate up. As a control, the same set of incubations was performed with ¹⁵N-labeled leucine (Fig. 2c,f) and reproduced already published data showing the production of glutamate from leucine via the enzyme BCAT [8].

3.2. The gene encoding the lysine-degrading enzyme LOR/SDH is conspicuously expressed in the mammalian central nervous system

We have previously isolated cDNAs encoding the mouse

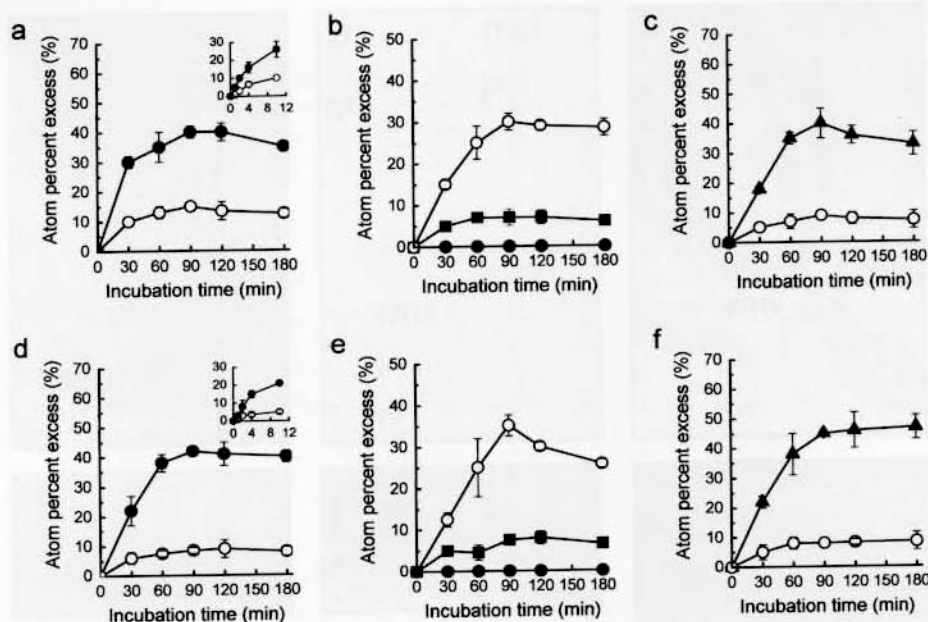


Fig. 2. Metabolism of ^{15}N -labeled amino acids in the brain and cerebellum. Slices of cerebellum (a–c) or cerebral cortex (d–f) were incubated with ^{15}N -labeled lysine (a,d), glutamate (b,e) or leucine (c,f) to assess the role of lysine as a precursor of glutamate in the mammalian brain. The percent ^{15}N -enrichment (atom percent excess) indicates the isotopic enrichment measured in a given amino group, namely the ϵ -amino group of lysine (filled circles), the α -amino group of lysine (filled squares), and the amino groups of glutamate (open circles) and leucine (filled triangles). Insets in a and d show earlier time points for incubations with lysine. Bars denote the S.E.M. of four independent experiments (slices obtained from four animals).

[12] and human LOR/SDH. These cDNAs were used in the analysis of LOR/SDH mRNA expression to demonstrate the occurrence of the saccharopine pathway in the mammalian central nervous system (Fig. 3). There was significant expression of LOR/SDH in the mouse cerebral cortex and cerebellum, with less prominent expression in the hypophyseal gland and in immature embryonic brain (Fig. 3a). In the cerebellum, the expression was even comparable to that in the liver (Fig. 3a). Expression in the cerebral cortex was lower than in the cerebellum, in agreement with the ^{15}N -data (Fig. 2). LOR/SDH expression also occurred in several regions of the human nervous system (Fig. 3b), paralleling the results obtained for mouse (Fig. 3a), with stronger expression in the occipital and frontal lobes and in the cerebellum. Expression was also evident in human embryonic tissues, including brain (Fig. 3c).

3.3. LOR/SDH is located in several regions of the mouse cerebellum, particularly in neurons

In situ hybridization was used to further investigate which regions and cell types of the brain and cerebellum express LOR/SDH (Fig. 4). LOR/SDH expression was found in almost every region of the adult mouse central nervous system, which was in keeping with results described in Fig. 3. The highest expression was seen in the cerebellum, with the granular and molecular cell layers showing lower staining and the Purkinje cell layer possessing the strongest staining (Fig. 4a–c). In the latter, the staining appeared to be concentrated in neuronal (Purkinje) cells (Fig. 4d, as compared with a Nissl-stained control section in Fig. 4e). There was no detectable expression of LOR/SDH in the cerebellar white matter (Fig. 4a). The hippocampus had conspicuous expression of LOR/SDH (Fig. 4f), mainly in the CA1 region, and less significantly in the CA3 region and dentate gyrus. The cerebral cortex also showed strong LOR/SDH expression (Fig. 4g,h), although

somewhat less prominent than that in the cerebellum, in agreement with the RT-PCR results (Fig. 3a). There was no difference in the staining of the several gray matter cortical layers, and the white matter showed no staining at all (Fig. 4g), a finding similar to that seen in the cerebellum (Fig. 4a). In the brainstem, several nuclei possessed strong LOR/SDH expression (Fig. 4i) and, as in the cerebellum, the staining seemed to be located mainly in neurons (Fig. 4j), although concomitant expression in glia could not be ruled out. The

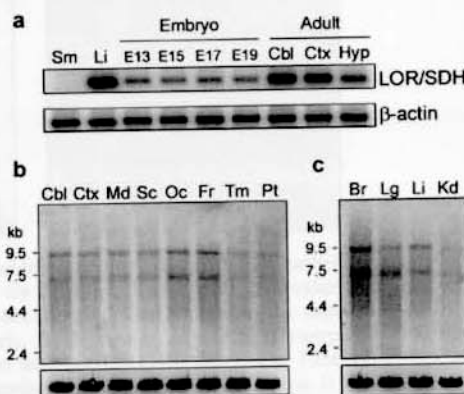


Fig. 3. Expression of LOR/SDH in the mammalian central nervous system. a: RT-PCR analysis showing the expression of LOR/SDH in mouse embryonic brain (stages E13–E19) and adult brain (Cbl, cerebellum; Ctx, cerebral cortex; Hyp, hypophyseal gland) compared to adult liver (Li) and skeletal muscle (Sm). b,c: Northern blot analysis showing the expression of LOR/SDH in human adult brain (b) and human embryo (c). Md, medulla; Sc, spinal cord; Oc, occipital pole; Fr, frontal lobe; Tm, temporal lobe; Pt, parietal lobe; Br, brain; Lg, lung; Kd, kidney. The 9.5 kb and 7.4 kb bands represent distinct LOR/SDH transcripts [12,29]. The bottom panels in b and c represent control hybridizations of the corresponding blots with a GAPDH probe.

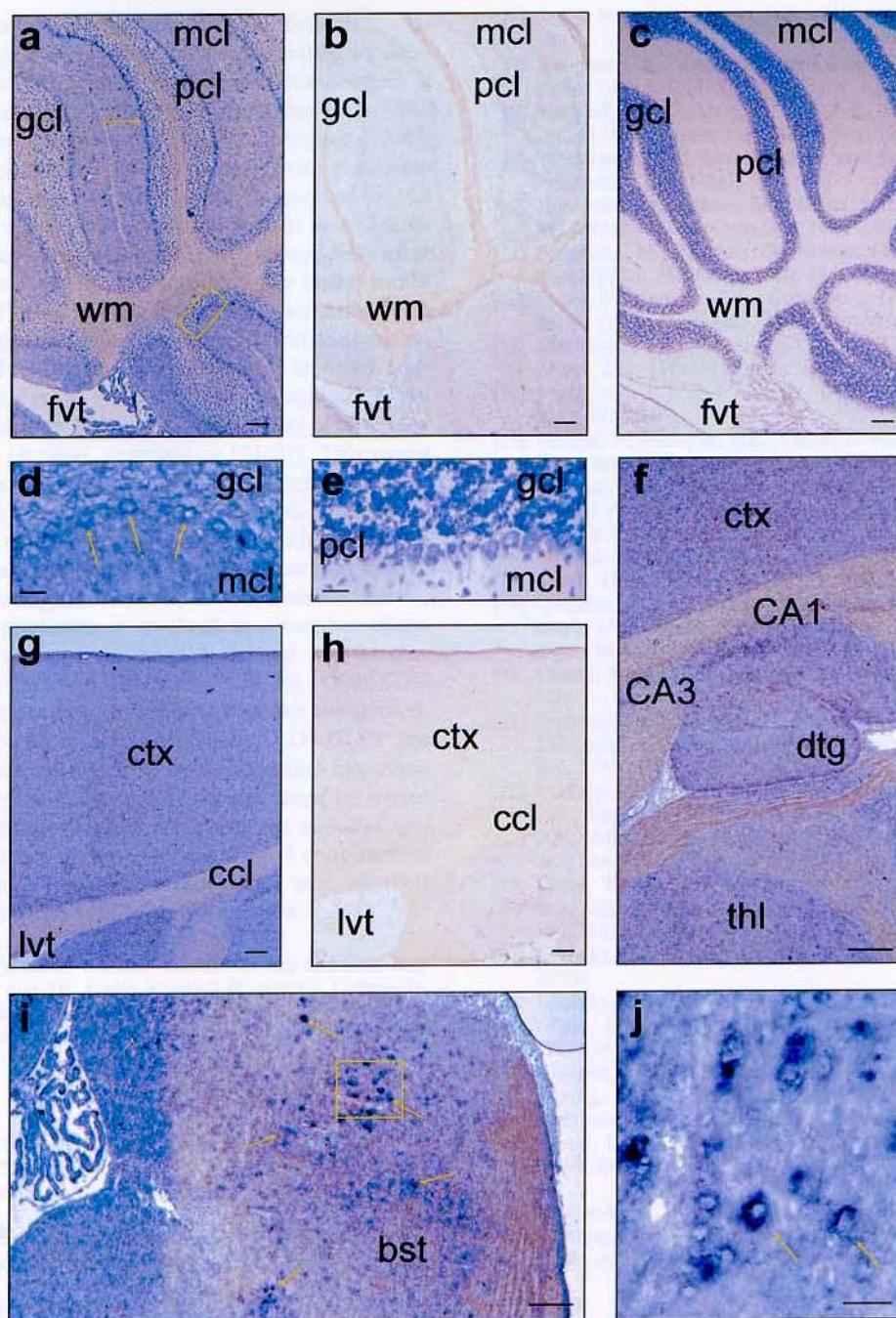


Fig. 4. In situ hybridization showing the expression of LOR/SDH in the mouse central nervous system. a,b: Cerebellum sections hybridized with LOR/SDH antisense (a) and sense (b) probes, showing conspicuous staining in the Purkinje (arrow, pcl), molecular (mcl) and granule (gcl) cell layers. The region delimited by the yellow box in a is shown at a higher magnification in d, and illustrates the expression of LOR/SDH in Purkinje neurons (arrows). c,e: Nissl-stained control sections of a and d, respectively. f: Expression in the hippocampus and in the thalamus (thl), showing strong staining in the CA1 region and less staining in the CA3 region and dentate gyrus (dtg). g,h: Cerebral cortex sections hybridized with LOR/SDH antisense (g) and sense (h) probes, showing uniform expression throughout cortical layers. i: Several brainstem (bst) nuclei with strong expression of LOR/SDH (arrows), mostly in neurons, as detailed in j (a higher magnification of the yellow-boxed region in i). Scale bars in a–c,f–i: 100 μ m; scale bars in d,e,h: 21.5 μ m. Other abbreviations: fvt, fourth ventricle; ccl, corpus callosum; lvt, lateral ventricle.

detection of LOR/SDH in neuronal cells suggests that the saccharopine pathway may be a de novo glutamate-synthesizing route for neurons, in contrast to the BCAT-catalyzed glutamate synthesis, which seems to be restricted to astrocytes [2,3,5].

4. Discussion

Our data show the widespread distribution of the lysine-degrading enzyme LOR/SDH in the mammalian central nervous system and indicate that lysine is an important precursor of the neurotransmitter glutamate (via LOR/SDH) in several brain regions, in adult as well as in embryo. This biosynthesis

was shown to occur in neurons and it is the first time a *de novo* glutamate-synthesizing route has been ascribed to these cells. Moreover, this represents a glutamate synthesis which is independent of the astrocytic glutamate–glutamine cycle. GABAergic neurons may also use this route to produce GABA since this neurotransmitter is derived directly from glutamate [9]. Glutamate-mediated neurotransmission is essential for the proper functioning of the central nervous system and is especially required during brain maturation and immediately after birth, when most cellular communications are being established and refined [1,21–23]. Any substances associated with the production of glutamate in these phases will thus be essential, and their absence may probably result in brain malfunctioning. Indeed, lysine has long been recognized as an essential amino acid, the lack or low supply of which may lead to mental and physical retardations [24–27]. This seems to be a very important issue since the lysine content of cereals, the most consumed staple food in the world, is severely restricted. Thus, the results described here provide a link between glutamate synthesis, neurotransmission, nervous system development and nutritional requirement for lysine.

Moreover, since glutamate is involved in a number of excitatory brain injuries, such as those associated with stroke, hypoglycemia, epilepsy and ischemia [1,28,29], LOR/SDH may turn into an important molecular target for the prevention and therapy of such damages. Lastly, LOR/SDH has been implicated in several kinds of human familial hyperlysinemias [30], some of them frequently accompanied by severe physiological and morphological defects in the nervous system, which will be better understood and treated upon further studies on the human and mouse LOR/SDH and on their participation in glutamate synthesis in the brain.

Acknowledgements: We thank Claudia Morelli for her technical help with ^{15}N experiments, and Dr. Leslie Voshall (Columbia University, New York) for suggestions on *in situ* hybridizations. This work was supported by grants to F.P., M.J.S., J.R.T. and P.A. from FAPESP.

References

- [1] Michaelis, E.K. (1998) *Progr. Neurobiol.* 54, 369–415.
- [2] Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (2000) *J. Nutr.* 130, 1026S–1031S.
- [3] Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. and Robinson, S.R. (1999) *J. Neurosci. Res.* 57, 417–428.
- [4] Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L. and Shulman, R.G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 316–321.
- [5] Yudkoff, M. (1997) *Glia* 21, 92–98.
- [6] Jones, P. and Bachelard, H.S. (1999) *Neurochem. Res.* 24, 1327–1331.
- [7] Kanamori, K., Ross, B.D. and Kondrat, R.W. (1998) *J. Neurochem.* 70, 1304–1315.
- [8] Yudkoff, M., Daikhin, Y., Lin, Z.P., Nissim, I., Stern, J., Pleasure, D. and Nissim, I. (1994) *J. Neurochem.* 62, 1192–1202.
- [9] Westergaard, N., Sonnewald, U. and Schousboe, A. (1995) *Dev. Neurosci.* 17, 203–211.
- [10] Erecinska, M., Nelson, D., Nissim, I., Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (1994) *J. Neurochem.* 62, 1953–1964.
- [11] Erecinska, M., Pleasure, D., Nelson, D., Nissim, I. and Yudkoff, M. (1993) *J. Neurochem.* 60, 1696–1706.
- [12] Papes, F., Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Langone, F. and Arruda, P. (1999) *Biochem. J.* 344, 555–563.
- [13] Markovitz, P.J., Chuang, D.T. and Cox, R.P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11643–11646.
- [14] Markovitz, P.J. and Chuang, D.T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9353–9358.
- [15] Arruda, P., Kemper, E.L., Papes, F. and Leite, A. (2000) *Trends Plant Sci.* 5, 324–330.
- [16] Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Papes, F., Moraes, K.C.M., Leite, A. and Arruda, P. (1999) *Plant Cell* 11, 1981–1993.
- [17] Rao, V.V., Pan, X. and Chang, Y.-F. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 103B, 221–224.
- [18] Smith, Q.R. (2000) *J. Nutr.* 130, 1016S–1022S.
- [19] Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. and Hediger, M.A. (1997) *Nature* 388, 482–488.
- [20] Chang, Y.-F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 174–180.
- [21] Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaya, V., Turski, L. and Olney, J.W. (1999) *Science* 283, 70–74.
- [22] Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J. and Sudhof, T.C. (2000) *Science* 287, 864–869.
- [23] Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M. and Aiba, A. (2000) *Science* 288, 1832–1835.
- [24] Levitsky, D.A. and Strupp, B.J. (1995) *J. Nutr.* 125, 2212S–2220S.
- [25] Levitsky, D.A. and Barnes, R.H. (1970) *Nature* 225, 468–469.
- [26] Chase, H.P., Lindsley, W.F.B. and O'Brien, D. (1969) *Nature* 221, 554–555.
- [27] Abelson, P.H. (1969) *Science* 164, 17.
- [28] During, M.J., Symes, C.W., Lawlor, P.A., Lin, J., Dunning, J., Fitzsimons, H.L., Poulsen, D., Leone, P., Xu, R., Dicker, B.L., Lipski, J. and Young, D. (2000) *Science* 287, 1453–1460.
- [29] Rossi, D.J., Oshima, T. and Attwell, D. (2000) *Nature* 403, 316–321.
- [30] Sacksteder, K.A., Biery, B.J., Morrell, J.C., Goodman, B.K., Geisbrecht, B.V., Cox, R.P., Gould, S.J. and Geraghty, M.T. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1736–1743.

Regulation of lysine catabolism in higher plants

Paulo Arruda, Edson L. Kemper, Fabio Papes and Adilson Leite

Lysine is an essential amino acid for mammals but its concentration in cereals, one of our main food sources, is low. Research over the past 40 years has unraveled many biochemical and molecular details of the aspartic acid pathway, which is the main route of lysine biosynthesis in plants. However, genetic manipulation of this pathway has not been successful at producing high-lysine seeds. This is because lysine, instead of being accumulated, is degraded via the saccharopine pathway. Recent work has increased our knowledge of this pathway, including both the enzymes involved and their regulation.

Lysine is one of the most important essential amino acids, owing to its low concentration in cereals, an important human and animal food source¹. Because of its nutritional relevance, extensive investigations have focused on understanding the regulatory mechanisms that control lysine accumulation in seeds. This involves complex processes including synthesis, incorporation into proteins and degradation.

Lysine is synthesized in plants by a specific branch of the aspartate-family pathway¹. This pathway is regulated by end-product feedback inhibition, with lysine inhibiting aspartate kinase (AK) and dihydrodipicolinate synthase (DHDPS)². AK is the first enzyme in the pathway and is feedback inhibited by lysine and threonine, whereas DHDPS is specific for the lysine branch and is inhibited only by lysine. Several research groups have isolated mutants of AK and/or DHDPS that are less sensitive to feedback inhibition by lysine in an attempt to increase the concentration of this amino acid in vegetative tissues and seeds. Mutant plants with AK that is less sensitive to lysine inhibition overproduce threonine but not lysine¹. The failure to accumulate lysine has been attributed to DHDPS, which is much more sensitive to lysine inhibition than AK (Ref. 2). Transgenic plants overexpressing bacterial, feedback-insensitive AK and DHDPS overproduce threonine³ and accumulate free lysine, but they also display increased lysine degradation⁴. These findings have led to the consensus that lysine catabolism is an important factor to consider when engineering high-lysine plants. However, high free-lysine levels might be toxic to cells and therefore this amino acid might need to be incorporated into lysine-containing proteins.

In cereals, synthesis through the aspartate pathway⁵ is not the only source of lysine for developing seeds; lysine is also translocated in appreciable amounts (~5% of the translocated amino acid pool) from vegetative tissues to developing seeds⁶. However, the amount of lysine-containing proteins in cereal seeds is low, in contrast with the high content of lysine-devoid storage proteins, the prolamins⁷. This could lead to an excess of free lysine but this does not occur because cereal seeds have extensive lysine degradation ability through the saccharopine pathway^{8,9}. Lysine degradation is not only important for controlling free-lysine levels in plant tissues. Recently, several lines of investigation have revealed that lysine degradation might be related to other physiological processes. In this article, we focus on the regulation of lysine catabolism and its implications for the control of lysine content in seeds, as well as its possible role in plant growth, development and response to environmental changes.

Lysine catabolism through the saccharopine pathway

The saccharopine pathway (Fig. 1) is generally regarded as the major metabolic route for lysine degradation in plants. Feeding experiments on cereal seeds using ¹⁴C-lysine showed significant isotope incorporation into α -amino adipic acid and glutamic acid^{10,11} (Fig. 1). This pathway has been confirmed by the demonstration of lysine-ketoglutaric acid reductase (LKR, also referred to as lysine 2-oxoglutaric acid reductase) activity in the immature maize endosperm⁸.

The first two enzymatic steps of the saccharopine pathway are catalyzed by LKR and saccharopine dehydrogenase (SDH), which are separate domains of a bifunctional polypeptide¹² (LKR-SDH). LKR condenses lysine and α -ketoglutaric acid to form saccharopine, which is then hydrolyzed by SDH, giving rise to α -amino adipic- δ -semialdehyde and glutamic acid (Fig. 1). These two enzymatic steps can be viewed as an atypical transamination reaction in which the ϵ -amino group of lysine is transferred to α -ketoglutaric acid to form glutamic acid (Fig. 1). A second glutamic acid is generated in a reaction catalyzed by α -amino adipic acid aminotransferase (AAA), in which the lysine skeleton's α -amino group is transferred from α -amino adipic acid to α -ketoglutaric acid (Fig. 1).

The ¹⁴C-labeling of glutamic acid observed in cereals^{10,11} is not due to the direct production of glutamic acid in the reactions catalyzed by LKR-SDH and AAA, because these steps do not transfer carbon atoms from lysine to glutamic acid (Fig. 1). Instead, the carbon atoms from lysine are directed to acetyl-CoA at the end of the pathway, which then enters the citric acid cycle, generating α -ketoglutaric acid. This can then be used to produce another glutamic acid molecule via amino acid transamination (Fig. 1). Thus, the saccharopine pathway seems to channel the whole lysine skeleton to the production of glutamic acid. This amino acid might have regulatory functions not only in plant growth and development but also in responses to environmental changes, as will be discussed later.

Regulation of lysine catabolism in seeds

Prolamins are the most abundant storage proteins of cereal seeds⁷ and are devoid of lysine¹³. Thus, the demand for free lysine during seed development is likely to be low. Lysine translocation from vegetative tissues⁶ provides more lysine to the seed than is actually required, which could lead to an accumulation of excess lysine. Nevertheless, at least in the developing maize endosperm, the concentration of free lysine is maintained at low levels¹⁴. By contrast, seeds of dicots synthesize large amounts of lysine-containing

storage proteins⁷ and they, therefore, demand large amounts of free lysine.

Both cereals (e.g. maize^{8,14} and rice⁹) and dicots (e.g. *Arabidopsis*¹⁵, tobacco¹⁶ and soybean¹⁷) catabolize lysine through the saccharopine pathway but the physiological role of lysine catabolism might differ between the two plant families. In maize endosperm and tobacco seeds, LKR-SDH activity is temporally coordinated with the rate of storage-protein accumulation and total nitrogen input into the seed^{14,16}. In maize, this agrees with the hypothesis that, because zein (the maize prolamin) synthesis does not demand lysine, the excess of this amino acid should be catabolized. Indeed, the genes encoding members of the zein family, including the abundant 22-kDa zein class, and the gene encoding the maize LKR-SDH have been shown to be under control of Opaque-2, a transcription factor belonging to the basic-domain-leucine-zipper family¹⁸⁻²⁰. Thus, as the rate of zein synthesis increases, owing to the transcriptional activation of their corresponding genes by Opaque-2, LKR activity concomitantly increases, resulting in degradation of the excess lysine in the endosperm cells (Fig. 2).

The *opaque2* mutant has decreased levels of LKR-SDH transcript and protein, and therefore has decreased enzyme activity^{18,21,22}. This might increase the free lysine available to be used for lysine-containing-protein synthesis. A double mutant homozygous for *opaque2* and *ask1* (which encodes an AK that is less sensitive to feedback inhibition by lysine¹) has more free lysine, a lower zein content and more lysine-containing proteins than the *opaque2* single mutant²³. These results suggest that an increase in free lysine owing to the feedback-insensitive characteristics of the AK encoded by *Ask1* and decreased LKR-SDH activity has a direct effect on the synthesis of lysine-containing proteins²³ (Fig. 2).

In dicots, LKR activity has been shown to be coordinated with AK activity during seed development¹⁶. Transgenic tobacco plants overexpressing genes encoding AK and DHDPS enzymes that are less sensitive to feedback inhibition by lysine have shown little effect on free-lysine accumulation because of a dramatic induction of LKR activity¹⁶. Increased lysine degradation through the saccharopine pathway has also been observed in transgenic canola (*Brassica napus*) and soybean plants overexpressing genes that encode feedback-insensitive AK and DHDPS (Ref. 4). Taken together, these results suggest that lysine degradation by LKR-SDH in seeds of both dicots and monocots is likely to fine tune the regulation of free-lysine levels. In addition, the products of lysine degradation might exert some regulatory functions in seed development as well.

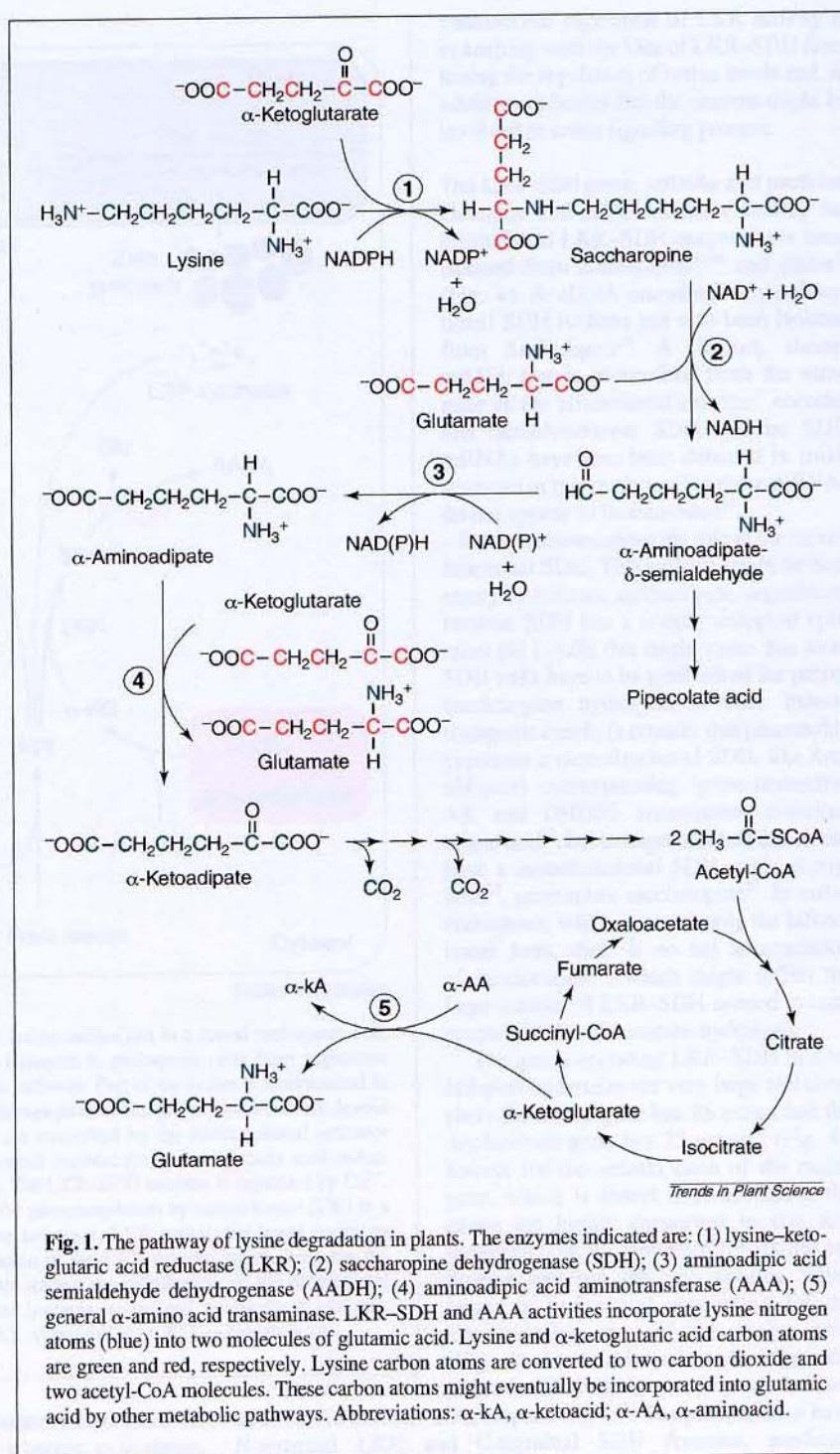
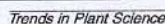


Fig. 1. The pathway of lysine degradation in plants. The enzymes indicated are: (1) lysine-ketoglutaric acid reductase (LKR); (2) saccharopine dehydrogenase (SDH); (3) aminoadipic acid semialdehyde dehydrogenase (AADH); (4) aminoadipic acid aminotransferase (AAA); (5) general α -amino acid transaminase. LKR-SDH and AAA activities incorporate lysine nitrogen atoms (blue) into two molecules of glutamic acid. Lysine and α -ketoglutaric acid carbon atoms are green and red, respectively. Lysine carbon atoms are converted to two carbon dioxide and two acetyl-CoA molecules. These carbon atoms might eventually be incorporated into glutamic acid by other metabolic pathways. Abbreviations: α -kA, α -ketoacid; α -AA, α -aminoacid.

The saccharopine pathway appears to be under complex regulation, particularly at the post-translational level. In tobacco seeds, exogenous lysine administration induces LKR activity by a mechanism involving intracellular Ca^{2+} and protein-phosphorylation cascades²⁴. Moreover, the LKR enzymes of soybean¹⁷ and maize (Fig. 3) are phosphorylated *in vitro* by casein kinase. Dephosphorylation of the native enzyme leads to a decreased LKR activity¹⁷. However, whereas phosphorylation increases LKR activity in a lysine-dependent manner in maize (Fig. 3), it is dephosphorylation that depends on lysine in soybean¹⁷. It is possible that, in



47

encoding monofunctional SDH. In addition, GCN4-like sequences, which are involved in the transcriptional activation of genes involved in nitrogen metabolism in yeast²⁹ and plants³⁰, can be found in both the upstream and the internal promoters of the maize gene, and in the internal promoter of the *Arabidopsis* gene (Fig. 4).

However, Opaque-2-binding sites similar to those found in the promoters of prolamin genes are also present in the upstream and internal promoters of the *Arabidopsis* gene for LKR-SDH, but only in the upstream promoter of the maize LKR-SDH gene (Fig. 4). It is possible that both Opaque-2 and GCN4-like target sequences are involved in the transcriptional regulation of maize and *Arabidopsis* genes for LKR-SDH; if this is true, the absence of an Opaque-2 target sequence in the internal promoter of the maize gene might explain why this species expresses only the bifunctional polypeptide even though *Arabidopsis* expresses bifunctional LKR-SDH and monofunctional SDH from the same gene.

Implication of the saccharopine pathway in growth and development

In mammals, the saccharopine pathway is involved in growth and development. LKR-SDH activity has been detected during embryonic central nervous system development³¹ and mutations in genes encoding LKR-SDH have been associated with a metabolic disorder known as familial hyperlysinemia, whose symptoms include severe developmental abnormalities, such as mental retardation³². Whether the saccharopine pathway has any particular role beyond that of excess lysine degradation in plants remains to be elucidated.

Analysis of the spatial and temporal patterns of LKR-SDH production in maize has revealed that the gene is highly expressed in the endosperm and that this expression is temporally coordinated

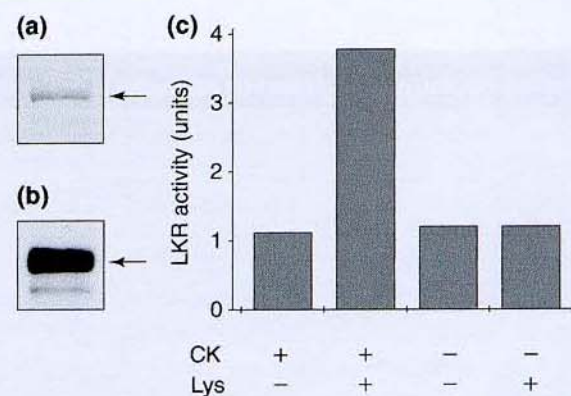


Fig. 3. Phosphorylation of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutaric acid reductase-saccharopine dehydrogenase (LKR-SDH) *in vitro*. Aliquots of purified LKR-SDH were subjected to phosphorylation *in vitro* with casein kinase (CK) in a reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 20 μ M [γ -³²P]ATP (1000 cpm pmole⁻¹) in a final volume of 20 μ l. After 30 min incubation at 30°C, the samples were separated on a 7% SDS-PAGE gel and the gel stained with Coomassie Brilliant Blue (a) and autoradiographed (b). An aliquot of purified LKR-SDH was dephosphorylated with alkaline phosphatase, leading to the complete loss of LKR activity. The dephosphorylated sample was chromatographed through a Superdex 200 gel filtration column and the protein was phosphorylated with CK in the presence (+) and absence (-) of 11 mM lysine (Lys). After phosphorylation, LKR activity was assayed (c).

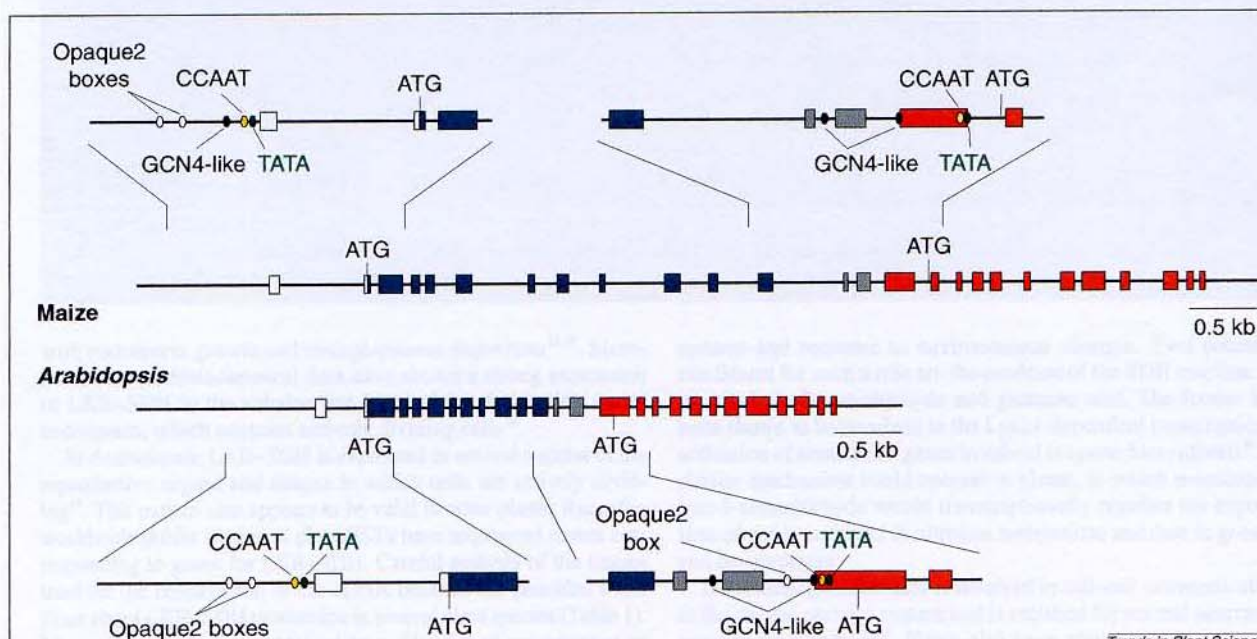


Fig. 4. Structure of coding and regulatory sequences of genes from maize and *Arabidopsis* encoding the bifunctional enzyme lysine-ketoglutaric acid reductase-saccharopine dehydrogenase (LKR-SDH). The gene structure is shown at the center; exons are represented as boxes and introns as lines. Exons belonging to the LKR and SDH regions are blue and red, respectively. Gray boxes represent exons from the interdomain region. The first exons of both the maize or the *Arabidopsis* genes are noncoding (white). The schemes shown above and below are enlargements of selected regions of the maize and *Arabidopsis* genes showing the regulatory TATA and CCAAT sequences, and putative Opaque2 and GCN4 binding sites, in the upstream (left) and internal (right) promoters. The GenBank Accession numbers for the *Arabidopsis* and maize genomic sequences are U95758 and AF271636, respectively.

Table 1. Plant ESTs homologous to the maize lysine- α -ketoglutaric acid reductase and saccharopine dehydrogenase

Nr hits ^a	Species	Variety	Organ	Developmental stage	Accession no. ^b
13	Tomato	TA496	Carpel	5 days pre-anthesis to 5 days post-anthesis	AI486200, AI488742, AI485129, AI486726, AI483615, AI771941, AI486762, AI771935, AI899372, AI488387, AI487518, AI486763, AI771382
7	Tomato	TA496	Callus	25–40-day-old	AI894899, AW034280, AI894874, AW035261, AW035300, AI896768, AW031018
5	Tomato	Rio Grande PtoR	Leaf	4–6-week-old plants treated with mixed elicitors	AW037965, AW093830, AI782310, AW038858, AW096237
4	Tomato	TA496	Pericarp	Red ripe (7–20 days post-breaker)	AW442160, AW224200, AW441656, AW224318
1	Maize	Ohio43	Anthers and pollen	Premeiotic anthers to pollen shed	AW057000
1	Sugarcane	SP3280	Root tip	5 days of stem culturing	*
1	Sugarcane	NA	Leaf roll	NA	AA577639
1	Rice	Milyang23	Immature seed	5 days after pollination	AA753786
1	Rice	Nipponbare	Rice panicle	Flowering stage	C72468
1	Soybean	Williams	Seedling cotyledons	3- and 7-day-old	AW201969
1	Soybean	NA	Mature flowers, field grown plants	NA	AW432287
3	Cotton	NA	Boll abscission zone	NA	AI054604, www.genome.clemson.edu *
6	<i>Arabidopsis</i>	Columbia	Pool of several tissues	NA	AA585912, T04246, T45802, T13618, T88051, N37568
1	<i>Arabidopsis</i>	Columbia	Seedling hypocotyl	3-day-old	W43474

^aNumber of non-redundant EST clones.

^bAll EST clones, except clones marked with an asterisk, were retrieved from the dbEST using the tblastx algorithm (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Abbreviations: Nr, non-redundant; NA, data not available.

with endosperm growth and storage-protein deposition^{14,18}. Moreover, immunohistochemical data have shown a strong expression of LKR-SDH in the subaleurone layer of the developing maize endosperm, which contains actively dividing cells¹⁸.

In *Arabidopsis*, LKR-SDH is expressed in several regions of the reproductive organs and tissues in which cells are actively dividing¹⁵. This pattern also appears to be valid in other plants. Recently, worldwide public studies of plant ESTs have sequenced clones corresponding to genes for LKR-SDH. Careful analysis of the tissues used for the construction of the cDNA libraries has provided some clues about LKR-SDH production in several plant species (Table 1). Most of the ESTs were obtained from libraries of reproductive or other growing tissues such as root tip and immature leaves (the leaf rolls). Leaves of tomato plants treated with a mixture of elicitors also produced LKR-SDH (Table 1), as did leaf discs of oilseed rape submitted to osmotic stress or treated with abscisic acid³³.

These data suggest that there is a link between the operation of the saccharopine pathway and developmental processes in plants and animals. How they relate to each other is not known as yet but it is possible that the products of lysine degradation through the saccharopine pathway are needed to regulate growth, devel-

opment and response to environmental changes. Two potential candidates for such a role are the products of the SDH reaction, α -amino adipic- δ -semialdehyde and glutamic acid. The former has been shown to be involved in the Lys14-dependent transcriptional activation of some yeast genes involved in lysine biosynthesis³⁴. A similar mechanism could operate in plants, in which α -amino adipic- δ -semialdehyde would transcriptionally regulate the expression of genes involved in nitrogen metabolism and thus in growth and development.

In animals, glutamic acid is involved in cell-cell communication in the central nervous system and is required for normal neuronal-synapse development³⁵. Plants also have glutamic acid receptors with strong sequence similarity to animal glutamic acid receptors³⁶. It might be that, over the course of evolution, glutamic acid has been preserved as a biologically active amino acid, functioning in development and cellular communication. In this sense, the saccharopine pathway is unique among amino acid degradation pathways in that it generates at least two molecules of glutamic acid per lysine molecule oxidized (Fig. 1). This pathway might be involved in the transient synthesis of glutamic acid, which then functions as messenger between cells during organ

development or in response to environmental changes. In the case of the osmotic-stress response³³, glutamic acid generated through lysine degradation might also act as a precursor of proline, a well-known osmolyte in plants³⁷.

Conclusions and future prospects

Lysine catabolism might play a central role in controlling free lysine levels in plant cells. The saccharopine pathway, the best characterized and apparently the main route of lysine degradation, appears to be under complex regulation at the transcriptional and post-translational levels. The structure and regulatory properties of the gene for LKR-SDH reveal that it can encode both bifunctional LKR-SDH and monofunctional SDH, a process that involves a putative internal promoter in the middle of the gene. The observation that the possession bifunctional and monofunctional isoforms is species specific suggests that the enzyme has different physiological roles in different taxa. Moreover, the existence of Opaque-2 and GCN4-like binding sites in both the upstream and internal promoters suggests that LKR-SDH might be involved in the regulation of nitrogen balance in plants, by linking lysine degradation to protein synthesis.

It is also clear that these processes are related to seed development and other developmental processes such as root elongation and floral development. The production of this enzyme in processes such as abscission and response to abiotic stress is also important. It is not yet known whether these processes are related to the regulation of free lysine levels. It is possible that, in senescing and stressed tissues, protein hydrolysis leads to transient increases in free lysine concentration, which then needs to be degraded. Alternatively, the saccharopine pathway might be responsible for the synthesis of regulatory molecule(s) involved in developmental processes from root growth to leaf senescence to respond to biotic or abiotic stress.

Detailed studies on LKR-SDH activities in mutants with modified endosperm development, in specific mutants for the aspartic acid pathway and in LKR-SDH mutants or knockouts will soon help to elucidate the steps controlling amino acid and protein synthesis in seeds and determine the precise role of LKR-SDH in plant nitrogen balance and development. Furthermore, the expression of recombinant bifunctional LKR-SDH or the separate LKR and SDH domains will help to determine the enzymatic properties of each domain as well as to identify the inhibitory domain of the enzyme. If the putative regulatory *cis*-acting elements identified in the promoters of the gene for LKR-SDH are proved to be functional, and if *trans*-acting factors (other than Opaque2) that can bind to such *cis*-acting elements are identified, this would help us to understand the signaling process involved in the regulation of lysine catabolism.

Acknowledgements

This work was supported by grants to P.A. and A.L. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP. P.A. and A.L. received research fellowships from CNPq. Postgraduate fellowships were granted to E.L.K. and F.P. by FAPESP.

References

- Azevedo, R.A. *et al.* (1999) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* 46, 395–419
- Galili, G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell* 7, 899–906
- Shaul, O. and Galili, G. (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.* 23, 759–768
- Falco, S.C. *et al.* (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology* 13, 577–582
- Sodek, L. (1976) Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry* 15, 1903–1906
- Arruda, P. and Silva, W. (1979) Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry* 18, 409–410
- Shewry, P.R. and Casey, R. (1999) Seed proteins. In *Seed Proteins* (Casey, R. and Shewry, P.R., eds), pp. 1–10. Kluwer Academic Publishers
- Arruda, P. *et al.* (1982) Lysine-ketoglutaric acid reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 69, 988–989
- Gaziola, S.A. *et al.* (1997) The enzymology of lysine catabolism in rice seeds – isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. *Eur. J. Biochem.* 247, 364–371
- Sodek, L. and Wilson, C.M. (1970) Incorporation of leucine-C¹⁴ and lysine-C¹⁴ into protein in the developing endosperm of normal and opaque2 corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 29–38
- Brandt, A.B. (1975) *In vivo* incorporation of lysine-C¹⁴ into the endosperm of wild type and high lysine barley. *FEBS Lett.* 52, 288–291
- Gonçalves-Butruille, M. *et al.* (1996) Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* 110, 765–771
- Shewry, P.R. and Tatham, A. (1999) The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. In *Seed Proteins* (Casey, R. and Shewry, P.R., eds), pp. 11–33. Kluwer Academic Publishers
- Arruda, P. and Silva, W.J. (1983) Lysine-ketoglutaric acid reductase activity in maize: its possible role on lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* 22, 206–208
- Tang, G. *et al.* (1997) Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutaric acid reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9, 1305–1316
- Karchi, H. *et al.* (1994) Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2577–2581
- Miron, D. *et al.* (1997) *In vitro* dephosphorylation inhibits the activity of soybean lysine-ketoglutaric acid reductase in a lysine-regulated manner. *Plant J.* 12, 1453–1458
- Kemper, E.L. *et al.* (1999) The role of Opaque2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* 11, 1981–1994
- Schmidt, R.J. *et al.* (1992) Opaque2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 4, 689–700
- Cord Neto, G. *et al.* (1995) The involvement of Opaque2 on β -prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol. Biol.* 27, 1015–1029
- Brochetto-Braga, M.R. *et al.* (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase activity in normal and opaque2 maize endosperms. *Plant Physiol.* 98, 1139–1147
- Gaziola, S.A. *et al.* (1999) Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1268–1275
- Azevedo, R.A. *et al.* (1990) Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*1* with opaque-2 maize mutant. *Plant Sci.* 70, 81–90
- Karchi, H. *et al.* (1995) The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein-phosphorylation. *Plant Cell* 7, 1963–1970
- Kemper, E.L. *et al.* (1998) Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur. J. Biochem.* 253, 720–729
- Epelbaum, S. *et al.* (1997) Lysine-ketoglutaric acid reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. *Plant Mol. Biol.* 35, 735–748
- Mazur, B. *et al.* (1999) Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285, 372–375
- Ramos, F. *et al.* (1988) Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a regulatory route of LYS14. *Eur. J. Biochem.* 171, 171–176
- Hinnebusch, A.G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 248–273

- 30 Müller, M. and Knudsen, S. (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J.* 4, 343–355
- 31 Rao, V.V. *et al.* (1992) Developmental changes of L-lysine–ketoglutaric acid reductase in rat brain and liver. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 103, 221–224
- 32 Markovitz, P.J. *et al.* (1984) Familial hyperlysinemias. *J. Biol. Chem.* 259, 11643–11646
- 33 Deleu, C. *et al.* (1999) Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs. *Plant Cell Environ.* 22, 979–988
- 34 Feller, A. *et al.* (1994) Repression of the genes for lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by limitation of Lys14-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6411–6418
- 35 Verhage, M. *et al.* (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864–869
- 36 Lam, H.M. *et al.* (1998) Glutamic acid receptor genes in plants. *Nature* 396, 125–126
- 37 Nanjo, T. *et al.* (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 185–193

Paulo Arruda*, Edson L. Kemper, Fabio Papes and Adilson Leite are at the Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Paulo Arruda is also in the Departamento de Genética e Evolução, IB, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

*Author for correspondence (tel +55 19 788 1137; fax +55 19 788 1089; e-mail parruda@unicamp.br).

Recent progress in reconstructing angiosperm phylogeny

Robert K. Kuzoff and Charles S. Gasser

In the past year, the study of angiosperm phylogeny has moved from tentative inferences based on relatively small data matrices into an era of sophisticated, multigene analyses and significantly greater confidence. Recent studies provide both strong statistical support and mutual corroboration for crucial aspects of angiosperm phylogeny. These include identifying the earliest extant lineages of angiosperms, confirming *Amborella* as the sister of all other angiosperms, confirming some previously proposed lineages and redefining other groups consistent with their phylogeny. This phylogenetic framework enables the exploration of both genotypic and phenotypic diversification among angiosperms.

Understanding the phylogenetic relationships among the principal lineages, or clades (Box 1), of angiosperms is essential for elucidating the evolutionary events that underlie the diversification and ascension of this ecologically dominant plant group. We also need to reconstruct flowering-plant phylogeny to facilitate comparative studies of plant development, metabolism, reproduction, pathology and genomics. For these and other reasons, reconstructing angiosperm phylogeny has been a major goal of plant systematists.

The state of knowledge before 1999

Attempts to unravel the overall phylogeny of angiosperms through cladistic analysis date back more than a decade^{1,2}. Goals of such studies include identifying the composition of major lineages, the relationships among them and the earliest lineages (first-branching clades) of flowering plants. Analyses reported before 1999 were typically based on relatively small non-molecular^{2,3} or single-gene^{4–6} data matrices, with some exceptions^{7,8}. Many results generated during this period constituted noteworthy advances that were largely upheld by subsequent work. For example, several clades were identified, including the eudicots, rosids and asterids; some previously proposed groups, including the Hamamelidae and Dilleniidae, were also shown to be assemblages of distantly related species^{2,4–6,8,9}. However, although a potentially accurate picture of angiosperm phylogeny was taking shape, the plant-systematic and larger biological communities did not place great confidence in it.

In addition to obvious instances of conflict among the earlier studies, systematists were aware of several other problems that tempered

their enthusiasm. One major concern was that statistical support for putative clades and the relationships among them was generally low, if investigated. A second concern was that earlier studies relied exclusively on parsimony as an optimality criterion in data analysis. However, in parsimony analyses of DNA sequences, long branches in a tree separated by short internodes can attract each other artifactually because of chance substitutions of identical nucleotides at homologous sequence positions^{10,11}. Such long-branch attraction can be engendered by using distantly related outgroups. This is because the branch leading to the outgroups attracts another long branch to the base of the ingroup (Box 1). Alternatively it can be engendered by insufficient taxon sampling, because taxonomically large groups are represented only by sparse, long branches in an analysis^{9,12–14}.

A third concern about these earlier studies was that the available analysis protocols and computer programs employed were not well suited to analysing complex phylogenies (those with large numbers of taxa^{5,15,16}). Consequently, analyses of some complex phylogenies had to be stopped by the investigators before they could be completed^{4–6}. Finally, it became clear that the amount of data being analyzed was not sufficient to resolve the phylogenetic problems addressed, both because there were too few phylogenetically informative characters^{9,12,15} and because some of the apparently informative characters were potentially biased and misleading^{9,17}.

Breakthroughs during the past year

Beginning in late 1999, several more-rigorous, multigene studies have been published that address phylogenetic relationships among

3 – DISCUSSÃO

Diferentes evidências sugerem que a via da sacaropina possui outras funções além do seu papel na degradação do aminoácido lisina. A caracterização inicial de uma destas funções constituiu um dos temas centrais desenvolvidos nesta tese: mostrou-se que o catabolismo de lisina está envolvido na geração de mensageiros de comunicação intercelular, de modo especial o ácido glutâmico, cujo reconhecido papel no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso foi revisado no item 1.6. Serão discutidas a seguir algumas evidências da participação da via da sacaropina em processos que requerem comunicação célula-célula, à luz dos resultados apresentados nos artigos nº 2 (Papes *et al.*, 2001) e nº 3 (Arruda *et al.*, 2000).

Conforme destacado anteriormente, a análise da expressão espacial e temporal do gene que codifica LOR/SDH em milho revelou que ele é altamente expresso no endosperma e que sua expressão é coordenada temporalmente ao desenvolvimento deste tecido e à deposição das proteínas de reserva (Kemper *et al.*, 1999). Além disso, dados imunohistoquímicos mostraram uma expressão evidente de LOR/SDH na camada de sub-aleurona no endosperma em desenvolvimento, que contém células em divisão ativa (Kemper *et al.*, 1999).

Em *Arabidopsis*, LOR/SDH é expressa em várias regiões dos órgãos reprodutivos e tecidos em que as células estão ativamente se dividindo (Tang *et al.*, 1997). Este padrão parece ocorrer também em outras plantas, mono e dicotiledôneas (Arruda *et al.*, 2000). Recentemente, projetos públicos de sequenciamento de ESTs ('expressed sequence tags') obtiveram clones de EST correspondendo ao gene LOR/SDH em diversas espécies. Uma análise cuidadosa dos tecidos usados para a construção das bibliotecas de cDNA de onde estes clones foram isolados forneceu algumas pistas sobre a localização de LOR/SDH nos tecidos vegetais (Arruda *et al.*, 2000). A maioria dos clones foi obtida de bibliotecas de órgãos reprodutivos ou de outros tecidos em crescimento, como ponta de raiz e folhas jovens. Outros clones foram obtidos de tecidos em que está ocorrendo algum fenômeno biológico para o qual a comunicação célula-célula é vital, como em folhas submetidas a tratamento com uma mistura de elicitores (Arruda *et al.*, 2000), folhas submetidas a estresse

osmótico (Deleu *et al.*, 1999), a tratamento com o hormônio vegetal ácido abscísico, ou no tecido da zona de abscisão (www.clemson.edu).

Estes dados sugerem que existe uma ligação entre a operação da via da sacaropina e processos que requerem comunicação intercelular em plantas. É possível que os produtos da degradação de lisina pela via da sacaropina sejam necessários para regular tais processos. Dois candidatos para exercer tal função são os produtos da reação de SDH, o semialdeído do ácido aminoadípico (AASA) e o glutamato. O primeiro está envolvido na regulação dos genes que codificam LOR e SDH em leveduras, como descrito no item 1.4.3, podendo portanto operar de modo similar em plantas.

Em animais, o glutamato está envolvido na comunicação célula-célula no sistema nervoso (revisado por Michaelis, 1998; Meldrum, 2000) e é necessário para o desenvolvimento do mesmo (Ikonomidou *et al.*, 1999; Verhage *et al.*, 2000). As plantas também possuem receptores de glutamato (Lam *et al.*, 1998), homólogos aos encontrados no sistema nervoso de mamíferos. É possível, então, que durante a evolução o ácido glutâmico tenha sido mantido como um aminoácido biologicamente ativo, funcionando como mensageiro intercelular em certos processos que requerem comunicação célula-célula, como o desenvolvimento do endosperma. A via da sacaropina poderia ser responsável pela síntese deste mensageiro. Neste sentido, ela é única, uma vez que resulta, em plantas, na síntese de pelo menos duas moléculas de glutamato por molécula de lisina oxidada, sendo os dois grupamentos amino da lisina removidos pelas reações catalisadas por LOR/SDH e aminoadipato aminotransferase (Voet e Voet, 1990). O esqueleto de carbono da lisina é, por sua vez, convertido em acetil-CoA, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico e ser convertido em 2-oxoglutarato, o qual pode originar o esqueleto de carbono do glutamato, conforme apresentado no item 1.6.4. Isto de fato ocorre em plantas, em especial no endosperma de milho (Sodek, 1976). Parece, pois, que toda molécula de lisina é canalizada para a produção de glutamato em plantas.

Em mamíferos, a participação da via da sacaropina na geração de compostos que podem assumir um papel de mensageiro para comunicação intercelular é ainda mais evidente, em especial no que se refere ao glutamato. Foi mostrado no artigo nº 2 (Papes *et al.*, 2001), utilizando monitoramento da dinâmica das reações envolvidas através do uso de

[¹⁵N]lisina, que aproximadamente um terço do glutamato sintetizado dentro dos limites do sistema nervoso tem como doador de nitrogênio a lisina, especificamente o grupamento ε-amino da lisina. Este é transferido para o esqueleto do 2-oxoglutarato pela ação das atividades de LOR e SDH na via da sacaropina (Fig. 1).

Mostrou-se também que a reação catalisada pela enzima LOR/SDH é irreversível (artigo nº 2), significando que a transferência do grupamento amino da lisina para o glutamato representa de fato uma introdução de novos átomos de nitrogênio no sistema nervoso, que constantemente perde grupamentos amino pela desaminação do glutamato (item 1.6.4; Williamson *et al.*, 1967). Foi mostrado que a conversão de lisina em glutamato ocorre tanto no córtex cerebral como no cerebelo, sugerindo que esta é uma via geral para a síntese *de novo* de glutamato no tecido nervoso.

É provável que tanto a lisina como os aminoácidos de cadeia ramificada, em especial a leucina, participem do fornecimento de nitrogênio para a síntese de glutamato. Desta forma, o tecido nervoso não seria dependente de apenas um aminoácido para este processo. Ambos os aminoácidos são candidatos em potencial, não só pelos dados apresentados aqui e por outros (Yudkoff *et al.*, 1994; Yudkoff, 1997) com relação à síntese de glutamato *in vitro*, mas também porque lisina e leucina são bastante abundantes no sistema nervoso e capazes de atravessar rapidamente a barreira hemato-encefálica (Smith, 2000).

Ambas as enzimas envolvidas na transformação de leucina e lisina em glutamato (BCAT e LOR/SDH, respectivamente) estão presentes no sistema nervoso. A BCAT parece estar concentrada principalmente nos astrócitos (Hutson *et al.*, 1995). Por outro lado, a reação de transaminação catalisada por esta enzima ocorre no sentido inverso em neurônios, ou seja, consome glutamato, gerando leucina (Yudkoff *et al.*, 1996a; Yudkoff *et al.*, 1996b). Sendo assim, sua participação na síntese do neurotransmissor *in vivo* parece não ser relevante no compartimento neuronal, de modo que todo o glutamato proveniente da leucina deve vir dos astrócitos e ser transferido aos neurônios pelo ciclo glutamina-glutamato, com as limitações inerentes ao seu funcionamento já discutidas no item 1.6.4.

Demonstrou-se a ocorrência da via da sacaropina e da enzima LOR/SDH no sistema nervoso através do uso de duas técnicas (artigo nº 2: Papes *et al.*, 2001): experimentos de 'Northern Blot' determinaram que o gene *Lor/Sdh* é expresso em diversas áreas do sistema

nervoso adulto, tanto em camundongos como em humanos, de modo especial no córtex cerebral e no cerebelo, corroborando os experimentos com [^{15}N]lisina. A expressão no cerebelo chega mesmo a ser comparável à expressão no fígado, onde a ocorrência da via da sacaropina é predominante e bem conhecida. Experimentos de hibridação *in situ* confirmaram estes resultados, mostrando que, efetivamente, LOR/SDH é expressa em todo o sistema nervoso central de camundongos, estando presente de forma bem evidente no cerebelo. Por outro lado, esta análise determinou que LOR/SDH é expressa de modo particular nos neurônios, como pôde ser visto na camada de células de Purkinje no cerebelo, em alguns núcleos do tronco encefálico e na camada CA1 da formação hipocampal. A presença de LOR/SDH nos neurônios é altamente significativa. Foi dito no item 1.6.4 que o neurônio precisa receber novos grupamentos amino provenientes de fora do sistema nervoso para suprir a demanda de síntese *de novo* de glutamato a longo prazo. Este fornecimento, como dito anteriormente, não pode ser desempenhado no neurônio pela leucina ou pelos outros aminoácidos de cadeia ramificada porque a enzima BCAT que faz a transaminação dos mesmos a glutamato não realiza esta função dentro do compartimento neuronal (Yudkoff *et al.*, 1996a; Yudkoff *et al.*, 1996b; Hutson *et al.*, 1995). Se não fosse pela presença da enzima LOR/SDH neste compartimento, os grupamentos amino do glutamato deveriam vir em última análise do astrócito através do ciclo glutamina-glutamato, com concomitante consumo de ATP (Fig. 3; Hertz *et al.*, 1999). LOR/SDH libera, pois, os neurônios de uma dependência metabólica em relação aos astrócitos, em especial no que se refere à síntese de glutamato. Isto não significa que o astrócito não contribua para a reposição do estoque de glutamato no tecido nervoso, mas indica apenas que os neurônios não dependem exclusivamente da glia para sintetizá-lo.

Assim, os dados apresentados no artigo nº 2 mostram claramente a ocorrência da via da sacaropina no sistema nervoso central de mamíferos adultos, o que está em desacordo com resultados anteriores (Hutzler e Dancis, 1975; Chang, 1976; Giacobini *et al.*, 1980). Estes estudos mostraram que a via da sacaropina é minoritária no tecido nervoso porque não foi possível encontrar sacaropina em extratos de cérebro adulto e porque uma baixa atividade de LOR foi aí detectada. Estes dados não podem, entretanto, ser considerados válidos no presente, uma vez que a sacaropina é um composto pouco abundante em qualquer tecido do organismo, mesmo no fígado, onde LOR/SDH é bastante conspícua

(Higashino *et al.*, 1971). De outra parte, a baixa atividade de LOR medida no cérebro adulto não está de acordo com medições das atividades enzimáticas realizadas recentemente por nosso grupo, utilizando métodos espectrofotométricos sensíveis e precisos, não disponíveis na ocasião em que os dados de Hutzler e Dancis (1975) foram obtidos.

É possível que as vias da sacaropina e do ácido pipecólico atuem em conjunto no sistema nervoso para a degradação de lisina. A via do ácido pipecólico também gera moléculas de glutamato a partir de lisina, sugerindo que a lisina seja responsável pelo fornecimento de grupamentos amino para a síntese de bem mais do que um terço do glutamato encontrado no sistema nervoso (conforme artigo nº 2, em que foi analisado apenas o destino do grupamento ϵ -amino da lisina na geração de glutamato através de LOR/SDH).

A expressão de LOR/SDH foi detectada também no sistema nervoso em desenvolvimento, tanto em camundongos como no ser humano (artigo nº 2), corroborando os dados de Rao *et al.* (1992) que, medindo a atividade de LOR no cérebro de embriões de rato, sugeriram que esta é máxima no sistema nervoso imaturo. Estes autores não detectaram atividade na fração mitocondrial de extrato de cérebros de adultos, em discordância com nossos resultados. Esta diferença deve-se provavelmente ao fato de que a medida da atividade de LOR foi feita utilizando extratos mitocondriais, embora não haja evidência de que a enzima LOR/SDH cerebral esteja concentrada neste compartimento subcelular. Um exemplo claro de uma enzima que está localizada em diferentes compartimentos em tecidos distintos é a própria BCAT, que é citossólica no sistema nervoso (Hutson *et al.*, 1995) e mitocondrial no músculo e no coração (Bledsoe *et al.*, 1997).

De qualquer modo, a expressão de LOR/SDH no cérebro do embrião é bastante importante porque o desenvolvimento do tecido nervoso está baseado em sua capacidade de estabelecer comunicações entre células (Ikonomidou *et al.*, 1999; Verhage *et al.*, 2000). De modo especial, a neurotransmissão glutamatérgica parece ser indispensável para este processo, uma vez que seu bloqueio leva à morte celular por apoptose e à degeneração subsequente em extensas áreas do sistema nervoso em desenvolvimento (Ikonomidou *et al.*, 1999).

Estes fatos sugerem, por outro lado, que limitações na disponibilidade nutricional dos precursores para a síntese de glutamato podem levar a sérios distúrbios ontogenéticos e fisiológicos no desenvolvimento do encéfalo. A essencialidade do suprimento de glicose é bem conhecida, sendo o composto energético preferido pelo tecido nervoso (Erecinska *et al.*, 1988) e o doador do esqueleto de carbono para a síntese de glutamato (Erecinska *et al.*, 1988; Hertz *et al.*, 1999; Daikhin e Yudkoff, 2000). Seguindo este raciocínio, leucina e lisina deveriam ser extremamente importantes e fundamentais. Ambos são aminoácidos essenciais, significando que o organismo não é capaz de realizar síntese líquida destes compostos em situações fisiológicas (Reeds, 2000). Em termos estritamente bioquímicos, apenas a lisina pode ser considerada essencial, uma vez que não há reações que levam à sua síntese em mamíferos (Reeds, 2000), enquanto a leucina pode eventualmente ser produzida pela reação de reaminação (anabólica) catalisada pela BCAT (Yudkoff *et al.*, 1996b). A essencialidade estrita da lisina impõe a absoluta necessidade de sua ingestão através da alimentação. Muitos dos principais alimentos utilizados na alimentação humana e animal ao redor do mundo contêm, entretanto, baixo teor deste aminoácido, como os cereais (Mertz *et al.*, 1964).

Pode-se prever que uma ingestão elevada e exclusiva destas fontes nutricionais leva ao desenvolvimento anormal do sistema nervoso em decorrência do baixo suprimento de nitrogênio (na forma de lisina) para a síntese de glutamato. De fato, é bem conhecido que deficiências de aminoácidos essenciais afetam severamente a gênese do sistema nervoso durante a gestação em humanos e animais, bem como sua maturação pós-natal (Griffin *et al.*, 1977; Austin *et al.*, 1986; Tonkiss e Galler, 1990; Tonkiss *et al.*, 1990; Galler *et al.*, 1994; Levitsky e Strupp, 1995). Tem sido observado que dietas baseadas em milho, pobres em lisina e triptofano, levam à redução da síntese e degradação do neurotransmissor serotonina no cérebro de ratos jovens, bem como da expressão de seus receptores tipo 2 no cérebro de fetos e recém-nascidos (Fernstron *et al.*, 1977; Beas-Zárate *et al.*, 1995). Entretanto, não há uma correlação precisa entre os níveis de triptofano (precursor da serotonina) na dieta e a extensão dos danos encefálicos decorrentes (Beas-Zárate *et al.*, 1995), sugerindo que a deficiência de lisina presente nesta dieta, e não somente a deficiência de triptofano, possa contribuir para os danos observados, como consequência de uma alteração na síntese de glutamato.

Corroborando a hipótese de que a lisina é um precursor importante de glutamato, Velazquez *et al.* (1993) registraram uma significativa diminuição deste neurotransmissor no cerebelo de ratos jovens após submetê-los a uma dieta baseada em milho. É interessante notar que as concentrações de glutamina, leucina e outros aminoácidos de cadeia ramificada, que também são apontados como possíveis fontes de grupos amino para a geração de glutamato, não sofreram alteração em decorrência da dieta (Velazquez *et al.*, 1993), reforçando a hipótese de que a lisina é um importante precursor daquele neurotransmissor.

Parece haver então uma estreita relação entre o catabolismo de lisina pela via da sacaropina e o processo de desenvolvimento do tecido nervoso em mamíferos. Uma evidência a favor desta hipótese é a existência, no ser humano, de distúrbios neurológicos severos e retardamento mental associados a condições genéticas hiperlisinêmicas resultantes de deficiências nas atividades de LOR e SDH (item 1.5; revisadas por Markowitz *et al.*, 1984). Sintomas comumente encontrados em pacientes hiperlisinêmicos incluem convulsões febris constantes na infância, relaxamento permanente dos ligamentos do joelho e cotovelo, ausência de tonicidade na musculatura esquelética, em especial em relação ao tônus postural, expressão facial vaga, hiperatividade, alta irritabilidade, retardamentos físico e mental generalizados, comportamento errático e distrativo, dislexia e outros distúrbios da fala (Woody *et al.*, 1966; Armstrong e Rabinow, 1967; Ghadimi *et al.*, 1967). Casualmente, observaram-se anomalias ósseas graves na face, como mandíbulas e maxilas protrudentes, supercílios proeminentes e presença de pêlos na região supra-nasal, ausência de características sexuais secundárias, pregas simiescas e palato arqueado (Armstrong e Rabinow, 1967; Ghadimi *et al.*, 1967). Ainda resta ser determinado com precisão o envolvimento da via da sacaropina como rota de síntese de glutamato nestes casos, mas vale notar que pacientes com síndrome de Zellweger, doença genética caracterizada pela agênese de peroxissomos, apresentam muitos dos sintomas listados acima (Dancis e Hutzler, 1986; Wanders *et al.*, 1988). Algumas das reações da via do ácido pipecólico ocorrem no interior dos peroxissomos e são sabidamente afetadas nos pacientes com síndrome de Zellweger (Wanders *et al.*, 1988; Mihalik *et al.*, 1989; Ijlst *et al.*, 2000). É possível que tanto nas hiperlisinemias familiares como na síndrome de Zellweger haja alterações na síntese de glutamato a partir de lisina, ocasionando os mesmos sintomas.

Por fim, a enzima LOR/SDH pode representar um importante alvo para o tratamento de distúrbios neurológicos (por exemplo, *status epilepticus*), doenças neurodegenerativas [doença motora neuronal (MND), esclerose amiotrófica lateral (ALS), mal de Parkinson, coreia de Huntington e mal de Alzheimer] e outras condições patológicas ou traumáticas (isquemia cerebral, asfixia perinatal e trauma encefálico) associadas ao glutamato no sistema nervoso central humano (Michaelis, 1998; Chapman, 2000; Meldrum, 2000).

A regulação da expressão do gene *Lor/Sdh* ainda é pouco compreendida. Não é conhecido se ela envolve a participação do semialdeído do ácido aminoadípico, como em leveduras (Feller *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1988). Em plantas, a regulação da expressão deste gene pelo fator de transcrição Opaco2 está sendo estudada no momento. O promotor do gene *Lor/Sdh* de milho contém sítios teóricos de ligação de Opaco2 (Arruda *et al.*, 2000) e foi mostrado que o mutante *opaco2* possui expressão reduzida de LOR/SDH, acompanhada de reduções nas atividades de LOR e SDH e menor taxa de degradação de lisina (Sodek e Wilson, 1970; Arruda e da Silva, 1983; Brochetto-Braga *et al.*, 1992; Kemper *et al.*, 1999). A proteína Opaco2 também regula a expressão das proteínas de reserva do endosperma de milho (Schmidt *et al.*, 1990; Hartings *et al.*, 1989; Kodrzycki *et al.*, 1989), sugerindo-se que ela participa de todo o balanço de nitrogênio e carbono neste tecido (Cord-Neto, 1998; Kemper *et al.*, 1999). É provável que este fator regule todo o desenvolvimento do endosperma, pela coordenação da deposição de proteínas, da degradação e da síntese de aminoácidos (de maneira especial a lisina, que inibe as enzimas da via do aspartato, prejudicando a síntese de outros aminoácidos) e da síntese de substâncias ativas que podem estar regulando a comunicação célula-célula e até mesmo induzindo o crescimento e o desenvolvimento do tecido. Um ponto interessante a ser notado é que as prolaminas (proteínas de reserva), que constituem 80 a 90% das proteínas presentes no endosperma, não possuem resíduos de lisina. É provável que, durante a evolução, genes de prolaminas contendo pouco ou nenhum resíduo de lisina tenham sido positivamente selecionados, já que permitiam que uma maior quantidade de lisina livre estivesse disponível às células do endosperma para a síntese do mensageiro-regulador do desenvolvimento do tecido (glutamato).

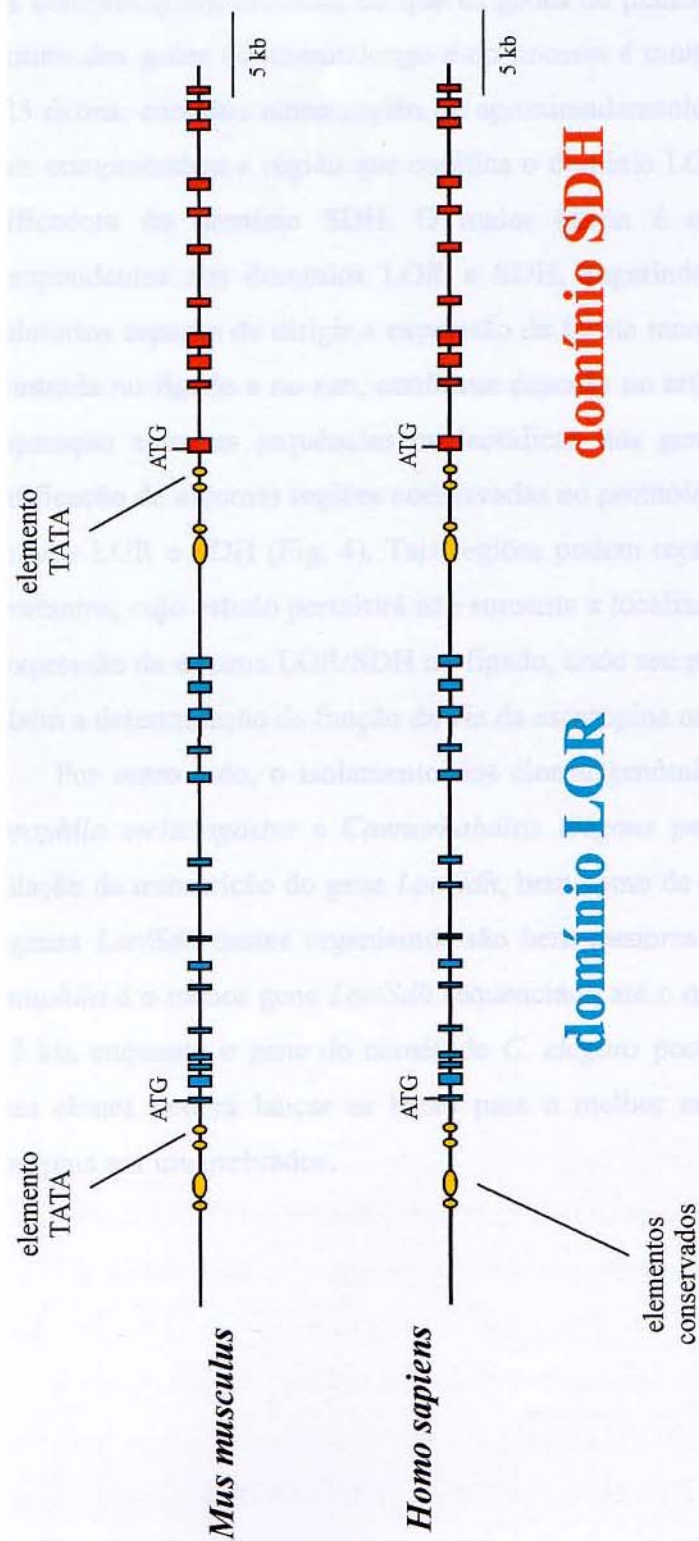


Figura 4: Comparação entre os genes *Lor/Sdh* humano e murino

Os éxons codificando os domínios LOR (azul) e SDH (vermelho) da proteína bifuncional estão representados por retângulos, e os introns, pelas linhas que os conectam. Os elementos TATA do promotor principal (à esquerda) e do possível promotor interno (no centro) também estão representados, bem como os elementos conservados entre as sequências dos promotores do gene humano e do gene de *Mus musculus* (ovais amarelos).

A regulação dos genes *Lor/Sdh* de mamíferos é ainda menos compreendida. Isolamos os genes de *Mus musculus* e *Homo sapiens*, que revelaram ser bem maiores e mais complexos em estrutura do que os genes de plantas ou mesmo de outros animais. A estrutura dos genes do camundongo e do homem é muito semelhante: eles são compostos de 23 éxons, contidos numa região de aproximadamente 70 kb do genoma (Fig. 4). Onze éxons compreendem a região que codifica o domínio LOR e 12 éxons constituem a região codificadora do domínio SDH. O maior íntron é o que separa estas duas regiões correspondentes aos domínios LOR e SDH, sugerindo que ele contém elementos *cis*-regulatórios capazes de dirigir a expressão da forma monofuncional com atividade de SDH encontrada no fígado e no rim, conforme descrito no artigo nº 1 (Papes *et al.*, 1999). Uma comparação entre as sequências nucleotídicas dos genes murino e humano permitiu a identificação de algumas regiões conservadas no promotor destes genes e no íntron entre os domínios LOR e SDH (Fig. 4). Tais regiões podem representar elementos *cis*-regulatórios importantes, cujo estudo permitirá não somente a localização futura de pontos de regulação da expressão da enzima LOR/SDH no fígado, onde seu papel já está bem estabelecido, mas também a determinação da função da via da sacaropina no rim e no cérebro.

Por outro lado, o isolamento dos clones genômicos que codificam LOR/SDH em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* permitirá uma análise detalhada da regulação da transcrição do gene *Lor/Sdh*, bem como da regulação da degradação de lisina. Os genes *Lor/Sdh* destes organismos são bem menores que os de mamíferos: o gene de *Drosophila* é o menor gene *Lor/Sdh* sequenciado até o momento, contendo apenas 8 éxons em 8 kb, enquanto o gene do nemátodo *C. elegans* possui 11 éxons em 12 kb. A análise destes clones poderá lançar as bases para o melhor entendimento da função da via da sacaropina em invertebrados.

4 – CONCLUSÕES

- 1) Foi extraído do fígado de *Mus musculus* (camundongo) um cDNA de aproximadamente 3.300 pares de bases contendo uma única matriz aberta de leitura (ORF) que codifica um polipeptídeo de 926 aminoácidos contendo regiões similares às enzimas LOR e SDH de *Saccharomyces cerevisiae*. Concluiu-se que este polipeptídeo corresponde a uma unidade enzimática bifuncional, possuindo as atividades de lisina-2-oxoglutarato redutase (LOR) e sacaropina desidrogenase (SDH), que catalisam os dois primeiros passos da degradação de lisina pela via da sacaropina.
- 2) O polipeptídeo de 926 aminoácidos codificado por este clone de cDNA tem uma massa molecular teórica de 106 kDa, o que está de acordo com o valor de 115 kDa sugerido por estudos anteriores com a proteína bifuncional LOR/SDH extraída de vários tecidos e órgãos de mamíferos.
- 3) As regiões compreendendo os resíduos de 1 a 455 e 477 a 926 da proteína deduzida da tradução do clone de cDNA isolado do fígado de camundongos apresenta similaridade, respectivamente, às proteínas LOR e SDH de *Saccharomyces cerevisiae*, as quais constituem unidades protéicas monofuncionais. Entre os domínios LOR e SDH do polipeptídeo bifuncional não existe uma região interdomínio, como nas proteínas LOR/SDH de plantas.
- 4) A proteína deduzida da tradução do clone de cDNA murino apresenta 41,6%, 44% e 62,3% de similaridade às proteínas LOR/SDH de milho (*Zea mays*), *Arabidopsis thaliana* e *Caenorhabditis elegans*, respectivamente.
- 5) Em *Mus musculus*, o gene que codifica o polipeptídeo bifuncional LOR/SDH está presente em cópia simples no genoma. Este gene é, portanto, capaz de dirigir a síntese de um mRNA que codifica um polipeptídeo bifuncional LOR/SDH, significando que os genes *Lor* e *Sdh* estão fundidos em mamíferos, à semelhança do que ocorre em plantas e outros animais. No homem, os dados obtidos como parte do Projeto Público do Genoma Humano indicam que há também um gene *Lor/Sdh* presente em cópia única no genoma.
- 6) O fígado e o rim de camundongos apresentam alta expressão do gene *Lor/Sdh*, que dirige a transcrição de duas variantes de mRNA: a espécie de maior tamanho, com 3,4 kb, apresenta sequências correspondentes a ambos os domínios LOR e SDH e codifica o

polipeptídeo bifuncional LOR/SDH; o outro mRNA possui ao redor de 2,4 kb e provavelmente codifica uma variante protéica contendo apenas o domínio SDH e, consequentemente, apenas atividade de desidrogenase.

7) O fígado de *Mus musculus* possui uma forma enzimática bifuncional tetramérica de 474.000 Da, composta de quatro subunidades bifuncionais LOR/SDH de 109.000 Da cada. Além disso, este órgão possui uma forma enzimática monofuncional contendo apenas atividade de SDH, possuindo 73.000 Da, muito provavelmente codificada pelo mRNA de 2,4 kb.

8) No rim, a enzima LOR/SDH está localizada principalmente na região cortical, nas células dos túbulos renais proximais e distais.

9) No fígado de camundongos em jejum, as atividades de LOR e SDH aumentam 52% e 47%, respectivamente, em relação às atividades nos fígados de animais com alimentação *ad libitum*. Os níveis de mRNA de 3,4 kb aumentam 80% no fígado destes animais.

10) Em camundongos injetados intraperitonealmente com lisina, as atividades de LOR e SDH aumentam significativamente no fígado, bem como os níveis de mRNA de LOR/SDH. Embora os níveis de mRNA não sofram modificação em animais injetados intraperitonealmente com sacaropina, a atividade de LOR hepática sofre uma redução de 25% neste caso.

11) Os dados apresentados nos itens (9) e (10) indicam que a degradação de lisina pela via da sacaropina está acoplada aos metabolismos energético e de nitrogênio no organismo, apontando para sua participação efetiva na manutenção da homeostase.

12) Dois métodos computacionais distintos indicam, com alta probabilidade, que o polipeptídeo LOR/SDH codificado pelo cDNA isolado do fígado de camundongos é translocado para a mitocôndria, corroborando dados anteriores mostrando a localização da enzima na matriz mitocondrial no fígado de ratos.

13) O gene *Lor/Sdh* é altamente expresso em várias regiões do sistema nervoso de camundongos, especialmente no cerebelo e no córtex cerebral. No primeiro, os níveis de expressão são comparáveis aos encontrados no fígado. Há expressão também na glândula hipófise e, em menor grau, no cérebro do embrião murino em diversos estágios de desenvolvimento, corroborando dados anteriores mostrando a presença da atividade de LOR no sistema nervoso embrionário.

14) O gene *Lor/Sdh* é altamente expresso em regiões do sistema nervoso central do ser humano adulto, especialmente no cerebelo, na medula espinhal e em algumas regiões corticais. Há expressão também no cérebro do embrião humano.

15) No cerebelo de *Mus musculus*, a expressão de *Lor/Sdh* é bastante evidente na camada de células de Purkinje, estando presente nos neurônios conspícuos desta camada. Há expressão também nas camadas granular e molecular, mas não na substância branca desta região encefálica.

16) A expressão de *Lor/Sdh* no córtex cerebral e no tálamo do camundongo está distribuída por todas as camadas de modo uniforme. Por outro lado, no hipocampo, a expressão é mais evidente na camada CA1 e no giro denteado. Há expressão conspícua de *Lor/Sdh* em diversos núcleos de neurônios do tronco encefálico, estando principalmente localizada em células neuronais.

17) O grupamento ϵ -amino da lisina é utilizado para a síntese de aproximadamente um terço do glutamato produzido no sistema nervoso central adulto do camundongo. O grupamento α -amino da lisina também pode ser utilizado para a síntese de glutamato, tornando a lisina um dos mais importantes doadores de nitrogênio para a geração deste importante neurotransmissor excitatório. Sugerimos que o envolvimento da degradação de lisina na síntese de glutamato possa ser a base molecular para a etiologia de doenças genéticas humanas conhecidas como hiperlisinemias familiares, em que há falta das atividades de LOR e/ou SDH.

18) Em diversas espécies de plantas, há expressão de LOR/SDH em diferentes tecidos em desenvolvimento, em crescimento, sob ação de hormônios ou ainda em condições que requerem comunicação intercelular. Sugerimos que a via da sacaropina seja responsável pela geração de compostos envolvidos na comunicação célula-célula, participando, portanto, de processos de desenvolvimento. Possíveis candidatos a exercer este papel são o glutamato e o semialdeído do ácido α -aminoadípico, ambos produtos da reação catalisada pela atividade de SDH.

19) Os genes *Lor/Sdh* de milho e *Arabidopsis* possuem sítios de interação com o fator transcrricional Opaco2 e elementos TATA tanto no promotor principal como numa região interna, a qual sugerimos tratar-se de um promotor alternativo capaz de direcionar a expressão de uma proteína monofuncional SDH. Análises comparativas entre a sequência

de nucleotídeos dos genes *Lor/Sdh* humano e de camundongo também sugerem que, em mamíferos, existe um promotor alternativo interno capaz de direcionar a expressão de uma isoforma protéica monofuncional contendo atividade de SDH.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Iriki, T., e Funaba, M. (1997) Lysine deficiency in postweaned calves fed corn and corn gluten meal diets. *J. Anim. Sci.*, **75**: 1974-1982.
- Abelson, P.H. (1969) Malnutrition, learning, and behavior. *Science*, **164**: 17.
- Alvarez, G. (1983) Effects of maternal deprivation on neurological functioning. *Soc. Sci. Med.*, **17**: 1097-1105.
- Al-Essa, M.A., Chaves-Carballo, E., e Ozand, P.T. (1999) Hyperpipecolic acidemia: clinical, biochemical, and radiologic observations. *Pediatr. Neurol.*, **21**: 826-829.
- Ameen, M., Palmer, T., e Oberholzer, V.G. (1987) Inhibition of bovine liver lysine-ketoglutarate reductase by urea cycle metabolites and saccharopine. *Biochem. Intl.*, **14**: 589-595.
- Armstrong, M.D., e Rabinow, M. (1967) A case of hyperlysinemia: biochemical and clinical observations. *Pediatrics*, **39**: 546-554.
- Arruda, P., e Silva, W. (1979) Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochem.*, **18**: 409-410.
- Arruda, P., Sodek, L., e da Silva, W.J. (1982) Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, **69**: 988-989.
- Arruda, P., e da Silva, W.J. (1983) Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize; its possible role in the metabolism of developing endosperm. *Phytochem.*, **22**: 2687-2689.
- Arruda, P., Kemper, E.L., Papes, F., e Leite, A. (2000) Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends Plant Sci.*, **5**: 324-330.
- Attwell, D. (2000) Brain uptake of glutamate: food for thought. *J. Nutr.*, **130**: 1023S-1025S.
- Austin, K.B., Bronzino, J., e Morgane, P.J. (1986) Prenatal malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. *Dev. Brain Res.*, **29**: 267-273.
- Azevedo, R.A., Arana, J.L., e Arruda, P. (1990) Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*1* with *Opaque-2* maize mutant. *Plant Sci.*, **70**: 81-90.
- Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.L., e Lea, P.J. (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate-derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry*, **46**: 395-419.
- Bagley, P.R., Tucker, S.P., Nolan, C., Lindsay, J.G., Davies, A., Baldwin, S.A., Cremer, J. E., e Cunningham, V.J. (1989) Anatomical mapping of glucose transporter protein and pyruvate dehydrogenase in rat brain: An immunogold study. *Brain Res.*, **499**: 214-224.
- Banerjee, S.P., Zuck, L.G., Yabionsky-Alter, E., e Lidsky, T.I. (1995) Glutamate agonist activity: implications for antipsychotic drug and schizophrenia. *NeuroReport*, **6**: 2500-2504.
- Battaglioli, G., e Martin, D.L. (1996) Glutamine stimulates gamma-aminobutyric acid synthesis in synaptosomes but other putative astrocyte-to-neuron shuttle substrates do not. *Neurosci. Lett.*, **209**: 129-133.
- Beas-Zárate, C., Ortuno-Sahagún, D., Del Angel Meza, A.R., e Feria-Velasco, A. (1995) Effects of a corn diet during development on [³H]spiperone binding in the brain of rats at the perinatal stage. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112A**: 161-166.

- Biemann, K.** (1962) Mass spectrometry. New York, McGraw Hill. Cap. 5.
- Birnbaumer, L., Campbell, K.P., Catterall, W.A., Harpold, M.M., Hoffmann, F., Horne, W.A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., e Tsien, R.W.** (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **13**: 505-506.
- Bledose, R.K., Dawson, P.A., e Hutson, S.M.** (1997) Cloning of the rat and human mitochondrial branched chain aminotransferases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1339**: 9-13.
- Blemings, K.P., Crenshaw, T.D., Swick, R.W., e Benevenga, N.J.** (1994) Lysine- α -ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase are located only in the mitochondrial matrix in rat liver. *J. Nutr.*, **124**: 1215-1221.
- Blemings, K.P., Crenshaw, T.D., e Benevenga, N.J.** (1998) Mitochondrial lysine uptake limits hepatic liver oxidation in rats fed diets containing 5, 20 or 60% casein. *J. Nutr.*, **128**: 2427-2434.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brand, J.G.** (2000) Receptors and transduction processes for umami taste. *J. Nutr.*, **130**: 942S-945S.
- Brandt, A.B.** (1975) *In vivo* incorporation of lysine-C¹⁴ into the endosperm of wild type and high lysine barley. *FEBS Lett.*, **52**: 288-291.
- Bright, S.W.J., Mifflin, B.J., e Rognes, S.E.** (1982) Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. *Biochem. Genet.*, **20**: 229-243.
- Brochetto-Braga, M.R., Leite, A., e Arruda, P.** (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and *opaque-2* maize endosperms. *Plant Physiol.*, **98**: 1139-1147.
- Brown, G.K., e O'Sullivan, W.J.** (1977) Subunit structure of the orotate phosphoribosyltransferase-orotidylate decarboxylase complex from human erythrocytes. *Biochemistry*, **16**: 3235-3242.
- Bryan, J.K.** (1980) Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In *The biochemistry of plants*. (ed. Mifflin, B.J.), vol. 5, San Diego, Academic Press. pp 403-452.
- Buchli, R., Alberati-Giani, D., Malherbe, P., Kohler, C., Broger, C., e Cesura, A.** (1995) Cloning and functional expression of a soluble form of kynurenine/aminoadipate aminotransferase from rat kidney. *J. Biol. Chem.*, **270**: 29330-29335.
- Butter, A.K., Uryu, K., e Chesselet, M.F.** (1998) A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Dev. Neurosci.*, **20**: 253-262.
- Carpenedo, R., Chiarugi, A., Russi, P., Lombardi, G., Carla, V., Pellicciari, R., Mattoli, L., e Moroni, F.** (1994) Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience*, **61**: 237-244.
- Carson, N.A.J., Scally, B.G., Neil, D.W., e Carré, I.J.** (1968) Saccharopinuria: a new inborn error of lysine metabolism. *Nature*, **218**: 679.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J., e Record, M.T.Jr.** (1991) Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **222**: 281-300.

- Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Dancis, J., Hutzler, J., e Bloskovicz, J.C. (1979) Hyperlysinemia with saccharopinuria due to combined lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase deficiencies presenting as cistinuria. *J. Pediatr.*, **95**: 234-238.
- Cesar, M., e Hamprecht, B. (1995) Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J. Neurochem.*, **64**: 2312-2318.
- Chang, Y.-F. (1976) Pipecolic acid pathway: the major lysine metabolic route in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**: 174-180.
- Chang, Y.-F. (1978) Lysine metabolism in the rat brain: the pipecolic acid forming pathway. *J. Neurochem.*, **30**: 347-354.
- Chang, Y.O., e Soong, C.C. (1975) Effect of feeding diets lacking various essential amino acids on body composition of rats. *Intl. J. Vit. Nutr. Res.*, **45**: 230-238.
- Chapman, A.G. (2000) Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.*, **130**: 1043S-1045S.
- Chase H.P., Lindsley, W.F.B., e O'Brien, D. (1969) Undernutrition and cerebellar development. *Nature*, **221**: 554-555.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., e Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**(24): 5294-5299.
- Chomczynski, P., e Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- Chu, S., e Hegsted, D.M. (1976) Adaptive response of lysine and threonine degrading enzymes in adult rats. *J. Nutr.*, **106**: 1089-1096.
- Claros, M.G., e Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.*, **241**: 779-780.
- Clements, J.D., Lester, R.A.J., Tong, G., Jahr, C.E., e Westbrook, G.L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*, **258**: 1498-1501.
- Cooper, A.J., McDonald, J.M., Gelbard, A.S., Gledhil, R.F., e Duffy, T.E. (1979) The metabolic fate of ¹⁵N-labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.*, **254**: 4982-4992.
- Cord-Neto, G., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Vettore, A.L., Arruda, P., e Leite, A. (1995) The involvement of Opaque 2 on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol. Biol.*, **27**: 1015-1029.
- Cord-Neto, G. (1998) O envolvimento do ativador transcricional Opaco2 no metabolismo de lisina e na síntese de proteínas de reserva durante o desenvolvimento da semente de milho (tese de doutoramento). Orientador: Paulo Arruda. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil. pp. 68-73.
- Daikhin, Y., e Yudkoff, M. (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J. Nutr.*, **130**: 1026S-1031S.
- Dalby, A., e Tsai, Y. (1975) Comparison of lysine in zein and non-zein protein contents in immature and mature maize mutants. *Crop Sci.*, **15**: 513-515.
- Dancis, J., Hutzler, J., Cox, R.P., e Woody, N.C. (1969) Familial hyperlysinemia with lysine-ketoglutarate reductase insufficiency. *J. Clin. Invest.*, **48**: 1447-1452.
- Dancis J., Hutzler, J., Woody, N.C., e Cox, R.P. (1976) Multiple enzyme defects in familial hyperlysinemia. *Pediatr. Res.*, **10**: 686-691.
- Dancis, J., Hutzler, J., e Cox, R.P. (1979) Familial hyperlysinemia: enzyme studies, diagnostic methods, comments on terminology. *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 290-299.

- Dancis, J., e Hutzler, J. (1986) The significance of hyperpipecolatemia in Zellweger syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **38**: 707-711.
- Deleu, C., Coustaut, M., Niogret, M.F., e Larher, F. (1999) Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs. *Plant Cell Environ.*, **22**: 979-988.
- Denton, R.M., e McCormack, J.G. (1988) Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am. J. Physiol.*, **249**: E543-E554.
- Denton, R.M., Randle, P.J., e Martin, B.R. (1972) Stimulation by Ca^{2+} of pyruvate phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.*, **128**: 161-163.
- Denton, R.M., Richards, D.A., e Chin, J.G. (1978) Calcium ions and the regulation of NAD^+ -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem. J.*, **176**: 899-906.
- Diedrick, T.J., Frisch, D.A., e Gegenbach, B.G. (1990) Tissue culture isolation of a second mutant locus for increased threonine accumulation in maize. *Theor. Appl. Genet.*, **79**: 209-215.
- Dienel, G.A., Liu, K., Chowdhury, P., e Cruz, N.F. (1998) Photic stimulation increases glial oxidative metabolism in superior colliculus. *Abstracts, Soc. Neurosci.*, **24**: 1166.
- Dingledine, R., e Jeffrey Conn, P. (2000) Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation. *J. Nutr.*, **130**: 1039S-1042S.
- Dringen, R., e Hamprecht, B. (1998) Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells. *Dev. Neurosci.*, **20**: 401-407.
- During, M.J., Symes, C.W., Lawlor, P.A., Lin, J., Dunning, J., Fitzsimons, H.L., Poulsen, D., Leone, P., Xu, R., Dicker, B.L., Lipski, J., e Young, D. (2000) An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science*, **287**: 1453-1460.
- Dyson, S.E., e Jones, D.G. (1976) Undernutrition and the developing nervous system. *Progr. Neurobiol.*, **7**: 171-196.
- Eden, A., Simchen, G., e Benvenisty, N. (1996) Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J. Biol. Chem.*, **271**: 20242-20245.
- Epelbaum, S., McDevitt, R., e Falco, S.C. (1997) Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. *Plant Mol Biol.*, **35**: 735-48.
- Erecinska, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D., Dagani, F., e Yudkoff, M. (1988) Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with $[^{15}\text{N}]$ glutamate. *J. Neurochem.*, **51**: 892-902.
- Erecinska, M., Zaleska, M.M., Nelson, D., Nissim, I., e Yudkoff, M. (1990) Neuronal glutamine utilization: glutamine/glutamate homeostasis in synaptosomes. *J. Neurochem.*, **54**: 2057-2069.
- Erecinska, M., Pleasure, D., Nelson, D., Nissim, I., e Yudkoff, M. (1993) Cerebral aspartate utilization: near-equilibrium relationships in aspartate aminotransferase reaction. *J. Neurochem.*, **60**: 1696-1706.
- Falco, S.C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T., e Webb, P. (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *BioTechnology*, **13**: 577-582.

- Feller, A., Dubois, A., Ramos, F., e Piérard, A. (1994) Repression of the genes for lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by limitation of *Lys14*-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 6411-6418.
- Fellows, F.C.I., e Lewis, M.H.R. (1973) Lysine metabolism in mammals. *Biochem. J.*, **136**: 329-334.
- Fellows, F.C.I., e Carson, N.A.J. (1974) Enzyme studies in a patient with saccharopinuria: a defect of lysine metabolism. *Pediatr. Res.*, **8**: 42-49.
- Fernström, J.D., e Hirsch, M.J. (1977) Brain serotonin synthesis: reduction in corn-malnourished rats. *J. Neurochem.*, **28**: 877-879.
- Fields, R.D., Yu, C., e Nelson, P.G. (1991) Calcium, network activity and the role of NMDA channels in synaptic plasticity *in vitro*. *J. Neurosci.*, **11**: 134-146.
- Fillenz, M. (1995) Physiological release of excitatory amino acids. *Behav. Brain Res.*, **71**: 51-67.
- Fjellstedt, T.A., e Robinson, J.C. (1975a) Purification and properties of L-lysine-ketoglutarate reductase from human placenta. *Archs. Biochem. Biophys.*, **168**: 536-549.
- Fjellstedt, T.A., e Robinson, J.C. (1975b) Properties of partially purified saccharopine dehydrogenase from human placenta. *Archs. Biochem. Biophys.*, **171**: 191-196.
- Forsberg, N.E., e Austic, R.E. (1986) Effect of dietary and extracellular potassium on lysine metabolism in the rat. *Nutr. Res.*, **6**: 191-202.
- Foster, A.R., Scislowski, P.W.D., Harris, C.I., e Fuller, M.F. (1993) Metabolic response of liver lysine- α -ketoglutarate reductase activity in rats fed lysine limiting or lysine excessive diets. *Nutr. Res.*, **13**: 1433-1443.
- Frankard, V., Ghislain, M., e Jacobs, M. (1991) High threonine producer mutant in *Nicotiana glauca* (Spegg. et Comes). *Theor. Appl. Genet.*, **82**: 273-282.
- Fujita, T., Hada, T., e Higashino, K. (1999) Origin of D- and L-pipecolic acid in human physiological fluids: a study of the catabolic mechanism to pipecolic acid using the lysine loading test. *Clin. Chim. Acta*, **287**: 145-156.
- Gaillardin, C.M., Poirier, L., Ribet, A.-M., e Heslot, H. (1979) General and lysine specific control of saccharopine dehydrogenase levels in the yeast *Saccharomyces lipolytica*. **61**: 473-482.
- Galili, G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell*, **7**: 899-906.
- Galler, J.R., Tonkiss, J., e Maldonado-Irizarry, C.S. (1994) Prenatal protein malnutrition and home orientation in the rat. *Physiol. Behav.*, **55**: 993-996.
- Gamberino, W.C., Berkich, D.A., Lynch, C.J., Xu, B., e LaNoue, K.F. (1997) Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, **69**: 2312-2325.
- Garattini, S. (2000) Glutamic acid: twenty years later. *J. Nutr.*, **130**: 901S-909S.
- Gatfield, P.D., Taller, E., Hinton, G.G., Wallace, A.C., Abdelnour, G.M., e Haust, M.D. (1968) Hyperpipecolatemia: a new metabolic disorder associated with neuropathy and hepatomegaly. A case study. *Can. Med. Ass. J.*, **99**: 1215-1233.
- Gaziola, S.A., Teixeira, C.M.G., Lugli, J., Sodek, L., e Azevedo, R.A. (1997) The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine-2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. *Eur. J. Biochem.*, **247**: 364-371.
- Ghadimi, H., Zischka, R., e Binnington, V.I. (1967) Further studies on hyperlysinemia associated with retardation. *Amer. J. Dis. Child.*, **113**: 146-151.

- Gheorvassaki, E., Papadakis, D., Alikaridis, F., Kephelas, T., Larsen, C., e Palaiologos, G.** (1992) Incorporation of ^{15}N from L-leucine into isoleucine by rat brain cerebral cortex slices. *J. Neurochem. Res.*, **33**: 306-309.
- Giacobini, E., Nomura, Y., e Chmidt-Glenewinkel, T.** (1980) Pipecolic acid: origin, biosynthesis and metabolism in the brain. *Cell. Mol. Biol.*, **26**: 135-146.
- Giacometti, T.** (1979) Free and bound glutamate in natural products. In *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* (eds. Filer, L.J.Jr., Garattini, S., Kare, M.R., Reynolds, W., e Wurtmaned, R.J.). Raven Press, New York, USA. pp. 25-34.
- Gill, R.** (1994) The pharmacology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate antagonists and their role in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc. Brain Metabol.*, **6**: 225-256.
- Goldsmith, P.C.** (2000) Neuroglial responses to elevated glutamate in the medial basal hypothalamus of the infant mouse. *J. Nutr.*, **130**: 1032S-1038S.
- Gonçalves-Butruile, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A., e Arruda, P.** (1996) Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.*, **110**: 765-771.
- Griffin, W.S.T., Woodward, D.J., e Chanda, R.** (1977) Malnutrition-induced alteration of developing Purkinje cells. *Exp. Neurol.*, **56**: 298-311.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., e Hediger, M. A.** (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**: 482-488.
- Habben, J.E., Kirleis, A.W., e Larkins, B.A.** (1993) The origin of lysine-containing protein in *opaque-2* maize endosperm. *Plant Mol. Biol.*, **23**: 825-838.
- Hall, T.R., Wallin, R., Reinhart, G.D., e Hutson, S.M.** (1993) Branched chain aminotransferases. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **268**: 3092-3098.
- Hartings, M., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F., e Thompson, R.** (1989) The *O2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J.*, **8**: 2795-2800.
- Hassel, B., e Brathe, A.** (2000) Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *J. Neurosci.*, **20**: 1342-1347.
- Hayashi, T.** (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.*, **3**: 46-64.
- Hertz, L.** (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Neurobiol.*, **13**: 277-323.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., e Robinson, S.R.** (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.*, **57**: 417-428.
- Higashino, K., Tsukada, K., e Lieberman, I.** (1965) Saccharopine: a product of lysine breakdown by mammalian liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**: 285-290.
- Higashino, K., Fujioka, M., e Yamamura, Y.** (1971) The conversion of L-lysine to saccharopine and α -amino adipate in mouse. *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**: 606-614.
- Higgins, T.J.V.** (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 191-221.
- Himwich, W.A., e Agrawal, H.C.** (1969) Amino acids. In *Handbook for neurochemistry* (ed. Lajtha, A.). Plenum Press, New York, USA. Vol. 1. p. 33.

- Hinnesbuch, A.G.** (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **52**(2): 248-273.
- Hogan, B., Costantini, F., e Lacy, E.** (1986) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., NY, Cold Spring Harbor Press.
- Hogstad, S., Svenneby, G., Torgner, I.A., Kvamme, E., Hertz, L., Schousboe, A.** (1988) Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: Kinetic properties and effects of phosphate, glutamate and ammonia. *Neurochem. Res.*, **13**: 383-388.
- Huck, S., Grass, F., e Hortnagl, H.** (1984) The glutamate analogue aminoadipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect *in vitro*. *J. Neurosci.*, **4**: 2650-2657.
- Hurst, D.L.** (1982) Infant malnutrition and mental retardation. *New Engl. J. Med.*, **306**: 545-546.
- Hutson, S.M., Bledose, R.K., Hall, T.R., e Dawson, P.A.** (1995) Cloning and expression of the mammalian cytosolic branched chain aminotransferase isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **270**: 30344-30352.
- Hutzler, J., e Dancis, J.** (1968) Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **158**: 62-69.
- Hutzler, J., e Dancis, J.** (1975) Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **377**: 42-51.
- Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M. e Aiba, A.** (2000) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science*, **288**: 1832-1835.
- Ijlst, L., de Kromme, I., Oostheim, W., e Wanders, R.J.A.** (2000) Molecular cloning and expression of human L-pipecolate oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**: 1101-1105.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L., Olney, J.W.** (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, **283**: 69-74.
- Im, H.S., Barnes, R.H., e Levitsky, D.A.** (1971) Postnatal malnutrition and brain cholinesterase in rats. *Nature*, **233**: 269-270.
- Jones, P., e Bachelard, H.S.** (1999) Studies on amino acid metabolism in the brain using ¹⁵N-labeled precursors. *Neurochem. Res.*, **24**: 1327-1331.
- Jones, E.E., e Broquist, H.P.** (1965) Saccharopine: an intermediate of the lysine biosynthesis. II. Studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **240**: 2531-2536.
- Kanamori, K., Ross, B.D., e Kondrat, R.W.** (1998) Rate of glutamate synthesis from leucine in rat brain measured *in vivo* by ¹⁵N NMR. *J. Neurochem.*, **70**: 1304-1315.
- Karchi, H., Shaul, O., e Galili, G.** (1993) Seed-specific expression of a bacterial desensitized aspartate kinase increases the production of seed threonine and methionine in transgenic tobacco. *Plant J.*, **3**: 721-727.
- Karchi, H., Shaul, O., e Galili, G.** (1994) Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2577-2581.
- Karchi, H., Miron, D., Ben-Yaacov, S., e Galili, G.** (1995) The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein phosphorylation. *Plant Cell*, **7**: 1963-1970.

- Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Capella, A., Gonçalves-Butruille, M., Azevedo, R.A., e Arruda, P. (1998) Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate-saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur. J. Biochem.*, **253**: 720-729.
- Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Papes, F., Martinez Moraes, K.C., Leite, A., e Arruda, P. (1999) The role of Opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell*, **11**: 1981-1993.
- Kemper, E.L. (1999) Estudo da modulação e do papel funcional da enzima lisina-cetoglutarato redutase em milho (tese de doutoramento). Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil.
- Kemper, E.L., Papes, F., Chiesse da Silva, A., Leite, A., e Arruda, P. (2000) Lysine-oxoglutarate reductase activity in maize endosperm is modulated by a Ca^{2+} -mediated dimerization and lysine-dependent phosphorylation (submetido a *Plant J.*).
- Kristensen, J.D., Svenson, B., e Gordh, T.Jr. (1992) The NMDA receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain*, **51**: 249-253.
- Kodrzycki, R., Boston, R.S., e Larkins, B.A. (1989) The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell*, **1**: 105-114.
- Komuro, H., e Rakic, P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, **26**: 95-97.
- Kurihara, K., e Kashiwayanagi, M. (2000) Physiological studies on umami taste. *J. Nutr.*, **130**: 931S-934S.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., e Meininger, V. (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, **34**: 1425-1431.
- Lam, H.-M., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., e Coruzzi, G. (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, **396**: 125-126.
- Levitsky, D.A., e Barnes, R.H. (1970) Effects of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature*, **225**: 468-469.
- Levitsky, D.A., e Strupp, B.J. (1995) Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J. Nutr.*, **125**: 2212S-2220S.
- Lynen, F. (1964) New perspectives in biology (ed. Sela, M.). Elsevier, Amsterdam. vol.4, pp. 132-146.
- Lyznik, L., Rafalski, A., e Raczynska-Bojoanowska, K. (1985) Amino acid metabolism in the pedicel-placento-chalazal region of the developing maize kernel. *Phytochemistry*, **24**: 425-430.
- Markowitz, P.J., Chuang, D.T., e Cox, R.P. (1984) Familial hyperlysinemias. Purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities. *J. Biol. Chem.*, **259**: 11643-11646.
- Markowitz, P.J., e Chuang, D.T. (1987) The bifunctional amino adipic semialdehyde synthase in lysine degradation. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9353-9358.
- Mauri, I., Maddaloni, M., Lohmer, S., Motto, M., Salamini, I., Thompson, R., e Martegani, E. (1993) Functional expression of the transcriptional activator Opaque-2 of *Zea mays* in transformed yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **241**: 319-326.
- Mawhinney, T.P., Robinett, R.S.R., Atalay, A., e Madson, M.A. (1996) Analysis of amino acids as their tert-butildimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **358**: 231-242.

- Mazur, B., Krebbers, E., e Tingley, S.** (1999) Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science*, **285**:372-375.
- McCormack, J.G., e Denton, R.M.** (1979) The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.*, **180**: 533-544.
- McGeoch, D.J.** (1995) On the predictive recognition of signal peptide sequences. *Virus Res.*, **3**: 271-286.
- McKenna, M.C., Tildon, J.T., Stevenson, J.H., e Kingwell, K.** (1993) Regulation of astrocyte malic enzyme by metabolites. *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, **24**: A54.
- McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J.H., e Zieike, H.R.** (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.*, **66**: 386-393.
- Meldrum, B.S., e Garthwaite, J.** (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. In *Trends in pharmacological sciences*. Elsevier Science Ltd., Cambridge, UK. pp. 379-387.
- Meldrum, B.S.** (1998) The glutamate synapse as a therapeutic target: perspectives for the future. In *Progress in Brain Research* (eds. Ottersen, O.P., Langmoen, I.A., e Gjerstad, L.). Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands. Vol. 116. pp. 413-430.
- Meldrum, B.S., e Chapman, A.G.** (1999) Excitatory amino acid receptors and antiepileptic drug development. In *Advances in neurology* (eds. Delgado-Escueta, A.V., Wilson, W.A., Olsen, R.W., e Porter, R.J.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. Vol. 79. pp. 965-978.
- Meldrum, B.S.** (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.*, **130**: 1007S-1015S.
- Mertz, E.T., Bates, L.S., e Nelson, O.E.** (1964) Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, **145**: 279-280.
- Michaelis, E.K.** (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progr. Neurobiol.*, **54**: 369-415.
- Mihalik, S.J., Moser, H., Watkins, P.A., Poulos, A., Danks, D.M., e Rhead, W.J.** (1989) Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatr. Res.*, **25**: 548-553.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E., e Resnick, O.** (1978) Effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Behav. Rev.*, **2**: 137-230.
- Müller, M., e Knudsen, S.** (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J.*, **4**: 343-355.
- Munro, H.N.** (1979) Factors in the regulation of glutamate metabolism. In *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* (eds. Filer, L.J.Jr., Garattini, S., Kare, M.R., Reynolds, W., e Wurtman, R.J.). Raven Press, New York, USA. pp. 55-68.
- Muramatsu, K., Takada, R., e Uwa, K.** (1984) Adaptive responses of liver and kidney lysine-ketoglutarate reductase and lysine oxidation in rats fed graded-levels of dietary lysine and casein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**: 703-711.
- Murphy, J.J., e Dalby, A.** (1971) Changes in the protein fractions of developing normal and *opaque-2* maize endosperm. *Plant Mol. Biol.*, **23**: 825-838.

- Naito, S., e Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.*, **44**: 99-109.
- Nakai, K., e Kanehisa, M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*, **14**: 897-911.
- Nanjo, T, Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., e Shinozaki, K. (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **18**: 185-193.
- National Research Council (1988) Nutrient requirements of swine. National Academy Press. Washington, D.C., USA. p. 48.
- National Research Council (1989) Recommended dietary allowances. 10^a ed. National Academy Press. Washington, D.C., USA. pp. 70-71.
- Negrutiu, L., Cattoir-Reynaerts, A., Verbruggen, F., e Jacobs, M. (1984) Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana glauca* (Spegazzini et Comes). *Theor. Appl. Genet.*, **68**: 11-20.
- Noda, C., e Ichihara, A. (1976) Control of ketogenesis from amino acids. IV. Tissue specificity in oxidation of leucine, tyrosine and lysine. *J. Biochem.*, **80**: 1159-1164.
- Noda, C., e Ichihara, A. (1978) Purification and properties of L-lysine-ketoglutarate reductase from rat liver mitochondria. *Biochim. biophys. Acta*, **525**: 307-313.
- Nomura, Y., Okuma, Y., Segawa, T., Schmidt-Glenewinkel, T., Giacobini, E. (1979) A calcium-dependent, high potassium-induced release of pipecolic acid from rat brain slices. *J. Neurochem.*, **33**: 803-805.
- Nomura, Y., Schmidt-Glenewinkel, T., e Giacobini, E. (1980) Uptake of piperidine and pipecolic acid by synaptosomes from mouse brain. *Neurochem. Res.*, **5**: 1163-1173.
- Norenberg, M.D., e Martinez-Hernandez, A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, **161**: 303-310.
- Oldendorf, W.H. (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.*, **221**: 1629-1639.
- Orrego, F., e Villanueva, S. (1993) The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neurosci.*, **56**: 539-555.
- Otis, T.S., Kavanaugh, M.P., e Jahr, C.E. (1997) Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science*, **277**: 1515-1518.
- Ozalp, I., Young, V.R., Nagachaudhuri, J., Tontisirin, K., e Scrimshaw, N.S. (1972) Plasma amino acid response in young men given diets devoid of single essential amino acids. *J. Nutr.*, **102**: 1147-1158.
- Ozawa, S., Kamiya, H., e Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **54**: 581-618.
- Papes, F., Kemper, E.L., Cord-Neto, G., Langone, F., e Arruda, P. (1999) Lysine degradation through the saccaropine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse. *Biochem. J.*, **344**: 555-563.
- Papes, F., Surpili, M.J., Langone, F., Trigo, J.R., e Arruda, P. (2001) The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Lett.* (no prelo).

- Pearce, I.A., Cambray-Deakin, M.A., e Burgoyne, R.D. (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulate neurite outgrowth from cerebellar cells. *FEBS Lett.*, **233**: 143-147.
- Peng, L., Schousboe, A., e Hertz, L. (1991) Utilization of α -ketoglutarate as a precursor of glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.*, **16**: 29-34.
- Peng, L., Zhang, X., e Hertz, L. (1994) Alteration in oxidative metabolism of alanine in cerebellar granule cell cultures as a consequence of the development of the ability to utilize alanine as an amino group donor for synthesis of transmitter glutamate. *Dev. Brain Res.*, **79**: 128-131.
- Pow, D.V., e Robinson, S.R. (1994) Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience*, **60**: 355-366.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., e Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.*, **74**(3): 595-636.
- Ramos, F., e Wiame, J.-M. (1985) Mutation affecting the specific regulatory control of lysine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **200**: 291-294.
- Ramos, F., Dubois, E., e Piérard, A. (1988) Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthesis pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a regulatory role of gene *LYS14*. *Eur. J. Biochem.*, **171**: 171-176.
- Rao, V.V., Pan, X., e Chang, Y.-F. (1992) Developmental changes of L-lysine-ketoglutarate reductase in rat brain and liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B**: 221-224.
- Reeds, P.J. (2000) Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.*, **130**: 1835S-1840S.
- Rossi, D.J., Oshima, T., e Attwell, D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, **403**: 316-321.
- Rothstein, M., e Miller, L.L. (1954) The metabolism of L-lysine-6-¹⁴C. *J. Biol. Chem.*, **206**: 243-253.
- Sacksteder, K. A., Biery, B. J., Morrell, J. C., Goodman, B. K., Geisbrecht, B. V., Cox, R. P., Gould, S. J., e Geraghty, M. T. (2000) Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**: 1736-1743.
- Said, A.K., e Hegsted, D.M. (1970) Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. *J.Nutr.*, **100**: 1363-1376.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, NY.
- Sanford Zeskind, P., e Ramey, C.T. (1978) Fetal malnutrition: an experimental study of its consequences on infant development in two caregiving environments. *Child Develop.*, **49**: 115-1162.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J., e Burr, B. (1990) Maize regulatory gene *Opaque-2* encodes a protein with a "leucine zipper" motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 46-50.
- Schmidt-Glenewinkel, T., Nomura, Y., e Giacobini, E. (1977) The conversion of lysine into piperidine, cadaverine and pipecolic acid in the brain and other organs of the mouse. *Neurochem. Res.*, **2**: 619-637.
- Schousboe, A., Hertz, L., Svenneby, G., e Kvamme, E. (1979) Phosphate activated glutaminase activity and glutamine uptake in astrocytes in primary cultures. *J. Neurochem.* **32**: 943-950.

- Scislawski, P.W.D., Foster, A.R., e Fuller, M.F. (1994) Regulation of oxidative degradation of L-lysine in rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, **300**: 887-891.
- Seal, R.P., e Amara, S.G. (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**: 431-456.
- Shank, R.P., Bennett, G.S., Freytag, S.O., e Campbell, G.L. (1985) Pyruvate carboxylase: An astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid transmitter pools. *Brain Res.*, **329**: 364-367.
- Shaul, O., e Galili, G. (1992) Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant J.*, **2**: 203-209.
- Shaul, O., e Galili, G. (1993) Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.*, **23**: 759-768.
- Shewry, P.R., e Tatham, A.S. (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.*, **267**: 1-12.
- Shinno, H., Noda, C., Tanaka, K., e Ichihara, A. (1980) Induction of L-lysine-2-oxoglutarate reductase by glucagon and glucocorticoid in developing and adult rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **633**: 310-316.
- Shors, T.J., Servatius, R.J., Thompson, R.F., Rogers, G., e Lynch, G. (1995) Enhanced glutamatergic neurotransmission facilitates classical conditioning in the freely moving rat. *Neurosci. Lett.*, **186**: 153-156.
- Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L., e Shulman, R. G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 316-321.
- Silva, W.J., e Arruda, P. (1979) Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochemistry*, **18**: 1803-1805.
- Smith, Q.R. (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J. Nutr.*, **130**: 1016S-1022S.
- Sodek, L. (1976) Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **B304**: 341-347.
- Sodek, L. e Wilson, C.M. (1970) Incorporation of leucine-¹⁴C and lysine-¹⁴C into protein in the developing endosperm of normal and *opaque-2* corn. *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**: 29-38.
- Sogawa, H., Oyanagi, K., e Nakao, T. (1977) Periodic hyperammonemia, hyperlysinemia, and homocitrullinuria associated with decreased arginosuccinate synthetase and arginase activities. *Pediatr. Res.*, **11**: 949-953.
- Sonneward, U., Westergaard, N., e Schousboe, A. (1997) Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*, **21**: 56-63.
- Stegink, L.D., Filer, L.J.Jr., Baker, G.L., Mueller, S.M., e Wu-Rideout, M.Y.-C. (1979) Factors affecting plasma glutamate levels in normal adult subjects. In *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* (eds. Filer, L.J.Jr., Garattini, S., Kare, M.R., Reynolds, W., e Wurtmaned, R.J.). Raven Press, New York, USA. pp. 333-351.
- Stern-Boch, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J., e Heinemann, S. F. (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, **13**: 1354-1357.
- Swanson, R.A., e Graham, S.H. (1994) Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism *in vitro*. *Brain Res.*, **664**:94-100.

- Takahama, K., Miyata, T., Hashimoto, T., Okano, Y., Hitoshi, T., e Kase, Y. (1982)** Pipecolic acid: a new type of amino acid possessing bicuculline-sensitive action in the mammalian brain. *Brain Res.*, **239**: 294-298.
- Takamori, S., Seop Rhee, J., Rosenmund, C., e Jahn, R. (2000)** Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, **407**:189-194.
- Tang, G., Miron, D., Zhu-Shimoni, J.X., e Galili, G. (1997)** Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**: 1305-1316.
- Thomas, G.H., Haslam, R.H., Batshaw, M.L., Capute, A.J., Neidengard, L., e Ransom, J.L. (1975)** Hyperpipecolic acidemia associated with hepatomegaly, mental retardation, optic nerve dysplasia, and progressive neurological disease. *Clin. Gen.*, **8**: 376-382.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., e Gibson, T.J. (1994)** Clustal W – improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- Tonkiss, J., e Galler, J.R. (1990)** Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav. Brain Res.*, **40**: 95-107.
- Tonkiss, J., Galler, J.R., Formica, R.N., Shukitt-hale, B., e Timm, R.R. (1990)** Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol. Behav.*, **48**: 73-77.
- Tonkiss, J., Schultz, P., e Galler, J.R. (1994)** An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. *Physiol. Behav.*, **55**: 217-224.
- Torres, N., López, G., De Santiago, S., Hutson, S.M., e Tovar, A.R. (1998)** Dietary protein level regulates expression of the mitochondrial branched-chain aminotransferase in rats. *J. Nutr.*, **128**: 1368-1375.
- Turpin, J.S., e Broquist, H.P. (1965)** *J. Biol. Chem.*, **240**: 2524-2530.
- Velazquez, A., Del Angel, A.R., e Feria-Velasco, A. (1993)** Effects of corn feeding and protein restriction on free amino acid concentration in the rat cerebellum. *Arch. Med. Res.*, **24**: 33-36.
- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J., e Sudhof, T.C. (2000)** Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, **287**: 864-869.
- Voet, D., e Voet, J.G. (1990)** Biochemistry. 1ª edição. John Wiley & Sons, Nova Iorque, Estados Unidos.
- von Heijne, G. (1986)** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 4683-4690.
- Vogel, R., Hamprecht, B., e Wiesinger, H. (1998)** Malic enzyme isoforms in astrocytes: comparative study on activities in rat brain tissue and astroglia-rich primary cultures. *Neurosci Lett.*, **247**:123-126.
- Wanders, R.J.A., Romeyn, G.J., van Roermund, C.W.T., Chutgens, R.B.H., van den Bosch, H., e Tager, J. (1988)** Identification of L-pipecolate oxidase in human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**: 33-38.
- Westergaard, N., Varming, T., Peng, L., Sonnewald, U., Hertz, L., e Schousboe, A. (1993)** Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res.*, **35**:540-545.

- Williamson, J.R., Olson, M.S., Herczeg, B.E., e Coles, H.S. (1967) Control of citrate formation in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.*, **27**:595-600.
- Woody, N.C. (1964) Hyperlysinemia. *Amer. J. Dis. Child.*, **108**: 543.
- Woody, N.C., Hutzler, J., e Dancis, J. (1966) Further studies of hyperlysinemia. *Amer. J. Dis. Child.*, **112**: 577-580.
- Woody, N.C., e Ong, E.B. (1967) Paths of lysine degradation in patients with hyperlysinemia. *Pediatrics*, **40**: 986-992.
- Wu, H.-Q., Urgerstedt, U., e Schwarcz, R. (1995) L- α -Aminoadipic acid as a regulator of kynurenic acid production in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur. J. Pharm.*, **281**: 55-61.
- Yamaguchi, S., e Kimizuka, A. (1979) Psychometric studies on the taste of monosodium glutamate. In *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* (eds. Filer, L.J.Jr., Garattini, S., Kare, M.R., Reynolds, W., e Wurtmaned, R.J.). Raven Press, New York, USA. pp. 35-54.
- Yamashita, K., e Ashida, K. (1969) Lysine metabolism in rats fed lysine-free diet. *J. Nutr.*, **99**: 267-273.
- Yiannikas, C., e Cordato, D. (1996) Familial hyperlysinemia in a patient presenting with progressive spastic paraparesis. *Neurology*, **47**: 846.
- Young, V.R., e Ajami, A.M. (2000) Glutamate: an amino acid of particular distinction. *J. Nutr.*, **130**: 892S-900S.
- Yu, A.C., Drejer, J., Hertz, L., e Schousboe, A. (1983) Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, **41**:1484-1487.
- Yudkoff, M., Nissim, I., e Pleasure, D. (1987) [^{15}N]Aspartic acid metabolism in cultured astrocytes: studies with gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem. J.*, **241**: 193-201.
- Yudkoff, M., Nissim, I., e Pleasure, D. (1988) Astrocyte metabolism of [^{15}N]glutamine: implications for the glutamine-glutamate cycle. *J. Neurochem.*, **51**: 843-850.
- Yudkoff, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D., e Erecinska, M. (1989) Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with [^{15}N]glutamine. *J. Neurochem.*, **53**: 632-640.
- Yudkoff, M., Nissim, I., e Hertz, L. (1990) Precursors of glutamic acid nitrogen in primary neuronal cultures: studies with ^{15}N . *Neurochem. Res.*, **15**: 1191-1196.
- Yudkoff, M., Nissim, I., Nelson, D., Lin, Z.-P. e Erecinska, M. (1991) Glutamate dehydrogenase reaction as a source of glutamic acid in synaptosomes. *J. Neurochem.*, **57**: 153-160.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Lin, Z.-P., Nissim, I., Stern, J., Pleasure, D., e Nissim, I. (1994) Inter-relationships of leucine and glutamate in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, **62**: 1192-1202.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Grustein, L., Nissim, I., Stern, J., Pleasure, D., e Nissim, I. (1996a) Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. *J. Neurochem.*, **66**: 378-385.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nelson, D., Nissim, I., e Erecinska, M. (1996b) Neuronal metabolism of branched-chain amino acids: flux through the aminotransferase pathway in synaptosomes. *J. Neurochem.*, **66**: 2136-2145.
- Yudkoff, M. (1997) Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia*, **21**: 92-98.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R., e Nissim, I. (1997) Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem.*, **69**: 682-692.

- Yunes, J.A., Cord Neto, G., da Silva, M., Leite, A., Ottoboni, L.M.M., e Arruda, P.** (1994) The transcriptional activator Opaque2 recognizes two different target sequences in the 22-kD-like α -prolamin genes. *Plant Cell*, **6**: 237-249.
- Zacharias, E.M., Thompson, J.F., e Steward, F.C.** (1952) The detection, isolation and identification of (-)-pipecolic acid as a constituent of plants. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**: 2949-2950.
- Zenick, H., Brown, R.V., e Wright, D.C.** (1973) Effects of experimentally induced hyperlysinemia on maze learning in mice. *Physiol. Behav.*, **11**: 429-433.