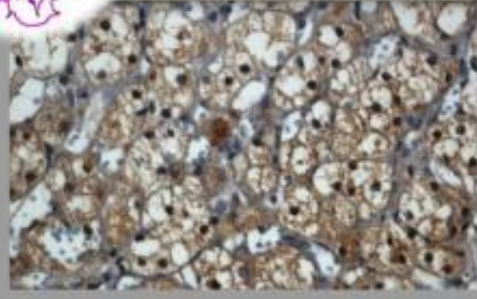
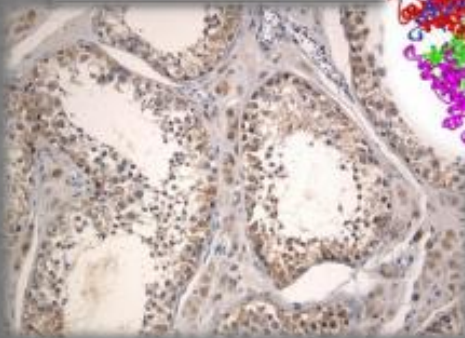
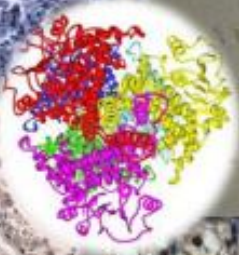
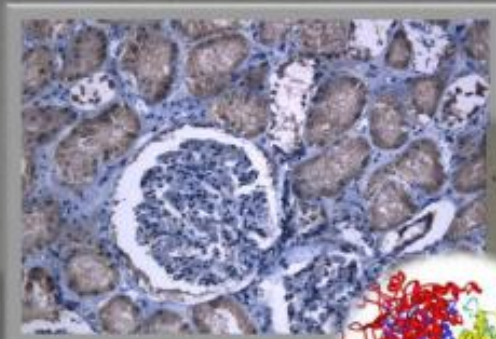


*Μελέτη έκφρασης της Γλουταμικής
Αφυδρογονάσης τύπου II (hGDH2)
σε ανθρώπινους ιστούς.*



ΡΑΝΙΑ ΤΖΩΡΤΖΗ 1403
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Κ. ΣΠΑΝΑΚΗ
ΥΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Κ. ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

2012



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ράνια Τζώρτζη

A.M. 1403

*“Μελέτη έκφρασης της Γλουταμικής αφυδρογονάσης
τύπου II (hGDH2) σε ανθρώπινους ιστούς.”*

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σπανάκη Κλεάνθη

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Σιδηροπούλου Κυριακή

Σχολή Επιστημών Υγείας - Τμήμα Ιατρικής

Εργαστήριο Νευρολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για όλους εκείνους που με στήριξαν με κάθε τρόπο και κάθε κόπο. Λίγα λόγια ευχαριστώ, στην καθηγήτρια μου, Κα Σπανάκη, για το ταξίδι που κάναμε μαζί στον κόσμο της επιστήμης, της εργαστηριακής έρευνας, της γνώσης. Για τους φίλους /συνεργάτες που με έμαθαν να συμπεριφέρομαι, να σκέφτομαι και να ενεργώ στα δύσκολα, αλλά και στα εύκολα, σε κείνους που με την αγάπη τους με έκαναν καλύτερο άνθρωπο· η Ρένα, η Παυλίνα, ο Πασχάλης, η Λένα, η Γιοβάννα, ο Κωστής, η Μαρία.

Αλλά πάνω από όλα σε κείνους που μου πρόσφεραν την παιδεία και το υπόβαθρο να φτάσω ως εδώ, ως το τέλος, ως τη νέα αρχή κι ως την κάθε νέα αρχή της ζωής μου. Για την αστείρευτη αγάπη τους, την υπομονή κι επιμονή τους. Λένε πως στην οικογένεια δεν λένε ευχαριστώ. Εγώ θα πω σας αγαπώ. Και σας αφιερώνω...

*Στους υπέροχους γονείς μου
και στον αδερφό μου,
Γιάννη...*

Ηράκλειο, 28 Φεβρουαρίου 2012.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή..... σελ. 3

Μεθοδολογία..... σελ. 24

Αποτελέσματα..... σελ.42

Συζήτηση..... σελ. 54

Βιβλιογραφία..... σελ. 61

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

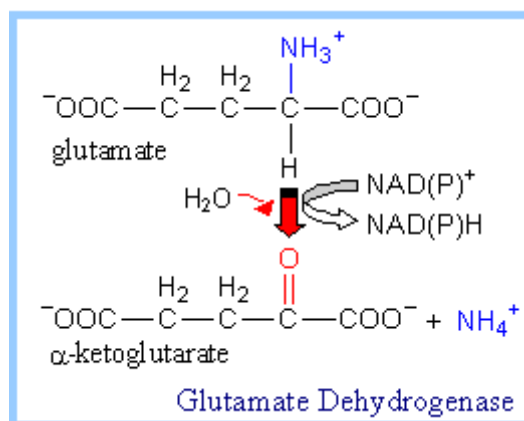
Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) κατέχει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος, του κύριου διεγερτικού νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ. Στον άνθρωπο έχουν κλωνοποιηθεί δύο γονίδια, το *GLUD1* που εκφράζεται παντού και το *GLUD2*, που εκφράζεται, (σύμφωνα με δεδομένα από μελέτες RNA) στον νευρικό και ορχικό ιστό. Εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους αλλά διαφέρουν στις λειτουργικές τους ιδιότητες. Μέχρι τώρα, δεν έχει καταστεί δυνατόν να διαχωριστούν οι δύο ισοπρωτεΐνες και να ταυτοποιηθεί η παρουσία/έκφρασή της hGDH2 σε επίπεδο ιστού, κυττάρων ή υποκυτταρικών δομών. Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης hGDH2 σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ιστούς χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα ειδικό για την hGDH2 που αναπτύχθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο και καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό της από την hGDH1. Στην παρούσα διπλωματική, θα μελετηθεί η έκφραση της hGDH2 σε ανθρώπινους ιστούς με τεχνικές ανοσοαποτύπωσης και ανοσοϊστοχημείας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κεφάλαιο αυτό διαιρείται θεματικά σε δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στη λειτουργία, στις μορφές και στην έκφραση/εντόπιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών. Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται οι ιδιότητες και η λειτουργία της hGDH2, ο ρόλος της στην αιτιοπαθογένεια των νόσων Πάρκινσον και Κατά Πλάκας Σκλήρυνση, καθώς επίσης και τα υπάρχοντα δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο.

A.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (glutamate dehydrogenase, GDH) καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό, χρησιμοποιώντας NAD ή/και NADP ως συνένζυμα (Smith και συν, 1975). Η αντίδραση αυτή συνδέει τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτόν των υδατανθράκων, καθώς το α-κετογλουταρικό είναι σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλου Krebs). Πράγματι, το ένζυμο έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, την ομοιόσταση ενέργειας, ενώ συμμετέχει και στον κύκλο της ουρίας (Hudson and Daniel, 1993).



Εικόνα 1 Η αντίδραση της οξείδωσης του γλουταμικού προς α-κετογλουταρικό και η αμμωνία που καταλύεται από τη γλουταμική αφυδρογονάση GDH.

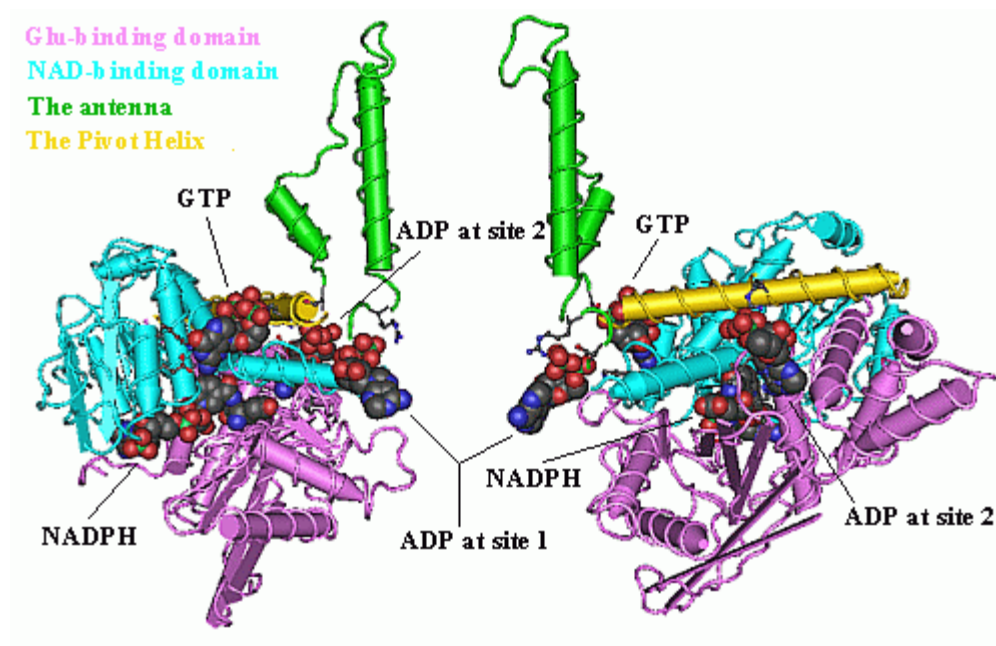
Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς, γεγονός που αναδεικνύει και τη σπουδαιότητά τους. Διακρίνονται 3 κύριοι τύποι GDH ανάλογα με τη χρήση NAD(H) ή NADP(H) ως συνενζύμου: αυτές που είναι ειδικές για NAD, αυτές που χρησιμοποιούν εκλεκτικά το NADP, και τέλος οι GDH διπλής ειδικότητας που δύνανται να χρησιμοποιήσουν και τα δύο συνένζυμα. Οι πρώτοι δύο τύποι (μονής ειδικότητας ένζυμα) απαντώνται κυρίως στους μικροοργανισμούς στους οποίους η αντίδραση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού (καταβολική οδός) καταλύεται συνηθέστερα από ειδικές για NAD GDH, ενώ η αναβολική αντίδραση της σύνθεσης του γλουταμικού από α-κετογλουταρικό και αμμωνία καταλύεται από ειδικές για NADP GDH. Η δυνατότητα χρησιμοποίησης είτε NAD είτε NADP για την κατάλυση της αντίδρασης προς τη πλευρά της

οξειδωσης ή της σύνθεσης γλουταμικού αντίστοιχα, αποτελεί χαρακτηριστικό των GDH κυρίως των ζωικών κυττάρων. Παρά το γεγονός ότι θερμοδυναμικά η αντίδραση της GDH ευνοείται προς την κατεύθυνση της σύνθεσης γλουταμικού, στα θηλαστικά η κατεύθυνση της αντίδρασης in vivo πιστεύεται ότι είναι στενά ρυθμιζόμενη και εξαρτάται από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, την τοπική συγκέντρωση των υποστρωμάτων (π.χ γλουταμικό, αμμωνία), και την παρουσία ή όχι αλλοστερικών τροποποιητών. Εξάλλου, αυτή η δυνατότητα στενής ρύθμισης της ενζυμικής της δραστηριότητας αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών, που την διαφοροποιεί από τις GDH των απλούστερων οργανισμών.

A.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η GDH των θηλαστικών είναι ένα ομοπολυμερές, αποτελούμενο από έξι υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες έχει μοριακό βάρος περίπου 56 kDa και αποτελείται από 505 αμινοξέα. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των GDH του ανθρώπου, του βοός, του μύος και επίμυος έχουν χαρακτηριστεί και επιδεικνύουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ένζυμο έχει διατηρηθεί στην εξελικτική πορεία των ειδών. (Mavrothalassitis και συν, 1988). Η τριτοταγής δομή κάθε υπομονάδας της GDH έχει καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Smith και συν, 2001, 2002) αποκαλύπτοντας την ύπαρξη τριών βασικών περιοχών: 1) την περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού στο αμινοτελικό άκρο, 2) την περιοχή σύνδεσης του NAD(P), και 3) την περιοχή της κεραίας (antenna), η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου.[Εικόνα 2]. Εξάλλου, η δυνατότητα αλλοστερικής ρύθμισης διαφοροποιεί τις γλουταμικές αφυδρογονάσεις των θηλαστικών από αυτές των προκαρυωτικών οργανισμών, οι οποίες στερούνται της περιοχής της antenna. Οι κύριοι αλλοστερικοί ενεργοποιητές του ενζύμου είναι το ADP, η L-Leucine και το NAD(P)⁺, ενώ οι κύριοι αλλοστερικοί

αναστολείς είναι το GTP και το NAD(P)H.



Εικόνα 2 Κρυσταλλογραφική δομή μιας μονομερούς υπομονάδας GDH. Η GDH των θηλαστικών είναι ένα ομοεξαμερές αποτελούμενο από έξι όμοιες υπομονάδες GDH. Κάθε υπομονάδα περιλαμβάνει: α) μια αμινοτελική περιοχή δέσμευσης γλουταμικού (με κόκκινο χρώμα), β) μια περιοχή που δεσμεύει NAD(P)⁺ πάνω από την περιοχή δέσμευσης του γλουταμικού (με γαλάζιο χρώμα), γ) μια προβολή 48 αμινοξέων –antenna- (πράσινο χρώμα), η οποία εκτείνεται στην κορυφή της περιοχής δέσμευσης NAD(P), δ) μια α-έλικα η οποία ονομάζεται ‘pivot helix’ (κίτρινο χρώμα), γύρω από την οποία περιστρέφεται η περιοχή δέσμευσης NAD(P) κατά την έναρξη της κατάλυσης. Επίσης οι αντένες από τρεις υπομονάδες περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη και υφίστανται δομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται και οι σχετικές θέσεις πρόσδεσης των αλλοστερικών τροποποιητών ATP και GTP, οι οποίοι απεικονίζονται ως σφαίρες.

A.3. ΜΟΡΦΕΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η ανθρώπινη GDH υπάρχει σε δύο ισομορφές, hGDH1 και hGDH2, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* αντίστοιχα, και οι οποίες διαφέρουν, στην ώριμη μορφή τους, σε 15 από τα 505 αμινοξέα τους. Το γονίδιο *GLUD1* περιέχει 13 εξόνια, είναι αυτοσωματικό (χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10) (Michaelides και συν, 1993) και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (γονίδιο κυτταρικής οικονομίας, house-keeping gene). Αντιθέτως, το γονίδιο *GLUD2* βρίσκεται στο X χρωμόσωμα, δεν περιέχει ιντρόνια και εκφράζεται ειδικώς στο νευρικό ιστό και στους όρχεις (Shashidharan και συν, 1994). Το γονίδιο *GLUD2* έχει προκύψει από ρετρομετάθεση του *GLUD1* στο χρωμόσωμα X. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο διπλασιασμός αυτός συνέβη <23,000,000 χρόνια πριν (Burki and Kaessmann et al., 2004). Στη συνέχεια, ο

συνδυασμός τυχαίων μεταλλάξεων και θετικής εξελικτικής πίεσης προσέδωσαν στο γονίδιο *GLUD2* τις σημερινές του ιδιότητες και επέτρεψαν στο δεύτερο αυτό ισοένζυμο (hGDH2) να προσαρμοστεί στις ιδιαίτερες μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου.

Τα δύο ισοένζυμα, αν και διαφέρουν σε 15 μόνο από τα 505 αμινοξέα τους, έχουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά στην σταθερότητά τους στη θερμότητα, την βασική τους δραστηριότητα (σε απουσία ενεργοποιητών) και τη ρύθμισή τους από ενεργοποιητές (ADP, L-Leucine) και αναστολείς (GTP, οιστρογόνα) (Plaitakis et al., 2000; Kanavouras et al., 2007).

Ειδικότερα:

1. Η *GLUD1* έχει σημαντική βασική δραστηριότητα (40-45% της μέγιστης) επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών. Επιπλέον, αναστέλλεται ισχυρά από το GTP ($I_{c50} = 0,2 \mu\text{M}$), το οποίο φαίνεται ότι ρυθμίζει την λειτουργία της στους περιφερικούς ιστούς. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο ρυθμιστικό τμήμα του ενζύμου, οι οποίες οδηγούν σε κατάργηση της αναστολής του από GTP, παρουσιάζουν το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας λόγω αυξημένης βασικής δραστηριότητας του ενζύμου στα β κύτταρα του παγκρέατος (Stanley και συν, 1998).
2. Το *GLUD2* είναι ανθεκτικό στην ανασταλτική δράση του GTP. Παρουσιάζει χαμηλή βασική δραστηριότητα (5-10% της μέγιστης), η οποία αποκαθίσταται πλήρως από το ADP και την L-λευκίνη (Plaitakis, Metaxari και Shashidharan, 2000). Είναι μία σημαντική μοριακή προσαρμογή του ενζύμου που του επιτρέπει να λειτουργεί στο νευρικό σύστημα κυρίως κατά την διάρκεια της διεγερτικής διαβίβασης. Επειδή η μεταφορά του γλουταμικού οξέος εντός των κυττάρων συνοδεύεται από κατανάλωση ενέργειας (υδρόλυση ATP→ADP), το παραγόμενο ADP προκαλεί ενεργοποίηση της hGDH2 και κατ'επέκταση στην οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού οξέος σε α -κετογλουταρικό για να χρησιμοποιηθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος για την εκ νέου παραγωγή ενέργειας. Επίσης, η μη δράση του GTP στο *GLUD2* επιτρέπει στο ένζυμο να λειτουργεί στον νευρικό ιστό, ο οποίος έχει υψηλότερα

επίπεδα GTP από άλλους ιστούς. Τέλος εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την hGDH1 στην απενεργοποίηση από θερμότητα (θερμο-ευαίσθητο) ενώ εμφανίζει βέλτιστη λειτουργικότητα σε χαμηλότερα pH (7.5-7.8) σε σχέση με την ισομορφή κυτταρικής οικονομίας

Πρόσφατες μελέτες μεταλλαξιογένεσης της GLUD1 σε θέσεις όπου διαφέρει από τη GLUD2 (Zaganas και Plaitakis, 2002) έδειξαν ότι δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις ευθύνονται για τις κύριες λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση της Arg443 της GLUD1 από Ser (στη GLUD2) ελαχιστοποιεί την βασική δραστηριότητα (3% της μέγιστης) αλλά επιτρέπει την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου με ADP. Η δεύτερη αντικατάσταση (Gly 456 από Ala) προσδίδει ανθεκτικότητα στην αναστολή από GTP και καταργεί τη θετική συνεργατικότητα αυτής της αναστολής.

A.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η έκφραση της GLUD1 γλουταμικής αφυδρογονάσης σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών (housekeeping) αντανακλά τη μεγάλη σημασία του ενζύμου αυτού στη λειτουργία των κυττάρων. Έχει υπολογιστεί ότι σε ορισμένα κύτταρα αποτελεί μέχρι και το 10% της ολικής πρωτεΐνης του μιτοχονδριακού στρώματος (matrix). Στα όργανα με τα υψηλότερα επίπεδα GDH περιλαμβάνονται ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι νεφροί, το πάγκρεας, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, με τα υψηλότερα επίπεδα να ανευρίσκονται στο ήπαρ (Smith και συν, 1975). Παρακάτω παρουσιάζονται οι γενικές, για όλους τους ιστούς, λειτουργίες της GDH, που αφορούν την ομοιόσταση και το μεταβολισμό, ενώ η ειδική για το νευρικό σύστημα λειτουργία της GDH θα παρουσιαστεί σε χωριστή ενότητα.

I. Ενεργειακή ομοιόσταση

Όπως έχει αναφερθεί, η GDH καταλύει τη μετατροπή του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό. Η σύνθεση του α-κετογλουταρικού οδηγεί μέσω του κύκλου του Krebs στη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP ή GTP. Καθώς τα τελευταία τριφωσφορικά νουκλεοτίδια αποτελούν αλλοστερικούς αναστολείς της GDH, ενώ το ADP δρα ως αλλοστερικός ενεργοποιητής, πιστεύεται ότι το ένζυμο μπορεί να λειτουργεί ως 'ενεργειακός αισθητήρας', ανταποκρινόμενο στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Έτσι, λοιπόν, η GDH μπορεί να χρησιμοποιήσει την οξειδωση αμινοξέων (μέσω γλουταμικού) για τη παραγωγή ενέργειας, σε περιπτώσεις που μειώνεται το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου (όπως αυτό καθορίζεται από το λόγο ATP/ADP).

II. Σύνθεση αμινοξέων- πρωτεϊνών

Το αμινοξύ γλουταμικό αποτελεί την απαραίτητη πρόδρομη ουσία για τη παραγωγή των αμινοξέων γλουταμίνη, προλίνη, αργινίνη. Επίσης, το γλουταμικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των περισσότερων μη απαραίτητων αμινοξέων μέσω μιας εκ των αντιδράσεων τρανσαμίνωσης. Στις αντιδράσεις αυτές, που καταλύονται από τα ένζυμα αμινο-τρανσφεράσες, μία α-αμινομάδα μεταφέρεται από ένα αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ για να παραχθεί ένα άλλο αμινοξύ. Έτσι, για παράδειγμα, τα αμινοξέα αλανίνη και ασπαρτικό συντίθενται από τα καρβοξυλικά οξέα πυρουβικό και οξαλοξικό με τη δράση των ενζύμων αλανινική και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση αντίστοιχα:

(Αλανινική αμινοτρανσφεράση)

Γλουταμικό + Πυρουβικό \longleftrightarrow Αλανίνη + α-Κετογλουταρικό

(Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση)

Γλουταμικό + Οξαλοξικό \longleftrightarrow Ασπαρτικό + α-Κετογλουταρικό

Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι πλήρως αναστρέψιμες. Η σημασία της αντίστροφης αντίδρασης είναι μεγάλη, καθώς επιτρέπει τη μεταφορά του αζώτου από την αλανίνη και το ασπαρτικό προς το γλουταμικό. Αυτό είναι το πρώτο βήμα στην αποδόμηση των αμινοξέων. Ο ρόλος της GDH είναι σημαντικός στην ολοκλήρωση της αποδόμησης αμινοξέων, καθώς καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε α -κετογλουταρικό και αμμωνία. Έτσι, το αμινικό άζωτο διοχετεύεται προς το γλουταμικό και μέσω της GDH απελευθερώνεται ως ελεύθερη αμμωνία, ενώ οι ανθρακικοί σκελετοί που απομένουν μετά την απομάκρυνση του αμινικού αζώτου μπορούν να εισέλθουν στον κύκλο του Krebs και να οξειδωθούν.

Καθώς η GDH ρυθμίζει τα επίπεδα γλουταμικού μέσα στο κύτταρο, είναι πιθανόν, μέσω των οδών που αναφέρθηκαν παραπάνω, να επηρεάζει έμμεσα και τη σύνθεση και αποδόμηση άλλων αμινοξέων.

III. Ομοιόσταση αμμωνίας –Κύκλος ουρίας

Η GDH έχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της αμμωνίας μέσα στα κύτταρα καθώς συμβάλλει μέσω απαμίνωσης του γλουταμικού στο μεταβολισμό της α -αμινομάδας των περισσότερων αμινοξέων. Κι αυτό γιατί κατά την αποδόμηση των αμινοξέων η α -αμινομάδα τους μεταφέρεται μέσω αμινοτρανσφερασών στο α -κετογλουταρικό για να σχηματιστεί γλουταμικό, το οποίο στη συνέχεια απαμινώνεται οξειδωτικά από τη GDH για να παραχθεί NH_4^+ . Στη συνέχεια, στα περισσότερα χερσαία σπονδυλωτά, το NH_4^+ μετατρέπεται σε ουρία, η οποία απεκκρίνεται. Ο κύκλος της ουρίας είναι εξαιρετικά σημαντικός γιατί είναι ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης της αμμωνίας, τα υψηλά επίπεδα της οποίας είναι τοξικά για τον άνθρωπο.

A.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GDH ΣΤΟ ΚΝΣ

Το γλουταμικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, χρησιμοποιούμενο σε περισσότερες από το 40-60% των συνάψεων, και εμπλέκεται σε εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, η κινητικότητα, η αισθητικότητα. Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός

γλουταματεργικών νευρώνων στο ΚΝΣ, οι οποίοι είναι ευρέως κατανεμημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη πυκνότητα γλουταματεργικών συνάψεων είναι τα βασικά γάγγλια, ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας, ο ιππόκαμπος, οι θαλαμικές περιοχές της μέσης γραμμής (Aoki και συν 1987).

Η γλουταμική αφυδρογονάση φαίνεται ότι έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο και αυτό αντανακλάται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της σε αυτό το όργανο είναι ιδιαίτερα ψηλές. Οι περισσότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Aoki και συν, 1987, Rothe και συν, 1994) δείχνουν ότι το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως σε αστροκύτταρα, ενώ μικρότερη ανοσοδραστικότητα ανευρίσκεται σε νευρωνικούς πληθυσμούς. Πιο πρόσφατες μελέτες στη λευκή ουσία εγκεφάλου αρουραίου (Schmitt και συν, 1999) αλλά και ανθρώπου (Werner και συν, 2001) αποκάλυψαν ότι η GDH είναι παρούσα σε σημαντικά ποσά και σε ολιγοδενδροκύτταρα.

Σημαντική ετερογένεια παρατηρείται στην κατανομή της GDH στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Οι Aoki και συν (1987) έδειξαν ότι υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση GDH σε περιοχές που δέχονται πυκνή γλουταματεργική νεύρωση. Σε αυτές τις περιοχές, η GDH ανευρίσκεται κυρίως σε αστροκυτταρικές αποφύσεις που περιβάλλουν γλουταματεργικές νευρικές απολήξεις, παρέχοντας έμμεσες ενδείξεις ότι το ένζυμο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού στις συνάψεις. Κάτι τέτοιο άλλωστε έχει προταθεί από παλιά από τους Plaitakis και συν (1982). Πάντως, οι Cooper και συν (1979) έδειξαν ότι η GDH δε φαίνεται να συμμετέχει άμεσα στη σύνθεση του γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, παρότι θερμοδυναμικά ευνοείται η κατεύθυνση της αντίδρασης προς τη παραγωγή γλουταμικού. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι ραδιοσημασμένη αμμωνία χορηγούμενη σε αρουραίους δεν ενσωματώνεται στο γλουταμικό στον εγκέφαλό τους. Αντίθετα, η σύνθεση στους νευρώνες του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού πιστεύεται ότι γίνεται από α-κετογλουταρικό, μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, ή από γλουταμίνη με τη δράση του ενζύμου γλουταμινάση.

Αν και η GDH δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του γλουταμικού στο ΚΝΣ, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό (οξειδωση) του γλουταμικού τόσο σε αστροκύτταρα που περιβάλλουν τις συνάψεις (Yu και συν, 1982), όσο και σε συναπτοσώματα (Erecínka και συν, 1990). Το γλουταμικό που απελευθερώνεται στις συνάψεις προσλαμβάνεται γρήγορα μέσω μεταφορέων (EAAT) κυρίως από τα περιβάλλοντα αστροκύτταρα, αλλά και από τους ίδιους τους νευρώνες. Στο εσωτερικό των αστροκυττάρων το γλουταμικό μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: 1) να μετατραπεί σε γλουταμίνη μέσω της δράσης του ενζύμου συνθάση της γλουταμίνης, 2) να μετατραπεί σε α-κετογλουταρικό, είτε μέσω κάποιας εκ των αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, είτε μέσω της αντίδρασης της GDH (προς τη κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης). Συνεπώς η GDH μπορεί να συμβάλει στο καταβολισμό και την ανακύκλωση του γλουταμικού στις συνάψεις. Αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία σε περιπτώσεις υπερβολικής προσυναπτικής απελευθέρωσης γλουταμικού, αφού είναι γνωστό ότι η περίσσεια γλουταμικού, και κατά συνέπεια η υπερενεργοποίηση των μετασυναπτικών NMDA και AMPA υποδοχέων, μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα (excitotoxicity). Ωστόσο, σε καλλιέργειες αστροκυττάρων, κάποιοι ερευνητές έδειξαν ότι η ροή του γλουταμικού διαμέσου της GDH είναι δυσανάλογα (της συγκέντρωσης της) χαμηλή (Waniewski και Martin, 1986, Farinelli και Nicklas, 1992). Από την άλλη μεριά, οι Kuo και συν (1994) πρότειναν ότι η δραστηριότητα της GDH στο ΚΝΣ μπορεί να είναι στενά ρυθμιζόμενη, αφού τα επίπεδα της στον εγκέφαλο είναι υψηλά, ενώ η ροή γλουταμικού διαμέσου της αντίδρασης της είναι χαμηλή. Σε συμφωνία με τους παραπάνω οι Sonnwald και συν (1997) προτείνουν ότι ο μεταβολισμός του γλουταμικού στα αστροκύτταρα εξαρτάται από τα εξωκυττάρια επίπεδά του, με τα υψηλότερα επίπεδα να ευνοούν την οξειδωση του γλουταμικού διαμέσου της GDH.

GDH και νευρολογικά νοσήματα

Η σημασία της GDH στη βιολογία του ΚΝΣ αποκαλύπτεται και από το γεγονός ότι δυσλειτουργία της GDH ενέχεται στη παθοφυσιολογία νευρολογικών νοσημάτων. Η δραστηριότητα της GDH έχει βρεθεί μειωμένη σε λευκοκύτταρα και ινοβλάστες ασθενών με πολυσυστηματικές νευρολογικές διαταραχές, μία οικογένεια νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από κλινική και παθολογοανατομική ετερογένεια (Plaitakis και συν, 1980, 1982). Οι μελέτες που έγιναν στους ασθενείς αυτούς έδειξαν ότι η μείωση στη δραστηριότητα της GDH αφορούσε κατά κύριο λόγο τη 'θερμοασταθή' μορφή της GDH (Plaitakis και συν, 1984). Από την άλλη μεριά, όπως έχει ήδη αναφερθεί η GDH παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλουταμικού, του κυριότερου διεγερτικού νευροδιαβιβαστή με δυνητικά νευροτοξικές ιδιότητες. Η απελευθέρωση του γλουταμικού σε μεγάλες συγκεντρώσεις στη συναπτική σχισμή είναι δυνατόν να προκαλέσει διεγερτικοτοξική βλάβη (excitotoxic injury) στα νευρικά κύτταρα. Η διεγερτικο-τοξικότητα έχει ενοχοποιηθεί σε μηχανισμούς οξείας βλάβης του ΚΝΣ επί υποξίας, ισχαιμίας και υπογλυκαιμίας, καθώς και σε μηχανισμούς χρόνιας νευροεκφύλισης. Σημαντικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Parkinson, η νόσος Alzheimer, η Πλάγια Μυατροφική Σκλήρυνση (ALS) έχουν συσχετιστεί με τις διεγερτικοτοξικές ιδιότητες του γλουταμικού οξέος. Ειδικά όσον αφορά τη νόσο του Parkinson, όπου εκφυλίζονται οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας, οι Plaitakis και Shashidharan (2000) έδειξαν ότι αναστολή της έκφρασης της GDH με anti-sense ολιγονουκλεοτίδια οδηγεί σε εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων σε καλλιέργεια, παρέχοντας ενδείξεις για μία νευροπροστατευτική λειτουργία της GDH στα κύτταρα αυτά.

A.6. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ GDH ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η GDH, λόγω του σημαντικού της ρόλου στην ενεργειακή ομοιόσταση και στο μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος, έχει αποτελέσει πολλάκις το

αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών όσον αφορά την υποκυτταρική κατανομή της.

Η πιο ισχυρά αποδεδειγμένη εντόπιση της GDH στους ιστούς των θηλαστικών είναι εντός του μιτοχονδρίου. Η μιτοχονδριακή εντόπιση της GDH έχει από παλιά δειχθεί με μελέτες ομογενοποίησης και κλασματοποίησης ήπατος (Hogeboom και συν, 1953) ή εγκεφάλου αρουραίου (Salganicoff και συν, 1965). Μάλιστα οι τελευταίοι ερευνητές υπέθεσαν ότι η GDH εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό στρώμα (matrix), καθώς διαλυτοποιείται με Triton X-100. Αργότερα, η εντόπιση της GDH στο μιτοχόνδριο επιβεβαιώθηκε με υπερδομικές μελέτες ανοσοϊστοχημείας ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα να διατηρηθεί η δομή των κυττάρων και των υποκυτταρικών σχηματισμών. Συγκεκριμένα, οι Aoki και συν (1987), χρησιμοποιώντας πρωτοταγή αντισώματα έναντι της GDH και δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με σωματίδια χρυσού, εντόπισαν τη GDH κυρίως στα μιτοχόνδρια γλοιοκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό νευρώνων εγκεφάλου αρουραίου. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση GDH αντιστοιχούσε σε περιοχές με αυξημένη γλουταματεργική διαβίβαση, και ειδικότερα σε αστροκυτταρικές αποφύσεις που περιέβαλαν δενδριτικές άκανθες και συναπτικές απολήξεις. Αντίθετα, δεν υπήρχε συσχέτιση της κατανομής της GDH με τις απαιτήσεις σε ενέργεια των αντίστοιχων περιοχών. Εκτός από την αμιγή μιτοχονδριακή εντόπιση, οι Aoki και συν παρατήρησαν ανοσοδραστικότητα για GDH - σε μικρότερη συγκέντρωση- και σε κάποιες εξωμιτοχονδριακές θέσεις. Ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα χρυσού και ηλεκτρονική μικροσκοπία χρησιμοποίησαν και οι Rothe και συν (1994) για να εξετάσουν και να ποσοτικοποιήσουν την υποκυτταρική εντόπιση της GDH σε τομές παρεγκεφαλιδικού φλοιού αρουραίου. Οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ανοσοσήμανση GDH κατά κύριο λόγο στα μιτοχόνδρια αστροκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό σε μιτοχόνδρια ολιγοδενδροκυττάρων και νευρωνικών στοιχείων. Δε βρέθηκε εντόπιση GDH σε εξωμιτοχονδριακές θέσεις.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι, εκτός από την εύκολα διαλυτοποιούμενη μορφή GDH του μιτοχονδριακού στρώματος (matrix), πάρχει και μία άλλη μορφή GDH συνδεδεμένη με μεμβράνες. Έτσι οι Colon και συν (1986) έδειξαν ότι

προκύπτουν δύο δραστηριότητες GDH μετά από υπερφυγοκέντρωση (100000g) ολικού ομογενοποιημένου εγκεφάλου αρουραίου: α) μια διαλυτή GDH δραστηριότητα, η οποία λαμβάνεται στο υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης και πιθανώς αντιπροσωπεύει το κλάσμα του μιτοχονδριακού στρώματος, β) μια σωματιδιακή (particulate-bound) GDH δραστηριότητα, η οποία λαμβάνεται στο ίζημα και η οποία αντιστέκεται στη διαλυτοποίηση με Triton X-100 και απελευθερώνεται μόνο με το κατιονικό απορρυπαντικό CTAB και με υψηλή συγκέντρωση άλατος (0,5 M NaCl). Οι δύο αυτές μορφές GDH διαφέρουν ως προς τη θερμοσταθερότητα και την αλλοστερική ρύθμιση και πιθανώς ανταποκρίνονται λειτουργικά σε διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου [ενεργειακός μεταβολισμός – μεταβολισμός γλουταμικού οξέος]. Εκτός από τους Colon και συν, οι Lee και συν, και οι Rajas και συν μπόρεσαν να ανιχνεύσουνε συνδεδεμένη με μεμβράνες GDH. Συγκεκριμένα, οι Lee και συν (1999) απομονώσανε GDH από μεμβράνες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (RER), η οποία (παρομοίως με τα ευρήματα των Colon και συν) ήταν περισσότερο ανθεκτική στη θερμότητα, όπως και στη πρωτεόλυση, από τη μιτοχονδριακή GDH. Επίσης οι Rajas και συν (1993), χρησιμοποιώντας ήπαρ και εγκέφαλο χοίρου, αναγνώρισαν μία συνδεδεμένη με μεμβράνες λυσοσωμάτων ισομορφή GDH, η οποία εμφάνιζε εξαρτώμενη από το ATP ικανότητα πρόσδεσης μικροσωληνίσκων. Από την άλλη μεριά, οι Werner και συν παρατήρησαν με ανοσοϊστοχημεία GDH ανοσοδραστικότητα κοντά στη κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα ολιγοδενδροκυττάρων (Werner και συν, 2001).

Τέλος, η εντόπιση της GDH στον πυρήνα του κυττάρου έχει προταθεί από κάποιες ερευνητικές ομάδες (Di Prisco , 1975, Lai και συν, 1986), αν και άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η πυρηνική GDH αποτελεί μιτοχονδριακή επιμόλυνση του πυρηνικού κλάσματος.

Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γενωμικό DNA και συντίθενται ως πρόδρομα μόρια στο κυτταρόπλασμα. Οι πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μετατοπίζονται στη συνέχεια στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, καθοδηγούμενες από οδηγές αλληλουχίες, οι οποίες συνηθέστερα αποκόπτονται μετά την είσοδο της πρωτεΐνης στα

μιτοχόνδρια. Οι Mavrothalassitis και συν (1988), χρησιμοποιώντας κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες, καταφέρανε να απομονώσουν, από ανθρώπινες cDNA βιβλιοθήκες, κλώνους κωδικοποιούντες για ανθρώπινη GDH. Οι κλώνοι αυτοί κωδικοποιούν για ένα πολυπεπτίδιο 558 αμινοξέων, τα καρβοξυτελικά 505 αμινοξέα του οποίου είναι όμοια με την αμινοξική αλληλουχία της GDH πρωτεΐνης που έχει απομονωθεί από ανθρώπινους ιστούς (Smith και συν, 1979). Τα πρόσθετα 53 αμινοξέα που παρατηρούνται στο αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιείται από τους cDNA κλώνους της GDH και απουσιάζουν στην πρωτεΐνη που απομονώνεται από ανθρώπινο ιστό, πιστεύεται ότι ανταποκρίνονται στην οδηγό μιτοχονδριακή αλληλουχία της GDH, η οποία πιθανότατα αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη (Mihara και συν, 1982, Mavrothalassitis και συν, 1988).

B.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ hGDH1 και hGDH2 ΣΤΗΝ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ : ΑΝΟΙΑ και ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ .

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν ενδείξεις από μελέτες του '80 για την παρουσία διαταραχών του μεταβολισμού του γλουταμικού και της GDH σε ασθενείς με νευρολογικά νοσήματα. (Plaitakis et al., 1982, Iwasaki et al., 1992) χωρίς να έχουν αποκαλυφθεί συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο GLUD1. Αυξημένη συγκέντρωση γλουταμικού έχει πρόσφατα βρεθεί και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με φλεγμονώδεις νόσους του ΚΝΣ όπως η Σκλήρυνση κατά Πλάκας, στην οποία η εκφύλιση των νευραξόνων και ο θάνατος των ολιγοδενδροκυττάρων που παρατηρείται σε διάφορα στάδια της νόσου θεωρείται ότι οφείλεται στην τοξικότητα του γλουταμικού που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Σε ασθενείς με Σκλήρυνση κατά πλάκας έχει αποδειχθεί με ανοσοϊστοχημικές μελέτες ότι η GDH και η γλουταμινική συνθετάση (GS) λείπουν από τα ολιγοδενδροκύτταρα ενεργών και χρόνιων βλαβών ενώ αντίθετα υπάρχουν στα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα υποδηλώνοντας μακροχρόνια μεταβολική επιβάρυνση ακόμα και μετά την υποχώρηση της φλεγμονής (χρόνιες βλάβες). Η ανεπάρκεια σε GDH και GS των

ολιγοδενδροκυττάρων πιθανόν να καθιστά τόσο αυτά τα ίδια τα κύτταρα όσο και τους νευρώνες πιο ευάλωτους στην διεγερτοτοξικότητα από το γλουταμικό (Werner et al., 2001).

Επιπλέον, υπερέκφραση της GDH1 σε ποντικό, είχε ως αποτέλεσμα εκφυλιστικές αλλαγές στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου, οι οποίες είναι άμεσα συνυφασμένες με την αύξηση της ηλικίας (Bao et al., 2009).

Υπάρχουν νεότερα δεδομένα που εμπλέκουν ειδικά την hGDH2 ισομορφή στην παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Η πρόσφατη γονοτυπική ανάλυση του γονιδίου της GDH2 σε 612 ασθενείς με νόσο Parkinson από τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς, που έγινε στο εργαστήριο Νευρολογίας του Παν/μίου Κρήτης και αποκάλυψε την ύπαρξη ενός σπάνιου πολυμορφισμού της hGDH2 (αντικατάσταση της Ala445 με Ser στην ρυθμιστική περιοχή), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού σε ημίζυγη μορφή οδηγεί σε πρωϊμότερη έναρξη της νόσου κατά 8-13 χρόνια. (Plaitakis et al., 2009). Αντίθετα οι ετερόζυγες γυναίκες, δεν παρουσιάζουν το ίδιο φαινόμενο. Η έκφραση της Ala445Ser hGDH2 σε κυτταρικές σειρές εντόμων Sf21 αποκάλυψε ότι το ένζυμο εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα στην θερμική απενεργοποίηση και αυξημένη βασική δραστηριότητα που είναι ανθεκτική στην αναστολή από GTP. Τα ευρήματα αυτά συνιστούν ότι η απόκτηση αυξημένης λειτουργικότητας της hGDH2 (gain of function) σε ημίζυγους ασθενείς προσβάλλει εκλεκτικά τους νευρώνες της μέλαινας ουσίας επιταχύνοντας τη νευροεκφυλιστική διεργασία. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες με μη ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έχουν δείξει ότι η GDH εκφράζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας που εκφυλίζονται εκλεκτικά στη νόσο Πάρκινσον. Η αναστολή της έκφρασης της GDH μάλιστα, ήταν τοξική σε μεσεγκεφαλικούς νευρώνες αρουραίου σε καλλιέργεια με τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες να επηρεάζονται πρώτοι (Plaitakis και Shashidharan et al., 2000). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τόσο η έλλειψη γλουταμικής αφυδρογονάσης (loss of function) όσο και η παθολογικά αυξημένη δραστηριότητά της hGDH2 (gain of function) έχουν καταστροφικές συνέπειες για τα ντοπαμινεργικά κύτταρα.

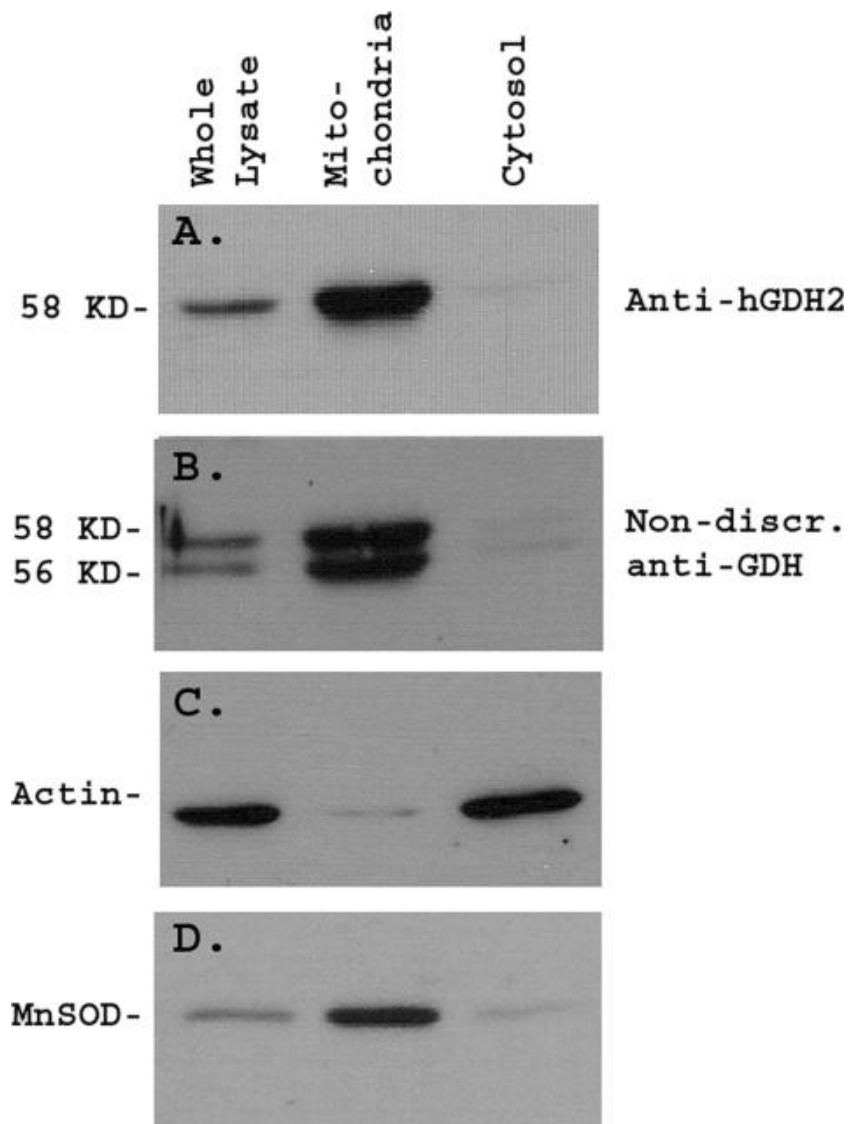
Ενώ η σημασία της hGDH2 είναι μεγάλη για τον νευρικό ιστό, παραμένει ακόμα άγνωστο σε ποιές περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και σε ποιά κύτταρα εκφράζεται η πρωτεΐνη αυτή. Ειδικά η κυτταρική εντόπιση της hGDH2 στο νευρικό σύστημα, αν δηλαδή εκφράζεται σε ολιγοδενδροκύτταρα, αστροκύτταρα ή

νευρώνες, είναι εξαιρετικής σημασίας καθόσον η εντόπιση αυτή υποδηλώνει εν πολλοίς και τον λειτουργικό της ρόλο στα πλαίσια της πολυπλοκότητας του ΚΝΣ. Ενώ η GDH έχει μελετηθεί εκτεταμένα με την χρήση ανοσο-ιστοχημείας στον νευρικό ιστό του επίμουσ (Aoki, et al., 1987), οι μελέτες αυτές έχουν γίνει με την χρήση μη ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων που δεν μπορούν να ξεχωρίσουν την hGDH1 από την hGDH2. Σαν αποτέλεσμα δεν έχει μέχρι σήμερα σημειωθεί πρόοδος προς την κατεύθυνση αυτή, εκτός από δεδομένα που στηρίζονται στην έκφραση του *GLUD2* mRNA, και αυτά μόνον όσον αφορά την ποσότητα που υπάρχει στους διάφορους ιστούς και όχι στην κυτταρική του κατανομή όπως αναφέρεται κατωτέρω.

B.2 ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ hGDH2 ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ.

Ειδικά *GLUD2* mRNA έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, εγκέφαλο και όρχεις (Shashidharan et al., 1994) Αλληλούχιση των πρωτεϊνών που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων από όρχεις επιβεβαίωσε τα παραπάνω δεδομένα. ESTs ειδικά για την hGDH2 έχουν απομονωθεί και από ανθρώπινο ιππόκαμπο, αλλά δεν έχει γίνει μέχρι τώρα άμεση ταυτοποίηση της hGDH2. Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις, το *GLUD2* φαίνεται να εκφράζεται και σε άλλους ανθρώπινους ιστούς (Rosso et al., 2008). Στο κυτταρικό επίπεδο, παρόλο που η ιστοχημεία ενεργότητας και οι βιοχημικές μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες έχουν δείξει ότι η hGDH1 είναι άφθονη τόσο σε νευρώνες όσο και σε γλοιακά κύτταρα, οι περισσότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες αλλά και ορισμένες μελέτες με ανοσοϊστοχημεία ενεργότητας δείχνουν ότι το ένζυμο εντοπίζεται σε αστροκύτταρα (Aoki, et al., 1987), με μικρή μόνο ανοσοδραστικότητα σε

ορισμένους νευρωνικούς πληθυσμούς (Zaganas et al., 2001). Όσον αφορά στο υποκυτταρικό επίπεδο, σύμφωνα με μελέτες του εργαστηρίου μας, έχει αποδειχθεί με εισαγωγή hGDH2-EGFP φθορίζουσας πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές ότι βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο μιτοχονδριακό στρώμα και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Mastorodemos et al 2005, Mastorodemos et al, 2009). Όπως αναφέρεται ανωτέρω, η ομοιότητα σε πρωτεϊνικό και επίπεδο mRNA των δύο ισοενζύμων έχει κάνει δύσκολη την μελέτη της έκφρασης τους. Η ανάπτυξη ενός ειδικού για την hGDH2 πολυκλωνικού αντισώματος από το εργαστήριο Νευρολογίας του Παν/μίου Κρήτης (με ανοσοποίηση κουνελιού χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο μικρό πεπτίδιο ειδικό για την hGDH2 ισομορφή) ανοίγει το δρόμο για την κατανόηση της ιστικής, κυτταρικής και υποκυτταρικής κατανομής της συγκεκριμένης ισομορφής του ενζύμου. Το αντίσωμα αυτό έχει ήδη αξιολογηθεί με ανοσοαποτύπωση ως ειδικό ως προς την hGDH2 (Spanaki et al, 2010). Σε τιτλοποιούμενες συγκεντρώσεις, το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα δεν φαίνεται να αναγνωρίζει ακόμα και πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της hGDH1 (εικ. 3).



Εικόνα 3 Κατανομή των hGDH2 και hGDH1 σε μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα από ανθρώπινο όρχι. Ίσες ποσότητες whole lysate, μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών κλασμάτων, ηλεκτροφορήθηκαν σε 8,5% πήκτωμα SDS-πολυακρυλμιδίου. Η ανόσοαποτύπωση έγινε με (A) το ειδικό αντίσωμα αντι-hGDH2 και (B) το μη ειδικό αντίσωμα αντι-GDH. (C) Η ακτίνη και (D) η δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου (MnSOD), γίνονται ορατά χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα αντισώματα και αποτελούν δείκτες του κυττοσολίου και των μιτοχονδρίων κατά αντιστοιχία. Αμφότερες οι hGDH2 και hGDH1, εντοπίζονται και μάλιστα σε αφθονία, στα μιτοχονδριακά κλάσματα, ενώ φαίνεται ότι το κυτταροπλασματικό κλάσμα ουσιαστικά στερείται της πρωτεΐνης GDH. (Spanaki et al, 2010)

Επιπρόσθετα η σύνδεσή του με την hGDH2 αναστέλλεται πλήρως μετά από συνεπάασή του με περίσσεια του πεπτιδίου-αντιγόνου. Πρόσφατη μελέτη σε παρασκευάσματα μη μονιμοποιημένου εγκεφάλου και μονιμοποιημένου όρχη έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως στα αστροκύτταρα και στα κύτταρα Sertoli του όρχη. Και οι δύο κατηγορίες κυττάρων έχουν σημαντικό

υποστηρικτικό ρόλο για τους νευρώνες και τα σπερματοκύτταρα αντίστοιχα. Ο στόχος της παρούσης μελέτης είναι η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης και η εντόπισή της και σε άλλους περιφερικούς ιστούς σε επίπεδο κυτταρικών πληθυσμών και, ει δυνατόν, υποκυτταρικών δομών. Η μελέτη αυτή θα πραγματοποιηθεί με τη χρήση του παραπάνω ειδικού για την hGDH2 πολυκλωνικού αντισώματος και τις τεχνικές ανοσοαποτύπωσης (Western blotting), ανοσοφθορισμού και ανοσο-ιστοχημείας.

ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η ανεύρεση του φυσιολογικού προτύπου έκφρασης της γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς σε επίπεδο κυττάρων αναμένεται να συμβάλλει ουσιαστικά στην διαλεύκανση της λειτουργίας της εξελικτικά νέας αυτής πρωτεΐνης και της σημασίας της για τον άνθρωπο. Επιπροσθέτως το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης της γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 στον άνθρωπο, θα αποτελέσει το μέτρο σύγκρισης για τη μελέτη της έκφρασής της σε μη φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, π.χ. σε νευρικό ιστό από περιοχές με νευροεκφύλιση ή σε νεοπλασματικούς ιστούς κ.α, καθώς αυξημένη δραστηριότητα ή υπερέκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης πρόσφατα ενεπλάκει στην παθοφυσιολογία νευροεκφυλιστικών (Plaitakis et al 2010, Bao et al, 2009) και άλλων νοσημάτων (Stanley et al 1998). Πρόσφατα, έχει επίσης επισημανθεί η σημασία της GDH στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων (Yang et al, 2009).

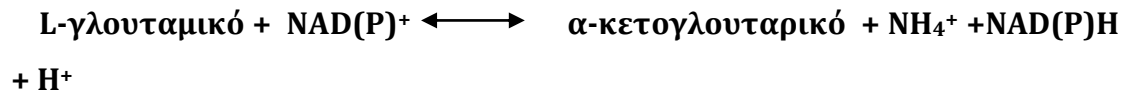
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης στους διάφορους ιστούς, χρησιμοποιήθηκαν καταρχάς ιστοί από παθολογοανατομικά παρασκευάσματα από το εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής και από πτωματικούς δότες (μετά από ενήμερη συγκατάθεση των οικείων τους) χωρίς σημαντική νοσηρότητα και με μεταθανάτιο χρόνο μέχρι τη νεκροτομή <12 ώρες. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν όρχις, νεφρός, επινεφρίδιο, πάγκρεας, ήπαρ, σπλήνας, θυρεοειδής, λεμφαδένες, έντερο, πνεύμονας, πλακούντας, ωθήκες κα. Οι ιστοί τεμαχίστηκαν με σεβασμό στην μορφολογία τους και τα ιστοτεμάχια κατανεμήθηκαν σε τρία μέρη. Το 1ο μέρος χρησιμοποιήθηκε για ομογενοποίηση και μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης σε επίπεδο ολικού ιστού με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Το 2ο μέρος καταψυχθηκε ταχύτατα με ισοπεντάνιο αφού κρυοπροστατεύθηκε με σουκρόζη και χρησιμοποιήθηκε για κρυοτόμηση και μελέτες ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε μη μονιμοποιημένους ιστούς. Το 3ο μέρος μονιμοποιήθηκε σε φορμόλη και σκηνώθηκε σε παραφίνη για καλύτερη διατήρηση της μορφολογίας. Τα μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια κοπήκαν σε μικροτόμο σε τομές των 4 μm, επικολήθηκαν σε ειδικά θετικά φορτισμένα πλακίδια και χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας μετά από αποκάλυψη του αντιγόνου.

1. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Αναλυτικότερα, στην πρώτη φάση της εργασίας μας έγινε ομογενοποίηση του ιστού με μηχανικό τρόπο (ομογενοποιητής Greinder) σε ειδικό buffer που περιείχε μεταξύ άλλων Triton X100, η συνταγή του οποίου αναγράφεται παρακάτω. Μετρήθηκε η περιεκτικότητα του ομογενοποιημένου

σε γλουταμική αφυδρογονάση με τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενός σε παρουσία 1 mM ADP.



Για να καθοριστεί η ενζυμική ενεργότητα των εκχυλισμάτων, μετρήθηκε σε φωτόμετρο η ταχύτητα κατανάλωσης των μορίων του NADPH ως ρυθμός μείωσης της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340 nm που εμφάνιζε ένας ορισμένος όγκος του διαλύματος της ως άνω αντίδρασης (σε TRA buffer, pH 8) προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του γλουταμικού ($dA_{340\text{nm}}/\text{min}$) υπό ορισμένες συνθήκες (παρουσία ADP 1mM). (όπου dA η μεταβολή της $OD_{340\text{nm}}/\text{min}$).

2. ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

Η ενζυμική ενεργότητα, δηλαδή η δραστηριότητα των ομογενοποιημάτων όπως αυτή μετρήθηκε παρουσία 1mM ADP προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του γλουταμικού, αποτελεί έμμεσο τρόπο εκτίμησης της συγκέντρωσης των ομογενοποιημάτων σε γλουταμική αφυδρογονάση, ανεξάρτητα αν είναι τύπου 1 ή 2. Δεδομένου ότι η γλουταμική αφυδρογονάση τύπου II (hGDH2) κατά πάσα πιθανότητα αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής πρωτεΐνης των ιστών, προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι θα τη φορτώσουμε σε συγκέντρωση ικανή ώστε να είναι δυνατή η απεικόνισή της στην ανάλυση με Western, αποφασίσαμε να φορτώσουμε τα αδρά ομογενοποιημένα στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης όχι με βάση τη συνολική τους συγκέντρωση σε πρωτεΐνη όπως είθισται, αλλά με βάση το βαθμό ενζυμικής ενεργότητάς τους. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζουμε ότι θα αναλυθεί κατά Western ίση ποσότητα γλουταμικής αφυδρογονάσης από κάθε ιστό, που όμως αντιστοιχεί σε διαφορετικά ποσά ολικής πρωτεΐνης. Είναι γνωστό ότι η έκφραση της

γλουταμικής αφυδρογονάσης ποικίλλει από ιστό σε ιστό. Προκειμένου στο τέλος να ελέγξουμε κατά πόσον αυτό (ισοφόρτωμα) το επιτύχαμε, δεν χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα κατά μιας ευρέως διαδεδομένης πρωτεΐνης σε όλα τα κύτταρα όπως είναι η ακτίνη, αλλά το μη ειδικό αντίσωμα της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Τα πρωτογενή αντισώματα αντι-hGDH2 και αντι-hGDH χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 1:5.000 και 1:15.000 αντίστοιχα.

ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN –ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

I. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμίδιου

Το ακρυλαμίδιο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μία ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων από 3% έως 30%. Το πήκτωμα σχηματίζεται με βινύλ-πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμίδιου που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολύακρυλαμίδιου. Σε αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου (bis) τα οποία λόγω της δομής τους μπορούν να ενσωματωθούν σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι να δημιουργηθεί ένα πλέγμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμίδιου γίνεται με μια βάση, την NNN'N'- τετραμεθυλοδιαμίνη (TEMED), για τη δράση της οποίας είναι απαραίτητη η παρουσία υπέρ-θειικών ιόντων. Τα υπερθειικά ιόντα ενεργοποιούν το TEMED, προκαλώντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, που με τη σειρά τους καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμίδιου. Η συγκέντρωση του ακρυλαμίδιου καθορίζει το μέσο μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς, ενώ η αναλογία ακρυλαμίδιου προς μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο καθορίζει την έκταση του σχηματισμού γεφυρών (cross-links). Έτσι και τα δυο είναι σημαντικά για τον καθορισμό των φυσικών ιδιοτήτων του πηκτώματος όπως είναι η πυκνότητα, η ελαστικότητα, η μηχανική αντοχή και το μέγεθος των πόρων.

Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4 gr SDS/gr

πρωτεΐνης) προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μεγέθους τους. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών όπως το DTT ή η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, τόσο αυτών που υπάρχουν στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα, όσο και αυτών που συνδέουν διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες πολυμερών πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 100°C για 3 λεπτά. Τελικά, τα πολυπεπτίδια τα οποία αναλύονται στην SDS-PAGE, έχουν αποκτήσει καθαρό αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Τα δείγματα για να τρέξουν στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αναμειγνύονται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών για SDS-PAGE (Loading Buffer SDS-PAGE 2X), ενώ η προσθήκη DTT γίνεται λίγο πριν τη φόρτωση τους στο πήκτωμα.

Το πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδιου αποτελείται από δύο διαφορετικά πηκτώματα. Το πρώτο είναι το πήκτωμα διαχωρισμού (*separation gel*) στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση του πηκτώματος αυτού εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να ελέγξουμε. Στα δικά μας πειράματα, καλύτερο διαχωρισμό των δύο ισομορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης επιτύχαμε με συγκέντρωση 8,5%. Το πήκτωμα αυτό παρασκευάζεται πρώτο στη βάση της συσκευής και στη συνέχεια επικαλύπτεται η ανώτερη επιφάνεια με νερό ώστε να πήξει δημιουργώντας μια ομοιόμορφη γραμμή. Από πάνω, βρίσκεται το πήκτωμα συμπύκνωσης ή επιστοίβασης (*stacking gel*), συγκέντρωσης 4%, το οποίο χρησιμεύει στην ταυτόχρονη είσοδο όλων των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού και περιέχει και τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Η πήξη επέρχεται μετά από 20 - 30min για το πήκτωμα διαχωρισμού και σε 10-15min για το πήκτωμα συμπύκνωσης σε RT.

Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα (*running buffer 1X*) με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου με διαφορά δυναμικού αρχικά 80V και στην συνέχεια όταν έχουν περάσει πλέον τα δείγματα στο πήκτωμα διαχωρισμού 110V.

II. Μεταφορά σε μεμβράνη - Transfer

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πολυπεπτιδίων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αρχικά κόβουμε τη μεμβράνη στις κατάλληλες διαστάσεις και την εμβαπτίζουμε σε παγωμένο διάλυμα μεταφοράς (*transfer buffer*). Τοποθετούμε στη συσκευή μεταφοράς τα παρακάτω με τη σειρά που αναφέρεται: (αρνητικός πόλος) δικτυωτό πλέγμα - σφουγγάρι - 3 χαρτιά whattman - πήκτωμα - μεμβράνη - 3 χαρτιά whattman - σφουγγάρι - δικτυωτό πλέγμα (θετικός πόλος). Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης 310mA για 1hr και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.

Προμηθευτήκαμε τις συσκευές από τη Bio-Rad Laboratories (Mini-PROTEAN electrophoresis system)

III. Blocking

Μετά τη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η μεμβράνη επώαζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμευσης (μπλοκάρισμα). Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, απαιτείται να υπάρχει στο διάλυμα κάποιος παράγοντας ο οποίος να μπορεί να δεσμευτεί σε αυτές τις μη ειδικές θέσεις. Το γάλα είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αυτό το πλεονέκτημα. Το διάλυμα οπότε αποτελείται από άπαχο γάλα διαλυτοποιημένο σε PBS-Tween 0,1% (*blocking solution*). Η εμβάπτιση διαρκεί 1hr σε RT αλλά μπορεί να γίνει και όλη νύχτα στους 4°C.

IV. Ανοσοαποτύπωση

Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης-αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στις μεμβράνες, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων

αλληλεπιδράσεων, διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Η μεμβράνη επώαζεται με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευτεί και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του πρώτου αντισώματος. Στο δεύτερο αντίσωμα έχει ομοιοπολικά συνδεθεί ένζυμο (υπεροξειδάση), με τη δράση του οποίου με χημειοφωταύγεια παίρνουμε σήμα στο σημείο που βρίσκεται η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Μετά το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα το οποίο περιέχει το πρώτο αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε PBS- Tween 0,1% στην κατάλληλη αραίωση κάθε φορά. Η επώαση γίνεται όλη νύχτα στους 4°C αλλά μπορεί να γίνει και σε RT για μία ώρα. Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα, η μεμβράνη ξεπλένεται. Αρχικά γίνονται 3 γρήγορες πλύσεις με PBS 1X και στη συνέχεια 3 πλύσεις με PBS- Tween 0,1% για 15min, 5min και 5min.

Αφού έχουμε ξεπλύνει τη μεμβράνη, τη επωάζουμε με το δεύτερο αντίσωμα. Το δικό μας δεύτερο αντίσωμα ήταν το anti-rabbit HRP conjugated και είναι αραιωμένο 1/2500 σε PBS- Tween 0,1% . Η επώαση διαρκεί 1hr σε RT. Μετά το πέρας της επώασης, η μεμβράνη ξεπλένεται όπως και πριν με την προσθήκη δύο ακόμη πεντάλεπτων πλύσεων με PBS 1X μετά τις πλύσεις με PBS- Tween 0,1%, γιατί το Tween εμποδίζει τη χημική αντίδραση της υπεροξειδάσης.

Τέλος, ακολουθεί η εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος των πρωτεϊνών με τη χρήση του συστήματος χημειοφωταύγειας ECL(Chilucent Detection System kit) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας (Chemicon International).

V. Αποδέσμευση αντισωμάτων από τη μεμβράνη

Η διαδικασία αποδέσμευσης του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συμβαίνει μόνο όταν έχει χρησιμοποιηθεί το σύστημα της χημειοφωταύγειας για το ανοσοαποτύπωμα της πρωτεΐνης και επιθυμούμε να επωάσουμε ξανά την ίδια μεμβράνη με διαφορετικό αντίσωμα. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C από όπου την παίρνουμε και την

εμβαπτιζουμε σε ειδικό διάλυμα *reprobing* για 15-20min. Ακολουθούν δύο πεντάλεπτα ξεπλύματα με blocking solution και

κατόπιν ακολουθείται κανονικά η διαδικασία από το μπλοκάρισμα και μετά. Το διάλυμα είναι το Re-Blot Plus (mild-strong) της Chemicon International.

VI. ΣΥΝΤΑΓΕΣ

<u>Loading buffer (1X SDS gel - LB)</u>	<u>Loading buffer (2X SDS gel - LB)</u>
• 50mM Tris-HCl (pH 6,8)	• 100mM Tris-HCl (pH 6,8)
• 100mM DTT	• 200mM DTT
• 2% SDS	• 4% SDS
• 0,1% bromophenol blue	• 0,2% bromophenol blue
• 10% glycerol	• 20% glycerol

<u>Separating buffer</u>	<u>Stacking buffer</u>
• 1,5M Tris (pH 8,8)	• 0.5M Tris (pH 6,8)
• 0,4% SDS	• 0,4% SDS

<u>Separating gel 7,5%</u>		<u>Separating gel 8,5%</u>	
• dd H ₂ O	2,5 ml	• dd H ₂ O	2,33 ml
• 30%Acrylamide	1,25 ml	• 30%Acrylamide	1,42 ml
• Separating buffer	1,25 ml	• Separating buffer	1,25 ml
• 10% APS	50μl	• 10% APS	50μl
• TEMED	2,5μl	• TEMED	2,5μl
V _{fin}	5 ml	V _{fin}	5 ml

<u>Stacking gel</u>	
• dd H ₂ O	1,8 ml
• 30%Acrylamide	450μl
• Stacking buffer	750μl
• 10% APS	30μl
• TEMED	3μl
V _{fin}	3 ml

<u>Blocking solution</u>
• 2,5gr γάλα σε σκόνη (Regilait στο ψυγείο)
• PBS Tween μέχρι τα 50 ml

<u>Reprobe solution 1X (για 20ml)</u>
• 18ml ddH ₂ O
• 2ml mild (or strong) reprobe solution 10X

* ΓΑΝΤΙΑ – ΠΟΜΠΑ – ΜΑΣΚΑ *

<u>SDS 10%</u>	<u>30%Acrylamide</u>
• 900ml dH ₂ O	• 29gr acrylamide
• 100gr SDS	• 1gr bisacrylamide
• pH 7,2 με HCl	• 60ml dH ₂ O
	• heating 37°C
	• adjust the volume up to 100ml with dH ₂ O
	• pH 7,0
	• sterilize by filtration

<u>Running buffer 10X</u>	<u>Tris - Glycine 10X</u>	<u>Transfer buffer</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 900ml Tris-Glycine 10X 	<ul style="list-style-type: none"> • 30,2gr Tris-base • 188 gr Glycine 	<ul style="list-style-type: none"> • 100ml Running buffer 10X
<ul style="list-style-type: none"> • 100ml SDS 10% 	$V_{fin} (+H_2O) = 1 \text{ lt}$ pH 8,3,heating	<ul style="list-style-type: none"> • 700ml d H₂O • 200ml methanol

<u>PBS 1X</u>	<u>PBS Tween 0,1%</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 900ml dH₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • 999μl PBS 1X
<ul style="list-style-type: none"> • 100ml PBS 10X 	<ul style="list-style-type: none"> • 1μl Tween 20

<u>DTT (1M Dithiotheitol)</u>	<u>Sodium Acetate 3M (Ph 5,2 + pH 7,0)</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 3,09 gr DTT 	<ul style="list-style-type: none"> • 408,1 gr NaOH 3H₂O
<ul style="list-style-type: none"> • 20ml Sodium Acetate 0,01M 	<ul style="list-style-type: none"> • 800 ml H₂O
<ul style="list-style-type: none"> • pH 5,2 με NaOH 	<ul style="list-style-type: none"> • pH 5,2 με Glacial Acetic Acid ή
<ul style="list-style-type: none"> • αποστείρωση με φίλτράρισμα 	<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,0 με Dilute Acetic Acid
<ul style="list-style-type: none"> • σε aliquots του 1ml και κατευθείαν στους -20°C 	<ul style="list-style-type: none"> • στο 1 lt με ddH₂O • σε Aliquots sterilize by autoclaving

Buffer ομογενοποίησης	50ml	250ml	500ml	1000ml	Final Concentration
PMSF 100mM (MW 174.2) 17mg σε 1ml ddH ₂ O	50μl	4.35mg	8.70mg	17.4mg	0.1mM
Triton X-100 (10%) 5ml Triton X-100 (100%) σε 45ml dd H ₂ O	5ml	25ml	50ml	100ml	1%
TrisHCl 1M (pH 7.4) Παίρνουμε TrisHCl 1M και φτιάχνουμε το pH του στο 7.4	2.5ml	12.5ml	25ml	50ml	50mM
NaCl (MW 58.44)	1.461gr	7.305gr	14.61gr	29.22gr	0.5M
ddH₂O	To final volume 50ml	To final volume 250ml	To final volume 500ml	To final volume 1000ml	

3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΔΡΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΘΕΙΚΟ ΑΜΜΩΝΙΑ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΜΕ SDS page ΚΑΙ ΤΗ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ Coomassie (Coomassie Blue Brilliant staining).

Οι ιστοί που στο πρώτο έλεγχο αποδείχθηκαν θετικοί στην έκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου II καθαρίστηκαν περαιτέρω προκειμένου να απαλλαγούν πλήρως από τις υπόλοιπες (πλην της γλουταμικής αφυδρογονάσης) πρωτεΐνες του ιστού. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική κλασματοποίησης σε θειικό αμμώνιο (30-65%) ακολουθούμενη καταρχήν από υγρή χρωματογραφία στήλης υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (δισ) και τέλος

χρωματογραφία συγγένειας (υδροξυαπατίτη). Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού της πρωτεΐνης μας από κάθε ιστό, τα κλάσματα έκλουσης της τελευταίας χρωματογραφικής στήλης κάθε ιστού που εμφάνιζαν θετική ενεργότητα για το ένζυμό μας συνενώθηκαν και φορτώθηκαν με βάση την ενζυμική ενεργότητά τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS page, όπως περιγράφεται παραπάνω για διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάση του μοριακού τους βάρους) το οποίο στη συνέχεια βάφθηκε με τη χρωστική Coomassie του κυανού, η οποία βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό, πιστοποιήσαμε ότι κάθε δείγμα από καθαρισμένο ιστό περιείχε μόνο ενός είδους πρωτεΐνη οπότε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης εφαρμόστηκε επιτυχώς.. Θεωρητικά από κάθε δείγμα περιμένουμε μια μπάντα πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

I. SDS page

Με τον τρόπο που περιγράφεται στην παραπάνω ενότητα, φτιάχνουμε ένα πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου 8,5% και προετοιμάζουμε τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Η ποσότητα του δείγματος που θα φορτωθεί στο πήκτωμα, ορίζεται ως η ποσότητα καθαρισμένου ενζύμου (από τη στήλη χρωματογραφίας) η οποία παρουσία 1mM ADP, δίνει φωτομετρική απορρόφηση 0,2 – 0,25 OD/min. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί περίπου σε 1μgr πρωτεΐνης. Εκτός από τα ένζυμα, στο πήκτωμα θα φορτωθούν πρωτεϊνικός δείκτης (marker) και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις BSA (1 2 και 3mg/μl) για να είναι εφικτή η κατά προσέγγιση ποσοτικοποίηση του ενζύμου. Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα (*running buffer 1X*) με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου με διαφορά δυναμικού αρχικά 100V και στην συνέχεια όταν έχουν περάσει πλέον τα δείγματα στο πήκτωμα διαχωρισμού 150V.

II. Χρώση με Coomassie Blue Brilliant G 250 tablets

Φτιάχνουμε διάλυμα για τη χρώση. Στο διάλυμα χρώσης Coomassie Blue (Staining solution : Coomassie Blue 0,04% σε methanol/acetic acid/ water 50/10/40 v/v/v) τοποθετούμε το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης για περίπου 17 ώρες (overnight) στους 4°C, πάνω σε κινούμενη έδρα. Το σύνολο του πηκτώμας λαμβάνει μια μπλε χρώση, την οποία

πρέπει να απομακρύνουμε ούτως ώστε πάνω στη μεμβράνη να είναι ορατές μόνο οι μπάντες από τον εκάστοτε ιστό. Για το λόγο αυτό, φτιάχνουμε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution: methanol/acetic acid/ water 50/10/40 v/v/v). Ακολουθούν δεκαπεντάλεπτα ξεπλύματα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το διάλυμα αποχρωματισμού και σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου αποχρωματιστεί η επιφάνεια τις μεμβράνης και πλέον είναι ορατές μονάχα οι μπάντες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του εκάστοτε δείγματος.

Συνεχίζοντας, θα πρέπει να αποξηράνουμε τη μεμβράνη, για την περαιτέρω χρήση της. Αυτό πραγματοποιείται σε ειδικό αποξηραντή (με θέρμανση υπό συνθήκες κενού) overnight.

III. ΣΥΝΤΑΓΕΣ

Coomasie Stain (200ml)	Coomasie Destain (500ml)
80ml H ₂ O	315ml H ₂ O
20ml Acetic acid	35ml Acetic Acid
100ml Methanol	150ml Methanol
200mgr Coomasie Brilliant Blue (1tablet = 25mgr)	

4. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος EnVision™ +*(DAKO Real Detection System Peroxidase/DAB + Rabbit/Mouse REF K5007) που βασίζεται στη χρήση ενός πολυμερούς σκελετού δεξτράνης πάνω στον οποίο βρίσκονται συζευγμένα περί τα 70 μόρια υπεροξειδάσης (HRP: horseradish peroxidase) και πολλαπλά δευτερογενή αντισώματα. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι anti-rabbit και anti-mouse, με αποτέλεσμα το σύστημα του πολυμερούς δεξτράνης με προσδεμένα δευτερογενή

αντισώματα, να μπορεί να ανιχνεύσει κάθε ιστό στον οποίο υπάρχει δεσμευμένο πρωτογενές αντίσωμα προερχόμενο από ανοσοποίηση κουνελιού ή ποντικού. Η μέθοδος αυτή είναι αυξημένης ευαισθησίας, ελαχιστοποιεί τη δημιουργία μη ειδικής χρώσης και επιπλέον μειώνει το συνολικό αριθμό βημάτων που απαιτούνται για τη διαδικασία, σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές, όπως είναι το σύστημα βιοτίνης-αβιδίνης/στρεπταβιδίνης. Ο λόγος που δεν γίνεται χρήση του ευρέως χρησιμοποιούμενου συστήματος βιοτίνης -αβιδίνης/στρεπταβιδίνης είναι γιατί η μέθοδος του πολυμερούς παρακάμπτει το πρόβλημα της παρουσίας μεγάλης ποσότητας ενδογενούς βιοτίνης σε ιστούς όπως ο νεφρός και το ήπαρ που θέλουμε να μελετήσουμε.

Το απλό πρωτόκολλο απαιτεί επεξεργασία δειγμάτων 1) με το πρωτογενές αντίσωμα, 2) με το πολυμερές δεξτράνης, 3) με χρήση χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος (DAB : 3,3'-Diaminobenzidine). Ποιο αναλυτικά, αφού γίνει η αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών των ιστών, θα υποβληθούν σε θέρμανση για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων που πιθανότατα έχουν καλυφθεί κατά τη φάση της μονιμοποίησης του ιστού. Στη συνέχεια γίνεται επώαση των δειγμάτων με περίσσεια υπεροξειδίου, η οποία ως γνωστόν αποκλείει την ενδογενή υπεροξειδάση του ιστού. Το πρωτογενές αντίσωμα θα εντοπίσει ειδικά το εν λόγω ένζυμο/αντιγόνο (το anti-hGDH αναγνωρίζει όπως και στο Western τις hGDH1 και το anti-hGDH2 την hGDH2) μέσα στην τομή. Ακολουθεί επώαση με πολλαπλά μόρια του βραχίονα πολυμερούς δεξτράνης, πάνω στον οποίο είναι προσκολλημένο το δευτερογενές αντίσωμα. Το σύμπλοκο αυτό θα δημιουργήσει ειδική σύνδεση με το πρωτογενές αντίσωμα. Τέλος, γίνεται χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος (DAB). Η DAB προσκολλάται στα μόρια υπεροξειδάσης που βρίσκονται πάνω στο πολυμερές δεξτράνης και δίνει μια χαρακτηριστική καφέ χρώση στις περιοχές όπου εντοπίζεται τελικά το ένζυμο.

Ως θετικός μάρτυρας στις μελέτες ανοσο-ιστοχημείας χρησιμοποιήθηκαν τομές από ορχικό ιστό για τον οποίο είναι ήδη γνωστές οι συνθήκες που οδηγούν σε ειδική χρώση. Ο τίτλος τους του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:5.000 για όλους τους ιστούς εκτός από το επινεφρίδιο στο οποίο έπρεπε να αυξήσουμε την αραίωση σε 1:10.000 προκειμένου να πάρουμε καθαρή ειδική χρώση ενώ στον εγκέφαλο έπρεπε να αυξήσουμε την συγκέντρωση του

αντισώματος σε 1:2.000 . Η ειδικότητα της χρώσης διασφαλίστηκε με ταυτόχρονη χρώση του ίδιου ιστού χωρίς πρωτογενές αντίσωμα (με την προσθήκη μόνο του δευτερογενούς) και με πρωτογενές αντίσωμα αφού είχε προεπωαστεί με περίσσεια του αντιγόνου-πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση του κουνελιού κατά την παραγωγή του ειδικού αντισώματος anti-hGDH2.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ: Η ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τομές μικροτόμου πάχους 4 μm από μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια εγκλεισμένα σε παραφίνη, τοποθετήθηκαν επάνω σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες και αποπαραφινώθηκαν με εμβάπτισή τους σε ξυλόλη (τρεις). Στη συνέχεια ενυδατώθηκαν σε μειούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (100%-70%) και αφού παρέμειναν στο ρυθμιστικό τους διάλυμα για 10 λεπτά υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία για αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με εμβάπτισή τους σε ειδικό διάλυμα και θέρμανσή στους 95 βαθμούς σε steamer για 40 λεπτά. Αφού αφέθηκαν για 15 λεπτά να επιστρέψουν σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε περίσσεια υπεροξειδίου του υδρογόνου για τον αποκλεισμό της ενδογενούς υπεροξειδάσης και παρέμειναν για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Στη συνέχεια αφού ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού μη ειδικής χρώσης (για 20 λεπτά) και επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη συγκέντρωση στους 4 βαθμούς κελσίου καθόλη τη διάρκεια της νύχτας. Η συγκέντρωση του ειδικού για την hGDH2 αντισώματος καθορίστηκε 1:5.000 σε όλους τους ιστούς εκτός από το επινεφρίδιο που χρειάστηκε να αραιωθεί περαιτέρω (1:10.000) και στον εγκέφαλο που χρειάστηκε να συμπυκνωθεί (1:2.000). Για το μη ειδικό αντίσωμα η συγκέντρωσή καθορίστηκε στο 1:5.000 για όλους τους ιστούς. Η προσθήκη ενός συστήματος χρωμογόνου (DAB (καφέ) ή AEC+ (κόκκινο)) έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό και τον εντοπισμό ενός ορατού χρωμογονικού προϊόντος στις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια, το δείγμα αντιχρωματίζεται με αιματοξυλίνη και η αντικειμενοφόρος καλύπτεται με καλυπτρίδα.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΩΣΗΣ

I. Σημειώσεις για τη διαδικασία χρώσης

- α. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αφήνονται να ισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν την ανοσοχρώση.
- β. Όλες οι επωάσεις πρέπει πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός εάν σημειώνεται διαφορετικά.
- γ. Οι αντικειμενοφόροι δεν αφήνονται να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρώσης. Στις παρατεταμένες επωάσεις, οι αντικειμενοφόροι πρέπει να τοποθετούνται σε θάλαμο υγρανσης.

II. Ανάκτηση επιτοπίου

- α. Γίνεται αποπαραφίνωση των αντικειμενοφόρων με μονιμοποιημένο παρασκεύασμα ως εξής: αρχικά τα παρασκευάσματα θερμαίνονται σε φούρνο (58°C - 60°C) για 10 λεπτά. Ακολουθούν 2 αλλαγές ξυλόλης (30 λεπτά έκαστη), 2 αλλαγές σε αλκοόλη 100% (15 λεπτά έκαστη), 1 αλλαγή σε αλκοόλη 90% (15 λεπτά) και 1 αλλαγή σε αλκοόλη 70% (15 λεπτά).
- β. Επανεnudάτωση των αντικειμενοφόρων με έκπλυση σε απιονισμένο H₂O (15 λεπτά).
- γ. Οι αντικειμενοφόροι βυθίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS και ξεπλένονται για 5 λεπτά.
- δ. Σε κατάλληλο βραστήρα προθερμαίνεται Target retrieval solution (DAKO) (15 λεπτά). Εν συνεχεία, γίνεται τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων στο Target Retrieval solution και αφήνονται να βράσουν για 40 λεπτά. Η θερμοκρασία στο βραστήρα – μηχανική μέθοδος – σε συνδυασμό με το υψηλό pH του Target retrieval solution – χημική μέθοδος – προκαλούν ρήξη των πρωτεϊνικών δεσμών του ιστού οι οποίοι δημιουργήθηκαν κατά τη μονιμοποίηση αυτού. Όταν ολοκληρωθεί το χρονικό σημείο θέρμανσης, οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να κρυσώσουν

στο διάλυμα (περίπου 15 λεπτά) και να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

- ε. Γίνονται 2 αλλαγές των αντικειμενοφόρων σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS (5 λεπτά έκαστη).

III. Αντιδραστήριο αποκλεισμού υπεροξειδάσης

- α. Επώαση των αντικειμενοφόρων σε σκοτάδι με το αντιδραστήριου αποκλεισμού υπεροξειδάσης: 3% H₂O₂ σε Methanol (10 λεπτά)
- γ. Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με ddH₂O (3 ξεπλύματα).
- δ. Γίνονται 2 αλλαγές σε 1X PBS (5 λεπτά έκαστη).
- ε. Οριοθέτηση περιμετρικά του ιστού, με κατάλληλο στυλό DAKO ο οποίος δημιουργεί υδρόφοβο περιβάλλον γύρω από τον ιστό ούτως ώστε το προστιθέμενο υλικό να παραμένει μόνο πάνω στον δείγμα και μέσα στο κύκλο που ζωγραφίσαμε.
- στ. Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων σε έναν θάλαμο ύγρανσης που έχω ετοιμάσει (γεμάτο από χαρτοπετσέτες νοτισμένες με νερό).
- ζ. Αντιδραστήριο πρωτογενούς αντισώματος: Σε κάθε αντικειμενοφόρο προστίθενται 200μl αντίσωμα (anti-hGDH1 ή anti-hGDH2) και αφήνονται για επώαση overnight. Το μη ειδικό αντίσωμα, anti-hGDH1 είναι Rabbit Antibody του Glutamate Dehydrogenase, Cat.No. W59158R.
- η. Την επόμενη μέρα γίνονται αρχικά 3 αλλαγές σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1X PBS (5 λεπτά έκαστη).
- θ. Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων σε θάλαμο ύγρανσης που είναι ήδη έτοιμος
- ι. Προστίθενται 200μL αντιδραστήριου αντισώματος HRP EnVision mouse/rabbit για να καλυφθεί πλήρως η τομή του ιστού. Γίνεται επώαση 45 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- κ. Κάθε αντικειμενοφόρος ξεπλένεται ανεξάρτητα με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης με έναν υδροβολέα.
- λ. Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (3 αλλαγές, 5 λεπτά έκαστη).

IV. Διαδικασία εντοπισμού (χρήση των αντιδραστηρίων EnVision®+)

- α. Προσθήκη 200μL αντιδραστηρίου του διαλύματος εργασίας DAB για κάλυψη της εκάστοτε τομής ιστού.
- β. Η επώαση ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό.
- γ. Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων σε τρεχούμενο αποσταγμένο H₂O επί 5

V. Αντίχρωση

- α. Εμβάπτισμα των αντικειμενοφόρων σε φιλτραρισμένη αιματοξυλίνη για 1 λεπτό ($\pm 40''$).
- β. Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων επί 3 λεπτά σε τρεχούμενο H₂O βρύσης.

VI. Κάλυψη

- α. Εμβαπτίσμα των αντικειμενοφόρων σε αιθανόλη 70% (10 λεπτά), μετά σε αιθανόλη 90% (10 λεπτά) και τέλος σε αιθανόλη 100% (2 εναλλαγές, 15 λεπτά έκαστη).
- β. Αφυδάτωση με ξυλόλη (2 αλλαγές, 30 λεπτά έκαστη).
- γ. Κάλυψη αντικειμενοφόρων με μη υδατικό μονιμοποιητικό υλικό κάλυψης, DPX, με τη χρήση γυάλινων καπυπτρίδων.

VII. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε κάθε κύκλο χρώσης περιλαμβάνεται ένας ιστός θετικού μάρτυρα (στην περίπτωσή μας ορχικός ιστός) για την επαλήθευση της απόδοσης της δοκιμασίας. Όταν ο ιστός θετικού μάρτυρα δεν παρουσιάσει θετική χρώση, τα αποτελέσματα των υπόλοιπων δειγμάτων της εξέτασης πρέπει να θεωρηθούν ύποπτα ή άκυρα.

Επιπλέον σε κάθε κύκλο χρώσης περιλαμβάνετε και ένας ιστός αρνητικού μάρτυρα για την επαλήθευση της ειδικότητας του πρωτογενούς αντισώματος και ως ένδειξη για τη μη ειδική χρώση του δευτερογενούς αντισώματος (στην περίπτωσή μας ορχικός ιστός, ο οποίος στερείται μόνο το στάδιο επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα όπου χρησιμοποιείται ο διαλύτης χωρίς το αντίσωμα). Όταν ο ιστός αρνητικού μάρτυρα παρουσιάσει θετική ειδική χρώση, τα

αποτελέσματα των υπόλοιπων δειγμάτων της εξέτασης θεωρούνται ύποπτα ή άκυρα.

VIII. ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Οι χρωματισμένες αντικειμενοφόροι αξιολογούνται σε ειδικό μικροσκόπιο ορατού φωτός.

IX. ΣΥΝΤΑΓΕΣ

PBS 10X (ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης)

Σε 1lt ddH₂O προσθέτουμε 80gr NaCl, 2gr KCl, 14,4gr Na₂HPO₄ και 2,4gr KH₂PO₄. Ρυθμίζουμε το τελικό pH του διαλύματος στο 7,4.

3% H₂O₂ σε Μεθανόλη

Σε 27λ Μεθανόλη προσθέτουμε 3λ H₂O₂. (Δόση για 10 πλακάκια που τοποθετούνται ανα ζεύγη και κάθετα σε κατάλληλο σκεύος).

Πρωτογενή αντισώματα.

Για συγκέντρωση 1:5000

Σε 5ml Antibody Diluent προστίθεται 1λ είτε anti-GDH είτε anti-hGDH 2.

AB chromogen (3,3' Diaminobenzidine)

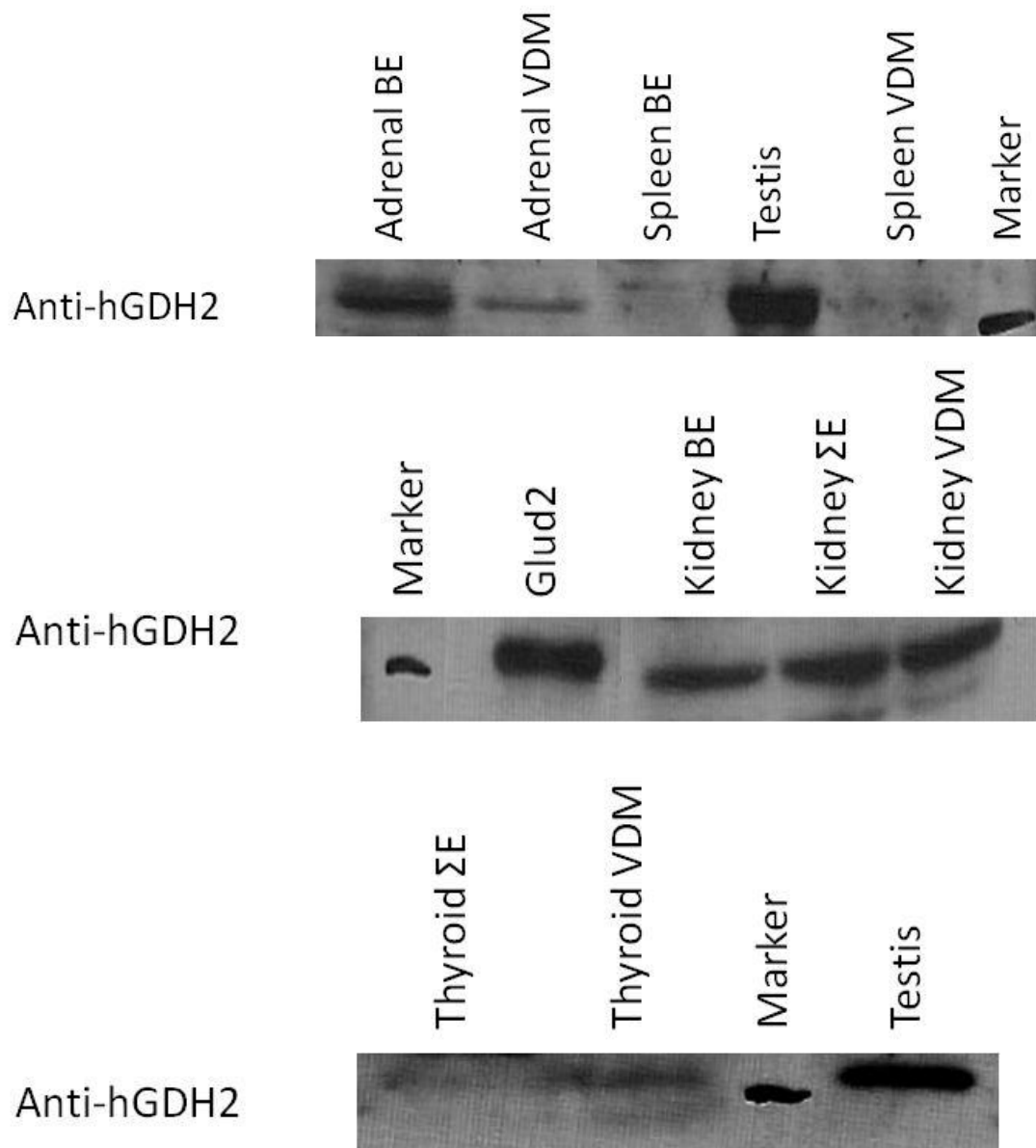
Σε 15ml substrate buffer προστίθενται 30λ DAB

Αποτελέσματα

WESTERN BLOT ΑΠΟ ΑΔΡΑ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση με την τεχνική Western σε αδρά ομογενοποιημένα ανθρώπινων ιστών χρησιμοποιώντας το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα και ένα μη ειδικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε ορχικός ιστός, νεφρός, επινεφρίδιο, εγκέφαλος, ήπαρ, σπλήνας, και θυρεοειδής από τουλάχιστον τρία διαφορετικά άτομα. Οι ιστοί ελήφθησαν κατά τη διάρκεια νεκροψίας μετά από ενήμερη συγκατάθεση των οικείων τους.

Κατά την ανάλυσή τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western διαπιστώθηκε ότι το ειδικό αντίσωμα anti-hGDH2 ανίχνευσε μια ανοσοαντιδρώσα (immune-reactive) μπάντα που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της γλουταμικής αφυδρογονάσης (56 kD) στον όρχη, το νεφρό το επινεφρίδιο και στον εγκέφαλο, μια αχνή μπάντα ανιχνεύθηκε στο θυρεοειδή και το ήπαρ ενώ δεν ανιχνεύεται καμία μπάντα στην αντίστοιχη περιοχή στους υπόλοιπους ιστούς (εικόνα 4).



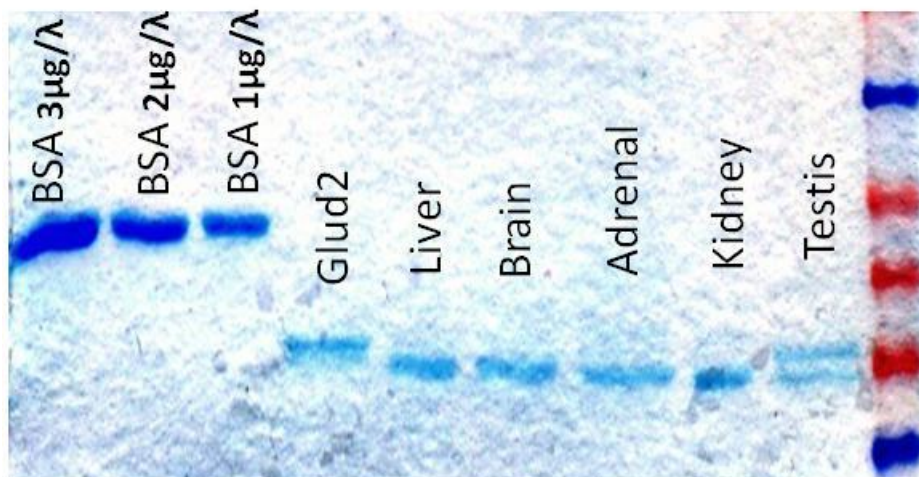
Εικόνα 4. Ανίχνευση της hGDH2 σε διάφορους ιστούς με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN ΣΕ ΚΑΘΑΡΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας από τα αδρά ομογενοποιημένα νεφρού, επινεφριδίου, εγκεφάλου και όρχεος, προχωρήσαμε σε πλήρη καθαρισμό της GDH από αυτούς τους ιστούς. Η ανάλυση με την τεχνική Western blot σε καθαρισμένα παρασκευάσματα GDH, με παράλληλη χρήση του ειδικού αντισώματος anti-hGDH2 και του μη ειδικού anti-GDH, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν σε αδρά ομογενοποιημένα.

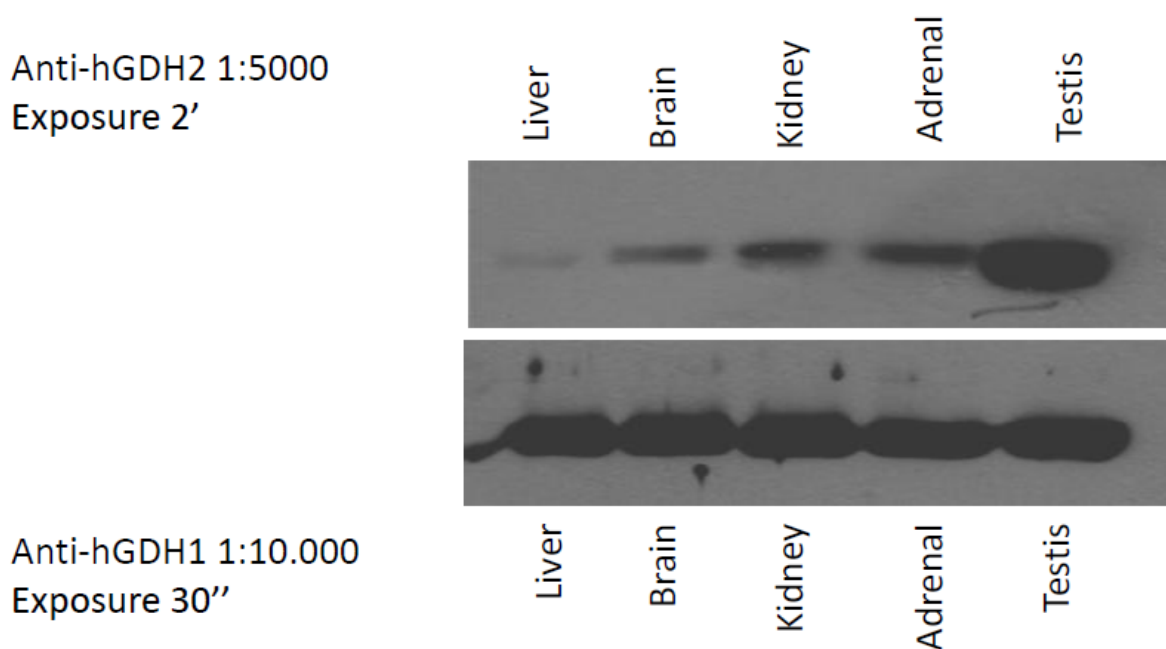
Αναλυτικότερα, επιλέξαμε τους ιστούς που βρέθηκαν θετικοί για την παρουσία της hGDH2 και αφού επιβεβαιώσαμε το εύρημα σε επιπρόσθετα άτομα, προχωρήσαμε σε καθαρισμό των ιστών με κλασματοποίηση με θειικό αμμώνιο και χρωματογραφία προκειμένου να απομονώσουμε την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (hGDH). Τα αδρά ομογενοποιημένα μας κλασματοποιήθηκαν με θειικό αμμώνιο στη συγκέντρωση 30-65%. Το ίζημα της κλασματοποίησης επαναδιαλύθηκε σε θειικό αμμώνιο 15%, φορτώθηκε και εκλούστηκε από τρεις διαδοχικές στήλες χρωματογραφίας. Οι πρώτες δύο ήταν στήλες υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (φαινυλσεφαρόζης) και η τελευταία ήταν χρωματογραφία συγγένειας (υδροξυαπατίτη). Τα κλάσματα της κάθε στήλης εκτιμήθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλουταμική αφυδρογονάση με την μέτρηση της ενζυμικής δραστηρότητας τους σε φασματοφωτόμετρο προς την κατεύθυνση σύνθεσης γλουταμικού. Τα κλάσματα έκλυσης της πρώτης στήλης που περιείχαν το ένζυμό μας (η έκλυση έγινε με βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης αιθυλενογλυκόλης σε διάλυμα θειικού αμμωνίου 15%) συνενώθηκαν σε ένα, τοποθετήθηκαν σε ημιδιαπερατή μεμβράνη, υποβλήθηκαν σε διάλυση έναντι διαλύματος θειικού αμμωνίου 15% για την αφαίρεση της αιθυλενογλυκόλης από το δείγμα και φορτώθηκαν σε δεύτερη στήλη φαινυλσεφαρόζης. Τα κλάσματα της δεύτερης στήλης μετρήθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε ένζυμο και όσα βρέθηκαν θετικά συνενώθηκαν σε ένα το οποίο υποβλήθηκε σε νέα διάλυση έναντι διαλύματος KCl και φορτώθηκε σε στήλη υδροξυαπατίτη από την οποία εκλούστηκε με βαθμίδωση διαλύματος φωσφορικού νατρίου αυξανόμενης συγκέντρωσης.

Προκειμένου αφενός να επιβεβαιώσουμε την απόλυτη καθαρότητα των πρωτεϊνών μας, και αφετέρου να κάνουμε μια σχετική ποσοτικοποίηση της συγκεντρωσής της πρωτεΐνης που πήραμε καθαρή μετά τη χρωματογραφία, τα κλάσματα με την μεγαλύτερη ενεργότητα ενζύμου από κάθε ιστό ενώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) η οποία στη συνέχεια βάφθηκε με τη χρωση Κυανού Commasie. Στην ίδια γέλη φορτώθηκαν και καθαρισμένες (από τις τρεις στήλες χρωματογραφίας) ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 ως θετικοί μάρτυρες καθώς και αλβουμίνη (BSA) σε γνωστές συγκεντρώσεις 1, 2 και 3 μgr. Οι ποσότητες που φορτώθηκαν από κάθε ιστό υπολογίστηκαν με βάση την ενζυμική ενεργότητά που εμφάνιζαν και όχι με βάση την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει βρεθεί ότι 1 μgr πρωτεΐνης αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που δίνει μέγιστη δραστηριότητα (ενεργότητα σε παρουσία 1mM ADP) 0.25 (dA/min). Όπως φαίνεται στην εικόνα 5, τα κλάσματα της χρωματογραφίας των ιστών μας περιέχουν μια μόνο μπάντα στο Μοριακό Βάρος των 56 kD που αντιστοιχεί στο MB της πρωτεΐνης μας. Επιβεβαιώνεται το εύρημα προηγούμενων μελετών (καναβούρας και συν 2007) σύμφωνα με το οποίο η hGDH2 έχει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα καθώς δίνει μια μπάντα 1-2 kD υψηλότερα από την hGDH1. Στον όρχη απεικονίζονται δύο μπάντες η μία πάνω από την άλλη στην περιοχή μοριακού βάρους που αντιστοιχούν στις δύο πρωτεΐνες μας (η πάνω μπάντα είναι η hGDH2 και η κάτω μπάντα η hGDH1) οι οποίες επιπροσθέτως απεικονίζονται με την ίδια ένταση επιβεβαιώνοντας την αναλογία 1:1. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν απεικονίζονται δύο μπάντες, ενώ φαίνεται να απουσιάζει εκείνη που αντιστοιχεί στην hGDH2. Η προφανής εξήγηση είναι ότι η hGDG2 εκφράζεται σε πολύ μικρότερη αναλογία σε σχέση με την ισομορφή κυτταρικής οικονομίας στους ιστούς αυτούς με αποτέλεσμα τα επίπεδά της στο δείγμα που φορτώθηκε (1 μgr πρωτεΐνης) να μην επαρκούν για την απεικονισή της με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία (χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου)



Εικόνα 5. SDS-page/Coomasie Blue Brilliant

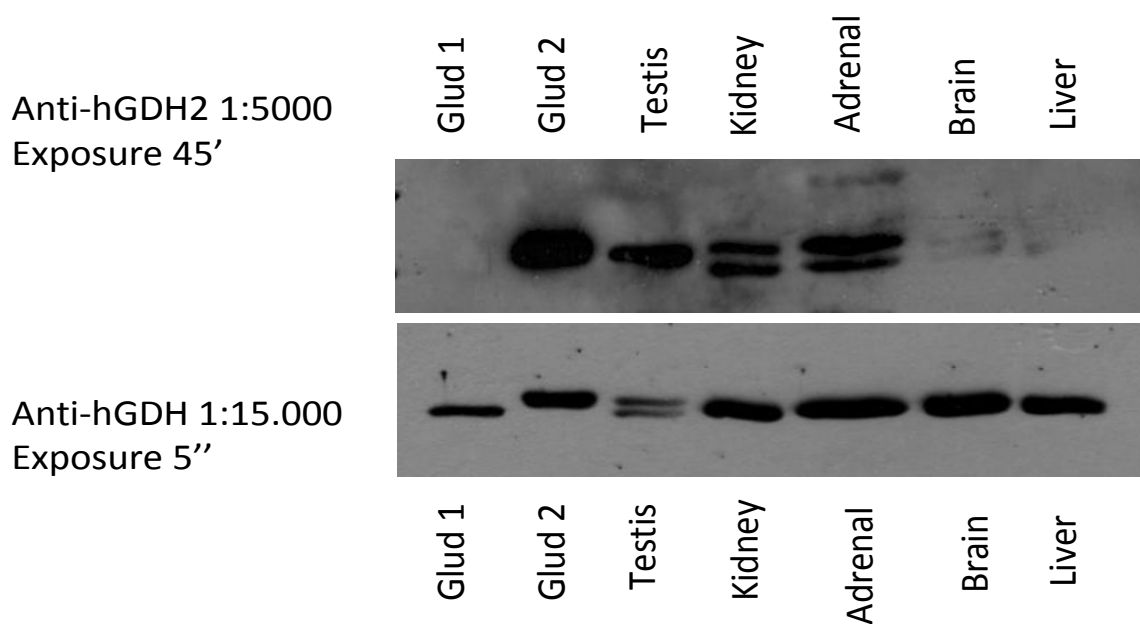
Μετά την επιβεβαίωση της καθαρότητας του δείγματός μας και την απουσία άλλων πρωτεϊνών προχωρήσαμε σε μελέτες με ανοσοαποτύπωση κατά Western με το ειδικό για την hGDH2 και το μη ειδικό αντίσωμα. Οι πρωτεΐνες φορτώθηκαν και πάλι με βάση την ενζυμική ενεργότητά τους και όχι με βάση την συγκέντρωσή τους.



Εικόνα 6. Σύγκριση εντάσεως έκφρασης της κάθε ισομορφής της γλουταμικής αφυδρογονάσης στους διάφορους ιστούς.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 6 το μη ειδικό αντίσωμα ανίχνευσε μια μεγάλη μπάντα μοριακού βάρους ~56 kD σε σχετικά ίση ένταση σε κάθε ιστό. Το anti-hGDH2 αντίσωμα αποκάλυψε μία ανοσοαντιδρώσα μπάντα στον όρχη, το νεφρό και τον εγκέφαλο ενώ μια πολύ αχνή μπάντα ανιχνεύθηκε και στο ήπαρ.

Όταν αυξήσαμε τον χρόνο της ηλεκτροφόρησης διαπιστώσαμε ότι ενώ στον όρχη ανιχνεύθηκε μια μπάντα σε όλους τους υπόλοιπους ιστούς ανιχνεύθηκαν δύο ανοσο-αντιδρώσες μπάντες (εικόνα 7) . Η μονή μπάντα που εμφανίζεται με το αντι-hGDH2 στον ανθρώπινο όρχη και η επάνω μπάντα που εμφανίζεται στον ανθρώπινο νεφρό, το επινεφρίδιο και τον εγκέφαλο βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με την καθαρή hGDH2 (μοριακό βάρος κατά προσέγγιση 58 kDa). Η δεύτερη, χαμηλότερη μπάντα που εμφανίζονται στον ανθρώπινο νεφρό, επινεφρίδιο και εγκέφαλο βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με την καθαρή hGDH1. Δεδομένου ότι προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η GDH υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στους ιστούς του ανθρώπου (Julliard και Smith, 1979? Hussain et al, 1989), είναι πιθανό οι μπάντες αυτές να οφείλονται στο γεγονός ότι η hGDH2 υπόκειται σε διαφορετικές τροποποιήσεις στον κάθε ιστό όπως για παράδειγμα στον ανθρώπινο εγκέφαλο το νεφρό και το επινεφρίδιο σε σχέση με τις τροποποιήσεις που γίνονται στους όρχεις.



Εικόνα 7 Η επάνω μπάντα στο νεφρό, το επινεφρίδιο, τον εγκέφαλο και η μονή μπάντα του όρχη αντιπροσωπεύουν την hGDH2. Η χαμηλότερη μπάντα στο νεφρό, το επινεφρίδιο και τον εγκέφαλο, αντιπροσωπεύει την hGDH1.

Επιπλέον, διαπιστώσαμε πάλι ότι ο όρχης περιέχει παρόμοιες ποσότητες hGDH1 και hGDH2 (αναλογία σχεδόν 1:1). hGDH1 (Spanaki et al, 2011). Στον αντίποδα, ο νεφρός το επινεφρίδιο και ο εγκέφαλος περιέχουν σαφώς μεγαλύτερες ποσότητες hGDH1 από ότι hGDH2. Υπό αυτές τις συνθήκες το μη ειδικό αντίσωμα, εντοπίζει μια πυκνή μπάντα η οποία φαίνεται να αντιστοιχεί στο MB των 56 kD και άρα στην hGDH1. Το γεγονός ότι το μη ειδικό δεν ανιχνεύει μια υψηλότερα εντοπιζόμενη μπάντα η οποία θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην hGDH2 ενώ ανιχνεύει την ανασυνδυασμένη μορφή της hGDH2 που έχει παραχθεί σε κύτταρα SF21 υποδηλώνει ότι η ποσότητα της στα δείγματα των ιστών που αναλύθηκαν δεν επαρκεί ώστε να απεικονιστεί με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία. Εάν αυξήσουμε τον χρόνο έκθεσης κατά τη διαδικασία εμφάνισης του φιλμ προκύπτει μια ευμεγέθους μπάντα στην οπο αλληλεπικαλύπτονται οι δύο που αντιστοιχούν στην τύπου 1 και τύπου 2 πρωτεΐνη.

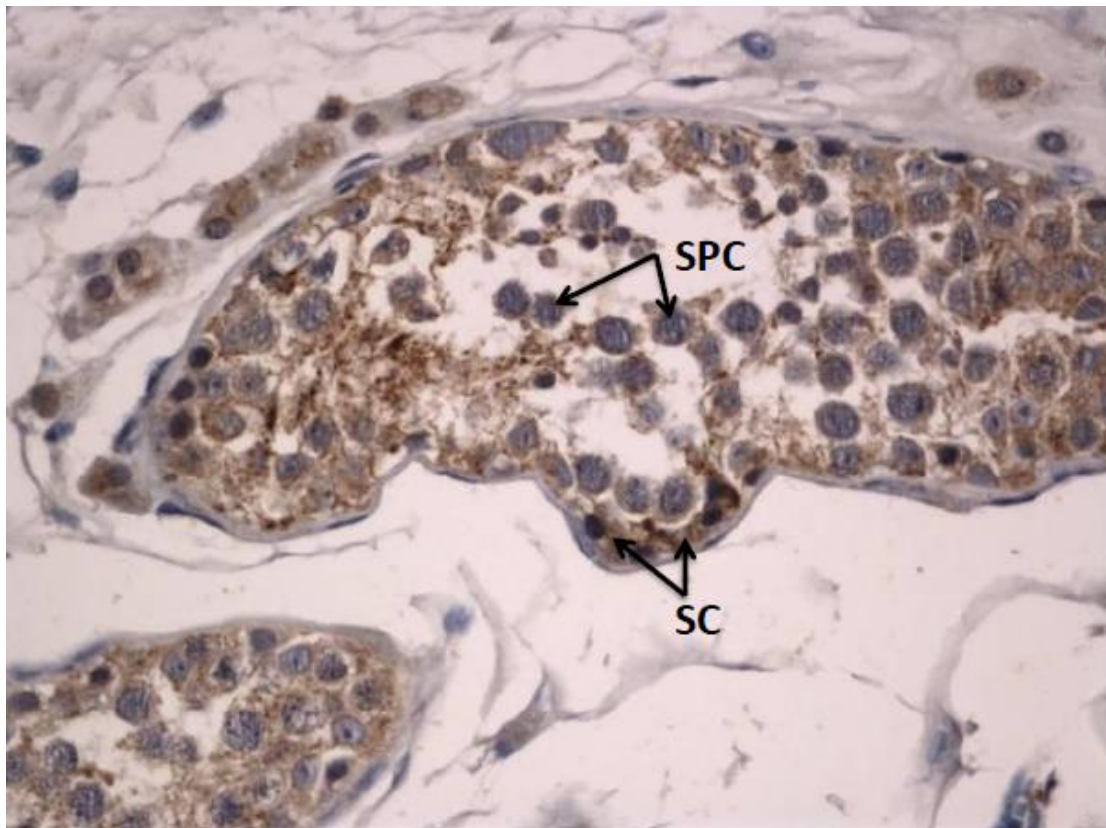
Σύγκριση των αποτελεσμάτων από τα Westerns αποκάλυψε ότι ο όρχης είναι ο ιστός με την μεγαλύτερη αναλογία hGDH2:hGDH1 (1:1) ενώ ο αμέσως επόμενος στη σειρά φαίνεται να είναι το επινεφρίδιο και ο νεφρός (1:10) και ακολουθεί ο εγκέφαλος (<1:20). Το ανθρώπινο ήπαρ που μέχρι πρόσφατα είχε βρεθεί αρνητικό, όσον αφορά στην παρουσία της hGDH2, με ανάλυση που έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες (Spanaki et al, 2010), φαίνεται ότι εκφράζει την hGDH2 σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ

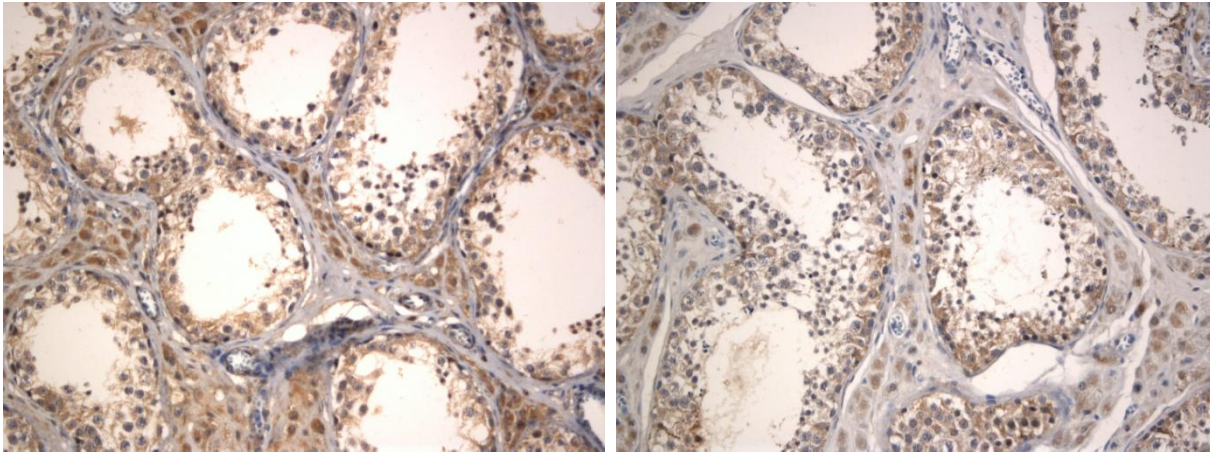
Για να εξερευνήσουμε περαιτέρω την κυτταρική κατανομή της ανοσοδραστικότητας της hGDH2 στους ιστούς στους οποίους η παρουσία της πρωτεΐνης έχει ήδη δειχθεί με στύπωμα κατά Western, προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε μονιμοποιημένα παρασκευάσματα των ίδιων ιστών που χρησιμοποιήσαμε στην ανάλυση με Western χρησιμοποιώντας το ειδικό για hGDH2 και το μη ειδικό αντίσωμα.

ΟΡΧΗΣ

Στους όρχεις εντοπίστηκε ισχυρή έκφραση της hGDH2 στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων Sertoli στα σπερματοφόρα σωληνάρια και στα κύτταρα Leydig στο διάμεσο χώρο. Τα σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα, οι σπερματίδες, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα κύτταρα του συνδετικού ιστού και τα υπόλοιπα κύτταρα του διαμέσου χώρου δεν παρουσίαζαν χρώση. Η ανοσολογική χρώση αμφοτέρων των κυτταρικών τύπων Sertoli και Leydig είχαν μια χαρακτηριστική κοκκώδη εμφάνιση η οποία συνάδει με το μιτοχονδριακό εντοπισμό που αναμένεται για την hGDH2 με βάση προηγούμενες μελέτες (Spanaki et al, 2010). Η χρώση του ιστού με το μη ειδικό αντίσωμα όπως αναμένετο είχε παρόμοια κατανομή αλλά είχε μεγαλύτερη ένταση στις δομές στις οποίες ανιχνεύθηκε.



Εικόνα 8. Χρώση μονιμοποιημένου ορχικού ιστού με το ειδικό αντίσωμα anti-hGDH2 και το πολυμερές EnVision της DAKO. Απεικόνιση του δείγματος με το χρωμογόνο DAB (καφέ χρώμα). Η στικτή καφέ χρώση στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων Sertoli (SC), μέσα στα σπερματικά σωληνάρια, αντιπροσωπεύει την hGDH2. Τα σπερματοκύτταρα (SPC) φαίνεται να στερούνται της παρουσίας της πρωτεΐνης. (Μεγ

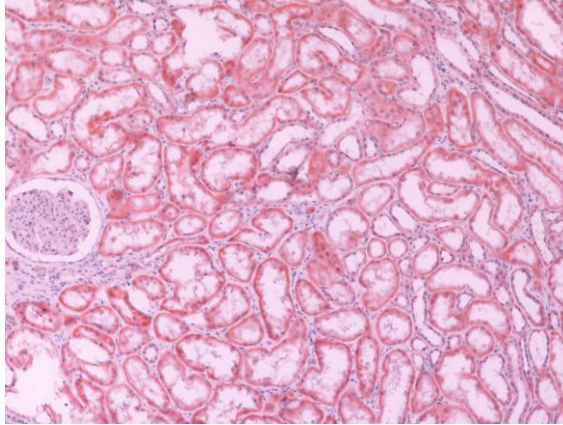


Εικόνα 9. Σπερματοφόρα σωληνάκια. EnVision (DAKO) + DAB chromogen. Αριστερά: χρώση με το μη ειδικό αντίσωμα anti-hGDH1. Δεξιά: χρώση με το ειδικό αντίσωμα anti-hGDH2. Στο διάστημα μεταξύ των σπερματοφόρων σωληναρίων, εντοπίζεται με καφέ χρώμα η hGDH2. Στο διάστημα αυτό βρίσκονται τα κύτταρα Leydig.

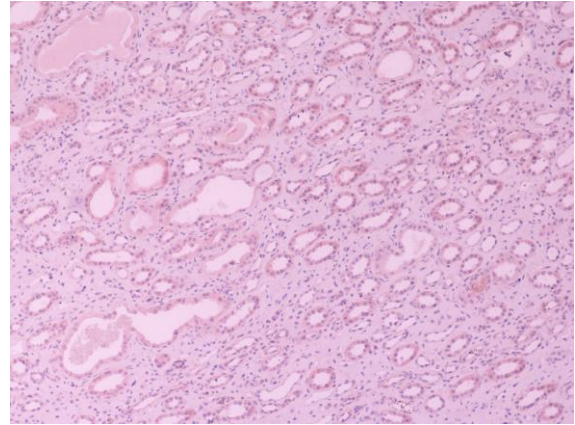
ΝΕΦΡΟΣ

Θετική χρώση για την hGDH2 διαπιστώθηκε κυρίως στο νεφρικό φλοιό και λιγότερο στο νεφρικό μυελό (εικόνα 10). Συγκεκριμένα χρώση ενδεικτική της παρουσίας του ενζύμου εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στα νεφρικά σωληνάκια. Ιδιαίτερα εμφανής ήταν η χρώση των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων λόγω πιθανότατα του γεγονότος ότι τα κύτταρα αυτά έχουν αρκετό κυτταρόπλασμα. Η χρώση εντοπιζόταν και στην κάψα του Bowman (η οποία αποτελεί στην ουσία συνέχεια των νεφρικών σωληναρίων). Λιγότερο έντονη αλλά σαφώς υπαρκτή ήταν η χρώση στα επιθηλιακά κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων και της αγκύλης Henle (επιθηλιακά κύτταρα με λιγότερο κυτταρόπλασμα). Το σπείραμα δεν εμφάνιζε χρώση καθώς και τα κύτταρα των ακτινωτών αγγείων (corona radiate) του νεφρικού μυελού. Η χρώση ήταν διάχυτη και δεν παρουσίαζε τη κοκκώδη εμφάνιση που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα Sertoli και τα αστροκύτταρα (Spanaki et al 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα κύτταρα έχουν μιτοχόνδρια, των οποίων το μέγεθος και το σχήμα διαφέρει της διαμόρφωσης μιτοχονδρίων άλλων ιστών καθώς είναι επιμήκη με ακτινωτή διάταξη και όχι σφαιρικά. γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνεύει την διάχυτη απεικόνιση της χρώσης.

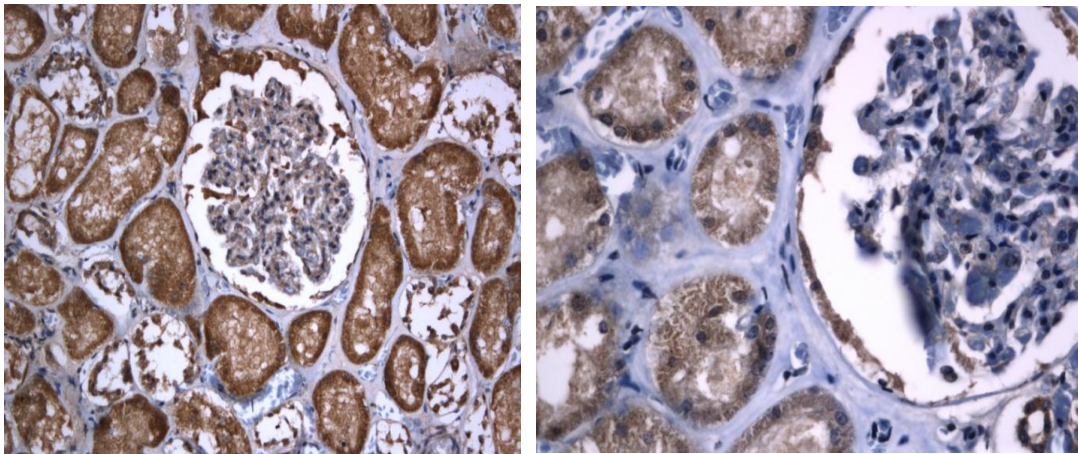
Νεφρικός Φλοιός



Νεφρικός μυελός



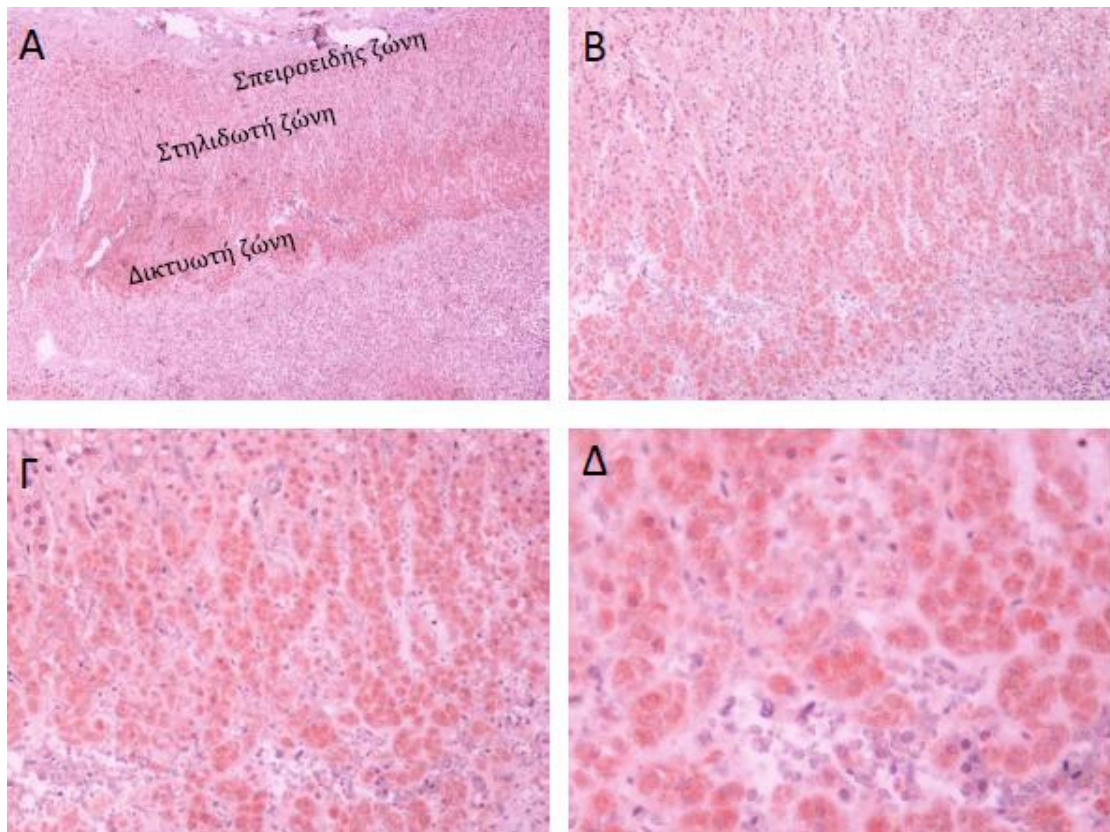
Εικόνα 100. Χρώση μονιμοποιημένου ιστού με το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα και με το πολυμερές EnVision της DAKO και απεικόνισή του με το χρωμογόνο AEC (κόκκινο). Σαφώς εντονότερη φαίνεται η χρώση στο νεφρικό φλοιό (αριστερά), στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων που καλύπτουν εξωτερικά τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια. Τα επιθηλιακά κύτταρα γύρω από τα αθροιστικά σωληνάρια βάφονται επίσης, αλλά έχουν λιγότερο έντονη ανοσοδραστικότητα. Δεν βρέθηκε έκφραση της hGDH2 στο συνδετικό ιστό του μανδύα, τα σωληνάρια και τη Vasa Recta του μυελού του νεφρού.



Εικόνα 11. Νεφρικά σωληνάρια. EnVision (DAKO) +DAB chromogen. Αριστερά: χρώση με το μη ειδικό αντίσωμα anti-hGDH1. **Δεξιά:** χρώση με το ειδικό αντίσωμα anti-hGDH2. Η χρώση στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων είναι έντονη και φανερώνει την παρουσία της hGDH2. Στερείται όμως της στικτής χρώσης που χαρακτηρίζει τα κύτταρα Sertoli στον όρχη.

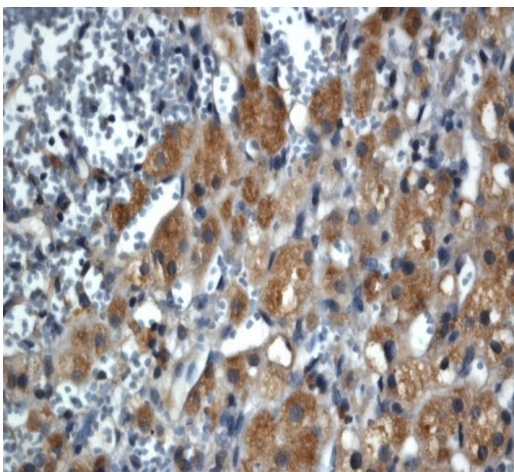
ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟ

Η ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό επινεφριδίου με το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα σε αραιώση 1:10.000 αποκάλυψε έκφραση της μόνο στο φλοιό ενώ ο μυελός ήταν αρνητικός. Ειδική χρώση ανιχνεύθηκε και στις τρεις στιβάδες με εντονότερη από τις τρεις τη δικτυωτή στιβάδα.

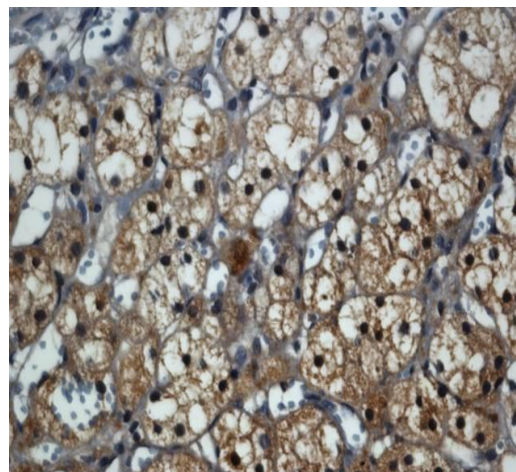


Εικόνα 112. Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό επινεφριδίου με το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα και το χρωμογόνο AEC (κοκκίνο) αποκαλύπτει έκφραση της και στις τρεις στιβάδες. (Α:μεγέθυνση X5 (A), B:X10),. Εντονότερη απο τις τρεις απεικονίζεται η χρώση της δικτυωτής στιβάδας (Γ:X20) η οποία εμφανίζει τη χαρακτηριστική κοκκώδη χρώση της μιτοχονδριακής εντόπισης (Δ:μεγέθυνση X40). Αντιχρώση με αιματοξυλίνη.

Δικτυωτή Ζώνη



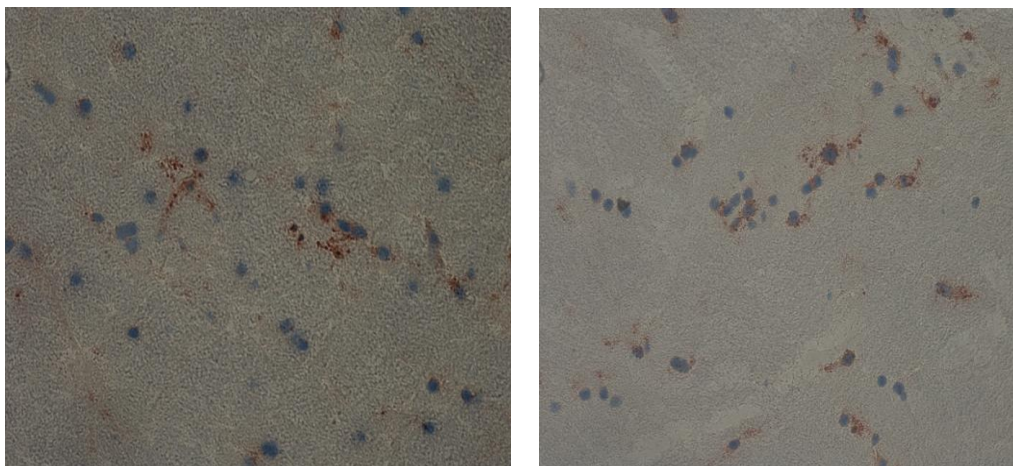
Σπειροειδής Ζώνη



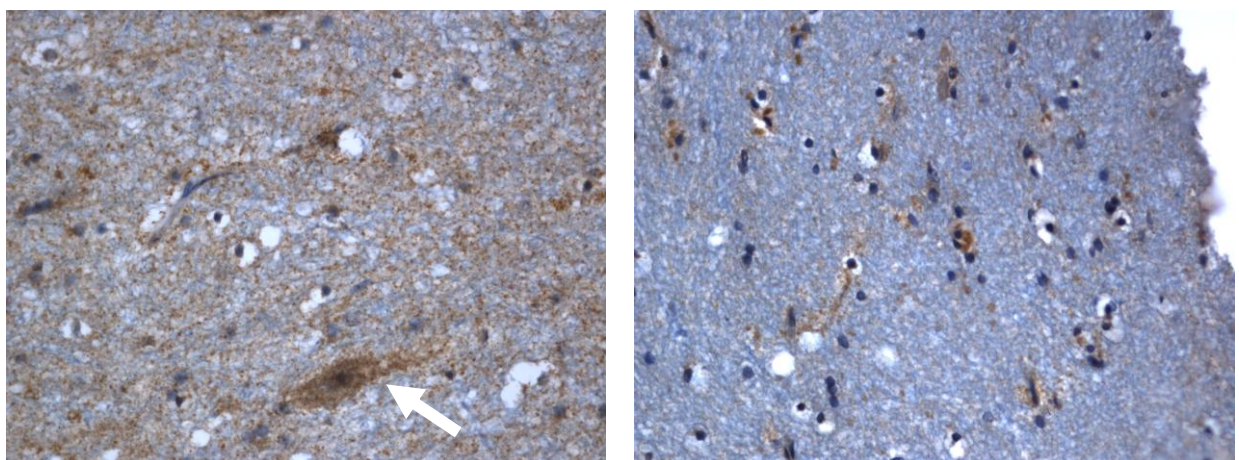
Εικόνα 123. Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό επινεφριδίου με το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα (1:10.000), όπως περιγράφεται στο κείμενο με χρωμογόνο DAB (καφέ) αποκαλύπτει ειδική χρώση στη δικτυωτή (αριστερά) και τη σπειροειδή (δεξιά) στιβάδα του φλοιού (μεγέθυνση X40). Αντιχρώση με αιματοξυλίνη.

ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ

Ο εγκέφαλος δεν παρουσίαζε καμιά χρώση εάν χρησιμοποιούσαμε το αντίσωμα στην αραιώση 1:5.000. Χρειάστηκε να κατεβούμε στο 1:2.000 για να πάρουμε ειδική χρώση οι οποία είχε χαρακτηριστικά αστροκυτταρικής εντόπισης, κυρίως περιπυρηνικά και στις προεκβολές τους γεγονός που συνάδει με τις προηγούμενες περιγραφές (Σπανάκη και συν 2010) . Εντούτοις, η ειδική χρώση πρέπει να αφορά κάποια αστροκύτταρα και όχι το σύνολό τους. Η χρώση παρουσίαζε την στικτή κοκκώδη εμφάνιση που είναι χαρακτηριστική μιτοχονδριακής εντόπισης. Ενίοτε λαμβάναμε μια διάχυτη μη ειδική χρώση και στους νευρώνες. Αντίθετα το μη ειδικό αντίσωμα εμφάνιζε μια πολύ εντονότερη χρώση που αφορούσε το σύνολο των νευρώνων και πιθανά των αστροκυττάρων στις τομές οι οποίες μελετήθηκαν (Εικόνες 14 και 15)



Εικόνα 134 Εγκέφαλος. EnVision (Dako) + AEC chromogen (κόκκινο). Αποκαλύπτεται, η έκφραση της hGDH2 σε αστροκύτταρα με εντόπιση περιπυρηνικά και στις προεκβολές τους με τη χαρακτηριστική κοκκώδη χρώση της μιτοχονδριακής εντόπισης (Δ:μεγέθυνση X40). Αντιχρώση με αιματοξυλίνη.



Εικόνα 15. Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένες τομές εγκεφάλου με το μη ειδικό (1:5.000) (αριστερά) και το ειδικό αντίσωμα (1:2.000) αντίσωμα (δεξιά) και ανίχνευση της συνολικής γλουταμικής αφυδρογονάσης σε νευρωνικές (άσπρο βέλος) και αστροκυτταρικές δομές και της hGDH2 σε περιορισμένο αριθμό αστροκυττάρων (χρώση με DAB, καφέ χρωμογόνο). (Μεγέθυνση 20X)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την εντόπιση της έκφρασης της γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 σε ανθρώπινους ιστούς. Το εγχείρημα αυτό έχει σταθεί ιδιαίτερα δύσκολο τα προηγούμενα χρόνια καθώς η ισομορφή αυτή διαφέρει μόνο σε 15 αμινοξέα (τα οποία είναι διάσπαρτα κατανεμημένα στην πολυπεπτιδική αλυσσο) από την ισομορφή κυτταρικής οικονομίας η οποία εκφράζεται ευρέως στους ιστούς. Το γεγονός αυτό καθιστούσε προβληματική τη διάκριση μεταξύ των δύο ισομορφών τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Στο εργαστήριο Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανε/μίου Κρήτης έχει αναπτυχθεί ένα ειδικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει με τρόπο ειδικό την hGDH2 ενώ δεν φαίνεται να αναγνωρίζει ακόμα και μεγάλες συγκεντρώσεις της hGDH1.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε το ειδικό για την hGDH2 αντίσωμα προκειμένου να μελετήσουμε την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε ανθρώπινους ιστούς με εφαρμογή των τεχνικών της ανοσοστύπωσης κατά Western και της ανοσοιστοχημείας.

Εδείχθη ότι η πρωτεΐνη hGDH2 εκφράζεται ενδογενώς στον όρχη, το επινεφρίδιο, το νεφρό και τον εγκέφαλο. Οι μελέτες με ανοσοϊστοχημεία αποκάλυψαν την έντονη έκφραση της hGDH2 στα κύτταρα Sertoli των σπερματοφόρων σωληναρίων των όρχεων, στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, στα κύτταρα της δικτυωτής, σπειροειδούς και στηλιδωτής ζώνης του επινεφριδίου και στα αστροκύτταρα στον εγκέφαλο.

Η υψηλότερη έκφραση της hGDH2 βρέθηκε στον όρχη. Αποτελεί στην ουσία την μισή ποσότητα της συνολικής γλουταμικής αφυδρογονάσης που παράγει ο ιστός. Το γεγονός αυτό συνάδει με παλαιότερα δημοσιευμένα δεδομένα που αφορούν την παρουσία mRNA της πρωτεΐνης στον όρχη. Είναι γνωστό ότι αρκετά γονίδια που προέρχονται από ρετρομετάθεση (όπως είναι το GLUD2 που κωδικοποιεί την hGDH2) εκφράζονται αρχικά

στους όρχεις και αναπτύσσουν αργότερα μια ευρύτερη κατανομή στους υπόλοιπους ιστούς (Vinckenbosch et al,2006).

Σε παλαιότερες μελέτες όρχη και εγκεφάλου με την τεχνική Western blot σε υποκυτταρικά κλάσματα εδείχθη ότι η hGDH2 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Σπανάκη et al, 2010). Στις μελέτες ανοσοϊστοχημείας της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε μικοκοκκώδη χρώση ενδεικτική μιτοχονδριακής εντόπισης στον όρχη (κύτταρα Sertoli), τον εγκέφαλο (αστροκύτταρα) και το επινεφρίδιο (κύτταρα δικτυωτής και στηλιδωτής στιβάδος). Επίσης η παρόμοια κατανομή της χρώσης τόσο του ειδικού όσο και του μη ειδικού αντισώματος στους ιστούς εγείρει την υποψία ύπαρξης ετερο-εξαμερών. Η επανάληψη των χρώσεων με ειδικό για την hGDH1 αντίσωμα θα προσφέρει επιπρόσθετες πολύτιμες πληροφορίες επί του θέματος.

Με βάση τα δεδομένα μας, η hGDH2 στον όρχη εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli και Leydig, αλλά όχι στα σπερμογόνια και στα διαφοροποιημένα γεννητικά κύτταρα. Η σπερματογένεση (η ανάπτυξη των σπερματοζωαρίων από σπερμογόνια) εξαρτάται από τον υποστηρικτικό, και θρεπτικό ρόλο των κυττάρων Sertoli, τα οποία δημιουργούν τον αιματο-ορχικό φραγμό και παρέχουν το κατάλληλο μικρο-περιβάλλον για την διαφοροποίηση των γενετικών κυττάρων (σπερματογόνια → σπερματοκύτταρα →σπερματίδες→ σπερματοζωάρια).

Οι μελέτες μας έδειξαν επίσης ότι η hGDH2 εκφράζεται πιθανά σε αστροκύτταρα στον εγκέφαλο. Παρόμοια με τον υποστηρικτικό ρόλο των κυττάρων Sertoli που δημιουργούν τον αιματο-ορχικό φραγμό στους όρχεις, τα αστροκύτταρα είναι γνωστό ότι παρέχουν υποστήριξη και τρέφουν τους νευρώνες και επιπλέον δημιουργούν τον αιματεγκεφαλικό φραγμό. Ουσίες, όπως το γαλακτικό οξύ, που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli, ομοιάζουν με αυτές που εκκρίνονται από τα αστροκύτταρα. Υπάρχει πληθώρα μεταβολικών "κύκλων" και "διαδρομών" που επιτρέπουν την ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων. Ως εκ τούτου η hGDH1 και η hGDH2 ίσως

εξυπηρετούν διαφορετικές αλλά εξίσου σημαντικές ανάγκες της βιολογίας των αστροκυττάρων και της αστροκυτταρικής αλληλεπίδρασης με τους νευρώνες. Από αυτή την άποψη, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ιδιότητες που απέκτησε το hGDH2 επιτρέπουν μεν στο ένζυμο να είναι λειτουργικό, αλλά υπό συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που απαιτούνται για τη λειτουργία του hGDH1 σε νευρικό ιστό (Zaganas και Plaitakis, 2001). Αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την ανθεκτικότητα σε αναστολή από GTP, την εξάρτηση από ADP για την επιτέλεση καταλυτικών λειτουργιών και την ικανότητα του ενζύμου να λειτουργεί αποτελεσματικά σε χαμηλά επίπεδα ενδοκυττάρου pH. Η ανθεκτικότητα σε αναστολή από GTP διευκολύνει τη λειτουργία του hGDH2 σε περιβάλλον πλούσιο σε GTP όπως είναι ο νευρικός ιστός, επιτρέποντας στο ένζυμο να μεταβολίζει το γλουταμικό που απελευθερώνεται στις συνάψεις των νευρώνων κατά τη διάρκεια μιας διεγερτικής μετάδοσης, ακόμα και αν ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων παράγει ποσά GTP ικανά να αδρανοποιήσουν πλήρως την hGDH1. Επίσης, η εξάρτηση της hGDH2 από το κυτταρικό επίπεδο του ADP, μπορεί να είναι σημαντική για τη ρύθμιση της ροής του γλουταμικού, ως νευροδιαβιβαστή, μέσω της οδού της GDH, καθώς είναι γνωστό ότι στις συνάψεις, κατά τη διάρκεια μιας διεγερτικής μετάδοσης, είναι αυξημένη υδρόλυση του ATP σε ADP. (Erecinska και Nelson, 1990). Επιπλέον, η ικανότητα της L-λευκίνης να ευαισθητοποιεί την hGDH2 σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP μπορεί να επιτρέπει στο ένζυμο να ανταποκρίνεται επιτυχώς σε μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση της ADP, ακόμη και εν απουσία της απαιτούμενης ενέργειας. Ομοίως, το γεγονός ότι το βέλτιστο pH για την hGDH2 είναι κάπως χαμηλότερο από εκείνο για την hGDH1 μπορεί να είναι σημαντικό για τη λειτουργία του ενζύμου, υπό συνθήκες χαμηλού pH που επικρατούν στις συνάψεις των αστροκυττάρων μετά την ενδοκυττάρια πρόσληψη του γλουταμικού από τη συναπτική σχισμή.

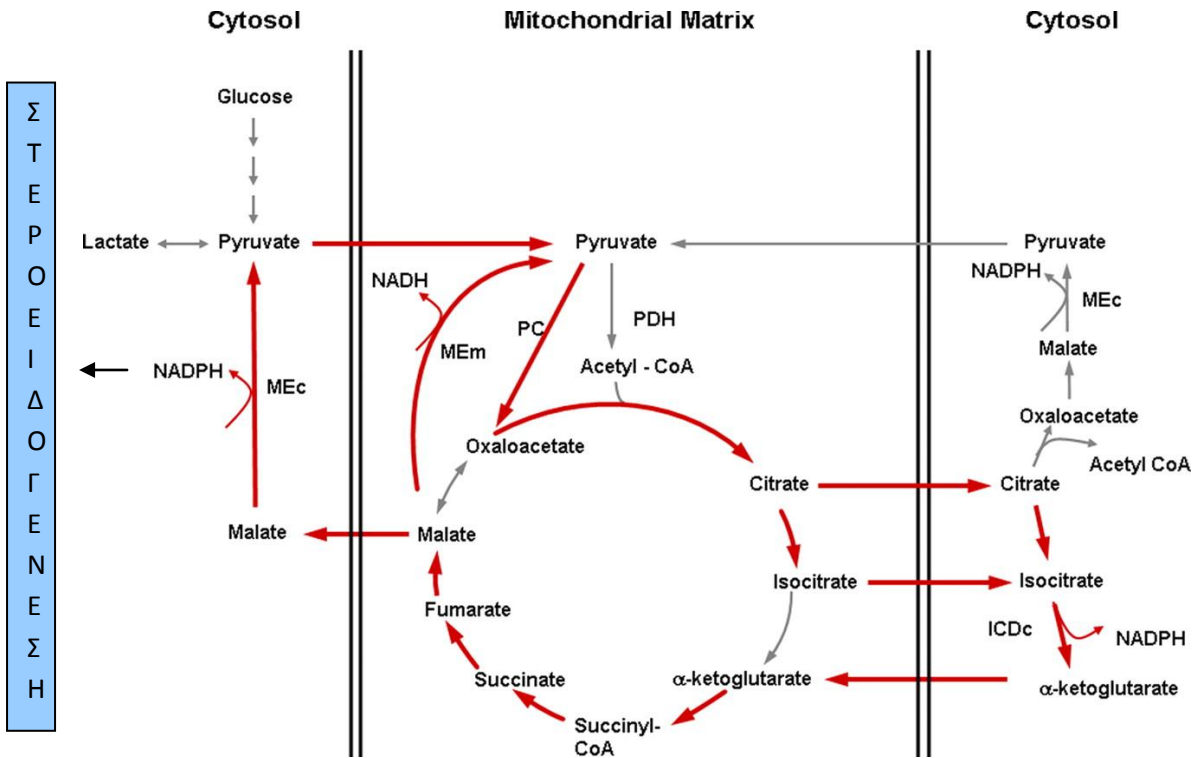
Η παρουσία του hGDH2 σε επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων στο νεφρό υποδηλώνει ισχυρά ότι η hGDH2 παίζει σημαντικό ρόλο στη νεφρική λειτουργία. Ο νεφρός ρυθμίζει τη συστηματική οξεοβασική ισορροπία με την απέκκριση ιόντων αμμωνίου (NH_4^+) στα ούρα

(Karim et al, 2005). Αυτή η νεφρική γένεση αμμωνίας λαμβάνει χώρα κυρίως στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, όπου παράγονται δύο μόρια αμμωνίας από τη γλουταμινή με τη διαδοχική δράση της γλουταμινάσης, και της GDH. Σε συνθήκες μεταβολικής οξέωσης, ο νεφρός απαντά με αύξηση της έκφρασης της GDH των νεφρών, ώστε να επιτευχθεί με την επιπρόσθετη παραγωγή μορίων αμμωνίας απομάκρυνση της περίσσειας του οξέος στα ούρα. Ωστόσο, η παρουσία της hGDH2 σε επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου θα μπορούσε να προσφέρει έναν πιο αποτελεσματικό και ταχύ μηχανισμό διόρθωσης της συστηματικής μεταβολικής οξέωσης. Συγκεκριμένα, η μείωση του pH στα πλαίσια της μεταβολικής οξέωσης είναι πιθανόν να οδηγεί σε αύξηση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2, αφού αυτό το ένζυμο έχει βέλτιστο pH χαμηλότερο από το αντίστοιχο της hGDH1 (Zaganas et al, 2002). Ως εκ τούτου, η παρουσία του hGDH2 στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του ανθρώπινου νεφρού, μπορεί να παρέχει ένα βιολογικό πλεονέκτημα, διευκολύνοντας το μεταβολισμό του γλουταμικού υπό συνθήκες μεταβολικής οξέωσης, συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας από το νεφρό. Η σημασία της GDH στη παραγωγή ενδογενούς αμμωνίας από τον νεφρό υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι στο σύνδρομο υπερινσουλιτισμού/ υπεραμμωνιαϊμίας το οποίο οφείλεται σε αυξημένη λειτουργία της γλουταμικής αφυδρόγονάσης τύπου 1 λόγω αδυναμίας αναστολής της από το GTP. Η πηγή της υπεραμμωνιαϊμίας που αποτελεί βασικό κλινικό χαρακτηριστικό των ασθενών, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι είναι ο νεφρός (Treberg et al, 2010? Palladino και Stanley, 2010). Με ανάλογο τρόπο με τη μεταλλαγμένη, ανθεκτική στο GTP, μορφή της γλουταμικής αφυδρόγονάσης I που παρατηρείται στο σύνδρομο αυτο έτσι και η GTP-ανθεκτική hGDH2 είναι πιθανό να ευθύνεται για ένα σημαντικό μέρος της νεφρικής αμμωνιογένεσης.

Στο επινεφρίδιο η hGDH2 φαίνεται ότι εκφράζεται στα κύτταρα των τριών ζωνών του φλοιού (δικτυωτή, στηλιδωτή και σπειροειδής). Τα κύτταρα της εξωτερική σπειροειδούς στιβάδας εκκρίνουν αλατοκορτικοειδή ενώ τα κύτταρα της στηλιδωτής και δικτυωτής στιβάδας συνθέτουν και εκκρίνουν γλυκοκορτικοειδή και ανδρογόνα. Ο φλοιός των επινεφριδίων παρουσιάζει

συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες με ενδιαφέρον για την παρούσα μελέτη. Έχει αναφερθεί σε παλαιότερες μελέτες (Bolding and Hillar 1976, Litwinska D et al 1983) ότι τα μιτοχόνδρια του φλοιού των επινεφριδίων εμφανίζουν πολύ χαμηλή ενεργότητα γλουταμικής αφυδρογονάσης με συνέπεια να θεωρείται ότι η μετατροπή του γλουταμικού σε α -κετογλουταρικό γίνεται μέσω τρανσαμίνωσης και δεν μπορεί να λάβει χώρα σε περίπτωση που απουσιάζει ο δέκτης της αμινομάδας του γλουταμικού. (Litwinska D et al 1983) Αυτό δύναται να διαταράσσει τη φυσιολογική αναπλήρωση του α -κετογλουταρικού, ενδιάμεσου στον κύκλο του Krebs. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι το επινεφρίδιο είναι ο ιστός με την μεγαλύτερη ενδογενή έκφραση hGDH2 μετά τον όρχη. Η εντόπισή της πρωτεΐνης αυτής σε υψηλά επίπεδα στα μιτοχόνδρια του επινεφριδιακού φλοιού υποδηλώνει το βασικό ρόλο που θα πρέπει να έχει στη λειτουργία των κυττάρων αυτών. Όπως έχει προαναφερθεί η γλουταμική αφυδρογονάση τύπου 2 δεν εμφανίζει καταλυτική δραστηριότητα απουσία ενεργοποιητών (π.χ ADP . λευκίνη) σε αντίθεση με την hGDH1. Ανασκόπηση των μελετών που ανέφεραν πολύ χαμηλή δραστηριότητα γλουταμικής αφυδρογονάσης στον επινεφριδικό φλοιό αποκάλυψε ότι η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας έγινε σε TRA pH 8 απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Υπό αυτές τις συνθήκες όμως η hGDH2 είναι γνωστό ότι είναι ανενεργή. Εντός των κυττάρων όμως το ενδογενώς παραγόμενο ADP είναι ικανό να ενεργοποιήσει σημαντικά την hGDH2 η οποία με τη σειρά της μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά μέσω της οξείδωσης του γλουταμικού σε α -κετογλουταρικό, στην αναπλήρωση των ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs. Αυτό έχει εξαιρετική σημασία για τον επινεφριδιακό φλοιό και τη λειτουργία της στεροειδογένεσης. Ως γνωστόν το πρώτο (και περιοριστικό του ρυθμού της rate-limiting) βήμα της σύνθεσης των στεροειδών καταλύεται από το μιτοχονδριακό σύστημα αποκοπής της πλαγίας αλυσίδας της χοληστερόλης (mitochondrial cholesterol side chain cleavage system) που εξαρτάται από το NADPH. Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής του NADPH στα μιτοχόνδρια του επινεφριδιακού φλοιού είναι μέσω του NADP-linked malic enzyme που αφαιρεί μεγάλη ποσότητα μαλικού από τον κύκλο του Krebs. Η αναπληρωτική δράση της hGDH2 αναμένεται να συμβάλει ουσιαστικά στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του κύκλου του Krebs αναπληρώνοντας μέσω από

την οξείδωση του γλουταμικού το α-κετογλουταρικό ενδιάμεσο και κατ'έπекταση το μαλικό που αφαιρείται σταθερά από τον κύκλο στα πλαίσιο της φυσιολογικής στεροειδογένεσης διασφαλίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία του οργάνου.



ΕΠΙΜΕΤΡΟΝ

Ο διπλασιασμός (μέσω ρετρομετάθεσης) του εβρισκόμενου παντού γονιδίου οικονομίας *GLUD1* για την δημιουργία του γονιδίου *GLUD2* είναι ένα τυπικό παράδειγμα διπλασιασμού που σχετίζεται με την εξέλιξη. Στη διαδικασία αυτή, το προγονικό γονίδιο συνεχίζει να υπηρετεί το ρόλο του, π.χ. εδώ, τη διασύνδεση των αμινοξέων και το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Αυτό επιτρέπει στο νέο γονίδιο που δημιουργείται να αποκτήσει διαφορετικές ιδιότητες και διαφορετική κατανομή στους ιστούς σε σύγκριση με το αρχικό γονίδιο, έτσι ώστε να εξυπηρετηθούν διαφορετικές ανάγκες. Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια για τον χαρακτηρισμό της *hGDH2* όσον αφορά στις λειτουργικές της ιδιότητες και την κατανομή της στους

ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με τη χρήση του ειδικού για την hGDH2 αντισώματος, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Εντούτοις είναι πιθανό το συναρπαστικό αυτό ταξίδι του γονιδίου GLUD2 από τη γέννησή του με ρετρομετάθεση περίπου είκοσι εκατομμύρια χρόνια πριν, στον κοινό πρόγονο των ανθρώπων και των σύγχρονων πιθήκων μέσω τυχαίων μεταλλάξεων και φυσικής επιλογής να διασφάλισε στον άνθρωπο μια πρωτεΐνη που του παρέχει σημαντικό εξελικτικό πλεονέκτημα. Η παρούσα εργασία αποτελεί ένα λιθαράκι στη διερεύνηση αυτού του εξελικτικού πλεονεκτήματος, η ακριβής φύση του οποίου στους διάφορους ιστούς απομένει να αποκαλυφθεί πλήρως σε επόμενες μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aoki C, Milner TA, Berger SB, Sheu KF, Blass JP, Pickel VM (1987). Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J Neurosci Res* 2, 305-318
2. Bao, X., Pal, R., Hascup, K.N., Wang, Y., Wang, W.T., Xu, W., Hui, D., Agbas, A., Wang, X., Michaelis, M.L., Choi, I.Y., Belousov, A.B., Gerhardt, G.A., Michaelis, E.K., 2009. Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: in vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J. Neurosci.* 29 (44), 13929-44.
3. Burki F, Kaessmann H. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet.* 2004 Oct;36(10):1061-3.
characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase
4. Cammer W., Cooper D. Y. and Estabrook Electron-transport reactions for steroid hydroxylation by adrenal cortex mitochondria. In *Fu/~c'tir~n.s of r/u, n&cznrr/Cortex* (Edited by McKerns K. W.) Vol. 2. pp. 943-992. Appleton, New York.
5. Cammer W. and Estabrook R. W. (1967) Respiratory activity of adrenal cortex mitochondria during steroid hydroxylation. *Arch.7 Biochem. ioph,~~.s. 122, 72 I-733.*
6. Chendong Yang, Jessica Sudderth, Tuyen Dang, Robert G. Bachoo, Jeffrey G. McDonald, and Ralph J. DeBerardinis. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signalling. *Cancer Res.* 2009 October 15; 69(20): 7986-7993.
7. Colon A, Plaitakis A, Perakis A, Clarke DD. (1986). Purification and characterization of a soluble and particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem* 46:1811-1819.
8. Cooper AJ. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(4):280-6.

9. di Prisco G, Garofano F. Links Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from ox liver nuclei. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974 Jun 4;58(3):683-9
10. Erecinska M, Nelson D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem*. 1990 Apr;54(4):1335-43
11. Farinelli SE, Nicklas WJ. Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J Neurochem*. 1992 May;58(5):1905-15.
12. Hogeboom GH, Schneider WC. 1953. Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem* 204:233-238.
13. Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Borompokas, N., Spanaki, C., Plaitakis, A., 2007. Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. *J. Neurosci. Res.* 85, 3398-3406.
14. Launay AN, Michejda JW, Vignais PV. Malate transport in bovine adrenal cortex mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1974 Apr 23;347(1):60-76.
15. Lai JC, Sheu KF, Kim YT, Clarke DD, Blass JP. 1986 The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem Res* 11(5):733-44
16. Lee WK, Shin S, Cho SS, Park JS. Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biochem*. 1999 Dec;76(2):244-53.
17. Litwińska D, Szczesna-Kaczmarek A, Popinigis J. Transaminative pathway of glutamate oxidation in adrenal-cortex mitochondria. *Int J Biochem*. 1984;16(8):943-6.
18. Mastorodemos V, Kotzamani D, Zaganas I, Arianoglou A, Latsoudis H and Plaitakis A, 2009. Human *glud1* and *glud2* glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum. *Bioch & Cell Biol*, Jun;87(3):505-16
19. Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Bessa, M., Plaitakis, A., 2005. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J. Neurosci. Res.* 79, 65-73.
20. Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis VI, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas NK. 1988. Isolation and characterization of cDNA

- clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3494–3498.
21. Michaelides TM, Tzimagiorgis G, Moschonas NK and Papamatheakis J (1993) The human glutamate dehydrogenase gene family. Gene organization and structural characterization. *Genomics* 16, 150-160
 22. Mihara K, Omura T, Harano T, Brenner S, Fleischer S, Rajagopalan KV, Blobel G. Rat liver L-glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, and sulfite oxidase are each synthesized as larger precursors by cytoplasmic free polysomes. *J Biol Chem.* 1982 Apr 10;257(7):3355-8.
 23. Plaitakis A, Berl S and Yahr MD (1984). Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann Neurol* 15, 144-153
 24. Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. (1982). Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216:193–196.
 25. Plaitakis A, Latsoudis H, Kanavouras K, et al. Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. 2009; 18:336-341.
 26. Plaitakis A, Metaxari M and Shashidharan P (2000), Nerve-tissue specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function. *J Neurochem.* 75, 1862-1869
 27. Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247: 1125-35.
 28. Plaitakis A., Latsoudis, H., Kanavouras, K., Ritz, B., Bronstein, J.M., Skoula, I., Mastorodemos, V., Papapetropoulos, S., Borompokas, N., Zaganas, I., Xiromerisiou, G., Hadjigeorgiou, G.M., Spanaki, C., 2010. Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. *Eur J Hum Genet.* 18(3), 336-41.
 29. Rosso L, Marques AC, Reichert AS, Kaessmann H. Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS Genet.* 2008 Aug 8;4(8):e1000150.

30. Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. (1994). Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellular cortex. *Neuroscience* 62:1134-1146.
31. Salganicoff F, De Robertis E. 1965. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and α -aminobutyric acid cycles in rat brain. *J Neurochem* 12:287-309
32. Schmitt A, Kugler P. Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1999;92(1):293-308.
33. Shashidharan P, Michaelides TM, Robakis NK, Kretsovali A, Papamatheakis J and Plaitakis A (1994a). Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem* 269 16971-16976
34. Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate Dehydrogenase. The Enzymes (Boyer PD editor). 1975 Vol 11: 293-367. New York, Academic Press
35. Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G and Stanley CA (2002). The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery *J Mol Biol* 318, 765-777
36. Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanisms of purine regulation. *Journal of Molecular Biology* 2001; 307:707-720.
37. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21:56 -63.
38. Spanaki C, Zaganas I, Kleopa KA, Plaitakis A. Human GLUD2 Glutamate Dehydrogenase Is Expressed in Neural and Testicular Supporting Cells. *J Biol Chem* 2010; 285:16748-16756.
39. Spanaki, C., Zaganas, I., Kleopas, K., Plaitakis, A., 2010. Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in Neural and Testicular Supportive cells. *J Biol Chem*. 285(22), 16748-56.
40. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BYL, et al. Hyperinsulinism and Hyperammonemia in Infants with Regulatory Mutations of the Glutamate Dehydrogenase Gene. *N Engl J Med* 1998; 338:1352-1357.
41. Stanley, C. A., Lieu, Y. K., Hsu, B. Y. L., Burlina, A. B., Greenberg, C. R., Hopwood, N. J., Perlman, K., Rich, B. H., Zammarchi, E., Poncz,

- M., 1998. Hyperinsulinism and Hyperammonemia in Infants with Regulatory Mutations of the Glutamate Dehydrogenase Gene. *N. Engl. J. Med.* 338, 1352-1357.
42. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H. Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:3220-5.
43. Werner P, Pitt D, Raine CS. 2001. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50:169-180
44. Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of ¹⁴C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1982 Oct;39(4):954-60.
45. Zaganas I and Plaitakis A (2002). Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behaviour of the enzyme, *J Biol Chem* 277, 26422-26428
46. Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M and Plaitakis A (2002). Substitution of Ser for Arg 443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine *J Biol Chem* 277,46552-58
47. Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 2001 Dec 1;66(5):909-13.