



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

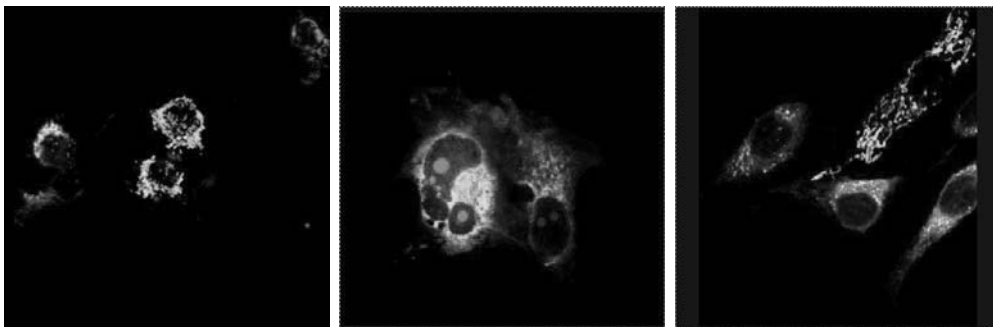
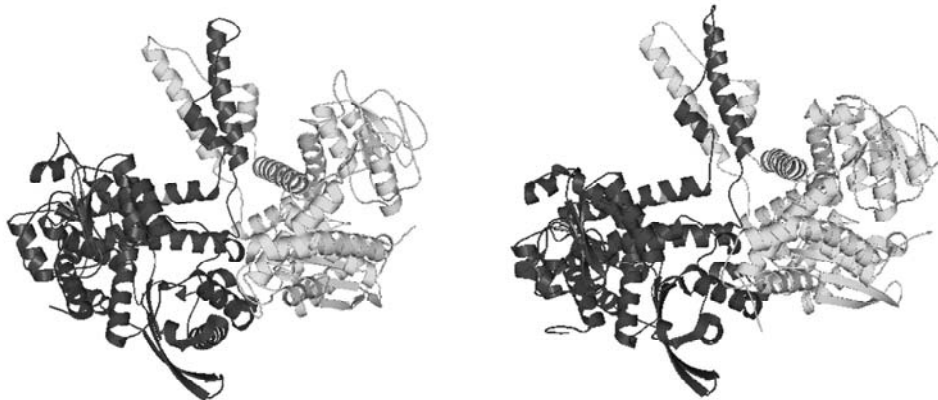


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ  
ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΧΡΗΣΤΟΥ ΜΑΣΤΟΡΟΔΗΜΟΣ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2007

## Επιβλέπων Καθηγητής: ΑΝΔΡΕΑΣ ΠΛΑΪΤΑΚΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

**ΠΛΑΪΤΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**

**Καθηγ. Νευρολογίας**

**ΘΕΡΜΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ**

**Αναπληρ. Καθηγήτρια**

**Φαρμακολογίας**

**ΚΑΡΑΓΩΓΕΩΣ ΔΟΜΝΑ**

**Αναπληρ. Καθηγήτρια**

**Νευροεπιστημών**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος «**ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα**» και χρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων της Ελλάδος (Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης Επιχειρησιακού Προγράμματος Εκπαίδευση και Αρχική Επαγγελματική Κατάρτιση, Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. II)



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



  
**Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ**  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης

*Στούς δασκάλους μου στή ζωή καί στήν γνώση*



“Δόξα είναι ή ευθύνη τής δικής μας αλλαγής”

Διονύσης Σαββόπουλος

Η συγγραφή της διδακτορικής διατριβής, επιστέγασμα δουλειάς αρκετών ετών, αποτελεί το τέλος ενός δρόμου ή την αφετηρία μιας καινούργιας πορείας? Μάλλον λίγο και από τα δύο. Από τη μια, συνάμα με τις μεταβολές στην προσωπική και επαγγελματική ζωή, χάνεται λίγο η εγγύτητα (σωματική και ψυχική) με την ζωή της προώιμης και ύστερης νεότητας. Από την άλλη είναι το τελευταίο μεγάλο σχολείο, η μαθητεία στον κριτικό λόγο και στην ορθολογική προσέγγιση ενός προβλήματος, η μελέτη των πηγών, η αναζήτηση της αλήθειας (δηλαδή της σωστής ερμηνείας), οι συνεργασίες, η ομαδική δουλειά, η φρεσκάδα της επαφής με νεότερους σου, οι στιγμιαίες χαρές για κάποια επιτυχία. Αλλά και οι πρόσκαιρες απογοητεύσεις, οι εντάσεις, οι παρεξηγήσεις, οι διαφωνίες, η πίεση (διάβαζε deadlines), τα τεχνικά προβλήματα, η περιπέτεια των σχέσεων με τους δασκάλους σου και τους συμφοιτητές σου. Το ταξίδι στα μυστικά της γλουταμικής αφυδρογονάσης και στον ρόλο της στο κεντρικό νευρικό σύστημα ήταν ταυτόχρονα και ένα ταξίδι αυτογνωσίας. Ένα ταξίδι εμπάθυνσης στις ανθρώπινες σχέσεις με απαραίτητα εφόδια την υπομονή, την επιμονή, την ψυχραιμία και το μεράκι.

Στο τέλος αυτού του ταξιδιού θα ήθελα πρώτον από όλους να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Ανδρέα Πλαϊτάκη για την ουσιαστική και πολύπλευρη βοήθειά του σε όλες τις φάσεις αυτής της διατριβής. Ο “νεανικός” ενθουσιασμός για τις καινούργιες γνώσεις και τεχνικές, η παραγωγή νέων ιδεών, η απλόχερη προσφορά της εμπειρίας και των γνώσεών του, η αφοσίωση στην αναζήτηση της επιστημονικής αλήθειας, το κριτικό πνεύμα αλλά και τα μαθήματα προσωπικού και επαγγελματικού ήθους τον καθιστούν πραγματικό δάσκαλο. Μπορεί να διαφωνείς με επιμέρους εκτιμήσεις και επιλογές αλλά σέβεσαι τις αξίες που ενσαρκώνει.

Θερμές ευχαριστίες αξίζουν στις καθηγήτριες κ. Δόμνα Καραγωγέος και κ. Κυριακή Θερού, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, οι οποίες τόσο στη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος των Νευροεπιστημών όσο και στη διάρκεια της παρούσας διατριβής ήταν πάντα αρωγοί σε κάθε πρόβλημά μου με τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Μιχάλη Κοκκινίδη για τις κριτικές του παρατηρήσεις και τη βοήθειά του ιδιαίτερω δε στη δομική μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και τον καθηγητή κ. Δημήτριο Μπούμπα για την ενθάρρυνση και τη βοήθεια στις “δύσκολες” στιγμές.

Εξχωριστή μνεία αξίζει στο Γιάννη Ζαγανά για την πολύτιμη βοήθειά του στο ξεκίνημα αυτής της διατριβής αλλά και κατά τη διάρκειά της όποτε παρουσιαζόταν πρόβλημα, καθώς όντας ο πρώτος που είχε ασχοληθεί με τα της GDH, η εμπειρία του ήταν ανεκτίμητη. Ας υπομνηστεί πως η δική του διδακτορική διατριβή αποτέλεσε, πέρα από αφετηρία δημιουργικών προβληματισμών με ευτυχή κατάληξη την παρούσα διατριβή, σίγουρο σημείο βιβλιογραφικής αναφοράς.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου (παρελθόντα και παρόντα) για τη συνεργασία, ιδιαίτερα δε τη λέκτορα Κλειώ Σπανάκη και την πάντα φιλότιμη Ρένα Σκουλά που στάθηκαν οι πρώτοι μου καθοδηγητές και σύμβουλοι στην εργαστηριακή πρακτική και μεθοδολογία. Ευχαριστίες αξίζουν στην post-doc μας τη Λένα Λατσούδη (για όποια απορία στα γενετικά ήταν η

σίγουρη λύση), στον συνοδοιπόρο από το Μεταπτυχιακό και συντοπίτη Κωστή Καναβούρα (“στηλολόγος”) και στους Ελένη Γιουρούκη, Αφροδίτη Πετσάκου, Δήμητρα Κοτζαμάνη και Νικόλα Μπορομπόκα.

Θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές και τους διδάσκοντες στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα στις Νευροεπιστήμες (ουσιαστική εμπειρία) αλλά και τους φίλους-συνεργάτες από τα άλλα εργαστήρια για την αφιλοκερδή και ουσιαστική βοήθειά τους σε πτυχές της εργασίας μου, ιδιαίτερα δε τους Κώστα Θεοδωράκη, Μιχάλη Βερυκοκάκη, Μαρίνα Βιδάκη, Νίκη Μαστροδήμου, Φοίβη Νιφλή και Γιώργο Βρέντζο.

Αποτελεί όμως πεποίθησή μου πως, με αφορμή το σημαντικό αυτό βήμα στην επιστημονική μου ζωή, χρήζουν μνημόνευσης κάποια πρόσωπα που επηρέασαν και συνετέλεσαν στο “ποιος είμαι και πού πάω”, για να μνημονεύσω τον γνωστό τραγουδοποιό. Στους γονείς μου χρωστώ και το «ζήν» και το «εὐ ζήν», γιατί αυτά που μου έμαθαν αποτελούν ανεξίτηλες παρακαταθήκες. Ελπίζω να αποτελεί η στιγμή αυτή δικαίωση των κόπων και των προσδοκιών τους. Τα αδέρφια μου Δήμητρα και Κώστας ήταν πάντα πολύτιμο στήριγμα. Δεν ξεχνώ την “κοινότητα των φίλων”, ιδιαίτερα τους Δημήτρη, Δημήτρη, Θανάση, Παύλο και Μαρία για τα όσα μάθαμε μαζί. Τέλος ένα ελάχιστο ευχαριστώ στην Ιωάννα για τα όσα προσέφερε, την υπομονή της πέντε χρόνια και βάλε και τη μετουσίωση σε πράξη του “ότι η ηθική στάση συνίσταται στο να υπάρχουν για τον Άλλο”. Και πάνω από όλα για το πιο πολύτιμο δώρο που μας χάρισε: να μας «ξανοίγει» έξι μήνες τώρα το πιο άδολο χαμόγελο του κόσμου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΣΕΛ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1-5

Ελληνική

1-3

Αγγλική (Abstract)

4-5

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

6-54

1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH)	6
2. Γονιδιακή οργάνωση της GDH στον άνθρωπο	7-9
2.1. Δομή γονιδίου <i>GLUD1</i>	7
2.2. Δομή γονιδίου <i>GLUD2</i>	8
2.3. Ψευδογονίδια στον άνθρωπο	9
3. Δομή της GDH των θηλαστικών Κρυσταλλογραφικές μελέτες	9-12
4. Έκφραση της GDH σε εγκέφαλο θηλαστικών αποκαλύπτει την ύπαρξη τουλάχιστον 2 ισομορφών	12-17
5. Υποκυτταρική εντόπιση GDH στα θηλαστικά	17-24
6. Ρόλος της GDH στον κυτταρικό μεταβολισμό και ιδιαίτερα στο μεταβολισμό του γλουταμικού στο ΚΝΣ	24-29
6.1. Ο ρόλος της GDH στον μηχανισμό έκκρισης ινσουλίνης	24-26
6.2. GDH και σύνδρομο υπερινσουλινισμού-υπεραμμωνιαϊμίας (HI/HA)	26-29
7. Λειτουργικές ιδιότητες των hGDH1 και hGDH2	29-54
7.1. Καταλυτικές ιδιότητες	30-31
7.2. Επίδραση του pH της αντίδρασης στην κατάλυση	31-32, 34
7.3. Ευαισθησία στη Θερμική αδρανοποίηση	33
7.4. Αλλοστερική ρύθμιση	35-54
i. Αναστολή από το GTP	35-36
ii. Ενεργοποίηση από το ADP	36
iii. Ενεργοποίηση από τη λευκίνη και συνεργική δράση με το ADP	37-39
iv. Επίδραση ορμονών (οιστρογόνων, διαιθυλστυλβεστροόλης, θυροξίνης), ιόντων (μαγνησίου), οργανικών οξέων (παλμιτόυλο-συνένζυμο A) και φαρμάκων (αντιψυχωσικών, γκαμπαμπεντίνης)	39-41
v. Μελέτες ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης (site directed mutagenesis) της ανασυνδυασμένης <i>GLUD1</i> προερχόμενης GDH στο <i>E. Coli</i>	41-45
vi. Μελέτες ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης (site directed mutagenesis) μεταλλαξιογένεσης της ανασυνδυασμένης wild-type hGDH1 εκφρασμένης σε Sf21 κύτταρα με το σύστημα έκφρασης του baculovirus	45-54
a. Η Arg443 καθορίζει της βασική δραστηριότητα της GDH, ρυθμίζει την ενεργοποίηση από την L-Leucine και είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία στη θερμότητα	46-49
b. Η Gly456 είναι απαραίτητη για την αναστολή από το GTP	49-50
c. Κινητικές ιδιότητες των καθαρισμένων μεταλλαγμένων ισοενζύμων και της φυσιολογικών ανθρώπινων GDH	50
d. Δομική Ανάλυση	52-54
<b>ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	<b>56-62</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>64-103</b>
a. Υλικά	64

b. Βασικές τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	65-74
c. Διαλύματα	74-81
d. Εκκινητές (primers)	82
e. Σχεδιασμός μεταλλαξιογένεσης	83-84
f. Μεταλλαξιογένεση	84-87
g. Υποκλωνοποίηση μεταλλαγμένου <i>GLUD1</i> ενθέματος σε pVL1393	87-90
h. Έκφραση σε <i>Sf21</i> κύτταρα	90-93
i. Καθαρισμός πρωτεΐνης	93-95
j. Ενζυμικές δοκιμασίες και κινητικές μελέτες	95-98
k. Δομικές μελέτες πρωτεϊνών και στατιστική ανάλυση	98-99
l. (Συν)Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών	99-102
m. Μονιμοποίηση κυττάρων-Μικροσκοπία	103
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>104-160</b>
<b>Διπλά μεταλλαγμένη (ARG443SER, GLY456ALA) hGDH1</b>	<b>104-118</b>
i. Μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα	104-107
ii. Καθαρισμός διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1	108-109
iii. Καταλυτικές, κινητικές ιδιότητες και ευαισθησία στη θερμότητα της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH	109-112
iv. Αλλοστερικές ιδιότητες της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH	113-118
<b>Μεταλλαγμένη SER409ARG hGDH1</b>	<b>119-135</b>
i. Μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα	119-121
ii. Καθαρισμός μεταλλαγμένης S409R hGDH1 Καταλυτικές, κινητικές ιδιότητες και ευαισθησία στη θερμότητα της μεταλλαγμένης SER409ARG hGDH1 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH	122-123 123-125
iii. Αλλοστερικές ιδιότητες της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH	125-132
iv. Δομική Ανάλυση	132-135
<b>Μεταλλαγμένη SER409ASP hGDH1</b>	<b>136-141</b>
Ενζυμικές μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα	136-140
Δομική Ανάλυση	140-141
<b>Υποκυτταρική εντόπιση της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης</b>	<b>142-160</b>
i. Χρήση διαδικτυακών προγραμμάτων για την δομική ανάλυση των wt hGDH1 και wt hGDH2 πρωτεϊνών με ιδιαίτερη έμφαση στην οδηγό αλληλουχία	144-148
ii. Σχεδιασμός και εκτέλεση πειραμάτων	148-149
iii. Η hGDH1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο	151,153-155
iv. Η hGDH2 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο	152, 156-159
v. Μελέτες συνεντοπισμού hGDH1 και hGDH2 σε κύτταρα νευροβλαστώματος	159-160
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>161-177</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>178-190</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>191-</b>
Πίνακες	191-196



Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	197-200
Νευρολογικές παθήσεις και GDH	201-206
<i>Ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία /ατροφία πολλαπλών συστημάτων και GDH</i>	201-202
<i>Πλαγία μυατροφική σκλήρυνση και GDH</i>	203
<i>Επιληψία και GDH</i>	204
<i>Νόσος του Parkinson και GDH</i>	205
<i>GDH και άλλες ασθένειες (Σχιζοφρένεια, νόσος Rett, άνοια)</i>	206
Μεταβολισμός γλουταμικού στο ΚΝΣ των θηλαστικών και GDH	
Σύντομο Βιογραφικό	207-214
Δημοσιεύσεις από παρούσα διατριβή	215-243



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), ένα ένζυμο με σημαίνοντα ρόλο στο μεταβολισμό του γλουταμικού, θεωρείται πως εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, μολονότι νεότερες μελέτες έδειξαν εντόπιση ισομορφής της GDH στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα λυσοσώματα, σε κυτταροπλασματικές μεμβράνες/κυστίδια ή ακόμη και στον πυρήνα. Στον άνθρωπο υπάρχει σε δύο ισομορφές. Η πρώτη (hGDH1) κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLUD1*, το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (house-keeping), περιέχει 13 εξόνια και χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10. Η δεύτερη (hGDH2) κωδικοποιείται από ένα φυλοσύνδετο μη περιέχων ιντρόνια γονίδιο (*GLUD2*), το οποίο εκφράζεται ειδικώς στο νευρικό σύστημα και στους όρχεις. Η wild type hGDH1 είναι θερμοανθεκτική και έχει σημαντική βασική δραστηριότητα (40-45% της μέγιστης) απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Αναστέλλεται όμως ισχυρά από το GTP σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις GTP ( $IC_{50} = 0,3 \mu M$ ), ανάλογες αυτών που υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες στους μη νευρικούς ιστούς, καθιστώντας το GTP ρυθμιστή της δραστηριότητας της GDH στους περιφερικούς ιστούς. Η wild type hGDH2 είναι θερμοασταθής, εμφανίζει χαμηλή βασική δραστηριότητα (5-10 % της μέγιστης) και δεν αναστέλλεται από το GTP, του οποίου τα επίπεδα στο νευρικό ιστό είναι υψηλότερα. Ενεργοποιείται πλήρως σε αυξημένες συγκεντρώσεις ADP και ως εκ τούτου λειτουργεί κυρίως όταν υπάρχει αυξημένη κατανάλωση κυτταρικής ενέργειας (υψηλά επίπεδα ADP), όπως επί έντονης διεγερτικής νευροδιαβίβασης. Επίσης η λευκίνη δρα ως αλλοστερικός ενεργοποιητής σε μεγαλύτερο ποσοστό της wild type hGDH2 απ' ό τι της wild type hGDH1, γεγονός που γίνεται εντονότερο παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP (συνέργεια ADP και λευκίνης). Οι διαφορές των δύο ισοενζύμων μελετήθηκαν με μεταλλαξιογένεση σε θέσεις στις οποίες διαφέρουν και βρέθηκε πως δύο αντικαταστάσεις αμινοξέων ευθύνονται για τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των wild type hGDH1 και wild type hGDH2. Η αντικατάσταση της Gly 456 από Ala προσδίδει την ανθεκτικότητα στο GTP. Η δεύτερη αντικατάσταση (Arg443 από Ser) ελαχιστοποιεί την βασική δραστηριότητα (~3% της μέγιστης) αλλά επιτρέπει την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου με ADP και επιπλέον αποτρέπει την ενεργοποίηση από τη λευκίνη. Παρουσία όμως μικρών συγκεντρώσεων ADP (0.025-0.1 mM) στις

οποίες μόνο του το ADP ελάχιστα ενεργοποιεί το ένζυμο (<10 % της μεγίστης δραστηριότητας), παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας έως και >2,000 %. Τέλος η Arg443 φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία στη θερμική αδρανοποίηση της wild type hGDH2. Η Arg443 βρίσκεται στην μικρή έλικα της κατερχόμενης αλυσίδας της antenna και συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με τη Ser 409 της ανερχόμενης α-έλικας της antenna γειτονικής υπομονάδας.

Με σκοπό να εμβαθύνουμε περαιτέρω στον τρόπο ρύθμισης της wild type hGDH2 δημιουργήσαμε αρχικώς 2 μεταλλαγμένες ισομορφές με αντικατάσταση της Ser409 με Arg ή Asp. Η Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνισε πολύ χαμηλή βασική ειδική δραστηριότητα (2.7 % της μεγίστης), παρουσίαζε σημαντική ανθεκτικότητα στη δράση του ADP ( $SC_{50} = 127.5 \pm 4.1 \mu\text{M}$ ) και ήταν ανθεκτική στην ενεργοποίηση από λευκίνη απουσία ADP. Μολαταύτα η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ADP (25-100 $\mu\text{M}$ ) ευαισθητοποιούσε το μεταλλαγμένο ένζυμο στη δράση της λευκίνης (συνεργική δράση ADP-λευκίνης). Υιοθετούσε δηλαδή την συμπεριφορά της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1 και προσομοιάζει στον τρόπο ενεργοποίησης της hGDH2. Μολαταύτα ήταν απρόσμενα ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση (χρόνος ημίσειας ζωής = 239.7 min) και σημαντικά πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την wild type hGDH1 (αλλά και την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1) στην αναστολή από το GTP. Η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνιζε χαμηλή βασική δραστηριότητα (3-5 % της μεγίστης) και σημαντικά μικρότερη ανθεκτικότητα στην ενεργοποίηση από λευκίνη, ενώ διαπιστώνεται συνέργεια μεταξύ ADP και L-λευκίνης μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP. Ενεργοποιούνταν από το ADP με τρόπο ομοιάζοντα περισσότερο στη wild-type hGDH1 και εμφάνιζε ανθεκτικότητα στην αναστολή από το GTP προσεγγίζοντας τη συμπεριφορά της wild-type hGDH2. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η βασική αιτία της χαμηλής βασικής δραστηριότητας της wild-type hGDH2 οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Arg443 μίας υπομονάδος με την Ser409 γειτονικής υπομονάδας μέσω δεσμών H, που αποτελεί το κριτικό γεγονός για το άνοιγμα/κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής. Επιπλέον επιβεβαιώνεται πως η λευκίνη συνδέεται εντός του ενεργού κέντρου και συνεπώς απαραίτητη συνθήκη για τη δράση της αποτελεί η διάνοιξη της καταλυτικής σχισμής, γεγονός που επιτελείται με την αλληλεπίδραση Arg443 και Ser409.

Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 που κατασκευάσαμε αναπαρήγαγε τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ hGDH1 και hGDH2. Συγκεκριμένα εμφάνισε χαμηλή βασική δραστηριότητα (0.25% της μεγίστης), ήταν

ευαίσθητη στη θερμότητα με χρόνο ημίσειας ζωής = 16.5 minutes, ήταν ~3 φορές πιο ανθεκτική στην ενεργοποίηση από το ADP σε σχέση με την wild type hGDH2 και επέδειξε παρόμοια με την wild type hGDH2 συμπεριφορά στην ανθεκτικότητα αναστολής από το GTP παρουσία ADP, ενώ απουσία αλλοστερικού ενεργοποιητή ήταν 8 φορές ανθεκτικότερη στη δράση του. Συνοπτικά υιοθετούσε συμπεριφορά ενδιάμεση της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 και της hGDH2 και παρότι η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποτελεί την καλύτερη έως σήμερα προσομοίωση της wild-type hGDH2 δεν ταυτίζεται με αυτήν.

Τέλος μελετήσαμε την υποκυτταρική εντόπιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης με παροδική συν-διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών COS 7, HeLa, CHO, HEK 293 και SH-SY5Y (κυττάρων νευροβλαστώματος) με το χιμαιρικό πλασμίδιο *pEGFP-N3-GLUD1* (ή *GLUD2*) και με 3 πλασμιδιακούς φορείς τους *pDsRed2-Mito*, *pDsRed2-Nuc* και *pDsRed2-ER* -δείκτες υποκυτταρικής εντόπισης για συγκεκριμένα κυτταρικά οργανύλλια (μιτοχόνδρια, πυρήνας και ενδοπλασματικό δίκτυο αντιστοίχως). Σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν και οι δύο ισομορφές hGDH1 και hGDH2 εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στα μιτοχόνδρια. Σε μικρότερο ποσοστό εντοπιζόταν στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανθρώπινων σωματικών και νευρικών κυττάρων, ενώ δεν υφίσταται πυρηνική μορφή GDH.



## ABSTRACT

Glutamate dehydrogenase (GDH), an enzyme central to glutamate metabolism, is located in the mitochondria. In addition, there is evidence for extra-mitochondrial localization of GDH. Human GDH exists in housekeeping (hGDH1) and nerve tissue-specific (hGDH2) isoenzymes encoded by the *GLUD1* and the *GLUD2* genes respectively, which differ markedly in their basal activity, allosteric regulation and thermal stability. hGDH2 is thermolabile, shows low basal activity that is fully restored by ADP albeit at higher concentrations than hGDH1, is more sensitive to L-leucine activation and to the synergistic effect of ADP and L-leucine and resistant to GTP inhibition. Site directed mutagenesis of *GLUD1* revealed that replacement of Gly456 by Ala made the enzyme resistant to GTP without altering its regulation by ADP. In addition substitution of Ser for Arg443 (which lies in the antenna region of GDH) virtually abolished basal activity, made the enzyme extremely sensitive to heat inactivation and totally abrogated the activation of the enzyme by L-Leucine. However the presence of low concentrations of ADP (0.025-0.1 mM) permitted the activation of the mutant by L-leucine. Structural modeling implicated that the replacement of Arg443 by Ser may disrupt the H-bond(s) between Arg443 and Ser409 (part of the ascending strand of the antenna) from an adjacent subunit and thus may result in closure of the active catalytic cleft. Substitution of the Ser409 for Arg rendered the enzyme virtually inactive at baseline and resistant to L-leucine activation. ADP fully restored the activity of mutant and made it sensitive to L-leucine activation. On the other hand, replacement of Ser409 by Asp had a lesser effect on basal activity and to L-leucine activation than Arg substitution. Hence, these data confirm that interaction of adjacent subunits through the Arg443 and Ser409 residues plays a crucial role in setting the basal activity levels. Abrogation of L-leucine activation by R443S, S409R or S409D mutants is consistent with the concept that these mutations lead to a closed conformation, which hinders access of L-leucine to the catalytic site for its action. Since the S409R hGDH1 mutant was insensitive to heat denaturation, the interaction between the two residues does not seem to be responsible for heat sensitivity. In addition both S409R and S409D hGDH1 mutants showed a differential response to GTP inhibition, with the former being more sensitive and the latter more resistant to GTP in comparison to the wt hGDH1. Moreover, we created a double hGDH1 mutant that had both Arg443Ser and

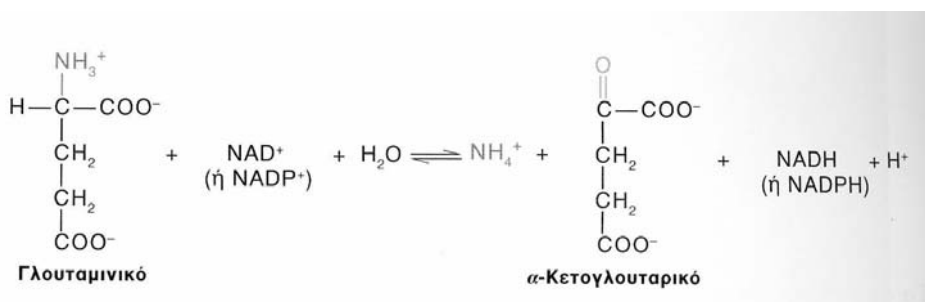
Gly456Ala in the same polypeptide chain. Functional analyses revealed that the doubly mutated enzyme had similar properties but did not acquire all the characteristics of the wild-type hGDH2. Subcellular localization studies were performed using expression vectors for hGDH1 and hGDH2 fused with the enhanced green fluorescence protein (EGFP) that transiently transfected COS 7, HeLa, CHO, HEK 293 and neuroblastoma cell lines. When the cultured cells were transfected with EGFP-tagged hGDH1 or hGDH2, confocal microscopy demonstrated localization of the fluorescence in the cytoplasmic region within coarse structures resembling mitochondria. Co-transfection experiments using a mixture of hGDH1-EGFP (or hGDH2-EGFP) vector and the pDsRed2-Mito vector (a mitochondrial marker) showed an identical fluorescence pattern in merged pictures, thus confirming the mitochondrial localization of both human GDHs. In addition, a small fraction of the hGDH1 (or hGDH2) was found to co-localize with endoplasmic reticular marker pDsRed2-ER. There was no evidence for the nuclear or cytoplasmic localization of either GDH isoforms. Our results elucidate further the properties that allow the brain isoenzyme to function well under the special conditions prevailing in the human Central Nervous System.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH)

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών (glutamate dehydrogenase, GDH; EC 1.4.1.3.) καταλύει την ανατρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού οξέος σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία, χρησιμοποιώντας NAD(H) ή NADP(H) ως συνένζυμα (Smith EL και συν., 1975) (Εικ. 1).



Η αντίδραση αυτή επιτρέπει τη αλληλομετατροπή α-αμινοξέων σε α-κετοξέα. Η σύνθεση του α-κετογλουταρικού, το οποίο συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλο του Krebs), οδηγεί στην παραγωγή ATP και GTP. Καθώς οι ανωτέρω παράγοντες είναι αλλοστερικοί αναστολείς της GDH, ενώ το ADP δρα ως αλλοστερικός ενεργοποιητής, το ένζυμο φαίνεται να λειτουργεί ως ενεργειακός “αισθητήρας”. Ενεργοποιείται δηλαδή από μόρια που υποδηλώνουν χαμηλή ενεργειακή κατάσταση στο κύτταρο (GDP και ADP) και αναστελλόμενα από μόρια που δηλώνουν περίσσεια ενεργειακών αποθεμάτων (GTP και ATP)} (Smith, 1979). Γενικώς, η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού από τις περισσότερες GDH γίνεται καλύτερα σε αλκαλικό pH (8.5-10), ενώ το βέλτιστο pH για την αντίστροφη αντίδραση (αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού) είναι συνήθως λίγο χαμηλότερο περίπου ~7.8-8.0 (Hudson και MacDaniel, 1993).

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι GDH: 1. Αυτές που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο ειδικά το NAD(H) (EC 1.4.1.2), απαντώνται συνήθως σε ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια, μύκητες άλγες, πρωτόζωα και φυτά και είναι είτε ομοεξαμερή (με MB κάθε υπομονάδας 48 kDa) είτε ομοτετραμερή (με MB κάθε υπομονάδας 115 kDa). 2. Οι συνδεδεμένες μόνο με NADP(H) (EC 1.4.1.4), τις οποίες συνήθως τις βρίσκουμε σε ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια, μύκητες άλγες, πρωτόζωα και φυτά και είναι ομοεξαμερή (με MB κάθε υπομονάδας 48 kDa). 3. Όσες μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τα δύο συνένζυμα (EC

1.4.1.3) (GDH διπλής ειδικότητας ως προς το συνένζυμο). Απαντούν συνήθως σε σπονδυλωτά και ασπόδυλα και αποτελούνται από έξι συνήθως υπομονάδες μοριακού βάρους περίπου 55-57 kDa.

## 2. Γονιδιακή οργάνωση της GDH στον άνθρωπο

Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές GDH. Η πρώτη κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLUD1*, το οποίο περιέχει 13 εξόνια και χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q23.3 (Michaelides και συν., 1993). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (γονίδιο κυτταρική οικονομίας, house-keeping). Το δεύτερο *GLUD2*, κωδικοποιείται από ένα φυλοσύνδετο μη περιέχον ιντρόνια γονίδιο, το οποίο εκφράζεται ειδικώς στο νευρικό ιστό και στους όρχεις (Shashidharan και συν., 1994). Η ανάγκη για πολλαπλές ισομορφές της GDH στο νευρικό ιστό πιθανόν να συσχετίζεται με το σύνθετο λειτουργικό ρόλο του γλουταμικού στο ΚΝΣ.

Οι αλληλουχίες των αμινοξέων στη GDH του βοός, ποντικού αρουραίου και ανθρώπου έχουν καθοριστεί (Moon και συν., 1973; Julliard and Smith, 1979; Tzimagiorgis και συν., 1991, Mavrothalassitis και συν., 1988; Nakatani και συν., 1988; Amuro και συν., 1989;) και φανερώνουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βασική δομή του ενζύμου έχει διατηρηθεί (conserved) στην εξελικτική πορεία των ειδών.

### Δομή γονιδίου *GLUD1*

Το λειτουργικό *GLUD1* γονίδιο μήκους περίπου 45kb περιέχει 13 εξόνια με το μέγεθος των ιντρονίων να ποικίλλει από 89 bp (ιντρόνιο 6) έως 18000bp (ιντρόνιο 1). Κλωνοποιήθηκε πρώτα από τους Michaelides και συν. (1993) επιβεβαιώνοντας την αλληλουχία του *GLUD* cDNA από ανθρώπινο ήπαρ, την οποία πρωτοπεριέγραψαν οι Mavrothalassitis και συν., 1988, ενώ παράλληλα αναγνωρίστηκαν τα όρια εξονίων και ιντρονίων, η θέση έναρξης μεταγραφής και τα χαρακτηριστικά της 5' αμετάφραστης περιοχής. Σχεδόν όλα τα όρια μεταξύ εξονίων-ιντρονίων έδειξαν ένα υψηλό βαθμό ομολογίας με τις αλληλουχίες ομοφωνίας των 5' και 3' θέσεων ματίσματος (Mount, 1982) με την εξαίρεση της 3' θέσης ματίσματος του ιντρονίου 1. Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε από το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος.

### Δομή γονιδίου *GLUD2*

Οι Shashidharan και συν., (1994), χαρτογράφησαν το *GLUD2* γονίδιο στο X χρωμόσωμα χρησιμοποιώντας πολλαπλασιασμό με PCR DNA προερχόμενο από υβριδικές κυτταρικές

σειρές hamster/ανθρώπου που περιείχαν τα ανθρώπινα χρωμοσώματα 10 ή X. Αποτύπωση κατά Southern των PCR προϊόντων, με χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών ικανών να διακρίνουν ανάμεσα στα *GLUD1* και *GLUD2* γονίδια, επιβεβαίωσε ότι το *GLUD2* βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα X, ενώ το *GLUD1* εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10. Επίσης αποτύπωση κατά Southern γενομικού DNA από άνδρες και γυναίκες έδειξε ότι οι γυναίκες διαθέτουν διπλάσια ποσότητα *GLUD2*. Οι Wan και Francke (1998) έδειξαν πως το *GLUD2* εντοπίζεται στο γονιδιακό τόπο Xq25 και αποτελείται από 11 εξόνια. Χαρακτηρίζεται από την πλήρη απουσία ιντρονίων, γεγονός που έθεσε την υπόνοια προέλευσης από το *GLUD1* μέσω ρετρομετάθεσης (retrotransposition) και εκφράζεται ειδικά σε νευρικό και ορχικό ιστό (Shashidharan και συν., 1994). Οι Burki και Kaessmann (2004) απέδειξαν πως πράγματι το *GLUD2* προήλθε από το *GLUD1* με ρετρομετάθεση στον πρόγονο των ανθρωποειδών λιγότερο από  $23 \times 10^6$  έτη. Οι αμινοξικές αλλαγές που είναι υπεύθυνες για τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του *GLUD2* (πρβ στο κεφ Συζήτηση) συνέβησαν μετά το γεγονός του γονιδιακού διπλασιασμού και κάτω από πίεση θετικής επιλογής. Η χρονική συσχέτιση της εξελικτικής εμφάνισης του *GLUD2* πριν από  $23 \times 10^6$  έτη με γονίδια που έχουν σχέση με το μέγεθος της κεφαλής (ASPM-Abnormal spindle-like microcephaly associated, MCPH1 –microcephalin, cyclin-dependent kinase 5 regulatory associated protein 2 - CDK5RAP2 και centromere-associated protein J – CENPJ ) (Bor Luen Tang, 2006; Evans και συν., 2004) είναι εξόχως ενδιαφέρουσα. Στην ιστορία της εξέλιξης είναι το σημείο που ο African Green Monkey (ένας Old World monkey, OWM) εξελίσσεται σε γίββωνα (Burki και Kaessmann, 2004).

### **Ψευδογονίδια στον άνθρωπο**

Οι Michaelidis και συν. (1993) αναγνώρισαν 4 υποτιθέμενα κολοβωμένα ψευδογονίδια, τουλάχιστον 2 από τα οποία μπορεί να προέκυψαν από ρετρομετάθεση (retrotransposition). Τα *GLUDP2* και *GLUDP3* χαρτογραφήθηκαν στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q11.2 και 10q22.1, αντίστοιχα και περιέχουν 3 εξόνια με σημαντική ομολογία με τα εξόνια 2–4 του *GLUD1* (Deloukas και συν., 1993). Ένα άλλο ψευδογονίδιο (*GLUDP4*) μήκους ~ 2kb, του οποίου δεν είχε χαρτογραφηθεί η θέση με μοριακές τεχνικές, εντοπίστηκε in silico (χρήση του προγράμματος BLAST) στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 18 (Ζαγανάς Ι, Διδακτορική διατριβή 2005). Παρουσιάζει υψηλή δομική ομολογία με την αλληλουχία του cDNA του *GLUD1* που εκτείνεται στα τελευταία 139 κωδικόνια και σε ολόκληρη την 3'-αμετάφραστη περιοχή. Τέλος το *GLUDP5* μήκους περίπου 1.2 kb, βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10p11.2

(Tzimagiorgis και συν., 1993) και περιλαμβάνει τα τελευταία 20 κωδικόνια και ολόκληρη σχεδόν (με ποσοστό ομολογίας 93%) την 3' αμετάφραστη περιοχή του *GLUD1* cDNA.. Με το πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος επιβεβαιώθηκε η θέση των ψευδογονιδίων αυτών. Τα χαρακτηριστικά των αλληλουχιών των (*GLUDP* 2-5) δείχνουν ότι είναι κολοβωμένα επεξεργασμένα ψευδογονίδια.

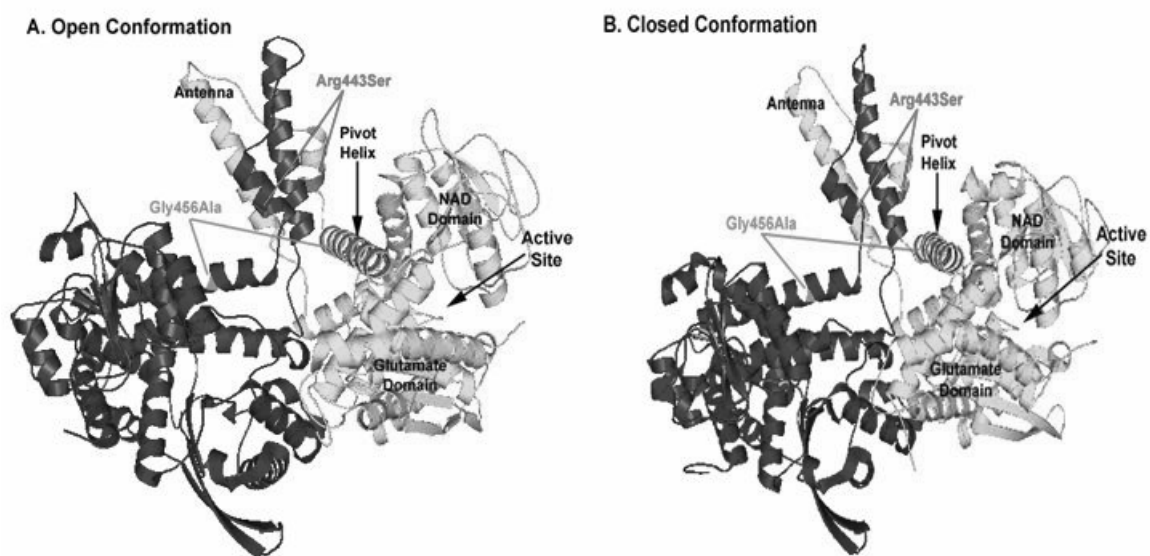
### 3. Δομή της GDH των θηλαστικών

#### Κρυσταλλογραφικές μελέτες

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών είναι ένα ομοεξαμερές της οποίας κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος ~56kDa. Πρόσφατες μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X καθόρισαν τη πιθανή δομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών (Peterson and Smith, 1999; Smith και συν., 2001, 2002; Banerjee και συν., 2003) αποκαλύπτοντας τρεις βασικές περιοχές σε κάθε υπομονάδα: την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος (γλουταμικού) στο αμινοτελικό άκρο, την περιοχή πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  και την ρυθμιστική περιοχή (Εικ. 2). Η τελευταία περιλαμβάνει την antenna (κεραία) (αμινοξέα 398-444 στη βόειο ή 402-448 στην ανθρώπινη) και την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix, αμινοξέα 445-471 στη βόειο ή 449-475 στην ανθρώπινη αρίθμηση, 1LIFpdb). Η antenna, αποτελούμενη από 48 αμινοξέα (residues), επεκτείνεται από την κορυφή της περιοχής πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  και φαίνεται να συμμετέχει στην αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου. Περιλαμβάνει μία προβάλλουσα δομή αποτελούμενη από μία ανιούσα  $\alpha$ -έλικα 21 αμινοξέων (403-422) και μια κατιούσα άλυσσο (αμινοξέα 425-448) που τελειώνει με μία μικρή  $\alpha$ -έλικα (residues 438-445). Η πρώτη βασική διαφορά μεταξύ της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών και των βακτηρίων είναι πως η antenna δεν ανευρίσκεται στις βακτηριακές μορφές της GDH. Οι κύριοι αλλοστερικοί ενεργοποιητές του ενζύμου είναι το ADP, η L-Leucine και το  $\text{NAD(P)}^+$ , ενώ οι κύριοι αλλοστερικοί αναστολείς είναι το GTP και το  $\text{NAD(P)H}$ . Οι βακτηριακές μορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης δεν εμφανίζουν αλλοστερική ρύθμιση, γεγονός που συνιστά τη δεύτερη βασική διαφορά μεταξύ της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών και αυτής των βακτηρίων.

Κάθε υπομονάδα οργανώνεται σε δυο περιοχές που διαχωρίζονται από μία βαθιά σχισμή (εμφάνιση σαν μύδι, “clam like” appearance). Η πρώτη περιοχή αποτελείται από τα αμινοξέα 4-204 και 428-453 (ανθρώπινη αρίθμηση). Η δεύτερη περιοχή (κατάλοιπα 205-427) δομικά ομοιάζει με μία κλασική περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου, εκτός από

το ότι η κατεύθυνση μίας β-αλύσου έχει αντιστραφεί (Εικ. 2). Η σύνδεση του  $\text{NAD}^+$  γίνεται στο στόμιο της σχισμής σε μία εκτεταμένη διαμόρφωση με το τμήμα (moiety) του νικοτιναμιδίου θαμμένο βαθιά μέσα στην σχισμή μεταξύ των δύο περιοχών. Το γλουταμικό συνδέεται στη βάση της βαθιάς σχισμής ανάμεσα στις δύο περιοχές του ενζύμου. Σύμφωνα με τις πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες η σύνδεση του υποστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα τη περιστροφή της περιοχής πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  κατά  $18^\circ$  γύρω από την έλικα 449-475 (pivot helix). Η κίνηση αυτή απορροφάται από γειτονικές δομές. Επίσης παρατηρείται μία αλλαγή διαμόρφωσης που έχει σαν αποτέλεσμα το κλείσιμο της σχισμής και την προσέγγιση των δύο περιοχών (Εικ. 2β).



**Εικ. 2: Οι λειτουργικές περιοχές (domains) μίας υπομονάδας της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών.** Επιπλέον απεικονίζονται οι δύο θέσεις Gly456 και Arg443, των οποίων η αλλαγή σε Ala και Ser με μεταλλαξιγένεση θέσης και η δημιουργία μιας διπλά μεταλλαγμένης ισομορφής αποτέλεσε θέμα μελέτης της παρούσας διατριβής. (Αναδημοσίευση από Mastorodemos και συν., 2005).

Το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου (active site cleft) έχει προταθεί πως προσφέρει εκείνο το υδρόφοβο περιβάλλον που επιτρέπει τη μεταφορά υδριδίου (hydride transfer). Με βάση τις κρυσταλλογραφικές μελέτες στο ατελέσφορο (abortive) σύμπλοκο boGDH-Glutamate-NADH η γ-καρβοξυομάδα του γλουταμικού αλληλεπιδρά με τη Lys94 (Lys90 βόειος αριθμηση) ενώ η α-καρβοξυομάδα με τη Lys118 (Lys114 βόειος αριθμηση). Η περιοχή πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  κλείνει πάνω στα προσδέματα φέρνοντας σε γειτνίαση το δακτύλιο του νικοτιναμιδίου με τη Lys130 (Lys126 βόειος αριθμηση) και το

συνδεδεμένο γλουταμικό. Η απόσταση ανάμεσα στον Ca του γλουταμικού και τον C4 του δακτυλίου νικοτιναμιδίου είναι 4.2 Å. Αυτή η σχετικά μικρή απόσταση είναι συμβατή με την πρόταση ότι το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου αποβάλλει μόρια νερού, διευκολύνοντας έτσι την υδριδική μεταφορά. Στο μοντέλο αυτό η αμινομάδα του γλουταμικού αλληλεπιδρά απευθείας με τη Gly92 (Gly92 βόειος αριθμηση) και τη Lys130 (Lys126 βόειος αριθμηση), η οποία επιπλέον θεωρείται ως ο δότης του H<sup>+</sup>.

Τα κύρια συμπεράσματα από τη μελέτη των διάφορων συμπλόκων της boGDH (boGDH•NADH•GLU•GTP, boGDH•NADPH•GLU•GTP και boGDH•NAD<sup>+</sup>•α-KG) είναι ότι υπάρχει μόνο μία ανασταλτική θέση πρόσδεσης GTP και ότι το NADH, το NAD<sup>+</sup> και το ADP συνδέονται όλα στην ίδια θέση κάτω από την περιστρεφόμενη (pivot) έλικα (Smith και συν., 2001). Στα ανωτέρω μοντέλα η αλλοστερική ρύθμιση διαμεσολαβείται από την κίνηση της περιοχής πρόσδεσης του NAD<sup>+</sup>. Τα GTP και ADP έχουν ανταγωνιστική συμπεριφορά και φαίνεται να επιδρούν μέσω ατελέσφορων συμπλόκων.

Η θέση πρόσδεσης του GTP εντοπίζεται μεταξύ της “αντένας” και της περιοχής πρόσδεσης του NAD<sup>+</sup>. Τα άτομα οξυγόνου του γ-φωσφορικού του GTP συνδέονται με ιοντικούς δεσμούς (salt bridges) με τρία κατάλοιπα Αργινίνης τις Arg265, Arg221, Arg269 (Arg261, Arg217, Arg265 βόειος αριθμηση). Η His213 (His209 βόειος αριθμηση) βρίσκεται σε εγγύτητα με το άτομο οξυγόνου του β-φωσφορικού, ενώ η His454 (His450 βόειος αριθμηση) ελάχιστα εκτός του εύρους του γ-φωσφορικού. Με τον πουρινικό δακτύλιο του GTP σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου τα κατάλοιπα Glu296, Lys293 και Arg265 (Glu292, Lys289 και Arg261, βόειος αριθμηση). Η θέση του GTP στην βάση της αντένας με την πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων του με το ένζυμο να είναι με τα άτομα οξυγόνου του γ-φωσφορικού, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε την περιοχή αυτή έναν «αισθητήρα ενέργειας» που προσδένει κατά προτίμηση τριφωσφορικά νουκλεοτίδια και απενεργοποιεί το ένζυμο σε συνθήκες υψηλής ενεργειακής κατάστασης. Το GTP συνδέεται αποκλειστικά στην “κλειστή” διαμόρφωση του ενζύμου και φαίνεται να ενεργεί μέσω σταθεροποίησης των ατελέσφορων συμπλόκων, άρα αναστολής ανοίγματος της καταλυτικής σχισμής.

Η θέση πρόσδεσης του ADP εντοπίζεται κάτω από την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix) και πίσω από την περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού (Banerjee και συν., 2003). Το ADP συνδέεται κατά προτίμηση στην “ανοικτή” διαμόρφωση του ενζύμου και

φαίνεται να ενεργεί μέσω αποσταθεροποίησης των ατελέσφορων συμπλόκων και αναίρεσης της αρνητικής συνεργατικότητας. Κατά συνέπεια ελαττώνει την ενέργεια που απαιτείται για να ανοίξει η καταλυτική σχισμή. Η αλληλεπίδραση του συνδεδεμένου ADP με το κατάλοιπο Arg463 (Arg459 βόειος αριθμηση), το οποίο εντοπίζεται στην περιστρεφόμενη έλικα, διευκολύνει το περαιτέρω άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου. Αυτό επιτυγχάνεται με την περιστροφή κατά ωρολογιακή φορά (clockwise) της περιστρεφόμενης έλικας ώστε να συμπλησιάσουν το συνδεδεμένο ADP με την Arg463 (Arg459 βόειος αριθμηση) και να δημιουργηθούν ιοντικοί δεσμοί με τη β-φωσφορική ομάδα του ADP.

Από μελέτες σε H/M η boGDH σχηματίζει πολυμερή (Frieden και συν., 1959) μέσω σύνδεσης των τελικών τμημάτων των εξαμερών. Σε απουσία συνδεμάτων (apofoms) η σχισμή του ενεργού κέντρου είναι στην “ανοικτή” διαμόρφωση και οι αλληλεπιδράσεις των εξαμερών είναι περισσότερο εκτεταμένες από τους κρυστάλλους της “κλειστής” διαμόρφωσης. Αυτό εξηγεί πως παρουσία ADP, καθώς ανοίγει περαιτέρω η σχισμή του ενεργού κέντρου, διευκολύνονται οι αλληλεπιδράσεις της antenna του ενός εξαμερούς με την antenna και την περιοχή πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  του γειτονικού εξαμερούς. Αντιθέτως η προσθήκη GTP, καθώς σταθεροποιείται το κλειστό ενεργό κέντρο, η περιοχή πρόσδεσης του NAD δεν προσφέρεται για αλληλεπιδράσεις άρα ελαττώνεται η τάση του ενζύμου για πολυμερισμό (Banerjee S και συν., 2003).

#### **4. Έκφραση της GDH σε εγκέφαλο θηλαστικών αποκαλύπτει την ύπαρξη τουλάχιστον 2 ισομορφών**

Το ένζυμο εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών με υψηλότερα όμως τα επίπεδά του στο ήπαρ. Άλλα όργανα ή ιστοί με υψηλά επίπεδα GDH είναι ο εγκέφαλος, οι νεφροί το πάγκρεας, το λεπτό και παχύ έντερο, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες και η καρδιά (Smith et al., 1975). Οι **Chee και συν., (1979)** έδειξαν πολύ υψηλά επίπεδα της δραστηριότητας της GDH στον εγκέφαλο αρουραίου με διακύμανση από 20  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  υγρού βάρους ιστού/h (με γλουταμικό στην αντίδραση) μέχρι 900  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  υγρού βάρους ιστού/h (με NADH και α-κετογλουταρικό στην αντίδραση). Όμως η εγκεφαλική GDH διέφερε σημαντικά από το ηπατικό ένζυμο ως προς τις κινητικές ιδιότητες (Παράρτημα, Πίνακας. 1), τη σταθερότητα και την αναστολή από αλοπεριδόλη. Πρώτοι οι **Colon και συν. (1986)** απομόνωσαν 2 ισομορφές GDH μετά από υπερφυγοκέντρωση (100,000 g x 60min) ολικού ομογενοποιημένου από τον εγκέφαλο

αρουραίου. Η μία ελήφθη στο ίζημα (high speed pellet, HSP), ήταν συνδεδεμένη με μεμβράνες (particulate) και αποτελούσε το 60 % της συνολικής δραστηριότητας της GDH που βρέθηκε στα κλάσματα μετά την υπερφυγοκέντρωση. Η άλλη ελήφθη στο υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης (high speed supernatant, HSS) ήταν εύκολα διαλυτοποιούμενη (soluble) και θεωρήθηκε πως προέρχεται από το μιτοχονδριακό στρώμα. Οι δύο ισομορφές επέδειξαν ίδια συμπεριφορά στην διαδικασία του καθαρισμού, η οποία περιελάμβανε συνδυασμό χρωματογραφίας υδρόφοβης αλληλεπίδρασης, ανταλλαγής ιόντων και στήλης υδροξυαπατίτη και στην ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με SDS είχαν το ίδιο MB. Η μελέτη της κινητικής τους συμπεριφοράς έδειξε πως δεν διέφεραν στη συγγένεια για ακετογλουταμικό, αμμωνία και γλουταμικό, επιδεικνύοντας παρόμοιες  $K_m$ . Παρουσίαζαν όμως μικρές αλλά στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην  $K_m$  για το NADH και NADPH με τη σωματιδιακή να επιδεικνύει μικρότερη συγγένεια (μεγαλύτερη  $K_m$ ) (Πιν. 1). Δεν διέφεραν στην αλλοστερική ρύθμιση από ADP και L-λευκίνη (ενεργοποίηση) και διεθυστιλβεστρόλη (DES) (αναστολή). Η σωματιδιακή (particulate) ήταν ανθεκτική στην απομόνωση με τη χρήση κοινών απορρυπαντικών όπως Triton X-100, digitonin ή δεοξυχολικό. Η εξαγωγή από τις μεμβράνες κατέστη δυνατή μόνο με τη χρήση του κατιονικού απορρυπαντικού CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide), ενώ μικρό ποσοστό (~ 26-27 %) μπορούσε να εξαχθεί σε διάλυμα μεγάλης συγκέντρωσης σε άλας (0.5M NaCl ή KCl). Επιπλέον ήταν ανθεκτική στην θερμική αδρανοποίηση, πιο ευαίσθητη στην αναστολή από το GTP και δεν επεδείκνυε συνεργατική συμπεριφορά (συντελεστής του Hill, Hill coefficient: 1.6) σε σχέση με την εύκολα διαλυτοποιούμενη (soluble) ισομορφή. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο οι **Mavrothalassitis και συν. (1988)** ανίχνευσαν με αποτύπωση Northern δύο *GLUD* μεταγραφήματα, ένα μεγέθους 3.5kb και ένα μεγέθους 2.9kb (Mavrothalassitis και συν., 1988), ενώ και οι **Tzimagiorgis και Moschonas (1991)** ανίχνευσαν παρόμοια μεταγραφήματα στον εγκέφαλο πιθήκου, κουνελιού και ποντικού. Οι **Hussain και συν. (1989)** απομόνωσαν γλουταμική αφυδρογονάση από ανθρώπινο εγκέφαλο (παρεγκεφαλίδα) και χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (με ισοηλεκτρικό εστιασμό και SDS-PAGE) έδειξαν ότι αυτή αποτελείται από τέσσερις ισομορφές, τις οποίες ονόμασαν GDH 1, 2, 3 και 4. Οι τέσσερις αυτές ισοπρωτείνες διαφέρουν ως προς την συγκέντρωσή τους στον εγκέφαλο, το ισοηλεκτρικό τους σημείο και το μοριακό τους βάρος, ενώ δεν είναι αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Η ερευνητική δουλειά των Mavrothalassitis και συν. (1988) και Michaelidis και συν. (1993) έδειξε ότι



υπάρχει μια οικογένεια GDH πρωτεϊνών που μάλλον κωδικοποιείται από περισσότερα του ενός γονίδια. Βασισμένοι στην πρόοδο των γενετικών μεθόδων και στα ανωτέρω αποτελέσματα οι **Shashidharan και συν. (1994)** ανίχνευσαν σε βιβλιοθήκη φάγων από ανθρώπινο αμφιβληστροειδή και όρχεις ένα καινούργιο c-DNA που κωδικοποιούνταν από ένα φυλοσύνδετο (X-linked), χωρίς ιντρόνια γονίδιο, το οποίο ονόμασαν *GLUD2*. Με την απομόνωση ολικού RNA από διάφορους ιστούς, τη σύνθεση cDNA (τη χρήση ανάστροφης τρανσκριπτάσης), τον πολλαπλασιασμό με PCR ενός τμήματος του cDNA και το κόψιμο με SalI (καθώς περιοριστική θέση για το SalI ένζυμο υπάρχει μόνο στο *GLUD2 cDNA*) διαπίστωσαν πως η πρωτεΐνη hGDH2 (η προερχόμενη από το *GLUD2 cDNA*) εκφραζόταν αποκλειστικά στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, στους όρχεις και σε μικρότερο βαθμό στον εγκέφαλο. Επιπλέον η πρωτεΐνη hGDH2 ήταν καταλυτικά ενεργή και εμφάνιζε διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ιδιότητες από την hGDH1. Οι **Cho και συν. (1995)** απομόνωσαν από βόειο εγκέφαλο δύο διαλυτές μορφές γλουταμικής αφυδρογονάσης, τις οποίες ονόμασαν GDH I και GDH II με μία διαδικασία καθαρισμού που περιελάμβανε το συνδυασμό χρωματογραφίας υδρόφοβης αλληλεπίδρασης και κολώνας υδροξυαπατίτη. Οι δύο ισοπρωτεΐνες ήταν εξαμερή με ίδιο μοριακό βάρος (~330 kDa) όπως διαπιστώθηκε από την ηλεκτροφόρηση SDS/PAGE και την διήθηση σε γέλη (gel filtration). Όμως διέφεραν ως προς τη θερμοσταθερότητα με την GDH II να είναι πιο θερμοανθεκτική. Επίσης εμφάνισαν ποικίλλουσες κινητικές ιδιότητες και ευαισθησία στο ADP τόσο στην κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης όσο και της αναγωγικής αμίνωσης τόσο σε διαφορετικές συνθήκες ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος όσο και με χρήση διαφορετικών συνενζύμων (NAD(H) ή NADP(H) (Πιν. 1). Ο αμινοτελικός προσδιορισμός της αλληλουχίας των ισοπρωτεϊνών αυτών αλλά και των πεπτιδίων που προκύπτουν από την τρυπτική πρωτεόλυσή τους, έδειξαν ότι οι δύο αυτές ισοπρωτεΐνες είναι διαφορετικά πολυπεπτίδια (Cho και συν., 1995). Περαιτέρω μελέτες από τους ίδιους ερευνητές ανέδειξαν τις περιοχές πρόσδεσης ADP, NAD<sup>+</sup> και GTP στο μόριό τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας σήμανση φωτοσυγγένειας με το [<sup>32</sup>P]8N3GTP (8-azidoguanosine triphosphate) ανέδειξαν ως πιθανή περιοχή πρόσδεσης του GTP και για τις δύο ισομορφές την περικλειόμενη μεταξύ των αμινοξέων Ile440 – Arg459 (Cho και συν., 1996). Αντίστοιχα χρησιμοποιώντας το φωτοδραστικό ανάλογο [<sup>32</sup>P]nicotinamide 2-azidoadenosine dinucleotide (2N3NAD<sup>+</sup>) έδειξαν πως η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων Cys270 έως Lys289 αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του NAD<sup>+</sup> και για τις δύο ισομορφές, με πλέον πιθανή θέση φωτοτροποποίησης το Glu275 (Cho και συν., 1998). Μελέτες σήμανσης φωτοσυγγένειας με [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]8-azidoadenosine 5'-

diphosphate (8N3ADP) αποκάλυψαν πως η περιοχή πρόσδεσης του ADP και για τις δύο ισομορφές περιελάμβανε τα αμινοξέα Glu179-Asn197 (Cho και Yoon, 1999). Η τροποποίηση καταλοίπων ιστιδίνης (His) με diethyl pyrocarbonate (DEPC) απέτρεπε την αναστολή από το GTP. Μάλιστα με φασματοφωτομετρικές μελέτες έδειξαν πως ένα μόνο κατάλοιπο ιστιδίνης εμπλέκεται στην αναστολή από το GTP, αφού τα τρία κατάλοιπα His αλληλεπιδρούσαν με το DEPC απουσία GTP, ενώ μόνο 2 παρουσία του GTP (Lee και συν., 2001). Μελετώντας το ρόλο στην καταλυτική αντίδραση των διαφόρων λυσινών στην περιοχή του ενεργού κέντρου αρχικώς οι Cho και Lee (1996) βρήκαν πως η φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal 5'-phosphate) ανέστελλε και τις δύο ισομορφές σχηματίζοντας βάση Schiff με την Lys126 (Kim και συν., 1997). Αργότερα οι Ahn και συν., (1999) έδειξαν πως η o-phthalaldehyde αναστέλλει πλήρως τα 2 ισοένζυμα αλληλεπιδρώντας με την Lys-306. Επιπλέον τα δύο ισοένζυμα εμφάνιζαν διαφορετικά αντιγονικά χαρακτηριστικά καθώς από τα 7 μονοκλωνικά αντισώματα που κατασκευάστηκαν και αναγνώριζαν τη GDH II, μόνο 4 αντιδρούσαν με τη GDH I (Choi και συν., 1999). Το αντιεπιληπτικό γκαμπαπεντίνη δρούσε ως αλλοστερικός ενεργοποιητής με τη GDH II να είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη στη δράση του, ενώ περαιτέρω μετρίαζε την ανασταλτική δράση του GTP (Cho και συν., 1998). Επίσης ενώ απουσία ή σε χαμηλή συγκέντρωση (0.05-0.20 mM) ADP οι GDH I και GDH II δεν εμφάνιζαν διαφορές στην αναστολή από περφαιναζίνη, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.5-1.0 mM) η GDH I ήταν πιο ευαίσθητη από τη GDH II (Yoon και συν., 2001). Πρόσφατα, οι **Burbaeva και συν., (2002)** απομόνωσαν από ανθρώπινο εγκέφαλο τρεις ισομορφές GDH. Οι δύο (GDH I & II) ήταν εύκολα διαλυτοποιούμενες ενώ η τρίτη, η GDH III ήταν συνδεδεμένη με μεμβράνες. Οι 3 ισομορφές διέφεραν ως προς την υδροφοβικότητά τους, όπως δείχθηκε από τα διαφορετικά σημεία έκλουσης από τη στήλη υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (Phenyl-Sepharose) αλλά και ως προς το μοριακό βάρος με τις GDH II και GDH III να έχουν το ίδιο (56 kDa ανά υπομονάδα), ενώ η GDH I ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη (58 kDa ανά υπομονάδα). Όσον αφορά τη θερμοσταθερότητα η GDH III ήταν η πιο ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση, ενώ οι τρεις ισομορφές δεν διέφεραν στην ενεργοποίηση από το ADP.

Σε ότι αφορά την κυτταρική εντόπιση της GDH παλαιότερες βιοχημικές μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες ή κυτταροπλασματικά τμήματα εμπλουτισμένα σε αστροκύτταρα, κοκκιώδη κύτταρα και κύτταρα Purkinje από 8-ημερών παρεγκεφαλίδα αρουραίου έδειξαν πως η GDH εντοπιζόταν στους νευρώνες αν και σε ποσότητα 2 έως 5 φορές λιγότερη απ' ότι σε αστροκύτταρα (**Patel και συν., 1982**). Οι **Aoki και συν.,**

(1987) σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (HM) στον εγκέφαλο αρουραίου έδειξαν πως η GDH εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα σε περιοχές πυκνής γλουταματεργικής εννεύρωσης, αν και έντονη ανοσοδραστικότητα για GDH παρατηρήθηκε και σε περιοχές που δέχονται ασθενείς γλουταματεργικές προσεκβολές. Μικρής έντασης διάχυτη ανοσοδραστικότητα παρατηρήθηκε και σε νευρώνες, όταν στην κατεργασία του ιστού δεν χρησιμοποιήθηκε Triton X-100, σε αντίθεση με τη σήμανση των γλοιακών κυττάρων όπου η χρήση του απορρυπαντικού είχε άμεση σχέση με την ένταση του σήματος. Οι **Wenthold και συν., (1987)** χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε παρεγκεφαλίδα αρουραίου επιβεβαίωσαν πως τα γλοιακά κύτταρα και ιδιαίτερα τα κύτταρα της γλοίας του Bergmann και τα αστροκύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας ήταν τα πιο ανοσοδραστικά για τη GDH. Οι νευρώνες (κύτταρα Purkinje και κοκκώδη κύτταρα) εμφάνισαν αχνή ανοσοδραστικότητα, ενώ δεν παρατηρήθηκε σήμανση σε καλαθοφόρα, αστεροειδή και κύτταρα Golgi όπως και σε προσυναπτικές απολήξεις. Παρομοίως οι **Rothe και συν., (1990, 1994)** με ανοσοϊστοχημεία (υπεροξειδάση-αντιυπεροξειδάση) και χρήση σωματιδίων χρυσού παρατήρησαν πως σε παρεγκεφαλιδικό φλοιό αρουραίου η GDH εντοπιζόταν κατά μείζονα λόγο στα αστροκύτταρα, δευτερευόντως στα ολιγοδενδροκύτταρα (συμπεριλαμβανομένης της γλοίας του Bergmann), ενώ η σήμανση σε νευρώνες αντιστοιχούσε στο 15% της αντίστοιχης στην αστρογλοία. Η ποσοτικοποίηση με HM δεν ανέχνευσε διαφορά ανάμεσα σε γλουταματεργικούς (βρυώδεις και παράλληλες ίνες, κοκκώδη κύτταρα) και μη-γλουταματεργικούς νευρώνες (κύτταρα Purkinje). Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν οι **Scmitt και Kugler (1999)** χρησιμοποιώντας τόσο μη ραδιενεργό *in situ* υβριδοποίηση με cRNA και ολιγονουκλεοτίδια ως ιχνηθέτες όσο και ανοσοϊστοχημικές μελέτες με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι καθαρισμένης ηπατικής GDH σε εγκέφαλο αρουραίου. Διαπίστωσαν πως το GDH mRNA εκφραζόταν στο ΚΝΣ του αρουραίου σε νευρώνες, σε γλοϊκά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα Bergmann glia) και σε επενδυματικά ή επιθηλιακά κύτταρα των χοριοειδών πλεγμάτων αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Μάλιστα ορισμένοι νευρωνικοί πληθυσμοί (πυραμιδικοί νευρώνες του ιπποκάμπου, μονονευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων) εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης GDH mRNA. Σε πρωτεϊνικό όμως επίπεδο μόνο τα αστροκύτταρα και τα κύτταρα της γλοίας του Bergmann εμφάνισαν ισχυρή ανοσοδραστικότητα σε αντίθεση με τους νευρώνες που παρουσίαζαν μόνο ασθενή σήμανση. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως σε Northern blot ανάλυση του mRNA ολόκληρου του εγκεφάλου αλλά και συγκεκριμένων τμημάτων του

(ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός) ανευρέθηκαν 2 μπάντες μία μεγέθους 3.4kb και μία μεγέθους 2.8kb (πρβ με αντίστοιχα αποτελέσματα των Mavrothalassitis και συν., 1988; Banner και συν., 1988). Επιβεβαίωση ότι η GDH εντοπίζεται σε σημαντικό βαθμό και στα ολιγοδενδροκύτταρα έδωσε πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη στην λευκή ουσία του εγκεφάλου του ανθρώπου (**Werner και συν., 2001**). Από την άλλη μεριά σε πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες από κοιλιακό μεσεγκέφαλο αρουραίου παρατηρήθηκε υψηλή ενζυμική δραστηριότητα για τη GDH, καθώς μπορούσαν να μεταβολίσουν τα υψηλά επίπεδα γλουταμικού που είχαν προστεθεί στο θρεπτικό υλικό ((1–1.2 mM) και τα οποία ήταν εφάμιλλα των συγκεντρώσεων γλουταμικού στις γλουταματεργικές συνάψεις. Επιπλέον σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες στις ίδιες καλλιέργειες παρατηρήθηκε πυκνή ανοσοαντιδραστικότητα για GDH σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (οι οποίοι ήταν θετικοί για υδροξυλάση της τυροσίνης) (**Plaitakis και Shashidharan, 2000**). Επίσης σε καλλιέργειες νευρώνων και αστροκυττάρων από εγκέφαλο (φλοιό και παρεγκεφαλίδα) ποντικού μεγαλύτερη δραστηριότητα GDH παρατηρήθηκε στα αστροκύτταρα (2-4 φορές μεγαλύτερη). Αλλά αξιοπρόσεκτα οι παρεγκεφαλιδικοί (γλουταματεργικοί από κοκκιώδη κύτταρα) νευρώνες εμφάνιζαν 60% μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα απ' ότι οι φλοιϊκοί (GABA-εργικοί) νευρώνες και περίπου το 50% της δραστηριότητας των αστροκυττάρων (**Zaganas και συν., 2001**).

Συμπερασματικά στο σύνολό τους μελέτες με διαφορετική μεθοδολογία (ανοσοϊστοχημεία, *in situ* υβριδοποίηση, απομόνωση από εγκέφαλο ή κυτταρικές καλλιέργειες και ενζυμική ανίχνευση GDH δραστηριότητας) επιβεβαιώνουν την παρουσία μίας ή περισσότερων ισομορφών (ή ισοενζύμων) γλουταμικής αφυδρογονάσης στο ΚΝΣ των θηλαστικών. Παρατηρείται διαφοροποίηση όσον αφορά την κυτταρική κατανομή (με τις περισσότερες να συμφωνούν πως μεγαλύτερο ποσοστό GDH εντοπίζεται στα γλοιακά κύτταρα) και το λειτουργικό ρόλο της.

## **5. Υποκυτταρική εντόπιση GDH στα θηλαστικά**

Οι παλαιότερες μελέτες σε ομογενοποίηση από ήπαρ ποντικού με τη χρήση διαλύματος σουκρόζης 0.25M και διαφορετικές φυγοκεντρήσεις έδειξαν πως η γλουταμική αφυδρογονάση εντοπιζόταν σχεδόν αποκλειστικά στο μιτοχονδριακό κλάσμα (**Hogeboom GH, Schneider WC.,1953**). Οι **Salganicoff και DeRobertis (1965)** χρησιμοποιώντας τεχνικές κυτταρικής κλασματοποίησης σε βαθμίδωση διαλυμάτων

σουκρόζης και διαφορετικών φυγοκεντρήσεων σε εγκέφαλο αρουραίου διαπίστωσαν πως η GDH εντοπίζεται στη θεμέλια ουσία (matrix) των μιτοχονδρίων και διαλυτοποιείται κατά 64% με τη χρήση Triton X-100. Αντιθέτως πλέον πρόσφατες μελέτες (**Colon A και συν., 1986**) έδειξαν πως στον εγκέφαλο του αρουραίου υπάρχουν δύο μορφές, μία διαλυτή (soluble) και μία συνδεδεμένη με μεμβράνες (particulate-bound), οι οποίες διαφέρουν στην ανθεκτικότητα έναντι της θερμότητας και στις αλλοστερικές ιδιότητες και έθεσαν το θέμα της διαφορετικής λειτουργικότητας (πιθανόν και υποκυτταρικής εντόπισης) των 2 ισοενζύμων. Πρώτοι οι **Knecht και συν. (1986)**, χρησιμοποιώντας μονο- (και πολυ-) κλωνικά αντισώματα έναντι της GDH και σωματίδια χρυσού, εντόπισαν στο ΗΜ την GDH στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στο ήπαρ αρουραίου. Οι **Aoki και συν., (1987b)** χρησιμοποιώντας ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού εντόπισαν στο ΗΜ την GDH κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά σε μιτοχόνδρια αστροκυττάρων κατά κύριο λόγο και δευτερευόντως νευρώνων. Ενδεικτικά ως οργανύλλια που εμφάνιζαν τη σήμανση έναντι της GDH αναφέρονται κυστίδια δίπλα στα μιτοχόνδρια, θυλάκια παρά την (πλασματο)κυτταρική μεμβράνη και προσεκβολές οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν αν ανήκουν σε νευρώνες ή κύτταρα γλοίας. Όπως αναμένονταν, παρατήρησαν εντόπιση της GDH σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε περιοχές (π.χ. πρόσθιος εγκέφαλος, ιππόκαμποι) με ταυτοχρόνως υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος, ενζύμου-δείκτη για αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Μάλλον απρόσμενα διαπιστώθηκε πως περιοχές με υψηλή δραστηριότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης (π.χ. βασικά γάγγλια, παρεγκεφαλιδικός φλοιός, πυρήνες του στελέχους) εμφάνισαν ασθενή ανοσοσήμανση για GDH, γεγονός που υποδηλώνει πως η GDH εντοπίζεται σε περιοχές με χρονίως ενεργή γλουταματεργική διαβίβαση, χωρίς αυτό να φαίνεται να σχετίζεται με τις αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια των περιοχών αυτών. Οι **Mandl και συν., (1988)** παράγαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι GDH και με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές στο ΗΜ παρατήρησαν έντονη σήμανση (άρα και εντοπισμό της GDH) στα μιτοχόνδρια αστροκυττάρων, ολιγοδενδροκυττάρων και στα κύτταρα της γλοίας Bergmann της παρεγκεφαλίδας του αρουραίου. Οι **Rothe και συν. (1994)** τόσο στο οπτικό όσο και στο ΗΜ χρησιμοποιώντας αφενός ανοσοϊστοχημεία (υπεροξειδάση-αντιυπεροξειδάση) και αφετέρου ανοσοσήμανση με αντισώματα έναντι του χρυσού, δεν βρήκαν ενδείξεις ύπαρξης μη μιτοχονδριακής GDH (συγκεκριμένα ανίχνευση σε μεμβράνες, κυτταροπλασματική μεμβράνη ή άλλα οργανύλλια). Με βάση την ανοσοσήμανση από τα σωματίδια χρυσού υπολόγισαν ότι η GDH αποτελεί περίπου το 10% της ολικής

πρωτεΐνης στο στρώμα (matrix) των αστροκυτταρικών μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια στα κυτταρικά σώματα της γλοίας του Bergmann εμφάνιζαν χαμηλότερη πυκνότητα σωματιδίων (χρυσού) από τις αστροκυτταρικές αποφύσεις. Στις τελευταίες η ανάλυση της ανοσοδραστικότητας για GDH, ενώ επιβεβαίωσε πως σε όλα τα μιτοχόνδρια εντοπιζόταν γλουταμική αφυδρογονάση, έδειξε πως υπήρχαν 2 υποπληθυσμοί μιτοχονδρίων με διαφορετικά επίπεδα GDH και σε ισοκατανομή σε όλες τις στοιβάδες του παρεγκεφαλιδικού φλοιού.

Από την άλλη μεριά από τα τέλη της δεκαετίας του '60 υποστηρίχθηκε πως πλην της μιτοχονδριακής υφίσταται και άλλη GDH ισομορφή. Ήδη από το 1973 οι **Godinot και Lardy** μιλούσαν για μία μορφή GDH συνδεδεμένης με τα μικροσώματα (η οποία σε ποσοστό 33% τουλάχιστον δεν αποτελούσε προϊόν επιμόλυνσης από μιτοχόνδρια). Μία άλλη ομάδα ερευνητών (**Di Prisco και συν., 1968; Di Prisco και Gasolia, 1975**) απομόνωσαν από το ήπαρ αρουραίου γλουταμική αφυδρογονάση που εντοπιζόταν στον πυρήνα. Η πυρηνική GDH διέφερε της μιτοχονδριακής ως προς την χημική συγγένεια (affinity) με το NADH, την ενεργοποίηση από το φωσφόρο την δραστηριότητα σε διαφορετικό εύρος pH και τη θερμοσταθερότητα (η μιτοχονδριακή πιο θερμοσταθερή). Επιπλέον οι 2 ισομορφές παρουσίαζαν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα και αντιγονικότητα. Την άποψη αυτή αντέκρουσαν οι **King και Frieden, (1970)** και επί τη βάσει των δικών τους πειραμάτων θεώρησαν την πυρηνική μορφή επιμόλυνση από το μιτοχονδριακό κλάσμα. Οι **Lai και συν., (1985)**, χρησιμοποιώντας ενζυμικές (μέτρηση δραστηριότητας GDH) και ανοσολογικές μεθόδους (ανοσοκαθήλωση με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της GDH από βόειο ήπαρ), διαπίστωσαν την ύπαρξη λειτουργικής GDH τόσο στο μιτοχονδριακό όσο και στο πυρηνικό κλάσμα από εγκέφαλο αρουραίου. Οι δύο ισομορφές είχαν παρόμοιο MB ~56 kDa αλλά διέφεραν στην ευαισθησία τους σε άλατα και απορρυπαντικά στη διαδικασία διαλυτοποίησης (η πυρηνική ισομορφή μπορούσε να απομονωθεί με χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων 0.3% Triton X-100 και Lubrol PX και >150 mM KCl). Μάλιστα υποστηρίζουν πως η GDH δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως μιτοχονδριακός δείκτης (marker). Ο **McDaniel (1995)** απομόνωσε επίσης από βόειο ήπαρ μία πυρηνική μορφή GDH, η οποία αν και είχε το ίδιο MB, όπως φάνηκε στην ηλεκτροφόρηση πηκτής με SDS-PAGE, διέφερε από τη μιτοχονδριακή στην πρωτοταγή δομή (<10% διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία), στη θερμοσταθερότητα (πιο θερμοσταθερή) και στην ευαισθησία στο ADP (2 φορές πιο ευαίσθητη). Η παρουσία της σε σημαντικές ποσότητες σημαίνει πιθανό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής (πρβ κατωτέρω με την υπόθεση των Preiss και συν., 1993, πως αποτελεί RNA δεσμεύουσα

πρωτεΐνη), στο μεταβολισμό του αζώτου και στην προσφορά ενέργειας για τις λειτουργίες του πυρήνα.

Μία άλλη ομάδα ερευνητών υποστήριξαν πως η GDH ανευρίσκεται σε λυσοσωμικές μεμβράνες και διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση λυσοσωμάτων-μικροσωληνίσκων (Rajas και συν., 1993, 1996). Οι ερευνητές αυτοί απομόνωσαν αρχικώς από λυσοσώματα/ενδοσώματα θυροειδή και αργότερα από αδρά εκχυλίσματα μεμβρανών ήπατος και εγκεφάλου χοίρου μία πρωτεΐνη, την MP50 (μεμβρανική πρωτεΐνη των 50 kDa). Η διαδικασία καθαρισμού περιελάμβανε αρχικώς διαφορετικές φυγοκεντήσεις σε δ/μα 0,25M σουκρόζης, οσμωτική λύση των κυστιδίων, κατεργασία με υψηλής ιοντικής ισχύος δ/μα NaCl 0.6M, διαλυτοποίηση με το zwitterionic απορρυπαντικό CHAPS και χρωματογραφία συγγένειας με καθηλωμένο ATP. Η MP50 εμφάνισε μία εξαρτώμενη από ATP δραστηριότητα στην πρόσδεση μικροσωληνίσκων και θεωρήθηκε ότι διαμεσολαβεί στην σύνδεση των λυσοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους και πιθανόν λειτουργεί ως παράγων αγκυροβόλησης (Rajas και Rousset, 1993). Η παραγωγή καθαρισμένης MP50 και μετά διαλυτοποίηση με Triton-X 114 έδειξε πως η MP50 είναι μία περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη. Με αλληλούχιση του αμινοτελικού άκρου (των 20 πρώτων αμινοξέων) αναγνωρίστηκε η MP50 ως μία συνδεδεμένη με μεμβράνη ισομορφή της GDH. Η MP50 εμφάνιζε δραστηριότητα GDH (αν και η ειδική δραστηριότητα ήταν 4-8 φορές μικρότερη της καθαρής ηπατικής GDH) αναστελλόταν από το GTP, ενώ ενεργοποιούνταν 1.5-2 φορές από το ADP. Η ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης της καθαρής ηπατικής GDH ανέδειξε 6 ισοπρωτεΐνες (!sic) ενώ της MP50 1 βασική ισομορφή (με ποσότητες MP50 διπλάσιες ή τριπλάσιες της συνηθισμένης μπορούσαν να παρατηρηθούν 3 επιπλέον ισομορφές) ισοηλεκτρικό σημείο ίδιο με αυτό της ισοπρωτεΐνης 2 της ηπατικής GDH (pI: 6.5). Σε αντίθεση με την MP50 η ηπατική GDH ποτέ δεν παρουσίαζε την ιδιότητα σύνδεσης των μικροσωληνίσκων. Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης τους, οι Rajas και συν., (1996) κατασκεύασαν ειδικά αντισώματα έναντι της καθαρής MP50. Επώαση των καθαρισμένων λυσοσωμάτων με τα αντισώματα αυτά ανέστειλαν τη σύνδεση λυσοσωμάτων με τους μικροσωληνίσκους. Περαιτέρω η ένθεση (microinjection) των αντισωμάτων στα φυσιολογικά θυροειδικά κύτταρα μετέβαλλε (αραίωσε) την περιπυρηνική κατανομή των λυσοσωμάτων. Από την άλλη μεριά αντισώματα έναντι της μιτοχονδριακής (soluble) GDH, μολονότι αναγνώριζαν την MP50, δεν παρεμπόδιζαν αυτήν την σύνδεση. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν πως οι MP50 και GDH διαφέρουν είτε στη δομή είτε στη διαμόρφωσή τους. Επί τη βάση των αποτελεσμάτων

αυτών οι συγγραφείς εισηγούνται μια νέα λειτουργία για τη “μεμβρανική” ισομορφία της γλουταμικής αφυδρογονάσης, αυτή της πρωτεΐνης-συνδέσμου (linker) μεταξύ λυσοσωμάτων και μικροσωληνίσκων. Επίσης φαίνεται να παίζει ρόλο στην εξαρτώμενη από τους μικροσωληνίσκους περιπυρηνική εντόπιση των λυσοσωμάτων.

Οι **Preiss και συν., (1993)** είχαν αρχικώς δείξει πως σε ομογενοποίηση βοείου ήπατος εμφανίζονταν 2 σύμπλοκα με δραστηριότητα σύνδεσης με RNA, τα οποία αλληλεπιδρούσαν με μεταγραφήματα από τις ηπατικές ισομορφές (L(iver)-forms) των διαφόρων υπομονάδων της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (bovine cytochrome c oxidase subunit VIII liver isoform, BCOL8; human cytochrome c oxidase subunit VIIa-liver type, HCOL7a). Η μία πρωτεΐνη απομονώθηκε μετά χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (με DEAE) και διήθησης σε πηκτή (Sephadex) και με αλληλούχιση του αμινοτελικού άκρου βρέθηκε πως ήταν η γλουταμική αφυδρογονάση. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν πως η σύνδεση της GDH με το mRNA BCOL8 και HCOL7a ήταν ειδική καθώς άλλες πρωτεΐνες (rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, bovine liver catalase, bovine muscle and chicken liver lactate dehydrogenase, porcine heart isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase (mitochondrial or cytosolic), bovine heart pyruvate dehydrogenase complex subunit E3 και BSA) δεν συνέδεαν RNA. Επιπλέον περίσσεια tRNA, DNA από όρχι σολωμού και ομοριβοπολυμερή δεν ανταγωνίζονταν για την θέση πρόσδεσης RNA, ενώ το ολικό κυτταροπλασματικό RNA ανέστειλλε την πρόσδεση ραδιοσημασμένου BCOL8 RNA στην GDH. Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνηγορούσαν πως η GDH περιέχει μία δεσμεύουσα θέση για RNA με μεγαλύτερη συγγένεια είτε για μία μη ακόμη γνωστή αλληλουχία ομοφωνίας είτε για τη συγκεκριμένη δομή. Η άλλη πρωτεΐνη με MB ~ 51 kDa, η οποία αρχικώς ονομάστηκε cytochrome c oxidase L-form transcript-binding protein (COLBP), βρέθηκε πως συνδέεται με το mRNA του BCOL8 μόνο τους ιστούς/όργανα (νεφρούς, ήπαρ, πνεύμονας) όπου εκφράζεται το ώριμο πεπτίδιο μολονότι το μεταγράφημα ανευρίσκεται σε όλους τους βόειους ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς και των μυών. Η σύνδεση της COLBP με το mRNA του BCOL8 (αλλά και του BCOL7a) φαίνεται πως χρειάζεται την ύπαρξη ελεύθερων σουλφυδρυλικών ομάδων. Η COLBP δεν συνδεόταν με τα mRNA από τις H(eart) ισομορφές της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Κατά συνέπεια εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των ηπατικών ισομορφών της οξειδάσης του κυτοχρώματος c σε συγκεκριμένους ιστούς (Preiss και Lightowers, 1993). Οι ίδιοι ερευνητές αργότερα υιοθετώντας μία ποικιλία μεθόδων (υποκυτταρική κλασματοποίηση, immunocompetition, UV crosslinking and shift-Western blot) έδειξαν πως χωρίς αμφιβολία η COLBP είναι η



γλουταμική αφυδρογονάση (Preiss T et.al. 1995). Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνηγορούν για μία νέα πιθανή λειτουργία της γλουταμικής αφυδρογονάσης στην cotranslational translocation (=συμεταφραστική μετατόπιση), ή στην τροποποίηση του RNA (processing) ή στην μεταφορά του μιτοχονδριακού RNA στο μιτοχόνδριο. Η αλληλεπίδραση με mtRNA αλληλουχίες(α) ή δομές(ή) πιθανόν να αυξάνει τη σταθερότητα σε περιόδους respiratory stress ή να διευκολύνει την ταχύτητα παραγωγής προϊόντων μετάφρασης ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ικανότητα για οξειδωτική φωσφορυλίωση. **Οι Lee και συν., (1999)** δουλεύοντας με ήπαρ αρουραίου απομόνωσαν μία ισομορφή GDH από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER) χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και διήθησης σε πηκτή (στήλη DEAE- Sepharose) και χρωματογραφία χημικής συγγένειας (ATP-agarose). Το γεγονός πως η GDH από το RER αφενός εξάχθηκε από τις μεμβράνες με χρήση μόνο 0.6 M NaCl χωρίς τη χρήση απορρυπαντικού και αφετέρου μετά κατεργασία με 0.1 % Triton X-100 η GDH δραστηριότητα του RER κλάσματος δεν μεταβλήθηκε (σε αντίθεση με το μιτοχονδριακό κλάσμα που αυξήθηκε κατά 1.5 φορές) έδειξε πως ήταν περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη προσδεσμένη χαλαρά στην κυτταροπλασματική πλευρά του RER. Στις κινητικές μελέτες η GDH από το RER παρουσίαζε υψηλότερη τιμή  $K_m$  για το NAD απ' ότι για το NADP σε αντίθεση με τη μιτοχονδριακή GDH (μικρότερη  $K_m$ , για το NAD<sup>+</sup>, υψηλότερη τιμή  $K_m$  για το NADP<sup>+</sup>, Παράρτημα Πίν. 1). Επίσης από το γεγονός πως στη διαδικασία καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε στήλη με ATP σημαίνει ότι έχει υψηλή συγγένεια για το ATP, χωρίς το τελευταίο να αποτελεί αλλοστερικό τροποποιητή. Παρόμοια υψηλή ικανότητας σύνδεσης με το ATP επέδειξε και η συνδεδεμένη με λυσοσωματικές μεμβράνες GDH που ανακάλυψαν οι Rajas και συν., (1996). Επιπλέον όταν οι 2 GDH ισοπρωτεΐνες επώστηκαν στους 42°C ή υπέστησαν κατεργασία με τρυψίνη η GDH από το RER ήταν πιο ανθεκτική στη θερμότητα και λιγότερο ευαίσθητη στην τρυπτική πρωτεόλυση από τη μιτοχονδριακή GDH. Αξίζει πάλι να υπομνηστεί πως τόσο οι Colon και συν. (1986) στον εγκέφαλο αρουραίου, όσο και οι Burbueva και συν., (2002) στον ανθρώπινο εγκέφαλο βρήκαν πως η “μεμβρανική” GDH ήταν πιο θερμοανθεκτική, γεγονός που αναπαρήγε και ο McDaniel (1995) στην “πυρηνική” GDH που απομόνωσε από το βόειο ήπαρ. Τέλος με αλληλούχιση του αμινοτελικού άκρου η GDH από το RER διέφερε τουλάχιστον κατά 5 αμινοξέα από τη μιτοχονδριακή ισομορφή της. Οι ερευνητές υπέθεσαν πως η GDH από το RER πιθανόν να εμπλέκεται στη σύνδεση με τους μικροσωληνίσκους (όπως οι Rajas και συν.). Σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες στη λευκή ουσία σε ανθρώπινο εγκέφαλο έντονη σήμανση για GDH διαπιστώθηκε στο κυτοδιάλυμα

(cytosol) και στη μεμβράνη των ολιγοδενδροκυττάρων (Werner και συν., 2001). Τέλος οι Veuthey και συν., (1994) διερεύνησαν την κυτταρική και υποκυτταρική κατανομή διαφόρων ενζύμων, μεταξύ των οποίων και της GDH στα κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς της μέλισσας Με βάση την ειδική δραστηριότητα (specific activity) παρατήρησαν δύο κλάσματα GDH κατανεμημένα εξίσου ανάμεσα στο κυτοδιάλυμα και στα μιτοχόνδρια των γλοιακών κυττάρων του Müller.

Συμπερασματικά παρά την πολλαπλότητα των μελετών δεν φαίνεται να υπάρχει οριστική απάντηση στο θέμα της υποκυτταρικής εντόπισης της GDH. Μολονότι στο σύνολό τους οι μελέτες επιβεβαίωσαν τον εντοπισμό της στα μιτοχόνδρια, όχι μικρός αριθμός ερευνητών εντόπισε και μία “μεμβρανική” GDH (ενδεικτικά Colon και συν., 1986; Aoki και συν., 1987b; Rajas και συν., 1996; Lee και συν., 1999; Burbaeva και συν., 2002), ενώ ορισμένοι (Prisco και Casola, 1975; Lai και συν., 1985; McDaniel 1995) μίλησαν και για “πυρηνική” ισομορφή. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική ετερογένεια στην πρωτοταγή δομή, στις ιδιότητες ιδιαιτέρως σε ότι αφορά στην θερμική αδρανοποίηση αλλά και στο λειτουργικό ρόλο τόσο της “μιτοχονδριακής” όσο και της “μεμβρανικής ισομορφής”. Από τη μία πλευρά η ποικιλομορφία των ευρημάτων εξηγείται από το γεγονός πως οι μελέτες διενεργήθηκαν σε διαφορετικά θηλαστικά (αρουραίος, βους, χοίρος και άνθρωπος), διαφορετικά όργανα (ήπαρ, εγκέφαλος) και με διαφορετικές τεχνικές και διαλύματα απομόνωσης των κλασμάτων GDH από τα συγκεκριμένα είδη/ιστούς. Γι’ αυτό το λόγο είναι δύσκολη αν όχι αδύνατη η σύγκριση μεταξύ των διαφόρων μελετών ακόμη κι όταν αφορούν ίδιο όργανο/ιστό (π.χ. βόειο ήπαρ ή εγκέφαλο αρουραίου). Από την άλλη δεν υπάρχει τόσο σημαντική γενετική ετερογένεια, καθώς όλες οι GDH των θηλαστικών έχουν >90 % γενετική ομοιότητα. Κατά συνέπεια είναι μάλλον δύσκολο να δεχθεί κάποιος την τόσο μεγάλη ετερογένεια λειτουργίας και ιδιοτήτων σε ένα τόσο ευρέως εκφραζόμενο ένζυμο. Ο συνδυασμός αποτελεσμάτων για το ίδιο όργανο /ιστό με διαφορετικές τεχνικές (υποκυτταρική κλασματοποίηση + ανίχνευση με ενζυμικές μεθόδους και ανοσοϊστοχημεία) ίσως αποτελεί έναν τρόπο κριτικής προσέγγισης της βιβλιογραφίας. Έτσι για παράδειγμα όσον αφορά στον εγκέφαλό των θηλαστικών η παρουσία της GDH κοντά σε λυσοσώματα (Rajas και συν., 1993, 1996) ή σε μεμβράνες (Colon και συν., 1986) θα μπορούσε να εξηγή τα αποτελέσματα των Aoki και συν. (1987) για ανεύρεση ανοσοσήμανσης για GDH σε εξωμιτοχονδριακές θέσεις. Ή όσον αφορά στη GDH του ήπατος είναι ενδιαφέρουσα η συσχέτιση εντόπισης GDH στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Lee και συν., 1999) και η ανεύρεση GDH με ικανότητα σύνδεσης RNA (Preiss και συν., 1993, 1995),

καθώς οι τελευταίοι εκτός από μιτοχονδριακή ομιλούν και για κυτοσολική GDH. Τέλος στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που προηγήθηκε εντυπωσιάζει πως οι περισσότερες μελέτες χρονολογούνται το αργότερο έως τα τέλη της δεκαετίας του 1990 και άρα δεν αξιοποιούνται οι νεότερες μοριακές τεχνικές. Επιπλέον ιδιαίτερος σε ό,τι αφορά στη λειτουργία/ υποκυτταρική εντόπιση της GDH στον άνθρωπο, δεν έχει αξιολογηθεί (και αξιοποιηθεί) η ύπαρξη 2 γονιδίων που κωδικοποιούν την GDH στον ανθρώπινο εγκέφαλο, με αποτέλεσμα να λείπουν οι σχετικές μελέτες. Κατά τη γνώμη μας τούτο συνιστά σημαντικό κενό και αποτέλεσε έναυσμα για τη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των hGDH1 και hGDH2 in vitro.

## **6. Ρόλος της GDH στον κυτταρικό μεταβολισμό και ιδιαίτερα στο μεταβολισμό του γλουταμικού στο ΚΝΣ**

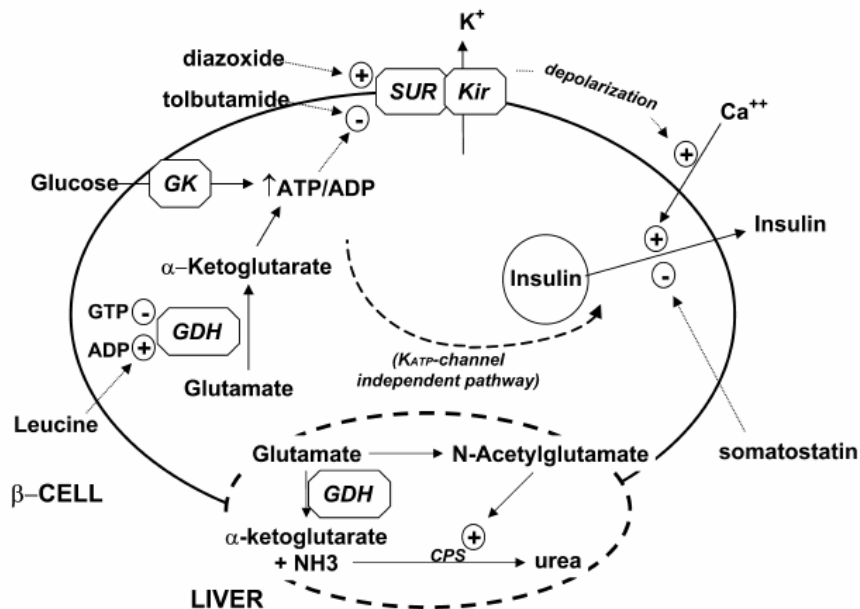
### **Ο ρόλος της GDH στον μηχανισμό έκκρισης ινσουλίνης**

Πρώτοι οι Sener και συν., (1980) έδειξαν πως ένα ανάλογο της λευκίνης (η 2-aminobicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid, BCH) ενεργοποιεί τη γλουταμική αφυδρογονάση στην φορά της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού στα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την παραγωγή  $\text{NH}_4^+$  και α-κετογλουταρικού. Επιπλέον αυξάνεται η περιεκτικότητα σε ATP, ενώ η είσοδος  $\text{Ca}^{++}$  οδηγεί τελικώς στην έκκριση ινσουλίνης. Περαιτέρω η παρουσία γλουταμίνης δρα ενισχυτικά στην ινσουλινοτρόπο δράση της λευκίνης μέσω της αντίδρασης της GDH (Fahien και συν., 1988). Παρομοίως ευοδωτική δράση στην έκκριση ινσουλίνης έχει η αλανίνη, καθώς ελαττώνει τα επίπεδα του α-κετογλουταρικού μέσω της παρακάτω αντίδρασης τρανσαμίνωσης (διά της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης)

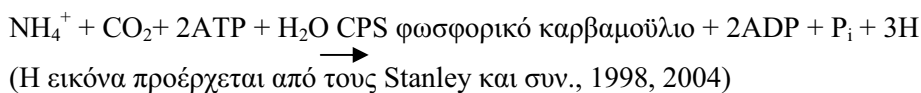
Αλανίνη + α-κετογλουταρικό  $\xrightarrow{ALT}$  πυρουβικό + γλουταμικό

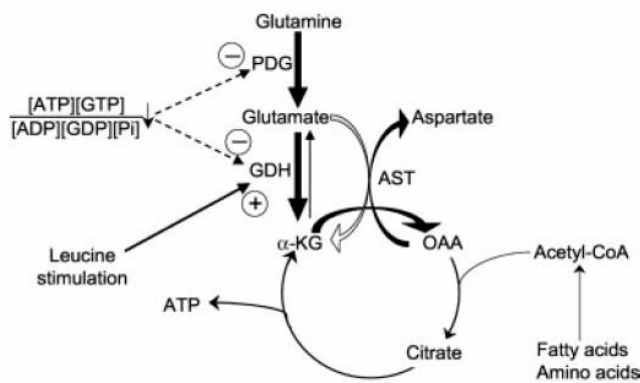
Αντίθετα το μαλικό αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης καθώς αυξάνει την παραγωγή α-κετογλουταρικού στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος (το οποίο λειτουργεί ως αναστολέας της αντίδρασης της GDH ) μέσω της συνδυασμένης δράσης αφυδρογονάσης του μαλικού και ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (μεταφορικός δρόμος μαλικού-ασπαρτικού, malate-aspartate shuttle). Η μεταγευματική υπεργλυκαιμία οδηγεί μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης στην αύξηση των επιπέδων ATP και GTP (και αντίστοιχα στην ελάττωση των επιπέδων των ADP, GDP και Pi). Καθώς οι ενδομιτοχονδριακές συγκεντρώσεις των GTP και ATP σαφώς υπερβαίνουν τις  $\text{IC}_{50}$  τους (50–100 nM και 10–20  $\mu\text{M}$  αντιστοίχως) για την αναστολή της GDH, είναι προφανές πως

η GDH αναστέλλεται πλήρως σε καταστάσεις υψηλού ενεργειακού δυναμικού (όπως αυτές που επικρατούν μετά από γεύμα). Επιπλέον καθίσταται ανθεκτική στη δράση της λευκίνης. Από την άλλη σε καταστάσεις ενεργειακής ένδειας (ελάττωση του δυναμικού φωσφορυλίωσης) η GDH γίνεται ευαίσθητη στη δράση της λευκίνης όπως φαίνεται στα σχήματα 3 και 4.

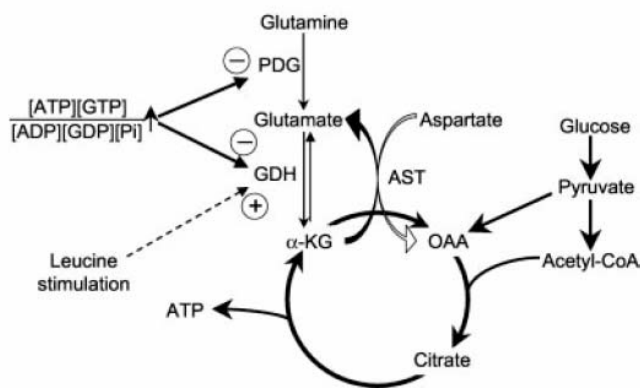


**Εικ. 3. Μηχανισμός εξαρτώμενης από τη GDH έκκρισης ινσουλίνης.** Εισερχόμενη στο παγκρεατικό β-κύτταρο, η γλυκόζη ενεργοποιείται από τη γλυκοκινάση και υφίσταται οξείδωση για να αυξήσει το λόγο ATP/ADP, κάτι που προκαλεί κλείσιμο ενός ανορθωτικού  $K_{ATP}$  καναλιού, αποτελούμενου από ένα σύμπλεγμα υποδοχέα σουλφονυλουρίας (SUR1)/καναλιού  $K^+$  (Kir6.2). Τότε συμβαίνει εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας σε  $Ca^{2+}$  να μπει στο β-κύτταρο και να διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Η λευκίνη εισερχόμενη στο β-κύτταρο ενεργοποιεί την GDH προς την κατεύθυνση παραγωγής α-κετογλουταρικού διαμέσου οξείδωσης του γλουταμικού, παραγωγής ATP μέσω του κύκλου των TCA (άρα και ↑ του λόγου ATP/ADP) και συνεπώς ενεργοποίησης της ίδιας αλληλουχίας γεγονότων για την απελευθέρωση ινσουλίνης που προκαλεί η γλυκόζη. Στο ηπατικό κύτταρο αφενός έχουμε αυξημένη παραγωγή αμμωνίας συνεπεία της δράσης της GDH κι αφετέρου η εξάντληση των ενδοηπατικών αποθεμάτων γλουταμικού εξαιτίας της συνεχούς κατανάλωσης οδηγεί στην ελάττωση παραγωγής N-ακετυλογλουταμικού (NAG), το οποίο αποτελεί αλλοστερικό τροποποιητή της συνθετάσης του φωσφορικού καρβαμοΐλίου (CPS), ενζύμου κλειδί για την απομάκρυνση της αμμωνίας μέσω του κύκλου της ουρίας σύμφωνα με την αντίδραση:





**B. with glucose**



**Εικ. 4. Επίδραση της γλυκόζης στις οδούς της γλουταμινόλυσης και της εξαρτώμενης από λευκίνη απέκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Α.** Σε απουσία γλυκόζης παρατηρούμε ελάττωση του δυναμικού φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα άρση αναστολής των PDG (phosphate-dependent glutaminase) και GDH, όπως φαίνεται από τις στικτές γραμμές. Η GDH είναι ευαίσθητη στην αλλοστερική ρύθμιση από τη λευκίνη (συνεχή γραμμή) οπότε η ροή γλουταμίνη→γλουταμικό →α-κετογλουταρικό αυξάνεται. Εάν η τροφοδοσία με acetyl-CoA είναι περιορισμένη ο κύκλος του Krebs σταματά στο οξαλοξικό και μέσω της τρανσαμίνωσης του γλουταμικού καταλήγει σε συσσώρευση ασπαρτικού. **Β.** Παρουσία γλυκόζης και συνακόλουθης αύξησης του δυναμικού φωσφορυλίωσης έχουμε αναστολή της γλουταμινάσης και της GDH, ενώ η τελευταία καθίσταται ανθεκτική στη δράση της λευκίνης (διακεκομμένη γραμμή). Κατά συνέπεια καταστέλλεται η παραγωγή γλουταμικού και α-κετογλουταρικού και καθώς υπάρχει συνεχής τροφοδοσία του κύκλου του Krebs με πυροσταφυλικό και ακετυλο-συνένζυμο Α η φορά της αντίδρασης τρανσαμίνωσης ευνοεί το σχηματισμό γλουταμικού (εικόνα από τους Li και συν., J. Biol. Chem. 278: 2853–2858; 2003).

## **GDH και σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας (HI/HA)**

Τα τελευταία έτη μεταλλάξεις στο γονίδιο της hGDH1 (*GLUD1*) βρέθηκε ότι ευθύνονταν για ένα ποσοστό παιδιών με συγγενή υπερινσουλιτισμό. Οι ασθενείς, συνήθως νεογνά ή βρέφη (μέση ηλικία: 4 μήνες) με κανονικό βάρος παρουσίαζαν υποτροπιάζοντα επεισόδια υπογλυκαιμίας μέτριας βαρύτητας μετά νηστεία ή και μεταγευματικά, εάν προηγήθηκε γεύμα πλούσιο σε πρωτεΐνες. Εκδηλωνόταν με επιληπτικές κρίσεις (συνήθως αφαιρέσεις) ή κόμα. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν σποραδικές εξαιτίας *de novo* μεταλλάξεων, αν και αναγνωρίστηκαν οικογένειες με αυτοσωματικό επικρατητικό χαρακτήρα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό ήταν η υπεραμμωναιμία (επίπεδα 2-5 φορές μεγαλύτερα του ανώτερου φυσιολογικού), η οποία παρέμενε σταθερή, δεν εξαρτώνταν από τα επίπεδα γλυκόζης, δεν ελαττωνόταν στη νηστεία και δεν αυξανόταν μετά σίτιση με πρωτεΐνες. Στο πλείστο των περιπτώσεων θεωρούνταν ασυμπτωματική καθώς οι ασθενείς δεν παρουσίαζαν συμπτώματα (λήθαργο, κεφαλαλγία) δηλωτικά τοξικότητας (όπως στην ηπατική εγκεφαλοπάθεια). Παραταύτα η ΗΕΓφική εικόνα θύμιζε γενικευμένες κρίσεις που εγείρει υπόνοια διασύνδεσης της υπεραμμωναιμίας με ενδεχόμενη εγκεφαλική δυσλειτουργία. Όλοι οι ασθενείς ανταποκρίθηκαν στη χορήγηση από του στόματος diazoxide σε δόση 5 to 10 mg/kg/H για την αντιμετώπιση της υπογλυκαιμίας.

Όλοι οι ασθενείς ήταν ετερόζυγοι γεγονός που υποδηλώνει επικρατητικό χαρακτήρα. Όλες ήταν σημειακές, παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις. Στην αρχική μελέτη (Stanley και συν., 1998) αναγνωρίστηκαν μεταλλάξεις σε 4 κατάλοιπα Ser445, Gly446, Ser448, His454, ενώ σε περαιτέρω μελέτες (Stanley και συν., 2000) ανευρέθησαν και άλλες σημειακές μεταλλάξεις (Phe440Leu, Gln441Arg, Ala447Thr Lys450Glu). Όλες αφορούν αμινοξέα που ανήκουν στα εξόνια 11 και 12 και εντοπίζονται στην περιοχή της antenna, ενώ ειδικά οι μεταλλάξεις Ser448Pro, Lys450Glu, His454Tyr καθώς εντοπίζονται στην αρχή της περιστρεφόμενης έλικας (“hinge”  $\alpha$ -helix) συνδέονται απευθείας με δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου των  $\beta$ - και  $\gamma$ - φωσφορικών ομάδων του GTP. Όλες φαίνονται να συσχετίζονται με ελαττωμένη ευαισθησία στην αναστολή από το GTP με τις τιμές  $IC_{50}$  να είναι 2–10 φορές υψηλότερες από των φυσιολογικών γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη δραστηριότητα της GDH (gain of function). Περαιτέρω ενζυμικές μελέτες των σε λεμφοβλάστες ασθενών με HI/HA έδειξαν πως οι μεταλλαγμένες GDH εμφάνιζαν ίδια βασική δραστηριότητα (πλήν της Ser448Pro που εμφάνιζε ελαττωμένη βασική δραστηριότητα) και αμετάβλητη ευαισθησία στην ενεργοποίηση από το ADP και την L-λευκίνη και στην αναστολή από

διεθυστιλβεστρόλη ή παλμιτόυλο-CoA (πλήν της Ser448Pro που εμφάνιζε στατιστικώς σημαντικά λιγότερη ευαισθησία στην ενεργοποίηση από το ADP και στην αναστολή από διεθυστιλβεστρόλη). Η εξήγηση για την διαφορετική συμπεριφορά της Ser448Pro hGDH1 mutant είναι πως η εισαγωγή του δακτυλίου της προλίνης (helix breaker) πιθανόν επιφέρει σοβαρή παραμόρφωση στην αρχή της α-έλικας και άρα επηρεάζεται η καταλυτική δραστηριότητά του (Stanley και συν., 2000). Μεταγενέστερες μελέτες (Miki και συν., 2000, Macmullen και συν., 2001) εντόπισαν ασθενείς με παρόμοιο φαινότυπο και μεταλλάξεις σε κατάλοιπα αμινοξέων (*Ser217Cys*, *Arg221Cys*, **Arg265Thr**, **Arg265Lys**, **Tyr266Cys**, **Arg269Cys**, **Arg269His**, Glu296Ala, Asn410Thr) που ανήκουν στα εξόνια 6, 7 και 10 αντίστοιχα. Και αυτές ήταν σημειακές, παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις. Εντοπίζονται στην θέση πρόσδεσης του GTP και λειτουργικά σχετίζονται με ελαττωμένη ευαισθησία στην αναστολή από το GTP. Το ενδιαφέρον είναι πως σε σχέση με τις μεταλλάξεις που εντοπίζονταν στα εξόνια 11-12 διαπιστώθηκαν κάποιες ελάσσονος σημασίας (? για τους συγγραφείς του άρθρου) αλλαγές που αφορούσαν χαμηλότερη μέγιστη δραστηριότητα στην ενεργοποίηση από το ADP και την L-λευκίνη, ελαττωμένη βασική δραστηριότητα, ελαφρώς μειωμένη ευαισθησία στην αναστολή από παλμιτόυλο-συνένζυμο A ( $\uparrow$  τιμών  $IC_{50}$ ) και αυξημένη ευαισθησία στην αναστολή από την διεθυστιλβεστρόλη.

Πλέον πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας άλλος μηχανισμός απελευθέρωσης ινσουλίνης από τα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος, ο οποίος εξαρτάται από τη λειτουργία της GDH αλλά είναι ανεξάρτητος της ευοδωτικής δράσης της λευκίνης. Οι Herrero-Yraola και συν., (2001), έδειξαν πως η μιτοχονδριακή GDH μπορεί να ανασταλεί μέσω της ενζυματικώς αναστρέψιμης ADP ριβοσυλίωσης σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Οι Haigis και συν., (2006) επικέντρωσαν τις έρευνές τους σε μία ομάδα γονιδίων τις σιρτουΐνες (sirtuins, SIRT1–7) ομόλογες των Silent information regulator (Sir2) γονιδίων που σε σακχαρομύκητες (yeast), *C. elegans*, και Δροσόφιλα σχετίζονται με παράταση της ζωής. Η SIRT1 αποτελεί θετικό τροποποιητή της έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος σε φόρτιση με γλυκόζη KCl και δρα αναστέλλοντας την έκφραση της mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP-2). Η SIRT6 λειτουργεί ως ADP-ribosyltransferase και παίζει ρόλο στην αντίσταση βλάβης του DNA, καταστολής της γενομικής αστάθειας και πιθανόν στην επιδιόρθωση βάσεων στο πυρηνικό DNA (base excision repair). Με μια σειρά πολύ καλά σχεδιασμένων πειραμάτων απέδειξαν πως η πρωτεΐνη SIRT4 είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που χρησιμοποιεί το NAD για να επιτελεί ADP ριβοσυλίωση και δι' αυτού του μηχανισμού να καταστέλλει την

δραστηριότητα της GDH. Σε κύτταρα ινσουλινώματος η απώλεια SIRT4 (μέσω RNA interference) είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της GDH και συνεπώς της ενεργοποιούμενης από αμινοξέα (π.χ. λευκίνη, γλουταμίνη) έκκρισης ινσουλίνης (amino acid stimulated insulin secretion, AASIS). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος ποντικών knockout για το SIRT4 ή σε επίμυες που είχαν υποβληθεί σε θερμιδικό περιορισμό (calorie restriction, CR). Περαιτέρω έδειξαν πως σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ποντίκια, η δραστηριότητα της GDH από SIRT4- knockout ή CR επίμυες δεν επηρεαζόταν από τη δράση της φωσφοδιεστεράσης, ενός ενζύμου που αποκόπτει (cleaves) την ADP-ribose και συνεπώς αίρει την αναστολή στη λειτουργία της GDH που επιφέρει η ADP ριβοσυλίωση. Ειδικώς στους επίμυες υπό θερμιδικό περιορισμό ο χαμηλός λόγος NAD/NADH πιθανόν να ελαττώνει (downregulate) την δραστηριότητα της SIRT4 και της επαγόμενης ADP ριβοσυλίωσης της GDH με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελευταίας και την έκκριση ινσουλίνης. Συμπερασματικά στα παγκρεατικά β-κύτταρα του επίμυος τόσο in vivo όσο και ex vivo η SIRT4 λειτουργεί ως αρνητικός τροποποιητής της ινσουλίνης σε αντίθεση με την SIRT1.

## **7. Λειτουργικές ιδιότητες των hGDH1 και hGDH2**

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών μελετήθηκε σε πληθώρα οργανισμών (αρουραίος, βους, χοίρος και άνθρωπος) και οργάνων/ιστών (ήπαρ, εγκέφαλος), όπως έχουμε ήδη δει ανωτέρω (κεφάλαια για ανίχνευση ισομορφών και υποκυτταρικής εντόπισης). Στις μελέτες αυτές επίσης έγινε προσπάθεια διελεύκανσης του μηχανισμού αντίδρασης, ανάλυσης των κινητικών και αλλοστερικών ιδιοτήτων της/των ισομορφής(ών) της GDH, της επίδρασης της θερμότητας, του pH, του ρυθμιστικού διαλύματος, φαρμάκων και ορμονών στο ένζυμο. Εξαιτίας όμως της ετερογένειας ιστών και οργανισμών, διαπιστώθηκαν διαφορές που αφορούσαν τόσο στις κινητικές ιδιότητες ( $K_m$ , Ειδική δραστηριότητα-SA,  $V_{max}$ ), όσο και τον ακριβή ρόλο των αλλοστερικών τροποποιητών. Στους πίνακες 1 και 2 (Παράρτημα), οι οποίοι έχουν ληφθεί από τη διδακτορική διατριβή του Ι. Ζαγανά (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 2005) γίνεται μια προσπάθεια συνοπτικής περιγραφής των αποτελεσμάτων των σημαντικότερων μελετών. Εξάλλου λεπτομερής αναφορά έχει ήδη γίνει στην ρηθείσα διατριβή (Ζαγανάς Ι., Ηράκλειο, 2005), όπου και παραπέμπεται ο αναγνώστης για περισσότερες λεπτομέρειες. Γι' αυτό τον λόγο θα αναφερθούμε μόνο περιληπτικά στις



λειτουργικές ιδιότητες της ανθρώπινης GDH παρουσιάζοντας νέα δεδομένα από τη βιβλιογραφία και αναλύοντας ό,τι σχετίζεται με το θέμα της παρούσης διατριβής.

Καθώς στόχος των περισσότερων ερευνητών είναι η διελεύκανση του λειτουργικού ρόλου της GDH στον άνθρωπο και η πιθανή εμπλοκή της σε ασθένειες, ήταν δύσκολο τα συμπεράσματα μελετών σε άλλους οργανισμούς να εφαρμοστούν στην ανθρώπινη GDH. Γι' αυτό το λόγο ομάδες ερευνητών προσπάθησαν, χρησιμοποιώντας τη γνώση της αλληλουχίας της ανθρώπινης GDH και τις νεότερες μοριακές τεχνικές, να κλωνοποιήσουν το(α) γονίδιο(α) και να το εκφράσουν είτε σε ευκαρυωτικούς (ομάδα καθ. Πλαϊτάκη, ΗΠΑ & Ελλάδα) είτε σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (*E. Coli*, ομάδες Νότιας Κορέας και Φιλαδέλφειας ΗΠΑ).

Έκφραση των wild-type *GLUD1* and *GLUD2* cDNA σε Sf21 (ή Sf9) κύτταρα με το σύστημα έκφρασης του baculovirus οδήγησε στην παραγωγή ανασυνδυασμένων GDH ικανών να καταλύουν την αναστρέψιμη αλληλομετατροπή του γλουταμικού σε ακετογλουταρικό, όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (Shashidharan και συν., 1997; Plaitakis και συν., 2000). Καθώς η ενδογενής GDH των κυττάρων του εντόμου *Spodoptera frugiperda* έχει ειδικότητα μόνο για NADH (Shashidharan και συν., 1994), όλες οι ενζυμικές μελέτες έγιναν με τη χρήση αποκλειστικώς NADP(H). Με αυτό τον τρόπο μηδενίστηκε η όποια ενζυμική δραστηριότητα σχετιζόταν με την GDH των κυττάρων του εντόμου.

### **Καταλυτικές ιδιότητες**

Σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα η hGDH1 εμφανίζει σημαντική βασική δραστηριότητα (40-45% της μέγιστης) επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών (ADP ή L-leucine). Η hGDH2 παρουσιάζει χαμηλή βασική δραστηριότητα (5-10% της μέγιστης), η οποία αποκαθίσταται πλήρως από το ADP και την L-λευκίνη (Plaitakis και συν., 2000). Στα καθαρισμένα ένζυμα οι Καναβούρας και συν (2007), χρησιμοποιώντας 1.0 μg καθαρισμένης πρωτεΐνης/ml TRA ρυθμιστικού διαλύματος, έδειξαν πως η βασική δραστηριότητα της wild-type hGDH2 είναι 2.5% της μέγιστης ενώ της housekeeping hGDH1 είναι περίπου 40% της μέγιστης. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση που αφορά την wild-type hGDH2 είναι πως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά ( $R=0.9397$ ,  $p<0.001$ ) με την βασική δραστηριότητα (concentration dependence). Η βασική δραστηριότητα ως ποσοστό της μέγιστης διακυμάνθηκε από 1% της μέγιστης σε 12% της μέγιστης, όταν η συγκέντρωση της wild-type hGDH2 αυξήθηκε από 0.5 μg/ml σε 12 μg/ml. Αντιθέτως η αυξανόμενη συγκέντρωση της wild-type

hGDH1 στη αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού δεν μετέβαλλε τη βασική ειδική δραστηριότητα αυτής.

Οι δύο ισομορφές διέφεραν σημαντικά στις κινητικές ιδιότητες ιδιαίτερα στη συγγένεια σύνδεσης με τα υποστρώματα ( $\alpha$ -κετογλουταρικό και γλουταμικό). Στην αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού και απουσία αλλοστερικών τροποποιητών (αλλά σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα) η  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό ήταν 3-4 φορές μικρότερη για την wild-type hGDH2 έναντι της wild-type hGDH1 ( $p = 0.005$ ). Η προσθήκη L-leucine ή ADP ελάττωνε την  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό στην wild-type hGDH1 και την αύξανε στην wild-type hGDH2. Ομοίως και στην αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού παρουσία L-leucine (10 mM) και ADP (0.05-0.1 mM) η  $K_m$  για το γλουταμικό ήταν 3 φορές μικρότερη για την wild-type hGDH2 έναντι της wild-type hGDH1 (Plaitakis και συν., 2000). Όμως στις καθαρισμένες πρωτεΐνες και σε συνθήκες μέγιστης ενεργοποίησης οι  $K_m$  για το γλουταμικό, το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, το NADPH και το  $\text{NH}_4^+$  (τα τρία τελευταία στην αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού) δεν διέφεραν μεταξύ των 2 ισοενζύμων (Πιν. 7) (Καναβούρας και συν., 2007).

### **Επίδραση του pH της αντίδρασης στην κατάλυση**

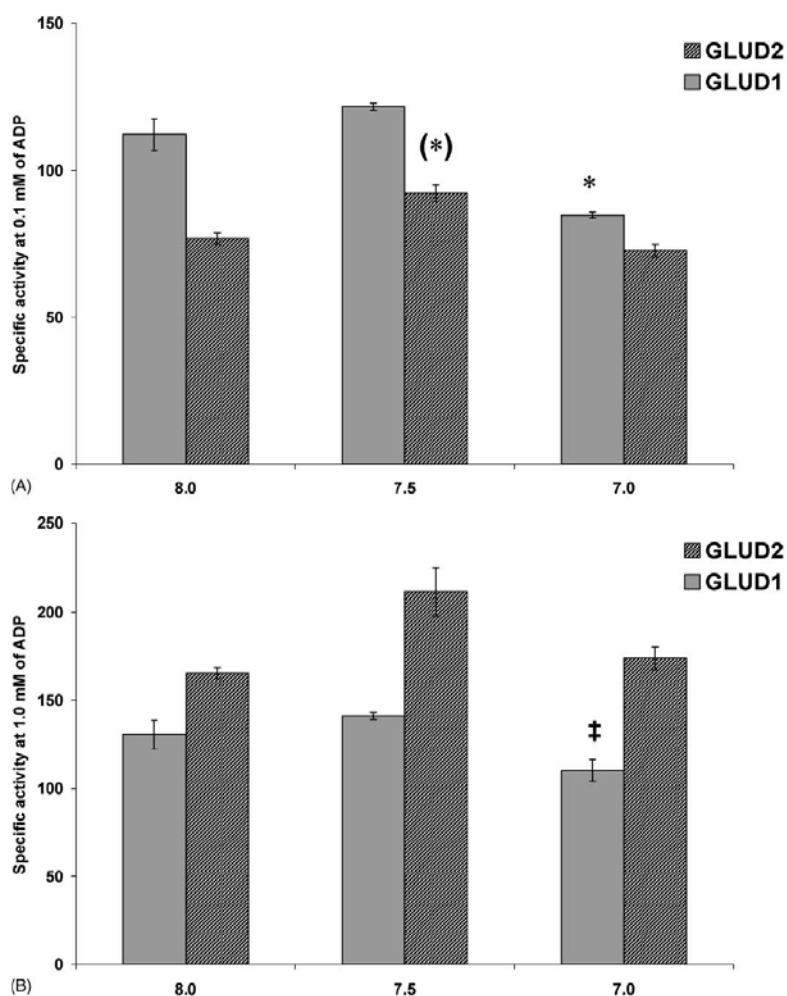
Πρώτοι οι Shashidharan και συν., (1997) παρατήρησαν σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα πως η βασική δραστηριότητα της hGDH1 τετραπλασιαζόταν εάν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος (0.1 M Phosphate buffer) αυξανόταν από 6.5 σε 8.0. Το γεγονός πως το ίδιο δεν παρατηρήθηκε στην hGDH2 οφειλόταν στην χαμηλή βασική δραστηριότητα της τελευταίας. Περαιτέρω η ενεργοποίηση με ADP (έως 0.5 mM τελική συγκέντρωση), ενώ δεν μετέβαλε το ποσοστό ενεργοποίησης της hGDH1 στα διάφορα pH (200-250 % έναντι της βασικής), επηρέαζε δραματικά το ποσοστό ενεργοποίησης της hGDH2 στα διάφορα pH. Συγκεκριμένα σε pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, η αύξηση της δραστηριότητας της hGDH2 (με προσθήκη ADP 0.5mM τελική συγκέντρωση) ήταν 600, 700, 1238 και 2,100 % αντίστοιχα. Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας ειδίκευσης (Μαστοροδότημος ΜΔΕ/ΜΠΝ (Master thesis), 2003, Plaitakis και συν., 2003) μελετήσαμε την επίδραση του pH στην ενζυματική δραστηριότητα των δύο ισοενζύμων σε μερικώς καθαρή μορφή χρησιμοποιώντας TRA ρυθμιστικό διάλυμα. Η επιλογή άλλου ρυθμιστικού διαλύματος (TRA αντί Phosphate) προκρίθηκε γιατί το ένζυμο είναι πιο σταθερό κι εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητα στο διάλυμα της τριαιθανολαμίνης (Shashidharan και συν., 1994; Plaitakis και συν., 2000). Εξάλλου παλαιότερες μελέτες

έδειξαν αφενός πως το ένζυμο είναι ασταθές σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl (base) που είναι ο διαλύτης του διαλύματος των φωσφορικών και αφετέρου αλληλεπιδρά ο ανόργανος φωσφόρος με τη σύνδεση του GTP στο ένζυμο (Dieter και συν., 1981). Παρουσία 0.1mM ADP η hGDH1 ήταν 25–30 % λιγότερο δραστική σε pH 7.0 ( $P < 0.01$ ) απ' ότι σε pH 7.5 και 8.0, ενώ η hGDH2 ήταν εξίσου δραστική σε όλα τα pH (Εικ. 5A). Σε συνθήκες μέγιστης ενεργοποίησης η hGDH2 ήταν λίγο πιο δραστική σε pH 7.5 αλλά εξίσου δραστική σε pH 7.0 και pH 8.0 (Εικ. 5B), ενώ η hGDH1 ήταν σημαντικά λιγότερο δραστική σε pH 7.0 ( $P < 0.05$ ) και εξίσου δραστική σε pH 7.5 και pH 8.0. Παρουσία 0.1mM ADP η ειδική δραστικότητα της hGDH2 ήταν σε απόλυτους αριθμούς μικρότερη από την αντίστοιχη της hGDH1. Αντιθέτως σε 1mM ADP η ειδική δραστικότητα της hGDH2 αυξήθηκε (κατά 50% σε pH 7.5 και κατά 60% σε pH 7.0) σε σχέση με τις αντίστοιχες της hGDH1 (Εικ. 5A) (Plaitakis και συν., 2003). Τέλος πιο πρόσφατα σε καθαρισμένες πρωτεΐνες επιβεβαιώνοντας τις ανωτέρω παρατηρήσεις οι Καναβούρας και συν (2007), η hGDH2 εμφάνισε μέγιστη ειδική δραστικότητα σε pH 7.5 ενώ η hGDH1 σε pH μεταξύ 7.75-8.0.

Είναι αξιοσημείωτο πως αυτό είναι το pH της μιτοχονδριακής μήτρας (matrix) των διαφόρων κυττάρων ((Rottenberg and Lee, 1975; Llopis et al., 1998), γεγονός που δείχνει πως hGDH1 έχει εξελιχθεί ώστε να λειτουργεί μεταξύ 7.80 και 8.0. Εξάλλου είναι γνωστό πως η είσοδος του γλουταμικού στα αστροκύτταρα (στα οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει ανιχνεύεται κυρίως η GDH) συνοδεύεται από πτώση του κυτοσολικού pH στα επίπεδα του 7.2-7.0 λόγω αντιμεταφορά ιόντων  $\text{OH}^-$  ((Bouvier et al., 1992) και συμμεταφοράς  $\text{H}^+$  (Anderson και Swanson, 2000). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώνεται το pH της μιτοχονδριακής μήτρας περίπου στο 7.50 (Llopis et al., 1998), το οποίο αποτελεί το βέλτιστο pH λειτουργίας της hGDH2. Στα κύτταρα Müller του αμφιβληστροειδούς της σαλαμάνδρας (μία ειδική μορφή γλοιακών κυττάρων), πλέον της ενδοκυττάριας οξέωσης λόγω της πρόσληψης του γλουταμικού, η οποία παρατηρήθηκε και στο κυτοδόλυμα και σε μακρινές απολήξεις πλούσιες σε μιτοχόνδρια, παρατηρήθηκε αύξηση NAD(P)H, η οποία αποδόθηκε στην οξείδωση του γλουταμικού μέσω της GDH (Poitry et al., 2000). Είναι λογικό άρα να συμπεράνει κανείς πως η ρύθμιση λειτουργίας της hGDH2 έχει εξελιχθεί ώστε να εναρμονίζεται με τις συνθήκες που επικρατούν στη μιτοχονδριακή μήτρα των περισυναπτικών αστροκυττάρων μετά την είσοδο του γλουταμικού.

### **Ευαισθησία στη Θερμική αδρανοποίηση**

Οι πρώτες παρατηρήσεις σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα από ασθενείς με ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία (Plaitakis και συν., 1984), έδειξαν πως υπήρχαν 2 ισομορφές GDH, μια σωματιδιακή (particulate) θερμοευαίσθητη και μία διαλυτή (soluble) η οποία ήταν θερμοσταθερή. Μετά την ανακάλυψη των 2 γονιδίων οι Shashidharan και συν., (1997) χρησιμοποίησαν τις ανασυνδυασμένες wild-type hGDH1 και 2 από σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα για να πραγματοποιήσουν πειράματα θερμικής αδρανοποίησης. Πράγματι μετά επώαση στους 45°C και μίξη 1:1 με BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM pH 7.4 χρόνος ημίσειας ζωής για την hGDH1 (housekeeping GDH) ήταν 3.5 ώρες ενώ για την hGDH2 (nerve tissue specific) μόνο 0.5 ώρες. Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης, στις καθαρισμένες πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° C επιβεβαίωσαν τις παλαιότερες παρατηρήσεις πως η wild-type hGDH1 είναι θερμοανθεκτική (χρόνος ημίσειας ζωής = 348 minutes), ενώ η wild-type hGDH2 είναι θερμοευαίσθητη (χρόνος ημίσειας ζωής = 38 minutes) (Kanavouras και συν., 2007).



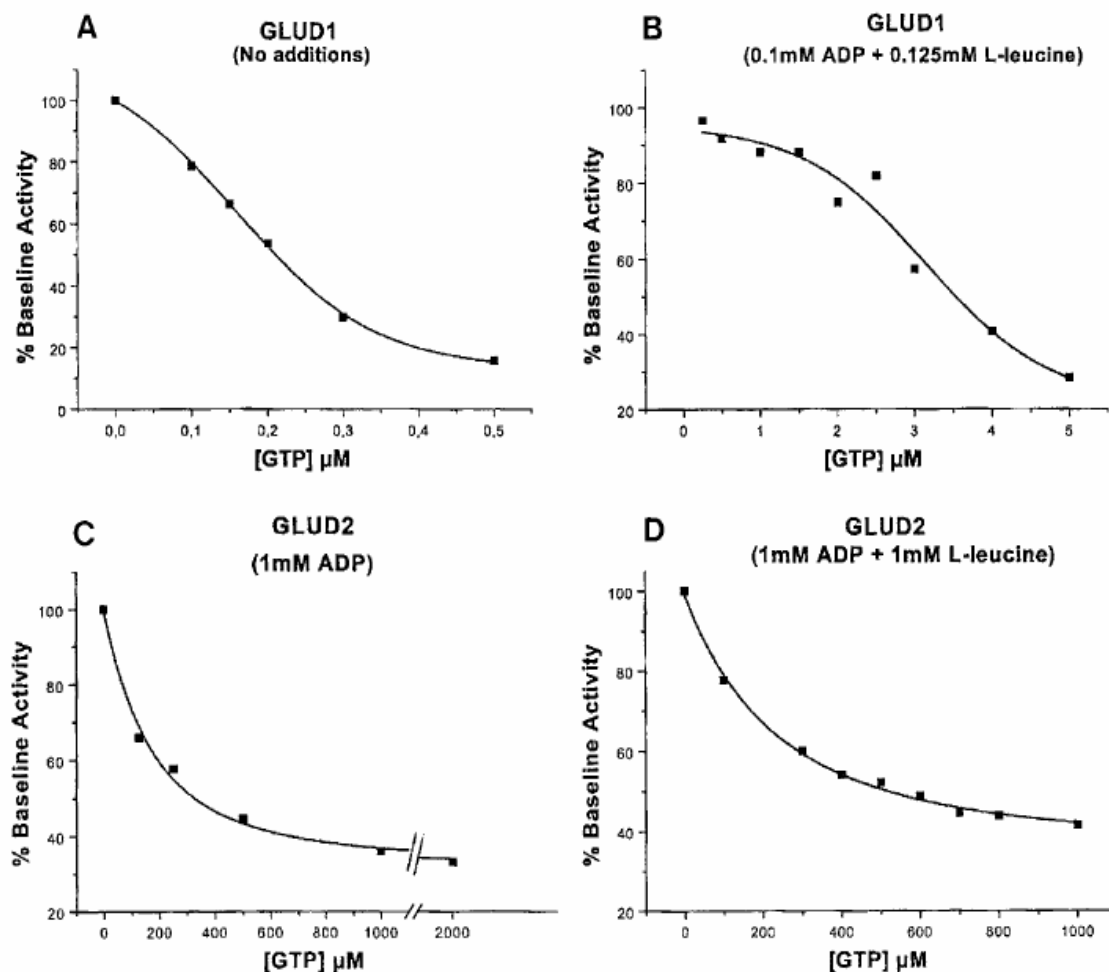
**Εικ. 5. Επίδραση του pH στη δραστηριότητα των ενεργοποιημένων από το ADP wild-type hGDH1 και hGDH2.** Η ειδική δραστηριότητα (Specific activity σε  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  καθαρισμένης πρωτεΐνης) κάθε ισοενζύμου υπολογίστηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε TRA buffer. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν μερικώς καθαρισμένα ένζυμα (κορυφαία κλάσματα από τη στήλη υδρόφοβης αλληλεπίδρασης [phenylsepharose]). Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αναγράφεται κάτω από τις στήλες. Οι γκρι κολώνες αντιπροσωπεύουν τις τιμές για την wild-type *GLUD1* GDH και οι διαγραμμισμένες για τη wild-type *GLUD2* GDH. (A) Δεδομένα παρουσία 0.1mM ADP. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  βασικών σφάλμα μέσου όρου (SEM) (οι ράβδοι) από 3 πειραματικούς προσδιορισμούς. \*:  $P < 0.01$  συγκρινόμενες με τις τιμές σε pH 7.5 και pH 8.0 ; (\*):  $P < 0.01$  συγκρινόμενες με τις τιμές σε pH 7.0 και pH 8.0. (B) Δεδομένα παρουσία 1mM ADP. Η μέση τιμή από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς  $\pm$  βασικών σφάλμα μέσου όρο (οι ράβδοι). ‡:  $P < 0.05$  συγκρινόμενες με την τιμή σε pH 7.5 (Αναδημοσίευση από το άρθρο των Plaitakis και συν., 2003).

## Αλλοστερική ρύθμιση

### Αναστολή από το GTP

Η wild-type hGDH1 απουσία αλλοστερικών τροποποιητών αναστέλλεται ισχυρά από το GTP, εύρημα που αναπαράχθηκε τόσο σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα ( $IC_{50}= 0.2 \mu\text{M}$ ) (Plaitakis και συν., 2000), όσο και στις καθαρισμένες πρωτεΐνες ( $IC_{50}= 0.3 \mu\text{M}$ ) (Kanavouras και συν., 2007). Τα αποτελέσματα συνηγορούν για τη σημασία το οποίο ρυθμίζει την λειτουργία του στους περιφερικούς ιστούς. Αντίθετα η wild-type hGDH2 είναι ανθεκτική στην ανασταλτική δράση του GTP με την  $IC_{50} (\pm \text{SEM})$  να ανευρίσκεται στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα  $>5,000 \mu\text{M}$  και στην καθαρή μορφή  $78.5 \pm 14.1$ . Είναι μία σημαντική μοριακή προσαρμογή του ενζύμου που του επιτρέπει να λειτουργεί στο νευρικό σύστημα που έχει υψηλότερα επίπεδα GTP από άλλους ιστούς στη διάρκεια της διεγερτικής νευροδιαβίβασης. Επί παρουσίας αλλοστερικών τροποποιητών η ανασταλτική δράση του GTP μετριαζόταν και στα 2 ισόενζυμα, συγκριτικά περισσότερο στη wild-type hGDH2. Συγκεκριμένα σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα η  $IC_{50}$  σε ( $\mu\text{M}$  GTP) των wild-type hGDH1 και hGDH2, παρουσία ADP 0.1 mM, ήταν  $0.58 (1.02 \pm 0.03)$ , Zaganas & Plaitakis 2002) και 20 αντίστοιχα (Plaitakis και συν., 2000). Στις καθαρισμένες πρωτεΐνες η  $IC_{50} (\pm \text{SEM})$  της wild-type hGDH2 ήταν  $23.9 \pm 2.2 \mu\text{M}$ , 16 φορές μεγαλύτερη από αυτή της wild-type hGDH1 ( $1.61 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) (Kanavouras και συν., 2007). Προσθήκη ADP 1.0 mM αύξανε την  $IC_{50}$  σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα στα επίπεδα του  $2.48 \mu\text{M}$  για τη wild-type hGDH1 και  $300 \mu\text{M}$  για τη hGDH2 (Plaitakis και συν., 2000). Οι Zaganas & Plaitakis (2002) αντίστοιχα υπολόγισαν την  $IC_{50} (\pm \text{SEM})$  της wild-type hGDH1 σε  $12.23 \pm 0.54$  και της hGDH2 σε  $203.87 \pm 16.2$ . Η L-λευκίνη, όταν χρησιμοποιείται μόνη της, είναι λιγότερο αποτελεσματική από το ADP στην αναστροφή της αναστολής από GTP. Όταν χρησιμοποιείται σε παρουσία ADP, η L-λευκίνη είναι ικανή να μειώσει την αναστολή από GTP (Plaitakis και συν., 2000). Η συνεργική δράση παρουσιάζεται σε συγκεντρώσεις L-λευκίνης ( $125 \mu\text{M}$ ) και ADP ( $50 \mu\text{M}$ ) εντός των επιπέδων που υπάρχουν μέσα στα ανθρώπινα κύτταρα. Στις καθαρισμένες πρωτεΐνες η  $IC_{50} (\pm \text{SEM})$  της wild-type hGDH2 παρουσία ADP 1.0 mM ήταν παρόμοια ( $166.8 \pm 57.8$ ), ενώ της wild-type hGDH1 ήταν 7.5 φορές μικρότερη ( $18.5 \pm 0.5$ ) (Kanavouras και συν., 2007). Όταν στην ανάλυση κατά Hill των γραφικών παραστάσεων αναστολής/ ενεργοποίησης ο συντελεστής Hill  $>1.0$  και δείκτης συνεργατικότητας  $<81$  αυτό σημαίνει θετική συνεργατικότητα. Αντίθετα όταν ο συντελεστής Hill  $<1.0$  και ο δείκτης

συνεργατικότητας  $>81$  το ένζυμο δείχνει αρνητική συνεργατικότητα. Η *GLUD1*-GDH απουσία αλλοστερικών τροποποιητών και παρουσία  $ADP$   $1.0$  mM δείχνει θετική συνεργατικότητα (συντελεστής Hill  $>1.9$  και  $2.1$ , δείκτης συνεργατικότητας:  $10$  και  $9$ ) και η καμπύλη της αναστολής από  $GTP$  είναι σιγμοειδής (Εικ. 6). Αντίθετα, η wild-type *hGDH2* παρουσία  $ADP$   $1.0$  mM δείχνει αρνητική συνεργατικότητα (συντελεστής Hill:  $0.5$  και δείκτης συνεργατικότητας:  $4679$ ) και η καμπύλη αναστολής από  $GTP$  είναι σχεδόν υπερβολική (Εικ. 6). Το  $ADP$  και η L-λευκίνη, όταν προστίθενται μαζί, τροποποιούν διαφορετικά της καμπύλες αναστολής από  $GTP$  των δύο ισοενζύμων (Εικ. 6) και συγκεκριμένα, ο συντελεστής Hill για την wild-type *hGDH1* μειώνεται (άρα μειώνεται και η συνεργατικότητα), ενώ ο αντίστοιχος δείκτης για την wild-type *hGDH2* φαίνεται να αυξάνεται (Plaitakis και συν., 2000).



**Εικ. 6.** Καμπύλες αναστολής από το  $GTP$  (απουσία ή παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών) των wild-type *hGDH1* και 2 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (Αναδημοσίευση από Plaitakis και συν., 2000)

### **Ενεργοποίηση από το ADP**

Πρώτοι οι οι Shashidharan και συν., (1997) σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν πως προσθήκη μικρών ποσοτήτων ADP (0.05—0.25 mM), εντός δηλαδή των *in vitro* συγκεντρώσεων, ενεργοποιούσε το ειδικό για το νευρικό σύστημα ισοένζυμο 550-1300 % ενώ το housekeeping ένζυμο (by 120-150%). Προσθήκη ADP 1.0 mM ενεργοποιούσε ειδικό για το νευρικό σύστημα ισοένζυμο ~2,000% από τη βασική δραστηριότητα ενώ στο housekeeping ένζυμο προξενούσε ~ 250 % αύξηση από τη βασική δραστηριότητα (Εικ. 7). Οι Plaitakis και συν., (2000) εξέτασαν την επίδραση του ADP στην αντίδραση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού και βρήκαν πως προσθήκη 0.025–1.0 mM ADP (τελική συγκέντρωση) ενεργοποίησε την *GLUD2* GDH κατά 170–2,230% ενώ το *GLUD1* ισοένζυμο κατά 156–250%. Οι Zaganas & Plaitakis (2002) στα πλαίσια των μελετών μεταλλαξιογένεσης της wild-type hGDH1 βρήκαν πως σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα την  $SC_{50}$  της hGDH1  $27.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$  ADP και της hGDH2  $85.1 \pm 7.9 \mu\text{M}$  ADP. Οι Kanavouras και συν., (2007) επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω αποτελέσματα σε καθαρισμένες πρωτείνες ανευρίσκοντας παραπλήσιες τιμές τόσο για την hGDH1 ( $SC_{50} = 17.0 \pm 3.3 \mu\text{M}$ ) όσο και την wild type hGDH2 ( $SC_{50} = 58.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ).

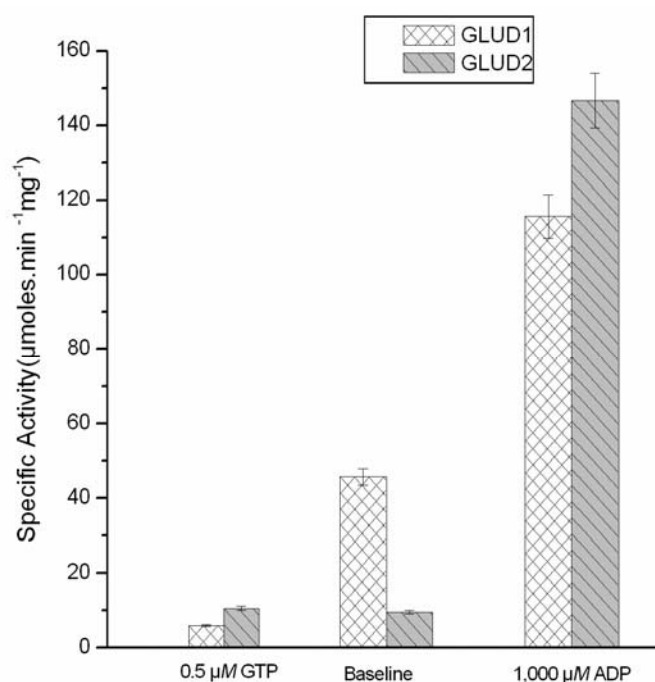
### **Ενεργοποίηση από τη λευκίνη και συνεργική δράση με το ADP**

Η προσθήκη λευκίνης σε συγκέντρωση (250-1000  $\mu\text{M}$ ) δηλαδή μεγαλύτερης της φυσιολογικής ευρισκόμενης ενεργοποιούσε και τα 2 ισοένζυμα αλλά συγκριτικά περισσότερο το ειδικό για το νευρικό ιστό. Ενδεικτικά η παρουσία 1.0 mM L-λευκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσε την δραστηριότητα της wild type hGDH2 κατά 1600 %, ενώ της hGDH1 κατά 75 % (μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα). Αντίθετα συγκεντρώσεις λευκίνης θεωρούμενες φυσιολογικές (67.5–125  $\mu\text{M}$ ) ελάχιστα ενεργοποιούσαν την wild type hGDH2 (μόνο κατά 5 και 30% αντίστοιχα). Όμως σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων λευκίνης η προσθήκη μικρών ποσοτήτων ADP (10, 25, or 50  $\mu\text{M}$ ) επέτρεπε στη λευκίνη για παράδειγμα να ενισχύει την δραστηριότητα του ενζύμου κατά 300, 500 και 700% αντίστοιχα (Εικ. 8). Μόνο του το ADP σε αυτές τις συγκεντρώσεις ενίσχυε τη δραστηριότητα του ενζύμου κατά 20, 40 και 170%, γεγονός που επιβεβαιώνει την συνεργία των δύο αλλοστερικών τροποποιητών όταν χρησιμοποιούνται από κοινού (Plaitakis και συν., 2000).

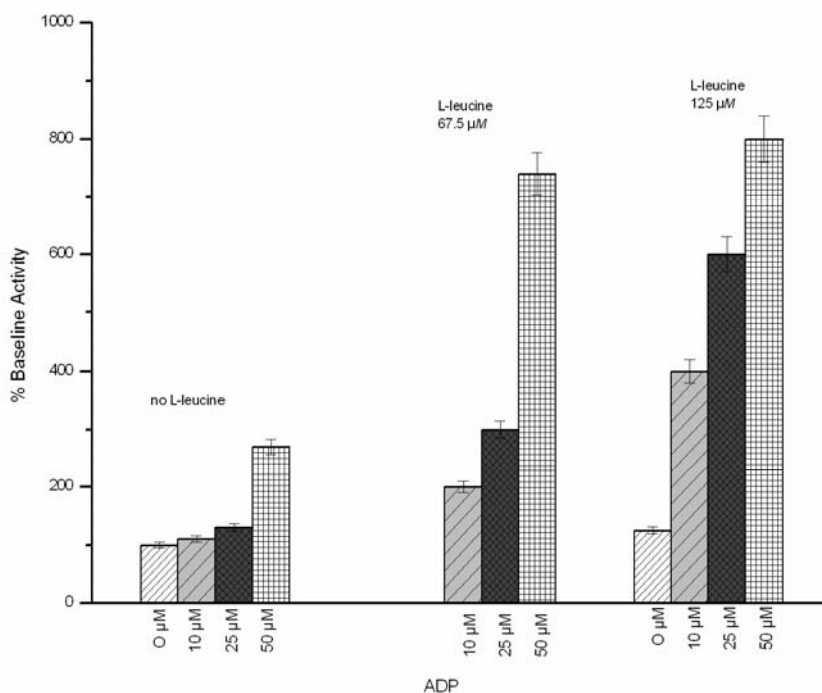
Οι μελέτες των καθαρισμένων ισοενζύμων επιβεβαίωσαν εν γένει τα ανωτέρω αποτελέσματα καθώς η προσθήκη L-λευκίνης (0.15-10 mM) προκάλεσε μεγαλύτερη ενεργοποίηση στην hGDH2 (έως 1,358%) απ' ότι στην hGDH1 (έως 161%). Όμως οι



SC<sub>50</sub> ( $\pm$  SEM) των δύο ισοενζύμων ήταν παραπλήσιες (για την wild type hGDH1 ( $0.98 \pm 0.05$  mM L-λευκίνης και για την wild type hGDH2  $1.1 \pm 0.1$  mM). Η προσθήκη ADP ελάττωνε την SC<sub>50</sub> κατά παραπλήσιο τρόπο και στα 2 ισοένζυμα (Καπανούρας και συν., 2007). Απλώς ως σχολιαστεί οι σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λευκίνης (έως 10 mM) που χρησιμοποιήθηκαν και τα, συγκριτικώς με τα αδρά εκχυλίσματα, μικρότερα ποσοστά ενεργοποίησης.



**Εικ. 7. Οι ειδικές δραστηριότητες (Specific Activities) των ανασυνδυασμένων *GLUD1* και *GLUD2* προερχόμενων hGDH απουσία αλλοστερικών τροποποιητών (Baseline), παρουσία 0.5 μM GTP ή παρουσία 1,000 μM ADP (τελικές συγκεντρώσεις).** Η ενζυμική δραστηριότητα (σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα) υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα δεδομένα προέρχονται από Plaitakis και συν., (2000) και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα εκτίμησης (SE) (οι ράβδοι) από 3 πειραματικούς προσδιορισμούς. (Αναδημοσίευση από Mastorodemos και συν., 2005).



**Εικ. 8. Αλλοστερική ρύθμιση της ανασυνδυασμένης hGDH2 από την L-λευκίνη και το ADP.**

Η ενζυμική δραστηριότητα (σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα) υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Η συγκέντρωση του ADP κυμαινόταν μεταξύ 0 μM και 50 μM, ενώ της L-λευκίνης παρέμενε σταθερή είτε στα 67.5 είτε στα 125 μM. Τα δεδομένα δίδονται ως ποσοστό της βασικής ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία υπολογίστηκε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Προέρχονται από τους Plaitakis και συν., (2000) και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα εκτίμησης (SE) (οι ράβδοι) από 3 πειραματικούς προσδιορισμούς. (Αναδημοσίευση από Mastorodemos και συν., 2005).

**Επίδραση ορμονών (οιστρογόνων, διαιθυλστυλβεστρόλης, θυροξίνης), ιόντων (μαγνησίου), οργανικών οξέων (παλμιτόυλο-συνένζυμο A) και φαρμάκων (αντιψυχωσικών, γκαμπαμπεντίνης)**

Αρκετά παλαιές μελέτες υποστήριζαν πως η GDH διαθέτει μια αλλοστερική θέση πρόσδεσης ευαίσθητη στα στεροειδή (Yielding & Tomkins 1960). Οι Peterson & Warren (1966) έδειξαν πως η 17β-οιστραδιόλη, η οιστρόνη & η προγεστερόνη χρησιμοποιώντας το NADP<sup>+</sup> ως συνένζυμο ανέστειλαν σημαντικά την GDH από ανθρώπινο πλακούντα σε συγκεντρώσεις ανάλογες των φυσιολογικών επιπέδων στον συγκεκριμένο ιστό. Οι Michel και συν., (1977) προχώρησαν περαιτέρω ενοχοποιώντας το αμινοξύ κυστεΐνη 89

πιθανο κατάλοιπο μέσα ή κοντά στο κέντρο πρόσδεσης των οιστρογόνων. Πιο πρόσφατα υποστηρίχθηκε πως οι οιστραδιόλη, προγεστερόνη και τεστοστερόνη αναστέλουν την δραστηριότητα της βόειας GDH (Hudson & Daniel 1993). Η διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) από παλαιά θεωρούνταν αλλοστερικός αναστολέας της GDH των θηλαστικών (Talal και Tomkins 1964, Colon και συν., 1986).

Στο εργαστήριό μας πλέον πρόσφατα θελήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση των στεροειδών ορμονών στις ανασυνδυασμένες wild type hGDH1 και wild type hGDH2. Στα προκαταρκτικά πειράματα τα δύο ισοένζυμα διέφεραν σημαντικά ως προς την ευαισθησία στις γεννητικές ορμόνες με την wild type hGDH2 να είναι 15 φορές πιο ευαίσθητη από την wild type hGDH1 στην αναστολή από την διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) και την 17β-οιστραδιόλη (EST) απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Συγκεκριμένα η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε  $\mu$ M DES για την hGDH1 ήταν  $IC_{50}$ :  $1.53 \pm 0.06$  και για την hGDH2  $IC_{50}$ :  $0.10 \pm 0.05$ . Αντίστοιχα για την οιστραδιόλη η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε  $\mu$ M EST για την hGDH1 ήταν  $IC_{50}$ :  $26.93 \pm 1.07$  και για την hGDH2  $1.53 \pm 0.23$ . Από τον έλεγχο των ανασυνδυασμένων μεταλλαγμένων hGDH1 οκτώ από αυτά και συγκεκριμένα τα E87K, R92Q, D195E, I219V, S227N, G300R, A374V και G456A δεν επηρέαζαν την ευαισθησία στα οιστρογόνα. Μόνο η αντικατάσταση της Arg443 με Ser φάνηκε να είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία της wild type hGDH2 στις γεννητικές ορμόνες. Η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ήταν 14 φορές πιο ευαίσθητη στην αναστολή από την διαιθυλστυλβεστρόλη και 31 πιο ευαίσθητη στην αναστολή από την οιστραδιόλη σε σύγκριση με την wild type hGDH1 παρουσία 0.1 mM ADP. Οι  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε  $\mu$ M DES για την Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν  $IC_{50}=0.51$  ενώ για την hGDH1 η  $IC_{50}=7.07$ . Οι αντιστοιχες  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε  $\mu$ M EST για την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ήταν  $IC_{50}=2.22 \mu$ M ενώ για την wild type hGDH1  $IC_{50}=69.35$ . Η ευαισθησία στα οιστρογόνα συσχετιζόταν αρνητικά με τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου ως ακολούθως Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 < wild type hGDH2 < wild type hGDH1. Επιπλέον ως προς τη δραστικότητα καταστολής της δραστηριότητας της ανθρώπινης GDH (μικρότερη  $IC_{50}$ ) τα οιστρογόνα κατατάσσονται ως ακολούθως: διαιθυλστυλβεστρόλη > οιστραδιόλη > οιστριόλη > προγεστερόνη (Παπαχατζάκη M, ΜΔΕ/ΜΠΝ (Master), 2005).

Οι Kawaguchi και Bloch (1975) έδειξαν πως το παλμιτόυλο-συνένζυμο A αποτελεί ισχυρό αναστολέα της GDH ( $IC_{50}=0.15 \mu$ M). Η αναστολή εξαρτώνταν από τη μοριακή στοιχειομετρία του αναστολέα και του ενζύμου παρά από τη συγκέντρωση του

πρώτου. Ήταν επίσης μερικώς αναστρέψιμη με την προσθήκη (είτε πριν είτε αμέσως μετά την έναρξη της αντίδρασης) βοείου αλβουμίνης του ορού (bovine serum albumin), mycobacterial polysaccharide MMP ή  $(\text{CH}_2)_3$  κυκλοδεξτρίνης (cyclodextrin). Ο μηχανισμός δράσης ήταν η μετατροπή της εξαμερούς ηπατικής GDH σε ενζυματικώς ανενεργά διμερή ( $M_r = 1.2 \times 10^5$ ) με τα οποία συνδέεται ισχυρώς. Πιο πρόσφατα οι Berthiaume και συν., (1994) πιθανολόγησαν πως ο μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης του παλμιτόϋλο-συνένζυμου A στα μιτοχονδριακά ενζυμα είναι μέσω ακυλίωσης των λιπαρών οξέων (fatty acylation). Ουσιαστικά η παλμιτοϋλίωση μιας πρωτεΐνης αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατάλοιπων σερίνης, θρεονίνης και κυστεΐνης μέσω δημιουργίας οξυεστερικών ή θειοεστερικών δεσμών με το λιπαρό οξύ (με 16 άτομα άνθρακα) παλμιτικό. Οι Fang και συν., (2002) στα πλαίσια μελέτης δύο ανασυνδυασμένων μεταλλαγμένων ισομορφών που εμπλέκονται στο σύνδρομο Υπερινσουλιτισμού-Υπεραμμωναιμίας (HI/HA), των His454Tyr και Ser448Pro hGDH1 βρήκαν πως οι μεταλλαγμένες ισομορφές (εκφρασμένες σε E. Coli) ήταν πιο ευαίσθητες στην αναστολή από το παλμιτόϋλο-συνένζυμο A από την wild-type huGDH ( $IC_{50} = 0,03 \mu\text{M}$ ). Ειρήσθω εν παρόδω παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και για την αναστολή από τη διαιθυλστυλβεστρόλη.

Οι Shashidharan και συν., (1997) έδειξαν πως απουσία ADP, το χλωριούχο μαγνήσιο (magnesium chloride,  $\text{MgCl}_2$ ) σε συγκέντρωση 1.0 και 2.0 mM ανέστειλε την wild type hGDH1 (housekeeping GDH) κατά 45 and 64%, αντίστοιχα. Δεν επηρέαζε όμως τη δραστηριότητα της wild type hGDH2 (nerve tissue-specific). Η αναστολή αίρονταν με την παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP (0.05-0.25 mM), εντός των φυσιολογικών επιπέδων του στους ιστούς. Παρότι το χλωριούχο μαγνήσιο δεν επηρέαζε την βασική δραστηριότητα της wild type hGDH2 ανέστειλε την ενεργοποίηση από το ADP εμποδίζοντας την σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.05-0.25 mM) αλλά όχι σε μεγαλύτερες. Σαν αποτέλεσμα η καμπύλη ενεργοποίησης του ADP δεν περιγράφεται από την χαρακτηριστική υπερβολική καμπύλη αλλά προσομοιάζει με σιγμοειδική καμπύλη, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τις τιμές του συντελεστή του Hill που απουσία χλωριούχου μαγνησίου ήταν  $1.24 \pm 0.02$  και γινόταν  $1.81 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ) παρουσία του κατιόντος.

## Μελέτες ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης (site directed mutagenesis) της ανασυνδυασμένης *GLUD1* προερχόμενης GDH στο *E. Coli*

Την τελευταία δεκαετία διάφορες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν την τεχνική της ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης για να αναγνωρίσουν τα κρίσιμα κατάλοιπα αμινοξέων στο μόριο της που ευθύνονται για τις ιδιότητές της (Cho και συν., 2001, Lee και συν., 2001, Fang και συν., 2001, Yoon και συν., 2002 a,b, Lee και συν., 2003, Yoon και συν., 2003).

Η ομάδα από την Νότιο Κορέα κατασκεύασε ένα συνθετικό γονίδιο 1557bp (pHGDDH), που κωδικοποιεί την ανθρώπινη *GLUD1* και εκφράστηκε στο *E.Coli* ως διαλυτή πρωτεΐνη. Χρησιμοποιώντας μεταλλαξιογένεση κασέτας του πλασμιδιακού pHGDDH εξέτασαν αρχικώς το ρόλο της **Lys130** (Lys126 στη βόειο GDH). Συγκεκριμένα, το συνθετικό *GLUD1* γονίδιο μεταλλάχθηκε έτσι ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να περιέχει Glu, Gly, Met, Ser ή Tyr στη θέση της Lys 130. Τα μεταλλαγμένα ένζυμα έδειξαν μείωση της  $V_{max}$  τους κατά 400 φορές σε σύγκριση με το φυσιολογικό ένζυμο, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην  $K_m$  τους για NADH και α-κετογλουταρικό (Cho και συν., 2001). Έτσι, οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι η Lys 130 είναι απαραίτητη στην καταλυτική δραστηριότητα της GDH, χωρίς όμως να υπεισέρχεται στην πρόσδεση του συνενζύμου ή του υποστρώματος σε αυτή (Cho και συν., 2001).

Στη συνέχεια μελέτησαν το ρόλο των καταλοίπων Tyr 266 και Lys 450 στην πρόσδεση του GTP (Lee και συν.,2001). Χρησιμοποιώντας την αυτή τεχνική (μεταλλαξιογένεση κασέτας) παρήγαγαν μεταλλαγμένες ανθρώπινες GDH με Gly, Ser, Glu, Met και Arg αντί για Tyr 266 και με Glu, Gly, Met, Ser, και Tyr αντί για Lys 450. Οι κινητικές μελέτες των μεταλλαγμένων ενζύμων και οι μελέτες με σήμανσης φωτοσυγγένειας (photoaffinity labeling) υπέδειξαν πως η **Lys 450** αλλά όχι η Tyr 266 απαιτούνται για την πρόσδεση του GTP.

Περαιτέρω οι ίδιοι ερευνητές με τη χρήση των τεχνικών της μεταλλαξιογένεσης κασέτας και σήμανσης φωτοσυγγένειας προσδιόρισαν πως το **Glu 279** παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του  $NAD^+$  στην ανθρώπινη GDH, χωρίς ωστόσο να εμπλέκεται άμεσα στην αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου (Yoon και συν., 2002a). Παρομοίως προσδιόρισαν πως η **Tyr 187** συμμετέχει στην πρόσδεση της αδενίνης του ADP στην ανθρώπινη GDH(Yoon και συν., 2002b).

Πλέον πρόσφατα η ίδια ομάδα παρήγαγαν με μεταλλαξιογένεση κασέτας σε επτά θέσεις (Lys333, Lys337, Lys344, Lys346, Ser445, Gly446, and His454) μεταλλαγμένες ανθρώπινες GDH για να μελετήσουν τη συμμετοχή των συγκεκριμένων αμινοξέων στη

διαδικασία του πολυμερισμού των υπομονάδων της GDH (Lee και συν., 2003). Μόνο η αλλαγή της His454 σε Tyr οδήγησε σε αποπολυμερισμό του εξαμερούς σε ενεργά τριμερή και αύξηση της  $K_m$  (άρα ελάττωσης της συγγένειας) για το NADH και το 2-oxoglutarate. Συνεπώς φαίνεται πως η **His454** συμμετέχει στη διαδικασία πολυμερισμού της ανθρώπινης GDH.

Οι ίδιοι ερευνητές με μεταλλαξιογένεση κασέτας σε επτά θέσεις (Lys 94, Gly 96, Lys 118, Lys 130, Asp 172) έδειξαν πως τα κατάλοιπα **Lys 94**, **Gly 96** και **Lys 118** παίζουν σημαντικό ρόλο, αν και σε διαφορετικό βαθμό στη πρόσδεση του γλουταμικού στο μόριο της GDH. Συγκεκριμένα οι τιμές της  $K_m$  για το γλουταμικό ήταν 4–10 φορές μεγαλύτερες για τις μεταλλαγμένες K94Y, G96Y και K118Y hGDH1&2 εν συγκρίσει με τις wild-type hGDH1 and hGDH2. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην  $K_m$  για το NAD<sup>+</sup>. Η τιμή  $K_m$  για το γλουταμικό για την K130Y μεταλλαγμένη hGDH1&2 ήταν αυξημένη κατά 1.6 φορά. Όμως η καταλυτική ταχύτητα (λόγος  $k_{cat}/K_m$ ) ήταν περίπου το 2–3% των φυσιολογικών ισοενζύμων, οπότε η ελάττωσή της οφείλεται κυρίως στην ελάττωση του αριθμού μετατροπής (τιμής  $k_{cat}$ ), γεγονός που υπονοεί πιθανότητα εμπλοκής της Lys 130 στην καταλυτική αντίδραση. Οι τιμές της  $K_m$  για το γλουταμικό και το NAD<sup>+</sup> και η τιμή  $k_{cat}$  για την D172Y μεταλλαγμένη hGDH1&2 δεν διέφεραν από τις φυσιολογικές hGDH1 and hGDH2 αντίστοιχα, γεγονός που σημαίνει πως το Asp 172 δεν εμπλέκεται τουλάχιστον άμεσα στη διαδικασία της κατάλυσης και της σύνδεσης του υπόστρώματος. Όμως οι D172Y μεταλλαγμένη hGDH1&2 ήταν λιγότερο ευαίσθητες στη ενεργοποίηση από το ADP. Πλέον εμφανής η ελάττωση της ευαισθησίας στο ADP παρατηρήθηκε στην D172Y μεταλλαγμένη hGDH2 παρά στην D172Y μεταλλαγμένη hGDH1 (60% and 40% ελάττωση έναντι των wild-type hGDH2 και hGDH1 αντίστοιχα). Σε όλα τα μεταλλαγμένα ισοένζυμα δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ευαισθησία αναστολής από το GTP σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ισοένζυμα (Yoon και συν., 2004).

Τέλος οι Yang και συν., (2004) έδειξαν πως στην wild-type hGDH2 η αντικατάσταση της **Ser443** από **Arg** με μεταλλαξιογένεση κασέτας ήταν η ικανή και αναγκαία συνθήκη για να απωλέσει η μεταλλαγμένη Ser443Arg hGDH2 την ευαισθησία στη θερμότητα της wt hGDH2. Ο χρόνος ημίσειας ζωής για την μεταλλαγμένη Ser443Arg hGDH2 ήταν 300 min παρόμοιος με τον αντίστοιχο της wild-type hGDH1 (310 min).

Η ομάδα από τη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ (Fang και συν., 2001) βασιζόμενοι στις μεταλλάξεις της ανθρώπινης GDH που παρατηρούνται στα παιδιά με το σύνδρομο Υπερινσουλινισμού-Υπεραμμωναιμίας (HI/HA), μελέτησαν τις κινητικές ιδιότητες

τριών από αυτές (His454Tyr, Ser448Pro, Arg463Ala), δημιουργώντας μεταλλαγμένες GDH με ειδική ως προς τη θέση μεταλλαξιγένεση και έκφραση σε E.Coli. Οι κινητικές και λειτουργικές μελέτες επιβεβαίωσαν άρση της ευαισθησίας στην αναστολή από το GTP στις καθαρισμένες **His454Tyr και Ser448Pro** χωρίς επίδραση στην ενεργοποίηση από ADP και L-Leucine. Από την άλλη μεριά η αντικατάσταση της **Arg463 με Ala** εξουδετέρωσε πλήρως την ενεργοποίηση της μεταλλαγμένης GDH από το ADP, ενώ δεν είχε επίδραση στην αναστολή από το GTP ή την ενεργοποίηση από L-Leucine. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τις προβλέψεις από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες στη δομή της βοείου GDH. Στον *πίνακα 3* περιγράφονται συνοπτικά τα ευρήματα από τις μελέτες μεταλλαξιγένεσης στην hGDH1 εκφρασμένης στο E.Coli.

Πρόσφατα προέκυψε ένας νέος μηχανισμός αλλοστερικής τροποποίησης (αναστολής) της γλουταμικής αφυδρογονάσης μέσω της ADP ριβοσυλίωσης (ribosylation), ενός γνωστού μηχανισμού μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πρωτεϊνών, ο οποίος είχε περιγραφεί ότι συμβαίνει σε μιτοχόνδρια προκαρυωτικών και κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ADP ριβοσυλίωση αφορά την αλληλεπίδραση της ελεύθερης ADP-ριβόζης, προερχόμενης είτε από κυκλική ADP ριβόζη είτε από  $\text{NAD}^+$ , με κατάλοιπα κυστεΐνης ή λυσίνης (μη ενζυμικός) ή με κατάλοιπα κυστεΐνης, αργινίνης, ασπαραγίνης ή αμινοξέων με υδροξυλικές ομάδες (τη δράσει του ενζύμου monoADP-ribosyl τρανσφεράση). Οι Herrero-Yraola και συν., (2001), επεκτείνοντας παρατηρήσεις προηγούμενων ερευνητών (Masmoudi και Mandel 1987, 1988; Jorcke και συν., 1998), ανακάλυψαν πως η μιτοχονδριακή GDH αποτελεί στόχο αναστρέψιμης ADP ριβοσυλίωσης. Δότης ήταν το  $\text{NAD}^+$ , δέκτης ένα κατάλοιπο (residue) κυστεΐνης της GDH και η αντίδραση καταλύεται από μια monoADP-ribosyl τρανσφεράση. Η ADP ριβοσυλίωση της GDH επέφερε την αναστολή της καταλυτικής της λειτουργίας κατά ~60- 65% τόσο προς τη φορά της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού όσο και προς τη φορά του σχηματισμού γλουταμικού. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης έδειξε πως αρκούσε η προσθήκη 1 μορίου ADP-ριβόζης σε μία υπομονάδα της εξαμερούς GDH για την αδρανοποίηση του ενζύμου. Η διαδικασία μπορούσε να αντιστραφεί in vivo με τη δράση μίας εξαρτώμενης από το  $\text{Mg}^{++}$  ADP-ribosylcysteine υδρολάσης. Ενδιαφέρον ήταν πως η προσθήκη  $\text{NADP}$  ή  $\text{NADPH}$  ή  $\text{NADH}$  (όλα νουκλεοτίδια περιέχοντα ένα δακτύλιο πυριμιδίνης) κατέστρεψε την ADP ριβοσυλίωση της GDH, ενώ η παρουσία GTP, ADP και ATP δεν την επηρέαζε. Τούτο υποδήλωνε πως η αναστολή της GDH μέσω της ADP ριβοσυλίωσης ήταν αποτέλεσμα τροποποίησης μίας καταλυτικής θέσης, γεγονός που αποτρεπόταν όταν στη θέση αυτή συνδεόταν  $\text{NADPH}$  ή  $\text{NADH}$ . Επιπλέον η περίσσεια

γλουταμικού αλλά όχι γλουταμίνης ενίσχυε την διαδικασία της ADP ριβοσυλίωσης της GDH και άρα αναστολής της λειτουργίας της, ώστε να αποτραπεί η συγκέντρωση τοξικών συγκεντρώσεων αμμωνίας. Περαιτέρω έρευνες αποσαφήνισης ποιο κατάλοιπο κυστεΐνης αποτελεί τη θέση ADP ριβοσυλίωσης στο μόριο της GDH έδειξε πως αυτό το ρόλο δεν τον παίζουν η Cys323 (Yang και συν., 2005) Cys59 και η Cys274 (Choi και συν., 2005). Μόνο μεταλλάγματα της Cys119 δεν αναστελλόταν από την ADP ριβοσυλίωση γεγονός που σημαίνει πως το συγκεκριμένο αμινοξύ εμπλέκεται άμεσα στην ADP ριβοσυλίωση της GDH (Choi και συν., 2005).

### **Μελέτες ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης (site directed mutagenesis) μεταλλαξιογένεσης της ανασυνδυσμένης wild-type hGDH1 εκφρασμένης σε Sf21 κύτταρα με το σύστημα έκφρασης του baculovirus**

Στα πλαίσια της μελέτης της μοριακής βάσης λειτουργίας της ειδικής για το νευρικό σύστημα προερχόμενης από το *GLUD2* γονίδιο GDH (hGDH2) χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριό μας η τεχνική της ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης για να μεταλλαχθεί το *GLUD1* γονίδιο στις 15 θέσεις αμινοξέων που διαφέρει από το *GLUD2* γονίδιο. Κατασκευάστηκαν 15 μεταλλαγμένες ισομορφές της hGDH1 (single mutants), οι οποίες εκφράστηκαν στα Sf21 κύτταρα με το σύστημα έκφρασης του baculovirus (ιδέ κεφάλαιο Μέθοδολογίας). Ενζυμικές μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες GDH (Ala3Leu, Glu34Lys, Arg39Gln, Asp142Glu, Ile166Val, Ser174Asn, Gly247Arg, Ala321Val, Ser331Thr, Met370Leu, Met415Leu, Arg470His, and Asn498Ser), είχαν μία βασική καταλυτική δραστηριότητα παρόμοια με αυτήν της wild-type *GLUD1* GDH. Επιπλέον λειτουργικές μελέτες έδειξαν ότι ο τρόπος αλλοστερικής ρύθμισης των μεταλλαγμένων αυτών ισομορφών (ενεργοποίηση από το ADP και αναστολή από το GTP) αλλά και οι κινητικές ιδιότητες ( $K_m$  για το ακετογλουταρικό και  $V_{max}$ ) ήταν παρόμοιες με αυτές της wild-type hGDH1 (Zaganas και Plaitakis, 2002; Zaganas και συν., 2002; Plaitakis και συν., 2003; Mastorodemos και συν., 2005, Ζαγανάς Διδακτ. Διατριβή, 2005 και αδημοσίευτα δεδομένα).

Μόνο δύο από τις μεταλλαγμένες ισομορφές (Arg443Ser και Gly456Ala) έδειξαν σημαντικές λειτουργικές διαφορές στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (Zaganas and Plaitakis, 2002; Zaganas και συν., 2002; Ζαγανάς Διδακτ. Διατριβή [ΔΔ εφεξής], 2005), γι' αυτό τον λόγο τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό ώστε να εξαχθούν καθαρές πρωτεΐνες για τις περαιτέρω μελέτες. Καθώς αυτό αποτελούσε το θέμα της προαναφερθείσης διατριβής του κ. Ζαγανά, παραπέμπεται σε αυτήν ο αναγνώστης

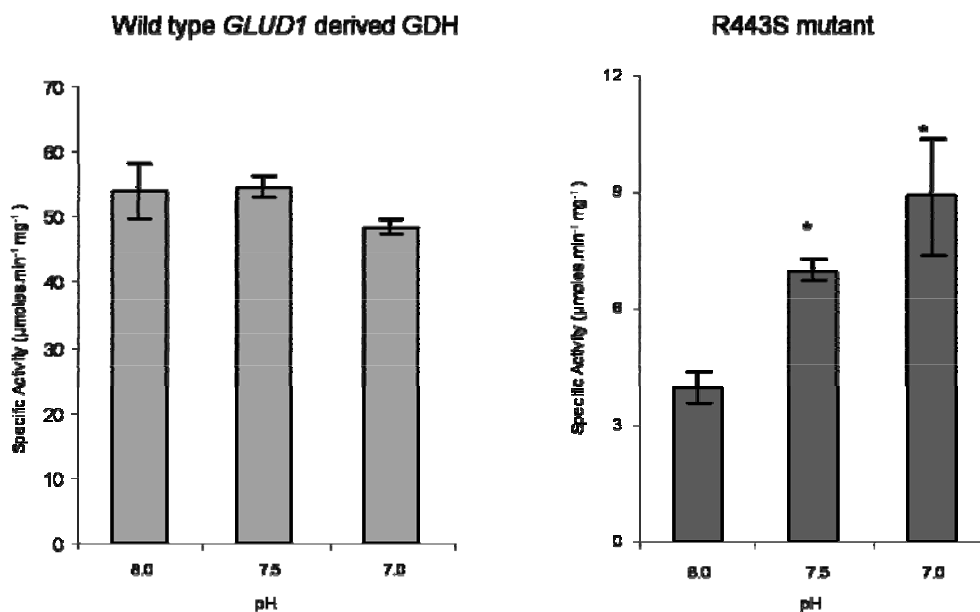


για πρισσότερες λεπτομέρειες που αφορούν στις μεθόδους και στα αποτελέσματα τόσο σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και στις καθαρισμένες πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένης της ανασυνδυασμένης wild-type hGDH1 και της ηπατικής wild-type hGDH1). Εν συνόψει τα κύρια ευρήματα έχουν ως ακολούθως

**Η Arg443 καθορίζει της βασική δραστηριότητα της hGDH2, ρυθμίζει την ενεργοποίηση από την L-Leucine και είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία στη θερμότητα.**

Αντικατάσταση της Arg443 από Ser (όπως συμβαίνει στην hGDH2) σχεδόν μηδένισε της βασική δραστηριότητα της μεταλλαγμένης hGDH1. Απουσία αλλοστερικών τροποποιητών και με παρουσία 0.3-0.5  $\mu\text{g}$  καθαρισμένου ενζύμου σε TRA pH:8.0 η ειδική βασική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ( $2.98 \pm 0.72$   $\mu\text{moles}$  οξειδούμενου NADPH  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης) ήταν 0.21 (ή 2.6 %) της μεγίστης δηλαδή της ειδική δραστηριότητας σε ADP 1mM, η οποία ήταν 136,7 (ή 111.2)  $\mu\text{moles}$  οξειδούμενου NADPH  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ). Η αλλιώς διατυπωμένο αντιστοιχεί στο 8% της ειδικής βασικής δραστηριότητας της wild type hGDH1 ( $54 \pm 4.3$   $\mu\text{moles}$  οξειδούμενου NADPH  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης). Η ελαττωμένη αυτή βασική δραστηριότητα της Arg443Ser hGDH1 παρέμενε σε διαφορετικά pH και ρυθμιστικά διαλύματα (TRA ή phosphate buffer) και μάλιστα το με μεταλλαγμένο ισοένζυμο να επιδεικνύει διαφορετική συμπεριφορά από την wild type hGDH1. Συγκεκριμένα ενώ η βασική δραστηριότητα της wild type hGDH1 σε pH 8.0 και 7.5 ήταν υψηλότερα απ' ότι σε pH 7.0, η βασική δραστηριότητα της Arg443Ser hGDH1 αυξανόταν 2 φορές όταν το pH ελαττωνόταν από 8.0 σε 7.0 (Εικ. 9).

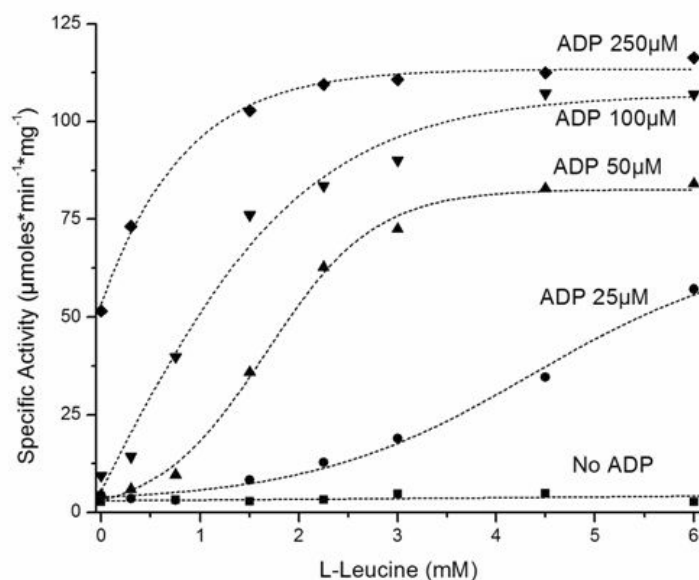
Επιπλέον η Arg443Ser μετάλλαξη ανέστειλε πλήρως την ενεργοποίηση του ενζύμου από την L-leucine (έως τελικής συγκεντρώσεως 10 mM) απουσία αλλοστερικών τροποποιητών (Εικ. 10). Η αντίστοιχη ενεργοποίηση της wild-type hGDH1 από την L-λευκίνης ήταν περίπου 75%. Η προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων ADP (0.025-0.1 mM) στις οποίες μόνο του το ADP ελάχιστα ενεργοποιούσε το ένζυμο (<10 % της μεγίστης δραστηριότητας, ευαισθητοποιούσε το μεταλλαγμένο ένζυμο στην δράση της λευκίνης. Η L-λευκίνη προκαλούσε, παρουσία σταθερής ποσότητας ADP, μία εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση ενεργοποίηση της Arg443Ser μεταλλαγμένης GDH, η οποία ήταν αναλογικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της wild-type hGDH1. Υπό αυτές τις συνθήκες, η L-λευκίνη ήταν ικανή να προκαλέσει μέγιστη ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου ενζύμου (αύξηση της δραστηριότητας του κατά >2000%) (Εικ. 10).



**Εικ. 9 Επίδραση του pH στη βασική ειδική δραστηριότητα (απουσία αλλοστερικών τροποποιητών) της καθαρτισμένης ανασυνδυασμένης Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 (R443S mutant) και της wild-type hGDH1 (wt *GLUD1*-derived GDH).** Οι μετρήσεις έγιναν στη φορά αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM TRA ρυθμιστικό διάλυμα με τιμές pH 8.0, 7.5 ή 7.0. \* =  $p < 0.01$  σε σύγκριση με τη δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 σε pH 8.0. Η τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή  $\pm$  βασικών σφάλμα μέσου όρου (τυπικό σφάλμα εκτίμησης) (SE) (ράβδοι) από τουλάχιστον 4 πειραματικούς προσδιορισμούς. Τα δεδομένα προέρχονται από τον πίνακα II του άρθρου των Zaganas και συν (2002) και το σχήμα αναδημοσιεύεται από το άρθρο των Mastorodemos και συν., (2005)

Η μελέτη των καμπυλών ενεργοποίησης από ADP (στη φορά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.0) αποκάλυψε ότι το μεταλλαγμένο ένζυμο ήταν πολύ λιγότερο ευαίσθητο στο ADP από ότι η wild-type hGDH1 (Εικ. 11). Σε 0.1mM ADP (συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει μία σχεδόν μέγιστη ενεργοποίηση της wild-type hGDH1) η δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 παρέμενε στο 13 % περίπου της αντίστοιχης της hGDH1. Μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις (έως 1mM ADP) προκαλούσαν την πλήρη ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου ισοενζύμου. Για το λόγο τούτο η μέγιστη ειδική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν παρόμοια της φυσιολογικής hGDH1 (130.5  $\mu\text{moles}$  οξειδούμενου NADPH  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης). Η τιμή ADP όμως

που αντιπροσωπεύει το 50 % της μεγίστης ( $SC_{50} = 383.9 \pm 14.6 \mu\text{M}$ ) ήταν σχεδόν δεκαπλάσια της wild -type hGDH1 ( $SC_{50} = 31.7 \pm 4.2 \mu\text{M}$ ).



**Εικ. 10** Καμπύλες αλλοστερικής ρύθμισης της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine παρουσία ADP. Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (0, 25, 50, 100, και 250  $\mu\text{M}$ ), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 6 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση ειδική δραστηριότητα από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8. Τα δεδομένα προέρχονται το άρθρο των Zaganas και συν (2002) και το σχήμα αναδημοσιεύεται από το άρθρο των Mastorodemos και συν., (2005)

Επιπλέον οι καμπύλες ενεργοποίησης έδειξαν πως η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ήταν πιο ευαίσθητη στο ADP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών από το διάλυμα της τριαιθανολαμίνης ιδίως σε pH 8.0 και 7.5. Αντιθέτως η wild-type hGDH1 ήταν ήταν πιο ευαίσθητη στο ADP σε ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθανολαμίνης παρά σε διάλυμα φωσφορικών (Zaganas και συν., 2002). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα οι  $SC_{50}$  της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και στα pH που μελετήθηκαν να είναι 2-3 υψηλότερες των αντίστοιχων της wild -type hGDH1. Ως προς την αναστολή από GTP, παρουσία 1mM ADP, σε αδρά κυταρικά εκχυλίσματα η  $IC_{50}$  ( $\pm$  S.E.M) της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν  $16.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$  GTP παρόμοια με αυτή της wild-type hGDH1 ( $IC_{50} = 12.2 \pm 0.5$ ) (Εικ. 12). Η μελέτη των καμπυλών

αναστολής από GTP στο καθαρισμένο Arg443Ser μεταλλαγμένο ένζυμο επιβεβαίωσε τα ευρήματα στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Τέλος η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη στη θερμική αδρανοποίηση στους 47.5°C σε 100 mM phosphate buffer, pH 6.8 (χρόνος ημίσειας ζωής=5 min) από την wild-type hGDH2 (χρόνος ημίσειας ζωής=38 min) και φυσικά τη θερμοσταθερή wild-type hGDH1 (χρόνος ημίσειας ζωής=348 min) (Kanavouras και συν., 2007).

#### Η Gly456 είναι απαραίτητη για την αναστολή από το GTP

Μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα απουσία αλλοστερικών τροποποιητών έδειξαν πως η αντικατάσταση της Gly456 από Ala προκάλεσε άρση της αναστολής στο μεταλλαγμένο ένζυμο από το GTP ( $IC_{50}=2.80\pm 0.15 \mu\text{M}$ ) σε σύγκριση με την wild-type hGDH1 ( $IC_{50}=0.19\pm 0.01 \mu\text{M}$ ). Η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP ήταν περίπου 15 φορές μεγαλύτερη εν σχέσει με την wild-type *GLUD1* GDH. Τα αποτελέσματα αναπαρήχθησαν και σε παρουσία ADP (0.1 και 1.0 mM, τελική συγκέντρωση). Ιδιαίτερα σε συνθήκες μέγιστης ενεργοποίησης η καμπύλη αναστολής της Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 προσέγγιζε την καμπύλη αναστολής της wild-type hGDH2 (Εικ. 12). Η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε ( $\mu\text{M}$  GTP) σε 1mM ADP της wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και της της Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν  $12.2\pm 0.5$ ,  $203.9\pm 16.2$  και  $79.6\pm 3.7$  αντίστοιχα. Δεν διαπιστώθηκε μεταβολή στον τρόπο ενεργοποίησης της μεταλλαγμένης GDH από ADP (Εικ. 11). Η  $SC_{50}$  ( $\pm$  SE) σε  $\mu\text{M}$  ADP για την Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 ( $25.42 \pm 2.6 \mu\text{M}$ ) προσέγγιζε την  $SC_{50}$  για την wild-type *GLUD1* προερχόμενη GDH ( $24.27 \pm 4.12 \mu\text{M}$ ).

Στα καθαρισμένα ένζυμα η ειδική δραστηριότητα (μετρημένη σε συγκέντρωση 8.0 mM α-κετογλουταρικό και 1mM ADP) της Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 ( $133.97 \mu\text{mol}$  οξειδούμενου NADPH/  $\text{min}^{-1}$ / mg πρωτεΐνης $^{-1}$ ) ήταν συγκρίσιμη με αυτή της ανασυνδυασμένης wild-type hGDH1 ( $130.50 \mu\text{mol}$  οξειδούμενου NADPH/  $\text{min}^{-1}$ / mg πρωτεΐνης $^{-1}$ ). Μελέτες αναστολής από GTP επιβεβαίωσαν τα δεδομένα από μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, καθώς η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε  $\mu\text{M}$  GTP σε παρουσία 1mM ADP ήταν για την Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 ( $IC_{50} = 121.35 \pm 14.89$ ) ενώ για την wild-type hGDH1 ήταν  $IC_{50} = 12.95 \pm 0.46 \mu\text{M}$ . Η μεταλλαγή Gly456Ala προκάλεσε την απώλεια της συνεργατικής συμπεριφορά των υπομονάδων του ενζύμου στην αναστολή από το GTP. Η τιμή του συντελεστή Hill ( $\pm$  SE) για τη Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 ήταν  $0.99 \pm 0.07$  ( $<1$ ) τιμή ενδεικτική μη συνεργατικής συμπεριφορά σε αντίθεση με την

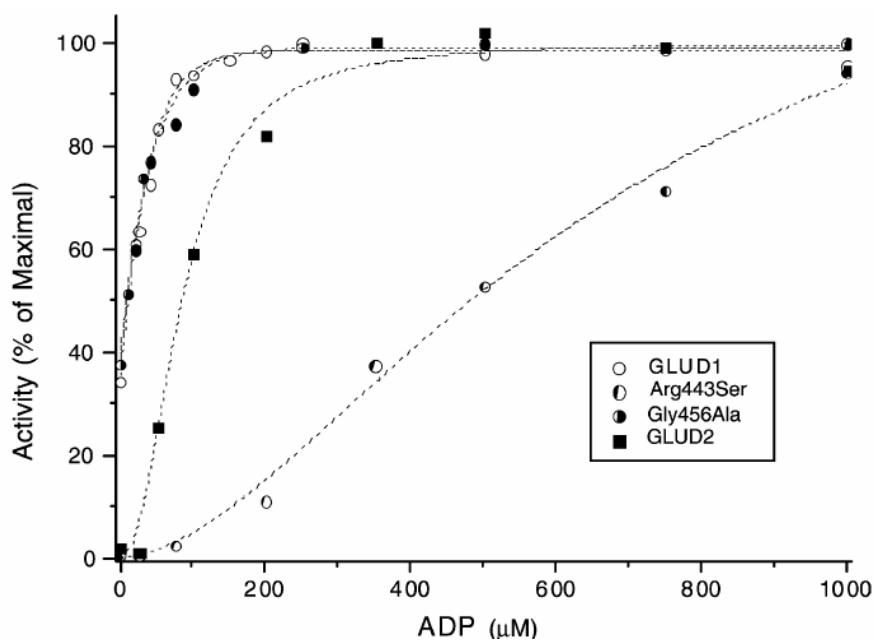
τιμή του συντελεστή Hill ( $\pm$  SE) για την καθαρισμένη ανασυνδυασμένη wild-type hGDH1 (HC =  $2.15 \pm 0.16$ ). Ομοίως η ενεργοποίηση της Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 από το ADP ήταν συγκρίσιμη της wild type hGDH1 (Zaganas και Plaitakis, 2002).

Κινητικές ιδιότητες των καθαρισμένων μεταλλαγμένων ισοενζύμων και της φυσιολογικών ανθρώπινων GDH

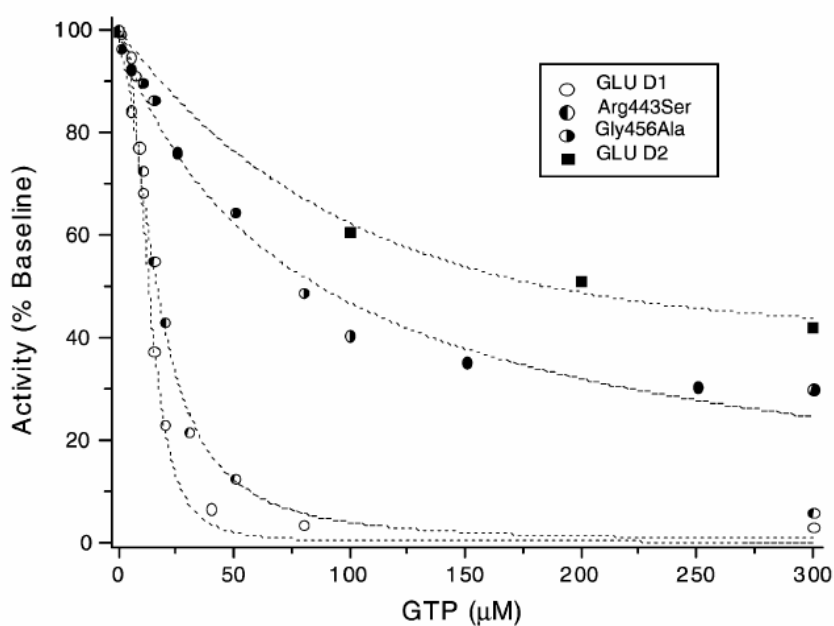
Κινητικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι μέγιστες ταχύτητες ( $V_{max}$ ) των τεσσάρων καθαρισμένων GDH (wild type hGDH1, ηπατική wild type hGDH1, Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 και Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1) ήταν παρόμοιες (Πίνακας 4), δείχνοντας ότι οι δύο αυτές μεταλλάξεις (Arg443Ser και Gly456Ala) δεν επηρεάζουν τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου. Επίσης οι τιμές των  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό και το NADPH (Ζαγανάς ΔΔ, 2005) στην περίπτωση των δύο μεταλλαγμένων ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες τιμές για τα φυσιολογικές ισομορφές (Πίνακας 4).

**Πίνακας.4. Κινητικές ιδιότητες των καθαρισμένων ενζύμων παρουσία 1mM ADP (αναδημοσιεύεται από Ζαγανάς ΔΔ, 2005).**

	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}^* \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$ )	$\alpha$ -κετογλουταρικό $K_m$		
		No ADP	0.25mM ADP	1mM ADP
<b>Arg443Ser hGDH1</b>	136.67	-	-	1.61 $\pm$ 0.39
<b>Gly456Ala hGDH1</b>	158.71	1.38 $\pm$ 0.48	1.27 $\pm$ 0.32	-
<b>wild-type hGDH1</b>	152.95	1.39 $\pm$ 0.26	1.44 $\pm$ 0.40	1.58 $\pm$ 0.44
<b>Ηπατική hGDH1</b>	137.05	1.26 $\pm$ 0.25	1.28 $\pm$ 0.15	1.51 $\pm$ 0.27



**Εικ. 11. Καμπύλες ενεργοποίησης από το ADP των wild type hGDH1, wild type hGDH2, Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 και Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH (% της μέγιστης δηλαδή παρουσία 1mM ADP) μετρήθηκε στην πορεία της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8, παρουσία αυξανομένων συγκεντρώσεων ADP, σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Αναδημοσιεύεται από Plaitakis και συν., 2003.**



**Εικ. 12 Καμπύλες αναστολής από το GTP των wild type hGDH1, wild type hGDH2, Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 και Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1. Κάθε σημείο**

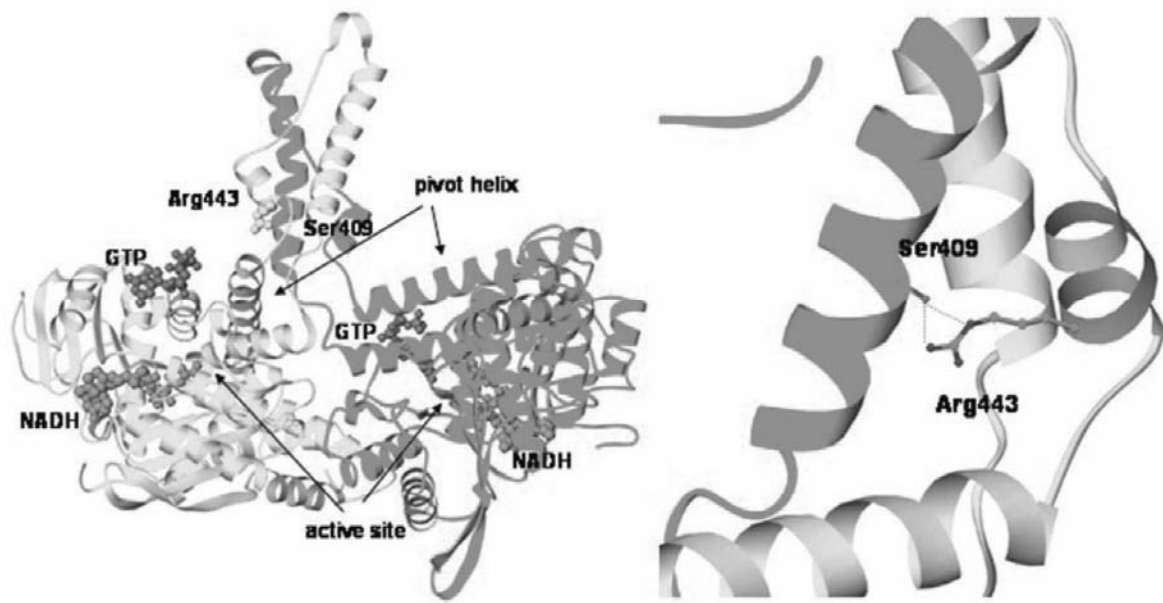
αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζεται το ποσοστό % της δραστηριότητας που μετράται χωρίς προσθήκη GTP. Η δραστηριότητα της GDH (σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα) μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8, παρουσία 1mM ADP και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις GTP. Οι ισοπρωτεΐνες Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 και wild type hGDH2 είναι ανθεκτικά στην αναστολή από συγκεντρώσεις GTP που καθιστούν πρακτικά ανενεργά τα άλλα δύο ισοένζυμα (την wild type hGDH1 και την Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1). Αναδημοσιεύεται από Plaitakis και συν., 2003.

### Δομική Ανάλυση

Από τις δομικές μελέτες της βόειας GDH (Peterson and Smith, 1999; Smith και συν., 2001) και της wild type hGDH1 (Smith και συν., 2002) φαίνεται πως η Arg443 είναι τμήμα της κατιούσης α-έλικας στην περιοχή της κεραίας (antenna), κοντά στη συμβολή της με την περιστρεφόμενη έλικα (pinot helix). Η τελευταία περιστρέφεται κατά τη διάρκεια της κίνησης της περιοχής πρόσδεσης του NAD<sup>+</sup>, το οποίο συμβαίνει κατά την πρόσδεση του υποστρώματος (γλουταμικού ή α-κετογλουταρικού). Με αυτόν τον τρόπο ανοίγει και κλείνει η σχισμή του καταλυτικού κέντρου. Δομική προσομοίωση της εισαγωγής της πλευρικής αλυσίδας της Ser443 υποδηλώνει ότι αυτή η αμινοξική αλλαγή μπορεί να καταστρέφει δυνητικούς υδρογονικούς δεσμούς που υπάρχουν μεταξύ της Arg443 μίας υπομονάδος με την Ser409 (ανήκει στην ανιούσα έλικα της αντένας) μίας γειτονικής υπομονάδας με αποτέλεσμα να κλείνει η σχισμή του καταλυτικού κέντρου (Εικ. 13).

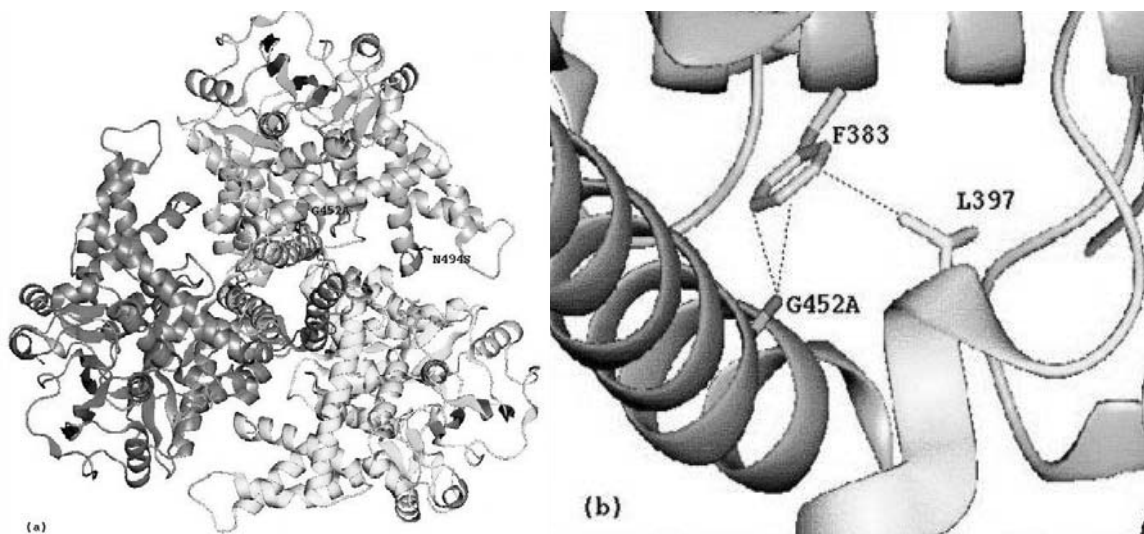
Από την άλλη μεριά η Gly456 εντοπίζεται στην αρχή της περιστρεφόμενης έλικας στη βάση μίας πυκνά δομημένης περιοχής του ενζύμου που χαρακτηρίζεται ως μεντεσές (“hinge region”), καθώς αλληλοδιαπλέκονται πολλά κατάλοιπα με τις πλευρικές αλυσίδες τους, αλλοστερικοί τροποποιητές και υποστρώματα.. Δομική προσομοίωση της εισαγωγής της πλευρικής αλυσίδας της μεθυλικής ομάδας της Ala456 υποδεικνύει πως η πλευρική αλυσίδα μπορεί να έρχεται σε στερικό παρεμπόδιση (steric clash) με την πλευρική αλυσίδα της Phe387. Η απόσταση μεταξύ Ala456 (452 στη βόειο) και Phe387 (383 στη βόειο) υπολογίστηκε στα ~2.8 Angstroms στην απομορφή του ανθρώπινου ενζύμου (PDB:1LIF, Εικ. 14), ενώ μόλις 2.52 Angstrom στη βόειο μορφή σε σύμπλοκο με GTP, NADH και γλουταμικό (PDB:1HWX) (Ζαγανάς ΔΔ, 2005). Ο στερικός παρεμπόδιση μπορεί να επηρεάσει την διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδας της Phe387 και με τη σειρά της να επηρεάσει την πλευρική αλυσίδα της Leu401 παρακείμενης

υπομονάδας. Κατ' αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται αφενός η σύνδεση του GTP κι αφετέρου η δυνατότητα της αντέννα να διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση των υπομονάδων με αποτέλεσμα να χάνεται η συνεργατικότητα που χαρακτηρίζει τη σύνδεση του GTP με την wild type hGDH1.



**Εικ. 13. Διάγραμμα δομής του βόειας GDH (PDB entry 1HWZ) σε σύμπλοκο με το GTP (γκρί) και το NADH(πορτοκαλί). Αριστερή εικόνα:** απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg443 και Ser409. Για λόγους ευκρίνειας μόνο 2 υπομονάδες απεικονίζονται. **Δεξιά εικόνα.** Μεγεθυμένη άποψη της αλληλεπίδρασης της Arg-443 της κατιούσης έλικας με την Ser-409 της ανιούσης έλικας της αντέννα παρακείμενης υπομονάδας. Οι στικτές γραμμές υποδηλώνουν δυνητικούς δεσμούς υδρογόνου (H-bonds). Η αρίθμηση αφορά την ανθρώπινη GDH. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα RIBBONS (Carson, 1997) από τον καθ. κ. Καρούζα Μ. Αναδημοσίευση από το Zaganas και συν., (2002).





Εικ. 14. Δομή της απομορφής της ανθρώπινης GDH (PDB:1LIF). **a:** Διάγραμμα ενός τριμερούς από το ομοεξαμερές της GDH βασισμένο στις κρυσταλογραφικές μελέτες της βόειας GDH (Petersen και συν., 1999) δείχνοντας το συνδεδεμένο GTP (πράσινο) τις 2 μεταλλάξεις (κόκκινο). Ακολουθείται η αρίθμηση για τη βόειο GDH, ενώ με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι τρεις υπομονάδες. (πράσινο, μπλε, κίτρινο). **b:** Μεγεθυμένη άποψη της αλληλεπίδρασης G452A (αντιστοιχεί με την G456A στην wild type hGDH1) με τις F383 (αντιστοιχεί στην F387 στην wild type hGDH1) και L397 (αντιστοιχεί στην wild type hGDH1 στην L401). Οι στικτές γραμμές υποδηλώνουν πιθανούς στερεοταξικούς παρεμποδισμούς (steric clashes). Η εικόνα δημιουργήθηκε από τον καθ. κ. Καρπούζα Μ. Αναδημοσίευση από το Zaganas και Plaitakis, (2002).



## ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Από την έως τώρα ανάλυση αναδείχθηκε ο εξέχων ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) στην κυτταρική οικονομία των θηλαστικών και ιδιαίτερος στον άνθρωπο στο μεταβολισμό του L-γλουταμικού οξέος. Η προσπάθεια πολλών ερευνητών κατάφερε να μας αποκαλύψει πτυχές της λειτουργίας του ενζύμου (δομή-μηχανισμός αντίδρασης, έκφραση στο ήπαρ/εγκέφαλο θηλαστικών, λειτουργικά χαρακτηριστικά). Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριο Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, οδήγησαν στην παραγωγή ανασυνδυασμένων GDH ισοπρωτεϊνών, με την έκφραση των κλωνοποιημένων *GLUD1* και *GLUD2* cDNAs σε κύτταρα από το έντομο *Spodoptera frugiperda* (Sf9 η Sf21) χρησιμοποιώντας το σύστημα έκφρασης του baculovirus. Ενζυμικές αναλύσεις των εκφραζόμενων πρωτεϊνών αποκάλυψαν ότι τα δύο ισοένζυμα παρουσιάζουν μεγάλες λειτουργικές διαφορές στην θερμοκή αδρανοποίηση, στη βασική δραστηριότητα και στην απόκριση στην επίδραση των αλλοστερικών τροποποιητών (GTP, ADP, L-λευκίνη).

Το πρόβλημα ρύθμισης της wild type hGDH2 προσεγγίστηκε με μεταλλαξιγένεση σε θέσεις στις οποίες διαφέρουν τα δύο ισοένζυμα (Ζαγανάς ΔΔ, 2005). Βρέθηκε πως μόνο δύο αντικαταστάσεις αμινοξέων ευθύνονται για ορισμένες διαφορές μεταξύ των wild type hGDH1 και wild type hGDH2. Η αντικατάσταση της Gly 456 από Ala προσδίδει ανθεκτικότητα στο GTP. Η δεύτερη αντικατάσταση (Arg443 από Ser) ελαχιστοποιεί την βασική δραστηριότητα (~3% της μεγίστης) αλλά επιτρέπει την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου με ADP. Επιπλέον αποτρέπει την ενεργοποίηση από τη λευκίνη αλλά παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP (0.025-0.1 mM) στις οποίες μόνο του το ADP ελάχιστα ενεργοποιεί το ένζυμο (<10 % της μεγίστης δραστηριότητας), παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας έως και >2,000 %. Τέλος η Arg443 φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για την ευαισθησία στη θερμοκή αδρανοποίηση της wild type hGDH2 (Yang και συν., 2004). Η Arg443 βρίσκεται στην μικρή έλικα της κατερχόμενης αλυσίδας της antenna και συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με τη Ser 409 της ανερχόμενης α-έλικας της antenna γειτονικής υπομονάδας (Zaganas και συν., 2002) (Εικόνα 13). Θεωρείται πως η απώλεια της επικοινωνίας αυτής είναι υπεύθυνη για τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1. **Το ερώτημα που προκύπτει εάν η υπόθεση αυτή ευσταθεί είναι αν η αντικατάσταση της Ser409 με άλλο αμινοξύ (όπως Arg,**

**Asp, ή Leu) που να διασπά τον δεσμό αυτό θα οδηγούσε σε παρόμοιες λειτουργικές αλλαγές.**

Οι ανωτέρω δύο μεταλλάξεις δεν εξηγούν όλες τις ιδιότητες της wild type hGDH2. Ιδιαίτερα η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1, ακόμη και σε ιδιότητες που προσομοιάζει της wild type hGDH2 (θερμοαστάθεια, χαμηλή βασική δραστηριότητα, τρόπος ενεργοποίηση από λευκίνη ή/και ADP), παρουσιάζει διακριτές διαφορές. *Πρώτον*, η βασική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 (2.6 % της μεγίστης) είναι περίπου ~50 % της wild type hGDH2 (5% της μεγίστης), *δεύτερον* η wild type hGDH2 είναι πιο ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από το ADP ( $SC_{50} = 58.6 \pm 2.4 \mu M$ ) από την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ( $SC_{50} = 383.9 \pm 14.6 \mu M$ ) *τρίτον*, ενώ η L- λευκίνη μόνη δεν ενεργοποιεί την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1, ενεργοποιεί την wild type hGDH2 έως και 1,600% (Plaitakis et al., 2000) και τέταρτον η θερμική αδρανοποίηση εμφανίζεται πολύ νωρίτερα στην Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 (χρόνος ημίσειας ζωής=5 min) από την wild-type hGDH2 (χρόνος ημίσειας ζωής=38 min) (Kananouras και συν., 2007) Επιπλέον σε αντίθεση με την wild-type hGDH2 η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 αναστέλλεται από το GTP, ιδιότητα που είναι η μόνη κοινή μεταξύ wild-type hGDH2 και Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1.

**Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν οι ιδιότητες της wild-type hGDH2 οφείλονται στη συνδυασμένη παρουσία και των δύο αλλαγών (Arg443Ser και Gly456Ala) στο μόριο της πρωτεΐνης. Εάν η υπόθεση είναι ορθή, η παραγωγή μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 πρωτεΐνης θα πρέπει να αναπαράγει όλες τις ιδιότητες της wild-type hGDH2.**

Το ζήτημα της υποκυτταρικής εντόπισης της GDH είναι από αυτά που διαφορετικοί ερευνητές έχουν καταλήξει σε ποικίλα και εν πολλοίς αντιφατικά συμπεράσματα. Μελέτες στις δεκαετίες του 1950 και 1960 έδειξαν εντόπιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης στα μιτοχόνδρια (Hogeboom and Schneider, 1953; Schmidt and Schmidt 1963; Salganicoff and DeRobertis 1965; Fahien και συν., 1969). Γι' αυτό το λόγο άλλωστε σε παλαιότερες μελέτες εντοπισμού χρησιμοποιήθηκε η GDH ως μιτοχονδριακός δείκτης ((Walter και Anabitarte, 1971). Όμως νεότερες μελέτες κατέδειξαν την ύπαρξη 2 ισομορφών με διαφορετικές φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες (Colon και συν., 1986; Cho και συν., 1995; Rajas και συν., 1996; Lee και συν., 1999), γεγονός που επιβεβαίωσε η ανεύρεση από τους (Mavrothalassitis και συν., 1988 & Shashidharan και συν., 1994) 2 γενετικών τόπων

που κωδικοποιούν τα δυο γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* της ανθρώπινης GDH. Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες η μία ισομορφή χαρακτηρίζονταν ως εύκολα διαλυτοποιούμενη (soluble) και εντοπιζόταν στα μιτοχόνδρια, ενώ η δεύτερη ισομορφή ήταν συνδεδεμένη σε μεμβράνες (membrane bound) και εντοπιζόταν στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Lee και συν., 1999) ή στα λυσοσώματα (Rajas και συν., 1996) ή σε κυτταροπλασματικές μεμβράνες/κυστίδια (Colon και συν., 1986; Aoki και συν., 1987; Veuthey και συν., 1994; Werner και συν., 2001). Ορισμένοι δε ερευνητές (Prisco and Casola 1975; McDaniel 1995) έδειξαν πως υφίσταται και πυρηνικό κλάσμα. Εκτενέστερη αναφορά γίνεται στο σχετικό κεφάλαιο της εισαγωγής όπου και παραπέμπεται ο αναγνώστης. Η οριστική απάντηση στο ζήτημα της υποκυτταρικής εντόπισης της GDH, κατά πρώτον βέβαια της wild-type hGDH1, είναι σημαντική διότι εάν εντοπίζεται και εκτός μιτοχονδρίου, τούτο μπορεί να σημαίνει και διαφορετικό λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο πλην του μεταβολισμού του γλουταμικού, όπως υπονοούν κάποιοι ερευνητές (Preiss και συν., 1993; Rajas και συν., 1996) Επιπλέον επί τη βάσει της ύπαρξης 2 λειτουργικών πρωτεϊνών είναι ασαφές, αν τα δύο ισοένζυμα συμπεριφέρονται το ίδιο στο θέμα της υποκυτταρικής εντόπισης, αφού εμφανίζουν διαφορετικές αλλοστερικές και φυσικοχημικές ιδιότητες.

**Συνεπώς το τρίτο ερώτημα της διατριβής αφορά στην διευκρίνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των ισοενζύμων της γλουταμινικής αφυδρογονάσης (GDH) wild-type hGDH1 και wild-type hGDH2, και ειδικότερα εάν εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που θα συμβάλλει στην κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας τους.**

#### Σύνοψη σκοπών μελέτης

- ❖ Για να απαντηθεί το **1<sup>ο</sup> ερώτημα** εάν για τις ιδιότητες της *Arg443Ser* μεταλλαγμένης *hGDH1* (συνεπώς και τις προσομοιάζουσες ιδιότητες της *wild type hGDH2*) οφείλεται η απώλεια δεσμού *H* μεταξύ *Arg443* και *Ser409* σκοπεύουμε να αντικαταστήσουμε την *Ser409* της *GLUD1* με *Arg* και *Asp* (Σκοπός 1).
- ❖ Για να απαντηθεί το **2<sup>ο</sup> ερώτημα** εάν οι δύο μεταλλαγές *Arg443Ser* και *Gly456Ala* αναπαράγουν πιστά τις ιδιότητες της *wild type hGDH2* σχεδιάζουμε να παράγουμε την διπλά μεταλλαγμένη *R443S/G456A hGDH1* (Σκοπός 2).

- ❖ Τέλος προκειμένου να απαντήσουμε στο **3<sup>ο</sup> ερώτημα** της υποκυτταρικής εντόπισης των ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης (*GDH*) *hGDH1* & *hGDH2* σχεδιάζουμε
- ✚ Εισαγωγή του *GLUD1* cDNA και του *GLUD2* cDNA στο φορέα *pEGFP-N3*, συνδιαμόλυνση διαφόρων κυτταρικών σειρών (COS 7, CHO, HEK293, HELA και κύτταρα νευροβλαστώματος) με *pEGFP-N3-GLUD1* ή *pEGFP-N3-GLUD2* και *pDsRed2-mito* και λήψη εικόνων με το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. **Στόχος είναι να απαντηθεί το ερώτημα εάν η *hGDH1* & *hGDH2* εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια (συνεντοπισμός με μιτοχονδριακό δείκτη *pDsRed2-mito*, Σκοπός 3α).**
- ✚ Συνδιαμόλυνση διαφόρων κυτταρικών (COS 7, CHO, HEK293, HELA και κύτταρα νευροβλαστώματος) με *pEGFP-N3-GLUD1* ή *pEGFP-N3-GLUD2* και ενός πυρηνικού δείκτη του *pDsRed2-Nuc* και λήψη εικόνων με το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. **Στόχος να διερευνηθεί η πιθανότητα εντοπισμού των *hGDH1* & *hGDH2* στον πυρήνα (συνεντοπισμός με *pDsRed2-Nuc*, Σκοπός 3β).**
- ✚ Συνδιαμόλυνση διαφόρων κυτταρικών σειρών (COS 7, CHO, HEK293, HELA και κύτταρα νευροβλαστώματος) με *pEGFP-N3-GLUD1* ή *pEGFP-N3-GLUD2* και ενός δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου *pDsRed2-ER* (και λήψη εικόνων με το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. **Στόχος να διερευνηθεί η πιθανότητα εντοπισμού των *hGDH1* & *hGDH2* στο ενδοπλασματικό δίκτυο (συνεντοπισμός με *pDsRed2-ER*, Σκοπός 3γ).**

Όσον αφορά στη μεθοδολογία, θα κάνουμε χρήση της ειδικής ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεσης για να δημιουργήσουμε τόσο τα απλά μεταλλαγμένα (single mutants) όσο και το διπλά μεταλλαγμένο (double mutant) *GLUD1* c-DNA. Αφού τα εισάγουμε στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (*pVL1393*), θα επιβεβαιώσουμε πρώτα την ορθότητα της μεταλλαγής και τον ορθό προσανατολισμό τους στον φορέα υποκλωνοποίησης μέσω μετασχηματισμού JM109 *E. Coli* βακτηρίων, καλλιέργειας, απομόνωσης του DNA και αλληλούχισης διπλής κατεύθυνσης. Έπειτα θα συνδιαμολύνουμε κύτταρα Sf21 από το έντομο *Spodoptera frugiperda* με τροποποιημένο baculovirus και το καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA (φορέας *pVL1393*

περιέχων το μεταλλαγμένο *GLUD1* cDNA ένθεμα), ώστε να εκφράσουμε την μεταλλαγμένη\_hGDH1 πρωτεΐνη που επιθυμούμε. Δεν αναμένεται να προκύψει ιδιαίτερο πρόβλημα στην εφαρμογή της ανωτέρω διαδικασίας πλην του φόρτου εργασίας που προκύπτει από τα πολλαπλά βήματα μεταλλαξιγένεσης και επιβεβαίωσης τους. Εναλλακτικώς εάν προκύψουν αξεπέραστα προβλήματα θα μπορούσαμε με κατάλληλα σχεδιασμένη πέψη της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ή της Gly456Ala μεταλλαγμένης hGDH1 (με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού) και μετέπειτα συγκόλληση (ligation) να δημιουργήσουμε τη διπλά μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.

Σε ότι αφορά στη μεθοδολογία που θα χρησιμοποιήσουμε στις μελέτες υποκυτταρικής εντόπισης της GDH, η ανακάλυψη των φθορίζουσών πρωτεϊνών έδωσε νέα ώθηση στις μελέτες υποκυτταρικής εντόπισης και κινητικότητας (trafficking) των πρωτεϊνών όπως και των αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες. Ειδικότερα η σήμανση με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP) έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες υποκυτταρικού συνεντοπισμού, καθώς πολλά γονίδια έχουν συνδεθεί στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό άκρο της GFP (Tavare και συν., 2001, Flach και συν., 1994; Wang & Hazelrigg, 1994; P van Roessel και A.H. Brand, 2002). Η GFP έχει απομονωθεί από τη μέδουσα (jellyfish) *Aequorea victoria* και εκφραζόμενη είτε σε προκαρυωτικά είτε σε ευκαρυωτικά κύτταρα εκπέμπει πράσινο φθορισμό, όταν διεγερθεί με μπλε ή υπεριώδες φως. Όταν η GFP συντήκεται (fused) στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό άκρο της με την υπό μελέτη πρωτεΐνη, η νεοσχηματισμένη χμιαϊκή πρωτεΐνη διατηρεί τα βιολογικά χαρακτηριστικά και την ίδια υποκυτταρική εντόπιση με την αρχική (native) πρωτεΐνη. Επιπλέον παραμένει ο πράσινος φθορισμός της GFP (Marshall et al. 1995). Αυτή η ιδιότητα είναι ανεξάρτητη είδους και δεν χρειάζεται συν-παράγοντες, υποστρώματα ή άλλα προϊόντα γονιδίων. Τούτο το γεγονός καθιστά την GFP πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης πρωτεϊνών με επιπρόσθετο πλεονέκτημα πως η ανίχνευση μπορεί να γίνει είτε σε ζωντανούς ιστούς ή κύτταρα είτε σε μονιμοποιημένα παρασκευάσματα.

Θα χρησιμοποιήσουμε το πλασμίδιο *pEGFP-N3*, έναν φορέα έκφρασης που εκφράζει μια μεταλλαγμένη μορφή της GFP, η οποία έχει τροποποιηθεί για λαμπερότερο φθορισμό και μεγαλύτερη έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στο αμινοτελικό άκρο του GFP γονιδίου θα εισαγάγουμε το cDNA της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (*GLUD1* ή *GLUD2*), γεγονός που επιτρέπει στη χμιαϊκή πρωτεΐνη να

διατηρεί την ιδιότητα του φθορισμού, άρα και να είναι δυνατή η υποκυττάρια εντόπιση *in vitro*.

Ως μιτοχονδριακό δείκτη θα χρησιμοποιήσουμε τον φορέα έκφρασης *pDsRed2-mito* οποίος εκφράζει μια χμιαϊκή πρωτεΐνη η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp. Red fluorescent protein (DsRed2)* και μίας αλληλουχίας από την υπομονάδα VIII της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεΐνης cytochrome c oxidase (Mito).

Ως δείκτη για το ενδοπλασματικό δίκτυο θα χρησιμοποιήσουμε τον *pDsRed2-ER*, έναν φορέα έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χμιαϊκή πρωτεΐνη, η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση α) της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp. Red fluorescent protein (DsRed2)* β) της καθοδηγητικής προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) αλληλουχίας της πρωτεΐνης calreticulin (στο 5' άκρο της DsRed2), και γ) του σήματος συγκράτησης στο ER (ER retention signal) KDEL.

Ως δείκτη για τον πυρήνα θα χρησιμοποιήσουμε τον *pDsRed2-Nuc* έναν φορέα έκφρασης κατάλληλο για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χμιαϊκή πρωτεΐνη, η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp. Red fluorescent protein (DsRed2)* και του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal) του simian virus 40 large T-antigen. Το σήμα αυτό καθοδηγεί την πρωτεΐνη DsRed2 στον πυρήνα του ξενιστή.

Και οι τέσσερις φορείς έκφρασης περιέχουν ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Κατά συνέπεια στο θρεπτικό υλικό στο οποίο θα αναπτύσσονται οι κυτταρικές σειρές με τους φορείς έκφρασης, θα έχει προστεθεί καναμυκίνη, ώστε να αναπτυχθούν μόνο οι συγκεκριμένοι φορείς έκφρασης.

Εναλλακτικά θα μπορούσαμε μετά τη συν-διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών με τα χμιαϊκά πλασμίδια *GLUD1-EGFP-N3* (ή *GLUD2 pEGFP-N3*) και τους ανωτέρω αναφερόμενους υποκυτταρικούς δείκτες να ομογενοποιήσουμε και λύσουμε τα κύτταρα με διαφορετική κλασματική φυγοκέντρηση, ώστε να απομονώσουμε κυτταρικά εκχυλίσματα από διαφορετικά οργάνωλλια του κυττάρου (μιτοχόνδρια, μικροσώματα, πυρήνας). Στη συνέχεια είτε με ανοσοαποτύπωση (Western blot) είτε με διπλές ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της GDH, έναντι της GFP και έναντι των *pDsRed2-ER*, *pDsRed2-mito* και *pDsRed2-Nuc* (υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα), θα ελέγχαμε κατά πόσον εντοπίζεται το χμιαϊκό μας πλασμίδιο στο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Οι εικόνες θα



λαμβάνονταν και θα αναλύονταν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Για επιβεβαίωση της «καθαρότητας» των υποκυτταρικών κλασμάτων θα διενεργούσαμε επιπλέον πειράματα διαμόλυνσης και ανοσοαποτύπωσης (Western blot) χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες τα πλασμίδια pDsRed2-ER, pDsRed2-mito και pDsRed2-Nuc και συγκεκριμένα ένζυμα που είναι γνωστό πως εκφράζονται στα συγκεκριμένα κυτταρικά οργάνυλλα (π.χ. σουκινική δεϋδρογενάση στα μιτοχόνδρια).



## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### ΥΛΙΚΑ

Τα κύτταρα Sf21 και οι φορείς έκφρασης pVL 1393 και pVL 1392 αγοράστηκαν από την Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Το θρεπτικό υλικό για τα ευκαρυωτικά και τα Sf21 κύτταρα και ο βόειος εμβρυικός ορός (fetal bovine serum, FBS) αποκτήθηκαν από τη Gibco-BRL (Gibco, Grand Island, NY) και τη Life Technologies αντίστοιχα. Τα *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells και οι μεταφορείς γενετικού υλικού (baculovirus expression vectors) αποκτήθηκαν από τη Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Το Gene Editor Mutagenesis system αποκτήθηκε από τη Promega (Madison, WI, USA), ενώ ο τροποποιημένος baculovirus (BaculoGold) από τη BD Pharmigen (San Diego, CA, USA). Τα NADPH, ADP, GTP (άλας λιθίου), αγοράστηκαν από τη Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany) ενώ το α-κετογλουταρικό, η παραφορμαλδεΰδη (PFA) και η L-Leucine από τη Sigma (St Louis, MO, U.S.A.). Το Phosphate Buffered Saline (PBS) αγοράστηκε από την VWR International (Dorset UK) και το Mowiol 4-88 από τη Calbiochem (Merck KGaA Biosciences, Darmstadt, Germany). Η Phenylsepharose High Performance αγοράστηκε από την Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) και ο Hydroxyapatite Bio-Gel HT από τη Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Οι εκκινητές αγοράστηκαν από τη MWG-Biotech και οι ενδονουκλεάσες περιορισμού αγοράστηκαν από τη New England Biolabs Inc (Ipswich, MA, USA). Οι φορείς έκφρασης *pEGFP-N3*, *pDsRed2-Mito*, *pDsRed2-ER* and *pDsRed2-Nuclei* αγοράστηκαν από τη BD Biosciences Clontech (Franklin Lakes, NJ USA 07417). Τα Chamber slides αγοράστηκαν από την Nalge Nunc International (Rochester, NY). Η απομόνωση των προϊόντων PCR από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με το QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Η σύνδεση στους φορείς EGFP-N3 και pVL1393 πραγματοποιήθηκε με την Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Epicentre, Madison Wisconsin). Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με την Concert Rapid PCR (Gibco, Grand Island, NY) ή/και Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Το μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό anti-GFP αποκτήθηκε από τη Zymed Laboratories (San Fransisco, CA) και το πολυκλωνικό αντίσωμα από λαγό anti GDH αποκτήθηκε από την Biodesign International (Saco, ME).

## **ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini-prep) (μέθοδος αλκαλικής λύσης, Sambrook και συν, 1989).**

1. Φυγοκέντρηση (12000g, 3min) περίπου 1.5ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων σε LB.
2. Αναρρόφηση και απόρριψη υπερκειμένου.
3. Επαναδιάλυση πελέτας σε 100μL παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης miniprep (Διάλυμα I). Επώαση 5min σε RT.
4. Προσθήκη 200μL φρέσκου διαλύματος περιέχοντος 0.2M NaOH, 1% SDS (Διάλυμα II) για λύση των βακτηρίων. Επώαση σε πάγο για 5min.
5. Προσθήκη 150μL παγωμένου 3M οξικού καλίου pH 4.8 (Διάλυμα III) για εξουδετέρωση. Ανάμειξη και επώαση σε πάγο (5min).
6. Φυγοκέντρηση (12000g, 10 min).
7. Μεταφορά ,προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφορμίου.
8. Φυγοκέντρηση, προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου.
9. Φυγοκέντρηση, προσθήκη αιθανόλης.
10. Επώαση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
11. Φυγοκέντρηση, πλύσιμο πελέτας με 70% αιθανόλη.
12. Διάλυση σε TE ή H<sub>2</sub>O.

**Παραλλαγή πρωτοκόλλου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (miniprep) (από το φυλλάδιο οδηγιών του Gene Editor Mutagenesis system της Promega )**

1. Μετάγγιση 1.3 ml από την 12ωρη mini καλλιέργεια σε ένα Eppendorf. Φυγοκεντρείς στα 12000g για 3min, πετάς σε χλωρίνη το υπερκείμενο, προσθέτεις και επαναλαμβάνεις την διαδικασία. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση με το ρύγχος μίας πιπέτας, αφήνοντας την βακτηριακή πελέτα όσο πιο στεγνή γίνεται.
2. Επαναδιάλυση της πελέτας με vortexing σε 100μL παγωμένου Solution I Επώαση για 5min σε RT.
3. Προσθήκη 200μL φρέσκου διαλύματος περιέχοντος 0.2M NaOH, 1% SDS για να λυθούν τα κύτταρα. Ανάμειξη με αναποδογύρισμα 4-5 φορές. OXI VORTEX. Επώαση σε πάγο για 5min.

4. Προσθήκη 150μl παγωμένο 3M potassium acetate (pH 4.8) για εξουδετέρωση. Ανακατεύουμε με αναποδογύρισμα του tube μερικές φορές (για 10sec). Επώαση για 5min σε πάγο.
5. Φυγοκέντρηση, 12000g, 6 min.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube, αποφεύγοντας το λευκό ίζημα.
7. Προσθήκη 1 όγκου (περίπου 400-450λ) TE saturated phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) και ανακατεύουμε με αναποδογύρισμα για 2min. Φυγοκέντρηση, 12000g, 6 min.
8. Μεταφορά του υπερκείμενου (υδατικής φάσης) σε νέο tube. Προσθήκη 1 όγκου (περίπου 400λ) chloroform:isoamylalcohol (24:1) και ανακατεύουμε με αναποδογύρισμα για 2min. Ανακατεύουμε με αναποδογύρισμα για 2min. Φυγοκέντρηση 12000g, 6 min.
9. Μεταφορά του υπερκείμενου (υδατικής φάσης) σε νέο tube. Προσθήκη 2.5 όγκων (περίπου 800λ) 100% αιθανόλης. Ανάμιξη και αφήνουμε να καθιζήσει για 10min στους -70°C.
10. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 10min. Αφαίρεση του υπερκείμενου αναποδογυρίζοντας το tube και προσθέτουμε 300λ παγωμένη 70% αιθανόλη (δεν ανακατεύουμε). Φυγοκέντρηση σε 12000g για 10min. Πετάμε το υπερκείμενο με ένα tip και αφήνουμε να στεγνώσει η πελέτα για 20-30 min στο hood.
11. Διάλυση πελέτας σε 30μl nanopure H<sub>2</sub>O ή TE. Προσθήκη 2μl RNase (10μg/μl).

#### **Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi-prep)**

1. Από το τρυβλίο επιλέγουμε έναν κλώνο και ενοφθαλμίζουμε σε φλάσκα με περίπου 50ml LB-ampicillin. Επώαζουμε στους 37°C O/N με ανάδευση.
2. Μεταφορά 0,5ml της καλλιέργειας σε σωληνάριο και προσθήκη 0,5ml γλυκερόλης 30%. Αποθήκευση στους -80°C.
3. Μεταφορά σε Falcon των 50ml και φυγοκεντρούμε για 10min στους 4°C.
4. Επαναδιάλυση πελέτας σε 2ml διάλυμα I, όπου έχουμε προσθέσει λυσοζύμη για τελική συγκέντρωση 5mg/ml.
5. Προσθήκη 4ml διάλυμα II (0.2 NaOH, 1% SDS), το οποίο μόλις έχουμε παρασκευάσει.
6. Προσθήκη 3ml διάλυμα III και ανακατεύουμε καλά.

7. Φυγοκέντρηση για 15min (5000 στροφές, 4<sup>0</sup>C).
8. Μεταφορά υπερκείμενου σε άλλο Falcon και προσθήκη ίσης ποσότητας (όση η υδατική φάση, τόσο και η οργανική) μείγματος φαινόλης-χλωροφορμίου(αναλογίας 5050).Ανακατεύουμε για 5min.Φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές για 5min.Μεταφορά υπερκείμενου σε άλλο Falcon και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου.Ανακάτεμα για 3min.Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5min.
9. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 15 ml(SARSTEDT).
10. Προσθήκη 0.6 όγκων ισοπροπανόλης και επώαση σε RT για 1h.
11. Ισοζυγισμός και φυγοκέντρηση στις (10.000 στροφές,10min,16<sup>0</sup>C).
12. Επαναδιάλυση pellet σε 250μl TE και μεταφορά σε σωληνάρια του 1,5ml.
13. Προσθήκη 100μl 10M Οξεικό Αμμώνιο και αφήνουμε για 10min σε πάγο. Φυγοκέντρηση σε 13000 rpm, 10min, 4<sup>0</sup>C.
14. Μεταφορά υπερκείμενου σε άλλα σωληνάρια του 1.5 ml και προσθήκη 800μl. Αιθανόλης.Φυγοκέντρηση σε 13000rpm,10min και επαναδιάλυση σε 100l TE.
15. Προσθήκη RNase I σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml.Επιάζουμε στους 37<sup>0</sup>C για 10min.
16. Προσθήκη 100μl από διάλυμα 1.6M NaCl, 13% PEG 8000 και αφήνουμε σε πάγο για 30min.
17. Φυγοκέντρηση για 20min σε 13000rpm, 4<sup>0</sup> C και ξέπλυμα την πελέτα με 70% αιθανόλη.Φυγοκεντρούμε για λίγο (2-5min). Επαναδιάλυση σε 200μl TE.
18. Επανάληψη διαδικασίας καθαρισμού με φαινόλη και χλωροφόρμιο,όπως στο 10.
19. Καθίζηση σε 1/10 όγκου 3 M οξικό νάτριο και διπλάσιο όγκο αιθανόλης. Ξέπλυμα πελέτας με 70% αιθανόλη και στέγνωμα.Επαναδιάλυση σε 100μl TE.

#### **Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών σε μετασηματισμό(Competent Bacteria)**

1. Ξύσιμο με αποστειρωμένο ρύγχος την επιφάνεια της αποθηκευμένης στους – 80<sup>0</sup>C καλλιέργειας και ενοφθαλμίζουμε σε τρυβλίο petri με LB-agar-αντιβιοτικό επιλογής. Επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 12-14 ώρες (overnight, o/n)

2. Σε 125ml LB σε αποστειρωμένη φιάσκα 2LT ενοφθαλμίζουμε 1 αποικία στους 37<sup>0</sup>C με ανάδευση.
3. Στις 2h έλεγχος της OD<sub>550</sub> και εφεξής ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μόλις η OD<sub>550</sub> γίνει 0.37-0.40 τοποθέτηση σε πάγο.
4. Μεταφορά της καλλιέργειας σε 50ml Falcon σωληνάρια (από 30ml 4 σωληνάρια) και φυγοκέντρηση για 10 min (4<sup>0</sup>C ,3000 στροφές).
5. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση πελέτας σε 40ml Transformation Buffer (TrB), το οποίο προστίθεται με πιπέτα σιγά-σιγά (10ml σε καθένα από τα 4 σωληνάρια).Ανάμιξη ελαφρώς με αργές κινήσεις και μεταφορά ώστε τελικά 2 σωληνάρια. Επώαση σε πάγο για 10min.
6. Φυγοκέντρηση για 10min (4<sup>0</sup>C,3000 στροφές).Απόρριψη υπερκειμένου. Επώαση σε πάγο για 10min.
7. Επαναδιάλυση σε 10ml TrB+ 700μL DMSO, προσθέτοντας σταγόνα-σταγόνα. Ελαφρό ανακάτεμα και μοιρασμα σε σωληνάρια του 1.5ml (π.χ. από 200μL.)
8. Διατήρηση στους -80<sup>0</sup>C.

### **Μετασχηματισμός Βακτηρίων (Transformation)**

1. Τοποθέτηση των τρυβλίων με το LB-άγαρ και το αντιβιοτικό επιλογής στον επωαστήρα στους 37<sup>0</sup>C για να ξεϊδρώσουν. Τοποθέτηση 17 × 100mm polypropylene Falcon σωληνάρια των 15ml στον πάγο.
2. Μεταφορά των επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηρίωνα από τους -70<sup>0</sup>C σε πάγο για 5min ή μέχρι να ξεπαγώσουν.
3. Μεταφορά 100μL από τα ξεπαγωμένα κύτταρα σε καθένα από τα προπαγωμένα Falcon σωληνάρια.
4. Προσθήκη 10pg έως 10ng πλασμιδιακό DNA σε κάθε 100μl από τα επιδεκτικά προς μετασχηματισμό κύτταρα.
5. Αμέσως τοποθέτηση σε πάγο για 30min.
6. Heat-shock στα κύτταρα για 45-50 sec σε υδατόλουτρο ακριβώς στους 42<sup>0</sup>C χωρίς κούνημα.
7. Αμέσως μεταφορά σε πάγο για 2min.
8. Προσθήκη 900μl SOC θερμοκρασίας δωματίου σε κάθε σωληνάριο Falcon και επώαση για 60min στους 37<sup>0</sup>C με κούνημα(περίπου 225 rpm).

9. Άπλωμα 50-300μl σε LB-agar τρυβλία με αντιβιοτικό και επωάζουμε στους 37°C για 12-14 ώρες.

### **Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πήκτωμα Αγαρόζης**

1. Για κατασκευή δυο μικρών πήκτωμάτων αγαρόζης 1%, ζυγίζουμε 0.5gr αγαρόζη σε φλάσκα 250ml και προσθέτουμε 50ml TBE 1X. Αφήνουμε στο φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά ακριβώς μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
2. Τοποθετούμε τα τζαμακία και τα χτενάκια στο καλούπι τους .
3. Αφήνουμε περίπου 5min το διάλυμα της αγαρόζης στο πάγκο να κρυώσει χωρίς να πήξει. Προσθέτουμε 2.5 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
4. Χύνουμε το διάλυμα στα καλούπια και αφήνουμε στο πάγκο για 1h περίπου να πήξει.
5. Αφαιρούμε προσεκτικά το πήκτωμα από το καλούπι, το τοποθετούμε μέσα στην δεξαμενή ηλεκτροφόρησης και βγάζουμε το χτενάκι.
6. Φορτώνουμε τα δείγματα (στα οποία έχουμε προσθέσει διάλυμα φόρτωσης) και ηλεκτροφορούμε στα 100Volts.

### **Πέψη RNA πριν την αλληλούχιση**

1. Ανάμιξη 15λ του DNA σε νερό από το miniprep με 35λ TE 1X (συνολικός όγκος 50λ). Προσθήκη 3λ RNAase (10mg/ml) και, προαιρετικά, 1λ T1 RNAase (500.000U/ml). Επώαση για 90min στους 37°C.
2. Προσθήκη 1/2 όγκου (25-26λ) 7.5M Ammonium acetate, pH 7.4. Φυγοκέντρηση 12,000g (15min) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σειρά σωληναρίων.
3. Προσθήκη ίσους όγκους (75λ) ισοπροπυλική αλκοόλη ή διπλάσιους όγκους (150λ) απόλυτη αιθανόλη, καλή ανάμιξη καλά και φυγοκέντρηση X12,000g (15min).
4. Πλύση της πελέτας με 500λ παγωμένη 70% αιθανόλη. Φυγοκέντρηση 12,000g (10min), ξήρανση στο κενό και διάλυση σε 20-25λ H<sub>2</sub>O.

### **Αλληλούχιση Πλασμιδιακού DNA**

1. Για κάθε αντίδραση sequencing προσθήκη των κατωτέρω σε ένα PCR tube:

Ready Reaction Premix

2λ



Big Dye Sequencing Buffer	1λ
Sequencing primer (4 pmol/λ)	1.5λ
Plasmid DNA	2λ
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>2λ</u>
ΣΥΝΟΛΟ	7.5λ

PCR cycling στο πρόγραμμα Big Dye™ στο ABI Cycler (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) ως κατωτέρω

1. 96°C για 60'' αρχική αποδιάταξη
2. 96°C για 10'' αποδιάταξη
3. 50°C για 5'' υβριδοποίηση
4. 60°C για 4' πολυμερισμός

Επανάληψη βημάτων 2-4 X 25 φορές και HOLD στους 4°C

2. Καθαρισμός PCR προϊόντων με αιθανόλη/EDTA

- i) Προσθήκη 5λ 125mM EDTA σε κάθε PCR tube
- ii) Προσθήκη 60λ 100% αιθανόλη ανακατεύοντας με το tip πάνω κάτω αρκετές φορές
- iii) Σε RT για 15min
- iv) Φυγοκέντρηση του plate (με αντίβαρο και κόλλημα με tape στον adapter) για 45min στους 4°C. Προχωράμε αμέσως στο επόμενο βήμα.
- v) Αναποδογυρίζουμε το plate σε χαρτί ώστε να φύγει το περισσότερο υπερκείμενο και κολλάμε ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί εξεταστικής κλίνης (με την πλαστική μεριά προς εμάς) με ζελοτέϊπ στο plate. Κάνουμε φυγοκέντρηση μέχρι να φθάσει στα 185g και σταματάμε την φυγόκεντρο.
- vi) Προσθέτουμε 60λ 70% παγωμένη αιθανόλη σε κάθε πηγαδάκι.
- vii) Φυγοκέντρηση κανονικά σε 1650g, 4°C για 15min.
- viii) Αναποδογυρίζουμε το plate σε χαρτί ώστε να φύγει το περισσότερο υπερκείμενο και κολλάμε ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί εξεταστικής κλίνης (με την πλαστική μεριά προς εμάς) με ζελοτέϊπ στο plate. Κάνουμε φυγοκέντρηση πάλι μέχρι να φθάσει στα 185g, το αφήνουμε στα 185g για 10 δευτερόλεπτα και σταματάμε την φυγόκεντρο.
- ix) Για αποθήκευση κλείνουμε σε αλουμινόχαρτο και φυλάμε στους 4°C.

Διαλύουμε τα δείγματα σε 20λ φορμαμίδη. Αποδιάταξη στους 94<sup>0</sup>C για 2min.  
Φόρτωση των δειγμάτων στο ABI3100.

### **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου(SDS-PAGE) για προσδιορισμό μεγέθους και καθαρότητας**

Η κινητικότητα ενός μορίου μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο του. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, η προσθήκη του απορρυπαντικού SDS, οδηγεί στο να προσδένονται οι πρωτεΐνες σε αυτό με μια σταθερή αναλογία (1.4gr SDS ανά gr πρωτεΐνης). Παράλληλα, το αρνητικό φορτίο του SDS υπερνικά κατά πολύ το φορτίο της πρωτεΐνης και το σχήμα των διάφορων πρωτεϊνών γίνεται ομοιόμορφο. Συνεπώς η κινητικότητα μιας πρωτεΐνης σε ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS είναι ανάλογη μόνο του μοριακού βάρους της. Αυτό βεβαίως με τη προϋπόθεση ότι έχει προστεθεί κάποιος αναγωγικός παράγοντας, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη ή η διθειοθρεϊτόλη (DTT), για να σπάσουν οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Το διάλυμα των πρωτεϊνών αναμειγνύεται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (2X Sample buffer, SDS reducing buffer) ή εναλλακτικώς 1:4 του διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών (5X). Το 2X διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών αποτελείται από 2% SDS, 20% glycerol, 20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 160 mM dithiothreitol (DTT) και 0.1 mg/ml bromphenol blue dye. Ακολουθώς το μίγμα θερμαίνεται στους 100<sup>0</sup>C επί 3 min (για αποδιάταξη των πρωτεϊνών) και φορτώνεται σε πήκτωμα SDS πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα αυτό αποτελείται από ένα πήκτωμα συμπύκνωσης (συγκέντρωσης 4%, stacking gel) πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) του οποίου η συγκέντρωση εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να δούμε (μια συνηθισμένη συγκέντρωση είναι 8-12 %, στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε δ/μα 8.5 %). Το πήκτωμα συμπύκνωσης χρησιμεύει για την ταυτόχρονη είσοδο όλων των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρικό πεδίο με διαφορά δυναμικού περίπου 50 Volt για 30min και ~155V για 55min.

### **Χρώση πρωτεϊνών μετά από SDS-PAGE**

Για να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρηση, αυτό εμβαπτίζεται σε 0.025% διάλυμα Coomassie brilliant blue (διάλυμα χρώσης) και στη συνέχεια γίνεται αποχρωματισμός με διάλυμα

αποχρωματισμού. Τόσο το διάλυμα χρώσης όσο και το διάλυμα αποχρωματισμού περιέχουν μεθανόλη (30-45%), H<sub>2</sub>O (45-60 %) και οξικό οξύ (10 %).

### **Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Lowry και συν, 1951)**

Στα αρχικά πειράματα για την μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα δείγματα μας χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο του Lowry, όπως αυτή περιγράφεται στην βιβλιογραφία (Lowry και συν, 1951). Στη συνέχεια, για να απλοποιήσουμε την διαδικασία χρησιμοποιήσαμε το DC Kit (BioRad), το οποίο εφαρμόζει στην ουσία μια παραλλαγή της μεθόδου Lowry.

1. Προετοιμασία standards: Αραιώνουμε το BSA 100X (10μg/λ) 1/10, ώστε τελικά η συγκέντρωση του να είναι 1μg/μl. Σε σωληνάρια του 1.5ml προσθέτουμε 0,2.5,5,10,20,30,40,50μl από το BSA 1μg/μl και συμπληρώνουμε τα ανάλογα μl νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50λ.

2. Προετοιμασία δειγμάτων: Αραιώνουμε τα δείγματα 1/5, 1/10 και 1/20.

3. Προσθήκη 50λ δειγμάτων και standards σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή σωληνάρια των 15ml.

4. Προετοιμασία διαλύματος A' (20λ αντιδραστήριο S για κάθε ml αντιδραστηρίου A).

Παρασκευάζουμε τόση ποσότητα A' (σε ml) όσοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες επί 0.25.

5. Προσθήκη 250μl διαλύματος A' σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Κάνουμε αμέσως vortex μετά από κάθε προσθήκη.

6. Προσθήκη 2.0ml αντιδραστηρίου B σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και vortex αμέσως.

7. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης μετά από 15min στα 750nm.

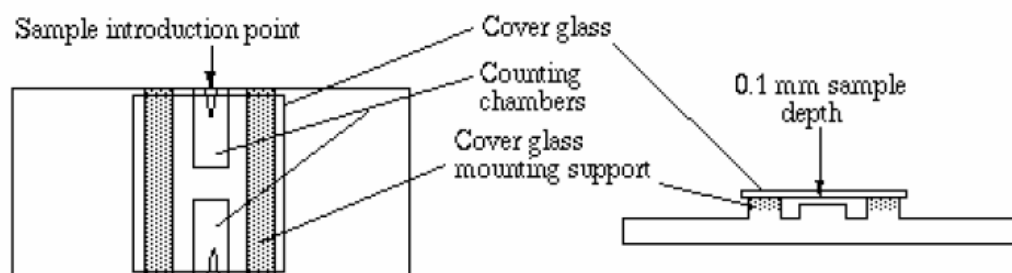
Η απορρόφηση των δειγμάτων θα παραμείνει σταθερή για 1hr τουλάχιστον.

8. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA (πρόγραμμα Origin).

### **Μέτρηση κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο**

- a. Η σαν καθρέπτης επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου και η καλυπτρίδα (διαφορετικού πάχους από αυτές που χρησιμοποιούνται στη συμβατική μικροσκοπία)
- b. καθαρίζονται με 70 % αιθανόλη.
- c. Εφαρμογή της καλυπτρίδα ύπερθεν της της επιφάνειας καταμέτρησης.

- d. Φόρτωση του διαλύματος κυττάρων με Trypan Blue 0.4 % 1:1 (στο σημείο του βέλους στο σχήμα) σε ποσότητα τέτοια ώστε να καλύπτεται η ομοιάζουσα με καθρέπτη επιφάνεια.
- e. Μέτρηση αριθμού κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο σύμφωνα με τον τύπο  
*Κύτταρα ανά ml* = ο αριθμητικός μέσος x παράγοντα διάλυσης (2) x 10<sup>4</sup>



### Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (πρωτόκολλο QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen)

- I. Αφαίρεση της μπάνας DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με καθαρό νυστέρι.  
*Τοποθέτηση σε σωληνάριο Eppendorf (ποσότητα έως 250 mg αγαρόζης).*
- II. Ζύγιση του πηκτώματος με την μπάνα DNA. Προσθήκη 3 όγκων διαλύματος (Buffer) QX1 ανά 1 όγκο του πηκτώματος για DNA τμήματα 100 bp – 4 kb.  
 Άλλως ακολουθούνται τα κάτωθι  
 DNA fragments <100 bp προσθήκη 6 όγκων Buffer QX1  
 DNA fragments >4 kb προσθήκη 3 όγκων Buffer QX1 +2 όγκους H<sub>2</sub>O
- III. Επαναδιάλυση QIAEX II με vortexing για 30 sec. Προσθήκη QIAEX II στο δείγμα σύμφωνα με τον πίνακα.  
 ≤2 μg DNA: Προσθήκη 10 μl QIAEX II  
 2–10 μg DNA: Προσθήκη 30 μl QIAEX II  
*Για κάθε επιπρόσθετα 10 μg DNA προσθήκη επιπλέον 30 μl of QIAEX II*
- IV. Επώαση στους 50°C για 10 min για διαλυτοποίηση της αγαρόζης και σύνδεσης του DNA. Ανάμιξη με vortexing (1,400 g) κάθε 2 min για να είναι πάντα διαλυτό το QIAEX II. Έλεγχος ώστε χρώμα μίγματος να είναι κίτρινο.
- V. Φυγοκέντρηση για 30 sec και απομάκρυνση υπερκειμένου με αναρρόφηση
- VI. Πλύσιμο της πελέτας με 500 μl διαλύματος (Buffer) QX1.  
*Επαναδιάλυση πελέτας με vortexing (1,400 g). Φυγοκέντρηση για 30 sec και απομάκρυνσης ιχνών υπερκειμένου*
- VII. Πλύσιμο της πελέτας δις με 500 μl διαλύματος (Buffer) PE.

Επαναδιάλυση πελέτας με *vortexing* (1,400 g). Φυγοκέντρωση για 30 sec και απομάκρυνσης ιχνών υπερκειμένου (τα διαδοχικά πλυσίματα απομακρύνουν προσμίξεις άλατος)

- VIII. Στέγνωμα στον αέρα της πελέτας για 10–15 min (ή έως ότου ασπρίσει)
- IX. Για την έκλυση του DNA, προσθήκη 20 µl 10 mM Tris·Cl, pH 8.5 σε H<sub>2</sub>O και επαναδιάλυση πελέτας με *vortexing* (1,400 g). Επώαση σύμφωνα με τον πίνακα
- Για DNA fragments ≤4 kb επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min  
DNA fragments 4–10 kb επώαση στους 50°C για 5 min  
DNA fragments >10 kb επώαση στους 50°C για 10 min  
Φύλαξη DNA στους –20°C
- X. Φυγοκέντρωση για 30 sec και μεταφορά υπερκειμένου με πιπέτα σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml.
- XI. Προαιρετικώς: Επανάληψη βημάτων 9 και 10. Συνένωση των δύο εκλουμάτων.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### A. Διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην διάρκεια της μεταλλαξιογένεσης

#### 1. Solution I (από Shambrook και συν ,1989)

50mM glucose

25mM Tris·Cl (pH 8.0)

10mM EDTA (pH 8.0)

Μπορεί να μοιραστεί σε aliquots των 100mL, να αποστειρωθεί με κλιβανισμό και να διατηρηθεί στους 4°C.

#### 2. Solution II (από Shambrook και συν ,1989)

Παρασκευάζουμε φρέσκο κάθε φορά. Τελική συγκέντρωση 0.2N NaOH, 1% SDS

Υλικά	1mL	2mL	3mL	5mL	10mL
H <sub>2</sub> O	930µL	1.860 µL	2.790 µL	4,65mL	9,3mL
NaOH 10N	20 µL	40 µL	60 µL	100 µL	200 µL
SDS 20%	50 µL	100 µL	150 µL	250 µL	500 µL

### **3. Solution III** (από Shambrook και συν ,1989)

5M potassium acetate	60mL
glacial acetic acid	11,5mL
H <sub>2</sub> O	28,5mL

Το διάλυμα που προκύπτει είναι 3M ως προς το potassium και 5M ως προς το acetate.

### **4. 2M ammonium acetate (pH 4.6)**

Διάλυση 15.4g ammonium acetate σε 50ml απιονισμένο νερό και προσαρμογή του pH 4.6 με glacial acetic acid και προσθήκη ποσότητας H<sub>2</sub>O ώστε τελικού όγκος 100ml.

### **5. 2M NaOH, 2mM EDTA**

Φρέσκο σε κάθε χρήση

Ανάμιξη 2ml 10M NaOH με 40μl 500mM EDTA σε 7.96ml απιονισμένο νερό.

### **6. TE 1X buffer (100 ml)**

Ανάμιξη 10mM Tris-HCl (pH 8.0) με  
1mM EDTA

### **7. TE-saturated phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)**

Mix equal parts of TE buffer and phenol and allow the phases to separate. Then mix 1 part of the lower, phenol phase with 1 part of chloroform:isoamyl alcohol (24:1).

### **8. Antibiotic Stock Solution**

Ampicillin 50 mg/ml σε dd H<sub>2</sub>O.

Kanamycin 10 mg/ml σε dd H<sub>2</sub>O.

Gentamicin 7 mg/ml σε dd H<sub>2</sub>O.

Αποστείρωση με φίλτρο (0.2 μm). Φύλαξη στους -20°C σε σκοτεινό περιβάλλον.

### **9. TAE Buffer 50X (Tris-Acetate-EDTA)**

Διάλυση 242gm Tris base, 57.1 ml Acetic acid και 100ml 0.5M EDTA σε ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 1 liter..Προσαρμογή pH στο 8.0.

### **10. TBE Buffer 10X (Tris-Borate-EDTA)**

Διάλυση 108 gm Tris base , 55 gm Boric acid και 9.3 gm Na<sub>4</sub>EDTA σε ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 1 liter. Το pH είναι 8.3 και δεν χρειάζεται προσαρμογή.

### **11. SDS-PAGE (Laemmli)1 Buffer System**

#### **A. Acrylamide/bis (30% T, 2.67% C)**

Διάλυση 87.6 g acrylamide (29.2g/100 ml) και 2.4 g N'N'-bis-methylene-acrylamide (0.8 g/100 ml) σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O (τελικός όγκος 300 ml ). Διήθηση και φύλαξη στους 4 °C σε σκοτεινό περιβάλλον (30 ημέρες maximum).

**B. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8**

Διάλυση 27.23 g Tris base (18.15 g/100 ml) με ~80 ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ρύθμιση σε pH 8.8 με 6N HCl και προσθήκη νερού ως τελικό όγκο 150 ml. Φύλαξη στους 4 °C.

**C. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8**

Διάλυση 6 g Tris base σε ~60 ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Ρύθμιση σε pH 6.8 με 6N HCl και προσθήκη νερού ως τελικό όγκο 100 ml. Φύλαξη στους 4 °C.

**D. 10% SDS**

Διάλυση 10 g SDS σε 90 ml σε dd H<sub>2</sub>O με ήπια ανάδευση ως τελικό όγκο 100 ml

**E. Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (4X Sample buffer, SDS reducing buffer) (φύλαξη σε RT)**

Ανάμιξη 3.8 ml απιονισμένου H<sub>2</sub>O, 1.0 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.8 ml Glycerol 1.6 ml 10% (w/v) SDS, 0.4 ml 2-mercaptoethanol 5% (w/v) 0.4 ml και bromophenol blue.

**F. 5X electrode (Running) buffer, pH 8.3 (enough for 10 runs)**

Ανάμιξη Tris base 9 g (15 g/l), Glycine 43.2 g (72 g/l), SDS 3 g (5 g/l) και απιονισμένο H<sub>2</sub>O ως τελικό όγκο 600 ml.

Φύλαξη στους 4 °C. Να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν τη χρήση.

**G. 10% (w/v) APS (καινούργιο κάθε μέρα)**

Διάλυση 100 mg ammonium persulfate σε 1 ml απιονισμένου H<sub>2</sub>O.

**H. Separating Gel Preparation - 0.375 M Tris, pH 8.8**

	12 %	7.5 %	8.5 %
H <sub>2</sub> O	3.35 ml	4.85 ml	4.55 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% (w/v) SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide 30%/0.8% w/v)	4.0 ml	2.5 ml	2.83 ml
10% (w/v) APS	0.05 ml	0.05 ml	0.1 ml
TEMED	5 μl	5 μl	10 μl
TOTAL MONOMER	10 ml	10 ml	10 ml

**I. Stacking Gel Preparation - 4.0% gel, 0.125 M Tris, pH 6.8**

H <sub>2</sub> O	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
10% (w/v) SDS	100 μl
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	1.33 ml
10% (w/v) APS	50 μl (.05%)
TEMED	10 μl (0.1%)
TOTAL STOCK MONOMER	10l

## **B. Διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών σε προκαρυωτικά κύτταρα (E. Coli)**

### **1. LB (Luria-Bertani) medium**

Ανάμιξη των κάτωθι υλικών

Υλικά	500mL	1.000mL
H <sub>2</sub> O	450mL	900mL
Bacto-tryptone	5gr	10gr
Bacto yeast extract	2,5gr	5gr
NaCl	5gr	10gr
H <sub>2</sub> O	έως συμπλήρωσης 500mL	έως συμπλήρωσης 1Lt

- i. Ανακίνηση μέχρι να διαλυθούν (κλείνουμε με parafilm τον ογκομετρικό σωλήνα). Ρυθμίζουμε το pH στο 7.0-7.05 με 1N NaOH
- ii. Για παρασκευή τρυβλίων με άγαρ στο μπουκάλι προσθήκη επιπλέον 12gr agar ανά Lt LB (Shambrook και συν ,1989: 15gr).
- iii. Μεταφορά σε μπουκάλι και αποστείρωση στους 121 C για 35min
- iv. Βγάζουμε από τον κλίβανο και αφήνουμε το διάλυμα να φθάσει στους 55<sup>0</sup>C (κατά προτίμηση σε υδατόλουτρο), πριν προσθέσουμε αντιβιοτικά (αμπικιλίνη 50-100 μg/ml, καναμυκίνη 10-20 μg/ml). Αφήνουμε να κρυώσει και φυλάμε καλά κλειστό στους 4<sup>0</sup>C.
- v. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος με το άγαρ φθάσει στους 55<sup>0</sup>C προσθήκη αντιβιοτικού και μετάγγιση περίπου 25-30mL σε 10cm petris με φλόγα. Αφήνουμε ανοιχτά πάνω στον πάγκο γύρω από το ανοιχτό γκαζάκι μέχρι να στερεοποιηθούν και να κρυώσουν καλά. Φύλαξη στους 4<sup>0</sup>C.

### **1<sup>α</sup>. Παραλλαγή LB (Luria-Bertani) medium (1L) (συνταγή GENE EDITOR)**

Ανάμιξη 10g Bacto®-tryptone, 5g Bacto®-yeast extract και 5g NaCl.

Ρυθμίζουμε το pH στο 7.5 με NaOH

Κλιβανισμός

### **2. SOC Medium (100mL)**

Προσθήκη 2.0gr Bacto-tryptone, 0.5gr yeast extract, 1mL 1M NaCl (5.8 gr σε 100mL) και 0.25mL 1M KCl (7.46gr σε 100mL) σε 97mL απιονισμένο νερό και ανακατεύουμε για να διαλυθούν. Κλιβανισμός (121<sup>0</sup>C, 35min) και αφήνουμε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1mL 1M MgCl<sub>2</sub> (filter sterilized),



1mL 1M MgSO<sub>4</sub> (filter sterilized) και 2mL 1M glucose (filter sterilized) σε αποστειρωμένες συνθήκες. Προαιρετικώς, μπορούμε να περάσουμε όλο το θρεπτικό υλικό από ένα 0.2μm φίλτρο σύριγγας. Το pH θα πρέπει να είναι 7.0. (πρωτόκολλο Gene Editor Mutagenesis system της Promega)

## **C. Διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών**

### **1. Παρασκευή θρεπτικού για ευκαρυωτικά κύτταρα (COS-7, HELA, HEK 293)**

1. Απόψυξη FBS/FCS(είναι αποθηκευμένο σε aliquots 50 ml (-30°C).) στο υδατόλουτρο (σε beaker με αποστειρωμένο νερό) στους 37°C
2. Για ποσότητα π. χ. για 500 ml ανάμιξη 450 ml DMEM 1X liquid High Glucose (4500mg/L) with GLUTAMAX I<sup>TM</sup> L-Alanyl-L-Glutamine 862 mg/L), Sodium Pyruvate (110mg/L), Phenol Red (15 mg/L) (GIBCO Cat No:31966-021) (εναλλακτικώς 450 ml DMEM 1X liquid High Glucose (4500mg/L) with L-Glutamine (580 mg/L), Sodium Pyruvate (110mg/L), Phenol Red (15 mg/L) GIBCO Cat No: 41966-029) με 50 ml 10% FBS ή FCS (heat inactivated: 56.5°C for 35min) και 50μl Gentamycin (50 mg/ml) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 μg/ml.
3. Το μίγμα περνάει απο φίλτρο (0.2 μm)

*Παραλλαγή:* Για την κυτταρική σειρά *SH-SY5Y* RPMI (GIBCO), συμπληρωμένο με L-Glutamine (2mM), FBS 10%, Gentamycin 50μg/ ml.

### **2. Διαλύματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων**

*1M CaCl<sub>2</sub>*

1. Διάλυση 54g CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O σε 200ml dd H<sub>2</sub>O (MANIATHΣ)
2. Εναλλακτικώς διάλυση 36g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (MB: 147) σε 200ml dd H<sub>2</sub>O
3. Αποστείρωση περνώντας το από 0.22-μm filter ( εναλλακτικώς 0.45-μm filter)
4. Αποθήκευση στους -20°C

*2X HEPES Buffered Saline (HBS)*

1. Για παρασκευή 100 ml, σε 90ml dd H<sub>2</sub>O διαλύουμε 1.6g NaCl, 0.074g KCl, 0.027g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (εναλλακτικώς εάν δεν υπάρχει άνυδρο 0,0215 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MB: 141,96), 0.2 g dextrose και 1g HEPES (MB: 238,9).
2. Προσαρμογή του pH στο 7.05 με 0.5N NaOH (επιβεβαίωση σε 2 pHmeters)

3. Προσθήκη dd H<sub>2</sub>O ώστε τελικός όγκος 100 ml
4. Αποστείρωση διά 0.22-μm filter στη hood
5. Σε aliquots των 5 ml και αποθήκευση στους -20°C

*1x PBS (phosphate-buffered saline)*

Ανάμιξη σε 800ml distilled H<sub>2</sub>O 8g of NaCl, 0.2g of KCl, 1.44g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Προσαρμογή του pH στο 7.4. Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως τελικού όγκου 1 liter, Αποστείρωση με κλιβανισμό.

### **3. Διαλύματα μονιμοποίησης ευκαρυωτικών κυττάρων**

*Παραφορμαλδεύδη 4 %*

1. Για παρασκευή 100 ml, σε 80ml dd H<sub>2</sub>O διάλυση 4g PFA (SIGMA P6148 500g) και
2. 10ml PBS 10X.
3. Θέρμανση (60-65°C) και ανάδευση στη hood έως να διαλυθεί η σκόνη.
4. Ρύθμιση pH: 7.4-7.5 με προσθήκη 10N NaOH (με pHμετρικό χαρτί και όχι στο πεχάμετρο)
5. Αποστείρωση διά 0.22-μm filter στη hood
6. Μοίρασμα σε falcon 50ml
7. Αποθήκευση στους -20 °C

#### Χρήση

Χρησιμοποιείται έως μία εβδομάδα μετά την ημερομηνία απόψυξη, γράφουμε Φύλαξη στους 4°C σε σκοτεινό περιβάλλον

*Διάλυμα στήριξης (Mounting solution) MOWIOL 4-88*

1. Ανάμιξη 2,4 gr MOWIOL 4-88, 6 g GLYCEROL και 6ml H<sub>2</sub>O σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για αρκετές ώρες έως να διαλυθούν τα υλικά.
2. Προσθήκη 12 ml TrisHCl 0,2M pH : 8.5.
3. Θέρμανση στους 50 °C και ανάμιξη για 10 min.
4. Φυγοκέντρηση 15min 2200rpm.
5. Αποθήκευση στους -20 °C.

### **D. Διαλύματα κυτταροκαλλιέργειών σε ευκαρυωτικά κύτταρα εντόμων (Sf21)**

#### **1. Θρεπτικό υλικό για καλλιέργειες Sf21 κυττάρων (TNM-FH)**

Grace's που περιέχει 3.3gr TC-yeastolate και 3.3gr lactalbumin ανά λίτρο. Επίσης, χρειάζεται 10% FBS. Τελική συγκέντρωση γενταμυκίνης 10μg/ml.

Άρα σε 500ml Grace's προσθέτουμε 10ml 50X yeastolate, 10ml 50X lactalbumin, 55ml FBS και 550μl από το stock γενταμυκίνης που είναι 10mg/ml.

Περνάμε από φίλτρο 0.2μm και αποθηκεύουμε σε αποστειρωμένο δοχείο

### 2. Διάλυμα συντήρησης παγωμένων Sf21 κυττάρων

6. Παρασκευή διαλύματος 60 % TNM-FH (χωρίς αντιβιοτικό), 30 % FBS, 10 % DMSO. Αποστείρωση με 0.22-μm filter στη hood. Αποθήκευση στους -20 °C.

### 3. Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης Sf21 κυττάρων

	50ml	Final Concentration
<b>PMSF 100mM (MW 174.2)</b> 17mg σε 1ml dd H <sub>2</sub> O	50 μl	0.1 mM
<b>Triton X-100 (10%)</b> 5ml Triton X-100 (100%) σε 45ml dd H <sub>2</sub> O	5 ml	1%
<b>TrisHCl 1M (pH 7.4)</b> Παίρνουμε TrisHCl 1M και φτιάχνουμε το pH του στο 7.4	2.5 ml	0.05M
<b>NaCl (MW 58.44)</b>	1.461gr	0.5M
dd H <sub>2</sub> O	To final volume 50ml	-

### 4. Διαλύματα ενζυμικής ανάλυσης

#### Triethanolamine Buffer

	Τελική συγκέντρωση	100 ml	200 ml	500 ml
Triethanolamine HCl (MW 185.7)	50mM	0.9285	1.857	4.642
EDTA (Disodium Dihydrate MW 372.2)	2.6 mM	0.0967	0.19	0.483

pH στο 8.00 με NaOH ή HCl

**NADPH 10mM Tetrasodium salt (MW 833)**

Παρασκευάζουμε καινούργιο για κάθε ημέρα ενζυμικής ανάλυσης διαλύοντας 0.008gr σε 1ml dd H<sub>2</sub>O. Φωτομετρούμε ώστε τα 10λ να έχουν απορρόφηση περίπου 0.6 (αν όχι 0.6 προσθέτουμε νερό ή σκόνη NADPH για να το κάνουμε 0.6).

**NADP 140mM**

Παρασκευάζουμε καινούργιο για κάθε ημέρα ενζυμικής ανάλυσης διαλύοντας 0.0275gr σε 250μl dd H<sub>2</sub>O

**GTP 50mM (MW 535)**

Διαλύουμε 0.0134gr σε 0.5ml dd H<sub>2</sub>O

**ADP 100mM (MW 427)**

Διαλύουμε 0.0427 σε 1ml dd H<sub>2</sub>O

 **$\alpha$ -Ketoglutarate 0.4M (MW 226)**

Διαλύουμε 0.904gr σε 10ml dd H<sub>2</sub>O

**L-Glutamate 1M (FW 169)**

Διαλύουμε 1.69gr σε 10mL dd H<sub>2</sub>O

**Leucine 0.1M (FW 131)**

Διαλύουμε 0.131gr σε 10mL dd H<sub>2</sub>O

## ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Οι εκκινητές που δημιουργήθηκαν στην παρούσα διατριβή κατασκευάστηκαν με τη χρήση των διαδικτυακών τόπων Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) και Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). Παραγγέλθηκαν και αποκτήθηκαν από την εταιρεία MWG (Ebersberg, Γερμανία). Οι μεταλλαξιγόνοι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να διαφέρουν από την αλληλουχία του *GLUD1* cDNA κατά 1 ή 2 νουκλεοτίδια, για να αλλάξει η μετάφραση του κωδικίου στο επιθυμητό αμινοξύ (π.χ. η SER409 σε ASP). Οι εκκινητές αλληλούχισης σχεδιάστηκαν ούτως ώστε να καλύπτουν ανά ζεύγη όλο το μήκος του *GLUD1* cDNA και επιπλέον τις περιοχές ενθεσης εκατέρωθεν του πλασμιδιακού φορέα pVL1393.

**Πίνακας 5.** Ονομασία, αλληλουχία και είδος χρήσης εκκινητών της παρούσης διατριβής (χρωματίζεται η τριπλέτα της αμινοξικής αλλαγής)

Όνομα	Αλληλουχία	Χρήση
PHE387TRP	CAG TATCT TAC TGG GAG TGG C TGA AG	Μεταλλαξιογένεση
PHE387ARG	GAC AGTA TCT TAC CGT GAG TGGCT GAA G	Μεταλλαξιογένεση
PHE387ASP	GAC AGT ATC TTA C GAT GAGTG GCT GAA G	Μεταλλαξιογένεση
PHE387GLY	GACA GTA TCT TAC GGT GAG TGG CTG AA G	Μεταλλαξιογένεση
PHE387LEU	GACA GTA TCT TAC CTG GAG TGG CTG AAG	Μεταλλαξιογένεση
LEU401LYS	GTC AGC TAT GGC CGT AAG ACC TTC AAA TAT G	Μεταλλαξιογένεση
LEU401GLU	CAG CTAT GGC CGT GAG ACC TTC AAA TA TG	Μεταλλαξιογένεση
LEU401GLY	GTC AGC TAT GGC CGT GGG ACC TTC AAA TAT G	Μεταλλαξιογένεση
SER409ASP	CAAATATGAAAGG GAT GAT AAC TAC CAC TTG CTG CTCC	Μεταλλαξιογένεση
SER409ARG	TC AAA TAT GAA AGG GAT CGT AAC TAC CAC TTG CTC C	Μεταλλαξιογένεση
SER409LEU	TAT GAA AGG GAT CTT AAC TAC CAC TTG CTC	Μεταλλαξιογένεση
ARG496	GGCAGAGTTCCAAGACAGTATATCGGGT GCATCTGAG	Μεταλλαξιογένεση
GLY509	GACATCGTGCACCTCTGCCTTGGCATACACACAATG	Μεταλλαξιογένεση
K1S	AGT CTG AGA AAG CGC ACCT	Αλληλούχιση
K1AS	ATG GTG AAC CTC CTT GTG AT	Αλληλούχιση
K2S	CA AGT GTG CAG TGG TTG AT	Αλληλούχιση
KSAS	TGA TCT TGG CTT TGA CTC TG	Αλληλούχιση
K3S	ATG AAG GAA GCA TCT TGG AG	Αλληλούχιση
K3AS	TGT CAG GAG AGA AAG GGA TT	Αλληλούχιση
ZAGS	CAG AGT CAA AGC CAA GAT CA	Αλληλούχιση
GLUDEND	ACCGGTGGATCCTCCTCCGCCTCCCATCTTTGTGAA	Αλληλούχιση
GLUD2UTR	CTTCGAATTCAAAGCGCACCTGTTC CGC GAC CGT CA	Αλληλούχιση
POLYFWD	AAATGATAACCATCTCGC	Αλληλούχιση
POLYREV	GTCCAACCTTCCCTG	Αλληλούχιση

## ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

### Σύνοψη

Φωσφορυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν για να μεταλλαχθεί το *GLUDI* cDNA, κλωνοποιημένο στον φορέα pBSKII+, σε συγκεκριμένες θέσεις με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου του συστήματος μεταλλαξιογένεσης Gene Editor Mutagenesis σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Promega, Madison, WI, USA), όπως περιγράφηκε παλαιότερα (Zaganas και Plaitakis, 2002). Τα μεταλλαξιγόνα ολιγονουκλεοτίδια (μήκους 25–30 bp) φωσφορυλιώθηκαν, αποδιατάχθηκαν σε μονή ή διπλή έλικα ταυτόχρονα με την αντίστοιχη περιοχή της μήτρας DNA και προσκολλήθηκαν στο *GLUDI* cDNA (εκμαγείο) με θέρμανση του μίγματος αντίδρασης στους 75°C και σταδιακής ελάττωσης της θερμοκρασίας (1.5 °C/min) ως τους 37°C. Η αντίδραση προσκόλλησης περιείχε εκκινητές (παρέχονταν από τον κατασκευαστή) σχεδιασμένους για να μεταλλάσουν το γονίδιο της β-λακταμάσης στον φορέα pBSKII+. Το πλασμίδιο αντιγράφηκε με την T4 DNA polymerase (οι βρόχοι συγκολλήθηκαν με την T4 DNA ligase) και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους του *Escherichia coli* BMH 71–18 mutS (με σκοπό να εμποδίσει την επιδιόρθωση της νεοσυντεθείσας μεταλλαγμένης διπλής έλικας από το μικρόβιο). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία κατάλληλου μίγματος αντιβιοτικών (παρέχεται από τον κατασκευαστή) ώστε να επιτυγχάνεται η επιλογή των πλασμιδίων που φέρουν το μεταλλαγμένο *GLUDI* cDNA και το μεταλλαγμένο γονίδιο της β-λακταμάσης. Απομονώθηκε πλασμδιακό DNA και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους του *Escherichia coli* JM109. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι με τη επιθυμητή μεταλλαγή με ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού ή/και με αλληλούχιση. Το μεταλλαγμένο *GLUDI* cDNA απομονώθηκε από τον φορέα κλωνοποίησης pBSKII+ με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού *Bam*HI και *Pst*I και συγκολλήθηκε στον συμπληρωματικό φορέα μεταφοράς γενετικού υλικού pVL1393 (Baculovirus Transfer Vector). Τα προϊόντα της τεχνητής σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιήθηκαν στον μετασχηματισμό των κυττάρων του στελέχους JM109 E.Coli. Η σωστή αλληλουχία του μεταλλαγμένου *GLUDI* cDNA και η εισαγωγή στην κατάλληλη θέση του πλασμιδίου επιβεβαιώθηκαν με αμφίδρομο αλληλούχιση καθ' όλο το μήκος του με τη χρήση του γενετικού αναλυτή ABI Prisms 3100, με σκοπό να αποκλειστούν

τυχαίες αλλαγές του *GLUDI* cDNA που πιθανόν προκλήθηκαν στη διάρκεια των ανωτέρω σταδίων μεταλλαξιογένεσης .

Συγκεκριμένα για την δημιουργία της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 χρησιμοποιήσαμε ως μήτρα το μεταλλαγμένο *GLUDI* Gly456Ala cDNA υποκλωνοποιημένο στον φορέα pBSKII+ (Zaganas και Plaitakis, 2002). Χρησιμοποιώντας τις ενδοκλουεάσες περιορισμού *Bam*HI και *Pst*I απομονώθηκε το μεταλλαγμένο ένθεμα *GLUDI* Gly456Ala από τον τροποποιημένο φορέα pBSKII+ καθώς έφερε τη μετάλλαξη στο γονίδιο της αμπικιλίνης και επανασυγκολλήθηκε με T4 DNA ligase σε φυσιολογικό (native) φορέα pBSKII+. Εφεξής ακολουθήθηκε η διαδικασία μεταλλαξιογένεσης ως περιγράφεται αναλυτικά κατωτέρω με μεταλλαξιγόνο εκκινητή που αντί της Arg443 έφερε Ser.

## **Αναλυτικό πρωτόκολλο μεταλλαξιογένεσης**

### **A. Φωσφορυλίωση ολιγονουκλεοτιδίων**

1. Διάλυση των λυοφιλοποιημένων νουκλεοτιδίων της MWG ώστε τελικά το stock να είναι 100pmol/λ.
2. Σε ένα Eppendorf του 0.5ml προσθέτουμε διαδοχικά:

H <sub>2</sub> O	18.5 λ
Μεταλλαξιγόνος Εκκινητής που θα φωσφορυλιωθεί στο 5' (100pmol/λ)	1 λ
Kinase 10X buffer	2.5 λ
T4 Polynucleotide Kinase (10u/λ)	0.5 λ
ATP 10mM	2.5 λ
3. Στους 37<sup>0</sup>C για 30min και στη συνέχεια στους 70<sup>0</sup>C για 10min
4. Αραίωση ώστε τελικά 1.25 pmol/λ. Φύλαξη στους -30<sup>0</sup>C.

### **B. Αλκαλική αποδιάταξη**

1. Σε δύο Eppendorf 1.5ml προσθήκη διαδοχικά:

H <sub>2</sub> O	16.5λ
2M NaOH, 2mM EDTA	2λ
<i>GLUDI</i> cDNA (1400ng/λ)	<u>5λ</u>
ΣΥΝΟΛΟ	20 λ
2. RT, 5 min

3. Προσθήκη 2λ από το 2M Ammonium Acetate (pH=4.6) και 75λ 100% αιθανόλη (4<sup>0</sup>C) και καλή ανάμιξη
4. -70<sup>0</sup>C, 30min
5. Φυγοκέντρωση (13000g, 15min, 4<sup>0</sup>C).
6. Πετάμε το υπερκείμενο με μία πιπέτα και προσθήκη 70% παγωμένη αιθανόλη. Φυγοκέντρωση (13000g, 15min, 4<sup>0</sup>C). Πετάμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε για 15-30 min στο hood.
7. Επαναδιάλυση πελέτας σε 100λ TE (pH=8.0). Τρέχουμε 10λ σε gel αγαρόζης 1.2% για να δούμε την αποδιάταξη και να εκτιμήσουμε στο περίπου την ποσότητα. Τρέξιμο μαζί και 1 και 3λ από το αρχικό (non denaturated DNA) για ποσοτικοποίηση (το οποίο έχουμε αραιώσει 1:10 ώστε 150ng/λ) και για να δούμε αν πράγματι έχει αποδιαταχθεί το DNA. Το αποδιαταγμένο τρέχει πιο γρήγορα από το μη αποδιαταγμένο.

**C. Προσκόλληση φωσφορυλιωμένων μεταλλαξιογόνων ολιγονουκλεοτιδίων στο αποδιαταγμένο *GLUDI* cDNA**

Προσθήκη σε Eppendorf 0.5ml:

Template DNA (dsDNA Alk. Denaturated)	10 λ
Top Strand Selection Oligo (2.9ng/λ, phosph.)	1 λ
Mutagenic oligo 1 (1.25pmol/λ, phosphoryl.)	1 λ
Annealing Buffer (10X)	2 λ
H <sub>2</sub> O	6 λ

Επώση στους 75<sup>0</sup>C για 5min, μειώνεται η θερμοκρασία σιγά σιγά στους 37<sup>0</sup>C (1.5<sup>0</sup>C/min).

**D. Σύνθεση μεταλλαγμένης αλύσου και συγκόλληση**

1. Προσθήκη των παρακάτω (με τη σειρά που αναφέρονται):

H <sub>2</sub> O	5λ
10X Synthesis Buffer	3λ
T4 DNA polymerase	1λ
<u>T4 DNA ligase</u>	<u>1λ</u>
Τελικό σύνολο	30λ

2. Επώση στους 37<sup>0</sup>C για 90min

**E. Μετασηματισμός σε BMH7118mutS κύτταρα**

Μετασηματισμός 2λ από τα 30λ της αντίδρασης σύνθεσης σε BMH71-18mutS κύτταρα (υπάρχουν στους -80<sup>0</sup>C).



1. Απόψυξη των BMH7118mutS από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πάγο για 5min. Μόλις βρεθούν σε υγρή μορφή, μεταφορά 100λ από τα BMH7118mutS στα προπαγωμένα Falcons, προσθήκη 2λ από κάθε αντίδραση μεταλλαξιογένεσης. Ανάδευση κουνώντας το tip μέσα στα κύτταρα ενώ αφήνουμε τα 2λ. και με ελαφρό χτύπημα στα τοιχώματα του Falcon με το δάκτυλό μας.
2. Τοποθέτηση σε πάγο αμέσως για 10min.
3. Επώαση σε υδατόλουτρο στους  $42^{\circ}\text{C}$  ακριβώς για 48sec αποφεύγοντας να κινούνται τα Falcons.
4. Τοποθέτηση σε πάγο για 2min.
5. Προσθήκη 900λ LB χωρίς αντιβιοτικό και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  με ανάδευση για 1 ώρα.
6. Προσθήκη 4ml από το LB με το Gene Editor Antibiotic Selection mix (ώστε 100λ/4ml LB) και ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για  $>18$  ώρες .

#### **F. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την καλλιέργεια των BMH7118S**

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (πρωτόκολλο Miniprep, ώρα ανωτέρω) με περίπου 3ml από τα 5ml της ο/n καλλιέργειας. Αραίωση σε 25λ αποστειρωμένο TE και ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση.

#### **G. Μετασχηματισμός σε JM109 κύτταρα**

Μετασχηματισμός 5-10 ng από το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τα BMH71-18mutS κύτταρα σε JM109 κύτταρα (σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στις βασικές μοριακές τεχνικές) και σπορά σε σε τρυβλία άγαρ με αμπικιλίνη (125  $\mu\text{g/ml}$ ) και Gene Editor Antibiotic Selection mix (7.5 $\mu\text{l/ml}$ ).

#### **H. Απομόνωση DNA από κλώνους JM109 βακτηρίων**

- I. Ενοφθαλμισμός σε περίπου 3ml LB-ampicillin από τις βακτηριακές αποικίες των JM109. Επώαση και ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$  ο/n.
- II. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (πρωτόκολλο Miniprep, ώρα ανωτέρω) από τα 3ml της ο/n καλλιέργειας, αραίωση σε 35λ αποστειρωμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και φωτομέτρηση DNA.
- III. Επιβεβαίωση μετάλλαξης και ορθότητας πλασμιδίου με αλληλούχιση (πρωτόκολλο sequencing) ή χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.
- IV. Εφόσον επιβεβαιωθεί η επιτυχία της μεταλλαξιογένεσης, ενοφθαλμισμός από την αντίστοιχη αποικία για midi-καλλιέργεια 75ml. Επώαση και ανάδευση ο/n στον στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

- V. Φύλαξη 2 Eppendorfs του 1.5ml σαν stock γλυκερόλης στους  $-80^{\circ}\text{C}$  (σε κάθε Eppendorf 0.5 ml αποστειρωμένη γλυκερόλη 30% και 0.5ml από την καλλιέργεια πριν την φυγοκέντρηση). Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (πρωτόκολλο Midiprep όρα ανωτέρω) από τα 75 ml της ο/η καλλιέργειας, αραίωση σε 75λ αποστειρωμένο TE και φωτομέτρηση DNA για ποσοτικοποίηση.
- VI. Επιβεβαίωση μετάλλαξης με αλληλούχιση (πρωτόκολλο sequencing). Επιπλέον διενέργεια ανάλυσης με την περιοριστική ενδονουκλεάση FspI για επιβεβαίωση ορθότητας πλασμιδίου και απουσία μόλυνσης. Οι μπάντες που αναμένονται στο pBSKII+*GLUDI* και σε όλες σχεδόν τις μεταλλάξεις σε pBSKII+ είναι 3200, 1200 και 400 bp περίπου (αλλάζει μόνο στην μετάλλαξη Arg523, οπότε 2 μπάντες: 3600 και 1200 bp περίπου).

**I. Πέψη μεταλλαγμένων pBSKII+*GLUDI* με BamHI, PstI και απομόνωση μεταλλαγμένου ενθέματος από πήκτωμα αγαρόζης. Κόψιμο pVL1393/*GLUDI* με BamHI, PstI και απομόνωση πλασμιδιακού φορέα από πήκτωμα αγαρόζης.**

Πέψη 6-8μg μεταλλαγμένων pBSKII+*GLUDI* από τις midiprep καλλιέργειες με BamHI (20u/λ ) και PstI (20u/λ) παρουσία BamHI (από stock 10x) ρυθμιστικού διαλύματος και BSA 1X. Τρέξιμο σε gel αγαρόζης 1.3% για >1 ώρα. Απομόνωση του ενθέματος (κάτω μπάντα ~1.8 Kb) από το πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση DNA με τη χρήση του Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen).

Πέψη 10-15μg pVL1393/*GLUDI* με BamHI (20u/λ) και PstI (20u/λ) παρουσία BamHI (από stock 10x) ρυθμιστικού διαλύματος και BSA 1X. Τρέξιμο σε gel αγαρόζης 1.3% για >1ώρα. Απομόνωση του φορέα (ανώτερη μπάντα, ~9.6 Kb) από το πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση DNA με τη χρήση του Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen). Μέτρηση συγκέντρωσης απομονωμένου DNA (φορέα pVL1393 και μεταλλαγμένου ενθέματος) σε πήκτωμα αγαρόζης (ποσοτικοποίηση) συγκρίνοντας με γνωστές ποσότητες DNA. Καλό να είναι και τα δύο (φορέας και μεταλλαγμένο ένθεμα) στο ίδιο gel για σύγκριση μεταξύ τους.

**J. Συγκόλληση φορέα pVL1393 και μεταλλαγμένου ενθέματος, μετασηματισμός σε JM109 supercompetent κύτταρα και σπορά σε τρυβλία με LB-agar-ampicillin.**

1. Σε Eppendorf του 0.5ml προσθήκη διαδοχικά για κάθε αντίδραση ligation:
  - i. Fast Link Ligation Buffer 1.5 λ
  - ii. 10mM ATP 1.5 λ
  - iii. pVL1393 φορέας gel isolated (riv:2) ~150ng

iv. μεταλλαγμένο ένθεμα gel isolated	~50ng
v. H <sub>2</sub> O	zλ
vi. <u>Fast Link DNA ligase</u>	1λ
vii. ΣΥΝΟΛΟ	15 λ

Μία μοριακή αναλογία ενθέματος:φορέα είτε 1:3, είτε 1:1 είτε 3:1 πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να βρεθεί η βέλτιστη. Η συνολική ποσότητα DNA υπολογίζεται στα 200 ng για κάθε 10 μl αντίδρασης. Οι ποσότητες ενθέματος και φορέα σε μία αντίδραση σύνδεσης περιγράφονται από τις εξισώσεις

$$i = (si \times t) / [(sv/riv) + si] \text{ και } v = t \times sv / sv + (si \times riv) \text{ όπου}$$

$si$  = μέγεθος ενθέματος

$sv$  = μέγεθος πλασμιδιακού φορέα

$riv$  = μοριακή αναλογία ενθέματος:φορέα

$t$  = ποσότητα συνολικού DNA (ένθεμα + φορέας)

$i$  = ποσότητα ενθέματος για την αντίδρασης DNA σύνδεσης

$v$  = ποσότητα φορέα για την αντίδρασης DNA σύνδεσης

2. Επώαση περίπου 30min στον πάγκο (RT)
3. Τοποθέτηση στους -70<sup>0</sup>C για 15min Spin για λίγο.
4. Έλεγχος αποτελεσματικότητας της αντίδρασης σύνδεσης τρέχοντας 5 λ από τα 15λ σε πήκτωμα TAE-αγαρόζης 1%.
5. Μετασηματισμός 2λ σε Supercompetent JM109 (σύμφωνα με το πρωτόκολλο, ώρα ανωτέρω) και σπορά σε σε τρυβλία άγαρ με αμικικιλίνη. Επώαση overnight στους 37<sup>0</sup>C.
6. Ενοφθαλμισμός σε περίπου 3ml LB-ampicillin από τις βακτηριακές αποικίες των JM109. Επώαση και ανάδευση στους 37<sup>0</sup>C o/n.
7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (πρωτόκολλο Miniprep, ώρα ανωτέρω) από τα 3ml της o/n καλλιέργειας, αραίωση σε 30λ αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O και φωτομέτρηση DNA.
8. Επιβεβαίωση μετάλλαξης και ορθότητας πλασμιδίου με αλληλούχιση (πρωτόκολλο sequencing).
9. Εφόσον επιβεβαιωθεί η επιτυχία της μεταλλαξιογένεσης, ενοφθαλμισμός από την αντίστοιχη αποικία για midi-καλλιέργεια 75ml. Επώαση και ανάδευση o/n στον στους 37<sup>0</sup>C.
10. Φύλαξη 2 Eppendorfs του 1.5ml σαν stock γλυκερόλης στους -80<sup>0</sup>C (σε κάθε Eppendorf 0.5 ml αποστειρωμένη γλυκερόλη 30% και 0.5ml από την

καλλιέργεια πριν την φυγοκέντρηση). Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (πρωτόκολλο Midiprep όρα ανωτέρω) από τα 75 ml της ο/η καλλιέργειας, αραίωση σε 75λ αποστειρωμένο TE και φωτομέτρηση DNA για ποσοτικοποίηση.

11. Επιβεβαίωση μετάλλαξης και αποκλεισμός άλλων μεταλλάξεων με αμφίδρομη αλληλούχιση (πρωτόκολλο sequencing). Επιπλέον διενέργεια ανάλυσης με την περιοριστική ενδονουκλεάση NspI για επιβεβαίωση ορθότητας πλασμιδίου (pVL1393 με το μεταλλαγμένο *GLUDI* cDNA) και απουσία μόλυνσης.

### **Καθαρισμός DNA**

Καθαρισμός περίπου 20μg pVL1393/ μεταλλαγμένο *GLUDI* cDNA με χρήση του Concert Rapid PCR Purification System (Life Technologies) ή Qiaquick PCR (Qiagen Inc., Valencia, CA).

1. Προετοιμασία : Θέρμανση aliquot TE buffer (120λ) στους 70°C. Σε ένα Eppendorf 1.5ml προσθήκη 400μl Binding Solution (H1) και x μl (ώστε τελικά 20μg, όχι παραπάνω γιατί η κολονίτσα δεν κρατάει παραπάνω) από το midiprep DNA του pVL1393/ μεταλλαγμένου *GLUDI* cDNA και καλά ανάμιξη.
2. Φόρτωμα Cartridge: Προσθήκη δείγματος από το βήμα 1 σε ένα spin cartridge προσαρμοσμένο σε ένα 2ml σωληνάριο πλύσης. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 2min. Απόρριψη του διηθήματος.
3. Πλύσιμο Cartridge: Προσθήκη 700μl Wash Buffer (H2) (που να περιέχει αιθανόλη) στο spin cartridge. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 2min. Απόρριψη του διηθήματος. Φυγοκέντρηση σε 12000g για 2min.
4. Έκλουση DNA: Εφαρμογή του spin cartridge πίσω στο 1.5ml σωληνάριο ανάκτησης. Προσθήκη 50μl από το ζεστό Buffer TE στο κέντρο του spin cartridge. Επώαση σε RT για 2min, φυγοκέντρηση σε 12000g για 2min και συλλογή διηθήματος.
5. Ανάμιξη στο hood 50μl pVL1393/ μεταλλαγμένου *GLUDI* cDNA 5μl NaAcetate 3M και 2.5 όγκους (125μl) αιθανόλη 100%. Φυγοκέντρηση στα 12000g, 4°C για 12min.
6. Απόρριψη του υπερκειμένου. Προσθήκη στην πελέτα 100μl 70% αιθανόλη. Φυγοκέντρηση στα 12000g, 4°C για 12min.

7. Απόρριψη του υπερκειμένου. Στέγνωμα στο hood για 20-30min περίπου. Επαναδιάλυση σε 30μl nanopure αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O. φωτομέτρηση DNA για ποσοτικοποίηση. Φύλαξη στους -30<sup>0</sup>C με parafilm κύκλοθεν του στομίου του Eppendorf.

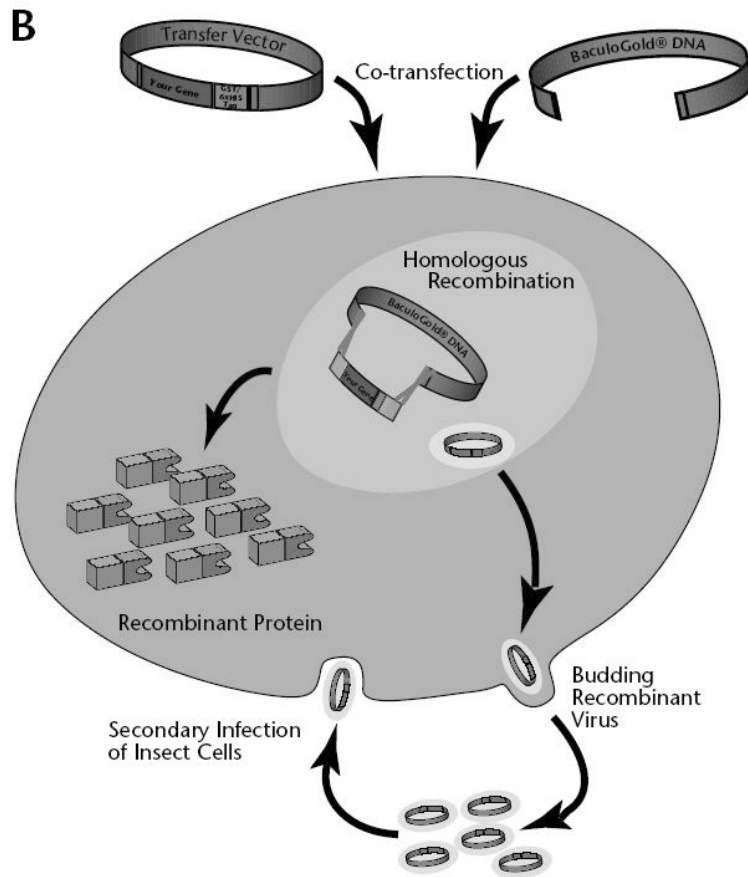
### **Σύστημα έκφρασης του Baculovirus σε κύτταρα εντόμων**

Το σύστημα έκφρασης Baculovirus Expression Vector System (BEVS) αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα (λόγω ευελιξίας και αποτελεσματικότητας) συστήματα έκφρασης ετερόλογων γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το Baculovirus DNA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή (PharMingen's BEVS) προέρχεται από τον ιό *Autographa californica* nuclear polyhedrosis (AcNPV). Η αρχή του συστήματος συνίσταται στην αντικατάσταση γονιδίων μη απαραίτητων για την επιβίωση του ιού στον καλλιεργητικό ιστό (όπως τα γονίδια της polyhedrin, p10) από ετερόλογα γονίδια (Εικ. 15). Η μόλυνση κυττάρων εντόμου *Sf* με τον AcNPV έχει σαν αποτέλεσμα την παύση (shut-off) μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων του ξενιστή (του κυττάρου *Sf*) και αντιστοίχως την αυξημένη παραγωγή του ανασυνδυσμένου mRNA (του ιού) και των πρωτεϊνών που εκφράζει (μεταξύ των οποίων και της μεταλλαγένης hGDH1 στην περίπτωσή μας).

Ο φορέας μεταφοράς γενετικού υλικού pVL1393 περιέχει: 1) μια περιοχή έναρξης αντιγραφής από το *E. Coli*, 2) το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη, 3) έναν υποκινητή από το γονίδιο της polyhedrin του AcNPV ιού 4) μία περιοχή κλωνοποίησης καθοδικώς του υποκινητή, όπου εισάγουμε το υπό εξέταση γονίδιο και 5) μια μεγάλης έκτασης αλληλουχία πλαισίου του γονιδιώματος του AcNPV για τη διευκόλυνση του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination).

### **Γραμμοποιημένο BaculoGold™ Baculovirus DNA**

Το BaculoGold™ DNA αποτελεί τροποποιημένο DNA από τον AcNPV Baculovirus στο οποίο περιέχεται μία θανατηφόρος έλλειψη, οπότε δεν κωδικοποιεί ζώντα ιό (Εικ. 14). Συν-μόλυνση του BaculoGold™ DNA με τον συμπληρωματικό φορέα μεταφοράς γενετικού υλικού pVL1393 (Baculovirus Transfer Vector) διασώζει την θανατηφόρο έλλειψη μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού τους που καθώς οδηγεί σε ζώντες ιούς και η συχνότητά του υπερβαίνει το 99%.



**Εικ. 15. Ο κύκλος ζωής του Baculovirus *in vitro*.** Το γονιδίωμα του Baculovirus είναι πολύ μεγάλο (130-kb) για να εισαχθούν γονίδια σε αυτό. Γι αυτό το υπό εξέταση γονίδιο κλωνοποιείται σε έναν φορέα μεταφοράς γενετικού υλικού (transfer vector) που περιέχει αλληλουχίες πλαισίου (flanking sequences) ομόλογες (φοράς 5' → 3' ως προς το ένθεμα) με το γονιδίωμα του Baculovirus. Ο BaculoGold™ DNA και ο φορέας μεταφοράς γενετικού υλικού με το κλωνοποιημένο υπό εξέταση γονίδιο συνδιαμολώνουν *Sf9* ή *Sf21* κύτταρα. Ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα στα κύτταρα εντόμου μεταξύ των ομόλογων περιοχών του φορέα μεταφοράς γενετικού υλικού και του BaculoGold™ DNA. Οι ανασυνδυασμένοι ιοί παράγουν την πρωτεΐνη υπό μελέτη και καθώς πολλαπλασιάζονται μολύνουν άλλα κύτταρα με συνέπεια την παραγωγή και άλλων ανασυνδυασμένων ιών.

### **Συνδιαμόλυνση του με Baculovirus DNA σε Sf21 cells. (πρωτόκολλο BD Pharmingen)**

1. Σπορά από  $2 \times 10^6$  κύτταρα σε φλάσκα των  $25\text{cm}^2$ . Επώαση στους  $27^\circ\text{C}$  ON.
2. Την άλλη μέρα, στο hood σε ένα αποστειρωμένο Eppendorf του 1.5ml ανάμιξη 5λ από το Baculogold DNA (0.5μg αφού είναι 0.1μg/λ) και 2 μg από το καθαρισμένο pVL1393/mutant DNA.

3. Επώαση για 5-10 min σε RT στο hood και προσθήκη 1ml Transfection Buffer B.
4. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από την φλάσκα και προσθήκη 1ml Baculogold Transfection Buffer A (καλή ανάμιξη)
5. Προσθήκη στην φλάσκα του μείγματος DNA+Transfection Buffer B. Η προσθήκη γίνεται με πιπέτα Pasteur και σταγόνα σταγόνα. Κάθε 2-3 σταγόνες απαλή ανάδευση της φλάσκας. Το διάλυμα DNA+ Transfection Buffer A + Transfection Buffer B πρέπει να πάρει όψη σχεδόν γαλακτώδη.
6. Επώαση στους 27<sup>0</sup>C για 4 ώρες
7. Αφαίρεση του Transfection Medium και προσθήκη 5ml TNM-FH, ελαφρά ανάδευση, απόρριψη με 5ml πιπέτα του TNM-FH και προσθήκη 5ml φρέσκου TNM-FH. Επώαση στους 27<sup>0</sup>C για 4-5 μέρες.

**Συγκομιδή (Harvesting):** Μετά από 4-5 μέρες αποκόλληση των κυττάρων με πιπέτα Pasteur και μετάγγιση με το θρεπτικό σε Falcon των 15ml και φυγοκέντρηση στις 1200 **rpm**, 10min, 4<sup>0</sup>C. Μεταφορά του υπερκειμένου (περιέχει τον ανασυνδυασμένο ιό) σε άλλα Falcon των 15ml και φύλαξη στους 4<sup>0</sup>C.

#### **Κατάψυξη (Freezing) και φύλαξη κυττάρων εντόμου**

Φυγοκέντρηση *Sf9* ή *Sf21* κυττάρων από υγιή log-phase καλλιέργεια (>80 % πυκνότητα σε χαμηλό passage) στους 1,000 x. g για 10 min. Αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Μεταφορά στον πάγο. Επαναδιάλυση σε μίγμα ψύξης ( 90% TNM-FH (χωρίς αντιβιοτικό), 10% DMSO ή 60 % TNM-FH (χωρίς αντιβιοτικό, 30 % FBS, 10 % DMSO)). Η πυκνότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 Χ10<sup>6</sup> cell/ml. Μετάγγιση 1 ml (aliquots) σε αποστειρωμένα κρυονials (στον πάγο). Κατάψυξη των κρυονials πρώτα στους -20<sup>0</sup>C για 1 ώρα και μετά στους -80<sup>0</sup>C overnight (εάν υπάρχει υγρό άζωτο).

#### **Απόψυξη (Thawing) κυττάρων εντόμου**

Μεταφορά από τους -80<sup>0</sup>C γρήγορα στους 37<sup>0</sup>C σε water bath. Όταν ξεπαγώσουν (30-40 seconds), ψεκασμός με 70% ethanol και εφεξής εργασία στη hood. Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup> με 4 ml TNM-FH (χωρίς αντιβιοτικό) \*. Επώαση στους 27<sup>0</sup>C για 45 min. και αφαίρεση θρεπτικού. Προσθήκη 5-6 ml καινούργιο πλήρες TNM-FH και επώαση στους 27<sup>0</sup>C για 18-24 h. Αλλαγή θρεπτικού κάθε 24 ώρες για 2 ημέρες. Τα υγιή *Sf21* διπλασιάζονται κάθε 18-24 h.

\*Προαιρετικώς spin at 600 x.g για 2–5 min .Αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Επαναδιάλυση σε 5 ml fresh TNM-FH (χωρίς αντιβιοτικό) και συνέχεια ως ανωτέρω.

### **Ομογενοποίηση**

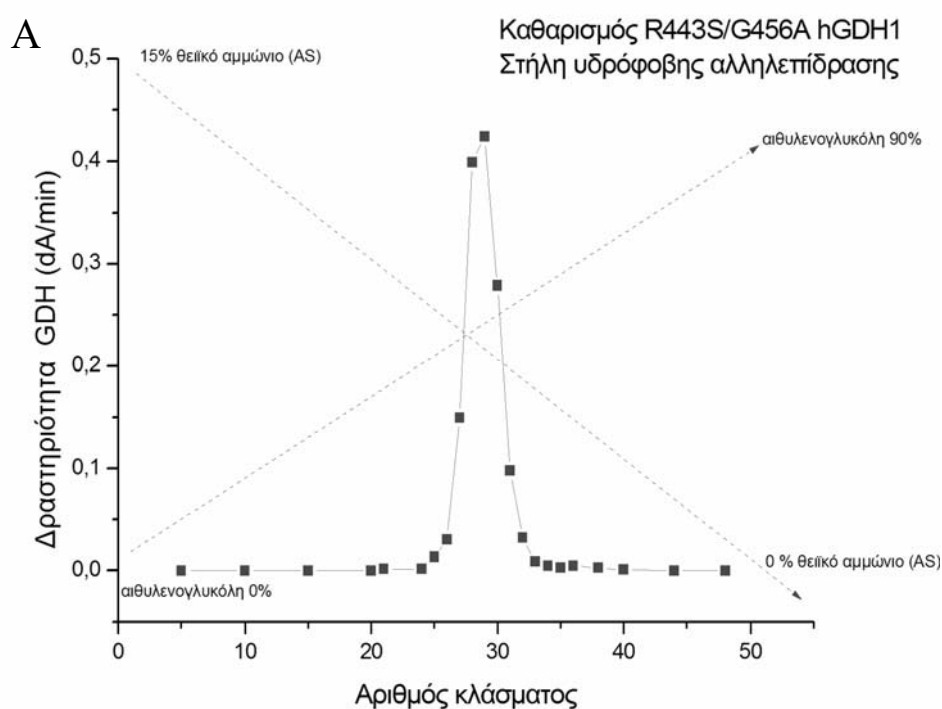
1. Απόψυξη σε πάγο πελέτας διαμολυσμένων *Sf21* από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  περίπου για 5min στον πάγο. Διάλυση σε 400-500μl διαλύματος ομογενοποίησης/falcon 50ml (το καθένα από 2 καλλιέργειες φλάσκας  $75\text{cm}^2$  ). Μεταφορά στο δοχείο ομογενοποίησης και ομογενοποίηση γυαλί με γυαλί (glass to glass) σε χαμηλή ταχύτητα (π.χ. 200-400rpm) για 4min.
2. Μεταφορά σε προπαγωμένο Eppendorf του 1.5ml του ομογενοποιήματος και ξέπλυμα με 100μl διαλύματος ομογενοποίησης για να ξεπλύνεις τόσο αυτό όσο και το έμβολο. Ομογενοποίηση για 30 sec πάλι σε χαμηλή ταχύτητα.
3. Φυγοκέντρηση σε 8000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  για 10min.
4. Μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλο προπαγωμένο Eppendorf και άμεση χρήση για ενζυμικές αναλύσεις. Άλλως φύλαξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

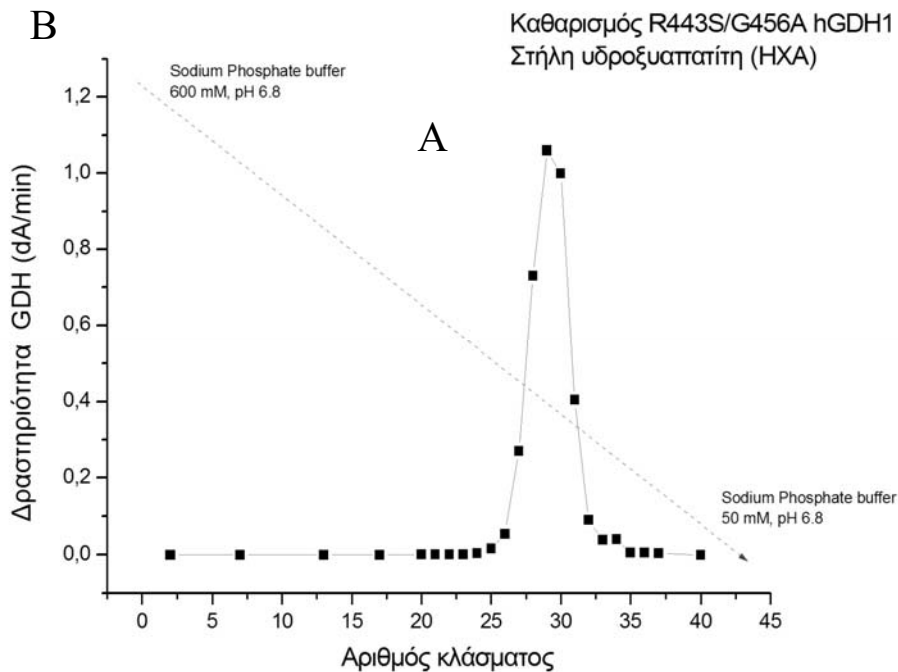
### **Καθαρισμός πρωτεΐνης**

Στη συνέχεια έγινε απομόνωση και καθαρισμός GDH από εκχυλίσματα κυττάρων *Sf21* Περίπου  $200 \times 10^6$  μολυσμένα 21Sf κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον ενζυμικό καθαρισμό, ο οποίος έγινε με τροποποίηση μιας προηγουμένως περιγραφείσας μεθόδου (Hussain και συν, 1989). Τα κύτταρα και οι ιστοί υπεβλήθησαν σε δύο με τρεις κύκλους παγώματος-απόψυξης και ομογενοποιήθηκαν (20-25% βάρος/όγκος) σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM TrisHCl, pH 7.4 που περιείχε 0.1mM EDTA, 0,5M NaCl, 1% Triton X-100 και 0,1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Σε δεύτερο στάδιο σε αυτά τα εκχυλίσματα έγινε καθίζηση των μεγαλομοριακών συμπλεγμάτων και πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους με 30% θειϊκού αμμωνίου και στο (περιέχον GDH) υπερκείμενο προστέθηκε θειϊκό αμμώνιο ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 65%. Το προκύπτον ίζημα μετά από φυγοκέντρωση του παραπάνω διαλύματος επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCl, pH 6.0, που περιείχε 15% θειϊκό αμμώνιο (AS) και φορτώθηκε σε μια στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης προετοιμασμένη με υψηλής επίδοσης PhenylSepharose και εξισορροπημένη με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Έγινε έκλουση με μια διπλή βαθμίδωση μειούμενης συγκέντρωσης θειϊκού αμμωνίου (15%-0%) και



αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλενογλυκόλης (0%-90%) (Εικ. 16Α). Μετά την άθροιση των κλάσμάτων επαναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCl, pH 6.0, που περιείχε 15% θειικό αμμώνιο (AS και επαναδιάβαση από την ίδια στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης. Επειδή η μεταλλαγμένη Gly456Ala GDH έχει μειωμένη συγγένεια για GTP (όπως είχε φανεί ήδη από μελέτες σε ακατέργαστα εκχυλίσματα), δεν χρησιμοποιήθηκε μια στήλη συγγένειας για GTP (Hussain και συν, 1989) για των παραπέρα καθαρισμό των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Στη θέση της χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία με υδροξυαπατίτη (Colon και συν, 1986). Για αυτό το λόγο, κλάσματα από τη στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης υπεβλήθησαν σε διαπίδυση διαμέσου ημιδιαπερατής μεμβράνης στους (4°C) έναντι αρκετών αλλαγών περιέσεως ρυθμιστικού διαλύματος 100mM TrisHCl, 200mM KCl, pH 7.15 και στη συνέχεια φορτώθηκαν στη στήλη υδροξυαπατίτη (Εικ. 16B). Η στήλη εκλούσθηκε με μια κλίση συγκέντρωσης 50-600 mM Sodium Phosphate buffer, pH 6.8 (αντί για 10mM – 400mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου με pH 7.4, Zaganas και συν., 2002). Η καθαρή πλέον GDH χρησιμοποιήθηκε για ενζυμικές μελέτες και για μελέτη της ηλεκτροφορητικής της κινητικότητας με SDS-PAGE.





**Εικ. 16.** Διαδικασία καθαρισμού ανασυνδυασμένων GDH (το παράδειγμα ελήφθη από τον καθαρισμό της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1) από κυτταρικά εκχυλίσματα του εντόμου *Spodoptera frugiperda* με χρήση στηλών υδρόφοβης αλληλεπίδρασης και υδροξυαπατίτη, όπως περιγράφεται στο κείμενο.

### Ενζυμικές δοκιμασίες και κινητικές μελέτες

Για τον καθορισμό των κινητικών και αλλοστερικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων ενζύμων έγιναν μια σειρά από ενζυμικές δοκιμασίες, τόσο σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και σε καθαρισμένες πρωτεΐνες. Η εκτίμηση της δραστηριότητας της GDH με μέτρηση της κινητικής δραστηριότητας του ενζύμου στα 340nm (με το φασματοφωτόμετρο) προς την κατεύθυνση οξειδωτικής απαμίνωσης του α-κετογλουταρικού (Plaitakis και συν., 2000). Το τυπικό μίγμα της αντίδρασης (τελική ποσότητα 1 ml) περιείχε 50 mM Triethanolamine (TEA) pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα, 2.6 mM EDTA, 100 mM Ammonium Acetate, 100 μM NADPH and 0.5-1μg του καθαρισμένου ενζύμου εκτός αν αναφέρεται αλλιώς. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη α-κετογλουταρικού 8 mM. Όλες οι ενζυμικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25°C, εκτός αν αναφέρεται αλλιώς. Καταγράφηκε η ταχύτητα κατάλυσης του ενζύμου στα πρώτα 30 sec μετά την έναρξη της αντίδρασης.

### Ενεργοποίηση από ADP

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από ADP έγινε σε 1ml ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθανολαμίνης (pH 8.0 εκτός και αν αναφέρεται διαφορετική τιμή) στο οποίο προσετέθησαν κατά σειρά 100mM οξικού αμμωνίου, 100μM NADPH, προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις ADP και ποσότητα του υπό μελέτη ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340\text{min}}/\text{min}$ ) σε παρουσία 1mM ADP να είναι περίπου 0.2 (ή 0.5-1μg του καθαρισμένου ενζύμου). Όλα τα συστατικά παραμένουν ίδια σε κάθε μέτρηση, αυτό που μεταβάλλεται είναι η ποσότητα του ADP. Η έναρξη της αντίδρασης γινόταν με προσθήκη α-κετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8 mM. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί καλύτερα η ενεργοποίηση από ADP ήταν η  $v = V_0 + (V_{\text{max}} * x^H) / (x^H + SC_{50}^H) = V_0 + V_{\text{max}}(1 + x^H / SC_{50}^H)$ , όπου  $v$  η ταχύτητα της αντίδρασης και  $x$  η συγκέντρωση του ADP, ενώ οι  $V_0$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $H$  και  $SC_{50}$  είναι θεωρητικές σταθερές που αφορούν την αρχική ταχύτητα (σε απουσία ADP), την μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης σε παρουσία ADP, τον βαθμό συνεργατικότητας των υπομονάδων και την συγκέντρωση ADP όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι  $V_{\text{max}}/2$  (Ζαγανάς ΔΔ, 2005). Ειδικότερα ο υπολογισμός της θεωρητικής τιμής  $SC_{50}$  ( $\pm$  τυπικό σφάλμα- SE) έγινε από τις γραφικές παραστάσεις ενεργοποίησης από ADP με χρήση του προγράμματος Origin (Microcal Software).

### Αναστολή από GTP

Η μελέτη της αναστολής των ανασυνδυασμένων ενζύμων από GTP έγινε σε 1ml ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθανολαμίνης (pH 8.0, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετική τιμή pH) στο οποίο εμπεριεχόταν 100mM οξικού αμμωνίου, 100μM NADPH, προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις GTP και ποσότητα του υπό μελέτη ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $D_{a340\text{nm}}/\text{min}$ ) σε απουσία GTP να είναι περίπου 0.2 παρουσία 1mM ADP, ~ 0.16 0.1 mM ADP και 0.1 απουσία ADP (ή 0.5-1μg του καθαρισμένου ενζύμου). Η έναρξη της αντίδρασης γινόταν με προσθήκη α-κετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8 mM ενώ γινόταν ανάμιξη των υλικών με parafilm. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί καλύτερα η αναστολή από GTP ήταν η  $V = V_{\text{max}} / (1 + x^H / IC_{50}^H)$  όπου  $v$  η ταχύτητα της αντίδρασης  $x$  η συγκέντρωση του GTP, ενώ οι  $V_{\text{max}}$ ,  $H$  και  $IC_{50}$  είναι θεωρητικές σταθερές που αφορούν την αρχική ταχύτητα (σε απουσία GTP) τον βαθμό συνεργατικότητας των υπομονάδων και την συγκέντρωση GTP όπου η αντίδραση της ταχύτητας είναι  $V_{\text{max}}/2$  (Ζαγανάς ΔΔ, 2005). Ειδικότερα ο υπολογισμός της

θεωρητικής τιμής  $IC_{50}$  ( $\pm$  τυπικό σφάλμα-SE) έγινε από τις γραφικές παραστάσεις αναστολής από GTP με χρήση του προγράμματος Origin (Microcal Software). Ο συντελεστής Hill (HC) για την συνεργατικότητα της αναστολής από GTP υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση του Hill  $dA_{340nm}/min=(GTP)^h/(K+(GTP)^h)$ . Επειδή η γραφική παράσταση της παραπάνω εξίσωσης ( $dA_{340nm}/min$  έναντι (GTP) είναι σιγμοειδική, κάνοντας δύσκολους τους υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός της στο τύπο  $\log((dA_{340nm}/min)/(1-dA_{340nm}/min))=h\log(GTP)-\log K$ . Η γραφική παράσταση της τελευταίας εξίσωσης ( $\log((dA_{340nm}/min)/(1-dA_{340nm}/min))$  έναντι  $\log(GTP)$  είναι γραμμική και η κλίση της δίνει τον h (Ζαγανάς ΔΔ, 2005).

### **Ενεργοποίηση από L-λευκίνη**

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από L-λευκίνη έγινε σε 1ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Τριαιθανολαμίνης στο οποίο εμπεριεχόταν 100mM Οξεικού Αμμωνίου, 100mM NADPH, προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης και ποσότητα του υπο μελέτη ενζύμου τέτοια ώστε η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) σε παρουσία L-λευκίνης 10 mM να είναι περίπου 0,1 (ή 0.5-1μg του καθαρισμένου ενζύμου). Πιο συγκεκριμένα, για την αξιολόγηση της συνεργιστικής δράσης ADP και L-λευκίνης (0,6mM) προστίθεται σε μείγμα αντίδρασης που περιείχε ADP σε διάφορες σταθερές συγκεντρώσεις (0,0.025,0.050,0.100,0.250 και 1mM). Η έναρξη όλων των παραπάνω αντιδράσεων γίνονταν με προσθήκη α-κετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8mM.

### **Επίδραση του pH και της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης**

Επιπλέον, για να μελετηθεί η επίδραση του pH στις ενζυμικές ιδιότητες (ειδική δραστηριότητα, αναστολή από GTP και ενεργοποίηση από ADP), πραγματοποιήσαμε ενζυμικές αντιδράσεις σε ρυθμιστικά διαλύματα TRA με pH 7.0, 7.5, και 8.0.

### **Μελέτες θερμικής αδρανοποίησης**

Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης έγιναν επωάζοντας δείγματα που περιείχαν 40-60 μg/ml του καθαρισμένου ενζύμου και 4mg/ml bovine serum albumin σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° Aliquots (10 μl) απομακρύνονταν σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα και μετρώονταν η ενζυμική δραστηριότητα προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία 1mM ADP.

### **Κινητικές αναλύσεις**

Για τον καθορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) για το α-κετογλουταρικό, την αμμωνία και το NADPH στα καθαρισμένα ένζυμα έγιναν

κινητικές αναλύσεις. Στο πρώτο από τα παραπάνω πειράματα, η συγκέντρωση του ακετογλουταμικού μεταβαλλόταν από 0.4 έως 8 mM, ενώ η συγκέντρωση του ADP παρέμενε σταθερή στο 1mM. Στην δεύτερη ομάδα πειραμάτων η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου μεταβαλλόταν από 10 έως 120 mM. Στην τρίτη ομάδα πειραμάτων η συγκέντρωση του NADPH μεταβαλλόταν από 20 έως 160  $\mu$ M παρουσία 1mM ADP. Για την  $K_m$  του γλουταμικού η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού σε διάλυμα που περιείχε 50 mM Triethanolamine pH 8.0, ρυθμιστικό διάλυμα, 2.6 mM EDTA, 1.4 mM NADP και 1mM ADP. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5  $\mu$ g ενζύμου και η αντίδραση άρχισε με την προσθήκη γλουταμικού από 2 έως 40 mM.

### **Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας καθαρισμένων ενζύμων**

Για να καθοριστεί η ειδική δραστηριότητα των καθαρισμένων ενζύμων μετρήθηκε η δραστηριότητα ( $dA_{340nm}/min$ ) ενός ορισμένου όγκου τους υπο ορισμένες συνθήκες (π.χ. σε απουσία ADP ή επί παρουσίας ADP 1Mm). Στη συνέχεια μετρήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση (mg/ml) του ενζυμικού παρασκευάσματος. Ο υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας έγινε με βάση το τύπο  $SA = dA / (min * 6.222 * PC * V)$  όπου SA η ειδική δραστηριότητα (σε  $\mu$ moles NADH ή NADPH /mg πρωτεΐνης /min), dA η μεταβολή της  $OD_{340nm}/min$ , PC η πρωτεϊνική συγκέντρωση του καθαρισμένου ενζυμικού παρασκευάσματος (σε mg/ml) και V ο όγκος (σε ml) του παραπάνω παρασκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση. Η συγκεντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων υπολογίστηκε με χρήση της πυκνομετρίας (TINA Scan) από τα κεχρωσμένα SDS-PAGE ηλεκτρόδια έχοντας σαν πρότυπο γνωστές ποσότητες βοείου αλβουμίνης του ορού (BSA).

### **Δομικές μελέτες πρωτεϊνών και στατιστική ανάλυση**

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πάνω στα πειραματικά δεδομένα και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με χρήση του λογισμικού Origin (Microcal Software, Northampton, MA). Οι τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$  υπολογίστηκαν με εφαρμογή της μεθόδου weighted hyperbolic fit στο λογισμικό Hyper (JS. Eastarby, Dept. Of Biochemistry, University of Liverpool, UK). Οι τιμές  $IC_{50}$  και  $SC_{50}$  υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις με το λογισμικό Origin. Οι συντελεστές Hill (HC) για την αναστολή των ενζύμων από GTP υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της Cornish-Bowden (1979). Οι μελέτες των δομικών μοντέλων της GDH από αγελάδα και άνθρωπο έγιναν με χρήση των προγραμμάτων Swiss-PDBViewer (version 3.7.b2,

N.Guex, <http://au.expasy.org/spdbv/>) και Pymol (DeLano Scientific, 2003, <http://pymol.sourceforge.net/>).

## Μελέτες υποκυτταρικής εντόπισης

### Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

Η δημιουργία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *GLUD1-EGFP* και *GLUD2-EGFP* έγινε παλαιότερα στο εργαστήριο Νευρολογίας. Πιο συγκεκριμένα για το *GLUD1-EGFP*, ολόκληρη η κωδικεύουσα αλληλουχία του *GLUD1* cDNA (υποκλωνοποιημένη στον φορέα pBSKII+) πολλαπλασιάστηκε με PCR και συγκολλήθηκε (fused) ανοδικά της αλληλουχίας του γονιδίου *EGFP*. Ο forward εκκινητής 5'-CTTCGAATTCAAAGCGATGTTTCGCGACCATCA-3' σχεδιάστηκε ώστε να είναι συμπληρωματικός της 5' αλληλουχίας πλαισίου *GLUD1* και να δημιουργεί μία περιοριστική θέση για την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Ο reverse εκκινητής 5'-CCGGTGGATCCTCCTCCCCCATCTTTGTGAAGCTCACACCAG-3' σχεδιάστηκε ώστε να μετατρέπει το κωδικόνιο τερματισμού (stop codon) TAG σε AAG (Lys) και να δημιουργεί μία περιοριστική θέση για την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI. Το πολλαπλασιασμένο τμήμα *GLUD1*cDNA αφού καθαρίστηκε, υποβλήθηκε σε πέψη με EcoRI και BamHI ενδονουκλεάσες περιορισμού και απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκόλληση (ligation) χωρίς αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (in frame) στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου του *EGFP* πραγματοποιήθηκε με το τμήμα του φορέα *EGFP-N3* vector το οποίο είχε απομονωθεί από πήκτωμα αγαρόζης μετά πέψη με EcoRI και BamHI

Για την δημιουργία του *GLUD2-EGFP* πλασμιδίου ένα τμήμα μήκους 550 bp του *GLUD2* cDNA πολλαπλασιάστηκε με PCR. Χρησιμοποιήθηκαν ο forward εκκινητής 5'-CAGAGTCAAAGCCAAGATCA-3' και ο reverse εκκινητής 5' ACCGGTGGATCCTCCTCCGCCTCCCATCTTTGTGA 3', ο οποίος σχεδιάστηκε να εξαλείψει κωδικόνιο τερματισμού (stop codon) TAG και να δημιουργήσει μία περιοριστική θέση για την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υποβλήθηκε σε πέψη με BsmI and BamHI ενδονουκλεάσες περιορισμού, απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και συνδέθηκε στο υπόλοιπο *GLUD2* cDNA, ήδη υποκλωνοποιημένο στον φορέα pBSKII+, το οποίο είχε υποβληθεί σε πέψη με BsmI and BamHI. Το τροποποιημένο *GLUD2*

cDNA υποβλήθηκε σε πέψη με SacI and BamHI, απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και εισήχθη στον φορέα *EGFP-N3*. Η συγκόλληση (ligation) χωρίς αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (in frame) στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου του *EGFP* πραγματοποιήθηκε με το τμήμα του φορέα *EGFP-N3* vector το οποίο είχε απομονωθεί από πήκτωμα αγαρόζης μετά πέψη με SacI and BamHI.

Και στις δύο περιπτώσεις τα προϊόντα της σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των κυττάρων του στελέχους του *E. coli* JM109 και καλλιεργήθηκαν σε LB θρεπτικό υλικό. Τα πλασμιδιακά DNA απομονώθηκαν από μεσαίας (midi) ή μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης και καθαρισμού με την μέθοδο equilibrium centrifugation in CsCl-Ethidium Bromide gradients (Sambrook και συν., 1989). Η σωστή αλληλουχία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *GLUD1-EGFP* και *GLUD2-EGFP*, η εισαγωγή στην κατάλληλη θέση του πλασμιδίου, η εξάλειψη του κωδικόνιου τερματισμού και ο σωστός προσανατολισμός του ενθέματος επιβεβαιώθηκαν με αμφίδρομο αλληλούχιση καθ' όλο το μήκος των *GLUD1&2* γονιδίων με τη χρήση του γενετικού αναλυτή ABI Prisms 3100. Πρίν τα πειράματα διαμόλυνσης τα πλασμιδιακά DNA ξανακαθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας είτε το Concert Rapid PCR (Gibco, Grand Island, NY) είτε το Qiaquick PCR (Qiagen Inc., Valencia CA.) πρωτόκολλο καθαρισμού.

#### **Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας:**

Η κυτταρική σειρά *HEK293* καλλιεργήθηκε σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο DMEM-Glutamax (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) συμπληρωμένο με FBS (Fetal Bovine Serum) σε τελική συγκέντρωση 10% και αντιβιοτικό Gentamycin 50μg/ ml. Η κυτταρική σειρά *SH-SY5Y* καλλιεργήθηκε σε υγρό αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο RPMI (GIBCO), συμπληρωμένο με L-Glutamine (2mM), FBS 10%, Gentamycin 50μg/ ml.

#### **Υλικά κυτταροκαλλιέργειας:**

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 100mm (ή 35mm με ενσωματωμένη καλυπτρίδα 24X24mm, εάν επρόκειτο να γίνει διαμόλυνση).

#### **Συνθήκες καλλιέργειας:**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστήρα, σε θερμοκρασία 37°C, συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5%, και επαρκή υγρασία.

*Σπορά (Seeding) και συνέχιση καλλιέργειας (Passage) σε plates 35mm*

- i. Αναρρόφηση υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur
- ii. Προσθήκη 1ml τρυψίνη
- iii. Επώαση στους 37°C για 3-4 min
- iv. Με πιπέτα Pasteur ή 5ml απομάκρυνση (ξεκόλλημα) των κυττάρων από επιφάνεια τρυβλίου
- v. Προσθήκη 1-2ml θρεπτικού
- vi. Μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο με χρήση Trypan Blue sol 0.4% (η επιθυμητή περιεκτικότητα  $3 \cdot 10^5$  κύτταρα) και μετάγχιση της ανάλογης ποσότητας στο πιάτο 35mm.
- vii. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού
- viii. Επώαση στους 37°C O/N

#### **Κατάψυξη (Freezing) και φύλαξη κυττάρων θηλαστικών**

Σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup> από υγιή καλλιέργεια (>80 % πυκνότητα σε χαμηλό passage) αναρρόφηση υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur. Πλύσιμο με 5 ml PBS. Προσθήκη 1ml τρυψίνη. Επώαση (στους 37°C) για 3-4 min. Επαναδιάλυση σε 10ml DMMM + 10% FCS +Gentamycin/Glutamine (πλήρες θρεπτικό υλικό). Φυγοκέντρηση κυττάρων θηλαστικών στους 1,200 x rpm για 10 min σε RT. Αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Επαναδιάλυση σε μίγμα ψύξης (70% DMMM (χωρίς αντιβιοτικό), 20 % FBS , 10% DMSO, περασμένο από φίλτρο(0.2 μm)) σταγόνα-σταγόνα. Η πυκνότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1-2  $\times 10^6$  cell/ml. Μετάγχιση 1 ml (aliquots) σε αποστειρωμένα κρυονials (στον πάγο). Κατάψυξη των κρυονials πρώτα στους -20°C για 5 ώρες και μετά στους -80°C overnight (εάν υπάρχει υγρό άζωτο).

#### **Απόψυξη (Thawing) κυττάρων**

Μεταφορά από τους -80°C γρήγορα στους 37°C σε water bath. Όταν ξεπαγώσουν (30-40 seconds), ψεκασμός με 70% ethanol και εφεξής εργασία στη hood. Μεταφορά των κυττάρων σε falcon 15ml με 4 ml DMEM (RT, χωρίς αντιβιοτικό) και φυγοκέντρηση 1000 rpm x 5-7min. Αναρρόφηση υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur και απόρριψή του. Επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων σε 5 ml φρέσκο πλήρες DMEM (RT) σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup>. Αλλαγή θρεπτικού κάθε 24 ώρες για 2 ημέρες.

**Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο κατακρήμνισης του γλωριούχου ασβεστίου σε τρυβλία διαμέτρου 35mm.**



Η διαμόλυνση με την τεχνική του γλωριούχου ασβεστίου βασίζεται στη δημιουργία ενός ιζήματος άλατος-DNA, το οποίο όταν επικάθεται στην επιφάνεια των κυττάρων, έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί μικρές 'οπές', διαμέσου των οποίων μπορεί να εισέλθει το cDNA στο εσωτερικό του κυττάρου, και, χρησιμοποιώντας τη μεταφραστική μηχανή του, να οδηγήσει στη σύνθεση πρωτεΐνης (Sambrook, Maniatis και συν, 1989). Συνοπτικά, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα;

1. Προετοιμασία των διαλυμάτων Α και Β

ΔΙΑΛΥΜΑ Α. Ανάμιξη κατά σειρά, για τρυβλία διαμέτρου 35mm:-10μg DNA, X μl H<sub>2</sub>O, 16 μl CaCl<sub>2</sub> ώστε ο τελικός όγκος να είναι 125μl

ΔΙΑΛΥΜΑ Β: 125μl HBS 2X (Hepes Buffered Saline)

2. Ανάμιξη του διαλύματος Α με το διάλυμα Β αργά, με πιπετάρισμα, σταγόνα-σταγόνα. Επώαση για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστεί το ίζημα.

3. Εναπόθεση σπειροειδώς σταγόνα-σταγόνα του μίγματος CaCl<sub>2</sub>- DNA, στα τρυβλία (επιθυμητή πυκνότητα κυττάρων 60-70% της επιφάνειας), όπου έχουμε προηγουμένως προσθέσει φρέσκο θρεπτικό μέσο.

4. Επώαση στους 37°C για 4-16 ώρες.

5. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα των κυττάρων από το ίζημα 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα 2ml DMMM (ή PBS 1X (phosphate buffered saline). Προσθήκη 2ml DMMM + 10% FCS +Penicillin/Streptomycin/Glutamine (θρεπτικό υλικό)

6. Επώαση στους 37°C για 48-72 ώρες, ώστε να εκφραστούν οι πρωτεΐνες.

**Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο κατακρήμνισης του γλωριούχου ασβεστίου σε LABTEK (Chamber Slide 4 wells , NUNC, Cat No177437)**

A. 24 ώρες μετά transfection σε 35mm plates προσθήκη 1ml Trypsin 1X

B. Επώαση (στους 37°C) για 3-4 min

Γ. Προσθήκη 1ml θρεπτικού

Δ. Εφόσον θεωρούμε πως στα 2 ml έχουμε 3x 10<sup>5</sup> κύτταρα και στο κάθε well θέλουμε 0,7x 10<sup>5</sup> κύτταρα μετάγγιση της ανάλογης ποσότητας (~ 470μl) σε κάθε well.

Ε. Προσθήκη θρεπτικού ώστε τελικός όγκος 1-1.5 ml

**Μονιμοποίηση κυττάρων**

1. 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση αφαίρεση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων 2 φορές με PBS
2. Προσθήκη 4% PFA (1ml στα 35mm plates, 400μl/well στα 4 well LAB-TEK) και επώαση για 10-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αφαίρεση PFA και πλύση δις με PBS.
4. Αφαίρεση της καλυπτρίδας από τον πυθμένα του τρυβλίου και εναπόθεση αργά (με την πλευρά που είναι προσκολλημένα τα κύτταρα προς τα κάτω) στην επιφάνεια ενός slide, στο οποίο έχει προστεθεί προηγουμένως μικρή ποσότητα (60μl) Mowiol 4-88 (mounting solution). Φύλαξη στους 4<sup>0</sup>C σε σκοτεινό μέρος. Εάν χρησιμοποιείται 4 well LAB-TEK αφαίρεση media chamber and adhesive
5. Προσθήκη κατά μήκος του labtek 60μl Mowiol (όχι φουσκάλες)
6. Αποστείρωση καλυπτρίδας 24x60 mm 70% ETOH και επίθεση αργά στο labtek (με βοήθεια βελόνας για «απαλή» επίθεση)
7. Στέγνωμα

#### **Παρατήρηση σε πολυεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού**

Η παρατήρηση των κυττάρων για την ανίχνευση φθορισμού και τη λήψη φωτογραφιών έγινε με μικροσκόπηση σε πολυεστιακό, με σαρωτή laser (laser scanning), μικροσκόπιο φθορισμού τύπου Leica TCS-NT. Η διέγερση των φθοριζόντων πρωτεϊνών έγινε στα μήκη κύματος 488nm για πρωτεΐνη EGFP και 568 για την DsRed2). Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκαν κυρίως οι αντικειμενικοί φακοί 40X και 60X, με χρήση ελαίου. Η ανάλυση σε σειριακές τομές και η συγχώνευση των εικόνων έγινε με το software πρόγραμμα της Leica (Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

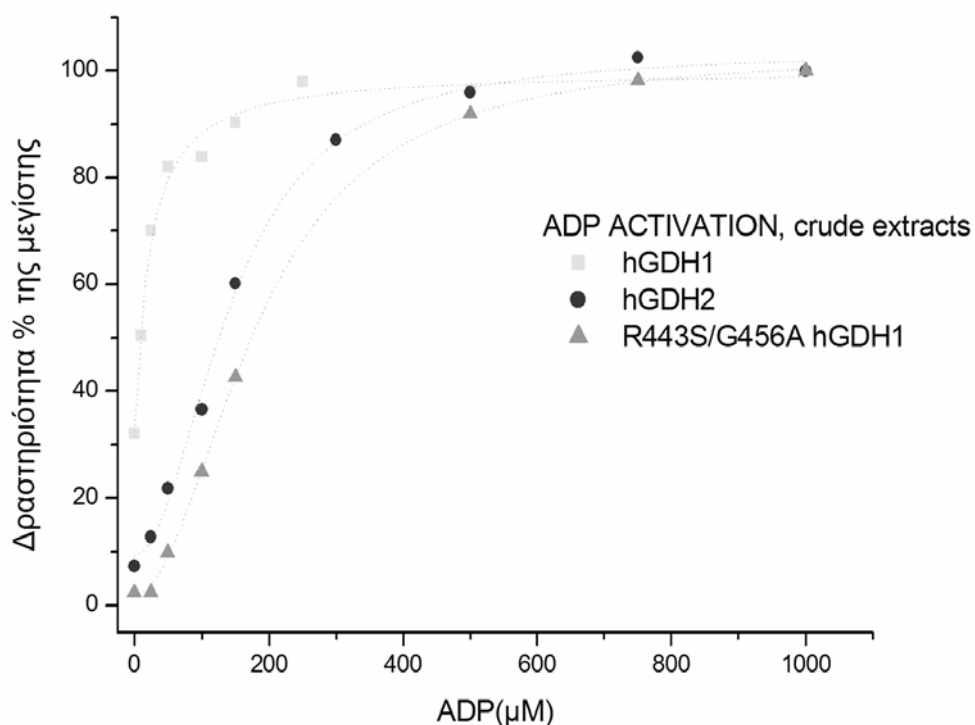
Η έκφραση των wild-type hGDH1, hGDH2 και των μεταλλαγμένων cDNAs έγινε σε Sf21 κύτταρα, διότι αν και περιέχουν ενδογενή GDH, αυτή έχει απόλυτη ειδικότητα για NADH και συνεπώς έχει μηδενική δραστηριότητα όταν χρησιμοποιείται το NADP(H) ως συνένζυμο (Shashidharan και συν., 1994). Γι' αυτό το λόγο, όλες οι παραγόμενες ανασυνδυασμένες GDH πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων των μολυσμένων με ανασυνδυασμένο Baculovirus Sf21 κυττάρων μελετήθηκαν με χρησιμοποίηση του NADP(H).

## Διπλά μεταλλαγμένη (ARG443SER, GLY456ALA) hGDH1

### Μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα

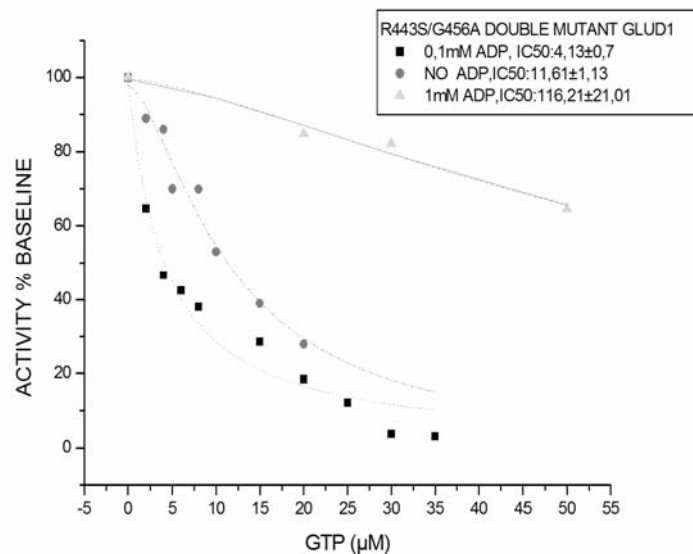
Ενζυμικές μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν πως η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 είχε πολύ χαμηλή βασική καταλυτική δραστηριότητα (3-4% της μεγίστης). Παρενθετικώς ως σημειωθεί πως η wild-type hGDH1 εμφανίζει βασική καταλυτική δραστηριότητα ~40 % της μεγίστης, ενώ η wild-type hGDH2 βασική καταλυτική δραστηριότητα ~ 5-10 % της μεγίστης. Αν και η διπλά μεταλλαγμένη hGDH1 είναι ουσιαστικώς ανενεργή χωρίς ADP η δραστηριότητα της αποκαθίσταται πλήρως από το ADP σε συγκέντρωση 1mM. Απαιτούνται όμως πολύ μεγαλύτερα επίπεδα ADP (~7.5 φορές) για την ενεργοποίησή της ( $SC_{50}=182.9 \pm 13.3 \mu\text{M}$ ) σε σύγκριση με την wild-type hGDH1 ( $SC_{50}=24.02 \pm 5.12 \mu\text{M}$ ) και σχεδόν εφάμιλλα, αλλά πάντα μεγαλύτερα, από την wild-type hGDH2 ( $SC_{50}=143.2 \pm 7.7 \mu\text{M}$ ) (Παράρτημα, Πίνακας 6) (Εικ. 17).

Όσον αφορά στην αναστολή από GTP η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 παρουσίαζε σημαντική αντίσταση (Εικ. 18). Σε απουσία ADP, η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP ήταν περίπου 45 φορές μεγαλύτερη για τη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ( $11.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ) σε σύγκριση με την wild-type *GLUD1* GDH ( $IC_{50}= 0.25 \pm 0.02$ ). Αντιστοίχως στην Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP ήταν περίπου 15 φορές μεγαλύτερη εν σχέσει με την wild-type *GLUD1* GDH (Ζαγανάς 2005, διδακτορική διατριβή).



**Εικ. 17. Ενεργοποίηση από ADP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και R443S/G456A hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 5 πειραματικούς προσδιορισμούς (2 προσδιορισμούς για την wild-type hGDH1) και εκφράζονται ως ποσοστό της μεγίστης δραστηριότητας του κάθε ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

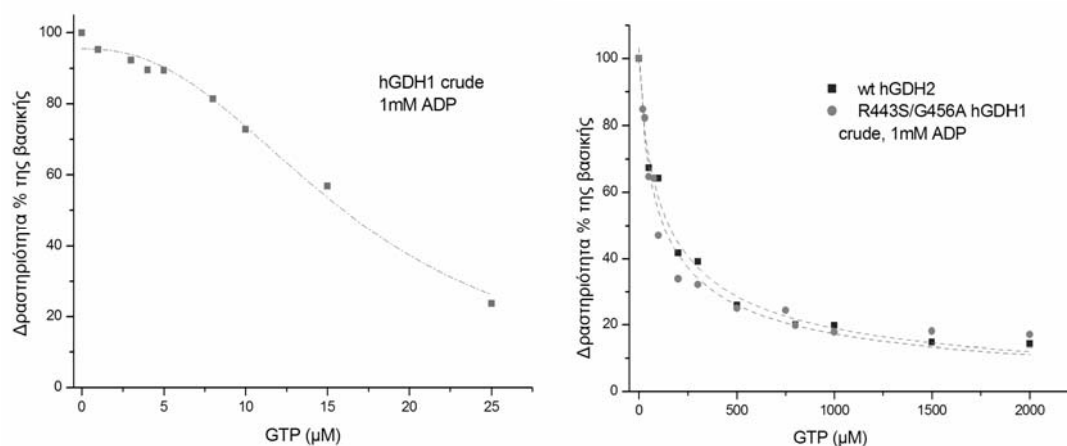
Η αντίσταση στην αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 επιβεβαιώθηκε και παρουσία ADP (0.1mM και 1mM). Στην ενδιάμεση συγκέντρωση (0.1mM ADP) η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν περίπου 2.5 φορές μεγαλύτερη ( $IC_{50}=4.13\pm 0.7$ ) σε σύγκριση με την wild-type *GLUD1* GDH ( $IC_{50}=1.73\pm 0.09$ ). Σε συνθήκες μέγιστης ενεργοποίησης (1mM ADP) η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν περίπου 7 φορές μεγαλύτερη ( $IC_{50}=116.21\pm 21.01$ ) σε σύγκριση με την wild-type hGDH1 ( $IC_{50}=16.5\pm 0.64$ ). Ουσιαστικώς σε αυτές τις συνθήκες η  $IC_{50}$  για την αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν συγκρίσιμη της  $IC_{50}$  της wild-type *GLUD2* GDH ( $IC_{50}=154.8\pm 18.9$ ) και της Gly456Ala μεταλλαγμένης GDH ( $IC_{50}=79.55\pm 3.67$ ) (Zaganas & Plaitakis, 2002a).



**Εικ. 18. Αναστολή από GTP της R443S/G456A hGDH1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ADP σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP σε σταθερές (για κάθε καμπύλη) συγκεντρώσεις ADP

Επιπλέον η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 κατήργησε την συνεργατική συμπεριφορά του ενζύμου τόσο σε παρουσία όσο και σε απουσία ADP (Πίνακας 6). Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, η αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 δεν περιγράφεται από την χαρακτηριστική σιγμοειδική καμπύλη της wild type hGDH1 αλλά προσομοιάζει στη υπερβολική καμπύλη αναστολής της wild-type *GLUD2* GDH (και στην καμπύλη αναστολής της μεταλλαγμένης Gly456Ala GDH). Ο συντελεστής του Hill (Hill coefficient, HC) για την αναστολή από GTP, ενώ για την wild type *GLUD1* GDH ήταν  $2.5 \pm 0.79$  (απουσία ADP), είχε τιμές ενδεικτικές μη συνεργατικής συμπεριφοράς για την διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ( $HC=1.36 \pm 0.16$ ). Η ίδια εικόνα (απουσία συνεργατικότητας έως και αρνητικής συνεργατικότητας) παρατηρήθηκε στις μελέτες αναστολής από το GTP παρουσία αλλοστερικού ενισχυτή (ADP σε συγκέντρωση 0.1mM και 1mM). Λόγου χάρι παρουσία ADP 0.1mM ο συντελεστής του Hill για τη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ήταν  $1.16 \pm 0.2$  σε σύγκριση με τον

HC=2,04±0,1 της wild type hGDH1. Ως αναμενόταν από παλαιότερες μελέτες (Plaitakis και συν., 2000) ο συντελεστής του Hill για τη wild-type *GLUD2* GDH παρουσία ADP 0.1mM ήταν 0.98±0.0.13. Ενδεικτικά τέλος αναφέρεται πως στην Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1 ο HC ήταν 1.12 ± 0.06 και 1.30 ± 0.07 απουσία ADP και παρουσία ADP 0.1mM αντίστοιχα (Zaganas & Plaitakis, 2002a).



**Εικ. 19. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και R443S/G456A hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα παρουσία 1mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP.

**Πίνακας 6. Συντελεστές Hill των των wild-type hGDH1 και hGDH2 και των μεταλλαγμένων ισομορφών σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα**

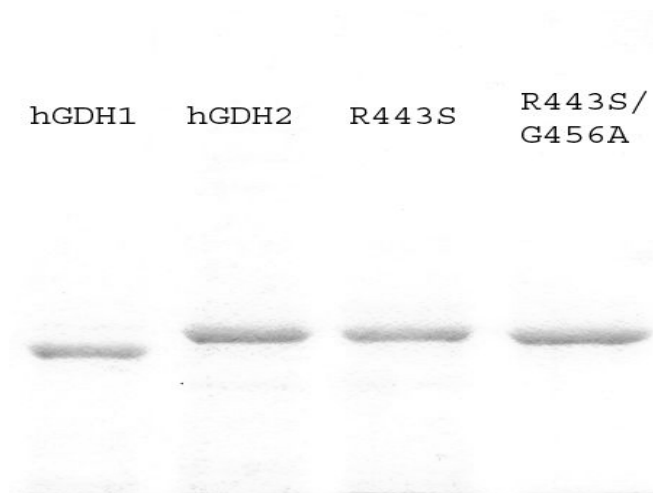
Αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα	Αναστολή από GTP Συντελεστής Hill (Hill coefficient)		
	Απουσία ADP	0.1mM ADP	1mM ADP
<b>hGDH1</b>	2.51±0.79	2.04±0.1	1.26±0.2?
<b>hGDH2</b>	ND	1.31±0.2	0.75±0.04
<b>R443/G456A hGDH1</b>	1.36±0.16	1.16±0.2	0,74±0.05
<b>G456A hGDH1(ΓΖ, ΔΔ)</b>	1.12±0.06	1.3±0.07	1.07±0.04
<b>R443S hGDH1 (ΓΖ, ΔΔ)</b>	ND	ND	2.0±0.1
<b>S409R hGDH1</b>	ND	1.07±0.2	0.95±0.1
<b>S409D hGDH1</b>	ND	1.32±0.1	0.8±0.03

Οι τιμές για τους συντελεστές Hill (± τυπική απόκλιση) αντιπροσωπεύουν την κλίση της καμπύλης γραμμικής παλινδρόμησης (Hill plot), η οποία κατασκευάστηκε με την

εφαρμογή των δεδομένων της αναστολής από το GTP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ADP σύμφωνα με τη μέθοδο της Cornish-Bowden (1979). Οι υπολογισμοί έγιναν με την χρήση του προγράμματος Origin.

### **Καθαρισμός διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1**

Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 καθαρίστηκε από τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των Sf21 κυττάρων χρησιμοποιώντας μια μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει κλασματοποίηση με θειϊκό αμμώνιο, χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης και χρωματογραφία στήλης υδροξυαπατίτη. Η μέθοδος αποτελεί τροποποίηση από προηγουμένως περιγραφείσες τεχνικές (Colon και συν., 1986; Zaganas και συν., 2002) όπως περιγράφεται αναλυτικά ανωτέρω (κεφάλαιο Μεθοδολογίας, εικ. 16). Με τη μέθοδο καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε ανακτήθηκε στα καθαρισμένα κλάσματα περίπου το 40 % της αρχικής GDH δραστηριότητας που υπήρχε στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, σε συμφωνία με προηγούμενες περιγραφές (Hussain και συν., 1989). Επιπλέον χαμηλώνοντας το pH του διαλύματος έκλουσης (50-600 mM Sodium Phosphate buffer) από τη στήλη του υδροξυαπατίτη από 7.40 σε pH 6.80 βελτίωσε αισθητά τη σταθερότητα του ενζύμου στο χρόνο γεγονός απαραίτητο για την πραγματοποίηση όλων των μελετών. Ανάλυση με 8 % SDS-PAGE των θετικών για GDH κλασμάτων που εκλούσθηκαν από τη στήλη υδροξυαπατίτη έδειξε ότι το ένζυμο ήταν καθαρό σε ποσοστό >95 %, καθώς σχηματιζόταν μόνο μία ζώνη. Όπως φαίνεται στην Εικ. 20 το μοριακό βάρος της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 αντιστοιχούσε στο αναμενόμενο για τη γλουταμική αφυδρογονάση (~ 56 kDa) αλλά είναι κατά τι μεγαλύτερο της hGDH1 και παρόμοιο της hGDH2 αλλά και της μεταλλαγμένης R443S hGDH1. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματά μας υπολογίστηκε με πυκνομετρία (densitometrically) από κεχρωσμένα SDS-PAGE πηκτώματα, χρησιμοποιώντας τη βόειο αλβουμίνη (bovine serum albumine, BSA) σαν πρότυπο.



**Εικ. 20 8% SDS-PAGE ανάλυση των καθαρισμένων ισοενζύμων wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, μεταλλαγμένης R443S hGDH1 και διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1.**

#### **Καταλυτικές και κινητικές ιδιότητες της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 εν σχέσει με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH**

Ενζυμικές αναλύσεις που έγιναν με παρουσία 1.0  $\mu\text{g}$  καθαρισμένου μεταλλαγμένου ενζύμου /1ml TRA, pH 8.0 ρυθμιστικού διαλύματος, επιβεβαίωσαν την σχεδόν μηδενική ενεργότητα του ενζύμου σε βασική κατάσταση, δηλαδή απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Συγκεκριμένα η βασική ειδική δραστηριότητα (specific basal activity) ήταν 0.35  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (που αντιστοιχεί σε 0.25% της μέγιστης, δηλαδή παρουσία ADP 1mM). Προφανώς η πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα οφείλεται αποκλειστικά στην αντικατάσταση της Arg443 από Ser, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το ότι η βασική ειδική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν ~0.21 % της μέγιστης (Ζαγανάς 2005, διδακτορική διατριβή), ελάχιστα χαμηλότερης δηλαδή του διπλά μεταλλαγμένου ενζύμου. Σε αντιπαραβολή η βασική ειδική δραστηριότητα της wild-type hGDH1 ήταν ~ 38  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  που αντιστοιχεί στο 40 % της μέγιστης και της wild-type hGDH2 ήταν 4  $\mu\text{moles min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (2.5% της μέγιστης) (Kanavouras και συν, 2007). Με άλλα λόγια η βασική ειδική δραστηριότητα της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν 10 φορές λιγότερη από την αντίστοιχη της wild-type hGDH2 ( $p < 0.01$ ) και ~100 φορές λιγότερη από την βασική ειδική δραστηριότητα της wild-type hGDH1.

Διαπιστώθηκε επίσης πως υπήρχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της ποσότητας της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 στο ρυθμιστικό διάλυμα

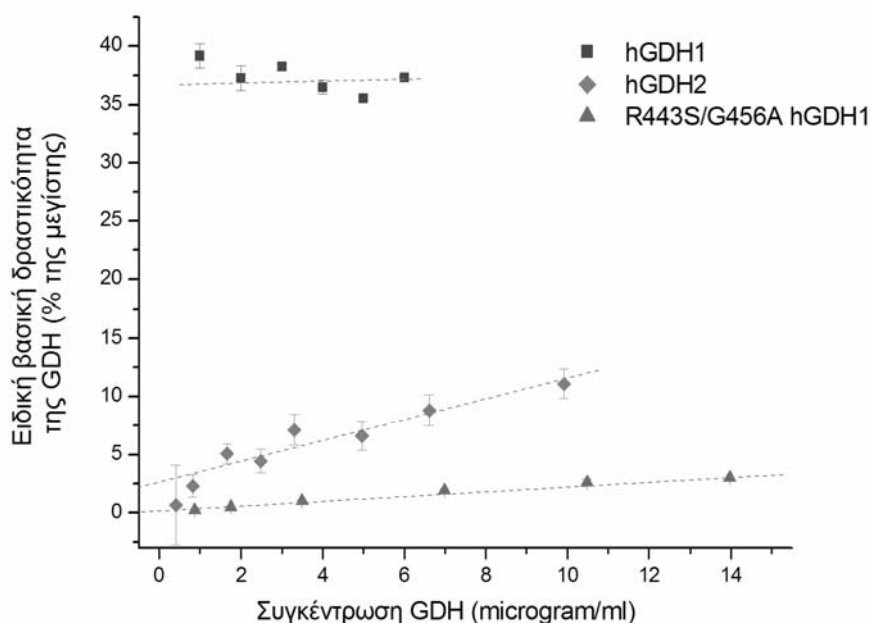


της αντίδρασης οξειδωτικής απαμίνωσης του α-κετογλουταρικού και της βασικής ειδικής δραστηριότητας (concentration dependence). Στη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 βασική ειδική δραστηριότητα αυξήθηκε από 0.25 % της μέγιστης σε συγκέντρωση ενζύμου 0.9 μg/ml σε 3 % της μέγιστης σε συγκέντρωση ενζύμου 13 μg/ml (Εικ. 21). Ο συντελεστής συσχέτισης R (correlation coefficient) ήταν 0.9890, ενώ η πιθανότητα (ότι ο R είναι μηδέν) ήταν  $p < 0.001$ . Η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης (slope of the regression line) που εκφράζει το ρυθμό μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου (σε  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) για κάθε αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου σε mg ήταν  $0.316 \pm 0.024$ , αρκετά πιο «επίπεδη» σε σύγκριση με την hGDH2 (Εικ. 20). Η βασική δραστηριότητα της wild-type hGDH1 δεν επηρεαζόταν από τη συγκέντρωση του ενζύμου στην αντίδραση (Εικ. 21) (Kanavouras και συν., 2007).

Όσον αφορά τις κινητικές ιδιότητες μελετήθηκαν η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα, η οποία ταυτίζεται με την μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης  $V_{\text{max}}$ , η σταθερά Michaelis-Menden ( $K_m$ ) καθώς και η σταθερά μετατροπής  $k_{\text{cat}}$  (turnover number). Διαπιστώθηκε πως οι δύο σημειακές αλλαγές (R443S & G456A) στο μόριο της wild-type hGDH1 δεν μεταβάλλουν ουσιαδώς την κινητική των αντιδράσεων τόσο προς την πλευρά της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού όσο και προς την πλευρά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού. Συγκεκριμένα η  $K_m$  για το γλουταμικό της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 υπολογίστηκε πως ήταν  $10.8 \pm 1.2 \text{ mM}$ , ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τις wild-type hGDH1 & 2 ήταν  $12.4 \pm 0.7$  και  $10.7 \pm 0.8$ . Η  $K_m$  για το α-κετογλουταρικό ήταν για την μεν διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1  $1.5 \pm 0.2$ , ενώ για τις wild-type hGDH1 & 2 ήταν  $2.0 \pm 0.2 \text{ mM}$  και  $2.1 \pm 0.3 \text{ mM}$  αντίστοιχα. (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.  $K_m$  για hGDH1, hGDH2, διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 και την Ser409Arg hGDH1 (παρουσία 1mM ADP)**

	$K_m \text{ (mM)} \pm \text{S.E.M.}$			
	a-KTG	NADPH	NH <sub>3</sub>	Glutamate
<b>hGDH1</b>	$2.0 \pm 0.2$	$199.8 \pm 23.4$	$13.4 \pm 0.7$	$12.4 \pm 0.7$
<b>hGDH2</b>	$2.1 \pm 0.3$	$160.7 \pm 26.4$	$17.1 \pm 2.0$	$10.7 \pm 0.8$
<b>R443S/G456A hGDH1</b>	$2.4 \pm 0.5$	$136.9 \pm 46.5$	$19.7 \pm 3.4$	$10.8 \pm 1.2$
<b>S409R hGDH1</b>	$1.2 \pm 0.1$	$149.6 \pm 20.1$	$8.98 \pm 0.7$	ND

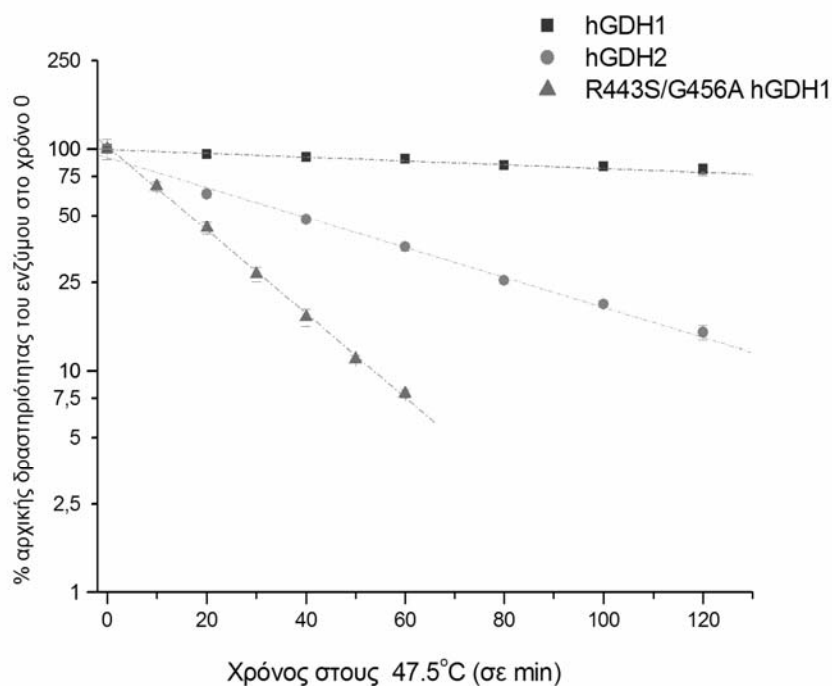


**Εικ. 21. Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην ειδική βασική δραστηριότητα των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1.** Οι ενζυμικές δοκιμασίες διενεργήθηκαν απουσία αλλοστερικών τροποποιητών στο standard διάλυμα αντίδρασης στους 25°C. Κάθε σημείο της γραφικής παράστασης αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± βασικών σφάλμα μέσου όρου (οι ράβδοι) από 3-6 πειραματικούς προσδιορισμούς. Οι τιμές του δείκτη συσχέτιση R (correlation coefficient) και της πιθανότητα p (πιθανότητα πως το R είναι μηδέν) της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Origin. Η κλίση της καμπύλης γραμμικής παλινδρόμησης αντιστοιχεί στο ρυθμό αύξησης της βασικής δραστηριότητας (ως ποσοστό % της μέγιστης βασικής δραστηριότητας, δηλαδή παρουσία 1mM ADP) συναρτήσει της ανά mg αυξανόμενης συγκέντρωσης του ενζύμου.

### **Ευαισθησία στη θερμότητα της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 και εν σχέσει με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH**

Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης, οι οποίες έγιναν επωάζοντας το ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° C επιβεβαίωσαν παλαιότερες παρατηρήσεις (Plaitakis και συν., 1984, Shashidharan και συν., 1997) πως η wild-type hGDH1 είναι θερμοανθεκτική (χρόνος ημίσειας ζωής = 348 minutes), ενώ η wild-type hGDH2 είναι θερμοευαίσθητη (χρόνος ημίσειας ζωής = 38 minutes) (Kanavouras και συν., 2007, Εικ. 22). Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποδείχθηκε θερμοευαίσθητη με χρόνο ημίσειας ζωής = 16.5

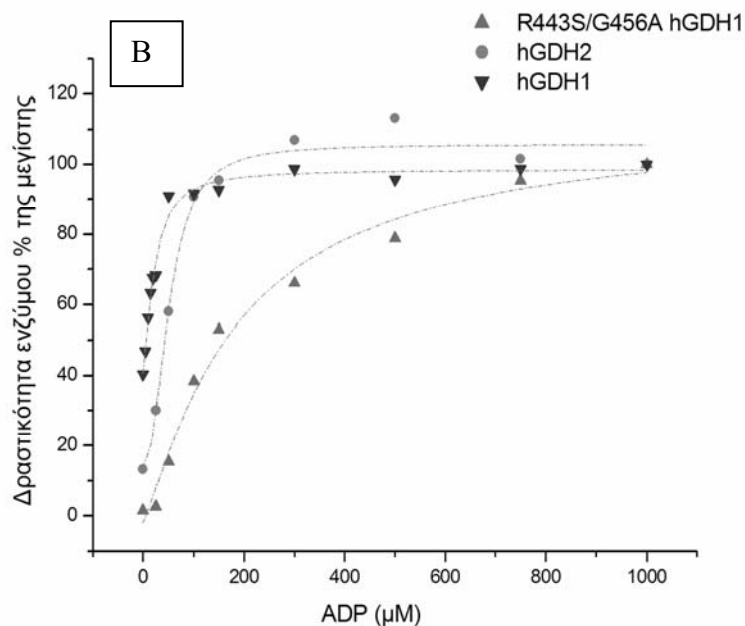
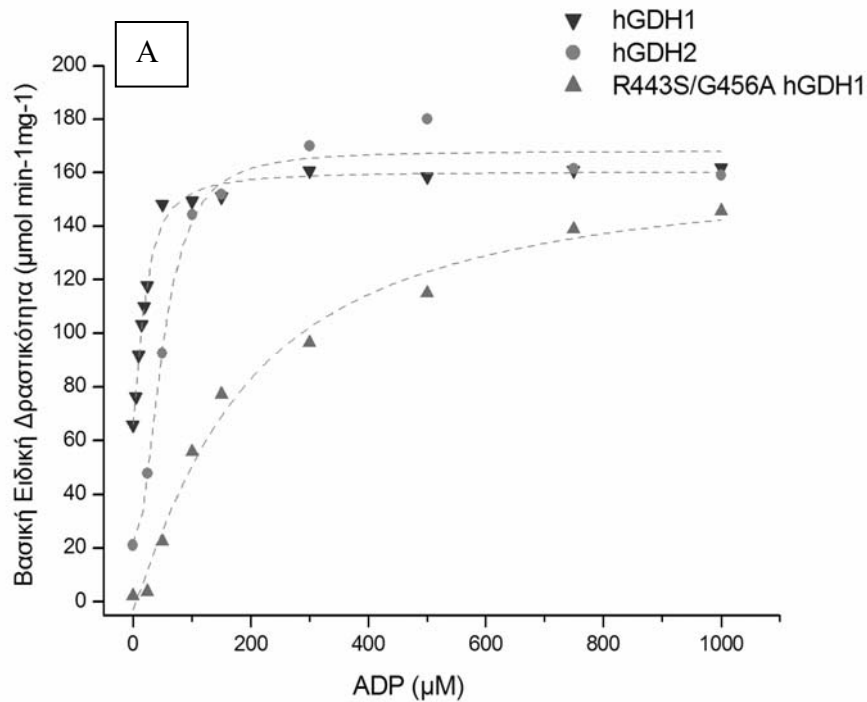
minutes, σχεδόν υποδιπλάσιο του αντίστοιχου χρόνου της wild-type hGDH2. Από την άλλη μεριά καθώς η θερμοευαισθησία της wild-type hGDH2 φαίνεται να οφείλεται στην αντικατάσταση της Arg443 από Ser (Yoon και συν, 2004) η μεταλλαγμένη Arg443Ser hGDH1 ήταν η πλέον ευαίσθητη στη θερμική αδρανοποίηση (χρόνος ημίσειας ζωής = 5 minutes) Kanavouras και συν., 2007).



**Εικ. 22.** Θερμοσταθερότητα των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1. Δείγματα καθαρισμένων ενζύμων (με περιεκτικότητα 40-60  $\mu\text{g/ml}$ ) αναμίχθηκαν 1:1 (vol/vol) με βόειο αλβουμίνη του ορού (BSA 4  $\text{mg/ml}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° C. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα απομακρύνονταν aliquots (10  $\mu\text{l}$ ) και μετρούνταν η ενζυμική δραστηριότητα προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού παρουσία 1mM ADP. Κάθε σημείο της γραφικής παράστασης αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή  $\pm$  βασικών σφάλμα μέσω όρου (οι ράβδοι) από 3 πειραματικούς προσδιορισμούς.

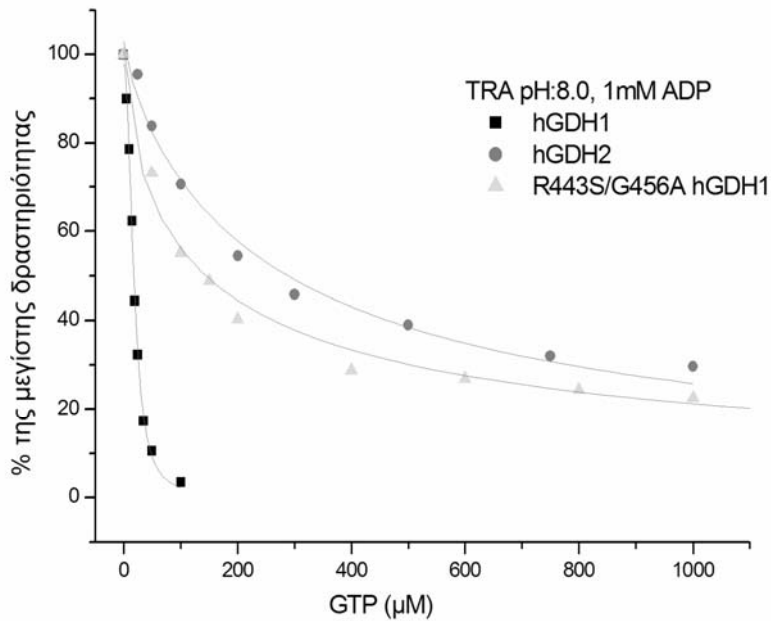
### **Αλλοστερικές ιδιότητες της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 εν σχέσει με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH**

Στην καθαρισμένη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 επιβεβαιώθηκαν οι ιδιότητες που παρατηρήθηκαν στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Καταρχάς αν και η βασική δραστηριότητα του ενζύμου ήταν πολύ χαμηλή (πρακτικώς μη μετρήσιμη), η προσθήκη ADP σε τελική συγκέντρωση 1mM οδήγησε σε πλήρη ενεργοποίηση της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1, με την μέγιστη ειδική δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου ( $145.7 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) να πλησιάζει αυτή της wild type hGDH1 ( $161.9 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) και της wild-type hGDH2 ( $159.1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) (Εικ. 23). Με άλλα λόγια η προσθήκη ADP (από 0.025 έως 1.0 mM) επήγε μία (εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του ADP) ενεργοποίηση της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 της τάξης των 5000-6000 %, η οποία είναι υπερτριπλάσια από την αντίστοιχη ADP-επαγόμενη αύξηση δραστηριότητας της wild type hGDH2 (της οποίας η αύξηση ήταν κατά 1,600 %) και υπερεικοσαπλάσια της αντίστοιχης αύξησης δραστηριότητας της wild type hGDH1 (της οποίας η αύξηση ήταν της τάξης του 235%) (Kanavouras και συν, 2007). Όμως η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ήταν σημαντικά λιγότερο ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από το ADP ( $SC_{50} = 188.4 \pm 40.4 \mu\text{M}$ ) σε σύγκριση με την wild-type hGDH1 ( $SC_{50} = 21.5 \pm 3.5 \mu\text{M}$ ) και την wild type hGDH2 ( $SC_{50} = 50.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$ ). Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH, αν και προσεγγίζει τον τρόπο συμπεριφοράς της wild type hGDH2, όσον αφορά την ενεργοποίηση από το ADP, δεν ταυτίζεται με το wild type ισοένζυμο. Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί πως η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από το ADP από την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ( $SC_{50} = 474.3 \pm 17.7 \mu\text{M}$  σύμφωνα με τους Kanavouras και συν, 2007 ή  $SC_{50} = 383.9 \pm 14.6$ , κατά τους Zaganas *et al*, 2002), γεγονός που υποσημαίνει πως η προσθήκη της σημειακής αλλαγής G456A «ευαισθητοποιεί» το διπλά μεταλλαγμένο ένζυμο ως προς την αλλοστερική τροποποίηση από το ADP.

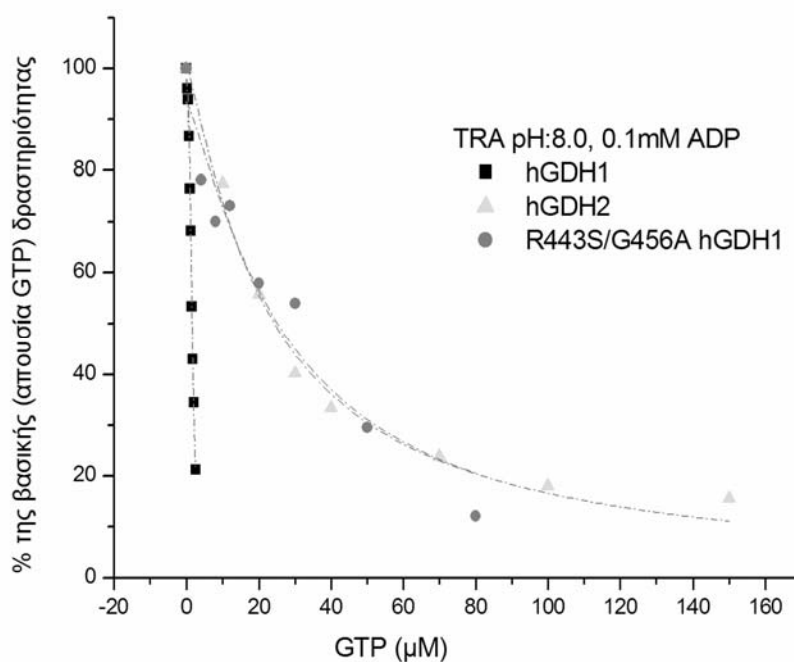


**Εικ. 23. Καμπύλες ενεργοποίησης από το ADP των καθαρισμένων wild type hGDH1, wild type hGDH2, και Arg443Ser/Gly456Ala διπλά μεταλλαγμένης hGDH1. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές από 3 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH (% της μεγίστης δηλαδή παρουσία 1mM ADP) μετρήθηκε στην πορεία της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP. Η δραστηριότητα των ενζύμων εκφράζεται στον κάθετο άξονα είτε ως ειδική δραστηριότητα σε  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (A) είτε ως ποσοστό επί της μεγίστης δραστηριότητας (ADP 1.0 mM, τελική συγκέντρωση) (B).**

Σε σχέση με την αναστολή από το GTP, η καθαρισμένη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποδείχθηκε πολύ ανθεκτική στη δράση του παρουσία ή απουσία του αλλοστερικού ενεργοποιητή. Συγκεκριμένα μελέτη των καμπυλών αναστολής από GTP έδειξε πως η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε ( $\mu$ M GTP) της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 απουσία ADP ήταν  $622.4 \pm 19.5$  δηλαδή  $>2000$  φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) της wild-type hGDH1 ( $0.31 \pm 0.03$ ) και 8 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) της wild-type hGDH2 ( $78.5 \pm 14.1$ ). Οι διαφορές ως προς την ευαισθησία στο GTP μεταξύ της διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 και των φυσιολογικών wild-type hGDH1 και wild-type hGDH2 παρέμεναν όταν η αναστολή από GTP μελετήθηκε σε παρουσία ADP (0.1 και 1.0 mM, τελική συγκέντρωση), αν και λιγότερο έντονες (Εικ. 24 και 25, Παράρτημα Πιν. 7). Συγκεκριμένα παρουσία ADP 0.1 mM η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε ( $\mu$ M GTP) της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν  $25.8 \pm 6.6$  όταν η αντίστοιχη  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) της wild-type hGDH2 ήταν  $23.9 \pm 2.2$  και της wild-type hGDH1  $1.61 \pm 0.02$  (16 φορές μικρότερη). Σε συγκέντρωση ADP 1.0 mM η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) σε ( $\mu$ M GTP) της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν  $139.4 \pm 21.0$ . Συγκριτικά η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) της wild-type hGDH2 ήταν παρόμοια ( $166.8 \pm 57.8$ ), ενώ της wild-type hGDH1 ήταν 7.5 φορές μικρότερη ( $18.5 \pm 0.5$ ). Παρατηρούμε, όπως και στις μελέτες αναστολής στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (crude extracts), η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 απέκτησε της ανθεκτικότητα στην αναστολή από το GTP του single mutant Gly456Ala hGDH1, του οποίου η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) ήταν  $121.35 \pm 14.89$   $\mu$ M GTP, επί παρουσίας 1mM ADP (Zaganas & Plaitakis, 2002). Από την άλλη μεριά προσεγγίζει τη συμπεριφορά του wild-type hGDH2 ισοενζύμου, αν και πάντα η  $IC_{50}$  του διπλά μεταλλαγμένου ενζύμου υπολείπεται κατά τι της  $IC_{50}$  της wild-type hGDH2 (εικ 24 και 25). Εξαιρέση αποτελεί η αναστολή απουσία ADP αλλά μάλλον σχετίζεται με την σημαντικά χαμηλότερη βασική δραστηριότητα της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1.



**Εικ. 24. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και R443S/G456A hGDH1 σε καθαρισμένες πρωτεΐνες παρουσία 1mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της μέγιστης (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP.



**Εικ. 25. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και R443S/G456A hGDH1 σε καθαρισμένες πρωτεΐνες παρουσία 0.1 mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP.

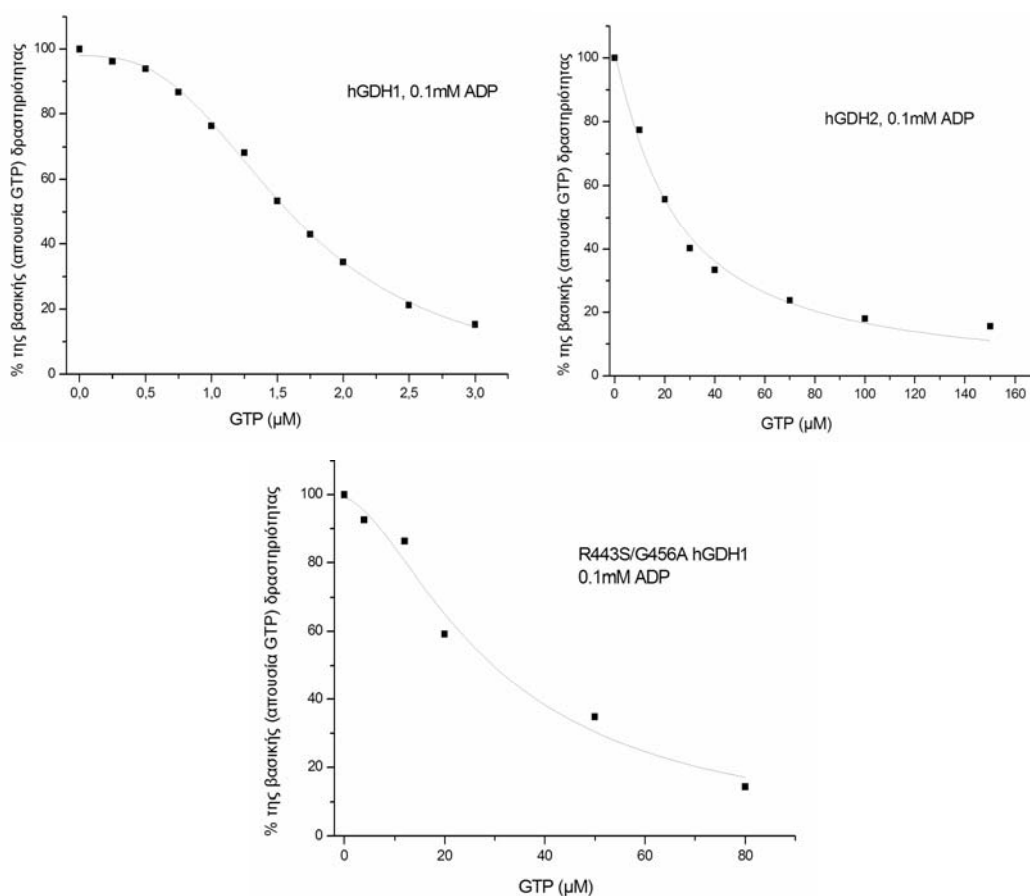
Αναλύσεις κατά Hill επίσης επιβεβαίωσαν ότι η αναστολή από GTP της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 δεν διαθέτει την συνεργατικότητα που έδειχνε η καθαρισμένη ανασυνδυασμένη wild-type hGDH1 και προσομοίαζε στην wild-type hGDH2 με τιμές του συντελεστή Hill δηλωτικές είτε μη συνεργατικότητας (~1) είτε αρνητικής συνεργατικότητας (<1). (Εικ. 26Α-Γ και Πίνακας 8). Ενδεικτικά σε συγκέντρωση 1mM ADP η τιμή του συντελεστή Hill ( $\pm$  SEM) της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 ήταν  $0.64 \pm 0.05$ , της wild-type hGDH2  $0.71 \pm 0.08$ , ενώ της wild-type hGDH1  $1.94 \pm 0.07$ .

**Πίνακας 8 Συντελεστές Hill των των wild-type hGDH1 και hGDH2 και των μεταλλαγμένων ισομορφών σε καθαρισμένες πρωτεΐνες**

Καθαρισμένες ισοπρωτεΐνες	Αναστολή από GTP		
	No ADP	0.1mM ADP	1mM ADP
<b>hGDH1</b>	1.51 $\pm$ 0.07	2.12 $\pm$ 0.15	1.94 $\pm$ 0.07
<b>hGDH2</b>	0.85 $\pm$ 0.14	1.08 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.08
<b>R443/G456A hGDH1</b>	0.67 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.19	0.64 $\pm$ 0.05
<b>G456A hGDH1(ΓΖ, ΔΔ)</b>	ND	ND	0.99 $\pm$ 0.07
<b>S409R hGDH1</b>	ND	1.03 $\pm$ 0.09	1,37 $\pm$ 0,13

Οι τιμές για τους συντελεστές Hill ( $\pm$  τυπική απόκλιση) αντιπροσωπεύουν την κλίση της καμπύλης γραμμικής παλινδρόμησης (Hill plot), η οποία κατασκευάστηκε με την εφαρμογή των δεδομένων της αναστολής από το GTP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ADP σύμφωνα με τη μέθοδο της Cornish-Bowden (1979). Οι υπολογισμοί έγιναν με την χρήση του προγράμματος Origin.



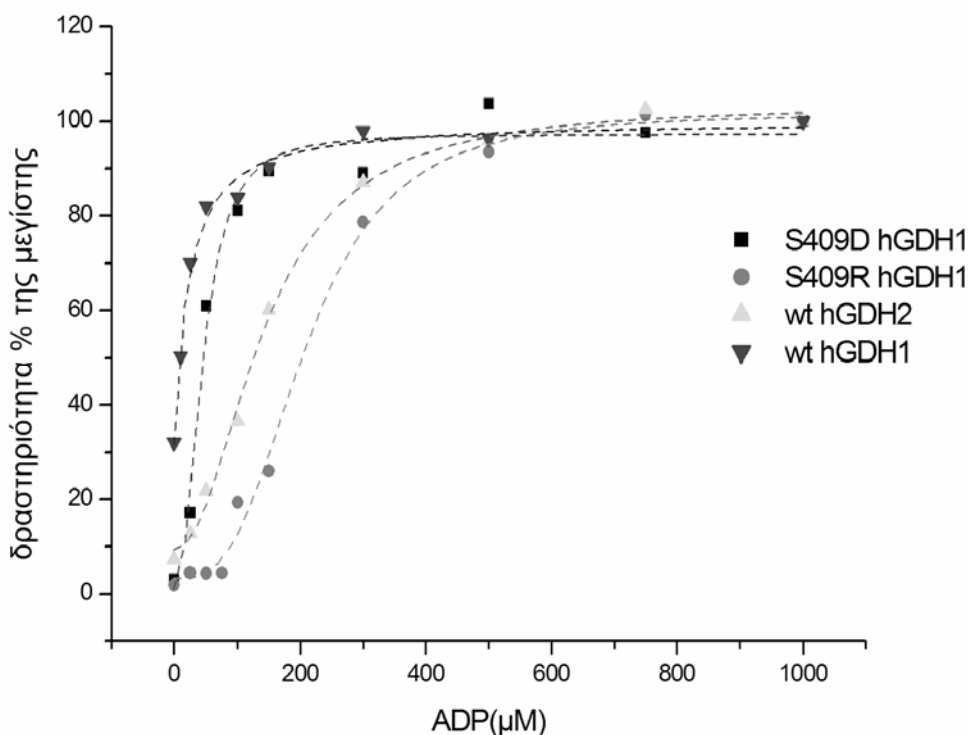


**Εικ. 26. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1(A), wild-type hGDH2 (B) και R443S/G456A hGDH1 (Γ) σε καθαρισμένες πρωτεΐνες παρουσία 0.1 mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP

## Μεταλλαγμένη SER409ARG hGDH1

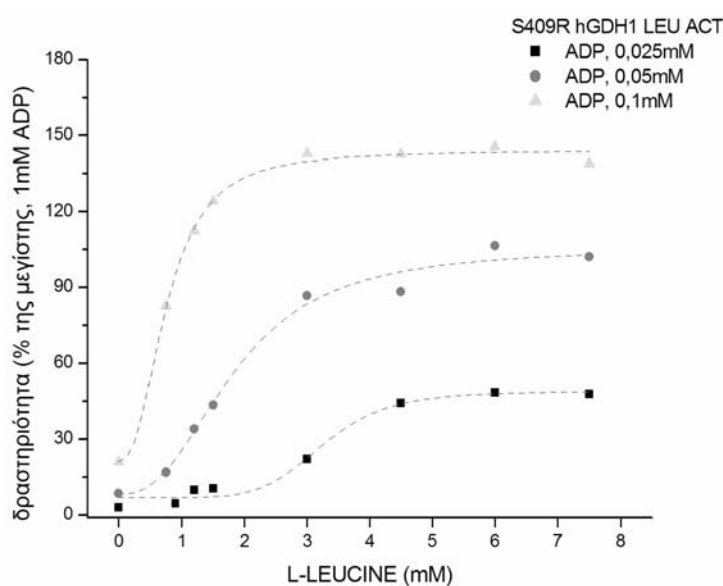
### Μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα

Ενζυμικές μελέτες σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν πως η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 παρουσίαζε βασική δραστηριότητα 1-3 % της μεγίστης (αντίστοιχη ήταν και η βασική δραστηριότητα, ~2.5-3 % της μεγίστης, στην μεταλλαγμένη Arg443Ser hGDH1). Η προσθήκη 1mM ADP επανέφερε την δραστηριότητα του ενζύμου στα επίπεδα της wild-type hGDH1 αλλά χρειαζόταν 8πλάσια συγκέντρωση του αλλοστερικού ενεργοποιητή για το αυτό αποτέλεσμα. Η  $SC_{50}$  της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 ήταν  $209.4 \pm 11.7$ , ενώ της wild-type hGDH1  $SC_{50} = 24.02 \pm 5.1$   $\mu$ M και της wild-type hGDH2  $SC_{50} = 143,2 \pm 7,7$   $\mu$ M ADP (Εικ. 27).



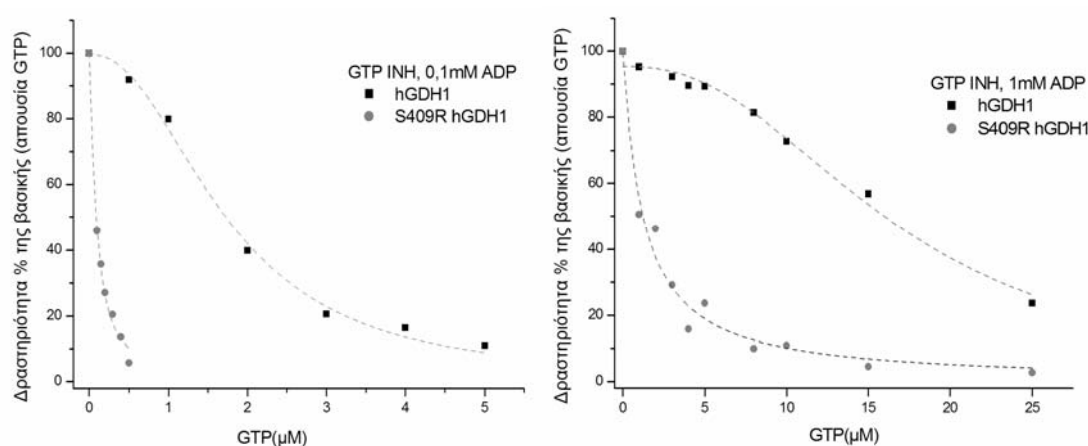
**Εικ. 27. Ενεργοποίηση από ADP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, S409R και S409D hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 4 πειραματικούς προσδιορισμούς (2 προσδιορισμούς για την wild-type hGDH1) και εκφράζονται ως ποσοστό της μεγίστης δραστηριότητας του κάθε ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

Η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 ήταν ανθεκτική στην ενεργοποίηση από λευκίνη (σε συγκεντρώσεις έως 10 mM) απουσία του άλλου αλλοστερικού ενεργοποιητή (ADP). Όμως η παρουσία ADP σε συγκεντρώσεις (0.01-0.1 mM) που μόλις ενεργοποιούσαν το ένζυμο είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση δραστηριότητας του μεταλλαγμένου ενζύμου (Πιν. 8 και Εικ. 28.). Συγκεκριμένα η προσθήκη λευκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (1ml TRA, pH 8.0) παρουσία 0.025 mM ADP αύξησε την δραστηριότητα της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 (σε σχέση με τη βασική δραστηριότητα, δηλαδή απουσία λευκίνης) κατά 1668 %, παρουσία 0.05 mM ADP κατά 1196 % και παρουσία 0.1 mM ADP κατά 665 %. Για σύγκριση η ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου ενζύμου παρουσία μόνο ADP ήταν 235 % για συγκέντρωση 0.025 mM ADP. Φαίνεται δηλαδή πως η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 αποκτά τη συμπεριφορά της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1 (Zaganas και συν., 2002β) και προσεγγίζει αυτήν της wild-type hGDH2 (Plaitakis και συν., 2000).



**Εικ. 28. Γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine παρουσία ADP σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα.** Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (25, 50 και 100  $\mu$ M), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 7.5 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση δραστηριότητα (ως ποσοστό % επί της μέγιστης, δηλαδή παρουσία 1mM ADP) από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.

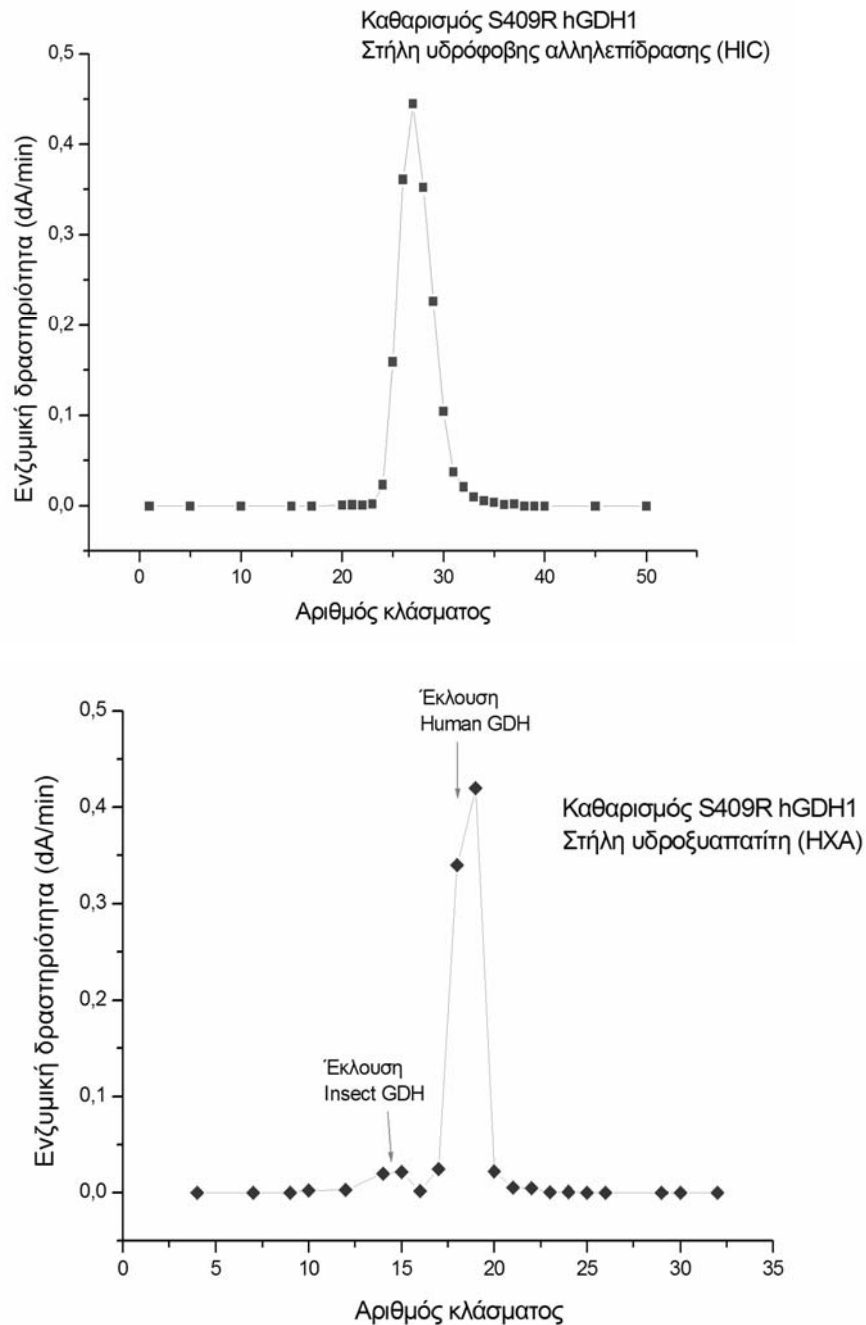
Όσον αφορά στην αναστολή από το GTP η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 έδειξε μια απρόσμενα υψηλή ευαισθησία στη δράση του. Παρά την παρουσία ADP σε 0.1 και 1.0 mM, τελική συγκέντρωση, το GTP σε χαμηλή συγκέντρωση ανάστειλε σχεδόν τελείως το ένζυμο. Οι  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) (σε  $\mu$ M GTP) ήταν  $0.096 \pm 0.01$  παρουσία ADP 0.1 mM και  $1.25 \pm 0.22$  παρουσία ADP 1 mM. Παρατηρούμε δηλαδή σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την wild-type hGDH1, της οποίας η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) (σε  $\mu$ M GTP) είναι περίπου 16 φορές μεγαλύτερη παρουσία ADP 0.1 mM ( $IC_{50} = 1.73 \pm 0.09$ ) και 13 φορές παρουσία ADP 1 mM ( $IC_{50} = 16.5 \pm 0.64$ ). Κατά συνέπεια διαφέρει και από την μεταλλαγμένη Arg443Ser hGDH1, η οποία επιδεικνύει συμπεριφορά παρόμοια με την wild-type hGDH1 ( $IC_{50} = 16.2 \pm 1.1$ ) (Zaganas και συν., 2002β). Επιπλέον το ένζυμο δεν εμφανίζει τη συνεργατική συμπεριφορά της wild-type hGDH1. Οι τιμές του συντελεστή Hill ήταν  $1,39 \pm 0,11$  στην αναστολή από GTP παρουσία ADP 0.1 mM και  $1,10 \pm 0,06$  παρουσία ADP 1 mM, ενδεικτικές απουσίας συνεργατικότητας, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την καμπύλη αναστολής (Εικ. 29), η οποία είναι υπερβολή σε αντίθεση με την σιγμοειδική καμπύλη της wild-type hGDH1.



**Εικ. 29. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1 και Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα παρουσία 0,1 και 1mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP

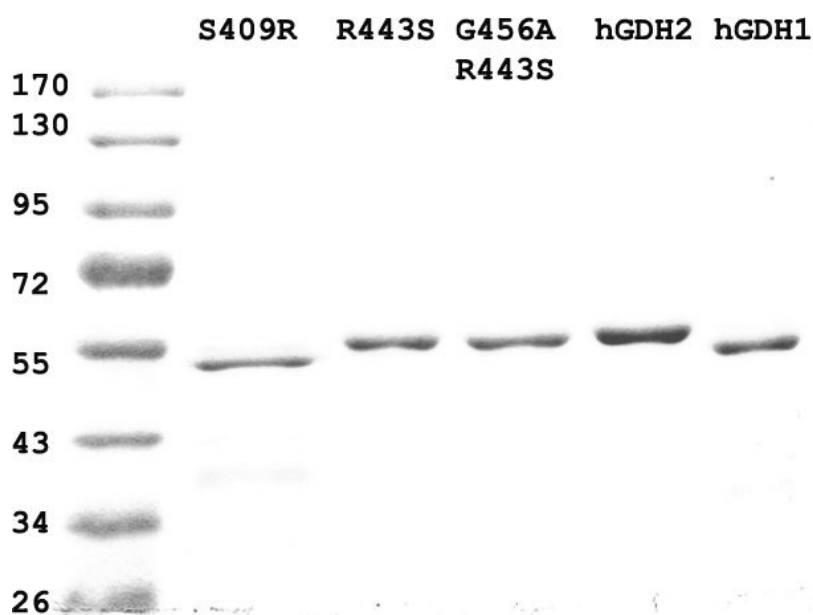
### Καθαρισμός μεταλλαγμένης SER409ARG hGDH1

Με τη μέθοδο καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε ανακτήθηκε στα καθαρισμένα κλάσματα περίπου το 45 % της αρχικής GDH δραστηριότητας που υπήρχε στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει τον διαχωρισμό της ενδογενούς GDH (των Sf21 κυττάρων) από την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη GDH μετά την έκλυση από τη στήλη του υδροξυαπατίτη (Εικ. 30β).



Εικ. 30. Διαδικασία καθαρισμού μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 από κυτταρικά εκχυλίσματα του εντόμου *Spodoptera frugiperda* με χρήση στηλών υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (α) και υδροξυαπατίτη (β).

Ανάλυση με 8.5 % SDS-PAGE των θετικών για GDH κλασμάτων που εκλούσθηκαν από τη στήλη υδροξυαπατίτη έδειξαν ότι το ένζυμο ήταν καθαρό σε ποσοστό >95 %. Το MB του μεταλλαγμένου ισοενζύμου ήταν ακριβώς το ίδιο με αυτό της wild-type hGDH1 αλλά ελαφρώς μικρότερο της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1 και της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 (Εικ. 31)



**Εικ. 31. 8.5 % SDS-PAGE ανάλυση των καθαρισμένων ισοενζύμων wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, μεταλλαγμένης R443S hGDH1 και διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1.**

### **Καταλυτικές και κινητικές ιδιότητες της μεταλλαγμένης SER409ARG hGDH1εν σχέση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH**

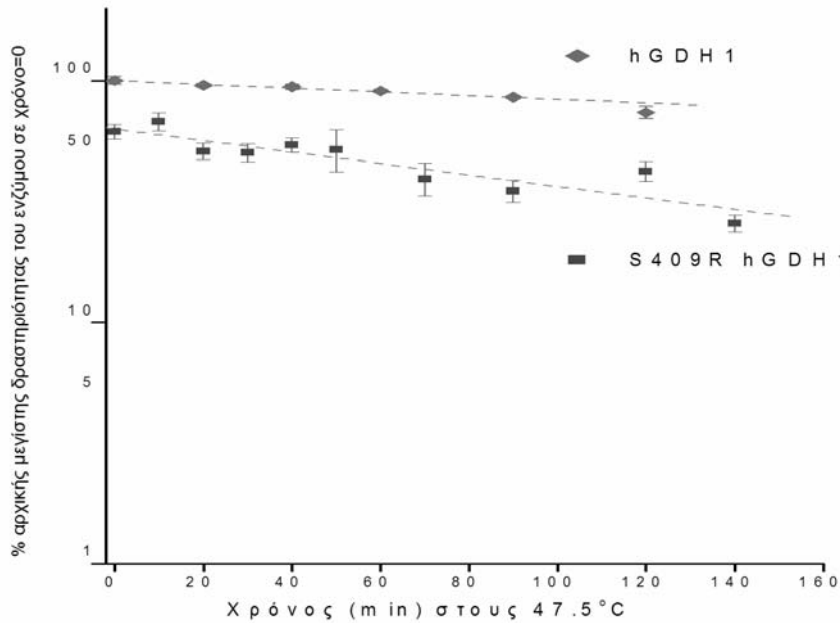
Στην καθαρισμένη πρωτεΐνη επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα που είχαν σημειωθεί στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Καταρχήν η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 εμφάνιζε ελάχιστη βασική δραστηριότητα απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών (ουσιαστικώς του ADP), σε αντίθεση με την wild-type hGDH1 (βασική δραστηριότητα ~40% της μεγίστης). Ενζυμικές αναλύσεις που έγιναν με παρουσία 0.8-1.0 μg καθαρισμένου μεταλλαγμένου ενζύμου /1ml TRA, ρυθμιστικού διαλύματος pH 8.0 στην κατεύθυνση της σύνθεσης γλουταμικού αποκάλυψαν ειδική βασική δραστηριότητα ~3,76 μmoles οξειδούμενου NADPH min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> (που αντιστοιχεί σε ποσοστό 2.7 % της μεγίστης, δηλαδή παρουσία ADP 1mM).. Σε κάθε

περίπτωση όμως με την προσθήκη στην αντίδραση ADP 1mM, η ειδική δραστηριότητα (specific activity) της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 ήταν 138,6  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  και προσέγγιζε την ειδική δραστηριότητα της wild-type hGDH1 (169.3  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) και της wild-type hGDH2 (164.2  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ). Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην μεταλλαγμένη Arg443Ser hGDH1 (ειδική δραστηριότητα σε ADP 1mM, 136,7  $\mu\text{moles οξειδούμενου NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ).

Οι καταλυτικές και κινητικές ιδιότητες της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 στην αντίδραση προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού (παρουσία 1mM ADP) δεν διέφεραν ουσιαστικά από τις αντίστοιχες των wild-type hGDH1 & 2. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7 η σταθερά Michaelis-Menden  $K_m$  ( $\pm$  SEM) για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, το NADPH και το Ammonium Acetate ήταν περίπου 10-30% χαμηλότερη από τις αντίστοιχες  $K_m$  της wild-type hGDH1. Ας υπομνηστεί πως και οι κινητικές ιδιότητες της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1 δεν διαφοροποιούνταν σε σχέση με την wild-type hGDH1 (Zaganas και συν., 2002β). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν πως η αλλαγή της Arg σε Ser στη θέση 443 με την επακόλουθη διάσπαση του δεσμού H μεταξύ της Arg443 με την Ser409 στο μόριο της wild-type hGDH1 δεν επηρεάζει την κινητική της αντίδρασης που καταλύει η γλουταμική αφυδρογονάση.

### **Ευαισθησία στη θερμότητα της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 και εν σχέσει με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH**

Διαπιστώθηκε πως η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 ήταν ανθεκτική στην θερμική αδρανοποίηση, επιδεικνύοντας συμπεριφορά ανάλογη της wild-type hGDH1. Συγκεκριμένα επωάζοντας το ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° C και μετρώντας την ταχύτητα της αντίδρασης στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού (παρουσία 1mM ADP), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, ο χρόνος ημίσειας ζωής του μεταλλαγμένου ενζύμου ήταν 239.7 min (Εικ. 32). Ως μάρτυρα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε την ανασυνδυασμένη wild-type hGDH1, της οποίας ο χρόνος ημίσειας ζωής ήταν 394.1 min (Εικ. 32), σε συμφωνία με πρόσφατες (Καναβούρας και συν., 2007) και παλαιότερες (Plaitakis και συν., 1984, Shashidharan και συν., 1997) παρατηρήσεις.



**Εικ. 32. Θερμοσταθερότητα των wild-type hGDH1 και μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1.** Δείγματα καθαρισμένων ενζύμων (με περιεκτικότητα 40-60 μg/ml) αναμίχθηκαν 1:1 (vol/vol) με βόειο αλβουμίνη του ορού (BSA 4 mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, στους 47.5° C. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα απομακρύνονταν aliquots (10 μl) και μετρώνταν η ενζυμική δραστηριότητα προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία 1mM ADP. Κάθε σημείο της γραφικής παράστασης αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± βασικών σφάλμα μέσου όρου (οι ράβδοι) από τουλάχιστον 3 (έως και 7 για την Ser409Arg hGDH1) πειραματικούς προσδιορισμούς.

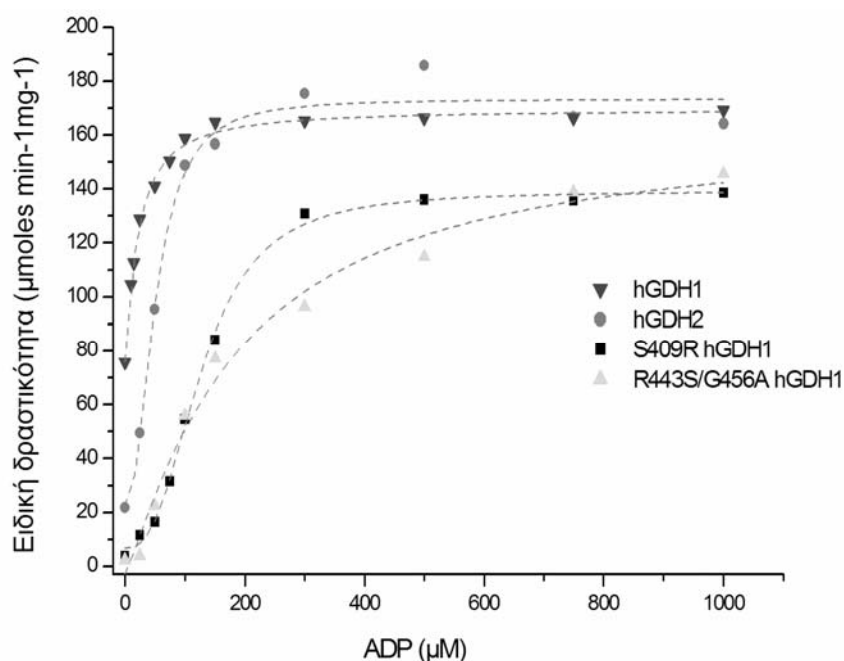
### Αλλοστερικές ιδιότητες της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 εν σχέσει με τις φυσιολογικές ανθρώπινες GDH

Στην καθαρισμένη μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 επιβεβαιώθηκαν οι παρατηρήσεις όσον αφορά την αλλοστερική τροποποίηση της συμπεριφοράς του ενζύμου από το ADP, GTP και L-λευκίνη που διαπιστώθηκαν στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα.

Συγκεκριμένα, παρά την πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα, η προσθήκη ADP ενεργοποιούσε τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, ούτως ώστε σε συνθήκες μέγιστης ενεργοποίησης να αποκτά ειδική δραστηριότητα παρόμοια των wild-type hGDH1 & 2. Χρειαζόταν όμως σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα ADP για την ενεργοποίηση της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 ( $SC_{50} = 127.5 \pm 4.1 \mu M$ ). Παρατηρείται δηλαδή περίπου 6 φορές μικρότερη ευαισθησία στη δράση του ADP σε σχέση με την wild-



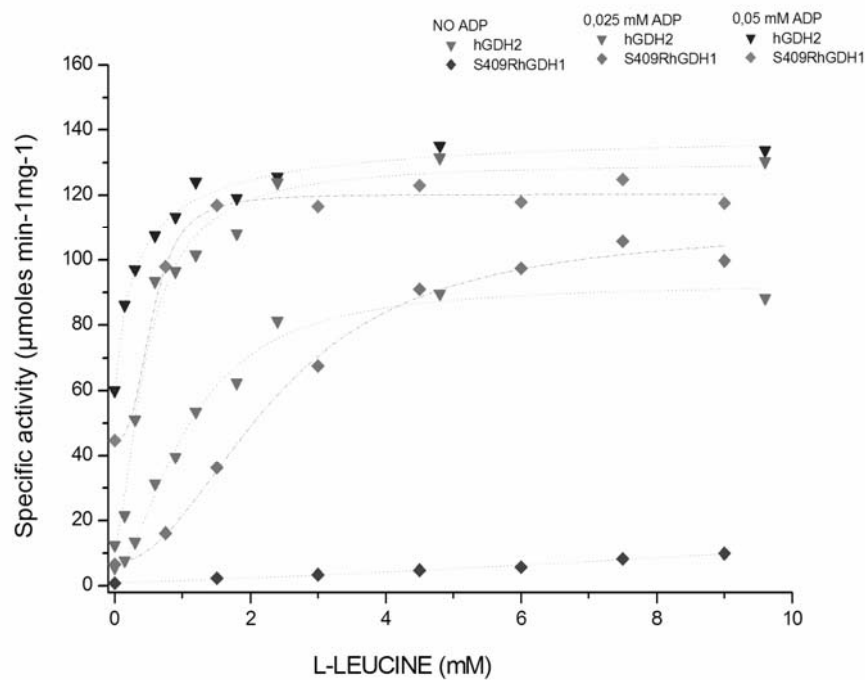
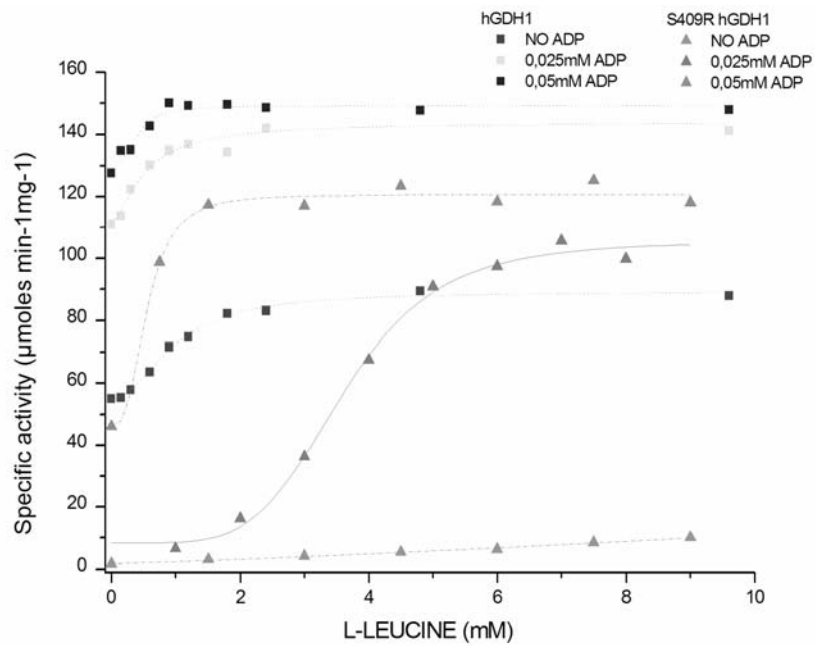
type hGDH1 ( $SC_{50} = 21.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ), ενώ σχεδόν διπλάσια είναι η τιμή της  $SC_{50}$  σε σχέση με την αντίστοιχη της wild-type hGDH2 ( $50.7 \pm 5.3 \text{ mM}$ ). (Εικ. 33). Για παράδειγμα ενώ συγκέντρωση  $0.1 \text{ mM ADP}$  προκαλεί σχεδόν μέγιστη ενεργοποίηση (~93 % της μεγίστης) της wild-type hGDH1, ενεργοποιεί την μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 μόνο κατά ~40 % της μεγίστης δραστηριότητας. Αντίστοιχα σε  $0.1 \text{ mM ADP}$  η ειδική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 παρέμενε <10 % περίπου της αντίστοιχης της wild-type GDH (Zaganas και συν., 2002β). Οι τιμές  $SC_{50}$  για την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ( $SC_{50} = 383.9 \pm 14.6 \mu\text{M}$ ) ήταν περίπου τρεις φορές υψηλότερες από εκείνες μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1. Η προσθήκη ADP προκαλεί αύξηση >3,500% στη βασική ειδική δραστηριότητα της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1, όταν η αντίστοιχη αύξηση είναι ~225 % για την wild-type hGDH1 και ~ 1,500 % για την wild-type hGDH2. Ενδεικτικά στην Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 η αύξηση της βασικής ειδικής δραστηριότητας είναι >10,000 %.



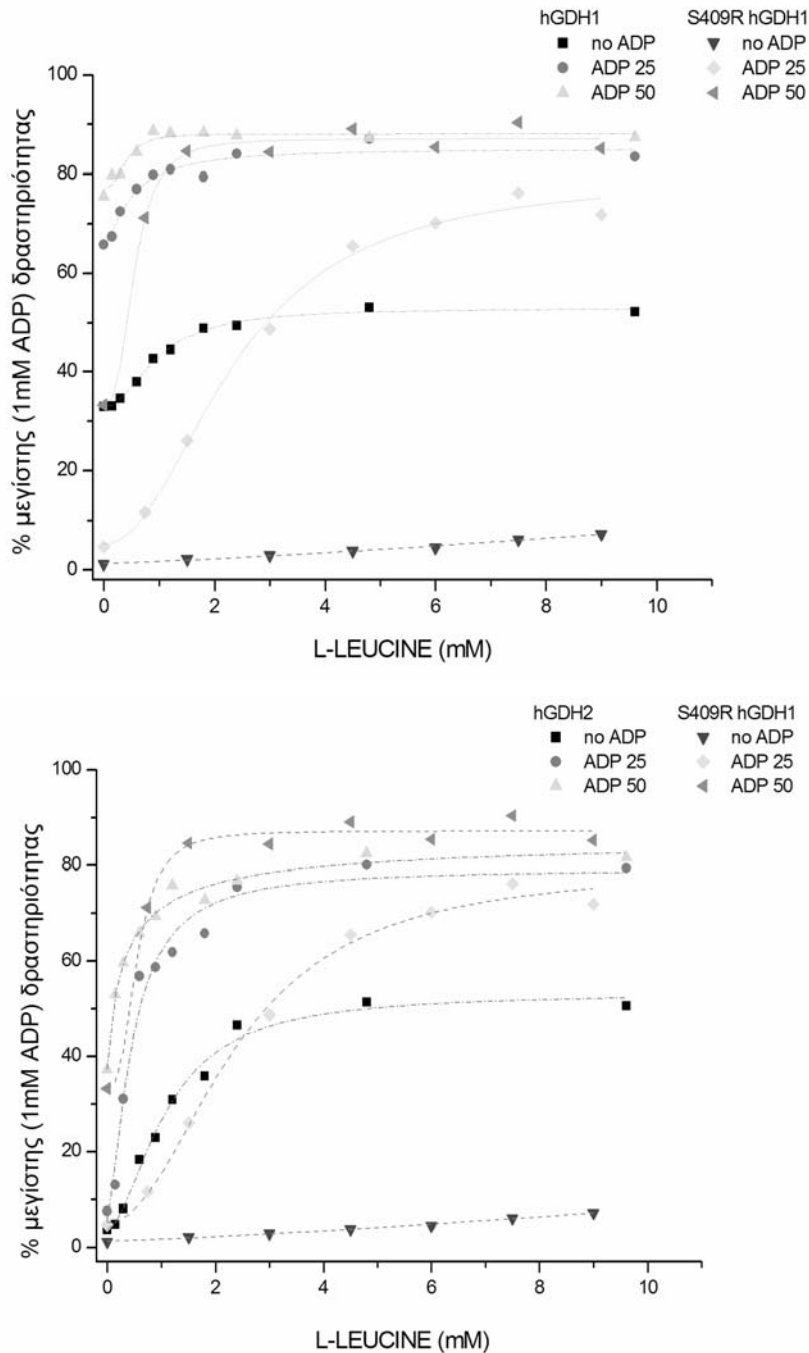
**Εικ. 33. Καμπύλες ενεργοποίησης από το ADP των καθαρismένων wt hGDH1, wt hGDH2, Arg443Ser/Gly456Ala διπλά μεταλλαγμένης hGDH1 και Ser409Arg hGDH1.** Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές από 3 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH (% της μεγίστης δηλαδή παρουσία  $1 \text{ mM ADP}$ ) μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP. Η δραστηριότητα των ενζύμων εκφράζεται στον κάθετο άξονα ως ειδική δραστηριότητα σε  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

Όσον αφορά στην ενεργοποίηση από τον έτερο αλλοστερικό τροποποιητή την L-λευκίνη, η Ser409Arg hGDH1 ήταν πρακτικά ανθεκτική στη δράση της (1-10mM τελική συγκέντρωση) απουσία του ADP. Η προσθήκη όμως μικρών ποσοτήτων (0.01-0,1 mM ADP) ευαισθητοποιούσε το μεταλλαγμένο ένζυμο στην δράση της λευκίνης. Όπως φαίνεται στις εικόνες 34 και 35, η L-λευκίνη προκαλεί σε παρουσία ADP μία εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της λευκίνης ενεργοποίηση της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1, η οποία είναι αναλογικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της wild-type hGDH1 και προσεγγίζει τον τρόπο ενεργοποίησης της hGDH2. Συγκεκριμένα (για παράδειγμα) παρουσία 0,025 mM ADP η wild-type hGDH1 ενεργοποιούνταν από την L-λευκίνη (1-10mM τελική συγκέντρωση) κατά 127 %, όταν η Ser409Arg hGDH1 στις ίδιες συνθήκες ενεργοποιούνταν κατά 1518 % και η wild-type hGDH2 κατά 1043 % (Πίνακας 9).

Κατά συνέπεια η συνεργική δράση της L-λευκίνης με το ADP, η οποία είχε παρατηρηθεί στις φυσιολογικές GDH, (πλέον έντονη στη wild-type hGDH2) (Plaitakis και συν., 2000; Μαστοροδήμος Master thesis MΠΝ, 2003; Kanavouras και συν., 2007), είναι εμφανής και στη μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1. Η συνέργεια καθίσταται πλέον έκδηλη στις χαμηλές συγκεντρώσεις του ADP (0,01-0,025 mM), όπως φαίνεται από την μορφή των καμπυλών ενεργοποίησης, οι οποίες από σιγμοειδικές (στις μικρότερες συγκεντρώσεις) γίνονται υπερβολικές στις μεγαλύτερες (Εικόνες 34 και 35). Επίσης οι τιμές της  $SC_{50}$  ( $\pm$  S.E.M) για την L-λευκίνη ελαττώνονται σημαντικά καθώς από  $1,98 \pm 0,6$  mM (παρουσία 0,01 mM ADP) και  $2,4 \pm 0,21$  (παρουσία 0,025 mM ADP) σε συγκέντρωση παρουσία 0,05 mM ADP γίνεται 4 φορές μικρότερη ( $0,55 \pm 0,1$  mM). Αυτό πιθανόν οφείλεται και στο γεγονός πως σε συγκεντρώσεις ADP  $> 0,05$  mM παρατηρούμε σημαντικού βαθμού ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου ενζύμου (τετραπλασιασμό της βασικής ειδικής δραστηριότητας). Πάντως αξίζει να σημειωθεί πως σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων του ADP (0.01-0,1 mM ADP) που χρησιμοποιήσαμε, παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του ADP και της L-λευκίνης, καθώς η ενεργότητα της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 υπερβαίνει κατά πολύ αυτής που παρατηρείται από μόνη την επίδραση του ADP. Η ελάττωση της  $SC_{50}$  αυξανόμενης της συγκέντρωσης ADP στην αντίδραση παρατηρείται και στις φυσιολογικές ανασυνδυασμένες wild-type hGDH1 & 2 (Πίνακας 10) και μάλιστα με τον ίδιο ρυθμό (υποδιπλασιασμό) παρά το διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης των 2 ισοενζύμων (Plaitakis και συν., 2000, Μαστοροδήμος Master thesis MΠΝ, 2003).



**Εικ. 34. Γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης των wild-type hGDH1 και 2 έναντι της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine παρουσία ADP. Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (0, 25 και 50 M), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 10 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση ειδική δραστηριότητα από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην πορεία της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.**



**Εικ. 35. Γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης των wild-type hGDH1 και 2 έναντι της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine παρουσία ADP.** Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (0, 25 και 50 M), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 10 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση δραστηριότητα των ισοεζύμων ως ποσοστό % της μέγιστης δραστηριότητας (παρουσία 1mM ADP) από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.

**Πίνακας 9. % αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των καθαρσιμένων wt hGDH1, wt hGDH2, και Ser409Arg hGDH1 με την μέγιστη ενεργοποίηση από την L-λευκίνη (10 Mm) σε σύγκριση με τη δραστηριότητα απουσία λευκίνης (βασική δραστηριότητα).**

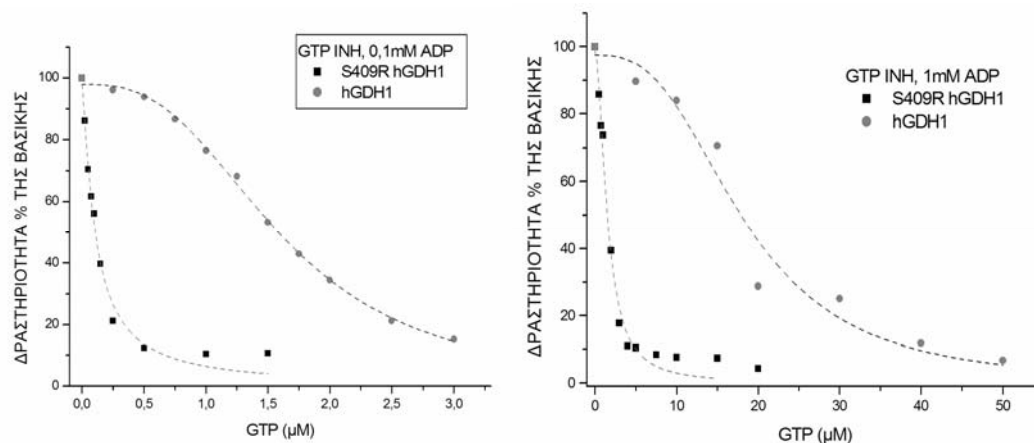
	<b>Απουσία ADP</b>	<b>25 μM ADP</b>	<b>50 μM ADP</b>
	<i>Αύξηση δραστηριότητας % της βασικής (χωρίς λευκίνη)</i>		
<b>hGDH1</b>	158.6 %	127 %	115.7 %
<b>hGDH1</b>	1358.6 %	1042.7 %	219.1 %
<b>S409R</b>	-	1518.6 %	256.1 %

**Πίνακας 10. Ενεργοποίηση των καθαρσιμένων wt hGDH1, wt hGDH2, και Ser409Arg hGDH1 από L-λευκίνη.** Ο υπολογισμός των τιμών  $SC_{50}$  ( $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσου όρου- SEM) έγινε από τις γραφικές παραστάσεις ενεργοποίησης από αυξανόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης παρουσία σταθερών συγκεντρώσεων ADP (όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία) με χρήση του προγράμματος Origin (Microcal Software). Κάθε σημείο της γραφικής παράστασης αντιπροσώπευε τη μέση τιμή από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Τα δεδομένα που αφορούν τις wt hGDH1 και wt hGDH2 προέρχονται από το άρθρο των Kanavouras και συν., 2007(τονισμένοι χαρακτήρες) και από την προηγούμενη διπλωματική μας εργασία (Μαστοροδήμος ΜΔΕ/ ΜΠΝ (Master thesis) 2003) (πλάγια γραφή).

	<b>hGDH1</b>	<b>hGDH2</b>	<b>S409R</b>
	<b>L-leucine <math>SC_{50}</math> (<math>\pm</math> S.E.M) (mM)</b>		
Απουσία ADP	<b>0.979 <math>\pm</math> 0.055</b> <i>0.93<math>\pm</math>0.35</i>	<b>1.092 <math>\pm</math> 0.095</b> <i>1.01<math>\pm</math>0.21</i>	0
10 μM ADP	ND <i>1.49<math>\pm</math>0,22</i>	ND <i>1.2<math>\pm</math>0.11</i>	1.976 $\pm$ 0.57
25 μM ADP	<b>0.493 <math>\pm</math> 0.123</b> <i>0.86<math>\pm</math>0,15</i>	<b>0.455 <math>\pm</math> 0.07</b> <i>0.69<math>\pm</math>0.08</i>	2.4 $\pm$ 0.21
50 μM ADP	<b>0.393 <math>\pm</math> 0.082</b> <i>0.61<math>\pm</math>0.09</i>	<b>0.362 <math>\pm</math> 0.079</b> <i>0.43<math>\pm</math>0.04</i>	0.553 $\pm$ 0.1

Οι μελέτες αναστολής από το GTP στην καθαρσιμένη Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Η Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη στην δράση του GTP σε σύγκριση με την φυσιολογική hGDH1. Η  $IC_{50}$  ( $\pm$

SEM) (σε  $\mu\text{M}$  GTP) του μεταλλαγμένου ενζύμου ήταν  $0.11 \pm 0.01$   $\mu\text{M}$  παρουσία ADP 0.1 mM και  $1.55 \pm 0.12$  παρουσία ADP 1 mM (Εικόνα 36). Δηλαδή παρατηρούμε πως η Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 είναι 15 φορές πιο ευαίσθητη από την wild-type hGDH1 ( $\text{IC}_{50} = 1.61 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ) παρουσία ADP 0.1 mM και 12 φορές πιο ευαίσθητη σε σχέση με την wild-type hGDH1 ( $\text{IC}_{50} = 18.22 \pm 1.8$   $\mu\text{M}$ ) επί παρουσίας ADP 1 mM. Η μελέτη αναστολής απουσία ενεργοποιητή δεν ήταν εφικτή λόγω της πολύ χαμηλής βασικής δραστηριότητας του ενζύμου.



**Εικ. 36. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1 και Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 σε καθαρισμένες πρωτεΐνες παρουσία 0,1 και 1mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP

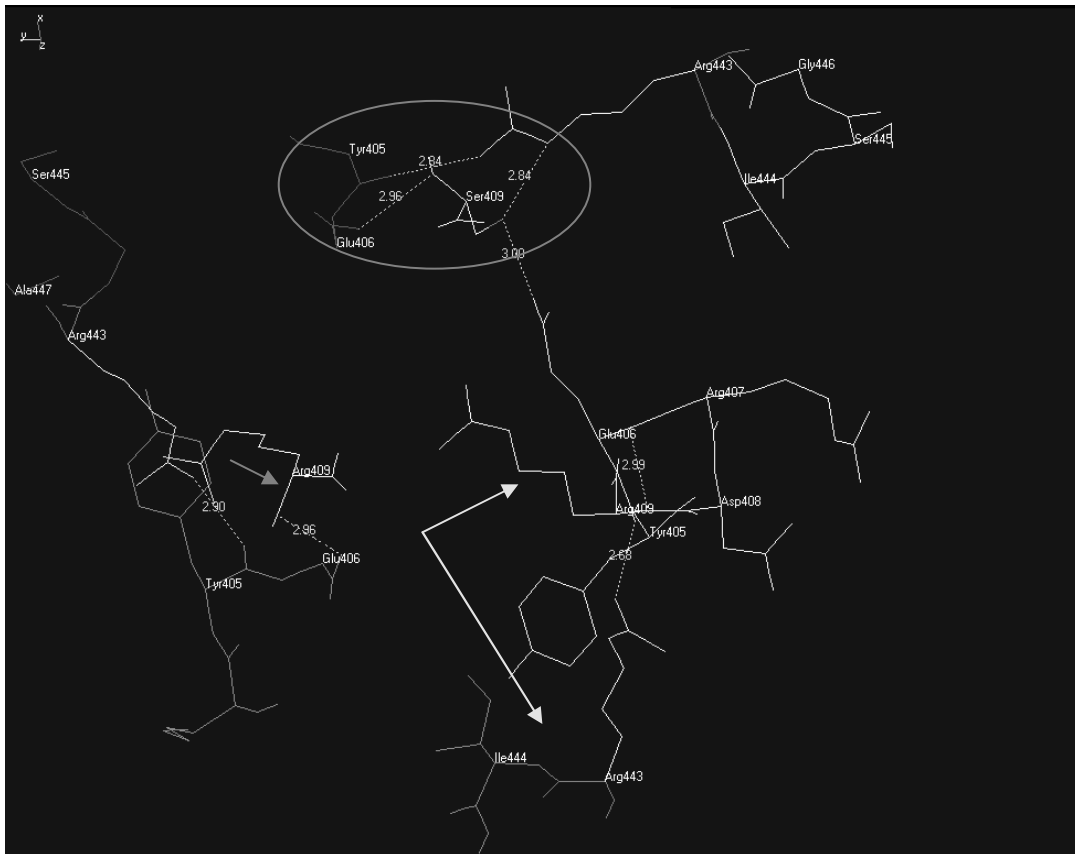
Συνεπώς η μεταλλαγμένη S409R hGDH1 δεν ακολουθεί τη συμπεριφορά της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1, όσον αφορά την αναστολή από το GTP. Θυμίζουμε πως η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 δεν διαφοροποιείται από την wild-type hGDH1 ως προς την αλλοστερική ρύθμιση από το GTP (Ζαγανάς και συν , 2002β). Παρά την αυξημένη ευαισθησία όμως η μετάλλαξη Ser409Arg κατήργησε την συνεργατική συμπεριφορά του ενζύμου (Εικόνα 36). Η αναστολή από GTP της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1, επί παρουσίας ADP 0.1 και 1 mM δεν περιγράφεται από την χαρακτηριστική σιγμοειδική καμπύλη της wild type hGDH1. Οι τιμές του συντελεστή Hill ήταν  $1.03 \pm 0.09$  στην αναστολή από GTP παρουσία

ADP 0.1 mM και  $1,37 \pm 0,13$  παρουσία ADP 1 mM είναι ενδεικτικές μη συνεργατικής συμπεριφοράς (Πίνακας 8).

Συμπερασματικώς η Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνισε πολύ χαμηλή βασική ειδική δραστηριότητα, η οποία αποκαθίστατο στα επίπεδα των φυσιολογικών ανασυνδυασμένων GDH ισοενζύμων με την επίδραση του ADP. Ήταν ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση (χρόνος ημίσειας ζωής = 239.7 min). Όσον αφορά την επίδραση των αλλοστερικών τροποποιητών, παρουσίαζε σημαντική ανθεκτικότητα στη δράση του ADP ( $SC_{50} = 127.5 \pm 4.1 \mu\text{M}$ ) και ήταν ανθεκτική στην ενεργοποίηση από λευκίνη απουσία ADP. Μολαταύτα η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ADP (25-100 $\mu\text{M}$ ) ευαισθητοποιούσε το μεταλλαγμένο ένζυμο στη δράση της λευκίνης (συνεργική δράση ADP-λευκίνης). Τέλος ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την wild type hGDH1 (αλλά και την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1) στην αναστολή από το GTP.

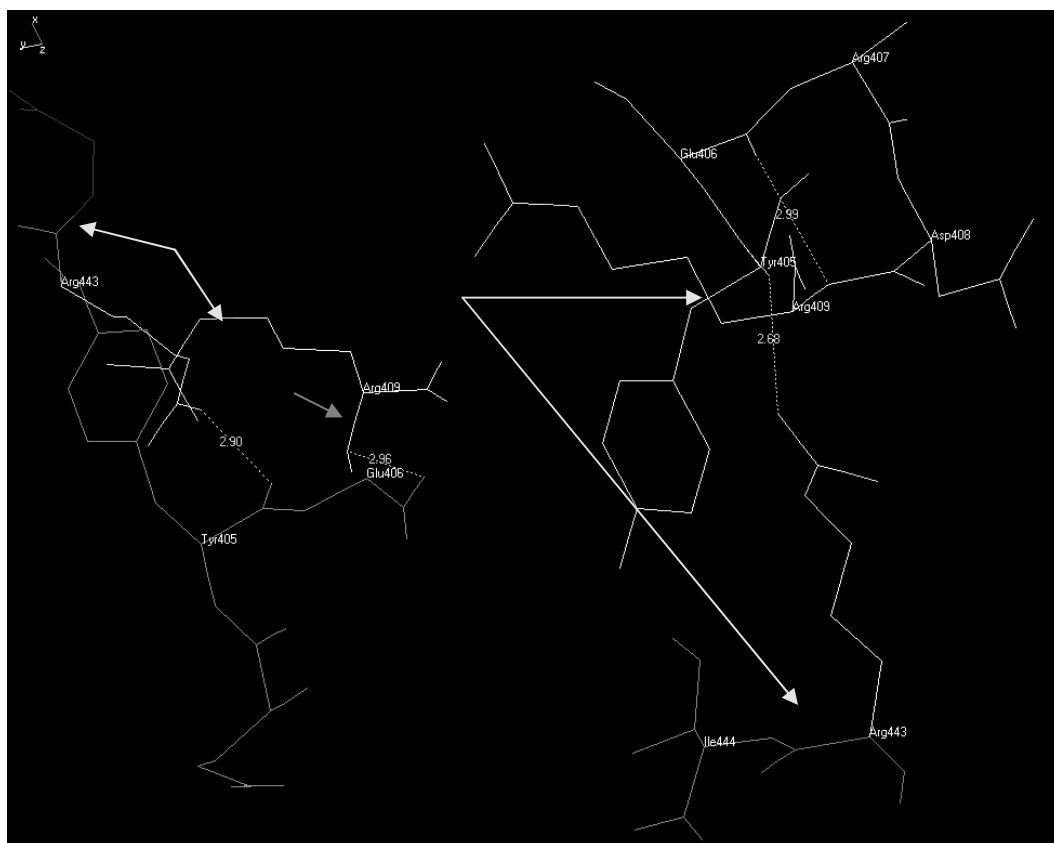
### Δομική Ανάλυση

Μελέτη της δομής της ανθρώπινης wild type hGDH1 δείχνει ότι η Arg443 βρίσκεται στην περιοχή του ενζύμου που μοιάζει με κεραία (αντένα). Όπως φαίνεται στην εικόνα 13 και 36, η Arg443 βρίσκεται κοντά στη συμβολή της αντένας με την έλικα περιστροφής (pivot helix), η οποία έχει δειχθεί ότι περιστρέφεται κατά τη διάρκεια της κίνησης της περιοχής πρόσδεσης  $\text{NAD}^+$  που συμβαίνει κατά την πρόσδεση του υποστρώματος. Στη Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 εισαγωγή της πλευρικής αλυσίδας της Ser443 υποδηλώνει ότι αυτή η αμινοξική αλλαγή μπορεί να καταστρέφει δυνητικούς υδρογονικούς δεσμούς που υπάρχουν μεταξύ της Arg443 μίας υπομονάδος με την Ser409 μίας γειτονικής υπομονάδα πιθανόν με την παρεμβολή μορίου ύδατος (Zaganas et al, 2002, Εικ. 13). Ομοίως η αλλαγή της Ser409 σε Arg φαίνεται πως εξαλείφει το δεσμό H μεταξύ Arg443 και Ser409 και ίσως δημιουργεί νέο δεσμό άλατος με το παρακείμενο αμινοξύ Glu406 (απόσταση 2.96 $\text{\AA}$ ) (Εικ. 36 και 37). Επίσης φαίνεται να δημιουργεί στερεοταξικές συγκρούσεις (steric clashes) (εικ 38) με το κατάλοιπο Glu406 παρακείμενης υπομονάδας (ή και με τη Arg443 της παρακείμενης αλυσίδας) και κυρίως με το κατάλοιπο Tyr405 της ίδιας υπομονάδας. Η υπολογιζόμενη απόσταση μεταξύ Arg 409 και Glu406 είναι 2.11 (ή 1.99 σε άλλη στερεοδιαμόρφωση, rotamer)  $\text{\AA}$ , ενώ μεταξύ Arg 409 και Arg443 2.31  $\text{\AA}$ . Όσον αφορά την επίδραση της σημειακής αλλαγής στην αναστολή από το GTP δεν κατέστη δυνατό στην παρούσα δομική ανάλυση να ευρεθεί επαρκής εξήγηση.

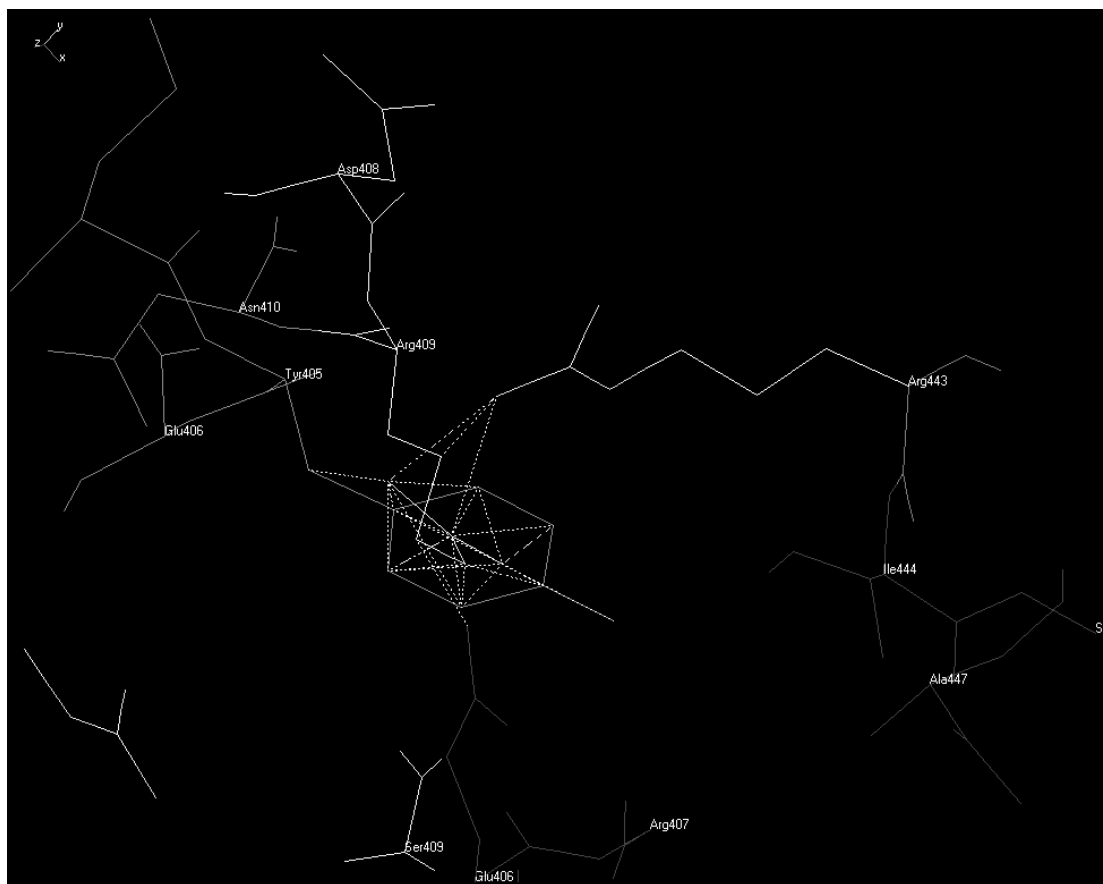


**Εικ. 36. Δομική προσομοίωση της αλληλεπίδρασης της Arg443 της κατιούσης έλικας με την Ser409 της ανιούσης έλικας της “αντένας” παρακείμενης υπομονάδας στην απομορφώτης ανθρώπινης GDH (PDB:1LIF) . Απεικονίζονται για λόγους απλότητας τμήματα 3 υπομονάδων της εξαμερούς hGDH με διαφορετικά χρώματα (μπλε, κίτρινο και magenta). Με κόκκινο απεικονίζεται η Arg443, με πορτοκαλί η Ser409, ως ribbon οι πλευρικές άλυστοι των Ser409 και Arg443 και με πράσινες στικτές γραμμές οι δυνητικοί δεσμοί υδρογόνου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις αποστάσεις μεταξύ των αμινοξέων σε Ångstrom. Εντός της κόκκινης έλλειψης απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Arg443, Ser409 και Tyr405 στην wt hGDH1. Με το κόκκινο βέλος απεικονίζεται ο δυνητικός δεσμός H μεταξύ Arg409 (στη Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1) και Glu 406. Με τα κυανά βέλη απεικονίζεται η πιθανή απώλεια δεσμού H μεταξύ Arg443 και Arg409. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με χρήση του προγράμματος DeepView Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>)**





**Εικ. 37. Δομική προσομοίωση της αλληλεπίδρασης της Arg443 της κατιούσης έλικας με την μεταλλαγμένη Arg409 (από Ser409) της ανιούσης έλικας της “αντέννας” παρακείμενης υπομονάδας στην απομορφή της ανθρώπινης GDH (PDB:1LIF) σε μεγέθυνση.** Απεικονίζονται για λόγους απλότητας τμήματα 3 υπομονάδων της εξαμερούς hGDH με διαφορετικά χρώματα (μπλε, κίτρινο και magenta). Με κόκκινο απεικονίζεται η Arg443, με πορτοκαλί η Arg409, ως ribbon οι πλευρικές άλυσιοι των Arg409 και Arg443 και με πράσινες στικτές γραμμές οι δυνητικοί δεσμοί υδρογόνου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις αποστάσεις μεταξύ των αμινοξέων σε Ångstrom. Με το κόκκινο βέλος απεικονίζεται ο δυνητικός δεσμός H μεταξύ Arg409 και Glu 406. Με τα κυανά βέλη απεικονίζεται η πιθανή απώλεια δεσμού H μεταξύ Arg443 και Arg409. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με χρήση του προγράμματος DeepView – Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).



**Εικ. 38.** Δομική προσομοίωση των στερεοταξικών συγκρούσεων (steric clashes) της Arg443 της κατιούσης έλικας με την μεταλλαγμένη Arg409 (από Ser409) της ανιούσης έλικας της “αντέννας” παρακείμενης υπομονάδας στην απομορφή της ανθρώπινης GDH (PDB:1LIF) σε μεγέθυνση. Απεικονίζονται για λόγους απλότητας τμήματα δύο υπομονάδων της εξαμερούς hGDH με διαφορετικά χρώματα (μπλε και magenta). Με κόκκινο απεικονίζεται η Arg443, με πορτοκαλί η Arg409, ως ribbon οι πλευρικές άλυστοι των Arg409 και Arg443 και με μωβ στικτές γραμμές οι δυνητικές στερεοταξικές συγκρούσεις μεταξύ Arg409 Glu406 και Tyr405. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με χρήση του προγράμματος DeepView – Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

## Μεταλλαγμένη SER409ASP hGDH1

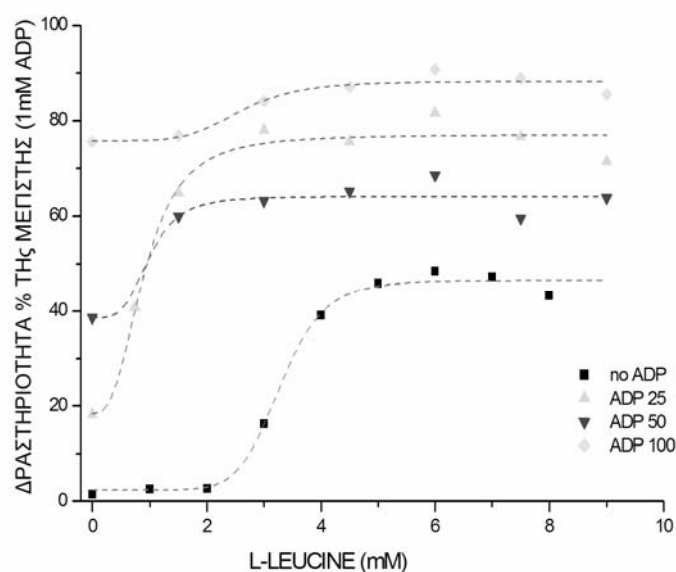
### Ενζυμικές μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα

Τα αποτελέσματα στην Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1, που αφορούσαν στην αλλοστερική ρύθμιση του μεταλλαγμένου ισοενζύμου (σε συνάφεια με το γεγονός τη αλληλεπίδρασης με την Arg443) μας ώθησαν στην περαιτέρω μελέτη σημειακών αλλαγών στη θέση 409. Ο σκοπός ήταν να διακριβωθεί κατά πόσον τα αποτελέσματα της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 ήταν «τυχαία» ή έχουν αιτιώδη σχέση με τη θέση αυτή και τις αλληλεπιδράσεις με άλλες θέσεις στο μόριο της GDH. Έτσι μεταλλάξαμε τη Ser409 σε Asp, υποθέτοντας πως η αλλαγή μπορεί να συμβάλλει σε δεσμούς H ή ιοντικούς δεσμούς (salt bridges) με τη Arg443.

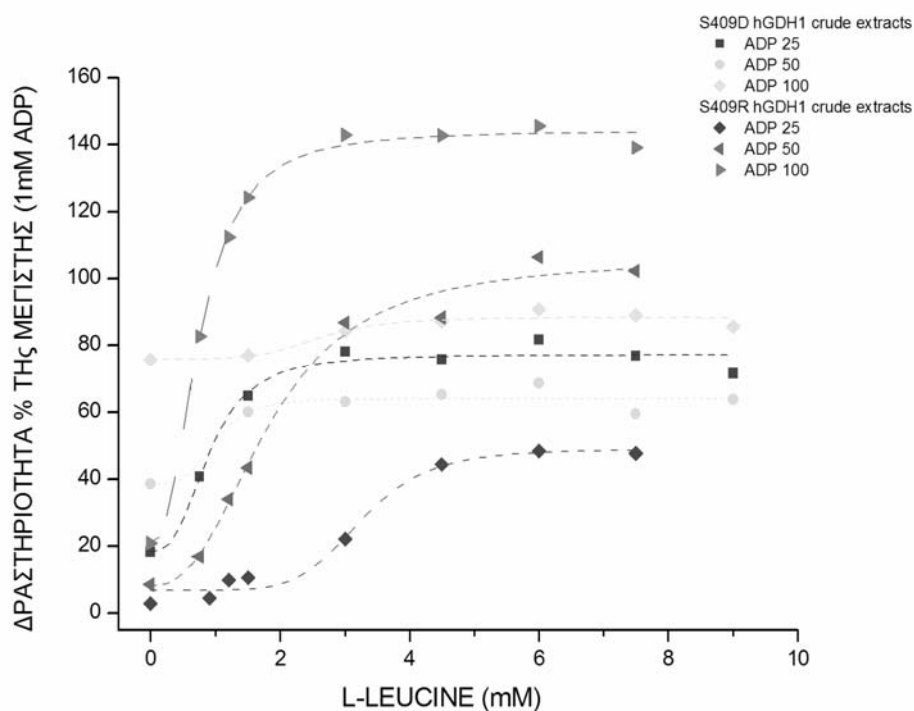
Η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνιζε βασική δραστηριότητα, η οποία ήταν 3-5 % της μεγίστης (δηλαδή παρουσία 1mM ADP). Η χαμηλή αυτή βασική δραστηριότητα (συγκρινόμενη σε σύγχρονες ενζυμικές μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα με τις υπόλοιπες φυσιολογικές GDHs και τα μεταλλαγμένα ισοένζυμα) υπολείπεται σαφώς της βασικής δραστηριότητας (B.Δ) της wild-type hGDH1 (~ 40 % της μεγίστης). Προσεγγίζει όμως τη ΒΔ της wild-type hGDH2 (5-10 % της μεγίστης) και προσομοιάζει με τη ΒΔ της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 (1-3 %) και της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 (2.5-3 %). Όμως η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 επιδεικνύει ευαισθησία στο ADP ενδιάμεση της wild-type hGDH1 και της wild-type hGDH2. Συγκεκριμένα η  $SC_{50}$  της μεταλλαγμένης Ser409Asp hGDH1 ήταν  $44.4 \pm 4.9 \mu\text{M ADP}$ , δηλαδή περίπου διπλάσια της wild-type hGDH1 ( $SC_{50} = 24.02 \pm 5.1 \mu\text{M}$ ) και περίπου το 1/3 της wild-type hGDH2 ( $SC_{50} = 143,2 \pm 7,7 \mu\text{M ADP}$ ) (Εικ. 27). Διαφέρει σημαντικά από την Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 ( $SC_{50} = 209.4 \pm 11.7$ ) και από την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ( $SC_{50} = 405.6 \pm 14.8$ , Zaganas και συν, 2002b).

Όσον αφορά την ευοδωτική δράση της L-λευκίνης στη δραστηριότητα της, η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνιζε ευαισθησία στη δράση της ενδιάμεση της wild-type hGDH2 και της wild-type hGDH1 και αρκετά διάφορη από τη Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1. (Εικ 39 και 40). Έτσι σε αντίθεση με την Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 ήταν ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από τη λευκίνη απουσία ADP. Προσθήκη L-leucine (0,75- 9 mM τελική συγκέντρωση) προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του μεταλλαγμένου ενζύμου κατά περίπου

1,600 % (σε σχέση με τη βασική δραστηριότητα), ποσοστό εφάμιλλο της wild-type hGDH2 (Plaitakis et al, 2000). Επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP (0.01-0.1 mM) εμφάνιζε μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε σχέση με την ενεργοποίηση από μόνο το ADP (συνέργεια ADP και L-λευκίνης). Για παράδειγμα σε συγκεντρώσεις 0.025 mM and 0.05 mM ADP η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου (σε σύγκριση με τη βασική δραστηριότητα) ήταν περίπου 580 % και 2,050 % αντίστοιχα. Στις αυτές συγκεντρώσεις ADP προσθήκη L-leucine (έως 9 mM τελική συγκέντρωση) αύξησε τη δραστηριότητα του ενζύμου κατά 2,700 % και 2,400 % αντίστοιχα. Όπως όμως γίνεται φανερό σε συγκεντρώσεις ADP >0.05 mM ελαχιστοποιούνταν η συνεργική δράση των δύο τροποποιητών (η καμπύλη ενεργοποίησης γινόταν υπερβολή από σιγμοειδής). Θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως στις χαμηλές συγκεντρώσεις ADP (0.01-0.05 mM) η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 συμπεριφερόταν περισσότερο σαν wild-type hGDH2 (και σε μικρότερο βαθμό σαν Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1), ενώ στις συγκεντρώσεις ADP (>0.05 mM) σαν wild-type hGDH1.



**Εικ. 39. Γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης της Ser409Asp μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine απουσία και παρουσία ADP.** Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (0, 25, 50 και 100  $\mu$ M), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 9 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση δραστηριότητα (ως ποσοστό % επί της μεγίστης, δηλαδή παρουσία 1mM ADP) από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.

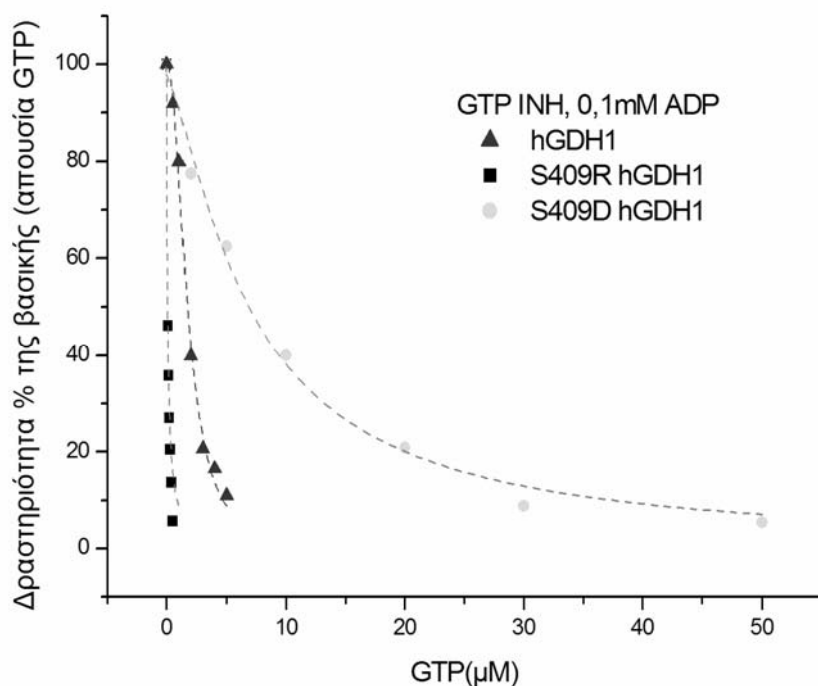


**Εικ. 40.** Σύγκριση αλλοστερικής ρύθμισης της Ser409Asp Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1 από L-leucine παρουσία ADP. Σε κάθε σειρά πειραμάτων (αντιπροσωπεύεται από διαφορετική καμπύλη), οι συγκεντρώσεις ADP παρέμεναν σταθερές (25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ), ενώ η συγκέντρωση της L-leucine κυμαινόταν μεταξύ 0 και 9 mM. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση δραστηριότητα (ως ποσοστό % επί της μέγιστης, δηλαδή παρουσία 1mM ADP) από 2 τουλάχιστον πειραματικούς προσδιορισμούς. Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε στην φορά της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε TRA ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.

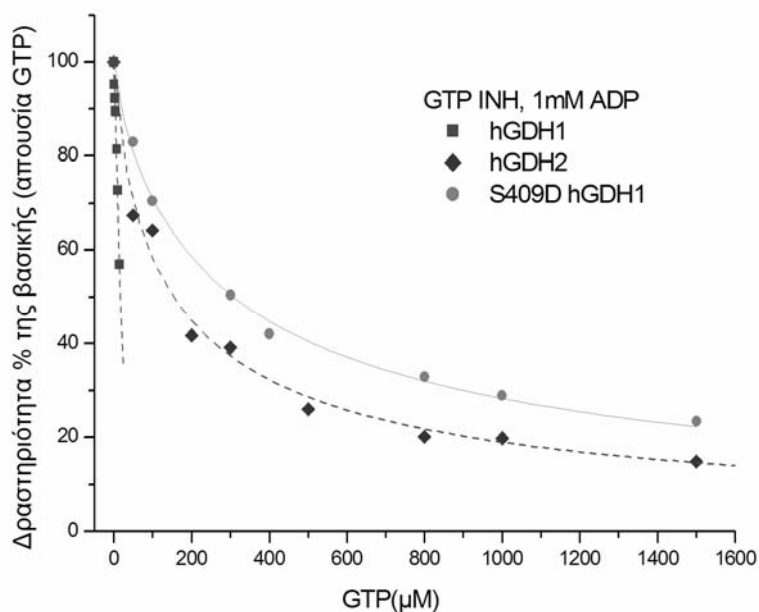
Η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνισε στα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα μια απρόσμενα υψηλή ανθεκτικότητα στην αναστολή από το GTP. Συγκεκριμένα σε παρουσία ADP 0.1 mM η  $\text{IC}_{50}$  ( $\pm$  SEM) (σε  $\mu\text{M}$  GTP) του μεταλλαγμένου ενζύμου ήταν  $7.09 \pm 0,73 \mu\text{M}$  και  $303.05 \pm 19,5$  παρουσία ADP 1 mM (υπενθυμίζεται πως λόγω πολύ χαμηλής βασικής δραστηριότητας δεν ήταν εφικτή η μελέτη αναστολής απουσία ADP). Οι τιμές αυτές (αλλά και οι αντίστοιχες καμπύλες αναστολής) προσομοιάζουν στη wild-type hGDH2, ενώ διαφέρουν σημαντικά από την wild-type hGDH1 (Εικ. 41 και 42).

Παρατηρούμε δηλαδή πως η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 είναι περίπου 4 φορές ανθεκτικότερη στη δράση του GTP σε σχέση με την wild-type hGDH1, της

οποίας η  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM), παρουσία ADP 0.1 mM, ήταν  $1.73 \pm 0.09$   $\mu$ M GTP και περίπου 18 φορές σε συγκέντρωση ADP 1 mM (wild-type hGDH1  $IC_{50} = 16.5 \pm 0.64$ ). Οι αντίστοιχες τιμές  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM), παρουσία 1mM, της wild-type hGDH2 είναι  $154.8 \pm 18.9$   $\mu$ M GTP (εναλλακτικώς παρουσία ADP 0.1 και 1mM  $51,4 \pm 6,8$   $\mu$ M GTP) και  $394,25 \pm 32.1$   $\mu$ M GTP, Μαστοροδήμος ΜΔΕ/ΜΠΝ, 2003).



**Εικ. 41. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, Ser409Asp και Ser409Arg μεταλλαγμένων hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα παρουσία 0,1 mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP.



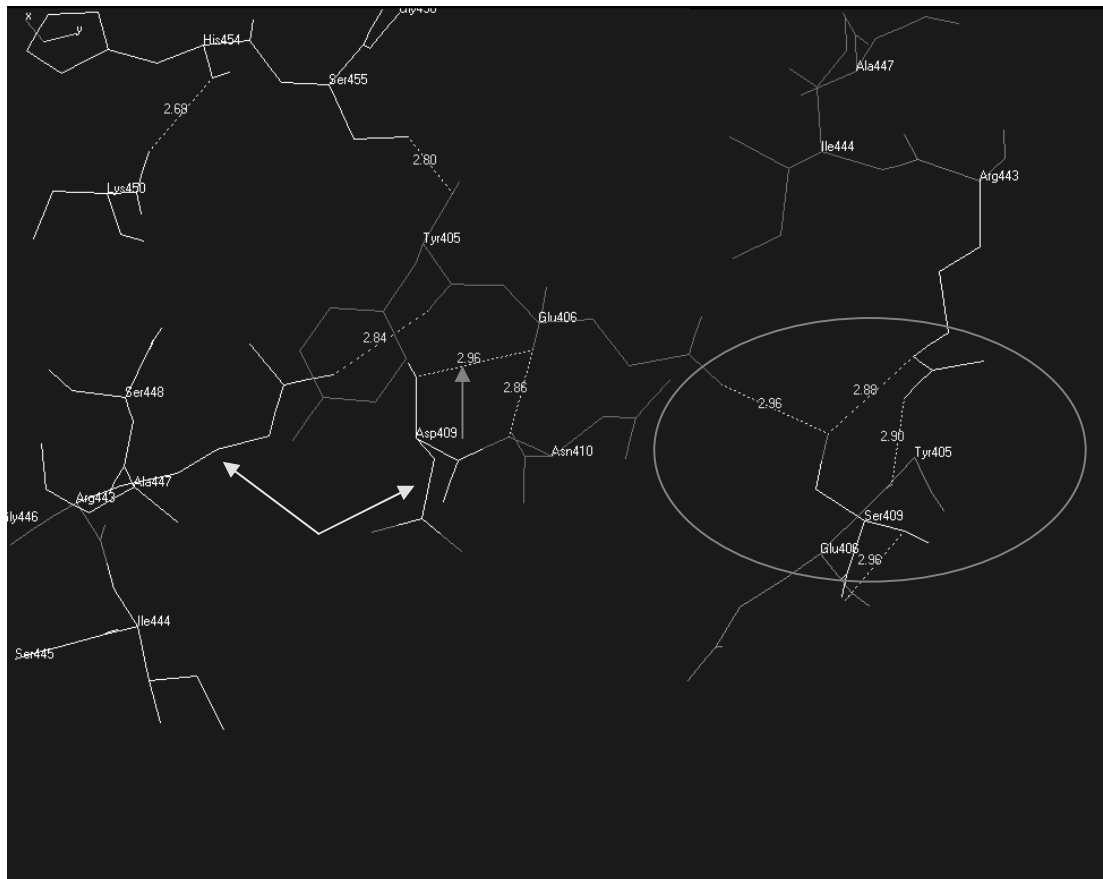
**Εικ. 42. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2 και Ser409Asp μεταλλαγμένης hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα παρουσία 1mM ADP.** Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τουλάχιστον 2 πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής (χωρίς GTP) δραστηριότητας του ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίστηκε στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού σε 50 mM, TRA pH 8.0 ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων GTP

Επιπλέον ως αναμένονταν η ανάλυση κατά Hill των αποτελεσμάτων της αναστολής από το GTP κατέδειξε την κατάργηση της συνεργατικότητας των υπομονάδων του μεταλλαγμένου ενζύμου. Συγκεκριμένα οι τιμές του συντελεστή Hill ήταν  $1,32 \pm 0,1$  στην αναστολή από GTP παρουσία ADP 0.1 mM και  $0,80 \pm 0,03$  παρουσία ADP 1 mM. Αυτές οι τιμές είναι ενδεικτικές έλλειψης συνεργατικής συμπεριφοράς ή και αρνητικής συνεργατικότητας ( $<1$ ). Περαιτέρω επιβεβαίωση παρέχεται από την επισκόπηση των καμπυλών αναστολής του μεταλλαγμένου ισοενζύμου που έχουν την μορφή της υπερβολής σε αντίθεση με τις σιγμοειδικές καμπύλες της wild-type hGDH1 (Εικ. 41 και 42).

### Δομική Ανάλυση

Ανάλυση στο πρόγραμμα DeepView–Swiss-PdbViewer αποκαλύπτει πως με τη σημειακή αλλαγή Ser409Asp χάνονται οι δεσμοί υδρογόνου (H-bonds) που υπήρχαν

στη wild-type hGDH1 μεταξύ Arg443 και Ser409 (Εικ. 43). Όμως σε αντίθεση με την αντικατάσταση της Ser από Arg δεν δημιουργούνται στερεοταξικές συγκρούσεις μεταξύ των παρακείμενων αμινοξέων. Πιθανολογείται πως με αυτόν τον τρόπο η καταλυτική σχισμή δεν κλείνει τελείως επιτρέποντας την αλλοστερική ευοδωτική δράση της λευκίνης και του ADP.



**Εικ. 43.** Δομική προσομοίωση της αλληλεπίδρασης της Arg443 της κατιούσης έλικας με την μεταλλαγμένη 409Asp (από Ser409) της ανιούσης έλικας της “αντένας” παρακείμενης υπομονάδας στην απομορφή της ανθρώπινης GDH (PDB:1LIF) σε μεγέθυνση. Απεικονίζονται για λόγους απλότητας τμήματα 3 υπομονάδων της εξαμερούς hGDH με διαφορετικά χρώματα (μπλε, κίτρινο και magenta). Με κόκκινο απεικονίζεται η Arg443, με πορτοκαλί η Asp409 (ή η Ser409), ως ribbon οι πλευρικές άλυστοι των Asp409 (ή η Ser409) και Arg443 και με πράσινες στικτές γραμμές οι δυνητικοί δεσμοί υδρογόνου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις αποστάσεις μεταξύ των αμινοξέων σε Ångstrom. Εντός της κόκκινης έλλειψης απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Arg443, Ser409 και Tyr405 στην wt hGDH1. Με το κόκκινο βέλος απεικονίζεται ο δυνητικός δεσμός H μεταξύ Asp409 και Glu406. Με τα κυανά βέλη απεικονίζεται η πιθανή απώλεια δεσμού H μεταξύ Arg443 και Arg409. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με χρήση του προγράμματος DeepView – Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).



## Υποκυτταρική εντόπιση της Γλουταμικής Αφυδρογονάσης

Ως έχει αναφερθεί ανωτέρω (σχετικό υποκεφάλαιο Εισαγωγής, Σκοποί Μελέτης) αφενός το ζήτημα της υποκυτταρικής εντόπισης της GDH (ιδία δε της wild-type hGDH2) δεν έχει απαντηθεί οριστικά αφετέρου δε δεν έχουν χρησιμοποιηθεί νεότερες μοριακές μέθοδοι, οι οποίες θα μπορούσαν με ασφάλεια και επάρκεια δώσουν οριστική απάντηση στο ερώτημα.

Αρχικώς χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές (COS-7, HeLa και CHO) οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες συνεντοπισμού, καθώς είναι εύκολα καλλιεργήσιμες, ώστε αφενός να βελτιστοποιήσουμε τις τεχνικές συνδιαμόλυνσης, συγκομιδής και μονιμοποίησης και φωτογράφισης στο συνεστιακό μικροσκόπιο αφετέρου δε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα σε κύτταρα προερχόμενα από διαφορετικούς ιστούς/όργανα (νεφρό, τράχηλο μήτρας, ωοθήκες) και είδη (Αφρικανικό πράσινο πίθηκο, άνθρωπο, Κινεζικό hamster) αντίστοιχα. Σε μεταγενέστερη φάση προκειμένου να απαντηθεί αξιόπιστα το ερώτημα της υποκυτταρικής εντόπισης της wild-type hGDH2, η οποία έως σήμερα έχει απομονωθεί μόνο από νευρικό και ορχικό ιστό (Shashidharan et al. 1994), χρησιμοποιήσαμε αποκλειστικά ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα 1) τη σειρά των ανθρωπίνων εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού, HEK 293 (Human Embryonic Kidney cells), διότι είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες σειρές για έκφραση εξωγενών πρωτεϊνών και επιπλέον ο νεφρός είναι από τους ιστούς με την μεγαλύτερη έκφραση GDH στον άνθρωπο και 2) τη σειρά SH-SY5Y του ανθρώπινου νευροβλαστώματος, της οποίας τα κύτταρα διαθέτουν νευρικό φαινότυπο ανώριμων συμπαθητικών νευροβλαστών. Τα κύτταρα αυτά μπορούν, μετά από κατάλληλη έκθεση σε ρετινοϊκό οξύ, να διαφοροποιηθούν σε ντοπαμινεργικούς συμπαθητικούς νευρώνες. Η σειρά αυτή αν και λιγότερο επιδεκτική σε διαμόλυνση με cDNA και στην έκφραση εξωγενών πρωτεϊνών, προτιμήθηκε ακριβώς λόγω του νευρικού χαρακτήρα των κυττάρων της για την εκτέλεση των πειραμάτων συνεντοπισμού της wild-type hGDH2.

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήσαμε την ενισχυμένη (enhanced green fluorescent protein, EGFP), μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, η οποία προέκυψε από δύο σημειακές αλλαγές F64L και S65T στο γονίδιο της wild type GFP. Το φάσμα εκπομπής της EGFP είναι μετατοπισμένο προς το κόκκινο και φθορίζει 4 to 35-φορές

πιο λαμπερά από την wild type GFP όταν διεγείρεται με UV ακτινοβολία (Cormack et al. 1995). Όπως περιγράφεται ανωτέρω (Μεθοδολογία) δημιουργήσαμε μια χμιαϊκή πρωτεΐνη η οποία περιέχει ολόκληρη την wild-type hGDH 1 ή (2) συνδεδεμένη στο N'-άκρο της EGFP.

Για να επιβεβαιώσουμε τον εντοπισμό των ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης σε υποκυτταρικά οργανύλλια (μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, πυρήνας) συμμόλυναμε τις ανωτέρω προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές με πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι περιείχαν το γονίδιο για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη της *Discosoma* sp. (red fluorescent protein, DsRed2) συνδεδεμένο με καλώς χαρακτηρισμένες σηματοδοτικές αλληλουχίες που στοχεύουν στα 3 αυτά υποκυτταρικά οργανύλλια. Η άγριου τύπου (wild type) *Discosoma* sp. red fluorescent protein, γνωστή εμπορικά ως DsRed, είναι μέλος της ομάδας των υφαλογενών φθορίζοντων κοραλλιών (Reef Coral Fluorescent Proteins), των οποίων το φάσμα φθορισμού κυμαίνεται από κυανό έως κόκκινο ((Matz et al., 1999). Συγκεκριμένα ως δείκτη μιτοχονδριακής εντόπισης χρησιμοποιήσαμε τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης *pDsRed2-Mito*, ο οποίος περιέχει την μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης της υπομονάδος VIII της οξειδάσης του ανθρώπινου κυτοχρώματος c συνδεδεμένη (fused) με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed2, ώστε η χμιαϊκή DsRed2-mito πρωτεΐνη να καθοδηγηθεί στα μιτοχόνδρια του κυττάρου-ξενιστή. Αντιστοίχως ο δείκτης πυρηνικής εντόπισης *pDsRed2-Nuc* αποτελεί μία πρωτεΐνη σύντηξης με την DsRed2 συνδεδεμένη (fused) στο καρβοξυτελικό της άκρο με 3 αντίγραφα μίας αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) του αντιγόνου T του ιού simian (SV) 40. Η χμιαϊκή πρωτεΐνη έτσι είναι ικανή να κατευθυνθεί (μετατοπιστεί) με αυξημένη πιθανότητα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Τέλος ο δείκτης εντόπισης του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ο πλασμιδιακός φορέας *pDsRed2-ER*, ο οποίος περιέχει τη σηματοδοτική αλληλουχία για το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER) της καλρετικουλίνης (calreticulin) συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της DsRed2 και την αλληλουχία κατακράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER retention sequence) KDEL συνδεδεμένη (fused) στο 3' άκρο της DsRed2.

## Χρήση διαδικτυακών προγραμμάτων για την δομική ανάλυση των wt hGDH1 και wt hGDH2 πρωτεϊνών με ιδιαίτερη έμφαση στην οδηγό αλληλουχία

Με την εντυπωσιακή αύξηση των πληροφοριών για τη δομή των πρωτεϊνών ήταν θέμα χρόνου η ανάπτυξη βάσεων δεδομένων και υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης λεπτομερειών της δομής της υπό εξέταση πεπτιδικής αλληλουχίας.

Το πρόγραμμα **Predict Protein (B Rost, G Yachdav and J Liu, 2004)** χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς διαμόρφωσης των wt hGDH1 και wt hGDH2 πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί μία βάση δεδομένων αποτελούμενη από ένα μεγάλο αριθμό αμινοξικών ακολουθιών γνωστής δευτεροταγούς δομής για να προβλέψει τη πιθανή διαμόρφωση ενός άγνωστου πεπτιδίου σε  $\alpha$ -έλικες,  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες (sheets) ή σπείρες (coils). Με τη χρήση του προγράμματος <http://www.predictprotein.org/> έγινε ποσοστιαία ανάλυση της σύνθεσης σε αμινοξέα των υπό μελέτη ισοενζύμων (Πίνακας 11).

### Πίνακας 11. Ποσοστιαία ανάλυση της σύνθεσης σε αμινοξέα των wt hGDH1 και wt hGDH2 με χρήση του προγράμματος Predict Protein.

#### hGDH1

%A: 9.5	%C: 1.1	%D: 5.4	%E: 6.6	%F: 4.1
%G: 9.5	%H: 2.7	%I: 6.8	%K: 5.9	%L: 7.2
%M: 2.5	%N: 3.8	%P: 4.7	%Q: 2.1	%R: 6.3
%S: 6.6	%T: 4.7	%V: 5.9	%W: 0.9	%Y: 3.8

#### hGDH2

%A: 9.3	%C: 1.1	%D: 5.0	%E: 6.5	%F: 4.1
%G: 9.1	%H: 3.0	%I: 6.6	%K: 6.3	%L: 7.5
%M: 2.1	%N: 3.9	%P: 4.7	%Q: 2.3	%R: 6.1
%S: 6.6	%T: 4.8	%V: 6.3	%W: 0.7	%Y: 3.8

Όπως φαίνεται η ποσοστιαία σύσταση των αμινοξέων των 2 ισοενζύμων δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, γεγονός απόλυτα αναμενόμενο, αφού οι αλληλουχίες τους έχουν ~96% ομολογία (διαφέρουν σε 15 από τα 558 αμινοξέα).

Αντιθέτως οι αλληλουχίες-οδηγοί (τα αμινοτελικά πεπτίδια) διαφέρουν μεταξύ τους σε 9 από τα 53 αμινοξέα (83% ομολογία). Η αλληλουχία του leader peptide για τα δύο ισοένζυμα παρουσιάζεται παρακάτω (τα διαφορετικά αμινοξέα υποδεικνύονται με κίτρινο στη hGDH1 και κόκκινο στη hGDH2):

#### **hGDH1**

MYRYLGEALLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPGLALAARRHY

#### **hGDH2**

MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHY

**Πίνακας 12. Ποσοστιαία ανάλυση της σύνθεσης σε αμινοξέα των οδηγών αλληλουχιών των wt hGDH1 και wt hGDH2 με τη χρήση του προγράμματος πρόγραμμα Predict Protein**

<b>hGDH1</b>					<b>hGDH2</b>				
%A: 28.3	%C: 0.0	%D: 1.9	%E: 1.9	%F: 0.0	%A: 28.3	%C: 0.0	%D: 0.0	%E: 0.0	%F: 0.0
%G: 11.3	%H: 1.9	%I: 0.0	%K: 0.0	%L: 17.0	%G: 11.3	%H: 3.8	%I: 0.0	%K: 1.9	%L: 15.1
%M: 1.9	%N: 0.0	%P: 7.5	%Q: 3.8	%R: 9.4	%M: 1.9	%N: 1.9	%P: 7.5	%Q: 3.8	%R: 11.3
%S: 7.5	%T: 0.0	%V: 0.0	%W: 1.9	%Y: 5.7	%S: 7.5	%T: 0.0	%V: 0.0	%W: 0.0	%Y: 5.7

Παρατηρούμε τη συχνή εμφάνιση του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Arg (R), του πολικού Ser (S), την απουσία του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Lys (K), και τη συχνή παρουσία του υδρόφοβου αμινοξέως Leu (L). Από την άλλη απουσιάζουν πλήρως τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα στο GLUD2 οδηγό πεπτίδιο, ενώ στο GLUD1 οδηγό πεπτίδιο παρατηρούνται μόνο ένα κατάλοιπο Asp (D) και ένα κατάλοιπο Glu (E). Επίσης απουσιάζουν πλήρως τα υδρόφοβα αμινοξέα Val (V) and Ile (I). Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται εις επίρρωση της άποψης περί μιτοχονδριακής εντόπισης των wt hGDH1 και wt hGDH2 ισοενζύμων, καθώς υποστηρίζεται πως οι μιτοχονδριακές καθοδηγητικές αλληλουχίες είναι πλούσιες σε κατάλοιπα Arg, Leu and Ser (όχι όμως Lys), ενώ έχουν λίγα κατάλοιπα Asp, Glu Val (V) and Ile (I) (von Heijne G, 1986). Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί η παρουσία καταλοίπου Arg στη θέση -3 (από το τέλος), η οποία μπορεί να σηματοδοτεί την αποκοπή του πεπτιδίου (cleavage site) δυο αμινοξέα καθοδικώς (Gavel Y, von Heijne G.,1990). Η ύπαρξη μιτοχονδριακής καθοδηγητικής αλληλουχίας (mitochondrial targeting peptide, mTP) και στα 2 ισοένζυμα της GDH, hGDH1 και hGDH2 άρα και

η πιθανή εντόπιση στα μιτοχόνδρια προβλέπεται και από το πρόγραμμα **TargetP1.1** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1>) (Emanuelsson O. et al, 2001). Προβλέπεται ακόμη η ύπαρξη πιθανού σημείου αποκοπής της καθοδηγητικής αλληλουχίας στη θέση 53 (Nielsen H et al., 1997), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά από τους Shashidharan και συν.,(1994, 1997). Μάλιστα η πρόβλεψη για τη μιτοχονδριακή εντόπιση της wild-type hGDH2 ήταν ισχυρότερη από την αντίστοιχη για την wild-type hGDH1.

Μια άλλη χαρακτηριστική ιδιότητα των μιτοχονδριακών καθοδηγητικών αλληλουχιών είναι η τάση τους να σχηματίζουν αμφιπαθείς α-έλικες, που προβάλλουν μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια και μία αντιδιαμετρική υδρόφοβη επιφάνεια (von Heijne, 1986). Τα αμινοτελικά πεπτίδια των wild-type hGDH1 και wild-type hGDH2 με βάση το πρόγραμμα Predict Protein παρουσιάζουν ισχυρή πιθανότητα διαμόρφωσης σε α-έλικες σε περισσότερα του ενός σημεία στο μόριο τους.

#### **hGDH2**

sec str type	H	E	L
% in protein	45.88	12.01	42.11
No	.....1.....2.....3.....4.....5.....6		
AA	MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHYSELVADR		
PROF_sec	HHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHH	HHH HHHHHHHHHHHHHHHHH
Rel_sec	914788631767688155544776889872688887111477148888888999886316		
SUB_sec	█...HHHH...LLLLL...HHH...HHHHHHHH...LLLLL...L...HHHHHHHHHHHHHH...L		

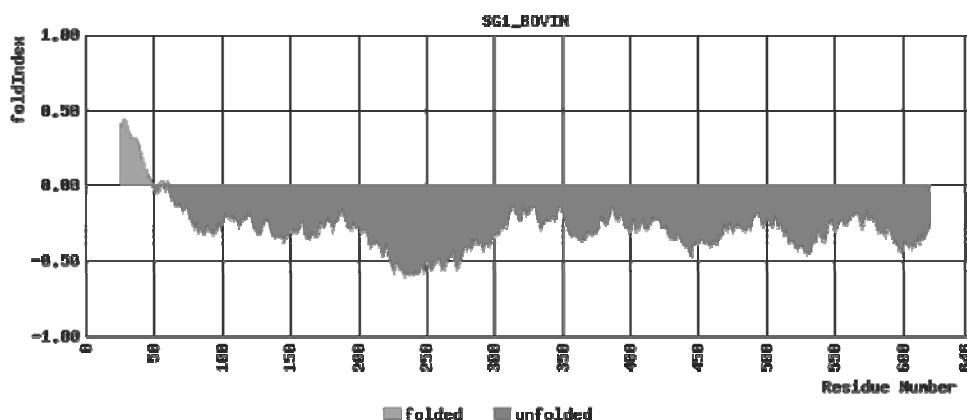
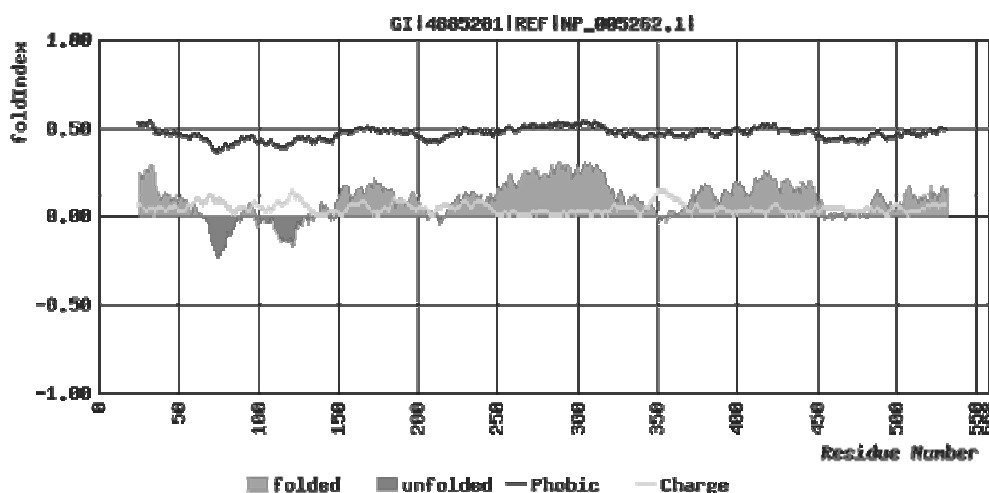
#### **hGDH1**

sec str type	H	E	L
% in protein	45.34	11.29	43.37
AA	MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPGLALAARRHYSEAVADR		
PROF_sec	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHH
Rel_sec	942046776432168200375006778786431388553787258889888878763007		
SUB_sec	█...HHHH...LL...LL...HHHHHHHH...LLL...LL...HHHHHHHHHHHHHH...L		

**Εικ. 44.** Η προβλεπόμενη δευτεροταγής διαμόρφωση για το αμινοτελικό άκρο των wt hGDH1 και wt hGDH2 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα **Predict Protein**. Οι αριθμοί (0-9) ανταποκρίνονται στο βαθμό της πιθανότητας να εμφανιστεί η προτεινόμενη δευτεροταγής δομή. (H= α-έλικα, E= πτυχωτή επιφάνεια, L= αγκύλη).

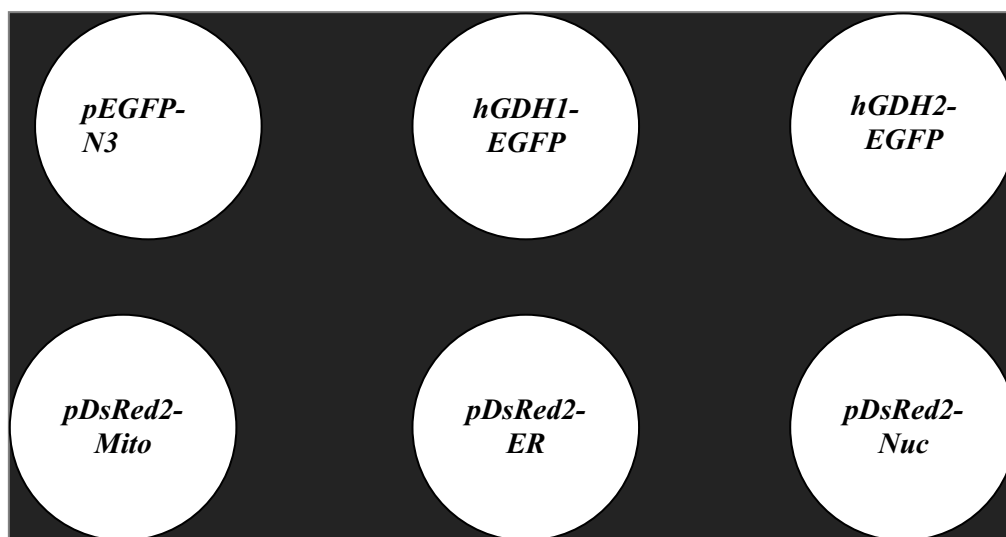
Το **PSORT** αποτελεί υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης της υποκυτταρικής εντόπισης μίας πρωτεΐνης. Με βάση την αμινοξική αλληλουχία και το εάν αποτελεί προκαρυωτική (βακτηριακή) ή ευκαρυωτική ή φυτική πρωτεΐνη, αναλύει την υπό εξέταση πεπτιδική αλληλουχία χρησιμοποιώντας αποθηκευμένους κανόνες για χαρακτηριστικά των σηματοδοτικών αλληλουχιών στα διαφορετικά οργανύλλια του κυττάρου. Έτσι υπολογίζει την πιθανότητα εντόπισης της υπό εξέτασης πρωτεΐνης στα διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Με την εφαρμογή του προγράμματος **PSORT II and iPSORT algorithm (<http://psort.nibb.ac.jp/>) (Nakai K et al., 1999)** η πιθανότητα της καθοδηγητικής προαλληλουχίας της wt hGDH1 ήταν 47.8 % να είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 21.7 % μιτοχονδριακή, 17.4 % πυρηνική και μόνο 4.3 % να είναι στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα για την καθοδηγητική προαλληλουχία της wt hGDH2, προβλέπεται κατά 82.6 % να είναι μιτοχονδριακή, μόνο 8.7 % να είναι κυτταροπλασματική, 4.3 % να εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και 4.3 % να είναι πυρηνική.

Τέλος το FoldIndex



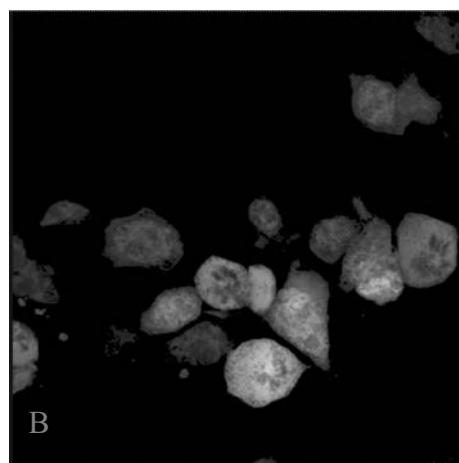
Συμπερασματικά με τη χρήση των διαφόρων υπολογιστικών προγραμμάτων, παρότι φαίνεται μια ισχυρότερη τάση υποστήριξης της άποψης περί μιτοχονδριακής εντόπισης των wt hGDH1 και wt hGDH2 ισοενζύμων, απέχουμε από την διατύπωση ομοφωνίας. Το γεγονός αυτό παρατηρήσαμε και στην ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (ιδέ εισαγωγή), όπου αν και οι περισσότεροι ερευνητές καταλήγουν στο ότι η GDH είναι μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, ικανός αριθμός ερευνητών προτείνουν και εξωμιτοχονδριακές θέσεις εντοπισμού. Κατά συνέπεια καθώς το ερώτημα παραμένει ανοικτό προσπαθήσαμε να το διερευνήσουμε χρησιμοποιώντας τις ιδιότητες των φθορίζουσών πρωτεϊνών μέσω της παροδικής διαμόλυνσης ποικίλων κυτταρικών σειρών.

## Σχεδιασμός και εκτέλεση πειραμάτων

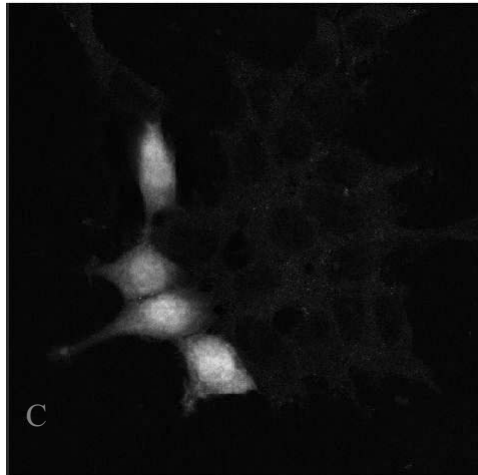


Εικ. 46.

Κύτταρα των σειρών COS7, HeLa, CHO ή HEK293 διαμολύνθηκαν σε τρυβλία Petri 35mm ή 4-well labtek 1) με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που εκφράζει ολόκληρη τη χιμαιρική πρωτεΐνη hGDH1-EGFP (ή hGDH2-EGFP) και με 2) καθένα από τα πλασμίδια- δείκτες υποκυτταρικής εντόπισης (*pDsRed2-Mito*, *pDsRed2-ER* και *pDsRed2-Nuc*), ως φαίνεται στην εικόνα 46. Τα αποτελέσματα παροδικής διαμόλυνσης CHO και HEK293 κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα *pEGFP-N3* (BD Biosciences Clontech) αποκάλυψε ένα διάχυτο πράσινο φθορισμό που αφορούσε και τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Εικ. 47).

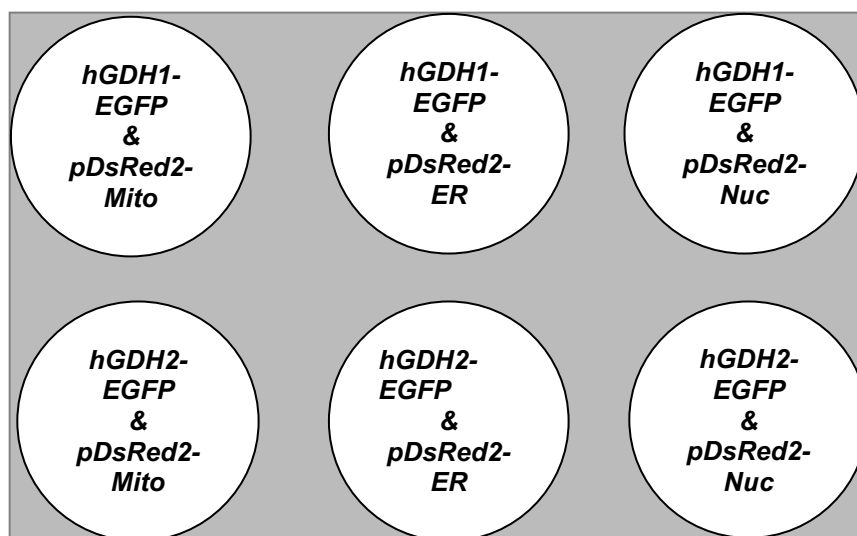






Εικ. 47. Παροδική διαμόλυνση CHO (A), HEK 293 (B) και SH-SY5Y (κυττάρων νευροβλαστώματος) (C) κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3.

Η διαμόλυνση των HeLa, COS-7, HEK 293 and CHO κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς *pDsRed2-Nuc*, *pDsRed2-ER* και *pDsRed2-Mito* που φέρουν τους ειδικούς δείκτες για κάθε οργανύλλιο του κυττάρου, αναπαρήγε το αναμενόμενο υπόδειγμα φθορισμού που αντιπροσώπευε την έκφραση της πρωτεΐνης-δείκτη (marker) στο συγκεκριμένο οργανύλλιο (πυρήνας, ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια αντίστοιχα) (Εικ..). Αξίζει να σημειωθεί πως τα ανωτέρω περιγραφόμενα πειράματα διενεργήθηκαν ταυτοχρόνως με τα πειράματα διαμόλυνσης με τους πλασμιδιακούς φορείς *GLUD1-EGFP* (ή *GLUD2-EGFP*). Επιπλέον διενεργήθηκαν πειράματα συν-διαμόλυνσης (co-transfection) των πλασμιδίων που φέρουν την full length hGDH1 (ή hGDH2) συνδεδεμένη (fused) με την EGFP με τους επιλεγμένους πλασμιδιακούς φορείς γνωστής υποκυτταρικής εντόπισης (*pDsRed2-Mito*, *pDsRed2-ER*, *pDsRed2-Nuc*), όπως φαίνεται στην εικόνα 48.



Εικ. 48.

Επιπλέον διενεργήθηκαν πειράματα πρόσκαιρης διαμόλυνσης και συνδιαμόλυνσης και για τα 2 ισοένζυμα όπως περιγράφηκε ανωτέρω στη σειρά SH-SY5Y του ανθρώπινου νευροβλαστώματος, καθώς θεωρούμε ουσιώδους σημασία τη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης της γλουταμικής αφυδρογονάσης (και δη της ειδικής για το νευρικό σύστημα ισομορφής, *GLUD 2* ) σε νευρικό ιστό.

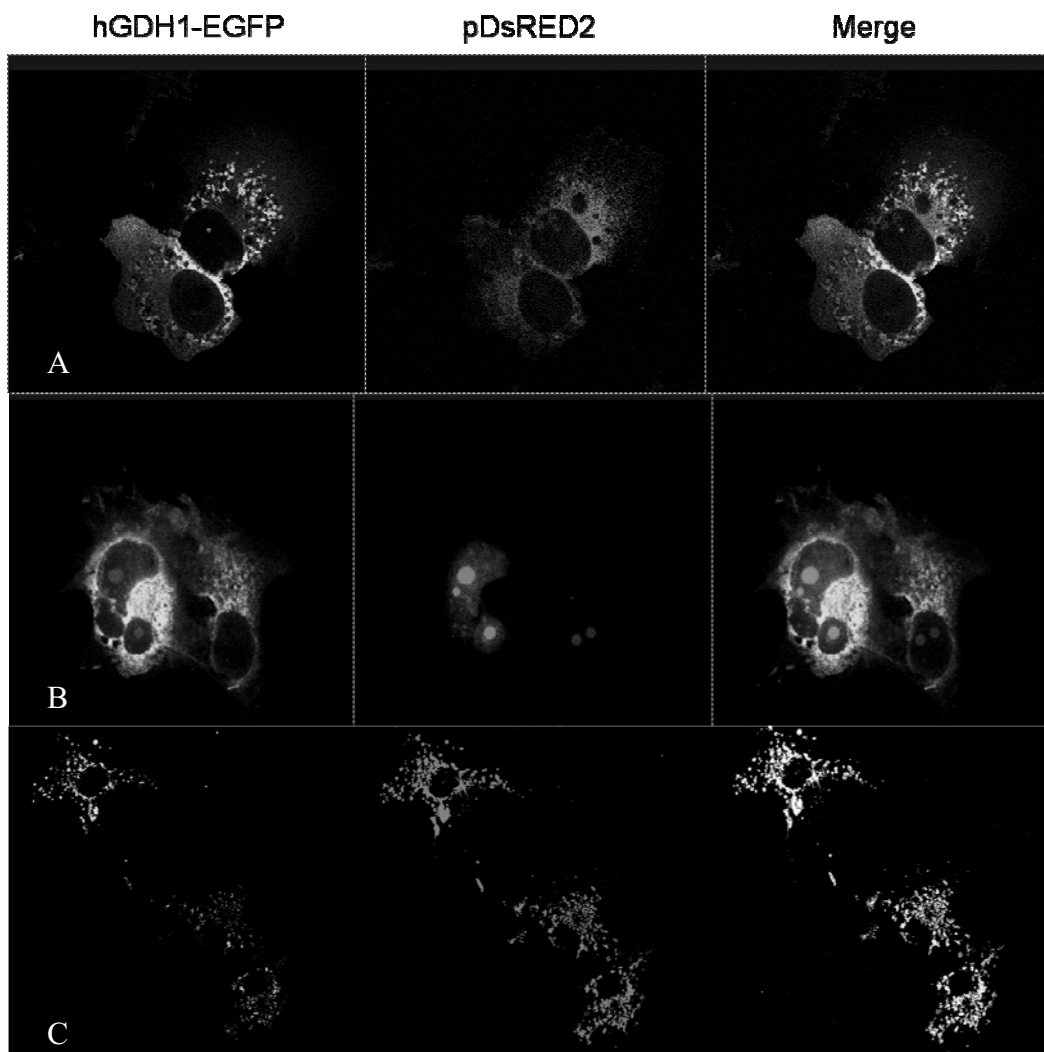
### **Η hGDH1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο.**

Στη διαμόλυνση με τη χιμαιρικό πλασμίδιο *GLUD1-EGFP*, οι εικόνες στο συνεστιακό μικροσκόπιο ανέδειξαν πράσινο φθορισμό σε στικτές δομές σε όλο το κυτταρόπλασμα. (Εικ 49 A-C, αριστερή στήλη; Εικ 50A, B, αριστερή στήλη). Από τους 3 υποκυτταρικούς δείκτες μόνο η διαμόλυνση με το πλασμίδιο *pDsRed2-Mito* αναπαρήγαγε μία κατανομή φθορισμού που επικαλυπτόταν με τον πράσινο φθορισμό της *hGDH1-EGFP* (Εικ 49C, μεσαία στήλη). Στα πειράματα συν-διαμόλυνσης *GLUD1-EGFP* και *pDsRed2-Mito* στις εικόνες με ταυτόχρονο διπλό επιτρεπόμενο χρωματισμό αναδύθηκε κίτρινος φθορισμός (διαπιστώθηκε πλήρης επικάλυψη του πράσινου φθορισμού της *hGDH1-EGFP* με τον κόκκινο φθορισμό του δείκτη *pDsRed2-Mito*), επιβεβαιώνοντας την μιτοχονδριακή εντόπιση της *hGDH1* (Εικ 49C, δεξιά στήλη). Επιπλέον στα πειράματα συνδιαμόλυνσης της *GLUD1-EGFP* με τον *pDsRed2-ER* διαπιστώθηκε κάποιου βαθμού αλληλεπικάλυψη των 2 φθορισμών και κατά συνέπεια μικρού βαθμού συνεντοπισμό της *hGDH1* στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικ 49A, δεξιά στήλη; 3A, δεξιά στήλη). Αντιθέτως δεν διαπιστώθηκε επικάλυψη του πράσινου φθορισμού της *hGDH1-EGFP* με τον κόκκινο φθορισμό του δείκτη εντόπισης στον πυρήνα του κυττάρου *pDsRed2-Nuc*, υποδεικνύοντας την απουσία εντοπισμού της *hGDH1* στον πυρήνα. (Εικ 1B, μεσαία στήλη; 3B, μεσαία στήλη) (Fig. 1B, δεξιά στήλη; 3B δεξιά στήλη). Τα αποτελέσματα αυτά αναπαρήχθησαν και στις τέσσερις κυτταρικές σειρές.

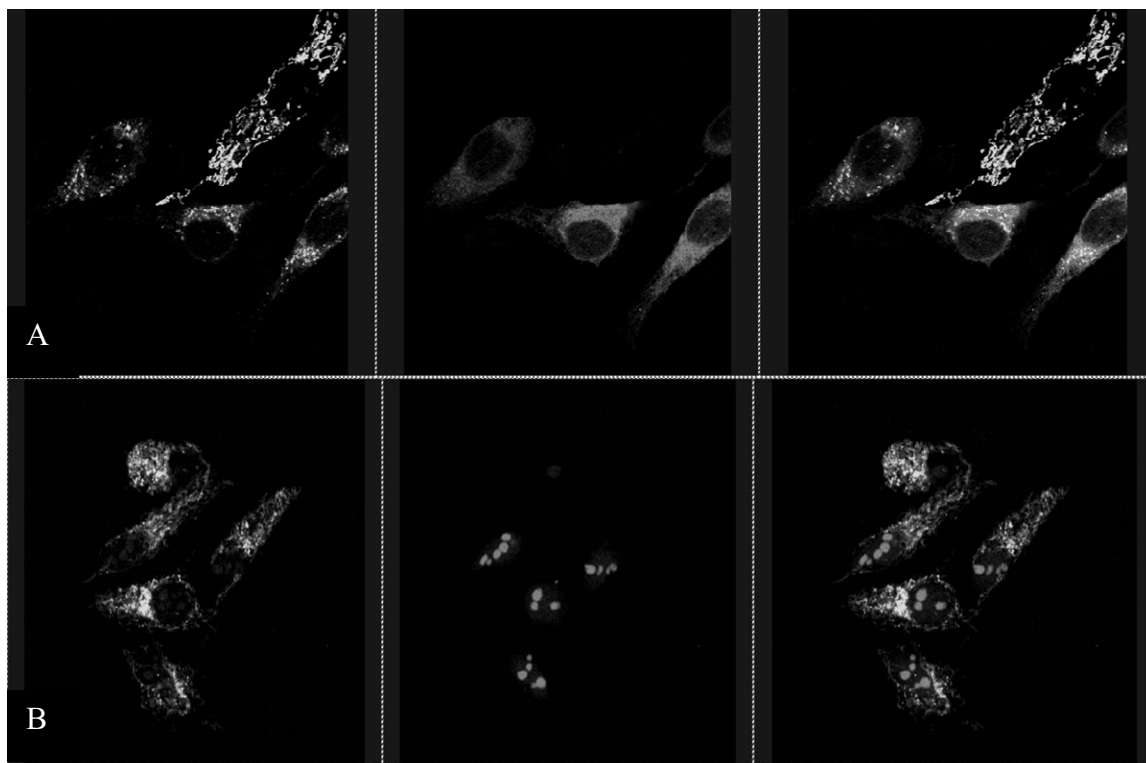
### **Η hGDH2 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο**

Η παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών HeLa, COS-7, HEK 293 και CHO με το πλασμίδιο *GLUD2-EGFP* ανέδειξε στο συνεστιακό μικροσκόπιο εντόπιση του πράσινου φθορισμού (που εκφράζει τη χιμαιρική πρωτεΐνη *hGDH2-*

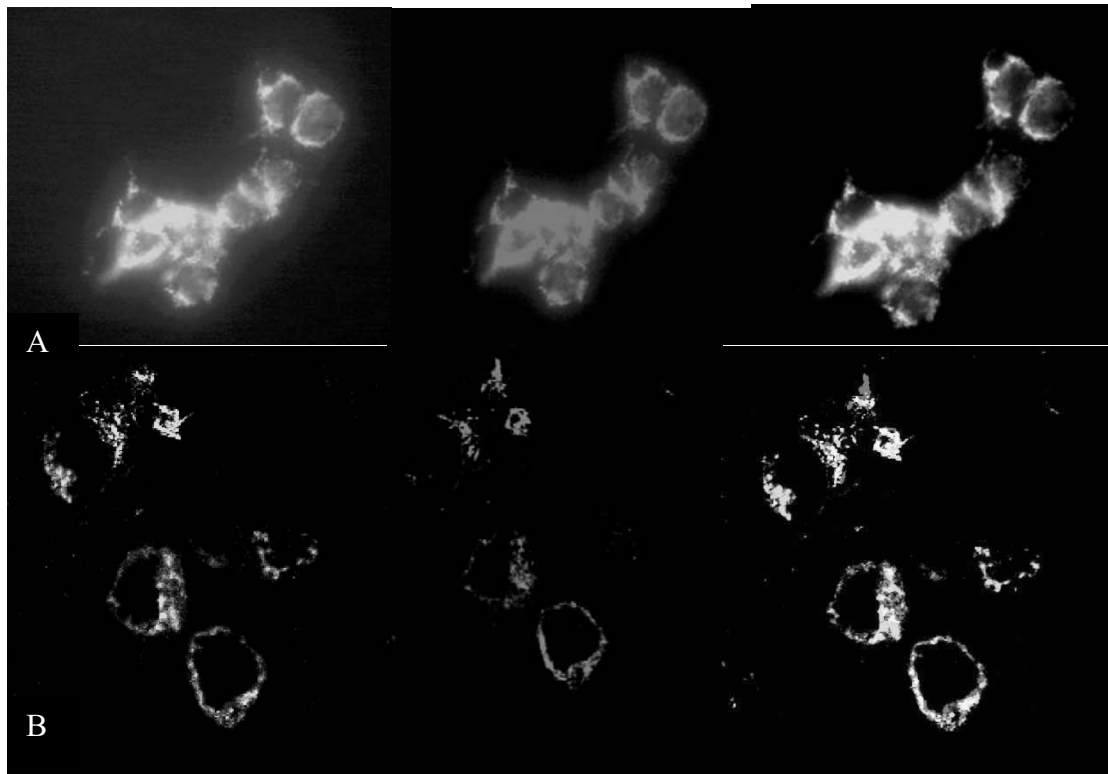
EGFP) σε στικτές δομές του κυτταροπλάσματος. Σε πειράματα συν-διαμόλυνσης και με τα δύο πλασμίδια δηλαδή το *GLUD2-EGFP* και τον μιτοχονδριακό δείκτη *pDsRed2-Mito*, σε COS-7 και HEK 293 κύτταρα, αποκαλύφθηκε πανομοιότυπο και επικαλυπτόμενο πρότυπο (φάσμα) φθορισμού, γεγονός που αποδεικνύει συνεντοπισμό της hGDH2-EGFP με τη dsRED tagged μιτοχονδριακή πρωτεΐνη (Fig. 2C, δεξιά στήλη). Επιπλέον συνδιαμόλυνση των κυτταρικών σειρών HeLa, COS-7, HEK 293 και CHO με μίγμα *GLUD2-EGFP* με τον πλασμιδιακό φορέα (δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου) *pDsRed2ER* ανέδειξε μικρού αλλά όχι ασήμαντου βαθμού συνεντοπισμό της hGDH2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Fig. 2A, δεξιά στήλη; Fig. 3D, δεξιά στήλη). Όπως όμως συνέβη και με τη hGDH1, η hGDH2-EGFP χιμαιρική πρωτεΐνη δεν επέδειξε κάποιου βαθμού συνεντοπισμό με τον πυρηνικό δείκτη *pDsRed2-Nuc* (Fig. 2B, δεξιά στήλη; Fig. 3C, δεξιά στήλη) σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (COS-7, CHO και HeLa).



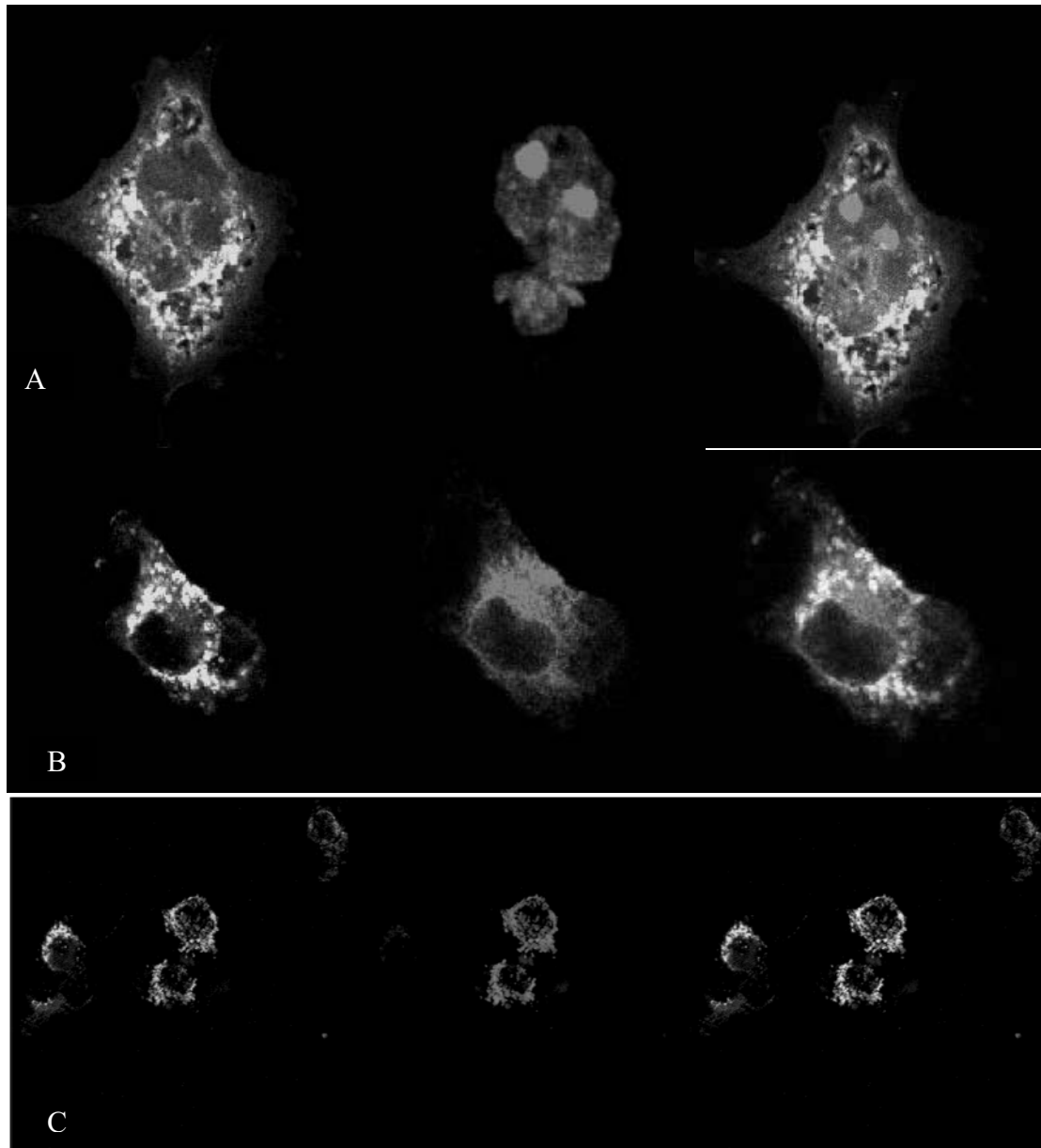
**Εικ. 49. Υποκυτταρική εντόπιση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP σε κύτταρα COS-7.** Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP χρησιμοποιήθηκαν υποκυτταρικοί δείκτες ειδικοί για το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Η λήψη φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού έγινε 48 h μετά την συνδιαμόλυνση των κυττάρων. Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ (pDsRed2-ER), τον πυρήνα (pDsRed2-Nuclear) και τα μιτοχόνδρια (pDsRed2-Mito). Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργάνο. Α. Συνδιαμόλυνση κυττάρου COS-7 με hGDH1-EGFP και pDsRed2-ER. Β: Συνδιαμόλυνση κυττάρου COS-7 με hGDH1-EGFP και pDsRed2-Nuclear C: Συνδιαμόλυνση κυττάρου COS-7 με hGDH1-EGFP και pDsRed2-Mito.



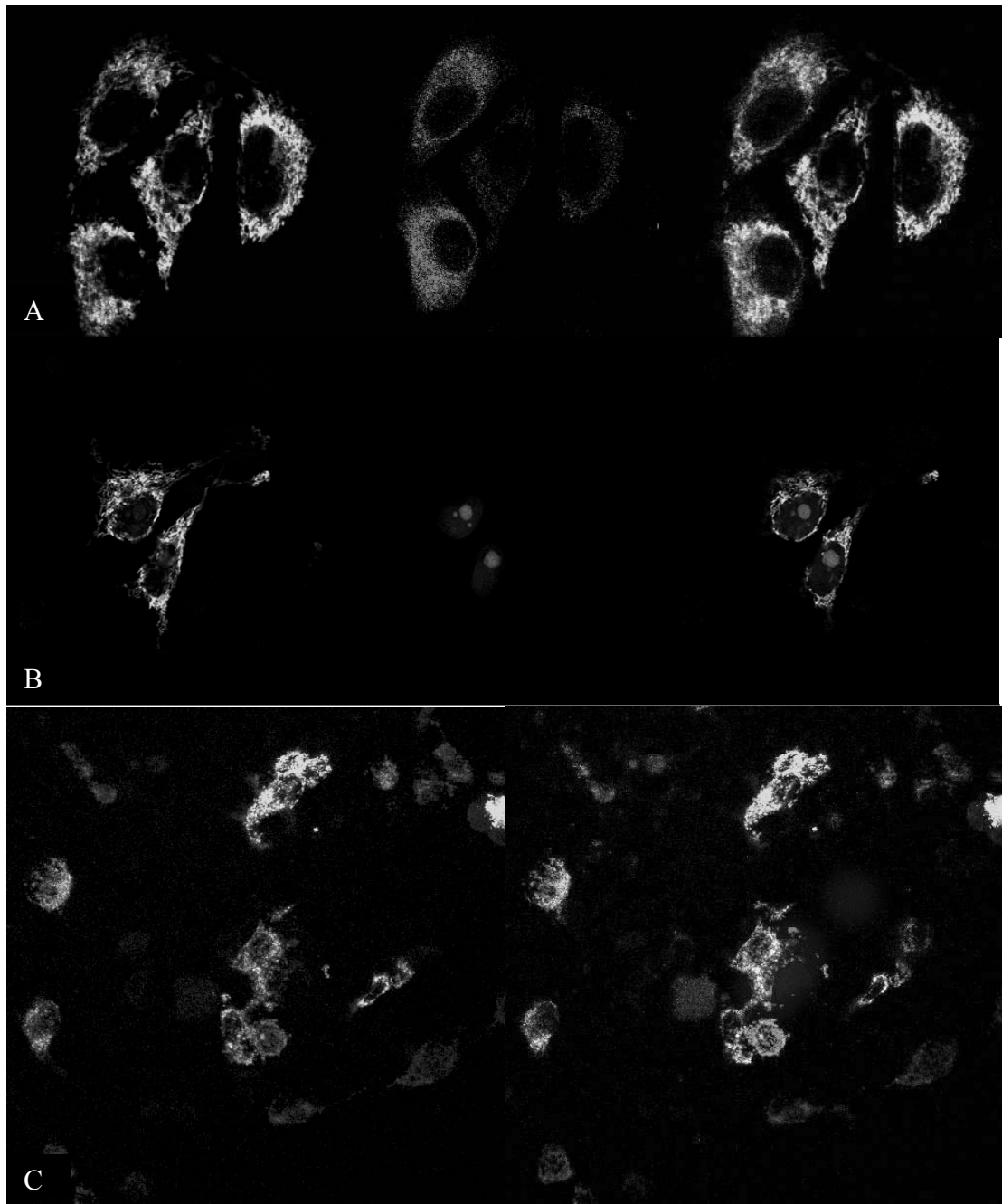
**Εικ 50. Υποκυτταρική εντόπιση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP σε κύτταρα HeLa.** Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων HeLa με την *GLUD1-EGFP* και τους πλασμιδιακούς φορείς *dsRed2-ER* και *DsRed2-Nuc* (σειρά A και B). Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ και τον πυρήνα. Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργάνυλλιο.



**Εικ 51. Υποκυτταρική εντόπιση της χμιαϊκής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP σε κύτταρα HEK293.** Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων HEK293 με την *GLUD1-EGFP* και τους πλασμιδιακούς φορείς και *pDsRed2-Mito* και *dsRed2-ER* (σειρά A και B). Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμιαϊκής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ και τον πυρήνα. Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμιαϊκής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργάνυλλιο.

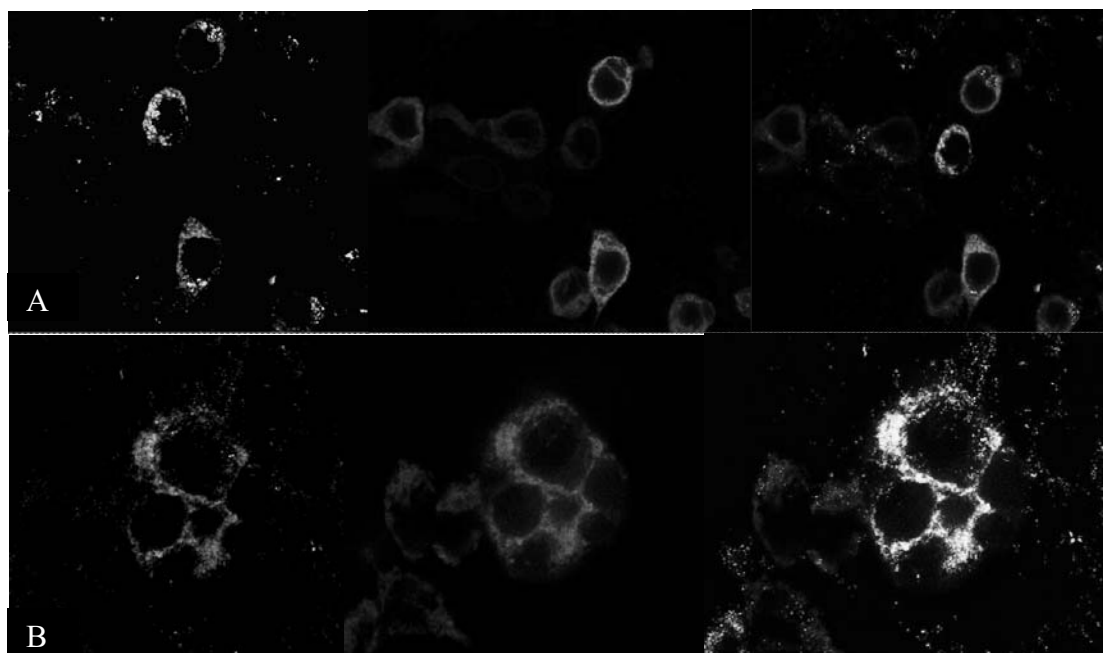


**Εικ. 52. Υποκυτταρική εντόπιση της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP σε κύτταρα COS-7.** Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ (pDsRed2-ER), τον πυρήνα (pDsRed2-Nuclear) και τα μιτοχόνδρια (pDsRed2-Mito). Στις εικόνες συγχώνευσης (δεξιά στήλη) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργάνωλλιο. Α. Συνδιαμόλυνση κυττάρων COS-7 με hGDH2-EGFP και pDsRed2-Nuclear. Β: Συνδιαμόλυνση κυττάρων COS-7 με hGDH2-EGFP και pDsRed2-ER C: Συνδιαμόλυνση κυττάρων COS-7 με hGDH2-EGFP και pDsRed2-Mito.

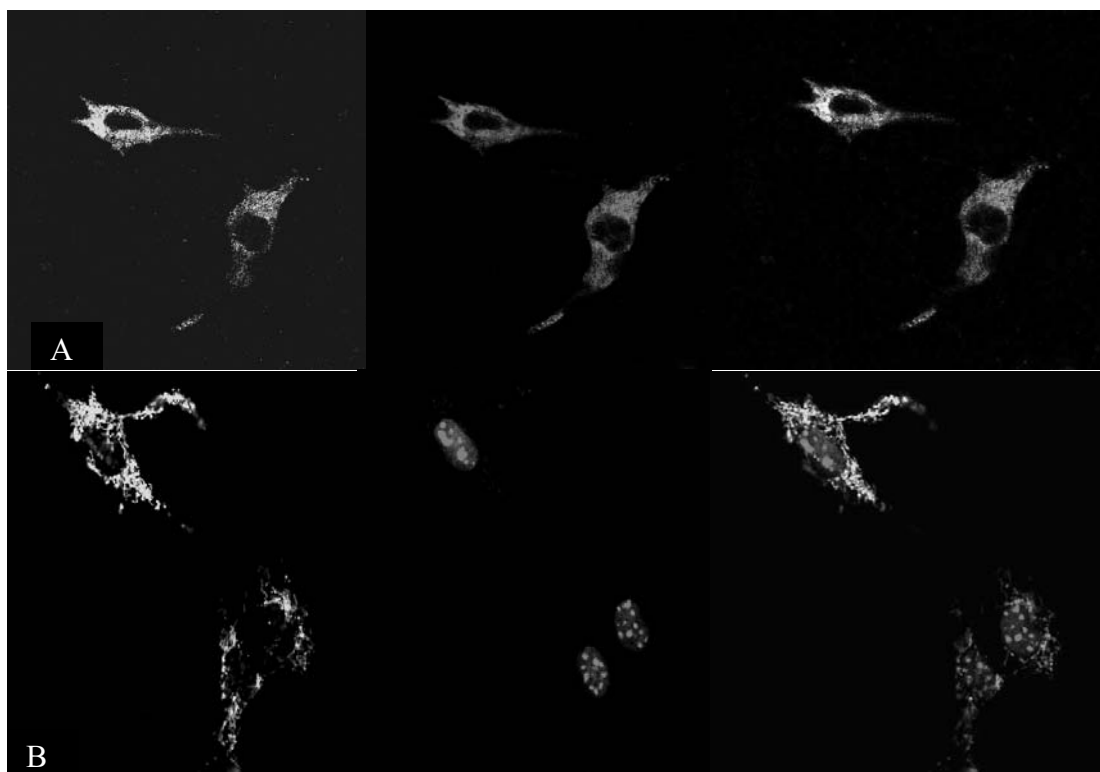


**Εικ. 53. Υποκυτταρική εντόπιση της χμαιρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP σε κύτταρα HeLa.** Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμαιρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ (pDsRed2-ER), τον πυρήνα (pDsRed2-Nuclear) και τα μιτοχόνδρια (pDsRed2-Mito). Στις εικόνες συγχώνευσης (δεξιά στήλη) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμαιρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργανύλλιο. Α. Συνδιαμόλυνση κυττάρων HeLa με hGDH2-EGFP και pDsRed2-ER. Β: Συνδιαμόλυνση κυττάρων HeLa με hGDH2-EGFP και pDsRed2-Nuclear C: Συνδιαμόλυνση κυττάρων HeLa με hGDH2-EGFP και pDsRed2-Mito.





**Εικ 54. Υποκυτταρική εντόπιση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP σε κύτταρα HEK293.** Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων HEK293 με την *GLUD2-EGFP* και τους πλασμιδιακούς φορείς *dsRed2-ER* και *pDsRed2-Mito* (σειρά A και B). Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ και τον πυρήνα. Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμαιοτικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργάνυλλιο.

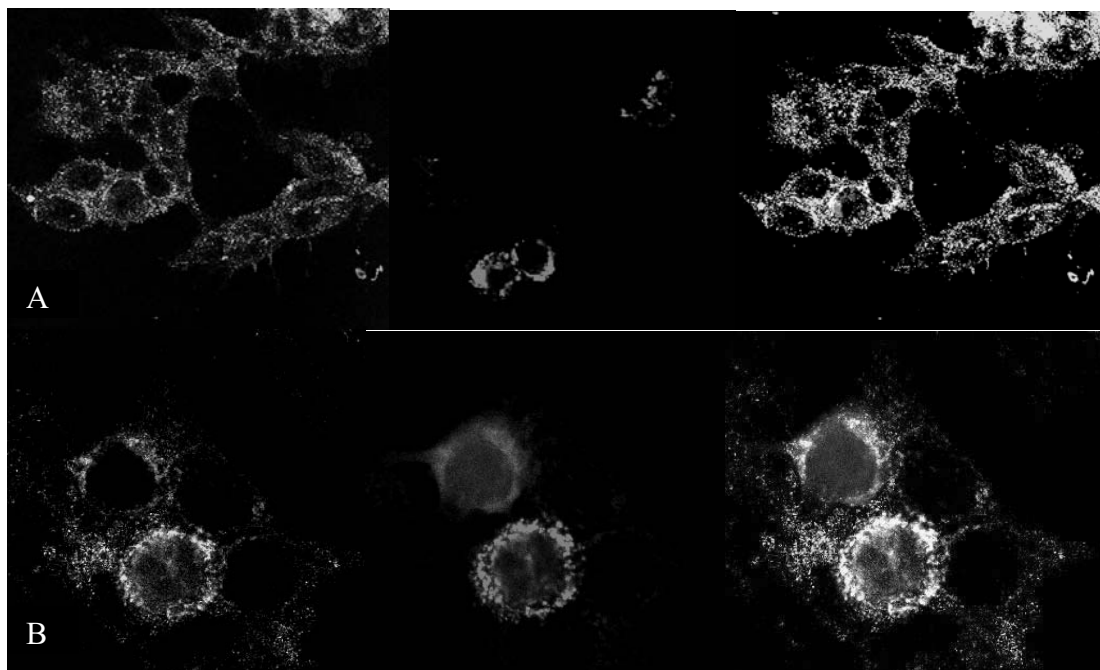


**Εικ 55. Υποκυτταρική εντόπιση της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH2-EGFP σε κύτταρα CHO.** Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων CHO με την *GLUD2-EGFP* και τους πλασμιδιακούς φορείς *dsRed2-ER* και *DsRed2-Nuc* (σειρά A και B). Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP, ενώ το κόκκινο την έκφραση των υποκυτταρικών δεικτών για το ΕΔ και τον πυρήνα. Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χμιαρικής πρωτεΐνης hGDH1-EGFP με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργανύλλιο.

#### **Μελέτες συνεντοπισμού hGDH1 και hGDH2 σε κύτταρα νευροβλαστώματος**

Καθώς όπως δείχθηκε ανωτέρω, δεν υπήρξε ένδειξη εντοπισμού της wild-type hGDH1 (ή της wild-type hGDH2) στον πυρήνα του κυττάρου, με τα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y πραγματοποιήσαμε πειράματα συνεντοπισμού μόνο με τους δείκτες εντοπισμού στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*pDsRed2-Mito* και *pDsRed2ER*). Η παροδική διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα *pEGFP-N3* (μάρτυρας) αποκάλυψε τον διάχυτο πράσινο φθορισμό που αφορούσε και τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα που διαπιστώσαμε και στις άλλες κυτταρικές σειρές (Εικ.47C). Οι μελέτες συν-διαμόλυνσης του πλασμιδιακού φορέα *GLUD1-EGFP* (ή

του *GLUD2-EGFP*) με το μιτοχονδριακό δείκτη *pDsRed2-Mito* αποκάλυψαν αλληλοεπικαλυπτόμενο πρότυπο φθορισμού στις εικόνες από το συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικ 56Α-Β, 3<sup>η</sup> στήλη). Επιβεβαιώνεται λοιπόν και σε κύτταρα νευρικού ιστού πως τόσο η *hGDH1-EGFP* όσο και η *hGDH2-EGFP* συνεντοπίζονται με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη *DsRed2-Mito* και συνεπώς οι δύο ισομορφές της *GDH* εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια.



**Εικ 56 Υποκυτταρική εντόπιση των χημικών πρωτεϊνών *hGDH1-EGFP* και *hGDH2-EGFP* σε κύτταρα νευροβλαστώματος *SH-SY5Y*.** Παροδική συν-διαμόλυνση κυττάρων *SH-SY5Y* με τα πλασμίδια *GLUD1-EGFP* (σειρά Α) και *GLUD2-EGFP* (σειρά Β) και τον πλασμιδιακό φορέα μιτοχονδριακής εντόπισης *pDsRed2-Mito* αποκάλυψε συνεντοπισμό των χημικών πρωτεϊνών *hGDH1-EGFP* και *hGDH2-EGFP* με το μιτοχονδριακό δείκτη στις εικόνες συγχώνευσης (merge, 3<sup>η</sup> στήλη). Το πράσινο στις εικόνες αντιπροσωπεύει την έκφραση της χημικής πρωτεΐνης *hGDH-EGFP*, ενώ το κόκκινο την έκφραση του μιτοχονδριακού δείκτη *pDsRed2-Mito*. Στις εικόνες συγχώνευσης (από την επικάλυψη των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού) το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει συνεντοπισμό της χημικής πρωτεΐνης *hGDH-EGFP* με τον δείκτη εντοπισμού για το συγκεκριμένο οργανύλλιο.



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## Σύνοψη αποτελεσμάτων

Οι μελέτες μας, σε συνέχεια εργασιών προηγούμενων ερευνητών (Shashidharan και συν., 1994, 1997; Plaitakis και συν., 2000; Zaganas και Plaitakis, 2002; Zaganas και συν., 2002), διευκρίνησαν ορισμένα ζητήματα που έχουν σχέση με τη λειτουργία της ανθρώπινης GDH και την τελεολογία ύπαρξης δύο ισοενζύμων με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά και ιστική κατανομή. Επιγραμματικώς τα κυριότερά μας ευρήματα είναι τα ακόλουθα:

Πρώτον με τη δημιουργία της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 επιβεβαιώθηκε πως οι μείζονες λειτουργικές ιδιότητες του ειδικού για το νευρικό σύστημα ισοενζύμου hGDH2 οφείλονται στην αντικατάσταση της Arg443 από Ser και της Gly456 από Ala.

Δεύτερον με την δημιουργία των μεταλλαγμένων Ser409Arg και Ser409Asp hGDH1 ισομορφών διελευκάνθηκε ποια είναι η βασική αιτία της χαμηλής βασικής δραστηριότητας της wild-type hGDH2. Η αλληλεπίδραση της Arg443 μίας υπομονάδος με την Ser409 γειτονικής υπομονάδας μέσω δεσμών H αποτελεί το κομβικό σημείο για τη λειτουργία της κατιούσης έλικας της “αντέννα” ως “μοριακού ελατηρίου” για το κλείσιμο/άνοιγμα της καταλυτικής σχισμής. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε πως η ευοδωτική δράση της λευκίνης στην δραστηριότητα της GDH διαμεσολαβείται μέσω σύνδεσης στο ενεργό κέντρο και συνεπώς χρειάζεται να είναι ανοικτή η καταλυτική σχισμή, γεγονός που επιτελείται με την αλληλεπίδραση Arg443 και Ser409. Προφανώς η σημειακή αλλαγή Arg443Ser στην εξελικτική ιστορία της GDH σχετίζεται με την πίεση της φυσικής επιλογής για ένα ένζυμο προσαρμοσμένο στις ανάγκες και συνθήκες του νευρικού συστήματος. Πάντως η ευαισθησία στη θερμότητα της hGDH2, μολονότι σχετίζεται με την σημειακή αλλαγή Arg443Ser, επιτυγχάνεται με άλλο μηχανισμό και δεν σχετίζεται με την αλληλεπίδραση Arg443 και Ser409.

Τρίτον για πρώτη φορά αποκαλύφθηκε πως και οι δύο ισομορφές wild-type hGDH1 και hGDH2 εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο ποσοστό στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανθρώπινων σωματικών και νευρικών κυττάρων. Δεν υφίσταται πυρηνική μορφή GDH. Συνεπώς η hGDH2, αφού

εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και εφόσον εκφράζεται στο νευρικό σύστημα (το οποίο ειρήσθω εν παρόδω αποτελεί τη μείζονα πρόκληση για όσους ασχολούνται με τη ρόλο της GDH στο ΚΝΣ), θα λειτουργεί όπως η πρωτεΐνη κυτταρικής οικονομίας.

### **Σύνοψη των κυριότερων διαφορών μεταξύ των ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί πολλαπλές μελέτες έχουν αναδείξει τη σημαντικότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης στις μεταβολικές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού. Επικεντρώνοντας όμως στο ρόλο της GDH στο μεταβολισμό του γλουταμικού στο ΚΝΣ, παρά την πληθώρα ενδείξεων συμμετοχής της σε αυτή τη διαδικασία, ο ακριβής ρόλος της, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις δεν έχει διευκρινιστεί. Ιδιαίτερα δε δεν έχει διασαφηνιστεί η σκοπιμότητα ύπαρξης του ειδικού για το νευρικό σύστημα ισοενζύμου (hGDH2, Shashidharan και συν., 1994) και ειδικότερα η σημασία του στις μεταβολικές οδούς και στο ενεργειακό ισοζύγιο αστροκυττάρων και νευρώνων.

Με αφετηρία εκκίνησης τον ανωτέρω προβληματισμό μελέτες των ανασυνδυασμένων GDH ισοενζύμων στο εργαστήριό μας (Plaitakis και συν., 2000; Zaganas και Plaitakis, 2002; Zaganas και συν., 2002; Plaitakis και συν., 2003; Mastorodemos και συν., 2005; Καναβούρας και συν., 2007) αποσαφήνισαν τις βασικές διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2 (εκτενής αναφορά στη Εισαγωγή). Ειδικότερα αναδείχθηκε πως οι κύριες διαφορές στην αλλοστερική τροποποίηση, στη θερμοσταθερότητα και στη βασική δραστηριότητα οφείλονται σε δύο σημειακές αλλαγές στην αντικατάσταση της Arg443 από Ser και της Gly456 από Ala. Η αντικατάσταση της Αργινίνης στη θέση 443 από Σερίνη κατ' ουσία εκμηδενίζει τη βασική δραστηριότητα της φυσιολογικής hGDH1 πρωτεΐνης. Το εύρημα αυτό επαναλαμβανόταν σταθερά σε όλες τις τιμές του pH που εξετάστηκαν (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) και ήταν ανεξάρτητο του είδους του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε (τριαιθανολαμίνης ή διαλύματος φωσφορικών) (Ζαγανάς ΔΔ, 2005). Επιπρόσθετα η αντικατάσταση της Arg443 από Ser δεν επιτρέπει την ενεργοποίησή του από τη λευκίνη (απουσία άλλων αλλοστερικών ενεργοποιητών), ενώ το φυσιολογικό ένζυμο παρουσιάζει 75% αύξηση της δραστηριότητας του με προσθήκη λευκίνης σε συγκέντρωση έως 1.5 mM. Όμως η ταυτόχρονη παρουσία λευκίνης και μικρών ποσοτήτων ADP (0.025-0.050 mM) επιτρέπει την

δραστηριοποίηση του ενζύμου από την λευκίνη έως >2000% πάνω από τη βασική δραστηριότητα (Εικ. 10).

Η δομική ανάλυση της ανθρώπινης GDH (σε ανοικτή διαμόρφωση) έδειξε πως η κατιούσα α-έλικα της “αντέννας” (τμήμα της οποίας είναι το κατάλοιπο Arg443) λειτουργώντας ως μοριακό ελατήριο ανατυλίσσεται καθώς ανοίγει η καταλυτική σχισμή. Αντιθέτως το κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής μίας υπομονάδας (κλειστή διαμόρφωση) συνοδεύεται από παραμόρφωση της κατιούσης α-έλικας, η οποία εξωθείται προς την αντέννα της γειτονικής υπομονάδας (Εικ. 2). Ας σημειωθεί πως οι δεσμοί H μεταξύ της πλευρικής αλύσου της Arg443 με την πλευρική αλυσό της Ser409 παρατηρούνται και στην ανοικτή και στην κλειστή διαμόρφωση (Εικ. 13). Η εναλλαγή μεταξύ ανοικτής και κλειστής διαμόρφωσης θεωρείται απαραίτητη για τη λειτουργία του ενζύμου. Είναι πιθανόν η αντικατάσταση της Arg443 από Ser με την συνακόλουθη απώλεια των δεσμών H με τη Ser409 να ευνοεί την κλειστή διαμόρφωση. Κατ’ αυτόν τον τρόπο δικαιολογείται η πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου. Στο ότι η σημειακή αλλαγή Arg443Ser ευνοεί την κλειστή διαμόρφωση συνηγορεί και η απώλεια ενεργοποίησης του μεταλλαγμένου ενζύμου από την λευκίνη, η οποία θεωρείται πως συνδέεται στο ενεργό κέντρο και συνεπώς το κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής εμποδίζει την σύνδεση αυτή. Από την άλλη μεριά το ADP έχει τη δυνατότητα να συνδέεται και στην ανοικτή και στην κλειστή διαμόρφωση και είτε να διευκολύνει τη διάνοιξη είτε να εμποδίζει την υπερβολική σύγκλειση της καταλυτικής σχισμής. Η ενεργοποίηση της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 απαιτεί σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ADP ( $SC_{50} = 383.9 \pm 14.6 \mu M$ ) για να ανοίξει η καταλυτική σχισμή και να επιτευχθεί η κατάλυση. Πάντως φαίνεται πως αρκούν μικρές συγκεντρώσεις ADP (ικανές να δεκαπλασιάσουν τη βασική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1, ώστε να αποκτήσει τη βασική δραστηριότητα της wild type hGDH2) για το άνοιγμα της καταλυτικής σχισμής και την είσοδο της L-λευκίνης στο ενεργό κέντρο. Με αυτό τον τρόπο εξηγείται ο τρόπος ενεργοποίησης από την λευκίνη παρουσία ADP και την αυξημένη έναντι και της hGDH2 ευαισθησία στη δράση της L-λευκίνης.

Η αντικατάσταση της Γλυκίνης 456 από Αλανίνη προσέδωσε στη μεταλλαγμένη ισομορφή ανθεκτικότητα στο GTP. Η δομική ανάλυση πιθανολογεί πως η σημειακή αλλαγή σηματοδοτεί την εισαγωγή στερεοταξικών συγκρούσεων με παρακείμενα αμινοξέα (Phe387, Leu401) της ίδιας ή παρακείμενης υπομονάδας. Το αποτέλεσμα είναι αφενός να παρεμποδίζεται η σύνδεση του GTP (το οποίο με τα

άτομα οξυγόνου των β- και γ- φωσφορικών ομάδων του δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά αμινοξέας όπως Lys450 ή His454) και αφετέρου να μην επιτρέπεται η επικοινωνία των υπομονάδων μέσω της “αντέννας” (και συνεπώς να αίρεται η συνεργατικότητα που αποτελεί χαρακτηριστικό της εξαμερούς GDH). Με τον ίδιο μηχανισμό εξηγείται άλλωστε και η ανθεκτικότητα στο GTP των μεταλλάξεων στο σύνδρομο HI/HA, οι οποίες σχετίζονται με την περιοχή της “αντέννας”.

### **Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποτελεί την πλέον κοντινή προσομοίωση της wild type hGDH2**

Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αναπαρήγαγε τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ hGDH1 και hGDH2, χωρίς όμως να ταυτίζεται με τον τρόπο ενζυμικής συμπεριφοράς της τελευταίας (μάλλον δε στις πλείστες των ιδιοτήτων υιοθετούσε συμπεριφορά ενδιάμεση της Arg443Ser μεταλλαγμένης hGDH1 και της hGDH2). Συνοπτικά εμφάνισε χαμηλή βασική δραστηριότητα (0.25% της μεγίστης) όταν αντιστοίχως η wild-type hGDH2 εμφάνιζε βασική δραστηριότητα 2.5% της μεγίστης (Kanavouras και συν., 2007) και η Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 ~0,21 % της μεγίστης (Ζαγανάς 2005, διδακτορική διατριβή). Σε ότι αφορά στην εξάρτηση της καταλυτικής δραστηριότητας από την συγκέντρωση του ισοενζύμου τόσο η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 όσο και η wild type hGDH2 σε συγκεντρώσεις από 0.5-13 μg/ml αύξησαν τη βασική τους δραστηριότητα κατά 12 φορές (Εικ. 21) (Kanavouras και συν., 2007). Επίσης η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ήταν ευαίσθητη στη θερμότητα με χρόνο ημίσειας ζωής = 16.5 minutes, σχεδόν υποδιπλάσιο του αντίστοιχου χρόνου της wild-type hGDH2 (Εικ. 22) (Kanavouras και συν., 2007). Οι κινητικές ιδιότητες δεν διέφεραν ουσιωδώς μεταξύ της διπλά μεταλλαγμένης R443S/G456A hGDH1 και των φυσιολογικών hGDH1 και hGDH2. Η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 ήταν ~3 φορές πιο ανθεκτική στην ενεργοποίηση από το ADP ( $SC_{50} = 188.4 \pm 40.4 \mu M$ ) σε σχέση με την wild type hGDH2 ( $SC_{50} = 50.7 \pm 4.3 \mu M$ ), μολονότι το ADP ενίσχυσε την δραστηριότητα του ενζύμου κατά ~ 5-6,000 % από τη βασική. Η αντίστοιχη αύξηση δραστηριότητας για την wild type hGDH2 ήταν της τάξης του 1,600 % (Εικ. 23) (Kanavouras και συν., 2007). Τέλος η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 εμφάνισε παρόμοια με την wild type hGDH2 συμπεριφορά στην ανθεκτικότητα αναστολής από το GTP παρουσία ADP, ενώ απουσία αλλοστερικού ενεργοποιητή ήταν 8 φορές



ανθεκτικότερη στη δράση του ( $IC_{50} = 622.4 \pm 19.5 \mu\text{M GTP}$  για τη διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 έναντι  $IC_{50} = 78.5 \pm 14.1 \mu\text{M GTP}$  για την hGDH2) (Εικ. 24 και 25). Κατά συνέπεια η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 επέδειξε όπως και η wild type hGDH2 αρνητική συνεργατικότητα στην ανάλυση κατά Hill (Πίνακας 8).

Πρόσφατη μελέτη των Choi και συν. 2007 έδειξε πως η δημιουργία δύο ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών α) της hGDH1 με την antenna (390-448 αμινοξέα) της hGDH2 και β) της hGDH2 με την antenna (390-448 αμινοξέα) της hGDH1 (ουσιαστικώς και οι δύο ισομορφές περιείχαν 2 σημειακές αλλαγές στις θέσεις Met415Leu και Arg443Ser) αναπαρήγαγε τις φυσικοχημικές ιδιότητες των hGDH2 και hGDH1 αντίστοιχα πλην της αναστολής από το GTP. Ειδικότερα μελέτησαν την διαφορετική επίδραση της θερμότητας, την διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα, τον διαφορετικό τρόπο ενεργοποίησης από τη λευκίνη και το ADP και την αναστολή από το GTP και το παλμιτόϋλο-συνένζυμο A. Όσον αφορά στο τελευταίο η wild type hGDH2 και αναλόγως η hGDH1(hGDH2<sub>390-448</sub>) hGDH1 επέδειξαν αυξημένη παρόμοια ευαισθησία στην αναστολή από το παλμιτόϋλο-συνένζυμο A, ενώ η wild type hGDH1 και η hGDH2(hGDH1<sub>390-448</sub>) hGDH2 ήταν σχετικώς ανθεκτικές στη δράση του. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει παλαιότερες παρατηρήσεις για τον ουσιώδη ρόλο της “αντέννας” στην αναστολή από το παλμιτόϋλο-συνένζυμο A (Allen και συν., 2004) και εστιάζει ειδικότερα στο ρόλο των θέσεων 415 και 443 ως πιθανών θέσεων σύνδεσης του παλμιτόϋλο-συνενζύμου A. Σε ότι αφορά την ενεργοποίηση από λευκίνη απουσία του ADP οι γραφικές παραστάσεις για την wild type hGDH2 και αναλόγως τη hGDH1(hGDH2<sub>390-448</sub>) hGDH1 ήταν σιγμοειδικές δηλωτικές αυξημένης ευαισθησίας στη δράση της, ενώ για τη wild type hGDH1 και τη hGDH2(hGDH1<sub>390-448</sub>) hGDH2 ήταν υπερβολές. Παρουσία ADP οι καμπύλες ενεργοποίησης τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα κατασκευασμένα ισοένζυμα ήταν υπερβολές με παρόμοια  $IC_{50}$ . Επιβεβαιώνονται τόσο παλαιότερες μελέτες στο εργαστήριό μας σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν., 2000) όσο και σε καθαρισμένες πρωτεΐνες ((Εικ. 8 και 10) (Μαστοροδήμος ΜΔΕ/ΜΠΝ, 2003, Kanavouras και συν., 2007). Κατά συνέπεια η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποτελεί με τα ως σήμερα δεδομένα το πλέον κοντινό μοντέλο που προσεγγίζει τον τρόπο λειτουργίας της hGDH2

**Μεταλλαγμένες ισομορφές Ser409Arg και Ser409Asp hGDH1-Ρόλος της αλληλεπίδρασης Ser409 και Arg443 στη βασική δραστηριότητα της GDH και στην ενεργοποίηση από τη λευκίνη.**

Η δεύτερη ανασυνδυασμένη hGDH ισοπρωτεΐνη που μελετήσαμε η Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνισε πολύ χαμηλή βασική ειδική δραστηριότητα (2.7 % της μέγιστης, δηλαδή παρουσία ADP 1mM). Η βασική ειδική δραστηριότητα (basal specific activity) του μεταλλαγμένου ενζύμου είναι παρόμοια με την βασική δραστηριότητα της wild-type hGDH2 (2.5-6 % της μέγιστης) αλλά 10 φορές μεγαλύτερη της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1. Όμως με την επίδραση του ADP αποκαθίστατο στα επίπεδα των φυσιολογικών ανασυνδυασμένων GDH ισοενζύμων. Ήταν απρόσμενα ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση (χρόνος ημίσειας ζωής = 239.7 min). Η ανθεκτικότητα στην θερμότητα της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1 συνιστά μείζονα διαφορά σε σχέση τόσο με την wild-type hGDH2 (χρόνος ημίσειας ζωής = 38 minutes) όσο και με την μεταλλαγμένη Arg443Ser hGDH1 (χρόνος ημίσειας ζωής = 5 minutes) (Kanavouras και συν., 2007). Καθώς δε η θερμοευαισθησία της wild-type hGDH2 φαίνεται να οφείλεται κατεξοχήν στην αντικατάσταση της Arg από Ser στη θέση 443 (Choi και συν., 2007; Yoon και συν, 2004), η ιδιότητα αυτή δεν σχετίζεται με τη σύναψη δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Ser409 της μίας υπομονάδας με την Arg443 μίας γειτονικής υπομονάδας στο εξαμερές της GDH. Όσον αφορά την επίδραση των αλλοστερικών τροποποιητών, παρουσίαζε σημαντική ανθεκτικότητα στη δράση του ADP ( $SC_{50} = 127.5 \pm 4.1 \mu M$ ) και ήταν ανθεκτική στην ενεργοποίηση από λευκίνη απουσία ADP. Μολαταύτα η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ADP (25-100 $\mu M$ ) ευαισθητοποιούσε το μεταλλαγμένο ένζυμο στη δράση της λευκίνης (συνεργική δράση ADP-λευκίνης). Παρατηρούμε πως η μεταλλαγμένη Ser409Arg hGDH1 υιοθετεί την συμπεριφορά της μεταλλαγμένης Arg443Ser hGDH1 σε σχέση με την ενεργοποίηση από την λευκίνη (Ζαγανάς και συν, 2002) και προσομοιάζει στον τρόπο ενεργοποίησης της hGDH2 (Εικ. 34-35). Οι μόνες ελάχιστες διαφορές που διακρίνονται παρατηρώντας τις καμπύλες ενεργοποίησης είναι πως 1) η μεν Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 έχει μηδενική δραστηριότητα σε οποιαδήποτε συγκέντρωση λευκίνης, ενώ στη Ser409Arg μεταλλαγμένη hGDH1 ανιχνεύεται μια ελάχιστη δραστηριότητα σε συγκεντρώσεις λευκίνης (6-10 mM τελική συγκέντρωση) και 2) η σιγμοειδική καμπύλη ενεργοποίησης της Ser409Arg μεταλλαγμένης hGDH1-δηλωτικό συνέργειας ADP και L-λευκίνη-γίνεται υπερβολή σε χαμηλότερη συγκέντρωση ADP (<0,05 mM) από

την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 που αυτό συμβαίνει σε συγκέντρωση ADP(>0,1 mM). Πιθανόν και αυτό να έχει σχέση με την πολύ χαμηλότερη βασική ειδική δραστηριότητα της Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 και την σημαντικά χαμηλότερη ευαισθησία της στο ADP. Τέλος ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την wild type hGDH1 (αλλά και την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1) στην αναστολή από το GTP. Παρά την αυξημένη ευαισθησία όμως η μετάλλαξη Ser409Arg κατήργησε την συνεργατική συμπεριφορά του ενζύμου (Εικόνα 36). Η δομική προσομοίωση της εισαγωγής της Αργινίνης στη θέση 409 αντί της Σερίνης στο μόριο της hGDH1 έδειξε πως είτε δημιουργούνται στερεοταξικές συγκρούσεις (steric clashes) με τα κατάλοιπα Glu406 ή/και Arg443 παρακείμενης υπομονάδας και με το αμινοξύ Tyr405 της ίδιας υπομονάδας είτε εξαλείφεται ο δεσμός H μεταξύ Arg443 και Ser409 (Εικ 37, 38 και 39).

Επιπλέον μελετήσαμε σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα μια ισοπρωτεΐνη όπου αντικαταστήσαμε την Ser409 με το όξινο αμινοξύ ασπαρτικό. Συνοπτικά η Ser409Asp μεταλλαγμένη hGDH1 εμφάνιζε χαμηλή βασική δραστηριότητα (3-5 % της μεγίστης) παρόμοια με αυτή των μεταλλαγμένων Ser409Arg και Arg443Ser hGDH1(1-3 % της μεγίστης). Σε αντίθεση όμως με τις άλλες δύο ενεργοποιούνταν από το ADP με τρόπο ομοιάζοντα περισσότερο στη wild-type hGDH1 ( $SC_{50}^{Ser409Asp} = 44.4 \pm 4.9 \mu M$  ADP έναντι  $SC_{50}^{wt hGDH1} = 24.02 \pm 5.1 \mu M$ ) παρά στη wild-type hGDH2 ( $SC_{50} = 143,2 \pm 7,7 \mu M$  ADP) (Εικ. 27). Διαπιστώνεται συνέργεια μεταξύ ADP και L-λευκίνης αλλά μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP (0.01-0.05 mM), ενώ και σε απουσία ADP ήταν ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από τη λευκίνη, σε αντίθεση με τις μεταλλαγμένες Ser409Arg και Arg443Ser hGDH1. Τέλος εμφανίζει ανθεκτικότητα στην αναστολή από το GTP προσεγγίζοντας τη συμπεριφορά της wild-type hGDH2 (ιδίως παρουσία ADP 1 mM). Εμφανίζει συμπεριφορά ακριβώς αντίθετη της μεταλλαγμένης Ser409Arg hGDH1, ενώ άξιο μνείας είναι ότι παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν οι Zaganas & Plaitakis (2002a) στη Gly456Ala μεταλλαγμένη hGDH1. Δομική προσομοίωση της εισαγωγής του Asp στη θέση 409 αντί Ser έδειξε πιθανή απώλεια των δεσμών υδρογόνου (H-bonds) που υπήρχαν στη wild-type hGDH1 μεταξύ Arg443 και Ser409 (Εικ. 43).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο της αλληλεπίδρασης της Ser409 της ανιούσης έλικος της μίας υπομονάδας με την Arg443 της κατιούσης έλικας της άλλης υπομονάδας στο άνοιγμα-κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής άρα και στη βασική δραστηριότητα της wild-type hGDH2. Έτσι εξηγείται η

πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα όλων των μεταλλαγμένων ενζύμων που μιμούνται τροποτινά την wild-type hGDH2 (Ser409Arg, Ser409Asp και Arg443Ser μεταλλαγμένες hGDH1). Επιπλέον επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση πως η λευκίνη συνδέεται στο ενεργό κέντρο (πιθανότατα λόγω της ομοιότητας με το υπόστρωμα δηλαδή το γλουταμικό ) όταν ανοίγει η καταλυτική σχισμή. Το γεγονός όμως αυτό εξαρτάται άρρηκτα από το δεσμό υδρογόνου μεταξύ Ser409 και Arg443, ο οποίος δεν υφίσταται στην περίπτωση της wild-type hGDH2, της Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 και της Ser409Arg (και ως ένα βαθμό και της Ser409Asp) μεταλλαγμένης hGDH1.

Η αποδέσμευση από τη ρύθμιση από το GTP και συνεπώς η εξάρτηση από το ADP των μεταλλαγμένων ισοενζύμων που ομοιάζουν με τη wild-type hGDH2 (αλλά φυσικά και καθεαυτής της wild-type hGDH2) πιθανότατα σχετίζονται με την λειτουργία του ισοενζύμου στην ειδικές συνθήκες του ΚΝΣ. Η συγκέντρωση του GTP στον εγκέφαλο είναι υψηλότερη από άλλα όργανα/ιστούς του ανθρωπίνου σώματος (ελεύθερο: 50-150  $\mu\text{M}$ , ολικό:  $>200 \mu\text{M}$  ). Κατά συνέπεια ίσως το GTP να μην αποτελεί τον καταλληλότερο αλλοστερικό τροποποιητή για τη hGDH. Επιπλέον αποτελώντας όπως και το ATP προϊόντα του κύκλου του Krebs (TCA cycle) δρα ως “αισθητήρας” ενέργειας στο κύτταρο που παράγεται. Έχοντας υπόψη την παραγωγή ενέργειας τόσο στα αστροκύτταρα πολλώ δε μάλλον στους νευρώνες κατά τη διάρκεια της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης υπάρχει ανάγκη για συνεχή λειτουργία της GDH (ώστε να μεταβολίζει το γλουταμικό και να αποτρέπεται η διαμέσου αυτού επαγόμενη νευροδιεγερτικοτοξικότητα). Τούτο για να συμβεί θα πρέπει οι ποσότητες GTP που παράγονται από τον κύκλο των TCA να μην αναστέλλουν τη GDH. Η συνθήκη αυτή δεν ισχύει για την wild-type hGDH1 ( $\text{IC}_{50}=0.2-0.3 \mu\text{M}$ ) αλλά εκπληρώνεται στην wild-type hGDH2, η οποία είναι  $>300$  φορές πιο ανθεκτική στην δράση του GTP ( $\text{IC}_{50}=78.5 \pm 14.1 \mu\text{M}$ ). Επιπλέον δείχθηκε πως η L-λευκίνη έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί (σε σημαντικό βαθμό) την wild-type hGDH2 (γεγονός που επιβεβαιώθηκε στις μεταλλαγμένες ομοιάζουσες τη wild-type hGDH2 ισοπρωτεΐνες, π.χ. Arg443Ser και Ser409Arg μεταλλαγμένες hGDH1) μόνο παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP. Τούτο συνεπάγεται πως, χωρίς σημαντικό ενεργειακό έλλειμμα, μικρές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του ADP αρκούν για την ενεργοποίηση του ενζύμου. Αυτές οι συνθήκες επικρατούν στα αστροκύτταρα στη διάρκεια της διεγερτικής (γλουταματεργικής) νευροδιαβίβασης, καθώς η πρόσληψη του γλουταμικού συσχετίζεται με αυξημένη υδρόλυση του ATP σε ADP.

Η κατανάλωση ενέργειας οφείλεται στην ενεργοποίηση της αντλίας ( $K^+Na^+$  ATPase) που διαμεσολαβεί την πρόσληψη (μέσω των μεταφορέων= transporters) του γλουταμικού στα αστροκύτταρα (Naito and Ueda, 1985; Anderson και Swanson, 2000). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως πρόσφατα αναγνωρίστηκαν δύο μεταφορείς του γλουταμικού στα μιτοχόνδρια οι GC1(Glutamate Carrier 1) και GC2 (Glutamate Carrier 2). Οι μεταφορείς διαφέρουν τόσο στις κινητικές ιδιότητες ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) όσο και στην ιστική κατανομή. Ο μεν GC1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ο δε GC2 κατά κύριο λόγο στον εγκέφαλο και στον ορχικό ιστό (Fiermonte και συν., 2002). Περαιτέρω γενετική ανάλυση έδειξε πως ο GC1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC25A2,2* το οποίο περιέχει 9 εξόνια και χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 11p15.5. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται περιέχει 323 αμινοξέα, εμφανίζει 95% ομολογία με την αντίστοιχη του ποντικού και πιθανόν εμπλέκεται στη νεογνική επιληψία με suppression-burst pattern (Molinari και συν., 2005). Ο GC2 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC25A18* το οποίο περιέχει 11 εξόνια, χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 22q11.2 και εμφανίζει 63% ομοιότητα με την πρωτεϊνική αλληλουχία του *SLC25A22*. Είναι περιττό να υπομνηστεί η εκπληκτική ομοιότητα με την κυτταρική κατανομή των wild-type hGDH1 και wild-type hGDH2, γεγονός που θα πρέπει να σχετίζεται πως και τα δύο γονίδια (*GLUD2* και *SLC25A18*) εξελίχθηκαν για να προσαρμοστούν στις ιδιαίτερες μεταβολικές απαιτήσεις του νευρικού ιστού.

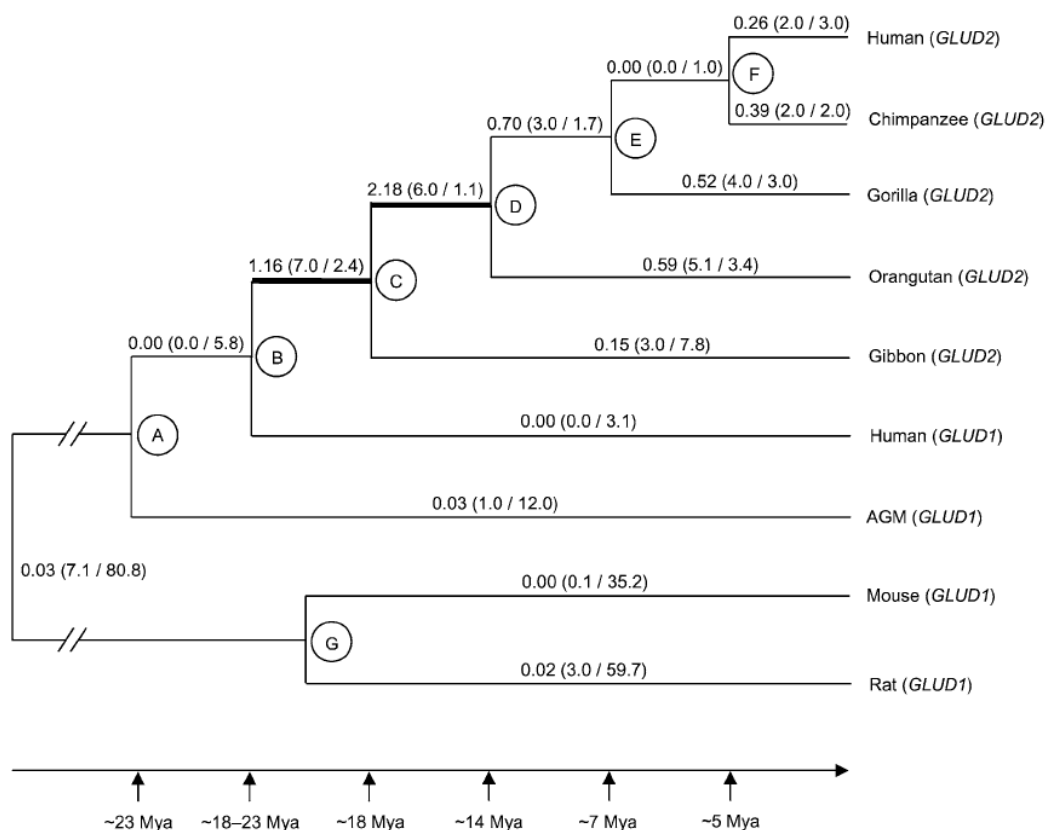
### **Εξελικτική ιστορία των ισοενζύμων της GDH και συσχέτιση με την εξέλιξη των πρωτευνόντων**

Ενώ το γεγονός πως το *GLUD2* γονίδιο προήλθε από διπλασιασμό και ρετρομετάθεση στο X χρωμόσωμα του αυτοσωματικού *GLUD1* γονιδίου ήταν από παλαιά γνωστό (Shashidharan και συν., 1994) μόνο πρόσφατα οι Burki και Kaessmann (2004) αποκάλυψαν τις πτυχές της εξελικτικής του ιστορίας. Προκειμένου να βρουν την πλήρη *GLUD2* αλληλουχία που εισήχθη στο X χρωμόσωμα μελέτησαν εκτός της κωδικοποιούσας αλληλουχίας 5 kb DNA ανοδικά και καθοδικά αυτής. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε μια αλληλουχία 263 bp ανοδικά και μία άλλη 1,240 bp καθοδικά της κωδικοποιούσας αλληλουχίας που αντιστοιχούσαν στην αμετάφραστη περιοχή (UTR) του πατρικού γονιδίου *GLUD1* στο χρωμόσωμα 10. Χρησιμοποιώντας εκκινητές εκατέρωθεν του σημείου ένθεσης του *GLUD2* ανακάλυψαν την ύπαρξη του *GLUD2* στους πιθήκους του Νέου Κόσμου αλλά όχι σε

αυτούς του Παλαιού Κόσμου (OWM, Αφρικανικό πράσινο πίθηκο). Το συμπέρασμα ήταν πως το *GLUD2* αποτελεί ειδικό για τα ανθρωποειδή γονίδιο το οποίο προέκυψε μέσω ρετροδιπλασιασμού μετά το διαχωρισμό τους από τους πιθήκους του Παλαιού Κόσμου (πριν  $\sim 23 \times 10^6$  έτη) αλλά οπωσδήποτε πριν το διαχωρισμό του γίββωνα από τους μεγάλους πιθήκους (ουρακοτάγκο, γορίλλα) και τον άνθρωπο (πριν  $\sim 18 \times 10^6$  έτη). Κατασκευάζοντας το φυλογενετικό δένδρο (Εικ. 57) παρατήρησαν την επικράτηση μη συνώνυμων αντικαταστάσεων ( $K_A$ ) σε σχέση με τις συνώνυμες (= σιωπηλές,  $K_S$ ) λίγο μετά το διπλασιασμό ενδεικτικό επιταχυνόμενης εξέλιξης κάτω από την πίεση της θετικής επιλογής (positive selection). Σε ορισμένους κλάδους ο λόγος  $K_A/K_S$  ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από 1 (κλάδος B-C,  $K_A/K_S \sim 4$ , κλάδος C-D,  $K_A/K_S \sim 16$ , Εικ. 57), γεγονός που συνηγορεί υπέρ εξελικτικής πίεσης θετικής επιλογής σε αντίθεση με το *GLUD1* το οποίο μετά το διπλασιασμό δεν υπέστη αλλαγές στα αμινοξέα ( $K_A/K_S < 1$ ) κάτω από την πίεση καθαρτικής επιλογής (purifying selection). Είναι αξιοσημείωτη η παρατήρηση πως οι αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala ήταν από τις πρώτες που συνέβησαν στο *GLUD2* (λίγα εκατομμύρια έτη μετά τον διπλασιασμό).

Μελέτη της περιόδου αυτής ( $18-23 \times 10^6$  έτη) από εξελικτικής σκοπιάς δείχνει πως παράλληλες αλλαγές σηματοδοτούνται και σε άλλα ανθρώπινα γονίδια που έχουν σχέση με τον εγκέφαλο. Για παράδειγμα οι Evans και συν., (2004 a, b) έδειξαν πως 2 γονίδια που ευθύνονται για το μέγεθος της κεφαλής τα *ASPM* (Abnormal spindle-like microcephaly associated) και *MCPHI* (microcephalin) υπέστησαν την πίεση της φυσικής επιλογής. Η επιτάχυνση της αλλαγής της αλληλουχίας ήταν περισσότερο εμφανής με την εξελικτική γραμμή από τους μεγάλους πιθήκους στον άνθρωπο. Ειδικότερα για τη μικροκεφαλίνη στη διάρκεια των  $\sim 25-30 \times 10^6$  ετών εξέλιξης από τους early simian progenitors στον άνθρωπο διαπιστώθηκαν 45 αλλαγές στα αμινοξέα της. Οι Dorus και συν., (2004) μελέτησαν την εξελικτική ιστορία γονιδίων που σχετίζονται με το ΚΝΣ και βρήκαν πως σε σχέση με τα τροφικά τα πρωτεΐοντα θηλαστικά επεδείκνυαν υψηλότερους ρυθμούς αλλαγών σε πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται ιδίως από γονίδια με εμπλοκή στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (μέγεθος) και στη συμπεριφορά. Η επιταχυνόμενη πρωτεϊνική εξέλιξη είναι σαφέστερη στην εξελικτική γραμμή από τους αρχέγονους πιθήκους (macaque) στον άνθρωπο, δηλαδή την περίοδο  $20-25 \times 10^6$  έτη. Όμως και γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό όπως αυτά των συμπλόκων III και IV και του κυτοχρώματος c, σχετίζονται με ταχεία εξέλιξη της πρωτεΐνης στην ιστορία της

εξέλιξης των ανθρωποειδών. Ιδιαίτερα για την υπομονάδα IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX; complex IV) ο ρυθμός των αλλαγών επιταχύνθηκε στην περίοδο 40-18 x 10<sup>6</sup> έτη (ενδεικτικό φυσικής επιλογής) και επιβραδύνθηκε αργότερα (ενδεικτικό καθαρτικής επιλογής) (Grossmann και συν., 1997, 1999). Κατά συνέπεια επιβεβαιώνεται πως ο διπλασιασμός και η δημιουργία του *GLUD2* συμπίπτει με μία περίοδο επιτάχυνσης της εξελικτικής διαδικασίας των ανθρωποειδών.



**Εικ. 57:** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες *GLUD2* των ανθρωποειδών που κωδικοποιούν το ώριμο πεπτίδιο και στις αλληλουχίες *GLUD1* από άνθρωπο και Αφρικανικό πράσινο πίθηκο (AGM; Αντιπροσωπεύει τους πιθήκους του Παλαιού Κόσμου=OWMs). Τα ορθόλογα γονίδια *GLUD1* από ποντικό και αρουραίο χρησιμοποιήθηκαν σαν outgroups. Η πιθανολογούμενη χρονολόγηση των αλλαγών σε εκατομμύρια έτη (Mya) σημαίνεται με τα βέλη. Οι τιμές μεγίστης πιθανότητας του λόγου  $K_A/K_S$  και ο υπολογιζόμενος αριθμός συνώνυμων έναντι μη συνώνυμων αντικαταστάσεων για κάθε κλάδο φαίνεται στις παρενθέσεις. Οι ενδιάμεσοι κόμβοι ονομάζονται (A–G) ενώ οι δύο κλάδοι που βρίσκονται υπό την επίδραση φυσικής επιλογής

(positive selection) μετά το γεγονός του διπλασιασμού δείχνονται τονισμένοι (bold). Οι αμινοξικές αλλαγές που συνέβησαν στους δύο αυτούς κλάδους είναι οι ακόλουθες : Κλάδος B–C: A3V, E34K, D142E, S174N, R443S, G456A και N498S; Κλάδος C–D: V3L, R39Q, K299R, S331T, M370L και R470H. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από το άρθρο των Burki F. και Kaessmann H. 2004. Nat Genet. 36, 1061-3.

### **Υποκυτταρική εντόπιση των ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης**

Σε ότι αφορά στην υποκυτταρική εντόπιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης βρήκαμε πως τόσο η wild-type hGDH1 όσο και η wild-type hGDH2 εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια όλων των κυτταρικών σειρών που εξετάστηκαν (COS 7, HEK293, HELA και κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y). Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στο μοντέλο φθορισμού (άρα και στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ανασυνδυασμένων χημικών πρωτεϊνών) μεταξύ ανθρώπινων και ζωϊκών κυτταρικών σειρών. Μικρό κλάσμα hGDH1 και hGDH2 φαίνεται πως εντοπίζεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς η συνδιαμόλυνση των *GLUD1-EGFP* (ή *GLUD2-EGFP*) με τον δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου *pDsRed2-ER* αποκάλυψε κάποιου βαθμού αλληλεπικάλυψη των 2 φθορισμών.

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τα ευρήματα προηγούμενων ανοσοϊστοχημικών μελετών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM) (Knecht και συν., 1985; Aoki και συν., 1987; Mandl και συν., 1988; Rothe και συν., 1994), οι οποίες αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα ανοσοσήμανσης GDH κατεξοχήν στα μιτοχόνδρια και δευτερευόντως σε άλλες υποκυτταρικές δομές (κατά κύριο λόγο μεμβρανικούς σχηματισμούς). Η εντόπιση των hGDH1 και hGDH2 στα μιτοχόνδρια είναι συμβατή με το ρόλο τους στο μεταβολισμό του γλουταμικού, ιδιαίτερα δε στην ανακύκλωσή του στις γλουταματεργικές συνάψεις (McKenna και συν., 1996) και γενικότερα στο ενεργειακό δυναμικό του κυττάρου (Plaitakis και συν., 2003; Mastorodemos και συν., 2005). Η πιθανότητα εντόπισης των hGDH1 και hGDH2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο συμφωνεί με παλαιότερες παρατηρήσεις για ύπαρξη και “μεμβρανικής” ισομορφής GDH. Ειδικότερα από το 1973 οι Godinot και Lardy ανίχνευαν μία μορφή GDH συνδεδεμένης με τα μικροσώματα, ενώ πλέον πρόσφατα οι Lee και συν., (1999) απομόνωσαν μία ισομορφή GDH από το ήπαρ αρουραίου προσδεδεμένη χαλαρά στην κυτταροπλασματική πλευρά του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (RER). Επίσης οι Colon και συν., (1986) ανίχνευαν στον εγκέφαλο αρουραίου μία ισχυρά συνδεδεμένη με μεμβράνες (particulate-bound) ισομορφή GDH. Οι Rajas και συν.,



1996 απομόνωσαν από αδρά εκχυλίσματα μεμβρανών ήπατος και εγκέφαλου χοίρου μία πρωτεΐνη με δραστηριότητα GDH θεώρησαν πως διαμεσολαβεί στην σύνδεση των λυσοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους και πιθανόν λειτουργεί ως παράγων αγκυροβόλησης. Αξίζει στο σημείο αυτό να υπομνηστεί ότι τα δεδομένα των Rajas και συν., (1993, 1996) συμφωνούν με αυτά των Colon και συν., (1986) καθώς οι λυσοσωμικές μεμβράνες αναμένεται να καθιζάνουν στο κλάσμα που απομονώθηκε από τον εγκέφαλο αρουραίου μετά την υπερφυγοκέντρωση των 100,000 x g (HSP). Επίσης μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι πως είτε με βάση το μοριακό τους βάρος (στην ηλεκτροφόρηση πηκτής με SDS-PAGE) είτε με βάση την αλληλούχηση του αμινοτελικού άκρου και οι δύο αυτές “μεμβρανικές” GDH ισομορφές προέρχονταν από μετα-μεταφραστική τροποποίηση καθώς τους έλειπε η αμινοτελική αλληλουχία-οδηγός (leader peptide).

Η συνέχιση, στο εργαστήριό μας, των μελετών υποκυτταρικής εντόπισης των hGDH1 και hGDH2 επιβεβαίωσαν την μιτοχονδριακή εντόπιση των hGDH1 και hGDH2. Κύτταρα HEK293 και SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *GLUD1\_del-EGFP* και *GLUD2\_del-EGFP*, τα οποία κωδικοποιούν τις άνευ αμινοτελικής καθοδηγητικής αλληλουχίας μορφές των hGDH1-EGFP και hGDH2-EGFP χμαιοτικών πρωτεϊνών (Κοτζαμάνη ΜΔΕ-ΜΠΝ (Master thesis), 2006). Η εξάλειψη της αμινοτελικής καθοδηγητικής αλληλουχίας κατήργησε τη μιτοχονδριακή εντόπιση των GDH ισοπρωτεϊνών. Ο πράσινος φθορισμός εμφάνιζε μια ομοιόμορφη ευρεία κατανομή γύρω από τον πυρήνα, σε μία περιοχή που πιθανότατα αντιστοιχεί στο κυτταρόπλασμα. Η κατανομή αυτή διέφερε από τη στικτή κατανομή του μιτοχονδριακού δείκτη pDsRed2-Mito ή των πλήρους μήκους hGDH1-EGFP και hGDH2-EGFP χμαιοτικών πρωτεϊνών. Τούτο αφενός επιβεβαιώνει τις προβλέψεις των υπολογιστικών προγραμμάτων (Predict Protein , TargetP-1.1, PSORT) και αφετέρου συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα παλαιότερων ερευνητών (Mihara και συν, 1982; Mavrothalassitis και συν, 1988; Shashidharan και συν., 1997). Σύμφωνα με τους τελευταίους η γλουταμική αφυδρογονάση (αναφερόμενοι στην hGDH1 μορφή) συντίθεται ως ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο στο κυτταρόπλασμα , και οδηγείται στη συνέχεια στο μιτοχόνδριο, όπου αποκόπτονται τα πρώτα 53 αμινοξέα, για να παραμείνει η ώριμη μορφή. Επιπλέον επιβεβαιώνεται η ειδικότητα των ευρημάτων μας και απομακρύνεται η πιθανότητα να αποτελούν τεχνικό σφάλμα, συνεπεία λόγου χάρη της αδυναμίας του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού να διακρίνει μεταξύ των υποκυτταρικών οργανυλλίων.

Επίσης παρατηρήθηκε κάποιου βαθμού συνεντοπισμός με το δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου pDsRed2-ER, γεγονός που συνηγορεί με τα ευρήματα των Colon και συν., (1986) και Rajas και συν., (1996) σχετικά με την πρωτοταγή δομή των “μεμβρανικών” GDH. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι το ενδοπλασματικό δίκτυο εκτείνεται σε όλη τη δεξαμενή του κυτταροπλάσματος, οπότε απαιτούνται επιπλέον μελέτες (με χρήση πιθανόν HM ή διαφορικής φυγοκέντρησης και υποκυτταρικού κλασματικού διαχωρισμού εκχυλισμάτων κυττάρων) ώστε να διευκρινιστεί εάν τα ανωτέρω ευρήματα ανταποκρίνονται αληθώς σε εντόπιση των πρωτεϊνών στο ER.

Μία αντίρρηση που θα μπορούσε να διατυπωθεί στα ευρήματά μας είναι κατά πόσον οι χιμαιρικές πρωτεΐνες hGDH1-EGFP και hGDH2-EGFP υπερεκφράζονται στη διαδικασία της διαμόλυνσης και συνεπώς αυτό που βλέπουμε δεν αντιστοιχεί στην αληθή υποκυτταρική εντόπιση των φυσιολογικών (native) ισοενζύμων. Ενζυμικές μελέτες (αναστολή από το GTP) σε ολικά εκχυλίσματα HEK293 κυττάρων διαμολυσμένων μόνο με τους πλασμιδιακούς φορείς *pEGFP-N3*, *GLUD1-EGFP* και *GLUD2-EGFP* δεν αποκάλυψε διαφορές στη δραστηριότητα της GDH μεταξύ των 3 κυτταρικών εκχυλισμάτων (μη επιδεικνυόμενα δεδομένα). Συνεπώς η εντόπιση των χιμαιρικών ισοπρωτεϊνών σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα δεν οφείλεται στην υπερέκφρασή τους.

Μία άλλη αντίρρηση ιδιαίτερα για το θέμα της υποκυτταρικής εντόπισης των hGDH1 και hGDH2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο θα μπορούσε να είναι η πιθανότητα η μερική αλληλεπικάλυψη των φθορισμών των χιμαιρικών GDH με τον φθορισμό του δείκτη pDsRed2-ER να μην είναι αληθής αλλά να οφείλεται σε “επιμόλυνση” από μιτοχονδριακό κλάσμα. Γι’ αυτό τον λόγο διενεργήσαμε πειράματα τιτλοποίησης της συν-διαμόλυνσης HEK293 κυττάρων χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις πλασμιδιακών φορέων. Συγκεκριμένα συν-διαμολύναμε τα κύτταρα με διπλάσιες ή τριπλάσιες συγκεντρώσεις *GLUD1-EGFP* και *GLUD2-EGFP* έναντι της συνήθους συγκέντρωσης (ιδέ Μεθοδολογία) των *pDsRed2-Mito* και *pDsRed2-ER*. Επίσης εκτελέσαμε το αντίστροφο πείραμα δι (ή τρι)πλασιάζοντας τη συγκέντρωση των *pDsRed2-Mit* και *pDsRed2-ER* και χρησιμοποιώντας την τυπική συγκέντρωση για τα *GLUD1-EGFP* και *GLUD2-EGFP*. Κάθε σειρά πειραμάτων εκτελέστηκε εις διπλούν. Σε όλες τις σειρές των πειραμάτων, ανεξαρτήτως του ποιου πλασμιδιακού φορέα η συγκέντρωση υπερείχε, παρατηρήσαμε το ίδιο πρότυπο φθορισμού και συνεντοπισμού που διαπιστώθηκε στα αρχικά πειράματα. Η μόνη διαφορά που

επισημάνθηκε ήταν η διαφορετική ένταση φθορισμού, η οποία κατά κανόνα ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του πλασμιδίου (αδημοσίευτα δεδομένα). Βέβαια καθώς δεν ήταν δυνατόν να εκτιμηθεί ποσοτικά ο βαθμός συν-διαμόλυνσης το ερώτημα της μιτοχονδριακής “επιμόλυνσης” παραμένει, αν και με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τις GFP φθορίζουσες πρωτεΐνες η σύντηξη με άλλες πρωτεΐνες δεν μεταβάλλει ούτε τα λειτουργικά χαρακτηριστικά ούτε την υποκυτταρική εντόπιση.

Είναι άγνωστο επί του παρόντος αν η αποκάλυψη και εξωμιτοχονδριακής εντόπισης των ισομορφών της GDH μπορεί να σχετίζεται με ανάληψη κάποιου άλλου λειτουργικού ρόλου. Έχει γίνει εκτενής αναφορά (στο κεφ. της Εισαγωγής) στη θεώρηση των Rajas και συν., (1993, 1996) για τη GDH ως πιθανή πρωτεΐνη σύνδεσης λυσοσωμάτων με μικροσωληνίσκους όπως και στην άποψη των Preiss και συν., (1993, 1995) πως η GDH περιέχει μια δεσμεύουσα RNA περιοχή και συνεπώς εμπλέκεται στην συμεταφραστική μετατόπιση δυνητικά μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Χρειάζονται λοιπόν καλά σχεδιασμένες μελέτες για να διασαφηνιστεί η λειτουργική σημασία της εντόπισης των ισοενζύμων hGDH1 και hGDH2 σε οργανύλλια πλην των μιτοχονδρίων.

Τέλος σε κανένα πείραμα συν-διαμόλυνσης και σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν δεν βρέθηκαν έστω και ελάχιστες ενδείξεις εντόπισης των hGDH1-EGFP και hGDH2-EGFP χιμαιρικών πρωτεϊνών στον πυρήνα σε αντίθεση με παλαιότερα δεδομένα (Prisco και Casola, 1975; Lai και συν., 1985; McDaniel 1995).

## **Προοπτικές**

Παρότι η διπλά μεταλλαγμένη R443S/G456A hGDH1 αποτελεί την καλύτερη έως σήμερα προσομοίωση της wild-type hGDH2 δεν ταυτίζεται με αυτήν. Συνεπώς θεωρείται αναγκαία η συνέχιση των ενζυμικών μελετών, για να αποδειχθεί κατά πόσον αποκτά συμπεριφορά hGDH2 στην ενεργοποίηση από τη λευκίνη, στην αναστολή από τη διαιθυλστυλβεστρόλη, την οιστραδιόλη και το παλμιτόϋλο-συνένζυμο A, την ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου δραστηριότητα (concentration dependence) και το βέλτιστο pH λειτουργίας. Σε περίπτωση που και οι περαιτέρω μελέτες επιβεβαιώσουν την μη ταύτιση με την wild type hGDH2 είναι χρήσιμο να επιχειρηθεί η δημιουργία τριπλών ή τετραπλών μεταλλαγμάτων (π.χ. R443S, G456A και ένα ή περισσότερα από τα A3V, E34K, D142E, S174N και K299R), εκμεταλλευόμενοι και τα δεδομένα της εξελικτικής ιστορίας του *GLUD1*

γονιδίου, για την δημιουργία πρωτεΐνης που να αναπαράγει πιστά τις ιδιότητες της wild-type hGDH2

Επίσης όπως προείπαμε η αντικατάσταση της Gly 456 από Ala προσδίδει ανθεκτικότητα στο GTP. Η Gly456 εντοπίζεται στην αρχή της περιστρεφόμενης έλικας στη βάση σε μία πυκνά δομημένη περιοχή του ενζύμου που χαρακτηρίζεται ως μεντεσές (“hinge region”), καθώς η α-έλικα της μίας υπομονάδας έρχεται σε επαφή με την antenna της άλλης υπομονάδας. Θεωρείται ότι η εισαγωγή της Ala-456 προκαλεί στερεοταξικούς παρεμποδισμούς με τις πλευρικές αλύσους αμινοξέων της ίδιας υπομονάδας (όπως Phe387) ή παρακείμενων υπομονάδων (Leu401), οι οποίες επηρεάζουν την επικοινωνία των υπομονάδων μέσω της antenna (Εικόνα 14). Εάν η υπόθεση αυτή είναι σωστή, τότε η αντικατάσταση της Phe387 ή της Leu 401 wild type hGDH1 με μεγαλύτερου μεγέθους αμινοξέα θα οδηγούσε σε παρόμοιες λειτουργικές αλλαγές.

Όσον αφορά το θέμα της αλληλεπίδρασης Ser409 και Arg443 θα ήταν χρήσιμο η περαιτέρω ταυτόχρονη μελέτη των Ser409Arg και Ser409Asp μεταλλαγμένων hGDH1 (σε καθαρισμένη μορφή) και η σύγκριση τόσο με τις wild type hGDH1 και hGDH2 όσο και με την Arg443Ser μεταλλαγμένη hGDH1 σε σχέση με την ευαισθησία στη θερμότητα, την ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου δραστηριότητα και το βέλτιστο pH λειτουργίας. Επίσης είναι απαραίτητο οι *in silico* δομικές αναλύσεις να επιβεβαιωθούν με κρυσταλλογραφικά πειραματικά δεδομένα (λόγου χάρι κρυστάλλωση των Ser409Arg ή/και Arg443Ser μεταλλαγμένων hGDH1).

Τέλος όσον αφορά το θέμα της υποκυτταρικής εντόπισης των ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι σε εξέλιξη πειράματα στο εργαστήριό μας με χρησιμοποίηση τεχνικών διαφορικής φυγοκέντρωσης και υποκυτταρικού κλασματικού διαχωρισμού εκχυλισμάτων κυττάρων, ανοσοαποτύπωσης Western, RT-PCR και *in situ* υβριδοποίησης προκειμένου να διερευνηθεί αφενός κατά πόσον οι hGDH1-EGFP και hGDH2-EGFP χημεικές πρωτεΐνες είναι πράγματι λειτουργικές όπως οι αρχικές και αφετέρου να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω περιγραφέντα αποτελέσματα. Επιπλέον η χρήση νέων τεχνικών (π.χ. Fluorescence resonance energy transfer-FRET) ίσως επιτρέψει την διελεύκανση τόσο των αλληλεπιδράσεων των καταλοίπων στο μόριο της GDH όσο και της σημασίας ανεύρεσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης σε άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα (ενδοπλασματικό δίκτυο) πλην των μιτοχονδρίων.

Τελειώνοντας ας επισημάνουμε πως δεν έχουμε την αυταπάτη ότι λύσαμε το μυστήριο της ύπαρξης δύο λειτουργικών ισοενζύμων, εκ των οποίων το ένα με εξειδίκευση στο ΚΝΣ. Πιστεύουμε όμως πως τα συμπεράσματα από τις μελέτες μας και ο προβληματισμός που γεννιέται από την απάντηση επιστημονικών ερωτημάτων θα αποτελέσουν γόνιμο έδαφος για τη διελεύκανση του ρόλου της hGDH2 στην οικονομία του νευρικού συστήματος του ανθρώπου.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe T, Ishiguro SI, Saito, et al. (1992) Partially deficient glutamate dehydrogenase activity and attenuated oscillatory potentials in patients with spinocerebellar degeneration. *Invest Ophthalm. Vis Sci.* 33:447-452.
2. Allen A, Kwagh J, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. 2004. Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry* 43(45):14431-43.
3. Amuro, N., Ooki K., Ito, A., Goto, Y., Okazaki, T. 1989. Nucleotide sequence of rat liver glutamate dehydrogenase cDNA. *Nucleic Acids Res.* 17 : 2356.
4. Anagnou, N. P.; Seuanez, H.; Modi, W.; O'Brien, S. J.; Papamatheakis, J.; Moschonas, N. K. 1993 Chromosomal mapping of two members of the human glutamate dehydrogenase (GLUD) gene family to chromosomes 10q22.3-q23 and Xq22-q23. *Hum. Hered.* 43: 351-356.
5. 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.* 18: 305-318.
6. Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. 2003. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* 42:3446-3456.
7. Bastone A, Micheli A, Beghi E, Salmona M. 1995. The imbalance of brain large-chain amino acid availability in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with high doses of branched-chain amino acids. *Neurochem Int.* 27(6):467-72.
8. Bensimon G, Lascombe L, Meiniger V., the ALS/Riluzole group 1994. A controlled trial in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 330:585-591.
9. Berthiaume L, Dechaite I, Peseckis S, Resh MD. 1994. Regulation of enzymatic activity by active site fatty acylation. A new role for long chain fatty acid acylation of proteins. *J Biol Chem.* 69(9):6498-505.
10. Bouvier M, Szatkowski M, Amato A, Attwell D. 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 360: 471-474.
11. Bradford H. (1995) Glutamate, GABA and Epilepsy. *Progress in Neurobiology* 47:477-511.

12. Burki F. and Kaessmann H. 2004. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet.* 36: 1061-3.
13. Cho SW, Ahn JY, Lee J, Choi SY., 1996. Identification of a peptide of the guanosinetriphosphate binding site within brain glutamate dehydrogenase isoproteins using 8-azidoguanosine triphosphate. *Biochemistry* 35: 13907-13913.
14. Cho SW, Lee J, Choi SY. 1995. Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 233: 340-346.
15. Cho SW, Yoon HY, Ahn JY, Lee EY, Lee J. 2001. Cassete mutagenesis of lysine 130 of human glutamate dehydrogenase: an essential residue in catalysis. *Eur J Biochem.* 268:3205-3213.
16. Cho SW, Yoon HY., Ahn JY, Lee EY, Lee J. 2001. Cassete mutagenesis of lysine 130 of human glutamate dehydrogenase: an essential residue in catalysis. *Eur. J. Biochem.* 268, 3205-3213.
17. Cho SW., Ahn JY, Lee J. & Choi SY. (1996) Identification of an NAD<sup>+</sup> binding site of brain glutamate dehydrogenase isoproteins by photoaffinity labeling. *Biochemistry* 35: 13907-13913.
18. Choi MM, Huh JW, Yang SJ, Cho EH, Choi SY, Cho SW. 2005. Identification of ADP-ribosylation site in human glutamate dehydrogenase isozymes. *FEBS Lett.* 579(19):4125-30.
19. Choi MM, Kim EA, Yang SJ, Choi SY, Cho SW, Huh JW. 2007. Amino acid changes within antenna helix are responsible for different regulatory preferences of human glutamate dehydrogenase isozymes. *J Biol Chem.* 282(27):19510-7.
20. Clements JD, Lester RAJ, Tong CE, Jahr CE. 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498 –1501.
21. Colon A, Plaitakis A, Perakis A, Clark DD. 1986. Purification and characterization of a soluble and a particulare glutamate dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.* 46: 1811-1819.
22. Cormack, B. P., Valdivia, R., Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33–38.
23. Cornish-Bowden A., 1979. In: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Butterworth, London/Boston pp 147-176.
24. De Lonlay, P., Benelli, C., Fouque, F., Ganguly, A., Aral, B., Dionisi-Vici, C., Touati, G., Heinrichs, C., Rabier, D., Kamoun, P., Rober, J.J, Stanley, C., Saudubray,



- J.M., 2001. Hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome: report of twelve unrelated patients. *Pediatr. Res.* 50: 353-357.
25. Deloukas P., Dauwerse JG, Moschonas NK, van Ommen GJB, van Loon AP. 1993. Three human glutamate dehydrogenase genes (GLUD1, GLUDP2 and GLUDP3) genes are located on chromosome 10q, but are not closely physically linked. *Genomics* 17: 676-681.
26. Dennis, S., Clark, J., 1977. The pathway of glutamate metabolism in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 168, 521–527.
27. Dieter H, Koberstein R, Sund H., 1981. Studies of glutamate dehydrogenase. The interaction of ADP, GTP, and NADPH in complexes with glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 115: 217-226.
28. Di-Prisco G, Casola L. 1975. Detection of structural differences between nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases by the use of immunoadsorbents. *Biochemistry* 4(21): 4679-83.
29. Dorus, S. Vallender E, Evans P, et al. 2004. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* 119, 1027–1040
30. Erecinska, M., Nelson, D., 1990. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 54: 1335-43.
31. Evans, P.D., Anderson, J.R., Vallender, E.J., Gilbert, S.L., Malcom, C.M., Dorus, S. and Lahn, B.T. (2004) Adaptive evolution of ASPM, a major determinant of cerebral cortical size in humans. *Hum. Mol. Genet.* 13: 489–494.
32. Fahien, L. A., Strmecki, M., Smith, S. 1969. Studies of gluconeogenic mitochondrial enzymes. I. A new method of preparing bovine liver glutamate dehydrogenase and effects of purification methods on properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 130: 449-55.
33. Fahien, L.A., McDonald, M.J., Kmiotek, E.H., Mertz, R.J., Fahien, C., 1988. Regulation of insulin release by factors that also modify glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263: 13610-13614.
34. Fang J, Hsu B, MacMullen C, Poncz M, Smith T, Stanley C. 2002. Expression, purification and characterisation of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem J.* 363:81-87.
35. Farinelli SE, Nicklas WJ. 1992. Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J Neurochem.* 58: 1905–1915.

36. Fiermonte, G., Palmieri, L., Todisco, S., Agrimi, G., Palmieri, F., Walker, J.E., 2002. Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 19289-19294.
37. Frieden C. 1959. Glutamic dehydrogenase II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. *J Biol Chem.* 234:815-820
38. Frieden C. 1962. The effect of pH and other variables on the Dissociation of beef liver glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 237:2396-2400.
39. Gilbert SL, Dobyns WB, Lahn BT. 2005. Genetic links between brain development and brain evolution. *Nat Rev Genet.* 6(7):581-90.
40. Gylfe E. 1976 Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat.* 13:20-4.
41. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. 2006. SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic beta-Cells. *Cell* 126:941-954.
42. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, et. al. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126(5):941-54.
43. Herrero-Yraola A, Bakhit SM, Franke P, Weise C, Schweiger M, Jorcke D, Ziegler M. 2001. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J.* 20:2404-12.
44. Ho TH., Savkur RS., Poulos MG et al. 2005. Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy, *Journal of Cell Science* 118 (13):2923-33.
45. Hofmann K & Stoffel W. 1993. TMbase- A database of membrane spanning proteins segments *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166.
46. Hogeboom GH, Schneider WC. 1953. Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem.* 204:233–238.
47. Huang CY, Frieden C. 1969. Rates of GDP-induced and GTP-induced depolymerization of glutamate dehydrogenase: A possible factor in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:338-344

48. Hudson, R.C., Daniel, R.M., 1993. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 767-792.
49. Hussain MM, Zannis V, Plaitakis A. 1989. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J Biol Chem* 264:20730-20735.
50. Iwasaki Y, Ikeda K, Kinoshita M. 1992. Plasma amino acid levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 107(2):219-22.
51. Jorcke, D., Ziegler, M., Herrero-Yraola, A., and Schweiger, M. (1998). Enzymic, cysteine-specific ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria. *Biochem. J.* 332: 189–193.
52. Julliard JH, Smith EL. 1979. Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. *J Biol Chem.* 254(9): 3427-38.
53. 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.* 85:1101–1109
54. Kawaguchi A, Bloch K. 1976. Inhibition of glutamate dehydrogenase and malate dehydrogenases by palmitoyl coenzyme A. *J Biol Chem.* 251(5):1406-12.
55. King, K., S. and Frieden, C. 1970. The purification and physical properties of glutamate dehydrogenase from rat liver. *J Biol Chem.* 245: 4391-6.
56. Knecht, E., Martinez-Ramon, A., Grisolia, S. 1986. Electron microscopic localization of glutamate dehydrogenase in rat liver mitochondria by an immunogold procedure and monoclonal and polyclonal antibodies. *J Histochem Cytochem.* 34: 913-22.
57. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
58. Lai JC, Liang BB, Zhai S, Jarvi EJ, Lu DR. 1994. Brain mitochondrial citrate synthase and glutamate dehydrogenase: differential inhibition by fatty acyl coenzyme A derivatives. *Metab Brain Dis.* 9(2):143-52
59. Lee EY, Huh JW, Yang SJ, Choi SY, Cho SW, Choi HJ. 2003. Histidine 454 plays an important role in polymerization of human glutamate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 540(1-3):163-6.

60. Lee EY, Yoon HY, Ahn JY, Choi SY, Cho SW. 2001. Identification of the GTP binding site of human glutamate dehydrogenase by cassette mutagenesis and photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 276: 47930-47936.
61. Lee W, Shin S, Cho SS, and Park J. 1999. Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *Journal of Cellular Biochemistry* 76:244–253.
62. Li C., Najafi H., Daikhin Y, Nissim I.B., Collins H.W., Yudkoff M., Matschinsky F.M., Stanley C.A. 2003. Regulation of leucine stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J. Biol. Chem.* 278: 2853–2858.
63. Lithgow, T. and Gratzer, S. 1997. A reply to Preiss et al. (Letter). *Trends in Biochemical Sciences* 22: 290.
64. Llopis J, McCaffery M, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. 1998 Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6803-6809
65. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
66. MacMullen C, Fang J, Hsu BY, Kelly A, de Lonlay-Debeney P, Saudubray JM, Ganguly A, Smith TJ, Stanley CA. 2001. The Hyperinsulinism / Hyper-ammonemia Contributing Investigators: Hyperinsulinism /hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory GTP binding domain of glutamate dehydrogenase. *J Clin Endo Metab.* 86:1782–1787.
67. Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W. J., Howe, J. R., Hughes, T. E. 1995. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14: 211–215.
68. 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.
69. 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.

70. McDaniel HG. 1995. Comparison of the primary structure of nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Arch Biochem Biophys.* 319(1): 316-21.
71. McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen H, Schousboe A. 2006. Energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry*. New York, Elsevier Academic Press, p 531-557
72. McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. 1996. Exogenous concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* 66: 386-393.
73. Miki Y, Tomohiko T, Ohura T: 2000. Novel missense mutations in the glutamate dehydrogenase gene in the congenital hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. *J Pediatr* 136:69–72.
74. Molinari F.; Raas-Rothschild A; Rio M; Fiermonte G; Encha-Razavi F; Palmieri L et al. 2005. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 334-339.
75. Moon K. and Smith EL. 1973. Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. 8. Peptides produced by specific chemical cleavages; the complete sequence of the protein *J. Biol. Chem.* 248 (9): 3082-3088.
76. Naito S, Ueda T. 1985. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem.* 44(1): 99-109
77. Nakatani Y, Schneider M, Banner C, Freese E. 1988. Complete nucleotide sequence of human glutamate dehydrogenase cDNA. *Nucleic Acids Res.* 16: 6237.
78. Nissim, I. 1999. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes *Am J Physiol.* 277: F493-7.
79. Ottman R, Risch N, Hauser AW, et al. (1995) Localization of gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genetics* 10(1):56-60.
80. Patel AJ, Hunt A, Gordon RD, Balazs R. 1982. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Brain Res.* 256: 3–11.
81. Perry TL, Krieger C, Hansen S, Eisen A. 1990. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 28(1):12-7.
82. Peterson P, Smith TJ. 1999. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure* 7: 769-782.

83. Plaitakis A, Berl S, Yahr MD., 1982. Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216: 193-196.
84. Plaitakis A, Caroscio JT. 1987. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 22:575-579
85. Plaitakis A, Constantakakis E, Smith J. 1988. The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 24(3):446-9
86. Plaitakis A, Constantakakis. 1993. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull.* 30(3-4):381-6.
87. Plaitakis A, Metaxari M, 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.
88. Plaitakis A, Nicklas WJ and Desnick RJ. 1980. Glutamate dehydrogenase deficiency in three patients with spinocerebellar degeneration. *Ann Neurol* 7:297-303.
89. Plaitakis A, Smith J, Mandeli J, Yahr MD. 1988. Pilot trial of branched-chain aminoacids in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1:1015-1018.
90. Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. 2003. Study of structure–function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme, *Neurochem. Int.* 43: 401– 410.
91. Plaitakis A, Zaganas I. 2001. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J. Neurosci. Res.* 66: 899-908.
92. Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. 1984. Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann Neurol.* 15: 144-53.
93. Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish P, Tsakopoulos M. 2000. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* 20: 1809-1821.
94. PredictProtein: B Rost, G Yachdav and J Liu. 2004. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue):W321-W326.
95. Preiss T, Hall AG, Lightowlers RN. 1993. Identification of bovine glutamate dehydrogenase as an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 268: 24523–24526.

96. Preiss T, Sang AE, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Lightowlers R. N. 1995. The mRNA-binding protein COLBP is glutamate dehydrogenase. *FEBS Letters* 367: 291-296.
97. Rajas F, Rousset B. 1993. A membrane-bound form of glutamate dehydrogenase possesses an ATP-dependent high-affinity microtubule-binding activity. *Biochem J.* 295: 447-55.
98. Rajas F, Gire V, Rousset B. 1996. Involvement of a membrane-bound form of glutamate dehydrogenase in the association of lysosomes to microtubules. *J Biol Chem.* 271: 29882–29890.
99. Roessel P, Brand AH. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat. Cell. Biol.* 4 (2002) E15–20.
100. Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. 1994. Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience.* 62, 1133-46.
101. Rothe F, Wolf G, Schunzel G. 1990. Immunohistochemical demonstration of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 39: 419–429.
102. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 326:1464-1468.
103. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 28:18–25.
104. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 38:73–84.
105. Rottenberg H, Lee CP. 1975. Energy dependent hydrogen ion accumulation in submitochondrial particles. *Biochemistry* 14: 2675-2680.
106. Salganicoff F, De Robertis E. 1965. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and  $\alpha$ -aminobutyric acid cycles in rat brain. *J Neurochem.* 12: 287–309.
107. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
108. Schmidt E. and Schmidt FW. 1963. Distribution pattern of several enzymes in human liver and its variations during cell damage. III. On the methodology of enzyme

determination in human organ extracts and serum. *Enzymol Biol Clin (Basel)* 35: 73-9.

109. Schmidt TR, Goodman M and Grossman LI. 1999. Molecular evolution of the COX7A gene family in primates. *Mol. Biol. Evol.* 16: 619–626.

110. Schoolwerth A, Lanoue K, Hoover W. 1984. Effect of pH on glutamate efflux from rat kidney mitochondria. *Am. J. Physiol.* 246: F266-F271.

111. Schousboe A, Svenneby G, Hertz L. 1977. Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J. Neurochem.* 29: 999-1005.

112. Sener A, Malaisse WJ. 1980. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288: 187-9.

113. Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. 1981. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:5460-4.

114. Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. 1997. Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J Neurochem.* 68:1804-1811.

115. Shashidharan P, Michaelides TM, Robakis NK, Kretsovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. 1994. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem.* 269:16971-16976.

116. Shen J. 2005. In vivo carbon-13 magnetization transfer effect. Detection of aspartate aminotransferase reaction. *Magn Reson Med* 54:1321-1326.

117. Shoemaker, M. & Haley, B. (1996) Identification of the Adenine binding domain peptides of the ADP binding site of glutamate dehydrogenase. *Bioconjugate Chem.* 32: 1883-1890.

118. Shoemaker M. & Haley BE. 1993. Identification of a guanine binding domain peptide of the GTP binding site of glutamate dehydrogenase: isolation with metal-chelate affinity chromatography. *Biochemistry* 32: 1883-1890.

119. Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. 1975. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer, P.D. (Ed) *The Enzymes*. Vol 11, Academic Press, New York, pp. 293-367.



120. Smith EL. 1979. The evolution of glutamate dehydrogenases and a hypothesis for the insertion or deletion of multiple residues in the interior of polypeptide chains. *Proc Am Phil Soc* 123:73-84.
121. Smith T, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley C. 2002. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J. Mol. Biol.* 318: 765-777.
122. Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. 2001. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J Mol Biol.* 307:707-720.
123. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 21: 56-63.
124. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. (1993). Metabolism of [U<sup>13</sup>C]-glutamate in astrocytes studied by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy: Incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic cycle. *J. Neurochem.* 61: 1179-1182.
125. Stanley CA, Fang J, Kutyna K, Hsu BY, Ming JE, Glaser B, Poncz M. 2000. Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: predominance of mutations in exons 11 and 12 of the glutamate dehydrogenase gene. *Diabetes* 49: 667-673.
126. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, 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.
127. Tanizawa Y, Nakai K, Sasaki T, Anno T, Ohta Y, Inoue H, Matsuo K, Koga M, Furukawa S, Oka Y. 2002. Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: identification and characterization of a *GLUD1* gene mutation and insulin secretion studies with MIN6 cells overexpressing the mutant glutamate dehydrogenase. *Diabetes* 51(3):712-7.
128. Tavare JM, Fletcher LM, Welsh GI. 2001. Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *J Endocrinol.* 170: 297-306.
129. Testa D, Caraceni T, Fetoni V. 1989. Branched-chain amino acids in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 236:445-447.

130. Tsai GC, Stauch-Slusher B, Sim L, Hedreen JC, Rothstein JD, Kuncel R, Coyle JT 1991. Reductions in acidic amino acids and N-acetylaspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis CNS. *Brain Res.* 556(1):151-6.
131. Tzimagiorgis G; Adamson MC, Kozak CA, Moschonas NK. 1991. Chromosomal mapping of glutamate dehydrogenase gene sequences to mouse chromosomes 7 and 14. *Genomics* 10: 83-88.
132. Veuthey AL, Tsacopoulos M, Millan de Ruiz L, Perrottet P. 1994. Cellular and subcellular localization of hexokinase, glutamate dehydrogenase, and alanine aminotransferase in the honeybee drone retina. *J Neurochem.* 62: 1939-46.
133. Wan M, Francke U. 1998. Evaluation of two X chromosomal candidate genes for Rett syndrome: glutamate dehydrogenase-2 (GLUD2) and Rab GDP-dissociation inhibitor (GDI1). *Am. J. Med. Genet.* 78: 169-172, 1998.
134. Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369:400–403.
135. Waniewski R, Martin D. 1986. Exogenous glutamate is metabolised to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 47: 304-313.
136. Werner, P., Pitt, D. and. Raine, C. 2001. Multiple Sclerosis: Altered Glutamate Homeostasis in Lesions Correlates with Oligodendrocyte and Axonal Damage. *Ann Neurol.* 50, 169–180.
137. Westergaard N, Drejer J, Schousboe A, Sonnewald U. 1996. Evaluation of the importance of transamination versus deamination in astrocytic metabolism of [U-13C] glutamate. *Glia* 17: 160-168.
138. Wilkinson GM. 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem J* 80:324-332.
139. Wu W, Goodman M, Lomax MI, Grossman LI. 1997. Molecular evolution of cytochrome c oxidase subunit IV: evidence for positive selection in simian primates. *J. Mol. Evol.* 44: 477–491.
140. Yang SJ, Cho EH, Choi MM, Lee HJ, Huh JW, Choi SY, Cho SW. 2005 Critical role of the cysteine 323 residue in the catalytic activity of human glutamate dehydrogenase isozymes. *Mol Cells.* 19(1):97-103.
141. Yang SJ, Huh JW, Hong HN, Kim TU, Cho SW. 2004 Important role of Ser443 in different thermal stability of human glutamate dehydrogenase isozymes. *FEBS Lett.* 562: 9-64.

142. Yoon HY, Cho EH, Kwon HY, Choi SY, Cho SW. 2002. Importance of glutamate 279 for the coenzyme binding of human glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 277:41448-41454.
143. Yoon HY, Lee EY, Cho SW. 2002b. Cassette mutagenesis and photoaffinity labeling of adenine binding domain of ADP regulatory site within human glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* 41: 6817-6823.
144. Yorifuji T, Muroi J, Uematsu A, Hiramatsu H, Momoe T: 1999. Hyperinsulinism- hyperammonemia syndrome caused by mutant glutamate dehydrogenase accompanied by novel enzyme kinetics. *Hum Genet* 104:476–479.
145. Yudkoff M., Nissim I., Nelson D., Lin Z.P. and Erecinska M. 1991. Glutamate dehydrogenase reaction as a source of glutamic acid in synaptosomes. *J. Neurochem.* 57, 153-160.
146. Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. 2001. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 66: 909-13.
147. Zaganas I, 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 behavior of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 277: 26422-26428.
148. Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M, Plaitakis A. 2002. Substitution of Ser for Arg443 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: 46552-46558.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Km για υποστρώματα από διάφορους ιστούς θηλαστικών (από Ζαγανάς διδακτορική διατριβή 2005, ελαφρώς τροποποιημένο)

		Γλουταμικό (mM)	α-Κετο γλουταρικό (mM)	NADP (H) (μM)	NAD (H) (μM)	NH <sub>3</sub> (mM)	ADP (mM)	Βιβλιογραφική αναφορά
Ανασυνδυσασμένη hGDH2 (crude)		10.8	1.2	85.0	-	-	1	Shashidharan 1994
		-	1.83	-	-	-	0.5	
		2.43	-	-	-	-	0.1	Plaitakis, 2000
Ανασυνδυσασμένη hGDH1 (crude)		-	1.62	-	-	-	0.5	
		7.64	-	-	-	-	0.1	
Ανθρώπινος Εγκέφαλος	Διαλυτή GDH	11.8	1.16	46.5	-	-	1	Shashidharan 1994
	Σωματιδιακή GDH	9.6	1.27	81.0	-	-	1	
		17.7	1.3	51.2	77.8	-	1	Hussain 1989
Εγκέφαλος αρουραίου	Σωματιδιακή	3.7	1.7	154.7	99.1	18.2	1	Colon, 1986
		3.6	1.4	108.1	79.7	18.3	1	Colon, 1986
	Διαλυτή	2.5	0.2	27	29	10		Chee, 1979
Ήπαρ αρουραίου		0.6	0.18	20	30	20		Chee 1979
Ήπαρ αγελάδος		1.8	0.7	25	24	3.2		Hudson και MacDaniel, 1993
		pH: 6.0	10.5	0.031	-	2	164	
	22.7		0.94	-	36	8.2	0.18 ή 0.7	Bailey 1982
	pH: 8.0	2.6	0.336	-	19.5	13.6	0	
		4.9	0.94	-	36	8.2	0.18 ή 0.7	
Εγκέφαλος αγελάδας	GDH I	NADP(H)	8.33	1.33	100	-	15.38	Cho, 1995
		NAD(H)	5.56	3.61	-	120	18.19	
	GDH II	NADP(H)	3.42	2.22	130	-	20.01	
		NAD(H)	3.13	1.21	-	70	23.82	
Ήπαρ αρουραίου	GDH από RER	5.9* 23.8**	-	0.443	0.924	-	1	Lee, 1999
	GDH από mitochondria	4.6* 20.7**	-	0.637	0.364	-	1	

§ αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού

\* με συνένζυμο NAD<sup>+</sup>

\*\* με συνένζυμο NADP<sup>+</sup>

**Πίνακας 2: Ειδική Δραστικότητα και  $V_{max}$  της GDH από διάφορους ιστούς θηλαστικών (αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης) (από Ζαγανάς διδακτορική διατριβή 2005, ελαφρώς τροποποιημένο)**

	Ειδική Δραστικότητα			ADP (mM)	Βιβλιογραφική αναφορά
	( $\mu$ moles οξειδούμενου NADH/mg πρωτεΐνης/min)	(nmoles οξειδούμενου NADH/mg πρωτεΐνης/min)	(nmoles οξειδούμενου NADPH/mg πρωτεΐνης/min)		
Ανθρώπινη παρεγκεφαλίδα	160	-	-	1	Hussain, 1989
Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη <i>GLUD1</i> GDH (E. Coli)		115	-	0	Cho, 2001
Εγκέφαλος Ολική GDH	-	0.041	0.027	0	Chee, 1979
Αρουραίου Σωματιδιακή GDH	168	-	-	1	Colon, 1986
Ήπαρ αρουραίου	-	42	30	0	Chee, 1979
Εγκέφαλος GDH I	167	202	-	1	Cho, 1995
αγελάδας GDH II	104	124	-	1	

**Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή κυριότερων μελετών μεταλλαξιογένεσης της ανασυνδρασμένης σε *E. Coli* *GLUD1* προερχόμενης GDH (ελήφθη από Ζαγανάς διδακτορική διατριβή 2005, ελαφρώς τροποποιημένο).**

	<b>Lys 130</b>	<b>Tyr 187</b>	<b>Tyr 266</b>	<b>Glu 279</b>	<b>Lys 450</b>	<b>His 454</b>	<b>Ser 448</b>	<b>Arg 463</b>
<b>Πηγή</b>	Cho, 2001	Yoon, 2002α	Lee, 2001	Yoon, 2002β	Lee, 2001	Fang, 2003	Fang, 2003	Fang, 2003
<b>Αμινοξύ Αντικατάστασης</b>	G,S,E ,M,Y	G,S,E, M,R	G,S,E, M,R	G,L,M ,R,Y	G,S,E, M,Y	Y	P	A
<b>BΔ</b>	-	↔	-	-	-	↔	↓	↔
<b>Vmax</b>	↓ 400X	↓(4X)	↓(4X)	[↔]	↔	-	-	-
<b>S.A. (με ADP)</b>	-	↓(3X)	↓(4X)	-	↔	↔	↓	↓↓↓
<b>GTP IC<sub>50</sub></b>	-	[↑]	↔	↔	↑↑	↑↑	↑↑	↔
<b>ADP SC<sub>50</sub></b>	-	↑↑↑	↔	↔	↔	↔	↔	↑↑↑
<b>ATP IC<sub>50</sub></b>	-	-	↔	-	↑↑	-	-	-
<b>Km NAD<sup>+</sup></b>	-	-	-	↑	-	-	-	-
<b>Km Γλουταμικό</b>	-	-	-	↔	-	-	-	-
<b>Km NADH</b>	↔	↔	↑(4X)	-	↔	-	-	-
<b>Km α- κετογλουταρικό</b>	↔	↔	↔	-	↔	-	-	-

Επεξηγήσεις; SA= Ειδική δραστηριότητα, BΔ= Βασική Δραστηριότητα, [↑]=μικρή αύξηση  
Για λόγους ευκρίνειας του πίνακα παραλείφθηκε η μελέτη των Yoon και συν., 2004 με τα αποτελέσματα μεταλλαξιογένεσης σε επτά αμινοξέα (Lys 94, Gly 96, Lys 118, Lys 130, Asp 172), τα οποία αναλύονται στο κείμενο.

**Πίνακας 4: Συγκέντρωση στον ανθρώπινο εγκέφαλο**

<b>Συγκέντρωση στον εγκέφαλο</b>			
	<b>Εξοκυττάρια</b>	<b>Ενδοκυττάρια</b>	<b>REFERENCES</b>
<b>Γλουταμικό</b>	1-10 $\mu$ M 1-3 $\mu$ M -2 mM synaptic cleft	1-10 mM * 6-12 mM 2-3 mM (mito)	Erecinska, 1990 Shashidharan, 2000 Bailey, 1982 Clements, 1996
<b>Γλουταμίνη</b>	0.7 mM		Newsholme, 2000
<b>GABA</b>	0.1-1mM synaptic cleft		Clements, 1996
<b>Γαλακτικό</b>		~1.0 mmol/ g wet weigh (rest) ~2.0 mmol/ g wet weigh (act)	Dienel&Hertz, 2001
<b>Πυροσταφυλικό</b>		0.05– 0.1 mM	Dienel&Hertz, 2001
<b>L-λευκίνη</b>		0.1-0.2 mM	Block and Harper, 1991
<b><math>\alpha</math>-κετογλουταρικό</b>		0.1 mM 0.2 mM (mito)	Hindfelt and Siesjb,1971 Bailey, 1982
<b>NAD</b>		20-30 $\mu$ M (mito)	Bailey, 1982
<b>NADH</b>		100-150 $\mu$ M (mito)	Bailey, 1982
<b>ADP</b>		0.05->1 mM	Gabriel, 1986
<b>GTP</b>		50-150 $\mu$ M (free)§ >200 $\mu$ M (total)	Hatakeyama, 1982 var
<b>NH<sub>3</sub></b>		0.2-0.3 mM	Waniewski, 1992
<b>Mg<sup>++</sup></b>		1 mM	Taylor, 1991

\* 2-20 mM σε όλους του ιστούς

§ rat retina : 6.8 nmol/mg of protein (Schaeffer, 1984)

endothelial cells: 1.9 nmol/10<sup>6</sup> cells



**Πίνακας 5. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, R443S hGDH1, G456A hGDH1, S409R hGDH1, S409D hGDH1 και R443S/G456A hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα απουσία, παρουσία 0.1 και 1mM ADP (σε παρένθεση ο αριθμός των πειραματικών προσδιορισμών).**

	<b>IC<sub>50</sub> (± SEM) σε μM GTP</b>		
	<i>No ADP</i>	<i>0.1mM ADP</i>	<i>1mM ADP</i>
<b>hGDH1 crude</b> (2005-6)	0.23±0.03(2) 0.25±0.02(2)	1.73±0.09 (2)	16.5±0.64 (2)
<b>hGDH2 crude</b> (2005-6)	-	51.4±6.8 (2)*	154.8±18.9(2) 394.25±32.1(1)*
<b>R443S/G456A hGDH1 crude</b>	11,61±1.13(2)	4.13±0.7(5)	116,21±21.01(4)
<b>hGDH1 crude</b> (JN 2000)	0.2	0.58	2.48
<b>hGDH1 crude</b> (JBC 2002)	0.19±0.01 (2)	1.02±0.03 (2)	12.23±0.54 (2)
<b>hGDH2 crude</b> (JN 2000)	>5,000	20	300
<b>hGDH2 crude</b> (JBC 2002)	ND	ND	203.87±16.2 (2)
<b>R443S hGDH1</b> (JBC 2002)	ND	ND	16.2±1.1 (2)
<b>G456A hGDH1</b> (JBC 2002)	2.8±0.15 (2)	8.98 ± 0.25 (2)	79.55±3.67 (2)
<b>S409R hGDH1</b>	ND	0.096±0.01 (2)	1.25±0.22 (2)
<b>S409D hGDH1</b>	ND	7.09 ±0.73 (2)	303.05 ±19.5 (2)

\*2002 data

**Πίνακας 6. Ενεργοποίηση από ADP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, R443S hGDH1, G456A hGDH1, S409R hGDH1, S409D hGDH1 και R443S/G456A hGDH1 σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα.(σε παρένθεση ο αριθμός των πειραματικών προσδιορισμών)**

	<b>SC<sub>50</sub>(± SEM) μM ADP</b>
<b>hGDH1 crude</b> (2005)	24.02 ± 5.12 (2)
<b>hGDH2 crude</b> (2005)	143.2 ± 7.7 (4)
<b>R443S/G456A hGDH1 crude</b> (2005)	182.9± 4.9 (7)
<b>hGDH1 crude</b> JBC 2002)	27.4±2.2 (6)
<b>hGDH2 crude</b> (ΓZ, ΔΔ)	85.1±7.9 (6)
<b>R443S hGDH1</b> (JBC 2002)	405.6±14.8 (6)
<b>G456A hGDH1</b> (JBC 2002)	25.42 ± 2.6 (6)
<b>S409R hGDH1</b>	209.4±11.7 (4)
<b>S409D hGDH1</b>	44.4±4.9 (4)

**Πίνακας 7. Αναστολή από GTP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, R443S hGDH1, G456A hGDH1, S409R hGDH1, S409D hGDH1 και R443S/G456A hGDH1 σε καθαρισμένες πρωτεΐνες απουσία, παρουσία 0.1 και 1mM ADP.(σε παρένθεση ο αριθμός των πειραματικών προσδιορισμών)**

	<b>IC<sub>50</sub> (± SEM) σε μM GTP</b>		
	<i>No ADP</i>	<i>0.1mM ADP</i>	<i>1mM ADP</i>
<b>hGDH1</b>	0.31±0.03 (3)	1.61±0.02 (3)	18.5±0.5 (3) 12.95±0.5 (3, ΓΖ, ΔΔ)
<b>hGDH2</b>	78.5±14.1 (3)	23.9±2.2 (3)	166.8±57.8 (3)
<b>R443S/G456A hGDH1</b>	622.4±19.5 (3)	25.75±6.6 (3)	139.35±20.98 (3)
<b>S409R hGDH1</b>	ND	0.11±0.01 (2)	1.55±0.1 (2)
<b>R443S hGDH1</b> (JBC 2002)	ND	ND	ND
<b>G456A hGDH1</b> (JBC 2002)	ND	ND	121.35±14.9 (2)

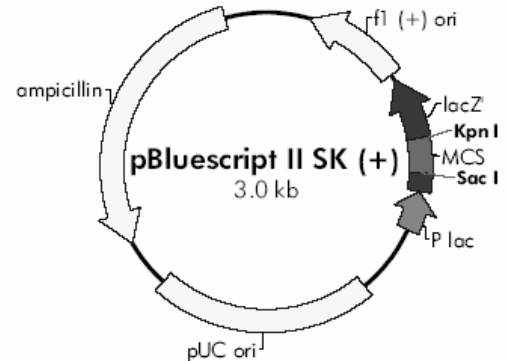
**Πίνακας 8. Ενεργοποίηση από ADP των wild-type hGDH1, wild-type hGDH2, R443S hGDH1, G456A hGDH1, S409R hGDH1, S409D hGDH1 και R443S/G456A hGDH1 σε καθαρισμένες πρωτεΐνες (σε παρένθεση ο αριθμός των πειραματικών προσδιορισμών).**

	<b>SC<sub>50</sub>(± SEM) μM ADP</b>
<b>hGDH1</b>	21.1±1.5 (3)
<b>hGDH2</b>	50.7± 5.3 (3)
<b>R443S/G456A hGDH1</b>	188.4 ±40.4 (3)
<b>S409R hGDH1</b>	127.5±4.1 (3)
<b>R443S hGDH1</b>	383.9±14.6 (6, JBC 2002) 474.3 ±17.7 (3, JNR 2007)
<b>G456A hGDH1 (JBC 2002)</b>	ND

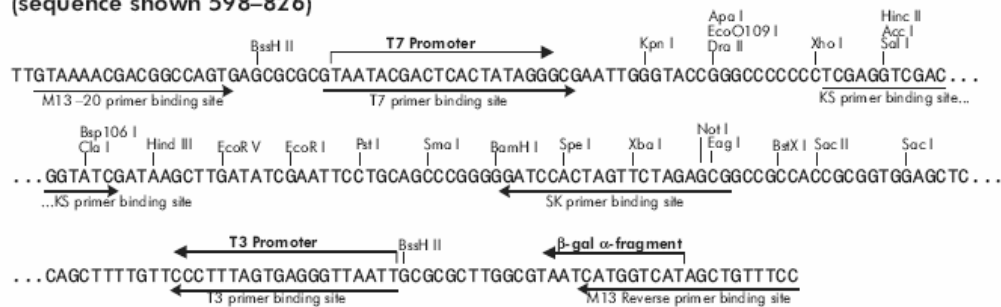
## Περιγραφή των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

### Δομή του φορέα υποκλωνοποίησης pBSKII+

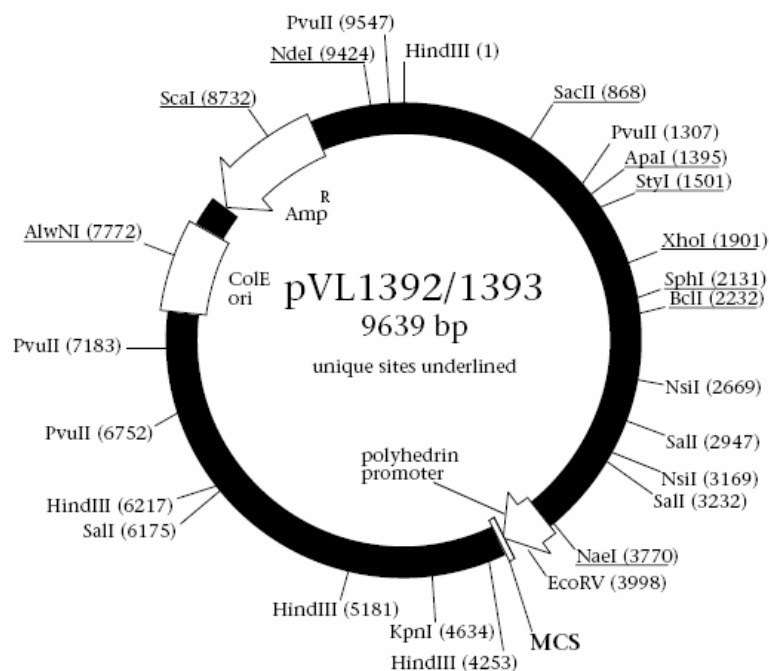
**f1 (+) origin** 135–441  
**β-galactosidase α-fragment** 460–816  
**multiple cloning site** 653–760  
**lac promoter** 817–938  
**pUC origin** 1158–1825  
**ampicillin resistance (bla) ORF** 1976–2833



### pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

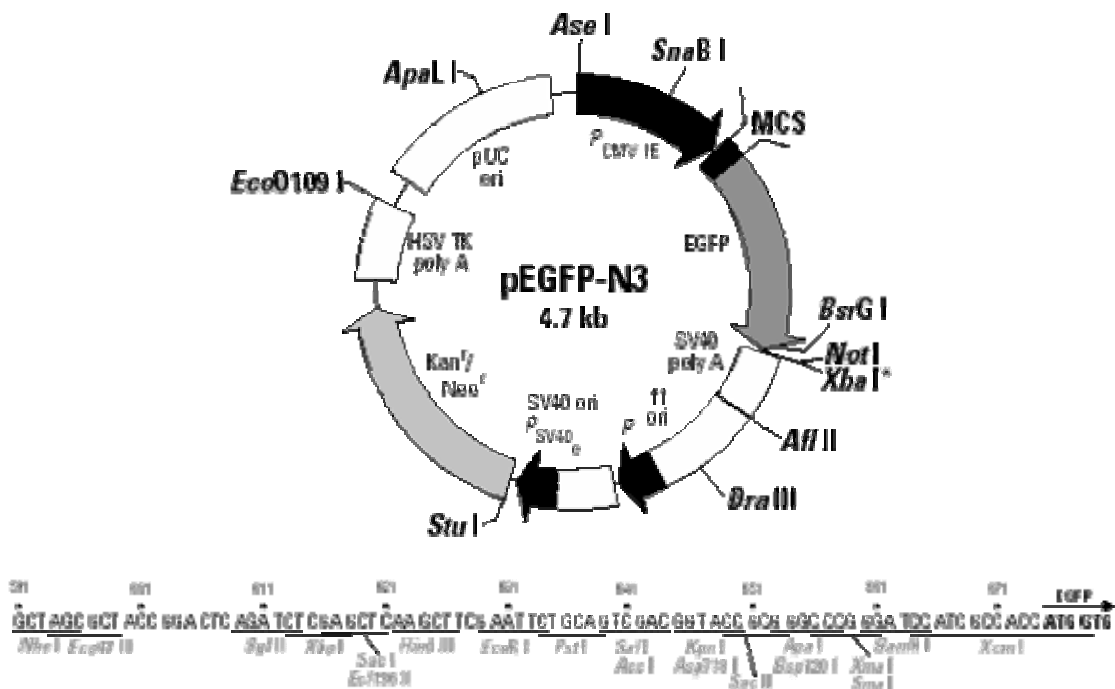


### Δομή των φορέων μεταφοράς γενετικού υλικού (transfer vector) του Baculovirus pVL1393 και pVL1392



### Δομή του πλασμιδιακού φορέα υποκλωνοποίησης pEGFP-N3

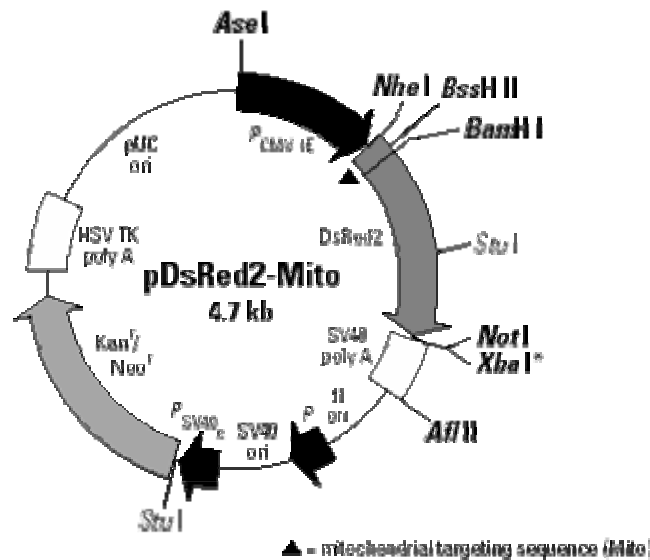
Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-N3 (CLONTECH) χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση τόσο των φυσιολογικών πλήρους μήκους *GLUD1* (ή *GLUD2*) cDNAs, όσο και των μεταλλαγμένων ως προς το οδηγό πεπτίδιο μορφών τους. Ο φορέας pEGFP-N3 κωδικοποιεί μια μορφή της GFP (enhanced green fluorescent protein), η οποία έχει τροποποιηθεί για λαμπερότερο φθορισμό και μεγαλύτερη έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στο αμινοτελικό άκρο του EGFP γονιδίου υπάρχει μία περιοχή 80bp (multiple cloning site) που περιέχει ένα μεγάλο αριθμό θέσεων περιορισμού, εντός της οποίας μπορεί με τη δράση των κατάλληλων ενζύμων να εισαχθεί η κωδικοποιός αλληλουχία μίας οποιασδήποτε πρωτεΐνης. Έτσι, με την προϋπόθεση ότι διατηρείται το πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης EGFP και δεν παρεμβάλλονται κωδικόνια τερματισμού, ο φορέας οδηγεί στην έκφραση μιας χημικτικής πρωτεΐνης, με την εισαγόμενη πρωτεΐνη να βρίσκεται αμινοτελικώς της EGFP. Στην παρούσα μελέτη οι μεταλλάξεις των *GLUD1* και *GLUD2* εισήχθησαν μεταξύ των θέσεων EcoRI και BamHI στην περιοχή MCS. Παρακάτω φαίνεται ο χάρτης του φορέα pEGFP-N3, καθώς και η αλληλουχία της περιοχής MCS.



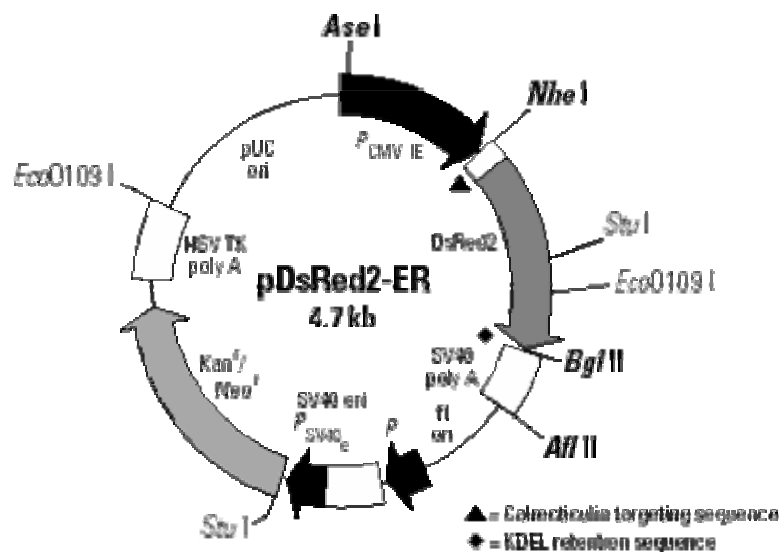
### Δομή των πλασμιδιακών φορέων- δεικτών υποκυτταρικής εντόπισης pDsRed2-Mito, pDsRed2-ER και pDsRed2-Nuc.

Ο pDsRed2-Mito (CLONTECH) είναι ένας φορέας έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χημικτική πρωτεΐνη, η οποία έχει

προέλθει από τη συγχώνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp.* Red fluorescent protein (DsRed2) και της μιτοχondριακής οδηγού αλληλουχίας της υπομονάδας VIII της ανθρώπινης μιτοχondριακής πρωτεΐνης cytochrome c oxidase. Η αλληλουχία αυτή είναι συγχωνευμένη στο 5' άκρο της πρωτεΐνης DsRed2 και καθοδηγεί τη χημική πρωτεΐνη Mito-DsRed2 μέσα στα μιτοχόνδρια του ξενιστή.



Ο **pDsRed2-ER** (CLONTECH) είναι ένας φορέας έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χημική πρωτεΐνη, η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση α) της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp.* Red fluorescent protein (DsRed2) β) της καθοδηγητικής προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) αλληλουχίας της πρωτεΐνης calreticulin (στο 5' άκρο της DsRed2), και γ) του σήματος συγκράτησης στο ER (ER retention signal) KDEL.



**Ο pDsRed2-Nuc** (CLONTECH) είναι ένας φορέας έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp.* Red fluorescent protein (DsRed2) και του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal) του simian virus 40 large T-antigen. Το σήμα αυτό καθοδηγεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη Mito-DsRed2 μέσα στον πυρήνα του ξενιστή.



## Νευρολογικές παθήσεις και GDH

### Ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία/ατροφία πολλαπλών συστημάτων και GDH

Στην αναζήτηση πειραματικού μοντέλου για την παρεγκεφαλιδική αταξία βρέθηκε πως η χορήγηση 3-ακετυλοπυριδίνης (3AP), ενός ανταγωνιστή του νικοτιναμιδίου προκαλεί αταξία βάδισης σε αρουραίους. Παθολογοανατομικά παρατηρείται εκλεκτική βλάβη των κάτω ελαίων, ελαιοπαρεγκεφαλιδικών ινών, πυρήνων εγκεφαλικών νεύρων και περιοχών της γέφυρας και της μέλαινας ουσίας (Desclin και Escubi, 1974), οι περιοχές δηλαδή που εκφυλίζονται στην ανθρώπινη ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία (olivopontocerebellar atrophy, OPCA). Πιθανολογήθηκε πως το 3AP δρα νευροτοξικά μέσω αναστολής των εξαρτώμενων από NADP(H) οξειδοαναγωγασών, γεγονός που μπορεί να αποτελεί και την αιτιοπαθογενετική βάση της OPCA. Για να διερευνηθούν αυτήν την υπόθεση, οι Plaitakis και συν. (1980) μέτρησαν την δραστηριότητα τεσσάρων ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NADP(H), και πιο συγκεκριμένα της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PDH), της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH), της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GSSGRD) και της GDH, σε ινοβλάστες ενός 19χρονου ασθενούς με πρώιμης έναρξης (juvenile onset) ελαιο-γεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία. Η δραστηριότητα της GDH ήταν σημαντικά ελαττωμένη (22 % του φυσιολογικού) στους ινοβλάστες του ασθενούς. Γι' αυτό το λόγο μέτρησαν την δραστηριότητα της GDH στα λευκοκύτταρα του ασθενούς, σε 2 αδέρφια με όψιμης έναρξης (adult onset) OPCA όπως και σε έναν υγιή αδελφό τους. Παρομοίως η δραστηριότητα της GDH στα λευκοκύτταρα των τριών ασθενών με OPCA ήταν εκλεκτικά μειωμένη (στο 1/3 του φυσιολογικού). Πιο αναλυτικά, η GDH δραστηριότητα σε ολικό ομογενοποίημα από καλλιεργημένους δερματικούς ινοβλάστες από τον πρώτο ασθενή ήταν σημαντικά μειωμένη και αποτελούσε το 22% της μέσης GDH δραστηριότητας σε ινοβλάστες από 10 φυσιολογικούς μάρτυρες. Η μειωμένη ινοβλαστική GDH δραστηριότητα στον ασθενή παρέμενε και με επανειλημμένες υποκαλλιέργειες των κυττάρων και με διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων (NADPH ή NADH, α-κετογλουταρικό και αμμωνία). Πειράματα ανάμειξης απέκλεισαν την ύπαρξη αναστολέα της GDH στους ινοβλάστες του ασθενούς. Η αλλοστερική ρύθμιση της GDH (ενεργοποίηση από ADP, αναστολή από GTP και διαιθυλοστιλβεστρόλη) από τα λευκοκύτταρα ή τους ινοβλάστες δεν διέφερε τόσο στους ασθενείς όσο και στους φυσιολογικούς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα

συνηγορούσαν υπέρ της ύπαρξης μίας μορφής OPCA με μερική έλλειψη GDH και πιθανή γενετική βάση. Επιπλέον έδωσαν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του μεταβολισμού του γλουταμικού σε 7 ασθενείς με OPCA με μερική έλλειψη GDH σε σύγκριση με 36 φυσιολογικούς μάρτυρες και 20 ασθενείς με νωτιοπαρεγκεφαλιδική εκφύλιση και φυσιολογική δραστηριότητα GDH (Plaitakis και συν., 1982). Τα επίπεδα του γλουταμικού στο πλάσμα ήταν σημαντικά αυξημένα ενώ του ακετογλουταρικού ήταν ελαττωμένα κατά ~25 %. Η φόρτιση με monosodium glutamate οδήγησε σε υπερσυσσώρευση του γλουταμικού στο πλάσμα, χωρίς όμως να διαταραχθεί ο λόγος γαλακτικού/πυροσταφυλικού. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν πως η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού (ενδογενούς και εξωγενούς) ήταν σαφώς επηρεασμένη με αποτέλεσμα η αύξηση των συγκεντρώσεών του στο αίμα να θέτει υπόνοιες για ανάλογη αύξηση στο ΚΝΣ εξωκυτταρίως και πιθανή υπερδιέγερση και εκφύλιση των μετασυναπτικών νευρώνων (νευροδιεγερτικοτοξική δράση, Onley, και συν., 1972). Οι ίδιοι ερευνητές μέτρησαν τη δραστηριότητα της GDH σε λευκοκύτταρα 88 ασθενών με εκφυλιστικές παθήσεις του ΚΝΣ (ιδιαίτερος με προσβολή των βασικών γαγγλίων και της παρεγκεφαλίδος). 12 από αυτούς εμφάνισαν μερική ανεπάρκεια της GDH (ελάττωση κατά 52 % έναντι των υγιών μαρτύρων). Οι ασθενείς αυτοί παρουσίαζαν ατροφία πολλαπλών συστημάτων, κυρίως συνδυασμό εξωπυραμιδικής συνδρομής άτυπης για νόσο Parkinson, παρεγκεφαλιδικής δυσλειτουργίας με πολυνευροπάθεια (άτυπη OPCA) και προσβολή της πυραμιδικής οδού. Από τα λευκοκύτταρα των ασθενών απομόνωσαν 2 μορφές GDH μια σωματιδιακή (particulate) συνδεδεμένη με μεμβράνες, η οποία ήταν θερμοευαίσθητη και μία διαλυτή (soluble), η οποία ήταν θερμοσταθερή. Η ανεπάρκεια αφορούσε μόνο στην σωματιδιακή (< 30 % των μαρτύρων). Επιπλέον η ανεύρεση 7 ασθενών με οικογενή μορφή (αδέλφια) έθεσε την υπόνοια για γενετική βάση της ασθένειας (Plaitakis και συν., 1984).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από άλλες μελέτες (Konagaya και συν., 1986, Kajiyama και συν., 1988, Iwattsuji και συν., 1989, Abe και συν., 1992), αν και υπήρξαν και κάποιες μελέτες που δεν κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα (Dunvoisin και συν., 1988, Aubby και συν., 1988).

#### Πλαγία μυατροφική σκλήρυνση και GDH

Στα πλαίσια της διερεύνησης της αιτιοπαθογένειας της πολύ δραματικής για πάσχοντες και οικείους ασθένειας, από τις αρχές της δεκαετίας του '80, διατυπώθηκε η υπόθεση πως η νευροεκφύλιση μπορεί να σχετίζεται με διαταρχή του μεταβολισμού



του γλουταμικού. Οι Plaitakis και Caroscio (1988) ανέφεραν πως εντόπισαν αυξημένα επίπεδα γλουταμικού σε 22 ασθενείς με πλαγία μυατροφική σκλήρυνση (ALS) εν σχέσει με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ περαιτέρω η φόρτιση με monosodium glutamate συνοδεύτηκε από ανεπαρκή απομάκρυνση του τελευταίου. Τα αποτελέσματα αυτά αναπαρήχθησαν και από άλλους ερευνητές (Perry και συν., 1990, Iwasaki και συν., 1992, Bastone και συν., 1995). Σε αντίθεση όμως με τα επίπεδα στο αίμα η συγκέντρωση γλουταμικού σε νευρικό ιστό ασθενών με ALS που απεβίωσαν (υλικό νεκροψίας) ήταν ελαττωμένη (~2μm/g wet tissue). Η ελάττωση ήταν γενικευμένη και αφορούσε τόσο περιοχές που προσβάλλονται από τη νόσο (νωτιαίος μυελός, στέλεχος, κινητικός φλοιός) όσο και περιοχές που δεν τις επηρέαζε (βασικά γάγγλια, ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα). Στο νωτιαίο μυελό η ελάττωση αφορούσε όχι μόνο τα πρόσθια αλλά και τα οπίσθια κέρατα ή τη λευκή ουσία (Plaitakis και συν., 1988). Ελαττωμένα βρέθηκαν επιπλέον τα επίπεδα του N-ακέτυλο-ασπαρτικού στο νωτιαίο μυελό (Plaitakis & Constantakakis, 1993; Tsai και συν., 1991). Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν το ερέθισμα να διατυπωθεί μία γλουταματεργική θεωρία της πλαγίας μυατροφικής σκλήρυνσης (Plaitakis, 1990). Τούτο οδήγησε άλλους μελετητές να διερευνήσουν πιθανές διαταραχές μεταβολισμού και να βρουν αφενός ελαττωμένη πρόσληψη του γλουταμικού στις περιοχές που προσβάλλονται και αφετέρου ελάττωση του μεταφορέα του γλουταμικού (GLT1=EAAT II) (Rothstein και συν., 1992, 1995). Επιπλέον συνέτεινε στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εφαρμογών, λόγω χάρη χορήγησης μίγματος αλειφατικών αμινοξέων (branched chain amino acids, BCAA, Leu, Ile, Val) ώστε να ενισχυθεί η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού μέσω της GDH (Plaitakis και συν., 1988, Testa και συν., 1989). Στη γλουταματεργική θεωρία τέλος οφείλεται η χρήση της ριλουζόλης (δρα πιθανόν μέσω αναστολής απελευθέρωσης γλουταμικού και ανταγωνισμού τόσο των τασεοευαίσθητων διαύλων  $\text{Na}^+$  όσο και των NMDA υποδοχέων), του μόνου φαρμάκου με μικρή θεραπευτική ισχύ στην ALS.

### Επιληψία και GDH

Από επιληψία υποφέρουν 1-2% του γενικού πληθυσμού. Οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούνται από ανισορροπία διεγερτικών και ανασταλτικών μηχανισμών. Συνεπώς ο ρόλος και η αλληλεπίδραση των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών (γλουταμικό) με τους ανασταλτικούς (GABA) θεωρείται σημαντικός στην διαδικασία της επιληπτογένεσης. Οι γλουταμινεργικοί μηχανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί για την επιληπτογένεση και ειδικότερα για την απώλεια νευρώνων, που παρατηρείται στον

ιπλόκαμπο σε ασθενείς με εστιακές επιληψίες κροταφικού λοβού (Bradford και συν., 1995). Το 1995 έγινε εντοπισμός ενός γονιδίου υπεύθυνου για μία μορφή εστιακή επιληψίας του κροταφικού λοβού στην χρωμοσωμική θέση 10q23.3-24.1 (Ottman και συν., 1995).

Πρόσφατα μελετήθηκε η δραστηριότητα 4 ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και στην ανακύκλωση του γλουταμικού σε ιστό από τον προσθιοπλάγιο κροταφικό νεοφλοιό και τον ιπλόκαμπο ασθενών με φαρμακοανθεκτική επιληψία, οι οποίοι ήταν υποψήφιοι για χειρουργική θεραπεία της “Ε”. Συγκεκριμένα μετρήθηκε η δραστηριότητα της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού (aspartate aminotransferase, AAT), της συνθάσης του κιτρικού (citrate synthase, CS, την οποία χρησιμοποίησαν ως μάρτυρα για την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων) της GDH και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) σε ιστοτεμάχια (τα οποία ελέχθηκαν για απώλεια νευρώνων και έκφραση νευροπεπτιδίων) από ασθενείς με μεσοκροταφική επιληψία (MTLE), παράδοξη κροταφική επιληψία (PTLE) και με χωροκατακτητική διεργασία σχετιζόμενη επιληψία του κροταφικού λοβού (mass lesion-associated temporal lobe epilepsy, Ma-TLE). Η δραστηριότητα της GDH βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά ελαττωμένη στον κροταφικό φλοιό των ασθενών με MTLE (> 50 % σε σχέση με τα επίπεδα στις άλλες δύο ομάδες,  $p=0.001$ ). Παρόμοια τάση, αλλά χωρίς να αποκτά στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκε και στον ιπλόκαμπο των ασθενών με MTLE. Επίσης διαπιστώθηκε πως η δραστηριότητα της GDH ήταν ελαττωμένη ενώ των AAT και LDH σημαντικά αυξημένη στον κροταφικό φλοιό σε σύγκριση με τον ιπλόκαμπο των ασθενών με MTLE. Τέλος η δραστηριότητα της GDH στους ασθενείς με μεσοκροταφική επιληψία (MTLE) σχετιζόταν αρνητικά ( $r=-0.696$ ,  $p<0.01$ ) με τη διάρκεια της περιόδου μεταξύ της πρώτης μη φαρμακευτικά αντιμετωπίσιμης επιληπτικής κρίσης και της χειρουργικής επέμβασης (οπότε θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης). Τα αποτελέσματα αυτά εγείρουν σοβαρή υπόμνηση μεταβολικής διαταραχής που μπορεί να συμβάλλει στην συνέχιση της επιληπτογόνου δραστηριότητας (Malthankar-Phatak και συν., 2006). Ειδικώς εάν η ελάττωση της δραστηριότητας της GDH συνδυαστεί με ανάλογη ελάττωση της δραστηριότητας της GS (συνθέτασης της γλουταμίνης), όπως έχει βρεθεί σε πρόσφατη μελέτη (Eid και συν., Lancet 2004;363:28–37), αυτό σημαίνει πως το εξωκυττάριο γλουταμικό δεν μπορεί να μεταβολιστεί, γεγονός που μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο (νευροδιεγερτικοτοξικότητα).

*Νόσος του Parkinson και GDH.*

Οι Plaitakis και Shashidharan (2000) σε μελέτες *in situ* υβριδοποίησης βρήκαν ότι ο νευρωνικός μεταφορέας γλουταμικού (EAAT3) εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον ιππόκαμπο, στον πρωτοταγή αισθητικό φλοιό και στην συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (οι νευρώνες της οποίας εκφυλίζονται στην νόσο Parkinson). Επίσης σε πρωτοταγείς καλλιέργειες νευρώνων από τον κοιλιακό μεσεγκέφαλο αρουραίου τόσο με ενζυμικές όσο και με ανοσοιστοχημικές μεθόδους ανακάλυψαν υψηλή δραστηριότητα GDH (περίπου 4 μmoles/mg πρωτεΐνης/min). Όλοι οι νευρώνες που εκφράζανε ανοσοδραστικότητα για τη GDH ήταν ντοπαμινεργικοί (θετικοί για υδροξυλάση της τυροσίνης). Ωριμες μεσεγκεφαλικές νευρωνικές καλλιέργειες (12 ημερών) μπορούσαν να μεταβολίζουν γρήγορα υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμικού (1-1,2 mM, στα επίπεδα που ανευρίσκεται στην συναπτική σχισμή) και απελευθέρωναν μικρή ποσότητα ασπαρτικού και αλανίνης στο θρεπτικό υλικό. Ο μεταβολισμός του γλουταμικού συσχετιζόταν θετικά με την έκφραση της GDH ( $r = 0.991$ ;  $P = 0.001$ ). Αντίθετα, ανώριμες καλλιέργειες (4 ημερών) με χαμηλή δραστηριότητα GDH μεταβόλιζαν γλουταμικό σε βραδύτερους ρυθμούς ενώ απελευθέρωναν σημαντικά ποσά ασπαρτικού και αλανίνης στο θρεπτικό μέσο, υποδηλώνοντας πως η κύρια οδός απομάκρυνσης του γλουταμικού ήταν μέσω τρανσαμίνωσης (ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης). Επώαση με αντινοηματικά (antisense) ολιγονουκλεοτίδια έναντι της GDH για 6 ημέρες ώστε να ανασταλεί η έκφραση της GDH ήταν τοξική για τους μεσεγκεφαλικούς νευρώνες. Ιδιαίτερα οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες από τα πρώτα στάδια (3 ημέρες) αυτής της αναστολής φαίνονταν να προσβάλλονται. Τα αποτελέσματα αυτά αποκαλύπτουν το σημαντικό ρόλο της GDH στη λειτουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων καθώς δέχονται πυκνή γλουταματεργική φλοιϊκή νεύρωση.

Επίσης, πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας (Καναβούρας ΜΔΕ-ΜΠΝ (Master thesis), 2005) έχουν δείξει ότι η παρουσία της σημειακής αλλαγής Ala445Ser στο γονίδιο *GLUD2*, ενώ δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ασθενείς με νόσο Parkinson, σε άντρες (ημίζυγους για την αλλαγή) σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου. Συγκεκριμένα η ηλικία έναρξης των ανδρών ασθενών με τον πολυμορφισμό ήταν  $\sim 47 \pm 4$ , ενώ των ανδρών ασθενών χωρίς τον πολυμορφισμό  $64 \pm 10$  ( $P=0.003$ ) όσο και των γυναικών ασθενών με τον πολυμορφισμό ( $68 \pm 8$ ) ή χωρίς ( $65 \pm 10$ ). Έκφραση του mutant hGDH2A445S σε Sf21 κύτταρα με το σύστημα του Baculovirus έδειξε πως η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εμφάνιζε διπλάσια βασική δραστηριότητα σε σχέση με την wild-type hGDH2 (gain of function ?), ενώ ήταν πιο θερμοανθεκτική

(χρόνος ημίσειας ζωής = 60 minutes) από την wild-type hGDH2 (χρόνος ημίσειας ζωής = 38 minutes). Η αλλοστερική ρύθμιση από το ADP ή το GTP δε διέφερε σημαντικά, εμφάνιζε όμως σχετικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αναστολή από την οιστραδιόλη από την wild-type hGDH2 (Kanavouras και συν., αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

#### GDH και άλλες ασθένειες (Σχιζοφρένεια, νόσος Rett, άνοια)

Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν καταγραφεί σε ότι αφορά τη σχέση σχιζοφρένειας και GDH. Συγκεκριμένα οι Burbaeva και συν., (2003.) βρήκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα συνθάσης της γλουταμίνης (GS) και GDH στο κυτοδιάλυμα προμετωπιαίου φλοιού (PFC, Brodmann area 10) 9 σχιζοφρενών ασθενών σε σχέση με 9 υγείς μάρτυρες (νεκροτομικό υλικό) τόσο με ενζυμικές όσο και με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Δεν επιβεβαίωσαν τα ευρήματα αναφορικά με τη GDH σε μεταγενέστερη μελέτη με περισσότερους ασθενείς και μάρτυρες (22 και 22 αντίστοιχα) και βελτίωση της μεθόδου ομογενοποίησης του εγκεφάλου (Burbaeva και συν., 2007).

Γονιδιακή ανάλυση του *GLUD2* γονιδίου σε δείγματα DNA με αποτύπωση κατά Southern και απευθείας αλληλούχιση πολλαπλασιασμένων με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) τμημάτων απέτυχε να εντοπίσει μεταλλάξεις σε 22 ασθενείς με σύνδρομο Rett (μία επικρατητική φυλοσύνδετη νευροεκφυλιστική νόσο που προσβάλλει γυναίκες σε συχνότητα 1/10,000 to 1/15,000 και θεωρείται θανατηφόρος στους ημίζυγους άνδρες) (Wan & Francke, 1998).

Οι Cavallaro και συν., (1997) χρησιμοποίησαν αποτύπωμα RNA (RNA fingerprinting) για να αναγνωρίσουν υποψήφια σχετιζόμενα με τη μνήμη γονίδια (candidate memory-related genes, MRGs), τα οποία υπερεκφράζονται (up-regulated) στον ιππόκαμπο εκπαιδευμένων αρουραίων με τη δοκιμασία υδρικού λαβυρίνθου (water maze), με την οποία ελέγχεται η χωρική (spatial) μάθηση (υπεύθυνη περιοχή είναι ο ιππόκαμπος). Η GDH ήταν ένα από τα πιθανά γονίδια και περαιτέρω μελέτη με αποτύπωση Northern, ανάστροφη μεταγραφής-PCR, και *in situ* υβριδοποίηση το επιβεβαίωσαν. Τα επίπεδα GDH mRNA στον ιππόκαμπο (τομέας CA1) αλλά και σε άλλες περιοχές (έλικα προσαγωγίου, προσθιοπλάγιος-laterodorsal πυρήνας του θαλάμου) αυξήθηκαν 110% 6 ώρες μετά τη δοκιμασία υδρικού λαβυρίνθου και επέστρεψαν στα φυσιολογικά επίπεδα 12 ώρες μετά. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανολογούν εμπλοκή της GDH στη διαδικασία της μακρόχρονης μνήμης.

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:** ΜΑΣΤΟΡΟΔΗΜΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ  
**ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:** ΧΡΗΣΤΟΣ  
**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** 04/06/1969  
**ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** ΛΑΡΙΣΑ  
**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** ΕΓΓΑΜΟΣ  
**ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ:** ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** ΑΡΚΑΔΩΝ 56, ΤΚ 71305  
**ΤΗΛΕΦΩΝΟ:** 2810373343 /6944612460  
**E-mail:** [vasmast@yahoo.com](mailto:vasmast@yahoo.com)  
[mastorod@edu.med.uoc.gr](mailto:mastorod@edu.med.uoc.gr)

## ΣΠΟΥΔΕΣ

**1981-1987:** Φοίτηση στο Πειραματικό Σχολείο Παν/μίου Θεσσαλονίκης. Αποφοίτηση με βαθμό 19/10/11

**Σεπτέμβριος 1987:** Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Παν/μίου Θεσσαλονίκης (11<sup>ος</sup>)

**23/3/1994** Πτυχίο Ιατρικής «Λίαν Καλώς» (7,61)

**20/11/1995-19/5/1996:** Ειδικευόμενος Παθολογίας στο Νοσοκομείο Λοιμωδών Παθήσεων Θεσσαλονίκης (6 μήνες)

**22/7/1996-29/9/1996:** Ειδικευόμενος Ψυχιατρικής στη Β' Πανεπιστημιακή Κλινική του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης (2 μήνες)

**14/7/1998-15/11/1998:** Ειδικευόμενος Ψυχιατρικής στο Α' Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης (4 μήνες)

- 6/4/1999- 11/4/2002:** Ειδικευόμενος Νευρολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η) (3 έτη).
- 9/8/2002:** Χορήγηση άδειας χρησιμοποίησης του τίτλου της ειδικότητας Νευρολογίας
- Νοέμβριος 2002- Ιούλιος 2004:** Συμμετοχή στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στις Νευροεπιστήμες του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- Ιούλιος 2004:** **Λήψη Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's)** στις Νευροεπιστήμες *Διπλωματική εργασία με θέμα «Συγκριτική Μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων των ισομορφών γλουταμικής αφυδρογονάσης **GLUD1** και **GLUD2**».*
- 4/11/2003 – 6/12/2007:** Εκπόνησης διδακτορικής διατριβής με θέμα «Μελέτη δομής και λειτουργίας γλουταμικής αφυδρογονάσης ειδικής για το νευρικό σύστημα» με επιβλέποντα τον καθηγητή Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής κ. Ανδρέα Πλαϊτάκη.

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά (Cambridge Proficiency).  
Γερμανικά (επίπεδο Zertificat)

## **ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

### **1) ΑΠΟ ΤΗ ΛΗΨΗ ΠΤΥΧΙΟΥ ΜΕΧΡΙ ΤΗ ΛΗΨΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ**

**14/6/1994- 31/10/1995:** Εκπλήρωση υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου του Ν/Δ 67/68 σε **έμμισθη θέση** στο περιφερειακό ιατρείο Βουκολιών, Κ.Υ. Κισσάμου

### **2) ΜΕΤΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**1/8/2002- 1/2/2004:** Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης της Νευρολογικής κλινικής ΠΑΓΝΗ και

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΤΑΚΤΙΚΟΥ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ  
ΙΑΤΡΕΙΟΥ ΤΩΝ ΑΕΕ.

3/12/2003-σήμερα

Υπεύθυνος του τακτικού εξωτερικού  
ιατρείου Απομυελινωτικών Νοσημάτων  
(25 μήνες).

1/8/2002- 31/7/2004:

Έμμισθη θέση με σύμβαση ανάθεσης  
έργου ορισμένου χρόνου (ΠΔ 432/81)  
στο εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης  
Νευρολογικών Νοσημάτων του τμήματος  
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με  
ερευνητικά και διδακτικά καθήκοντα που  
αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

1/10/2004- 5/5/2006

Διδάσκων σε έμμισθη θέση με σύμβαση  
ανάθεσης έργου ορισμένου χρόνου, ως  
μέλος του Π.Δ. 407/80, των μαθημάτων  
«Νευρολογία» και «Κλινική Άσκηση  
Νευρολογίας στο τμήμα Ιατρικής του  
Πανεπιστημίου Κρήτης.

5/5/2006- σήμερα

Επιμελητής Β` Ε.Σ.Υ. Νευρολογίας στην  
Νευρολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ.

## ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

### 1. ΠΛΗΡΕΙΣ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΥΡΟΥΣ (Original Papers)

1. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenase reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue specific (GLUD2) isoenzyme. A. Plaitakis, C. Spanaki, **V. Mastorodemos**, I. Zaganas. *Neurochemistry International* 1341:401-410 (2003). (**Impact Factor 3.26**).
2. Molecular basis of human Glutamate Dehydrogenases regulation under changing energy demands. **V. Mastorodemos**, I. Zaganas, C. Spanaki, M. Bessa and A. Plaitakis. *Journal of Neuroscience Research* 79:65–73 (2005) (**Impact Factor 3.37**).
3. Normal bone marrow hematopoietic stem cell reserves and normal stromal cell function support the use of autologous stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis. H. A. Papadaki, M. Tsagournisakis, **V. Mastorodemos**, A. Damianaki, K. Stamatopoulos, A. Fassas, A. Plaitakis, G. D. Eliopoulos. *Bone Marrow Transplantation* 36(12):1053-63 (2005). (**Impact Factor 2.17**).

4. Central Nervous System involvement as the presenting manifestation of autoimmune rheumatic diseases: A prospective study using the American College of Rheumatology Nomenclature for Neuropsychiatric Lupus. **V. Mastorodemos**, M Mamoulaki, H. Kritikos, A.Plaitakis, D. Boumpas,. Clin Exp Rheumatol. 2006 Nov-Dec;24(6):629-35 (**Impact Factor 2.37**).
5. Kanavouras K, **Mastorodemos V**, Borompokas N, Spanaki C, Plaitakis A.Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. J Neurosci Res. 2007, 85:1101–1109 (**Impact Factor 3.24**.)
6. Subcellular localization of human *GLUD1* and *GLUD2*-derived Glutamate Dehydrogenase. **V. Mastorodemos**, I. Zaganas, A Petsakou, A Plaitakis. Biochemistry and Cell Biology (submitted).

## 2.ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (ABSTRACTS) ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΣΕ ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Nervous system complications of systemic autoimmune diseases. **V. Mastorodimos**, M. Mamoulaki, M. Spilioti, H. Kritikos, D. Boumpas, A.Plaitakis. J Neurol 2003; 250 (Suppl.2): P612 II/161.
2. Seizure disorder associated with normal neuroimaging studies in Wegener' granulomatosis. **V. Mastorodimos**, M. Spilioti, M Mamoulaki, H. Kritikos, D. Boumpas, A.Plaitakis. J Neurol 2003; 250 (Suppl.2): P514 II/136.
3. Obstructive sleep apnea syndrome: respiratory disease during sleep neurological disease in alertness. **Mastorodimos V**, Klados G, Plaitakis A. Cerebrovasc Dis 2003; 16 (Suppl 4): 82.
4. Central Nervous System involvement as the presenting manifestation of systemic autoimmune diseases: frequency and presenting features using the ACR nomenclature. Marilena Mamoulaki, **Vasilios Mastorodimos**, Martha Spilioti, Heraklis Kritikos, Andreas Plaitakis, Dimitrios T. Boumpas. Arthritis and Rheumatism 2003; 48 (9 Suppl): 383.
5. Treatment of Cardioembolic stroke with intravenous unfractionated heparin: is there still a role? **V. Mastorodimos**, M. Mavrides, E. Bizas, A. Plaitakis. J Neurol (2004) 251 [Suppl 3]: P752–III/193.
6. Reserves and functional characteristics of bone marrow stem cells and hematopoiesis supporting capacity of marrow stromal cells in patients with multiple sclerosis. Papadaki HA, Tzagournissakis M, **Mastorodemos V**, Pontikoglou C, Plaitakis A. Neurology 2005; 64 (6) Suppl: A195-A196.



7. Autoimmune rheumatic diseases presenting with Central Nervous System (CNS) manifestations: A 6-year observational study in a tertiary referral center in the island of Crete. **Vasilios Mastorodimos**, Marilena Mamoulaki, Heraklis Kritikos, Andreas Plaitakis, Dimitrios T. Boumpas. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2005 23 (5): 591.
8. Rapidly increasing incidence of multiple sclerosis (MS) over the past 25 years renders Crete a high-risk geographic region **Mastorodimos V**, Nikolakaki H, Tzagournissakis M, Klados G, Spilioti M, Mavrides M, Papatzikakis A, Spanakis G, Kalamafkianaki A, Giouzevas K, Maris T, Kontolaimaki E, Psaroudaki K, Spanaki C, Georgakakis G, Plaitakis A *Neurology* 66 (5): A228-A228 Suppl. 2, 2006.
9. Community-Based Study of MS: Natural History and Prognostic Factors. Kotzamani D, Panou T, **Mastorodimos V**, Nikolakaki H, Tzagournissakis M, Klados G, Spilioti M, Mavrides M, Papatzikakis A, Spanakis G, Kalamafkianaki A, Kouroumalos N, Maris T, Kontolaimaki E, Psaroudaki K, Perisynaki S, Spanaki C, Georgakakis G, Plaitakis A. *Ann Neurol* 62 (suppl 11): S73, 2007

### 3. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Θ.Παπαδάκη, **B.Μαστοροδήμος**, Μ.Τσιλιμπάρης, Ι.Παλληκάρης. Μουκορμύκωση του οφθαλμικού κόγχου. *Ιατρική* 2001,79(1):74-78.
2. Γ.Κλάδος, **B.Μαστοροδήμος**, Γ.Ζουρνατζίδης, Α.Πλαϊτάκης. Σύνδρομο κακοήθους απόφραξης μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας σε γυναίκα ηλικίας 23 ετών που ανένηψε από βαθύ stupor και είχε καλή εξέλιξη μετά από αποσυμπιεστική κρανιεκτομή. *Νευρολογία* 2000,9(3),164.
3. Α Βισκαδουράκη, Γ.Κλάδος, Ε.Κουναλάκης, Ε.Δολαψάκης, **B.Μαστοροδήμος**, Μ.Τζαγκουρнисάκης, Μ.Μαυρίδης, Μ.Σπηλιώτη, Γ.Αμοιρίδης, Α. Πλαϊτάκης Ανάλυση 600 οξέων εγκεφαλικών επεισοδίων (ΟΕΕ) και αναγνώριση παραγόντων υψηλού κίνδυνου (Risk Factors) για τα νοσήματα αυτά στο πληθυσμό της Κρήτης. *Νευρολογία* 2000, 9(3),163.
4. Κοφτερίδης Δ., Καζάκου Ε., Μαυρίδης Μ., **Μαστοροδήμος Β.**, Βρέντζος Γ., Μπαρμπουνάκης Ε., Γκίκας Α. Αναδρομική μελέτη 65 περιπτώσεων με λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. *Νοσοκομειακά Χρονικά, Συμπληρωματικό Τεύχος*,2001,Τομος 63,83.
5. Θανάσης Παπατζικάκης, **Βασίλειος Μαστοροδήμος**, Γεώργιος Κλάδος, Σοφία Ερημάκη, Ιωάννα Αμερίδου, Εμμανουήλ Μπιζάς, Γεώργιος Σπανάκης, Δημοσθένης Ντούρος, Μηνάς Τζαγκουρнисάκης, Μάρθα Σπηλιώτη, Μιχάλης Μαυρίδης, Κλειώ Σπανάκη, Ανδρέας Πλαϊτάκης. Αποσυμπιεστική κρανιεκτομή σε ασθενείς με εκτεταμένο ημισφαιρικό ισχαιμικό έμφρακτο. *Νευρολογία* 2005;14(1): 96.

#### 4. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Purified nerve tissue specific glutamate dehydrogenase has properties adapted to the metabolism of excitatory neurotransmitter glutamate. C. Spanaki, **V. Mastorodimos**, J. Zaganas, A. Plaitakis. 17<sup>th</sup> Meeting Hellenic Society for Neuroscience: "Brain, Mind and Behaviour" 4-6 October 2002 Rethymno Crete Greece.
2. Obstructive sleep apnea syndrome: respiratory disease during sleep neurological disease in alertness. **Mastorodimos V**, Klados G, Plaitakis A. 12<sup>th</sup> European Stroke Conference, Valencia, Spain 21-24/5/2003
3. Nervous system complications of systemic autoimmune diseases. **V. Mastorodimos**, Marilena Mamoulaki, Martha Spilioti, H. Kritikos, D. Boumpas, A.Plaitakis 13<sup>th</sup> Meeting of European Neurologic Society 2003. Istanbul 14-18 June 2003
4. Seizure disorder associated with normal neuroimaging studies in Wegener granulomatosis. **V. Mastorodimos**, M. Spilioti, M Mamoulaki, H. Kritikos, D. Boumpas, A.Plaitakis 13<sup>th</sup> Meeting of European Neurologic Society 2003. Istanbul 14-18 June 2003
5. Central nervous system involvement as the presenting manifestation of systemic autoimmune diseases. M Mamoulaki, **V. Mastorodimos**, H. Kritikos, M. Spilioti, A.Plaitakis, D. Boumpas. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2003, Lisbon 18-21/6/2003
6. Central Nervous System involvement as the presenting manifestation of systemic autoimmune diseases: frequency and presenting features using the ACR nomenclature. M. Mamoulaki, **V. Mastorodimos**, M. Spilioti, H. Kritikos, A. Plaitakis, D. Boumpas. American College of Rheumatology (ACR) 2003 Annual Scientific Meeting, Orlando Florida 23-28/10/2003.
7. Treatment of Cardioembolic stroke with intravenous unfractionated heparin: is there still a role? **V. Mastorodimos**, M. Mavrides, E. Bizas, A. Plaitakis. Fourteenth Meeting of the European Neurological Society 26–30 June 2004, Barcelona, Spain.
8. Reserves and functional characteristics of bone marrow stem cells and hematopoiesis supporting capacity of marrow stromal cells in patients with multiple sclerosis. Papadaki HA, Tzagournissakis M, **Mastorodimos V**, Pontikoglou C, Plaitakis A. American Academy of Neurology 57th Annual Meeting; April 9-16, 2005, Miami Beach, Florida USA.
9. Autoimmune rheumatic diseases presenting with Central Nervous System (CNS) manifestations: A 6-year observational study in a tertiary referral center in the island of Crete. **Vasilios Mastorodimos**, Marilena

Mamoulaki, Heraklis Kritikos, Andreas Plaitakis, Dimitrios T. Boumpas, XI Congress of Rheumatology, Heraklion Crete, 22-24/9/2005.

10. Subcellular localization of human *GLUD1* and *GLUD2*-derived Glutamate Dehydrogenase. **V. Mastorodemos**, I. Zaganas, A Petsakou, A Plaitakis. 2nd Aegean Meeting on Neurologic Therapeutics, 21-23 May 2006, Heraklion, Crete, Greece.
11. **Mastorodemos V**, Nikolakaki H, Tzagournissakis M, Klados G, Spilioti M, Mavrides M, Papatzikakis A, Spanakis G, Kalamafkianaki A, Giouzepas K, Maris T, Kontolaimaki E, Psaroudaki K, Perisynaki S, Panou D, Kotzamani D, Chlouverakis G, Spanaki C, Georgakakis G, Plaitakis A. Increasing Incidence of Multiple Sclerosis (MS) in Crete. 2nd Aegean Meeting on Neurologic Therapeutics, 21-23 May 2006, Heraklion, Crete Greece.
12. M.M. Papachatzaki, K.Kanavouras, **V. Mastorodemos**, A. Plaitakis Sex steroid hormones regulation of the human Glutamate Dehydrogenase 2nd Aegean Meeting on Neurologic Therapeutics, 21-23 May 2006, Heraklion, Crete Greece.
13. Kotzamani D., **Mastorodemos V.**, Zaganas I, Plaitakis A. The role of Glutamate Dehydrogenase Leader Sequence into targeting the protein to mitochondria. 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience 29/9/-1/10/2006, Heraklion, Crete, Greece.
14. N.Borompokas, K.Kanavouras, **V.Mastorodemos**, A.Plaitakis Brain-specific glutamate dehydrogenase is sensitive to regulation by typical anti-psychotic agents: role of Arg443Ser 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience 29/9/-1/10/2006, Heraklion, Crete, Greece.
15. Kotzamani D, Panou T, **Mastorodemos V**, Nikolakaki H, Tzagournissakis M, Klados G, Spilioti M, Mavrides M, Papatzikakis A, Spanakis G, Kalamafkianaki A, Kouroumalos N, Maris T, Kontolaimaki E, Psaroudaki K, Perisynaki S, Spanaki C, Georgakakis G, Plaitakis A. Community-Based Study of MS: Natural History and Prognostic Factors. 132<sup>nd</sup> Annual Meeting American Neurological association, 7-10/10/07, Washington DC, USA.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

1. Ερευνητής (2002-2003) στο κάτωθι ερευνητικό προγράμματα που διεξάγονταν στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης Νευρολογικών Νοσημάτων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Παραλαβή και συλλογή δειγμάτων από διαφορετικά μέρη της Ελλάδος και της Κρήτης και ανάλυση του DNA με τις μεθόδους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πέψης με περιοριστικά ένζυμα, για ανεύρεση τυχόν πολυμορφισμών του γονιδίου PRNP, το οποίο ευθύνεται για την

ασθένεια Jacob-Creutzfeldt, στα πλαίσια **ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Γενετική ανάλυση του πολυμορφισμού του υπεύθυνου γονιδίου για την πρωτεΐνη Prion «PRNP»**, που χρηματοδοτείται από το Υπουργείο Υγείας (Κ.Ε.Ε.Λ.)

2. Συμμετοχή ως συνερευνητής (2002-2004) στην κλινική μελέτη MATCH EFC 7331 με τίτλο «Πρόληψη Αρτηριοθρόμβωσης με την κλοπιδογρέλη σε υψηλού κινδύνου ασθενείς με πρόσφατο παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο ή ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο: Μια τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη με περίοδο παρακολούθησης 18 μηνών», που διεξήχθη από τη φαρμακευτική εταιρία Sanofi Synthelabo. Τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στην επιθεώρηση Lancet. 2004;364(9431):331-7.
3. Συμμετοχή ως συνερευνητής (2004-2005) στην κλινική μελέτη «Μελέτη του αριθμού και της λειτουργικής επάρκειας των προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων του μυελού των οστών σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας» της Νευρολογικής και Αιματολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ. Τα αποτελέσματα της μελέτης περιλαμβάνονται σε άρθρο με τίτλο «Reserves and functional characteristics of bone marrow stem cells and hematopoiesis supporting capacity of marrow stromal cells in patients with multiple sclerosis» by H. A. Papadaki, M. Tsagournisakis, **V. Mastorodemos** et al., το οποίο δημοσιεύτηκε στο έγκριτο περιοδικό *Bone Marrow Transplantation*.
4. Συμμετοχή ως συνερευνητής (2006-. ) στην κλινική μελέτη TRANSFORMS (FTY720D2302) με τίτλο «a 12-month double-blind, randomized, multicenter, active-controlled, parallel-group study comparing the efficacy and safety of 0.5 mg and 1.25 mg fingolimod (FTY720) administered orally once daily versus interferon b-1a (Avonex) administered i.m. once weekly in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis» που διοργανώνεται από την εταιρεία NOVARTIS.

## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Ελληνική Νευρολογική Εταιρεία

## **ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ**

1. Υποτροφία ΙΚΥ για την εισαγωγή σε καλή σειρά (11<sup>ος</sup>) στην Ιατρική Σχολή ΑΠΘ (1987).
2. Βραβείο Ιωάννου και Βασιλείας Καραγιάννη από το Δήμο Θεσ/νίκης για άριστη σχολική επίδοση το έτος 1986-87.
3. Υπότροφος από 04/11/2003- 07/11/2005 στα πλαίσια του έργου ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ «Υποτροφίες Έρευνας με Προτεραιότητα στη Βασική Έρευνα», το οποίο συχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση κατά 75% και από Εθνικούς Πόρους (ΥΠΕΠΘ/ΕΥΔ ΕΠΕΑΕΚ II) κατά 25% για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής.



# Study of structure–function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (*GLUD2*) isoenzyme

Andreas Plaitakis\*, Cleanthe Spanaki, Vasilis Mastorodemos, Ioannis Zaganas

Department of Neurology, Section of Medicine, School of Health Sciences, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Received 18 November 2002; accepted 2 December 2002

## Abstract

In mammalian brain, glutamate dehydrogenase (GDH) is located predominantly in astrocytes, where is thought to play a role in transmitter glutamate's metabolism. Human GDH exists in *GLUD1* (housekeeping) and *GLUD2* (nerve tissue-specific) isoforms, which share all but 15 out of their 505 amino acids. The *GLUD1* GDH is potently inhibited by GTP, whereas the *GLUD2* enzyme is resistant to this compound. On the other hand, the *GLUD2* isoform assumes in the absence of GTP a conformational state associated with little catalytic activity, but it remains amenable to full activation by ADP and/or L-leucine. Site-directed mutagenesis of the *GLUD1* gene at sites that differ from the corresponding residues of the *GLUD2* gene showed that replacement of Gly456 by Ala made the enzyme resistant to GTP ( $IC_{50} = 2.8 \pm 0.15 \mu M$ ) compared to the wild-type GDH ( $IC_{50} = 0.19 \pm 0.01 \mu M$ ). In addition, substitution of Ser for Arg443 virtually abolished basal activity and rendered the enzyme dependent on ADP for its function. These properties may permit the neural enzyme to be recruited under conditions of low energy charge (high ADP:ATP ratio), similar to those that prevail in synaptic astrocytes during intense glutamatergic transmission. Hence, substitution of Ser for Arg443 and Ala for Gly456 are the main evolutionary changes that led to the adaptation of the *GLUD2* GDH to the unique metabolic needs of the nerve tissue.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Glutamate dehydrogenase; Mutagenesis; Regulation

## 1. Introduction

Glutamate dehydrogenase (GDH) (EC 1.4.1.3.) is a mitochondrial enzyme that catalyzes the oxidative deamination of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia using NAD and/or NADP as cofactors (Smith et al., 1975). For many organisms, GDH provides a major pathway for inter-conversion of  $\alpha$ -amino acids and  $\alpha$ -keto-acids with the enzyme's function being central to various metabolic processes, including ammonia homeostasis (Hudson and Daniel, 1993).

High levels of GDH activity are found in mammalian liver, brain, kidney, heart, pancreas, ovaries and testis, but the exact function of the enzyme in these tissues has not been fully understood. GDH activity is regulated allosterically with diverse compounds, such as purine nucleotides (ADP, NADH, GTP), L-leucine, polyamines, steroid hormones and neuroleptic drugs, shown to influence the enzyme's velocity

(Smith, 1979). ADP and L-leucine are known to activate GDH, whereas GTP and NADH act as allosteric inhibitors (Hudson and Daniel, 1993).

Tissue GDH activity is thought to be controlled by the need of the cell for ATP as an energy source (Smith, 1979), a contention supported by observations in pancreatic beta cells, in which GDH activation leads to insulin release (Fahien et al., 1988) through ATP production (Stanley et al., 1998). In the nervous system, however, the precise role of GDH has not been established. Previous observations (Plaitakis et al., 1982; Yu et al., 1982) raised the possibility that GDH is involved in the metabolism of transmitter glutamate. This has been supported by morphological studies on rat brain showing that GDH is localized predominantly in astrocytes (Aoki et al., 1987), the cells responsible for the removal and metabolism of glutamate released from nerve endings during excitatory transmission (Schousboe et al., 1977).

Although earlier experiments using cultured astrocytes exposed to low concentrations of glutamate, failed to show a significant role for GDH in these cells (Waniewski and Martin, 1986), more recent studies employing higher

\* Corresponding author. Tel.: +30-2810-394647/394648; fax: +30-2810-394839.

E-mail address: [plaitak@med.uoc.gr](mailto:plaitak@med.uoc.gr) (A. Plaitakis).

concentrations of glutamate revealed that a substantial proportion of glutamate taken up by the cultured cells is metabolized by this enzyme (McKenna et al., 1996). These discrepancies suggest that GDH function (and glutamate flux through this pathway) is highly regulated. Hence, it is important to understand the molecular mechanisms responsible for this regulation.

In human brain GDH exists in at least two isoforms encoded by structurally distinct genes, designated *GLUD1* and *GLUD2* (Mavrothalassitis et al., 1988; Shashidharan et al., 1994). *GLUD1* is expressed widely (housekeeping), whereas *GLUD2* is specific for neural and testicular system (Shashidharan et al., 1994). The need for multiplicity of brain GDH may relate to the complex function of glutamate in the nerve tissue. Here we provide evidence that *GLUD2* has evolved to function best in the particular environment that prevails in glial cells following glutamate uptake. The molecular basis of this adaptation is presented below.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Materials

Sf21 cells and the baculovirus expression vectors were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The media for the Sf21 insect cells and fetal calf serum were obtained from Life Technologies. Modified baculovirus (Baculo-Gold) was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). NADPH, ADP and GTP (lithium salt) were from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Phenylsepharose High Performance was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) and Hydroxyapatite Bio-Gel HT was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

### 2.2. Site-directed mutagenesis of the *GLUD1* cDNA

A *GLUD1* cDNA, cloned in pBSKII+ vector, was mutagenised at specific sites (Fig. 1) using the Gene Editor mutagenesis system according to the Manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, USA). Mutagenic oligonucleotides (25–30 bp in length) were phosphorylated and annealed to the *GLUD1* template by heating the reaction mixture at 75 °C and then by slowly cooling it (1.5 °C/min) to 37 °C. The annealing reaction also contained primers (provided by the Manufacturer) designed to mutate the beta lactamase gene of the pBSKII+ vector. The plasmid was then amplified by T4 DNA polymerase (nicks were ligated by T4 DNA ligase) and used to transform the BMH 71–18 mutS strain of *Escherichia coli* (to prevent repair of the newly synthesized strand by the microorganism). The cells were grown in presence of an appropriate antibiotic selection mix; plasmid DNA was isolated and used to transform the JM109 strain of *E. coli*. Clones containing plasmids with the desired mutations were selected by restriction digestion analysis and by DNA sequencing.

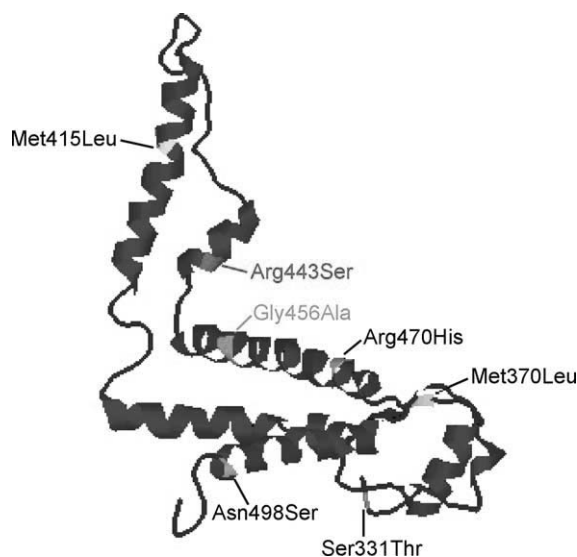


Fig. 1. Location of the Ser331Thr, Met370Leu, Met415Leu, Arg443Ser, Gly456Ala, Arg470His and Asn498Ser amino acid substitutions in human GDH. Shown is a cartoon diagram of the carboxyterminal region of one of the six subunits that compose the GDH hexamer based on X-ray crystallographic data from human liver GDH (Smith et al., 2002). Gly456Ala is shown in green and Arg443Ser in red, while all other mutations (which do not affect the allosteric and catalytic properties of the enzyme) are depicted in yellow.

The mutated *GLUD1* cDNA was cleaved from the pBSKII+ vector using *Bam*HI and *Pst*I restriction endonucleases and ligated to the baculovirus transfer vector pVL1393. The ligation products were used to transform the JM109 strain of *E. coli*. The proper orientation of the insert was verified by sequencing. The subcloned mutated *GLUD1* gene was bi-directionally sequenced in its entire length in order to confirm the presence of the desired mutation and exclude incidental DNA alterations induced during the above mutagenesis steps. DNA sequencing was carried out using the LI-COR 4200 system (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

### 2.3. Expression of recombinant proteins

Wild-type *GLUD1* and *GLUD2* cDNAs, along with the mutated *GLUD1* clones, were expressed in Sf9 or Sf21 cells using the baculovirus expression system as previously described (Shashidharan et al., 1994; Zaganas and Plaitakis, 2002). Cells of the insect *Spodoptera frugiperda* (Sf21) were co-transfected with the plasmid DNA (pVL1393 vector containing the appropriate insert) and modified baculovirus DNA (Baculogold; BD Pharmingen), and incubated at 27 °C for 4–5 days. The virus was amplified by 2–3 rounds of infection. The cultured cells were harvested 5 days post-infection and used for extracting the recombinant GDH proteins. For this, the cultured cells were homogenized in a buffer containing 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5 M NaCl. The resulting whole homogenate

was centrifuged at  $7000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min and the supernatant was used for studies employing crude extracts. Protein determination was done using the Lowry method (Lowry et al., 1951).

#### 2.4. Enzyme purification

GDH was purified from Sf21 cell extracts. About  $200 \times 10^6$  infected Sf21 cells were used for purifying GDH, which was carried out by modification of our previously published method (Hussain et al., 1989). The cultured cells were subjected to 2–3 cycles of freeze thaw and homogenized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 buffer containing 0.1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF. A 30–55% ammonium sulfate (AS) cut, obtained from these extracts, was re-suspended in 50 mM Tris-HCl, pH 6.0 buffer containing 15% AS and loaded on a hydrophobic interaction column packed with phenylsepharose high performance (Pharmacia) and equilibrated with the same buffer. The column was eluted with a double gradient of decreasing concentration of AS (15–0%) and increasing concentration of ethylene glycol (0–90%). Eluted GDH was precipitated with 60% AS and passed again through the same phenylsepharose column. Fractions containing GDH activity were dialyzed (at  $4^{\circ}\text{C}$ ) against several changes of 100 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH = 7.15, buffer and loaded into the hydroxyapatite column (Colon et al., 1986). The column was eluted with a gradient of 10–400 mM Sodium Phosphate buffer, pH 7.4. Purified GDH was used for enzyme assays (except as indicated).

#### 2.5. Enzyme assays

Enzyme activity was assayed spectrophotometrically (at 340 nm) in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate (Plaitakis et al., 2000). The reaction mixture of 1 ml contained 50 mM triethanolamine pH 8.0, buffer (except as indicated), 100 mM ammonium acetate, 100  $\mu\text{M}$  NADPH and 2.6 mM EDTA. NADH was used instead of NADPH only to test the activity of the endogenous insect cell GDH. Enzyme reaction was initiated by adding  $\alpha$ -ketoglutarate to 8 mM. Initial rates (enzyme velocity during the first 30 s after initiation of the reaction) were recorded. Wild-type *GLUD1* and *GLUD2*, as well as mutant *GLUD1* proteins were studied in parallel. To test the effect of the pH of the reaction buffer, assays were also performed using 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.0 and 7.5.

#### 2.6. Allosteric regulation studies

Regulation of the human recombinant GDHs by ADP and/or L-leucine was studied essentially as previously described (Plaitakis et al., 2000) by adding this compound to the reaction mixture at various concentrations (ADP =

0.025–1.0 mM, L-leucine = 0.3–10 mM, final concentrations) while keeping the other substrates constant. We also explored the effect ADP and L-leucine used together at various concentrations on enzyme activity. In addition, GTP inhibition was studied in the presence of 1 mM ADP (final concentration).

#### 2.7. Statistical analyses

All statistical analyses on the obtained data and plotting were performed by the use of the Origin Program (MicroCal Software, Northampton, MA, USA). Differences in catalytic and allosteric behavior were evaluated using Student's *t*-test.  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{SC}_{50}$  values were determined graphically. The Hill plot coefficients for GTP inhibition were calculated according to the method discussed by Cornish-Bowden (1979). Studies of the structural models of human and bovine GDH were performed with the use of the RasMol (v2.7.1.1, © 1992–1999 R. Sayle) and the Swiss-PDBviewer (v3.7.b2, © 1995–1999 N. Guex) programs.

### 3. Results

#### 3.1. Production of recombinant human *GLUD2* and *GLUD1* GDH

The nerve tissue-specific and the housekeeping GDH were obtained in an unmixed form by expressing the *GLUD2* and *GLUD1* cDNA, respectively, in Sf9 or Sf21 cells using the baculovirus expression system (Shashidharan et al., 1994, 1997; Plaitakis et al., 2000). Sequencing of the N-terminus of the expressed enzymes, purified from cell extracts, revealed that both proteins lacked the leader peptide (Shashidharan et al., 1997) predicted by the corresponding cDNA (Mavrothalassitis et al., 1988), thus confirming that the obtained recombinant proteins had been processed within the host cells as the mature enzymes are. This has been also supported by SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins, which revealed a molecular weight that was comparable to that of the mature endogenous GDH isolated from human liver and that of the commercial bovine liver GDH (Zaganas and Plaitakis, 2002).

The obtained recombinant *GLUD1* and *GLUD2*-derived GDH proteins were found to be as catalytically active as the endogenous human liver GDH (Shashidharan et al., 1997; Zaganas et al., 2002). When activated by 1.0 mM ADP, the specific activities of the purified endogenous liver enzyme, as well as, and the expressed *GLUD1* and *GLUD2* GDH were comparable (Fig. 2B) (Zaganas et al., 2002). However, the basal activity (determined in the absence of allosteric effectors) of the expressed nerve tissue-specific (*GLUD2*-derived) GDH was markedly decreased as compared to that of the expressed housekeeping (*GLUD1*-derived) and the endogenous GDH purified from human liver (Shashidharan et al., 1997; Zaganas et al., 2002).

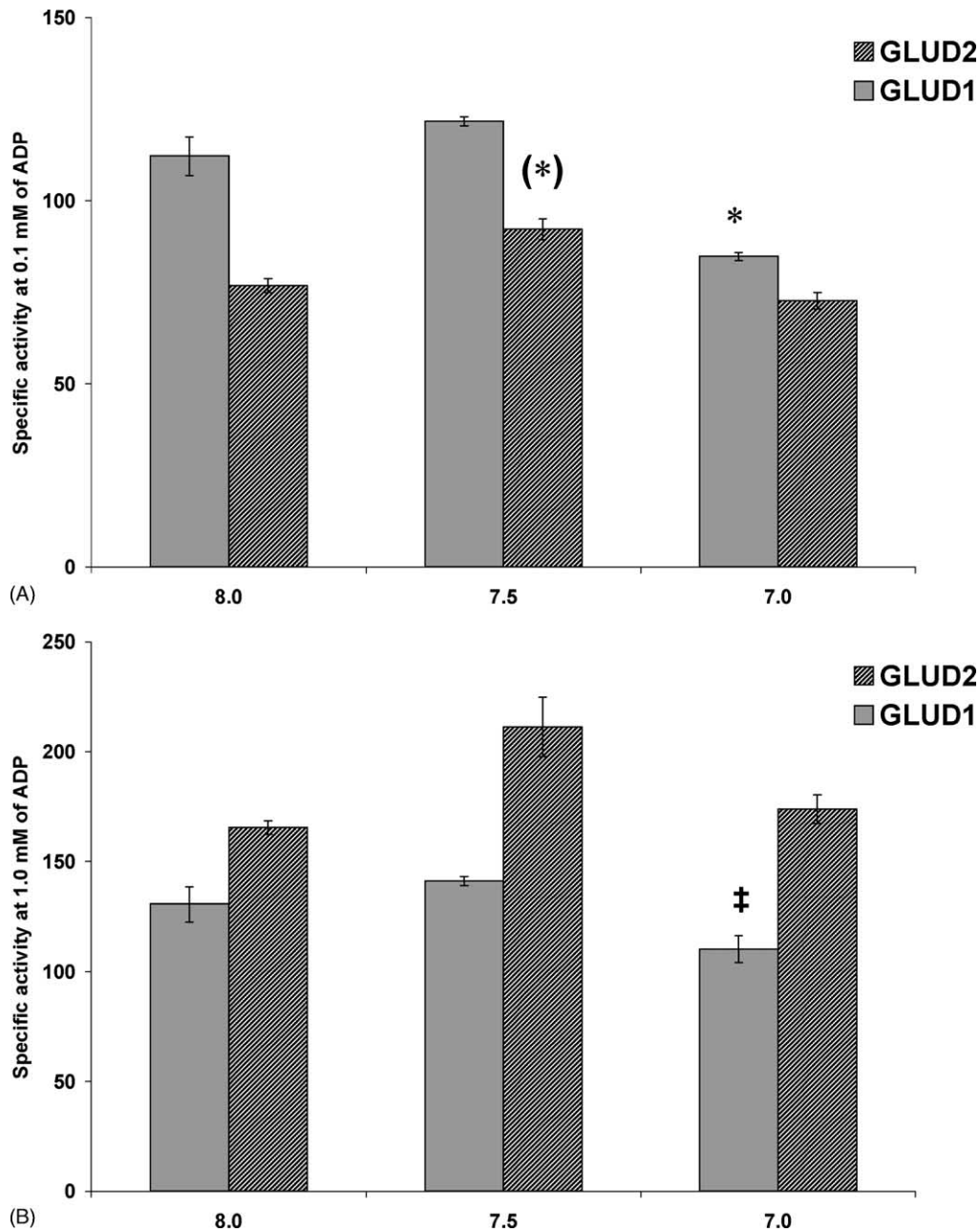


Fig. 2. Effect of pH on ADP-stimulated activity of the wild-type expressed *GLUD1* and *GLUD2*-derived GDHs. Specific activities ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  of pure protein) were measured in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate in TRA buffer. For these assays we used partially purified enzymes (peak fractions from the phenylsepharose column, see Methods). The pH of the reaction buffer is indicated below the columns. Grey columns represent the wild-type *GLUD1* GDH values and striped columns the wild-type *GLUD2* GDH values. (A) Data obtained in the presence of 0.1 mM ADP. Means of at least three experimental determinations  $\pm$  S.E.M. (bars). \*:  $P < 0.01$  as compared to pH 7.5 and pH 8.0 values; (\*):  $P < 0.01$  as compared to pH 7.0 and pH 8.0 values. (B) Data obtained in the presence of 1 mM ADP. Means of at least two experimental determinations  $\pm$  S.E.M. (bars). ‡:  $P < 0.05$  as compared to the pH 7.5 value.

### 3.2. Regulation of human *GLUD1* and *GLUD2* isoenzymes

ADP induced a concentration-dependent activation of the recombinant proteins, which was proportionally greater for the *GLUD2* than for the *GLUD1*-derived GDH (Fig. 3). Study of the ADP activation curves revealed an  $\text{SC}_{50}$  for

the expressed recombinant *GLUD1* GDH that was similar to that of the endogenous GDH isolated from human liver (Zaganas et al., 2002). In contrast  $\text{ADP SC}_{50}$  for the *GLUD2* enzyme was higher than both the endogenous liver GDH and the expressed *GLUD1* GDH (Fig. 3). L-Leucine (0.3–10 mM), another GDH activator, stimulated the activity of the recombinant proteins. Again this activation was



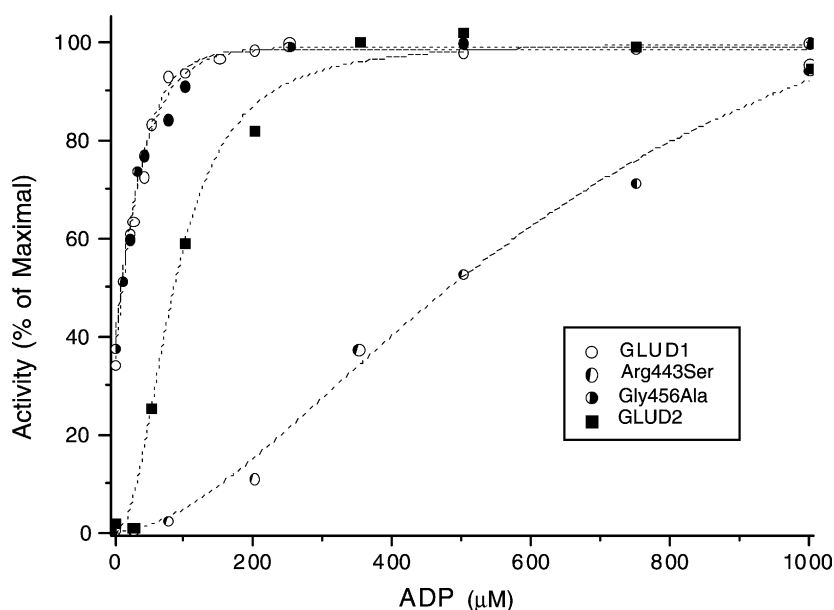


Fig. 3. Comparison of ADP activation curves of the Gly456Ala and Arg443Ser mutants and of the wild-type *GLUD1* and *GLUD2*-derived human GDHs. Data points represent mean values from at least two experimental determinations. GDH activity was measured in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate in TRA, pH 8.0, buffer in the presence of increasing concentrations of ADP. All assays were performed using crude extracts of the cultured cells.

proportionally greater for the *GLUD2* GDH than that for the *GLUD1* enzyme (Plaitakis et al., 2000). The presence of low concentrations of ADP (10–50  $\mu$ M) made the *GLUD2* GDH more sensitive to the stimulatory effect of L-leucine (0.0675–0.5 mM), permitting activation of the brain-specific isoenzyme up to 2500% (Plaitakis et al., 2000).

Assays done at different pH values of the TRA buffer, in the presence of 0.1 mM ADP (Fig. 2A), revealed that, while the *GLUD1* GDH was about 25–30% less active at pH 7.0 ( $P < 0.01$ ) than at pH 7.5 and 8.0, the *GLUD2* isoenzyme was equally active at pH 7.0 and 8.0. At 0.1 mM ADP, specific activities of the *GLUD2* isoenzyme were somewhat lower than those of the *GLUD1* GDH (Fig. 2A) as the ADP  $SC_{50}$  for *GLUD2* was higher than that for *GLUD1* (Fig. 3). In contrast, at 1 mM ADP, the specific activities of the *GLUD2* were increased (by 50% at pH 7.5 and by 60% at pH 7.0) as compared to those of the *GLUD1* GDH (Fig. 2B). Again, at pH 7.0 the *GLUD2* GDH was as active as at pH 8.0 (Fig. 2B).

GTP exerted a power inhibitory effect ( $IC_{50} = 0.20 \mu$ M) on the *GLUD1*-derived GDH, when assayed in the absence of allosteric activators (Plaitakis et al., 2000). In contrast, non-activated *GLUD2*-derived GDH was totally insensitive to this compound ( $IC_{50} > 5000 \mu$ M). ADP rendered the *GLUD1*-derived enzyme less sensitive to GTP inhibition. The *GLUD2*-derived GDH became amenable to GTP inhibition in the presence of ADP, albeit at higher GTP levels than the *GLUD1* enzyme (Fig. 4). L-Leucine, when used alone, was less effective than ADP in reversing GTP inhibition. However, when used in the presence of ADP (25–50  $\mu$ M), L-leucine was capable of markedly attenuating GTP inhibition of the *GLUD2* isoenzyme (Plaitakis et al., 2000).

### 3.3. Production of mutated *GLUD1* GDHs

Using site-directed mutagenesis, we obtained 7 *GLUD1* cDNAs each containing a different mutation. At each of the mutated sites, the residue present in the *GLUD1* GDH was replaced with the corresponding residue of the *GLUD2* predicted protein. The seven residues were located in the C terminal region of this protein (Fig. 1), a section of which forms part of the regulatory domain of GDH. Two of these mutants (Arg443Ser and Gly456Ala), which showed marked functional changes, were purified to homogeneity from cell extracts and were further studied (see below). SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins revealed that the mutant enzymes had the same molecular mass as the wild-type (*GLUD1*-derived) expressed GDH as well as the endogenous human *GLUD1* GDH purified from human liver (Zaganas and Plaitakis, 2002; Zaganas et al., 2002).

### 3.4. Properties of mutated *GLUD1* proteins

Functional analyses of the seven mutated *GLUD1* proteins, revealed that substitution of Thr for Ser331, Leu for Met 370, Leu for Met415, His for Arg470 or Ser for Asn498 had no effect on the enzyme's catalytic or regulatory properties. In contrast, substitution of Ser for Arg443 or Ala for Gly456 markedly affected the function of the mutant enzymes as described below.

#### 3.4.1. Arg443Ser mutation

Enzyme assays of recombinant *GLUD1* mutants revealed that substitution of Ser for Arg443 virtually abolished

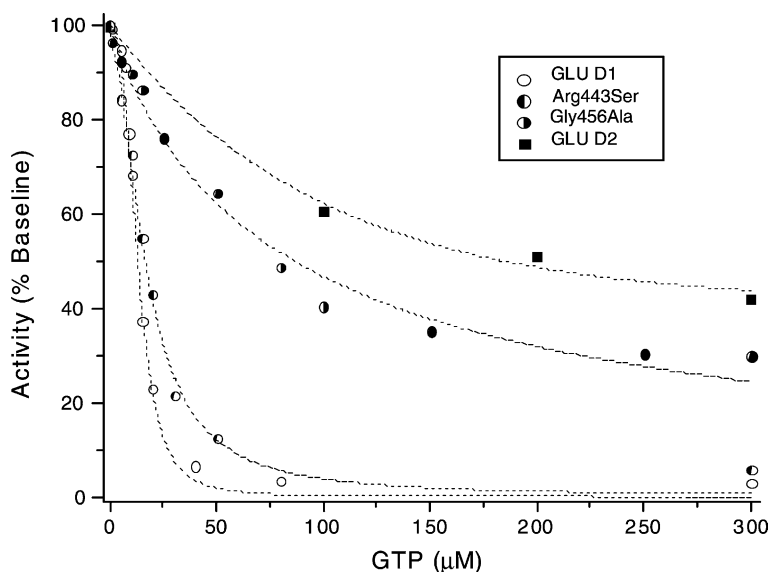


Fig. 4. Comparison of GTP inhibition curves of the Gly456Ala and Arg443Ser mutants and of the wild-type *GLUD1* and *GLUD2*-derived human GDHs. Data points represent mean values of at least two experimental determinations and are expressed as percentage of baseline activity (no GTP added). GDH activity was measured in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate in TRA, pH 8.0, buffer in the presence of increasing concentrations of GTP. All assays were performed with crude extracts and in the presence of 1mM ADP. The Gly456Ala mutant and the *GLUD2* isoenzyme are resistant to GTP concentrations which render both the wild-type GDH and the Arg443Ser mutant essentially inactive.

basal activity. As shown in Fig. 3, the basal activity of the Arg443Ser mutant was about 3% of the maximal of this mutant (obtained in the presence of 1 mM ADP) or about 8% of the basal activity of the wild-type *GLUD1* GDH. The markedly diminished basal activity of the Arg443Ser mutant persisted when assayed at different pH values in either TRA or phosphate buffer (Zaganas et al., 2002). However, varying the composition and the pH of the reaction buffer affected differentially the mutant and the wild-type GDH. Thus, while the basal activity of the *GLUD1* GDH was somewhat higher at pH 8.0 and 7.5 than at pH 7.0, the basal specific activity of the Arg443Ser mutant increased by about twofold when the pH of the reaction buffer was lowered from 8.0 to 7.0 (Zaganas et al., 2002).

In addition to diminishing basal activity, the Arg443Ser mutation totally abrogated the activation of the enzyme by L-leucine in the absence of allosteric effectors. As shown in Fig. 5, addition of L-leucine (1.5 mM final concentrations) failed to activate the Arg443Ser mutant, although the activity of the wild-type *GLUD1* GDH was stimulated up to about 75% (data not shown). Although L-leucine, when used alone, was totally ineffective in stimulating the activity of the Arg443 mutant, the presence of low concentrations of ADP (0.025–0.1 mM) rendered the mutant enzyme amenable to L-leucine activation (Fig. 5). In the presence of 0.025–0.1 mM ADP, L-leucine (>1.5 mM) stimulated the Arg443Ser mutant up to 2000% (Fig. 5). The Arg443Ser mutation did not affect the inhibition of the enzyme by GTP (determined in the presence of 1 mM ADP). Hill plot analysis also confirmed that the degree of cooperativity in GTP inhibition was similar to that of the wild-type enzyme (Fig. 4) (Zaganas et al., 2002).

### 3.4.2. Gly456Ala mutation

Substitution of Ala for Gly456 rendered the enzyme markedly resistant to GTP inhibition ( $IC_{50} = 2.80 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ) as compared to the wild-type *GLUD1*-derived GDH ( $IC_{50} = 0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ). In addition, the Gly456Ala mutation abolished the cooperative behavior of the enzyme, as revealed by the GTP inhibitory curves (Hill plot values  $1.12 \pm 0.06$  and  $2.09 \pm 0.11$  for the Gly456Ala mutant and the wild-type *GLUD1* GDH, respectively) (Zaganas and Plaitakis, 2002). Similar differences were obtained when GTP inhibition studies were performed in presence of ADP 1 mM (Fig. 4). In contrast, the catalytic and kinetic properties of the Gly456Ala mutant were not altered. Also, activation properties of the Gly456Ala mutant by ADP were comparable to those of the wild-type *GLUD1* GDH (Fig. 3).

### 3.5. Structural models of the Arg443Ser and Gly456Ala mutants

Study of the structure of human *GLUD1*-derived GDH suggests that Arg443 lies in the “antenna-like” structure of the enzyme, near the junction of the antenna with the “pivot” helix (Fig. 1). This helix is shown to rotate during the movement of the  $\text{NAD}^+$  binding domain that occurs with substrate binding. Modeling of the introduced Ser443 side chain suggests that this amino acid substitution may disrupt the hydrogen bond that exists between Arg443 of one subunit with Ser 409 of a neighboring subunit (Zaganas et al., 2002).

Concerning Gly456, this residue lies in a tightly packed region of the molecule. Modeling of the introduced Ala456 side chain suggests that this chain may be in steric clash with the side chain of Phe387 of the mutant enzyme, as the

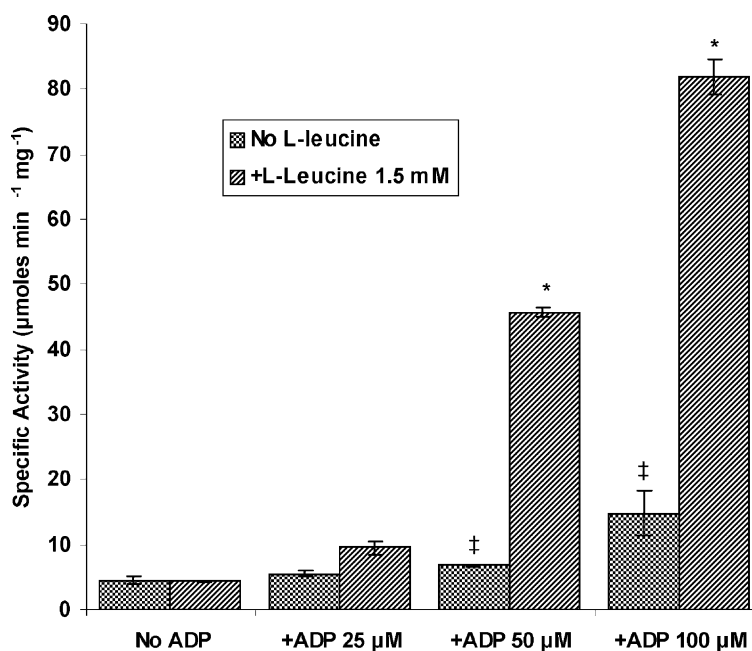


Fig. 5. Effect of ADP and/or L-leucine on the specific activities of purified expressed Arg443Ser mutant. Specific activities (SA) were measured in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate in TRA, pH 8.0, buffer. Grey columns represent GDH values obtained in the absence of L-leucine and stripped columns values obtained in the presence of 1.5 mM L-leucine (final concentration). ADP was present during assays at the concentrations indicated. Means  $\pm$  S.E.M. (bars) from three experimental determinations. \*:  $P < 0.001$  as compared to the value obtained in the absence of L-leucine (no L-leucine); ‡:  $P < 0.05$  as compared to the values obtained in the absence of ADP (No ADP).

estimated distance between Gly456 and Phe387 is  $\sim 2.8$  Å. This could alter the conformation of the Phe387 side chain, which in turn may affect the nearby Leu401 side chain from a neighboring subunit. Another steric clash (2.3 Å) apparent from this model is between the C $\beta$  of Ala456 and the carbonyl oxygen of residue 452. This clash occurs assuming that the main chain angles do not change after substitution of Gly456 with Ala (Zaganas and Plaitakis, 2002).

#### 4. Discussion

Although mammalian liver GDH is the product of the *GLUD1* gene, GDH isolated from brain is a mixture of at least two isoenzymes (Hussain et al., 1989; Cho et al., 1995). Because the structure of the polypeptides encoded by the *GLUD1* and the *GLUD2* genes is very similar (they share a 97% amino acid sequence homology), it has not been possible to separate the corresponding mature proteins from human brain. The use of the recombinant DNA technology has permitted us to obtain human *GLUD1* and *GLUD2*-derived GDH in unmixed form in order to study their catalytic and regulatory properties.

Our findings showed that *GLUD1*-derived recombinant human GDH behaves similarly to the mature mammalian liver enzyme, particularly with respect to its activation by ADP and L-leucine at pH 8.0 (enhancement of activity by 2–3-fold). These data are consistent with previous findings showing that human liver expresses the *GLUD1*

gene only (Shashidharan et al., 1994). In contrast, the nerve tissue-specific GDH showed low basal catalytic activity, which could be markedly activated by ADP and/or L-leucine. As a result, in their fully activated state, both isoenzymes showed comparable specific activities.

GTP inhibited potently ( $IC_{50} = 0.19$   $\mu$ M) the *GLUD1*-derived GDH. These results are consistent with previous observations showing that endogenous GDH isolated from human lymphoblasts shows the same sensitivity to GTP ( $IC_{50} = 0.05$ – $0.4$   $\mu$ M) (Stanley et al., 1998, 2000; De Lonlay et al., 2001). In contrast, the *GLUD2*-derived (nerve tissue-specific) GDH proved to be resistant to GTP. Under baseline conditions, the very low activity displayed by this isoenzyme was totally refractory to GTP inhibition ( $IC_{50} > 5000$   $\mu$ M). Also, when activated by ADP and/or L-leucine, the *GLUD2*-derived GDH proved less sensitive to GTP than the *GLUD1*-derived GDH.

Our studies using site-directed mutagenesis of the *GLUD1* gene provided important insights into the molecular mechanisms that underlie the diversity of human GDH by revealing that the main functional differences between the *GLUD1* and *GLUD2* GDH are due to two amino acid substitutions. The first change (replacement of Gly456 by Ala) made the enzyme resistant to GTP inhibition without altering its activation by ADP and L-leucine, whereas the second change (replacement of Arg443 by Ser) rendered the enzyme largely inactive in the absence of allosteric effectors. Although the activity of the Arg443Ser mutant could be fully restored by ADP, this occurred at higher concentrations than those

required for the *GLUD2* isoenzyme. Also, unlike the *GLUD2* isoenzyme, the Arg443Ser mutant was not amenable to activation by L-leucine unless ADP was also present during assay.

As indicated above, modeling of the Arg443Ser and Gly456Ala mutations have provided significant insights into the molecular mechanisms that underlie their effects. Study of the crystal structure of the bovine liver enzyme (Peterson and Smith, 1999) and more recently of the human *GLUD1*-derived GDH (Smith et al., 2002) revealed the presence of an “antenna-like” region in this enzyme (Fig. 1) that is thought to play an important role in GDH function. Gly456 is located at the base (hinge region) of this antenna at a point where the polypeptide chain of one subunit comes in direct contact with another (Zaganas and Plaitakis, 2002). As described in the Results, introduction of Ala456 side chain occurs in a tightly packed region of the molecule and this may lead to steric clashes with other side chains. These disturbances may impair the ability of the “antenna” to facilitate inter-subunit communication, a process thought essential for GTP inhibition and cooperative effects (Peterson and Smith, 1999).

Arg443 is located on a small helix of the descending strand of the antenna (Fig. 1), which undergoes major conformational changes during opening and closure of the catalytic cleft (Smith et al., 2002). In order for catalysis to occur, the enzyme needs to cycle between the open and closed states. Our findings showing that substitution of Ser for Arg443 virtually abolishes basal activity, suggests that this mutation favors the closed enzyme conformation. This could be due to the loss of the H-bonds between the Arg443 side chain of one GDH subunit with the side chain of Ser409 (part of the ascending strand of the antenna) from the adjacent subunit as described in the Results.

The ability of ADP to restore the activity of the mutant is consistent with the concept that ADP facilitates the opening of the active site or it prevents hyper closure (Smith et al., 2002). However, due to the impaired subunit interaction in the Arg443Ser mutant, ADP needs to be present in relatively high concentrations for this action to occur. The fact that the Arg443Ser mutation totally abrogated activation of the enzyme by L-leucine, is also consistent with the possibility that the introduction of the Ser443 side chain favors the closed enzyme conformation. L-Leucine is thought to bind at the active site (Fang et al., 2002) and therefore closure of the catalytic cleft will prevent L-leucine from entering this site. The finding that concentrations of ADP sufficient to double or triple the basal activity, sensitized the mutant enzyme to the stimulatory effect of L-leucine, provides additional evidence that opening of the catalytic site by ADP is necessary for L-leucine to act.

The present study also showed that varying the composition and the pH of the reaction buffer affected differentially the Arg443Ser mutant and the wild-type enzyme. GDH, isolated from mammalian tissues, is traditionally assayed at pH 7.5–8.0 (Smith et al., 1975). Also, TRA is often used for

assaying GDH (Shashidharan et al., 1994; Cho et al., 1995; Plaitakis et al., 2000), as the enzyme appears to be stable and yields its maximal specific activities in this buffer. Previous studies have shown that GDH is unstable in Tris buffer and that inorganic phosphate interferes with the binding of GTP to the enzyme (Dieter et al., 1981). Here we confirmed that the wild-type expressed *GLUD1*-derived GDH yielded in TRA buffer its maximal basal activities and ADP-stimulated activities at pH 7.5–8.0. In contrast, the Arg443Ser mutant yielded its highest basal activities at pH 7.0. The function of the mutant enzyme improved when assayed in phosphate in the presence of 0.1 mM ADP, particularly at pH 7.5 and 7.0 (Zaganas et al., 2002).

Prompted by the above findings, we examined the behavior of the *GLUD2* GDH at different pH values and found that the enzyme performs equally well at pH 7.0 and pH 8.0. In contrast, the specific activity of the *GLUD1* enzyme declines when the pH is lowered from 8.0 to 7.0. It is well known that glutamate's neurotransmitter action is terminated by uptake into glial cells. In the salamander Muller cells (a specialized type of glial cells found in retina), glutamate uptake generated significant intracellular acidification (pH dropped from about 7.2 to about 7.0) due to countertransport of OH<sup>-</sup> (Bouvier et al., 1992; Poitry et al., 2000). These pH changes occurred both in the cytosol and in the distal process, which is enriched in mitochondria. There was a parallel rise in NAD(P)H that is thought to result from glutamate oxidation via GDH (Poitry et al., 2000). Hence, the ability of the *GLUD2* GDH to function well at pH 7.0 may represent an adaptation of importance for the metabolism of neurotransmitter glutamate.

The pH in the mitochondrial matrix is thought to remain fairly constant around 7.5–8 (Rottenberg and Lee, 1975). However, studies in rat kidney showed that lowering the extra-mitochondrial pH causes a reduction in the intramitochondrial pH, which in turn, affects the transport of glutamate across the inner mitochondrial membrane (Schoolwerth et al., 1984). The inner membrane of human mitochondria contains two types of transporters for glutamate. The first is the aspartate/glutamate exchanger and the second the glutamate carrier (GC). Glutamate entering mitochondria by the exchanger is transaminated to form aspartate. In contrast, the GC seems to be the only source of supply of external glutamate to GDH (Dennis and Clark, 1977). Interestingly, transport of glutamate via the GC is associated with co-transport (symporter) of H<sup>+</sup> across the mitochondrial membrane.

Recently, two types of mitochondrial glutamate carrier (GC1 and GC2) have been identified. These differ in their kinetic properties (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>) and in their tissue distribution (Fiermonte et al., 2002). The GC1 is expressed in all tissues, whereas the GC2 is mainly expressed in the brain and in the testis. This tissue distribution is nearly identical to that of the *GLUD1* (housekeeping) and *GLUD2* (specific for neural and testicular tissues) GDH, respectively. Since the transport of glutamate into the mitochondria is linked to its metabolism

by GDH, one can assume that both *GLUD2* and *GC2* have adapted to the particular metabolic needs of the neural and testicular tissues where they are expressed.

There is evidence that in the human the *GLUD1* gene (located on the 10th chromosome) has been retro posed to the X chromosome, where it gave rise to the intronless *GLUD2* gene through random mutations and natural selection. The present data suggest the functional properties acquired by *GLUD2* facilitate its function in nerve tissue. Besides its ability to function at relatively low pH, the *GLUD2* GDH is resistant to GTP inhibition and depends on ADP for its catalytic function. As GTP levels are generally higher in brain than in other tissues, GTP may not be a suitable modulator for GDH activity in the nerve tissue. Also, dependency on available ADP levels provides a novel molecular mechanism for the regulation of glutamate flux through the GDH pathway. This will permit the recruitment of the enzyme under conditions of low energy charge (high ADP:ATP ratio), such as those occurring under intense glutamatergic neurotransmission (Erecinska and Nelson, 1990; Plaitakis and Zaganas, 2001). Hence, the *GLUD2* GDH has evolved to function best in the particular environment that prevails in glial cells following glutamate uptake.

It is interesting to note that the Gly456Ala substitution seems to be conserved during mammalian evolution. The bovine liver GDH, like the human *GLUD1* enzyme, contains Gly at position 452 (corresponds to Gly456 in the human). Concerning the presence of Ala at this position in the human *GLUD2*, Cho et al. (1996), who separated two GDH isoenzymes from bovine brain, found by sequencing of isolated peptides that one of this isoenzymes contains Ala at position 452 (corresponds to Ala456 in the human *GLUD2*). It is presently unclear as to whether the bovine brain isoenzyme also contains Ser at position 439 (corresponds to Ser443 of the *GLUD2* in the human) as the polypeptide region that contains this residue has not been sequenced.

Parallel to our efforts, other investigators (Yoon et al., 2002a,b; Lee et al., 2001; Cho et al., 2001) have also employed site-directed mutagenesis on the *GLUD1* gene expressed in *E. coli* to identify residues involved in ligand binding. Others (Fang et al., 2001) have also used site-directed mutagenesis to study *GLUD1* GDH mutations that are found in patients with the hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. None of these, however, involves the sites mutated here.

The present observations further our understanding of this important protein, particularly with respect to its proposed structural and functional models. However, the introduced Agr443Ser and Gly456Ala mutations cannot explain all functional differences that exist between the *GLUD1* and the *GLUD2* GDH isoenzymes. Hence, additional studies are needed in order to clarify the structural basis of the functional diversity of human GDH and to provide insights into the role of this enzyme in the biology of mammalian systems.

## Acknowledgements

This work was supported by the Association for Research and Treatment of Neurological Disorders of Crete «Εύ Ζήν», a training grant (EPEAEK-Neurosciences) from the Ministry of Education of Greece (to V.M.) and the “Maria Manasaki” award by the University of Crete (to I.Z.). We are grateful to Dr. Micheal Karpusas for performing the structural modeling of the mutations. We also thank Dr. Athanasios Alegakis, Giorgos Vrentzos and Irene Skoula for their help.

## References

- Aoki, C., Milner, T.A., Berger, S.B., Sheu, K.F., Blass, J.P., Pickel, V.M., 1987. Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J. Neurosci. Res.* 18, 305–318.
- Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A., Attwell, D., 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 360, 471–474.
- Cho, S.W., Lee, J., Choi, S.Y., 1995. Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 233, 340–346.
- Cho, S.W., Ahn, J.Y., Lee, J., Choi, S.Y., 1996. Identification of a peptide of the guanosine triphosphate binding site within brain glutamate dehydrogenase isoproteins using 8-azidoguanosine triphosphate. *Biochemistry* 35, 13907–13913.
- Cho, S.W., Yoon, H.Y., Ahn, J.Y., Lee, E.Y., Lee, J., 2001. Cassete mutagenesis of lysine 130 of human glutamate dehydrogenase: an essential residue in catalysis. *Eur. J. Biochem.* 268, 3205–3213.
- Colon, A., Plaitakis, A., Perakis, A., Clarke, D.D., 1986. Purification and characterization of a soluble and a particular glutamate dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.* 46, 1811–1819.
- Cornish-Bowden A., 1979. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Butterworth, London/Boston, pp. 147–176.
- De Lonlay, P., Benelli, C., Fouque, F., Ganguly, A., Aral, B., Dionisi-Vici, C., Touati, G., Heinrichs, C., Rabier, D., Kamoun, P., Rober, J.J., Stanley, C., Saudubray, J.M., 2001. Hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome: report of twelve unrelated patients. *Pediatr. Res.* 50, 353–357.
- Dennis, S., Clark, J., 1977. The pathway of glutamate metabolism in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 168, 521–527.
- Dieter, H., Koberstein, R., Sund, H., 1981. Studies of glutamate dehydrogenase. The interaction of ADP, GTP, and NADPH in complexes with glutamate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 115, 217–226.
- Erecinska, M., Nelson, D., 1990. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 54, 1335–1343.
- Fahien, L.A., McDonald, M.J., Kmiotek, E.H., Mertz, R.J., Fahien, C., 1988. Regulation of insulin release by factors that also modify glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263, 13610–13614.
- Fang, J., Hsu, B., MacMullen, C., Poncz, M., Smith, T., Stanley, C., 2002. Expression, purification and characterisation of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem. J.* 363, 81–87.
- Fiermonte, G., Palmieri, L., Todisco, S., Agrimi, G., Palmieri, F., Walker, J.E., 2002. Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 19289–19294.
- Hudson, R.C., Daniel, R.M., 1993. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 767–792.

- Hussain, M.M., Zannis, V., Plaitakis, A., 1989. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J. Biol. Chem.* 264, 20730–20735.
- Lee, E.Y., Yoon, H.Y., Ahn, J.Y., Choi, S.Y., Cho, S.W., 2001. Identification of the GTP Binding site of human glutamate dehydrogenase by cassette mutagenesis and photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 276, 47930–47936.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mavrothalassitis, G., Tzimagiorgis, G., Mitsialis, A., Zannis, V.I., Plaitakis, A., Papamatheakis, J., Moschonas, N.K., 1988. Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3494–3498.
- McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., Zielke, H.R., 1996. Exogenous concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* 66, 386–393.
- Peterson, P., Smith, T.J., 1999. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure* 7, 769–782.
- Plaitakis, A., Berl, S., Yahr, M.D., 1982. Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216, 193–196.
- Plaitakis, A., Metaxari, M., 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.
- Plaitakis, A., Zaganas, I., 2001. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J. Neurosci. Res.* 66, 899–908.
- Poity, S., Poity-Yamate, C., Ueberfeld, J., MacLeish, P., Tsakopoulos, M., 2000. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. *J. Neurosci.* 20, 1809–1821.
- Rottenberg, H., Lee, C.P., 1975. Energy dependent hydrogen ion accumulation in submitochondrial particles. *Biochemistry* 14, 2675–2680.
- Schoolwerth, A., Lanoue, K., Hoover, W., 1984. Effect of pH on glutamate efflux from rat kidney mitochondria. *Am. J. Physiol.* 246, F266–F271.
- Schousboe, A., Svenneby, G., Hertz, L., 1977. Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J. Neurochem.* 29, 999–1005.
- Shashidharan, P., Michaelides, T.M., Robakis, N.K., Kretsovali, A., Papamatheakis, J., Plaitakis, A., 1994. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J. Biol. Chem.* 269, 16971–16976.
- Shashidharan, P., Clarke, D.D., Ahmed, N., Moschonas, N., Plaitakis, A., 1997. Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J. Neurochem.* 68, 1804–1811.
- Smith, E.L., Austin, B.M., Blumenthal, K.M., Nyc, J.F., 1975. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*, vol. 11. Academic Press, New York, pp. 293–367.
- Smith, E.L., 1979. The evolution of glutamate dehydrogenases and a hypothesis for the insertion or deletion of multiple residues in the interior of polypeptide chains. *Proc. Am. Philos. Soc.* 123, 73–84.
- Smith, T., Schmidt, T., Fang, J., Wu, J., Siuzdak, G., Stanley, C., 2002. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J. Mol. Biol.* 318, 765–777.
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., Ponz, M., 1998. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* 338, 1352–1357.
- Stanley, C.A., Fang, J., Kutyna, K., Hsu, B.Y., Ming, J.E., Glaser, B., Ponz, M., 2000. Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: predominance of mutations in exons 11 and 12 of the glutamate dehydrogenase gene. *Diabetes* 49, 667–673.
- Waniewski, R., Martin, D., 1986. Exogenous glutamate is metabolised to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 47, 304–313.
- Yoon, H.Y., Cho, E.H., Kwon, H.Y., Choi, S.Y., Cho, S.W., 2002a. Importance of glutamate 279 for the coenzyme binding of human glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277, 41448–41454.
- Yoon, H.Y., Lee, E.Y., Cho, S.W., 2002b. Cassette mutagenesis and photoaffinity labeling of adenine binding domain of ADP regulatory site within human glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* 41, 6817–6823.
- Yu, A.C., Schousboe, A., Hertz, L., 1982. Metabolic fate of 14C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J. Neurochem.* 39, 954–960.
- Zaganas, I., 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 behavior of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 26422–26428.
- Zaganas, I., Spanaki, C., Karpusas, M., Plaitakis, A., 2002. Substitution of Ser for Arg443 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, 46552–46558.

# Molecular Basis of Human Glutamate Dehydrogenase Regulation Under Changing Energy Demands

Vasileios Mastorodemos,<sup>1</sup> Ioannis Zaganas,<sup>1</sup> Cleanthe Spanaki,<sup>1</sup> Maria Bessa,<sup>2</sup> and Andreas Plaitakis<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, University of Crete, School of Health Sciences, Section of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup>Department of Basic Science, University of Crete, School of Health Sciences, Section of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

Glutamate dehydrogenase (GDH), an enzyme central to glutamate metabolism, is located in the mitochondria although there is evidence for extramitochondrial localization of GDH. In the human, housekeeping and nerve tissue-specific isoforms, encoded by the *GLUD1* and *GLUD2* genes, have been identified. The two isoenzymes differ markedly in their baseline activities, allosteric regulation, and thermal stability. GTP potently inhibits *GLUD1*-derived GDH ( $IC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$ ), whereas the *GLUD2*-derived isoenzyme is resistant to this compound. The *GLUD2*-derived GDH shows low basal activity and has the capacity to be activated fully by ADP or L-leucine. We used molecular biological tools to study the subcellular localization of *GLUD1*-derived GDH in cultured cells and the molecular basis of its regulation. COS7 cells, transfected with a *GLUD1*-pEGFP-N3 vector, revealed a GFP fluorescence pattern nearly identical to that of the mitochondrial marker pDsRed2-Mito. Site-directed mutagenesis of *GLUD1* gene showed that replacement of Gly456 by Ala made the enzyme resistant to GTP ( $IC_{50} = 2.8 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ) without altering its regulation by ADP. Substitution of Ser for Arg443 rendered the enzyme virtually inactive at its basal state, but fully responsive to ADP activation. The Arg443Ser mutant was more active at pH 7.0 than at pH 8.0. The Gly456Ala change therefore dissociated *GLUD2*-derived GDH function from GTP, whereas the Arg443Ser change made enzyme regulation possible without this inhibitor. These properties may allow the brain isoenzyme to function well under conditions of intracellular acidification and increased turnover of ATP to ADP, as occurs in synaptic astrocytes during excitatory transmission.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** glutamate dehydrogenase; expression; localization; molecular; regulation

Glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.3.) catalyzes the oxidative deamination of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia using NAD or NADP as cofactors

(Smith et al., 1975). For many organisms, GDH provides a major pathway for interconversion of  $\alpha$ -amino acids and  $\alpha$ -keto acids. Generation of  $\alpha$ -ketoglutarate via oxidative deamination of glutamate leads to synthesis of NAD(P)H, GTP, and ATP. As these compounds are allosteric inhibitors for mammalian GDH, whereas ADP is a stimulator, GDH activity is thought to be controlled by the need of the cell for ATP as an energy source (Smith, 1979). This is supported by observations on pancreatic  $\beta$  cells showing that excessive activation of GDH results in insulin release through ATP production (Gylfe, 1976; Sener and Malaisse, 1980; Sener et al., 1981; Stanley et al., 1998).

Mammalian GDH is composed of six identical subunits, each of which has a molecular mass of  $\sim 56$  kDa and consists of a polypeptide chain of around 550 amino acids. The amino acid sequence of bovine, human, rat, and mouse GDH has been determined (Moon and Smith, 1973; Julliard and Smith, 1979) or deduced from the nucleotide sequence of cloned mRNAs (Mavrothalassitis et al., 1988; Nakatani et al., 1988; Amuro et al., 1989; Tzimagiorgis et al., 1991). They all share a high degree of amino acid sequence similarity. The enzyme is present in almost all mammalian tissues (housekeeping) with the highest levels found in the liver. Other organs with relatively high levels of GDH activity include the brain, kidney, pancreas, intestine, spleen, lymph nodes, and the heart (Smith et al., 1975).

Earlier work revealed GDH is located in the mitochondria (Hogeboom and Schneider, 1953). Results of more recent ultrastructural investigations, using electron microscopic (EM) immunocytochemistry (Aoki et al., 1987; Rothe et al., 1990) have confirmed this mitochon-

\*Correspondence to: Andreas Plaitakis, MD, PhD, Department of Neurology, University of Crete, School of Health Sciences, Section of Medicine, Heraklion, Crete, Greece. E-mail: plaitak@med.uoc.gr

Received 26 August 2004; Revised 30 August 2004; Accepted 31 August 2004

Published online 2 December 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20353

drial localization. Several investigators (di Prisco and Casola, 1975; Colon et al., 1986; Rajas and Rousset, 1993; Cho et al., 1995; McDaniel, 1995), however, have raised the possibility for additional subcellular sites for mammalian GDH. This is a quite important issue as it suggests novel functions for this enzyme. Most techniques used by these investigators, however, employed differential centrifugation of tissue homogenates that can cause redistribution of the enzyme in vitro. The issue of the subcellular localization of GDH therefore needs to be addressed better using molecular and cellular biological techniques that have become recently available.

In the human, GDH exists in two isoforms encoded by distinct genes (Mavrothalassitis et al., 1988; Shashidharan et al., 1994): a widely expressed intron-containing *GLUD1* gene (housekeeping) and an X-linked intronless *GLUD2* gene specific for neural and testicular tissues (Shashidharan et al., 1994). Recent observations revealed that despite their high degree of amino acid sequence similarity, *GLUD1*- and *GLUD2*-derived GDH show marked differences in their thermal stability, basic catalytic activities, and allosteric regulation (Shashidharan et al., 1997; Plaitakis et al., 2000; Plaitakis and Zaganas, 2001).

Although high levels of GDH are present in brain (Patel et al., 1982; Rothe et al., 1990), the flux of glutamate through the GDH pathway has been found to be disproportionately low (Waniewski and Martin, 1986; Farinelli and Nicklas, 1992). These observations suggest that GDH function (and consequently glutamate flux through this pathway) is highly regulated. It is therefore important to understand the molecular mechanisms responsible for this regulation. We used available molecular biological tools to address two important questions arising from the above data: the subcellular localization of GDH and the molecular basis of human GDH regulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

*Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells and baculovirus expression vectors were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). The media for the Sf21 insect cells and fetal calf serum (FCS) were obtained from Life Technologies. The Gene Editor Mutagenesis system was obtained from Promega (Madison, WI), and modified baculovirus (BaculoGold) was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). NADPH, ADP, GTP (lithium salt), and bovine liver GDH were acquired from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Phenylsepharose High Performance was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) and BioGel HT hydroxyapatite was from Bio-Rad (Hercules, CA). EGFP-N3 and pDsRed2-Mito expression vectors were obtained from BD Biosciences Clontech (Franklin Lakes, NJ) and Mowiol 4-88 from Calbiochem (Merck KGaA Biosciences, Darmstadt, Germany).

### Subcellular Localization of GDH

**Plasmid construction.** A *GLUD1* cDNA, subcloned in the pBSKII vector, was PCR amplified in its entire length using the forward primer 5'-CTTCGAATTCAAAGC-

GATGTTTCGCGACCATCA, designed to anneal the 5' flanking region of *GLUD1* and create an *EcoR1* restriction site. The reverse primer used, 5'-ACCGGTGGATCCTCCTCC-CCCCATCTTTGTGAAGCTCACACCAG, was designed to convert the stop codon TAG to AAG (Leu), introduce a *BamHI* restriction site, and insert the PCR-amplified *GLUD1* cDNA in frame with the coding sequence of EGFP. The PCR-amplified *GLUD1* cDNA was ligated to the EGFP-N3 expression vector and was used to transform the JM109 strain of *Escherichia coli*. Plasmid DNA isolated from these bacteria was sequenced bidirectionally in its entire length to confirm deletion of the stop codon and the proper orientation of the insert.

**Cell culture, transfection, and fluorescence microscopy.** COS7 cells were transfected with either pEGFP N3-*GLUD1* or pDsRed2-Mito plasmids or the combination of both using the calcium phosphate-mediated transfection procedure. After 48 hr, these cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with 1× phosphate-buffered saline (PBS) and mounted with Mowiol. Fluorescence images were generated in a Leica TCS-NT laser scanning confocal microscope using the 20× and 40× objectives and a Leica DM IRBE inverted microscope.

### Site-Directed Mutagenesis of *GLUD1* cDNA

A *GLUD1* cDNA, cloned in pBSKII+ vector, was mutagenized at specific sites by phosphorylated oligonucleotides using the Gene Editor Mutagenesis system (Promega) according to the manufacturer's protocol, as described previously (Zaganas et al., 2002). The plasmid was then amplified by T4 DNA polymerase (nicks were ligated by T4 DNA ligase) and used to transform the BMH 71-18 mutS strain of *E. coli*. The cells were grown in presence of an appropriate antibiotic selection mix; plasmid DNA was isolated and used to transform the JM109 strain of *E. coli*. The mutated *GLUD1* cDNA was cleaved from the pBSKII+ vector and ligated to the baculovirus transfer vector pVL1393. The ligation products were used to transform the JM109 strain of *E. coli*. Clones containing plasmids with the desired mutations were selected by restriction digestion analysis or DNA sequencing.

### Expression of Wild-Type and Mutant Proteins

Wild-type *GLUD1* and *GLUD2* cDNAs, along with the mutated *GLUD1* clones, were expressed in Sf9 or Sf21 cells using the baculovirus expression system as described previously (Shashidharan et al., 1994, 1997; Zaganas and Plaitakis, 2002). Sf21 insect cells were harvested 5 days after infection with the recombinant baculovirus and homogenized in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5 M NaCl.

### GDH Purification

GDH was purified from Sf21 cell extracts using 30–55% ammonium sulfate fractionation followed by hydrophobic interaction and hydroxyapatite chromatography (Colon et al., 1986; Zaganas and Plaitakis, 2002). Fractions from the phenylsepharose column containing GDH activity were dialyzed (at 4°C) against several changes of 100 mM Tris-HCl, 200 mM KCl buffer (pH 7.15) and loaded into the hydroxyapatite col-



Fig. 1. Subcellular localization of *GLUD1*-derived GDH in COS7 cells.

**A:** Fluorescence image of COS7 cells transfected with the EGFP-N3-*GLUD1* plasmid. **B:** Fluorescence image of COS7 cells transfected with the mitochondrial marker pDsRed2-Mito. **C:** Fluorescence image of COS7 cells co-transfected with EGFP-N3-*GLUD1* and pDsRed2-Mito. This figure reveals an identical overlay staining pattern. This confirms the colocalization of *GLUD1*-derived GDH and the mitochondrial human cytochrome C oxidase subunit VIII.



umn. The purified enzyme was eluted with a gradient of 10–400 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4).

#### Enzyme Assays and Allosteric Regulation Studies

Enzyme activity was assayed spectrophotometrically (at 340 nm) in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate (Plaitakis et al., 2000). The reaction mixture of 1 ml contained 50 mM triethanolamine (TEA) pH 8.0 buffer (except as indicated), 100 mM ammonium acetate, 100  $\mu$ M NADPH and 2.6 mM EDTA. Enzyme reaction was initiated by adding  $\alpha$ -ketoglutarate to 8 mM final concentration (except as indicated). Initial rates (enzyme velocity during the first 30 sec after initiation of the reaction) were recorded. To test the effect of pH and composition of reaction buffer, assays were also carried out using 50 mM TEA buffer at pH 7.0, 7.5, and 8.0 as well 50 mM phosphate buffer at pH 7.0, 7.5, and 8.0. Regulation of the human recombinant wild-type and mutants GDH by ADP and L-leucine was studied essentially as described previously (Plaitakis et al., 2000; Zaganas et al., 2002).

#### Statistical Analyses

All statistical analyses and plotting was carried out by the use of the Origin Program (MicroCal Software, Northampton, MA). Differences in kinetic and allosteric behavior were evaluated using Student's *t*-test.  $IC_{50}$  and  $SC_{50}$  values were determined graphically. Studies of the structural models of bovine and human GDH were carried out with Pymol v0.97 software (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA).

## RESULTS

### Subcellular Localization of GDH

Examination of COS7 cells expressing the *GLUD1*-pEGFP-N-derived chimeric protein showed strong GFP-associated fluorescence over the cytoplasmic region. In contrast, the plasma membrane and the nucleus were negative (Fig. 1A). COS7 cells were also transfected with the commercially available vector pDsRed2-Mito, which contains the human cytochrome C oxidase subunit VIII fused to red fluorescent protein DsRed2. This expressed protein was used as a mitochondrial marker. Comparison of the pEGFP-N3-*GLUD1*-associated green fluorescence

pattern with that associated with pDsRed2-Mito red fluorescence revealed very similar distributions (Fig. 1B). Cotransfection of COS7 cells with pEGFP-N3-*GLUD1* and pDsRed2-Mito produced almost identical staining patterns in overlay pictures as shown with confocal microscopy (Fig. 1C). These data suggest that when expressed in COS7 cells, *GLUD1*-derived GDH is localized in the mitochondria.

### Properties of Human GDH

*GLUD1*- and *GLUD2*-derived GDH were obtained in recombinant form using expression of the corresponding cDNAs in Sf9 cells as described previously (Shashidharan et al., 1997; Plaitakis et al., 2000). Enzymatic analyses revealed that in the absence of allosteric effectors, the *GLUD2*-derived isoenzyme showed only 5% of its maximal activity (obtained at 1.0 mM ADP). In contrast, the *GLUD1*-derived isoenzyme maintained at its basal state  $\sim$ 40% of its maximal activity. ADP induced a proportionally greater degree of stimulation of the nerve tissue-specific enzyme than of housekeeping GDH. At 1.0 mM ADP, the activity of the nerve tissue-specific GDH was enhanced up to 1,600% and that of the housekeeping GDH up to 250% (Fig. 2). At this concentration of ADP, the two isoenzymes showed comparable specific activities (Fig. 2). When low concentrations of ADP (10–50  $\mu$ M) were used together with 0.0675–0.5 mM of L-leucine (another GDH activator), a synergistic effect on *GLUD2*-derived GDH activity was obtained (Fig. 3).

### Properties of Mutated *GLUD1*-Derived GDH

Using site-directed mutagenesis, we obtained seven *GLUD1* cDNAs, each containing a different mutation. Substitution of Thr for Ser331, Leu for Met370, Leu for Met415, His for Arg470, or Ser for Asn498 did not affect the allosteric or catalytic properties of the enzyme. In contrast, substitution of Ala for Gly456 and Ser for Arg443 induced marked functional changes. These two mutants were purified to homogeneity from cell extracts and were studied further. Their properties are described below:

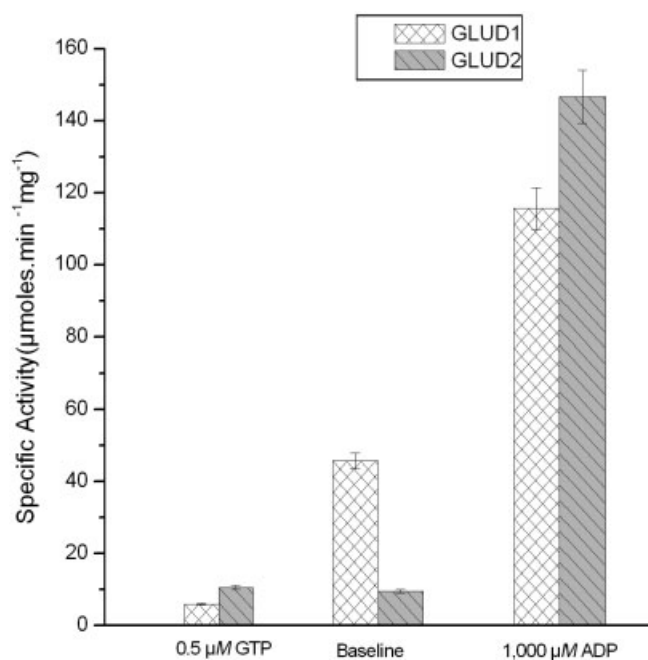


Fig. 2. Specific activities of recombinant *GLUD1* and *GLUD2* derived human GDH assayed in the absence of allosteric modulators (Baseline), or in the presence of either 0.5 μM GTP or 1,000 μM ADP (final concentrations). Enzyme activity was measured in the direction of reductive amination of α-ketoglutarate in 50 mM TEA buffer (pH 8.0). Data are mean values ± SE (bars) from three determinations.

**Arg443 determines basal GDH activity and abrogates L-Leucine activation.** Substitution of the Arg443 for Ser virtually abolished basal activity of the mutant *GLUD1*-derived enzyme. In the absence of allosteric effectors, the Arg443Ser mutant showed only 2.6% of its maximal activity obtained in the presence of 1 mM ADP. The markedly diminished basal activity of the Arg443Ser mutant persisted when assayed at different pH values in either TEA or phosphate buffer. Varying the composition and pH of the reaction buffer differentially affected mutant and wild-type GDH. Although basal activity of the *GLUD1*-derived GDH was somewhat higher at pH 8.0 and 7.5 than at pH 7.0, the basal specific activity of the Arg443Ser mutant increased by about twofold when the pH of the reaction buffer was lowered from 8.0 to 7.0 (Fig. 4). In addition, the Arg443Ser mutation totally abrogated enzyme activation by L-leucine at up to 10 mM (final concentrations) in the absence of allosteric effectors (Fig. 5). In contrast, activity of the wild-type *GLUD1*-derived GDH was stimulated up to about 75% (data not shown) by L-leucine. Although L-leucine, when used alone, was totally ineffective in stimulating the activity of the Arg443 mutant, the presence of rather low concentrations of ADP (0.025–0.1 mM) permitted the activation of the mutant by L-leucine (Fig. 5).

**Gly456 is essential for GTP inhibition.** Substitution of Ala for Gly456 rendered the enzyme markedly resistant to GTP inhibition ( $IC_{50} = 2.80 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ) as

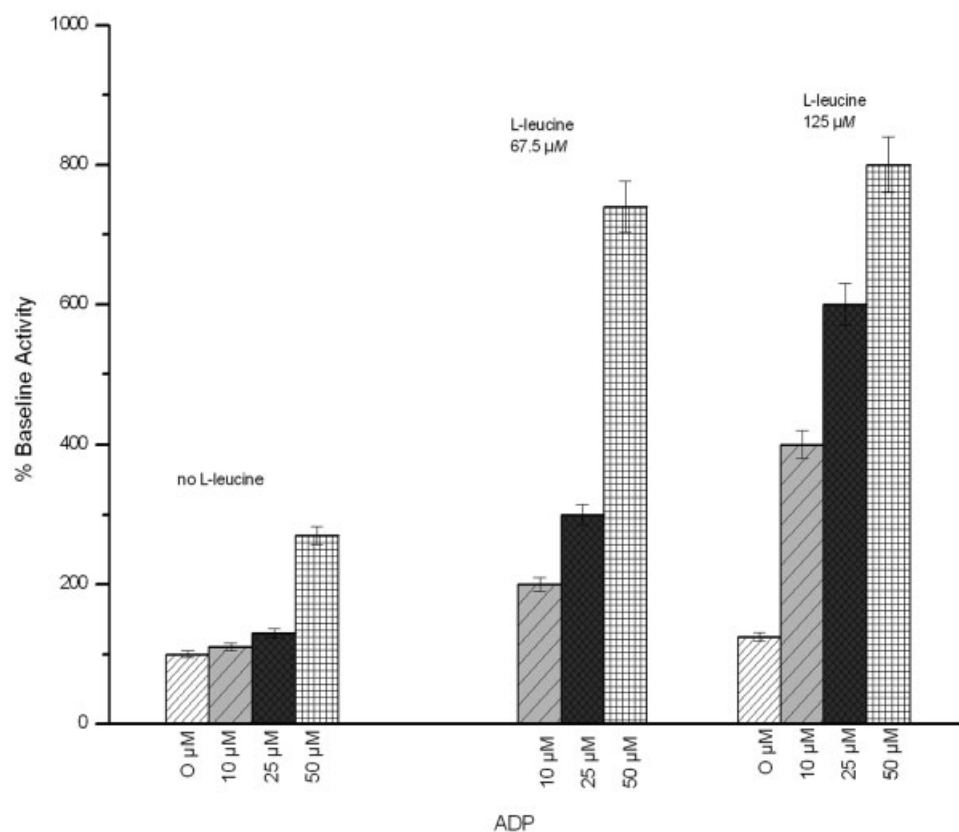


Fig. 3. Allosteric regulation of recombinant *GLUD2* derived human GDH (nerve tissue specific) by L-leucine and ADP. Enzyme activity was measured in the direction of reductive amination of α-ketoglutarate in 50 mM TEA buffer (pH 8.0). ADP concentration varied from 0 μM to 50 μM whereas L-leucine was kept constant either at 67.5 or 125 μM. Data are given as percentage of baseline enzyme activity. The latter was determined in the absence of allosteric activators. Modified from Figure 2 of our previous report (Plaitakis et al., 2000).

Fig. 4. Effect of pH on basal enzyme activities of purified recombinant R443S mutant and wild-type *GLUD1*-derived GDH. Basal specific activities were determined in the absence of allosteric effectors in 50 mM TEA buffer (pH 8.0, 7.5, or 7.0). \* $P < 0.01$  as compared to baseline values of the R443S mutant. Data are mean  $\pm$  SE (bars) from at least four determinations. Data are from Table II of our previous report (Zaganas et al., 2002).

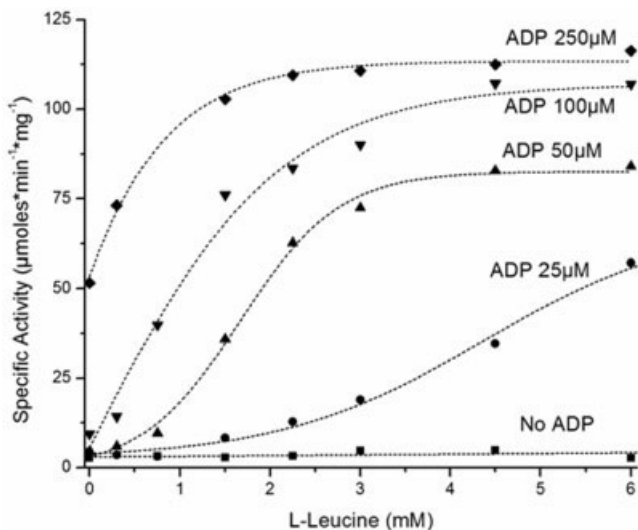
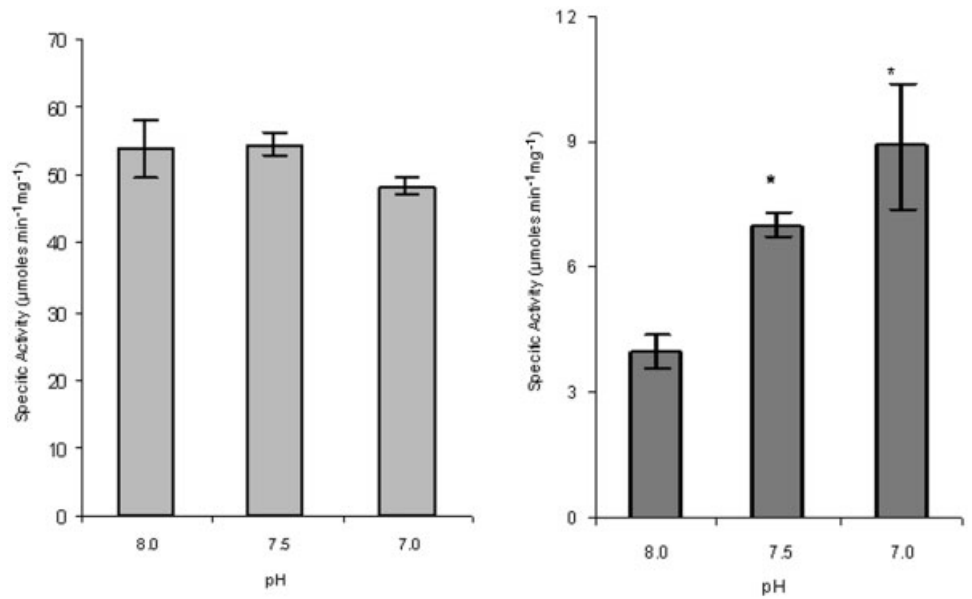


Fig. 5. Allosteric regulation curves of expressed R443S mutant by L-leucine in the presence of ADP. During each set of experiments (each represented by a different curve), ADP concentration was kept constant at 0, 25, 50, 100, and 250  $\mu\text{M}$  whereas L-leucine varied from 0 to 6 mM. Data points represent mean specific activity values from at least two experimental determinations. Modified from Figure 4 of our previous report (Zaganas et al., 2002).

compared to the wild-type *GLUD1*-derived GDH ( $\text{IC}_{50} = 0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ). In addition, the Gly456Ala mutation abolished the cooperative behavior of the enzyme, as revealed by the GTP inhibitory curves. Similar differences were obtained when GTP inhibition studies were carried out in the presence of 1.0 mM ADP. In contrast, the catalytic and kinetic properties of the Gly456Ala mutant were not altered. In addition, activa-

tion of the Gly456Ala mutant by ADP was comparable to activation of the wild-type *GLUD1*-derived GDH (Zaganas and Plaitakis, 2002).

### Structural Models of the Arg443Ser and Gly456Ala Mutants

Both Gly456 and Arg443 are within the regulatory domain of human GDH (Fig. 6). Gly456 is located at the base (“hinge region”) of the antenna, a tightly packed region of the molecule, at a point where the polypeptide chain of one subunit comes in direct contact with another (Zaganas and Plaitakis, 2002). This change could impair the ability of the antenna to mediate intersubunit communication, which is essential for allosteric inhibition of GDH by GTP (Zaganas and Plaitakis, 2002). Arg443 is located on a small helix of the descending strand of the antenna near the junction of the antenna with the “pivot” helix (Fig. 6). This helix undergoes major conformational changes during opening and closure of the catalytic cleft (Smith et al., 2002). Modeling of the Arg443Ser mutation suggests that this change could disrupt the hydrogen bond that exists between Arg443 of one subunit with side chain of Ser409 (part of the ascending strand of the antenna) of a neighboring subunit (Zaganas et al., 2002). Disruption of this bond could in turn cause closure of the active catalytic site (Fig. 6B), thus accounting for the near zero basal activity of the Arg443Ser mutant obtained under baseline conditions.

## DISCUSSION

X-ray crystal studies (Peterson and Smith, 1999; Smith et al., 2001, 2002; Banerjee et al., 2003) have shown that each of the six subunits of mammalian GDH is composed of approximately three domains: the glutamate-binding domain at the N terminus, the NAD binding domain, and the regulatory domain. The latter includes

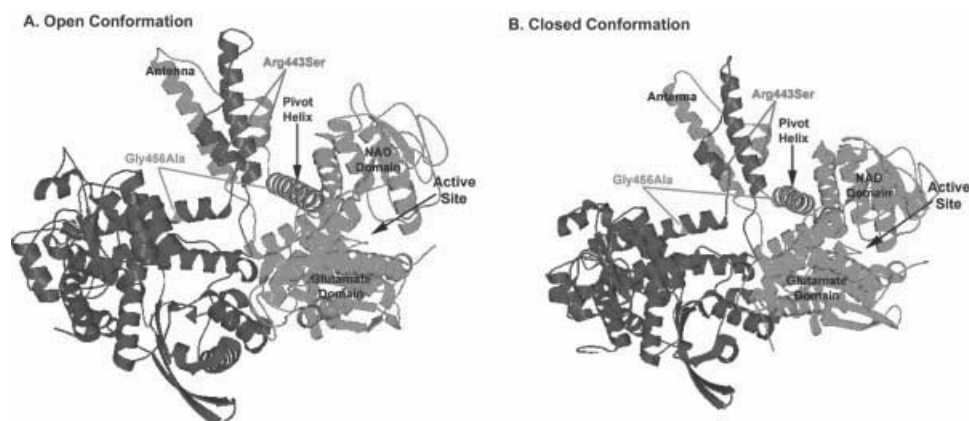


Fig. 6. Molecular model of mammalian GDH. **A:** Ribbon diagram of GDH in open conformation based on X-ray crystallographic data from bovine GDH crystallized in the absence of any ligands (PDB entry 1NR7). **B:** Ribbon diagram of GDH in closed conformation crystallized in the presence of GTP, NADH, and glutamate (PDB entry 1HWX; Peterson and Smith, 1999; Banerjee et al., 2003). For simplicity, only two of six subunits that compose the GDH hexamer are shown. Each of the two

subunits is painted in different color (green or blue). For the subunit shown in green, the NAD<sup>+</sup>-binding domain, the glutamate-binding domain, the active site, the pivot helix, and the antenna are shown. The Arg443Ser substitution is depicted in red and the Gly456Ala substitution in orange, irrespective of the subunit they belong to. The residue numbering corresponds to equivalent residues of human GDH. The ribbon diagram was created using the Pymol program.

the antenna and the pivot helix (Fig. 6). The antenna is a 48-residue protruding structure (residues 399–447) composed of an ascending 23-residue  $\alpha$ -helix and a descending strand that includes a small  $\alpha$ -helix (residues 425–448). In each GDH trimer, the antennae of the three subunits are intertwined, mediating interaction between these subunits that may be essential for allosteric regulation of this enzyme. The pivot helix (residues 449–473) is located behind the NAD-binding domain and plays a role during catalysis (Fig. 6). GTP binds in the regulatory domain between the NAD-binding domain and the antenna, whereas ADP binds under the pivot helix and behind the glutamate-binding domain (Smith et al., 2001; Banerjee et al., 2003).

During catalysis, the NAD domain undergoes a large conformational change that opens and closes the catalytic cleft (Peterson and Smith, 1999; Smith et al., 2002). Specifically, the transition from closed to open conformation is associated with rotation of the NAD domain about the long axis of the pivot helix (Fig. 6) and the antenna (Smith et al., 2002). GTP binds in the closed conformational state and prevents the opening of the catalytic cleft, whereas ADP binds to either the open or closed conformational state and facilitates the opening of the active site (Peterson and Smith, 1999; Smith et al., 2002; Banerjee et al., 2003).

As described above, the housekeeping and nerve tissue-specific isoforms of human GDH differ markedly in their basal activity, allosteric activation by ADP and L-leucine, and inhibition by GTP. In addition, they differ in their thermal stability characteristics: *GLUD2*-derived GDH is thermolabile whereas *GLUD1*-derived GDH is thermostable (Shashidharan et al., 1997; Plaitakis et al., 2000). To identify the amino acid residues responsible for these characteristics, we used site-directed mutagenesis of the *GLUD1* gene. Results showed that substitution of

Gly456 for Ala made the enzyme resistant to GTP inhibition without altering its activation by ADP and L-leucine, whereas substitution of Arg443 for Ser rendered the enzyme largely inactive (2.6% of maximal specific activity). Similarly to *GLUD2*-derived GDH, the activity of the Arg443Ser mutant could be restored fully by ADP. Additional studies by Yang et al. (2004) showed that the replacement of Arg443 by Ser is responsible for the fact that *GLUD2*-derived GDH is thermosensitive compared to the *GLUD1*-derived isoenzyme.

Although replacement of Arg443 with Ser was sufficient to make *GLUD1*-derived GDH assume the behavior of the *GLUD2*-derived isoenzyme (with respect to its low basal activity and activation by ADP), this amino acid change was not sufficient to reproduce entirely the properties of wild-type *GLUD2*-derived GDH. Firstly, the basal activity of the mutant (2.6% of maximal) was about half that of the *GLUD2*-derived enzyme (5% of maximal). Secondly, *GLUD2*-derived GDH was more sensitive to activation by ADP ( $SC_{50} = 68.51 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) than was the Arg443Ser mutant ( $SC_{50} = 383.9 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). Thirdly, L-leucine had no effect on the Arg443Ser mutant, although this amino acid was capable of restoring activity of *GLUD2*-derived GDH (Plaitakis et al., 2000).

Our functional studies showed that low ADP concentrations (0.025–0.050 mM), sufficient to double or triple the basal activity of the mutant, made the Arg443Ser mutant sensitive to activation by L-leucine. Similar synergistic effects of ADP and L-leucine have been shown for the *GLUD2*-derived isoenzyme (Plaitakis et al., 2000). The closed enzyme conformation, promoted by replacement of Arg443 with Ser (Fig. 6B), will prevent L-leucine from entering the active catalytic site, thus explaining the inability of L-leucine to activate the Arg443Ser mutant. On the other hand, the ability of ADP to open the active

site may permit L-leucine to enter this site, thus probably accounting for the synergistic effect of the two compounds.

Dissociation of *GLUD2*-derived GDH from GTP regulation and its dependency on ADP could be of importance for the function of the nervous tissue-specific isoenzyme. GTP levels are generally higher in brain than in other organs and thus GTP may not be a suitable GDH modulator in nerve tissue. In addition, GTP acts as an energy sensor for the cell being produced, along with ATP, from the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Owing to its resistance to GTP, the *GLUD2*-derived GDH should be capable of metabolizing the neurotransmitter glutamate even when the TCA cycle is producing amounts of GTP sufficient for total inhibition of the *GLUD1*-derived isoenzyme. Moreover, the ability of L-leucine to sensitize *GLUD2*-derived GDH to low concentrations of ADP could enable the nerve tissue-specific GDH to respond to small-scale changes of ADP in the absence of a substantial energy deficit. Such conditions may occur in astrocytes during excitatory transmission, as uptake of glutamate by these cells is associated with increased hydrolysis of ATP to ADP. This is required for the function of membrane pumps that become operational during this uptake (Naito and Ueda, 1985).

Further evidence supporting the role of GDH in cellular energetics came from studies on the hyperinsulinism/hyperammonia syndrome. Children with this syndrome have dominantly expressed missense mutations of GDH (Stanley et al., 1998, 2000). Most of these mutations are in the regulatory domain of the enzyme (Phe440Leu, Gln441Arg, Ser445Leu, Gly446Arg, Gly446Asp, Ser448Pro, Lys450Glu, and His454Tyr), attenuating the GTP inhibitory effect on *GLUD1*-derived GDH. This in turn leads to excessive flux of glutamate through GDH with resultant synthesis of ATP and insulin release (Stanley et al., 1998). The above residues are near the Gly456 site that determines the differences in GTP sensitivity of the *GLUD1*-derived and *GLUD2*-derived isoenzymes. Other investigators (Lee et al., 2001; Yoon et al., 2002a,b) have also employed site-directed mutagenesis on the *GLUD1* gene expressed in *E. coli* to identify Lys450 as a residue involved in GTP binding (Lee et al., 2001). Lys450 is also near the Gly456 residue. In addition, Yoon et al. (2002a,b) showed that Tyr187 and Glu279 are responsible for the efficient binding of ADP and NAD(+), respectively, to human GDH.

Our studies showed that varying the reaction buffer pH differentially affected the Arg443Ser mutant and the wild-type GDH. Although the wild-type expressed (*GLUD1*-derived) GDH yielded its highest basal and ADP-stimulated activities at pH 7.5–8.0, the Arg443Ser mutant yielded its highest basal activities at pH 7.0. In addition, the *GLUD2*-derived GDH was found to perform equally well at pH 7.0 and pH 8.0 (Plaitakis et al., 2003). As glutamate transport in astrocytes is associated with significant intracellular acidification (Bouvier et al., 1992; Poitry et al., 2000), the Arg443Ser change may

represent an adaptation that permits *GLUD2*-derived GDH to function well under the conditions that exist in astrocytes during excitatory transmission.

In brain, as in other tissues, GDH activity is found in the mitochondrial matrix being largely solubilized with Triton X-100 (Salganicoff and De Robertis, 1965). Contrary to this belief, however, Colon et al. (1986) showed that >60% of GDH activity present in a low-speed ( $480 \times g$ ) rat brain extract can be recovered in the membrane/ribosomal fraction ( $100,000 \times g$  for 1 hr). From pig liver and brain purified lysosomal membranes, Rajas and Rousset (1993) isolated a 50-kDa protein identified as GDH, which was thought to mediate lysosome-microtubule interactions. Lee et al. (1999) extracted GDH from rough endoplasmic reticulum of rat liver using 0.6 M NaCl. Di Prisco and Casola (1975) and McDaniel (1995) suggested that GDH might also be located in the nucleus. In this respect, Preiss et al. (1993) isolated from bovine liver homogenates two RNA-binding proteins identified as GDH that interacted with transcripts encoding the liver isoforms of various cytochrome C oxidase subunits.

In light of the above evidence, we sought to explore further the issue of subcellular localization of GDH using newer molecular and cellular biological tools. We found that COS7 cells transfected with *GLUD1* cDNA fused to EGFP-N3 vector showed a fluorescence distribution pattern of this chimeric protein nearly identical to that of the mitochondrial marker pDsRed2-Mito. These data on the mitochondrial localization of GDH are consistent with its role in glutamate metabolism and in cellular bioenergetics; however, we cannot exclude the possibility that part of GDH is also located in the ribosomes/microsomes of these cells. In addition, observations made on COS7 cells may not necessarily reflect the subcellular localization of GDH in nerve tissue.

Studies on cultured cells of neural origin have shown that GDH levels are higher in astrocytes (the cells that remove glutamate from the synaptic cleft) than in neurons (Zaganas et al., 2001). Cultured astrocytes exposed to 0.01–0.2 mM glutamate metabolize this amino acid via glutamine synthetase (GS) rather than via GDH. Clements et al. (1992) has estimated that during excitatory impulses, glutamate levels in the synaptic cleft can transiently reach 1.2 mM. McKenna et al. (1996) and Sonnewald et al. (1997) reported that the fraction of glutamate oxidized through the TCA cycle increased substantially (up to 50% of total) when extracellular glutamate levels were raised to 0.5 mM. Entry of glutamate carbon skeletons into the cycle was not affected by the transaminase inhibitor aminooxyacetic acid, indicating that oxidative deamination of glutamate via GDH was the major route for  $\alpha$ -keto-glutarate formation. Because GS function requires ATP and ammonia, and because glutamate oxidation via GDH and the TCA cycle generates both compounds, the parallel function of the two pathways could help astrocytes to maintain their energy charge and ammonia homeostasis while they handle large amounts of glutamate.

In summary, our studies on COS7 transfected with the *GLUD1* gene revealed that the expressed human GDH localizes in mitochondria of these cells. These results are consistent with the role of this enzyme in glutamate metabolism and cellular energetics. In addition, study of the molecular basis of human GDH regulation revealed that nerve tissue-specific GDH has adapted to function optimally under conditions that prevail in astrocytes during excitatory neurotransmission.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a training grant (EPEAEKII-Herakleitos) from the Ministry of Education of Greece and the European Community (to V.M.) and by the Association for Research and Treatment of Neurologic Disorders of Crete <<EY ZHN>>. We are grateful to Dr. Domna Karageorgos for her assistance in performing the subcellular localization studies and Giorgos Vrentzos and Irene Skoula for their help.

### REFERENCES

- Amuro N, Ooki K, Ito A, Goto Y, Okazaki T. 1989. Nucleotide sequence of rat liver glutamate dehydrogenase cDNA. *Nucleic Acids Res* 17:2356.
- 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* 18:305–318.
- Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. 2003. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* 42:3446–3456.
- Bouvier M, Szatkowski M, Amato A, Attwell D. 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 360:471–474.
- Cho SW, Lee J, Choi SY. 1995. Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. *Eur J Biochem* 233:340–346.
- Clements JD, Lester RA, Tong CE, Jahr CE. 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498–1501.
- Colon AD, Plaitakis A, Perakis A, Berl S, Clarke DD. 1986. Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem* 46:1811–1819.
- di Prisco G, Casola L. 1975. Detection of structural differences between nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases by the use of immunoadsorbents. *Biochemistry* 4:4679–4683.
- Farinelli SE, Nicklas WJ. 1992. Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J Neurochem* 58:1905–1915.
- Gylfe E. 1976. Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat* 13:20–24.
- Hogeboom GH, Schneider WC. 1953. Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem* 204:233–238.
- Julliard JH, Smith EL. 1979. Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. *J Biol Chem* 254:3427–3438.
- Lee W, Shin S, Cho SS, Park J. 1999. Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biochem* 76:244–253.
- Lee EY, Yoon HY, Ahn JY, Choi SY, Cho SW. 2001. Identification of the GTP binding site of human glutamate dehydrogenase by cassette mutagenesis and photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 276:47930–47936.
- 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.
- McDaniel HG. 1995. Comparison of the primary structure of nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Arch Biochem Biophys* 319:316–321.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. 1996. Exogenous concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* 66:386–393.
- Moon K, Smith EL. 1973. Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. 8. Peptides produced by specific chemical cleavages; the complete sequence of the protein. *J Biol Chem* 248:3082–3088.
- Naito S, Ueda T. 1985. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 44:99–109.
- Nakatani Y, Schneider M, Banner C, Freese E. 1988. Complete nucleotide sequence of human glutamate dehydrogenase cDNA. *Nucleic Acids Res* 16:6237.
- Patel AJ, Hunt A, Gordon RD, Balazs R. 1982. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Brain Res* 256:3–11.
- Peterson P, Smith TJ. 1999. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostericity. *Structure* 7:769–782.
- Plaitakis A, Metaxari M, 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.
- Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. 2003. Study of structure–function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (*GLUD2*) isoenzyme. *Neurochem Int* 43:401–410.
- Plaitakis A, Zaganas I. 2001. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J Neurosci Res* 66:899–908.
- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish P, Tsakopoulos M. 2000. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci* 20:1809–1821.
- Preiss T, Hall AG, Lightowers RN. 1993. Identification of bovine glutamate dehydrogenase as an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 268:24523–24526.
- Rajas F, Rousset B. 1993. A membrane-bound form of glutamate dehydrogenase possesses an ATP-dependent high-affinity microtubule-binding activity. *Biochem J* 295:447–455.
- Rothe F, Wolf G, Schunzel G. 1990. Immunohistochemical demonstration of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 39:419–429.
- Salganicoff F, De Robertis E. 1965. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and gamma-aminobutyric acid cycles in rat brain. *J Neurochem* 12:287–309.
- Sener A, Malaisse WJ. 1980. L-Leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288:187–189.
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. 1981. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5460–5464.
- Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. 1997. Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J Neurochem* 68:1804–1811.
- Shashidharan P, Michaelides TM, Robakis NK, Kretsovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. 1994. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem* 269:16971–16976.
- Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. 1975. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer PD, editor. *The enzymes*. Vol 11. New York: Academic Press. p 293–367.
- Smith EL. 1979. The evolution of glutamate dehydrogenases and a hypothesis for the insertion or deletion of multiple residues in the interior of polypeptide chains. *Proc Am Phil Soc* 123:73–84.

- Smith T, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley C. 2002. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J Mol Biol* 318:765–777.
- Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. 2001. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J Mol Biol* 307:707–720.
- Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21:56–63.
- Stanley CA, Fang J, Kutyna K, Hsu BY, Ming JE, Glaser B, Poncz M. 2000. Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: predominance of mutations in exons 11 and 12 of the glutamate dehydrogenase gene. *Diabetes* 49:667–673.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, 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.
- Tzimogiorgis G, Adamson MC, Kozak CA, Moschonas NK. 1991. Chromosomal mapping of glutamate dehydrogenase gene sequences to mouse chromosomes 7 and 14. *Genomics* 10:83–88.
- Waniewski R, Martin D. 1986. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 47:304–313.
- Yang SJ, Huh JW, Hong HN, Kim TU, Cho SW. 2004. Important role of Ser443 in different thermal stability of human glutamate dehydrogenase isozymes. *FEBS Lett* 562:59–64.
- Yoon HY, Cho EH, Kwon HY, Choi SY, Cho SW. 2002a. Importance of glutamate 279 for the coenzyme binding of human glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 277:41448–41454.
- Yoon HY, Lee EY, Cho SW. 2002b. Cassette mutagenesis and photoaffinity labeling of adenine binding domain of ADP regulatory site within human glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* 41:6817–6823.
- Zaganas I, 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 behavior of the enzyme. *J Biol Chem* 277:26422–26428.
- Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M, Plaitakis A. 2002. Substitution of Ser for Arg443 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* 277:46552–46558.
- Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. 2001. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res* 66:909–913.





# Properties and Molecular Evolution of Human *GLUD2* (Neural and Testicular Tissue-Specific) Glutamate Dehydrogenase

Konstantinos Kanavouras, Vasileios Mastorodemos, Nikolas Borompokas, Cleanthe Spanaki, and Andreas Plaitakis\*

Department of Neurology, University of Crete School of Health Sciences, Section of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

Glutamate dehydrogenase (GDH) is an enzyme central to the metabolism of glutamate that also plays a role in cellular energetics. In the human, GDH exists in a housekeeping isoenzyme (hGDH1) encoded by the *GLUD1* gene and a neural and testicular tissue-specific isoform (hGDH2) encoded by the *GLUD2* gene. There is evolutionary evidence that the *GLUD1* was retroposed to the X chromosome in the ape ancestor (<23 million years ago), where it gave rise to *GLUD2* through random mutations and directional selection. In the human, the two mature GDH isoproteins are highly homologous, differing in only 16 of their 505 amino acid residues. Functional analyses of highly purified recombinant wild-type hGDH2 revealed that this adaptive evolution dissociated the enzyme from GTP control, permitted regulation almost entirely by ADP and/or L-leucine, and fine-tuned its activity to the relatively low cellular pH that occurs in synaptic astrocytes during excitatory transmission. Study of structure-function relationships, using site-directed mutagenesis of *GLUD1* at single sites differing from *GLUD2*, showed that the Arg443Ser and the Gly456Ala change reproduced some, but not all, of the properties of hGDH2. In addition, we created a double hGDH1 mutant that had both Arg443Ser and Gly456Ala in the same polypeptide chain. Functional analyses revealed that the doubly mutated enzyme did not acquire all the characteristics of the wild-type hGDH2. Hence, additional amino acid changes, acting in concert with Arg443Ser and Gly456Ala, ought to be responsible for the unique properties of the brain-specific human isoenzyme. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** Arg443Ser/Gly456Ala mutant; allosteric regulation; stability

Glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.3.) catalyzes the oxidative deamination of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonia with NAD and/or NADP as cofactors (Smith et al., 1975). Unlike the GDH of bacteria, plants and fungi, the enzyme of higher organisms is regulated with diverse compounds acting as allosteric effectors. ADP and L-leucine act as allosteric stimulators and GTP, ATP, and NADH as allosteric inhibitors.

Smith (1979) proposed, based on this regulation pattern, that tissue GDH activity is controlled by the need of the cell for ATP as an energy source.

In mammalian brain, GDH might not function in reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate, although the thermodynamic equilibrium of the enzyme favors glutamate synthesis. This probably relates to the high  $K_m$  of GDH for ammonia and to the high NAD/NADH ratio that exists in brain (McKenna et al., 2006). Although aspartate aminotransferase appears to provide the main pathway for interconversion of  $\alpha$ -ketoglutarate to glutamate in the brain (Shen, 2005), there is evidence that the GDH anaplerotic pathway (oxidative deamination of glutamate) assumes importance when energy production from glucose metabolism or from other sources declines (McKenna et al., 1996).

In peripheral tissues, such as the pancreatic  $\beta$ -cells, GDH is under tonic inhibition by GTP, with ADP and/or L-leucine being able to counteract this inhibition in a concentration-dependent manner. The role of GDH in energy production in these cells is underscored by observations showing that regulatory mutations of GDH that attenuate GTP inhibition lead to excessive insulin release through increased ATP production (Stanley et al., 1998). Recently, a novel mechanism of GDH regulation that involves reversible ADP ribosylation of the enzyme in the mitochondria (Herrero-Yraola et al., 2001) has emerged. In this regard, Haigis et al. (2006) reported that,

Contract grant sponsor: Ministry of Education of Greece and the European Community, Second Operational Program for Education and Initial Vocational Training, EPEAEK II-HERAKLEITOS (to V.M.); Contract grant sponsor: European Community and the Ministry of Development/General Secretariat for Research and Technology; Contract grant number: PENED 2003/03ED576 (to N.M.); Contract grant sponsor: Association for Research and Treatment of Neurologic Disorders of Crete "EY ZHN."

\*Correspondence to: Andreas Plaitakis, MD, PhD, Department of Neurology, University of Crete School of Health Sciences, Section of Medicine, Heraklion, Crete, Greece. E-mail: plaitak@med.uoc.gr

Received 2 October 2006; Revised 16 November 2006; Accepted 20 November 2006

Published online 25 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21197

in insulinoma cells, loss of SIRT4, a mitochondrial enzyme that down-regulates GDH activity through ADP ribosylation, leads to excessive insulin release resulting from unduly enhanced ATP production.

In the human, GDH exists in hGDH1 and hGDH2 isoforms encoded by the *GLUD1* and the *GLUD2* genes, respectively, (Mavrothalassitis et al., 1988; Shashidharan et al., 1994). *GLUD1* is an intron-containing gene located on 10q that is expressed widely (housekeeping), whereas *GLUD2* is an X-linked intronless gene expressed in retina, brain, and testicles (Shashidharan et al., 1994). The two human GDH-specific genes share an extensive homology, each encoding a 558-amino-acid polypeptide (including a 53-amino-acid leader sequence). It has been suggested (Shashidharan et al., 1997) that the *GLUD2* originated from the *GLUD1* gene by reverse mRNA transcription and insertion into the X chromosome (retroposition). Burki and Kaessmann (2004) recently reported that *GLUD2* also occurs in other primates and presented evolutionary evidence that the *GLUD1* gene was indeed retroposed to the X chromosome in the ape ancestor less than 23 million years ago.

The housekeeping GDH has been extensively characterized via purified preparations of endogenous human liver hGDH1 (Zaganas and Plaitakis, 2002) or of recombinant hGDH1 obtained by expression of the *GLUD1* gene in expression systems (Cho et al., 2001; Lee et al., 2001; Zaganas and Plaitakis, 2002; Zaganas et al., 2002; Fang et al., 2002; Yoon et al., 2002a,b). On the other hand, the neural and testicular tissue-specific human enzyme (hGDH2) has been studied only in crude or partially purified extracts of Sf9 cells expressing this protein (Shashidharan et al., 1997; Plaitakis et al., 2000, 2003). These investigations revealed that the allosteric regulation of hGDH2 differed markedly from that of hGDH1 (Plaitakis et al., 2000).

To determine the molecular basis of these properties, we have employed site-directed mutagenesis of the *GLUD1* gene at sites that differ from the corresponding residues of the *GLUD2* (Zaganas and Plaitakis, 2002; Zaganas et al., 2002; Plaitakis et al., 2003; Mastorodemos et al., 2005). Functional analyses of single mutants showed that replacement of Gly456 by Ala rendered hGDH1 resistant to GTP inhibition, without altering its baseline activity. In contrast, substitution of Ser for Arg443 rendered the enzyme virtually inactive and abrogated its activation by L-leucine in the absence of ADP. These changes cannot explain the functional characteristics of hGDH2, which requires lower ADP levels for activation and is amenable to activation by L-leucine in the absence of ADP.

Here we tested whether Arg443Ser and Gly456Ala acting in concert are capable of reproducing the unique properties of hGDH2. For this, we created a double mutant that has both amino acid changes in the same polypeptide chain. The mutant protein, obtained by expression of the mutagenized cDNA in Sf21 cells, was purified and characterized. In addition, we determined the properties of the wild-type hGDH2 by using highly

purified preparations of recombinant protein (obtained by expression of a *GLUD2* cDNA in Sf21 cells) and compared them with those of the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant. Additional comparisons were made with the Arg443Ser single mutant and/or with the wild-type hGDH1, both of which were obtained in highly purified forms by the same methods. Results obtained were also considered with respect to the molecular evolution and adaptation of the neural and testicular tissue-specific human isoenzyme.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

*Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells and the baculovirus expression vectors were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). The media for the Sf21 insect cells and fetal calf serum were obtained from Life Technologies. Modified baculovirus (BaculoGold) was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). NADPH, ADP, and GTP (lithium salt) were from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Phenylsepharose High Performance was from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden), and Hydroxyapatite Bio-Gel HT was from Bio-Rad (Hercules, CA). Gel isolation of PCR products was performed with the QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), and ligation to pVL1393 expression vector was performed with the Fast-Link DNA Ligation Kit (Epicentre, Madison, WI). Sequencing was performed using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Primers were purchased from MWG-Biotech and restriction endonucleases were purchased from New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA). Purification of the amplified products was performed by using the Concert Rapid PCR (Gibco, Grand Island, NY) and/or the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc.).

### Site-Directed Mutagenesis

A *GLUD1* cDNA, cloned in the pBSKII<sup>+</sup> vector, has been mutagenized at the sites shown in Figure 1 (Zaganas and Plaitakis, 2002, Zaganas et al., 2002). To create the double mutant Arg443Ser/Gly456Ala, a *GLUD1* cDNA with the Gly456Ala mutation underwent a second-step mutagenesis in which the arginine at position 443 was replaced by serine. For this, we used the Gene Editor mutagenesis system as previously described (Zaganas and Plaitakis, 2002). The plasmids were then amplified by T4 DNA polymerase (nicks were ligated by T4 DNA ligase) and used to transform the BMH 71-18 mutS strain of *Escherichia coli*. The cells were grown in the presence of an appropriate antibiotic selection mix; plasmid DNA was isolated and used to transform the JM109 strain of *E. coli*. The mutated *GLUD1* cDNAs were cleaved from the pBSKII<sup>+</sup> vector and ligated to the baculovirus transfer vector pVL1393, and the ligation products were used to transform the JM109 strain of *E. coli*. Proper orientation of the insert was verified by sequencing. The subcloned doubly mutated *GLUD1* gene was bidirectionally sequenced in its entire length to confirm the presence of the desired mutations and to exclude incidental DNA alterations induced during the above-described mutagenesis steps.

	415	443	456	470
<b>Human GDH1</b>	ERDSNYHLLMSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDRI SGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTA			
<b>R443S</b>	. . . . M . . . . . S . . . . . G . . . . . R .			
<b>R443S/G456A</b>	. . . . M . . . . . S . . . . . A . . . . . R .			
<b>Human GDH2</b>	ERDSNYHLLLSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDSI SGASEKDIVHSALAYTMERSARQIMHTA			

Fig. 1. Schematic representation of the C-terminal region of the wild-type hGDH1 and hGDH2, the Arg443Ser single mutant, and the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant. Dots indicate amino acid residues that are identical in hGDH1 and hGDH2.

### Expression of Wild-Type and Mutant Proteins

Wild-type and mutant cDNAs were expressed in Sf21 cells by using the baculovirus expression system as previously described (Shashidharan et al., 1994, 1997). Cells of the insect *Spodoptera frugiperda* (Sf21) were cotransfected with the plasmid DNA (pVL1393 vector containing the *GLUD1* insert or mutants and pVL1392 vector containing the *GLUD2* insert) and modified baculovirus DNA (BaculoGold; BD Pharmingen) and incubated at 27°C for 4–5 days. The cultured cells were harvested 5 days postinfection and used for extracting the recombinant GDH proteins.

### GDH Purification

GDH was purified from Sf21 cell extracts by modification of a previously described method (Colon et al., 1986) that involves ammonium sulfate (AS) fractionation, hydrophobic interaction, and hydroxyapatite chromatography. The cultured cells were homogenized (20–25% w/v) in 10 mM Tris HCl, pH 7.4, buffer containing 0.1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. A 30–65% AS cut was resuspended in 50 mM Tris HCl, pH 6.0, buffer containing 15% AS, loaded on a column packed with Phenylsepharose High Performance, and equilibrated with the same buffer. The column was eluted with a double gradient of decreasing concentration AS (15–0%) and increasing concentration of ethylene glycol (0–90%). Eluted GDH was dialyzed against various changes of 15% AS in 50 mM Tris HCl, pH 6.0, and passed again through the same column. Fractions containing enzyme activity were dialyzed (at 4°C) against several changes of 100 mM Tris HCl, 200 mM KCl, pH 7.15, buffer and loaded into the hydroxyapatite column (Colon et al., 1986). The column was eluted with a gradient of 50–600 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 (instead of pH 7.4 as used by Colon et al., 1986). Purified GDH was used for enzyme assays and for studying its electrophoretic mobility by SDS-PAGE via the Laemmli procedure. Protein concentration of samples was determined densitometrically on stained SDS-PAGE gels, with bovine serum albumin as a standard. Wild-type and mutated hGDH proteins were produced and studied in parallel.

### Enzyme Assays and Allosteric Regulation Studies

GDH activity was assayed spectrophotometrically (at 340 nm) in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate (Plaitakis et al., 2000). The standard reaction mixture of

1 ml contained 50 mM triethanolamine (TEA) pH 8.0 buffer, 2.6 mM EDTA, 100 mM ammonium acetate, 100  $\mu$ M NADPH, and 0.5–1  $\mu$ g of purified enzyme, unless otherwise indicated. Enzyme reaction was initiated by adding  $\alpha$ -ketoglutarate to 8 mM. All assays were performed at 25°C except as specified. Initial rates (enzyme velocity during the first 30 sec after initiation of the reaction) were recorded. The pH curves for hGDH1 and hGDH2 were obtained by performing enzyme assays in the presence of 1 mM ADP in the standard reaction buffer, the pH of which varied from 6.0 to 9.0. Regulation of the human recombinant wild-type and mutant GDHs by allosteric stimulators was studied by adding to the standard reaction mixture ADP (0.025–1.0 mM final concentrations) or L-leucine (0.15–10 mM final concentrations) while keeping the other substrates constant. To test the effect of ADP on L-leucine activation, we also carried out two additional sets of experiments. In the first, we added L-leucine at various concentrations ranging from 0.15 to 10.0 mM to the standard reaction mixture that contained 0.025 mM ADP. In the second set, L-leucine (0.15–10.0 mM) was added to a standard reaction buffer that contained 0.05 mM ADP. GTP inhibition was studied by adding this compound in various concentrations to the standard reaction mixture, either in the absence or in the presence of 0.1 or 1.0 mM ADP.

Kinetic analyses were performed to determine the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for  $\alpha$ -ketoglutarate, ammonia, and glutamate. Separate sets of experiments were performed for each purified enzyme in the presence of 1 mM ADP. In the first set,  $\alpha$ -ketoglutarate varied from 0.4 to 10 mM while the other substrates were kept constant. In the second set, ammonium acetate varied from 10 to 100 mM. To determine the  $K_m$  for glutamate, GDH activity was also measured in the direction of glutamate oxidation in a mixture containing 50 mM triethanolamine pH 8.0 buffer, 2.6 mM EDTA, 1.4 mM NADP, and 1 mM ADP (Hussain et al., 1989). About 5  $\mu$ g of enzyme protein was used for each assay. The reaction was initiated by addition of glutamate from 2 to 40 mM.

### Heat Inactivation Studies

For the heat inactivation studies, samples containing 40–60  $\mu$ g/ml purified enzyme and 4 mg/ml bovine serum albumin were prepared in 100 mM (or 300 mM) sodium phosphate buffer, pH 6.8 or 7.4. The samples were incubated in a shaking water bath at 47.5°C. Aliquots (10  $\mu$ l) were removed

at specific time intervals and assayed immediately in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate, as described above, in the presence of 1 mM ADP.

### Statistical Analyses

All statistical analyses of the data and plotting were performed in the Origin program (MicroCal Software, Northampton, MA). Differences in kinetic and allosteric behavior were evaluated by using Student's *t*-test. Kinetic constants were calculated by hyperbolic regression analysis, based on the Michaelis-Menten equation, as described by Wilkinson (1961).  $IC_{50}$  and  $SC_{50}$  values were determined graphically. The Hill plot coefficients for GTP inhibition were calculated according to the method discussed by Cornish-Bowden (1979).

## RESULTS

### Production and Purification of Wild-Type and Mutant hGDHs

Expression of the wild-type and mutant cDNAs in Sf21 cells produced GDH proteins capable of catalyzing the reversible interconversion of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate (in the presence of 1 mM ADP) using either NAD(H) or NADP(H) as cofactors. Because the endogenous GDH of the host insect cells shows an absolute specificity for NADH (Shashidharan et al., 1994), all enzyme assays were performed in the presence of NADP(H) only. This eliminated all background enzyme activity related to the GDH of the insect cells.

The purification method used here yielded more than 40% of the GDH activity present in the Sf21 cell extracts. Lowering the pH of the hydroxyapatite column elution buffer from pH 7.40 to pH 6.80, as was done here, markedly improved the expressed enzymes' stability. Thus, when the purified enzymes were kept in this buffer at 5°C, they maintained their catalytic activity for up to several months of such storage. SDS-PAGE analysis of hydroxyapatite column fractions containing GDH activity revealed that the enzymes were more than 95% pure, forming a single band ( $\sim 56$  kDa) on SDS-PAGE. As shown in Figure 2, hGDH1 migrated slightly below hGDH2 and the mutants.

### Catalytic Properties of hGDH2 and the Arg443Ser/Gly456Ala Double Mutant

Functional analyses of hGDH2, using about 1.0  $\mu$ g purified protein/ml reaction buffer, revealed that the brain-specific isoenzyme had low catalytic activity ( $4 \mu\text{moles min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , or 2.5% of its maximal) in the absence of ADP or L-leucine (Fig. 3). In contrast, under the same conditions, the housekeeping GDH showed about 40% of its maximal activity. Experiments in which the amount of purified hGDH2 added to 1 ml reaction buffer varied from 0.5  $\mu$ g up to 10  $\mu$ g revealed that protein concentration correlated significantly with specific basal activity ( $R = 0.9397$ ,  $P < 0.001$ ). Expressed as a percentage of maximal activity, the basal activity of the hGDH2 ranged from 1% (at 0.5  $\mu$ g protein/ml) to about 12% (at 10  $\mu$ g protein/ml; Fig. 3). When the tempera-



Fig. 2. Eight percent SDS-PAGE analysis of purified human GDHs. hGDH1 represents expressed wild-type GLUD1-derived GDH and hGDH2 expressed wild-type GLUD2-derived GDH. R443S represents a single mutant of hGDH1 that carries the Arg443Ser mutation, whereas R443S/G456A represents a double mutant of hGDH1 that carries the Arg443Ser and the Gly456Ala mutations in the same polypeptide chain.

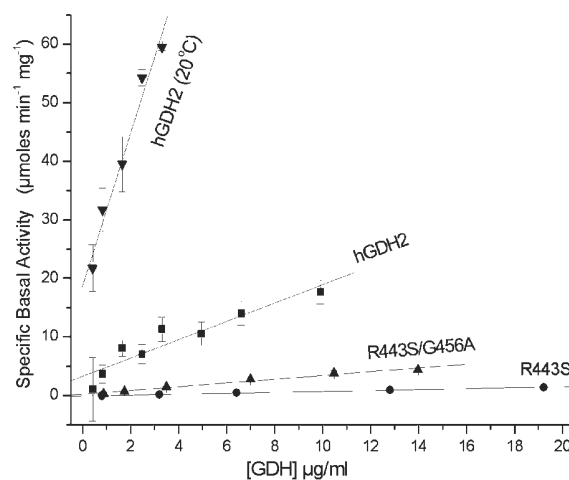


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on basal specific activities of wild-type and mutant hGDHs. Assays were performed in the absence of allosteric effectors in the standard reaction mixture at 25°C, except as indicated. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (bar) of three to six experimental determinations. The *R* correlation coefficient and the *P* (probability that *R* is zero) values of the linear regression were calculated in the Origin program. The slope ( $\pm$ SE) of the regression line is given below as the rate of change of enzyme specific activity (in  $\mu\text{moles min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) per microgram increase in protein concentration: slope for hGDH2 (20°C)  $13.025 \pm 1.267$  ( $R = 0.9861$ ,  $P = 0.002$ ); slope for hGDH2 (25°C)  $1.564 \pm 0.232$  ( $R = 0.9397$ ,  $P < 0.001$ ); slope for R443S/G456A (25°C)  $0.316 \pm 0.024$  ( $R = 0.9890$ ,  $P < 0.001$ ); slope for R443S (25°C)  $0.077 \pm 0.002$  ( $R = 0.9986$ ,  $P < 0.0001$ ).

**TABLE I. Kinetic Properties of Expressed Wild-Type hGDH1 and hGDH2 and of the R443S/G456A Double Mutant\***

	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)		
		$\alpha$ -Ketoglutarate	Ammonia	Glutamate
hGDH1	161.9	$2.0 \pm 0.2$ (20)	$13.4 \pm 0.7$ (20)	$12.4 \pm 0.7$ (18)
hGDH2	159.1	$2.1 \pm 0.3$ (18)	$17.1 \pm 2.0$ (20)	$10.7 \pm 0.8$ (19)
R443S/G456A	145.7	$1.5 \pm 0.2$ (21)	$22.2 \pm 6.6$ (19)	$10.8 \pm 1.2$ (20)

\*Kinetic studies were performed as described in Materials and Methods by varying the concentration of the substrate under study while keeping that of the other substrates constant. At each substrate concentration studied, three or more experimental determinations were performed. Kinetic constants were calculated by hyperbolic regression analysis using the Origin program. The  $V_{\max}$  values represent  $\mu\text{moles NADPH}$  oxidized per milligram protein per minute. The  $K_m$  values are means  $\pm$  SEM. Numbers in parentheses represent the total number of experimental determinations obtained for each substrate.

ture of the reaction buffer was lowered from 25°C to 20°C, the specific basal activity of hGDH2 (at 1  $\mu\text{g}$  protein/ml) increased eightfold (32  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  or 20.1% of maximal). At this temperature, the slope of the regression line became substantially steeper (Fig. 3). On the other hand, the specific basal activity of hGDH1 did not show concentration dependence (data not shown).

Functional analyses of the single Arg443Ser mutant (using 1.0  $\mu\text{g}$  purified protein/ml) revealed no measurable basal activity. Higher amounts of the mutant protein (up to 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) led to measurable basal activities, with protein concentration correlating significantly with specific basal activity ( $R = 0.9986$ ;  $P < 0.0001$ ). However, the slope of the regression line was relatively flat (Fig. 3). Functional analyses of the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant (using 1.0  $\mu\text{g}$  purified protein/ml) revealed a specific basal activity that was about 10-fold lower (0.35  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  or 0.25% of its maximal) than that of hGDH2 (4  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , or 2.5% of its maximal;  $P < 0.01$ ) but slightly higher than that of the Arg443Ser single mutant (Fig. 3). Again, there was a significant correlation between the amount of purified double mutant protein added to the reaction mixture and its specific basal activity ( $R = 0.9890$ ,  $P < 0.001$ ), the slope of the regression line also being flatter than that for hGDH2 (Fig. 3). Kinetic analyses showed that the  $K_m$ s for  $\alpha$ -ketoglutarate, ammonia, and glutamate for the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant and the wild-type hGDH2 and hGDH1 were comparable (Table I).

### Allosteric Properties of hGDH2 and the Arg443Ser/Gly456Ala Double Mutant

ADP (0.025–1.0 mM) induced a concentration-dependent activation of wild-type hGDHs that was proportionally much greater for hGDH2 (up to 2,500%) than for hGDH1 (up to 235%; Fig. 4). In the presence of 1.0 mM ADP, the  $V_{\max}$  of hGDH2 was comparable to that of hGDH1 (Table I). However, the  $SC_{50}$  for ADP was about threefold higher for hGDH2 ( $58.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ) than for hGDH1 ( $17.0 \pm 3.3 \mu\text{M}$ ). Also, the activity of the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant was fully restored by 1.0 mM ADP, with its specific maximal ac-

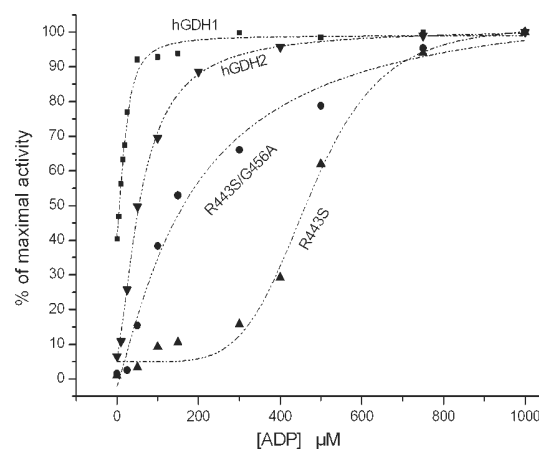


Fig. 4. Comparison of ADP activation curves of the wild-type hGDH1 and hGDH2, the R443S single mutant, and the R443S/G456A double mutant. Data points are mean values from at least three experimental determinations and are expressed as percentage of maximal activity. GDH activity was measured in the direction of reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate in TRA buffer, pH 8.0, in the presence of increasing concentrations of ADP as described in Materials and Methods. The activator  $SC_{50}$  values were calculated from the curves in the Origin program and are shown below for each expressed enzyme:  $SC_{50}$  hGDH1 =  $17.0 \pm 3.3 \mu\text{M}$  ADP;  $SC_{50}$  hGDH2 =  $58.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$  ADP;  $SC_{50}$  R443S =  $474.3 \pm 17.7 \mu\text{M}$  ADP;  $SC_{50}$  R443S/G456A =  $188.4 \pm 50.7 \mu\text{M}$  ADP.

tivity at this ADP concentration reaching that of hGDH1 and hGDH2 (Table I). However, detailed functional analyses revealed that the double mutant was less sensitive to activation by ADP ( $SC_{50} = 188.4 \pm 50.7 \mu\text{M}$ ) than the wild-type hGDH2 ( $SC_{50} = 58.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ) but substantially more sensitive than the Arg443Ser single mutant ( $SC_{50} = 474.3 \pm 17.7 \mu\text{M}$ ; Fig. 4).

L-leucine (0.15–10 mM) also induced a proportionally greater stimulation of hGDH2 (up to 1,358%) than of hGDH1 (up to 161%). In contrast to ADP activation, the  $SC_{50}$  for L-leucine was similar for both the wild-type hGDH1 ( $0.98 \pm 0.05 \text{ mM}$ ) and the wild-type hGDH2 ( $1.1 \pm 0.1 \text{ mM}$ ; Table II). The presence of low concentrations of ADP sensitized both human iso-

**TABLE II. L-Leucine Activation of Wild-Type hGDH1 and hGDH2\***

	hGDH1	hGDH2
	L-leucine SC <sub>50</sub> (mM)	L-leucine SC <sub>50</sub> (mM)
No ADP	0.979 ± 0.055	1.092 ± 0.095
25 μM ADP	0.493 ± 0.123	0.455 ± 0.070
50 μM ADP	0.393 ± 0.082	0.362 ± 0.079

\*L-leucine stimulation of hGDH1 and hGDH2 was performed as described in Materials and Methods, by measuring the activity of the enzymes in the absence or presence of increasing concentrations of L-leucine (0.15–10.0 mM). SC<sub>50</sub> values are means of at least three determinations (±SEM). They were calculated from the activation curves drawn with the use of the Origin program.

zymes to the stimulatory effects of L-leucine. At 0.025 mM and 0.05 mM ADP, the L-leucine SC<sub>50</sub> for the wild-type hGDH2 was reduced to 0.49 mM and 0.36 mM, respectively. Similar values were obtained for the hGDH1 (Table II).

Study of the GTP effect on enzyme activity revealed that nonactivated hGDH2 was resistant to GTP inhibition, whereas nonactivated hGDH1 was potently inhibited by this compound (Table III). Addition of ADP significantly modified GTP interaction with the hGDH1 and hGDH2. As shown in Table III, the presence of ADP increased the GTP IC<sub>50</sub> for hGDH1 from 0.3 μM (baseline) to 1.6 μM (at 0.1 mM ADP) and to 18.5 μM (at 1.0 mM ADP), respectively. In contrast, the GTP IC<sub>50</sub> for hGDH2 decreased from 78.5 μM (baseline) to 23.9 μM at 0.1 mM ADP, but it increased to 166.8 μM at 1.0 mM ADP. Under all conditions studied, hGDH2 proved substantially less sensitive to GTP than hGDH1. The Hill plot analysis showed that hGDH1 and hGDH2 differed significantly in their cooperativity profile. Whereas hGDH1 showed a positive cooperativity (Hill coefficient >1.0), the behavior of hGDH2 was noncooperative or it showed negative cooperativity (Table III). The Arg443Ser/Gly456Ala double mutant was also found to be resistant to GTP inhibition, as is hGDH2 (Table III).

### Effect of pH on Enzyme Velocity

Study of the effect of pH on enzyme activity revealed that the pH curve for wild-type hGDH2 was shifted toward relatively lower pH values than the curve for wild-type hGDH1. As depicted in Figure 5, hGDH2 showed its maximal specific activity at pH 7.5, whereas hGDH1 displayed its maximal specific activity at pH of 7.75–8.0 (Fig. 5).

### Sensitivity to Thermal Inactivation

The relative resistance of hGDH2 to thermal inactivation was determined by incubation of the enzyme at 47.5°C with different buffer compositions and pHs. As shown in Figure 6, heat denaturation, carried out in 100 mM phosphate buffer, pH 6.8, proceeded more quickly for hGDH2 (half-life 38 min) than for hGDH1 (half-life

348 min). Under these conditions, the Arg443Ser mutant was rapidly denaturated (half-life 5 min). On the other hand, the thermolability of the Arg443Ser/Gly456Ala double mutant (half-life 16.5 min) was between that of wild-type hGDH2 and that of the Arg443Ser single mutant (Fig. 6). Heat inactivation experiments, by varying the molarity of the phosphate, pH 6.80, revealed that high concentrations of phosphate (300 mM) had a protective effect on the thermal denaturation of both wild-type hGDHs, this effect being more pronounced for hGDH2. Thus, whereas the half-life of hGDH2 increased approximately 13-fold (from 38 min in 100 mM phosphate to 511 min in 300 mM phosphate), the half-life of hGDH1 increased approximately twofold (from 348 min in 100 mM phosphate to 728 min in 300 mM phosphate).

## DISCUSSION

Here we studied hGDH2, the isoform of human GDH that is expressed in neural and testicular tissues, by using highly purified preparations of recombinant protein obtained by expression of the *GLUD2* gene in Sf21 cells. Results agree with previous observations on crude extracts of Sf9 cells containing expressed hGDH1 and hGDH2 (Plaitakis et al., 2000) in showing that the two isoenzymes had similar kinetic properties but differed markedly in their regulation characteristics. Thus, whereas hGDH1 was inhibited potently by GTP (IC<sub>50</sub> ~ 0.3 μM), hGDH2 was resistant to this compound. This being the case, GTP, which is a major player in the function of hGDH1 in peripheral tissues (Stanley et al., 1998), might not be involved in the regulation of the neural and testicular tissue-specific GDH.

Instead of being regulated by GTP, hGDH2 has developed a unique molecular mechanism that permits enzyme regulation without this allosteric inhibitor (Mastorodemos et al., 2005). The enzyme assumes, in the absence of GTP, a closed conformation associated with a low-rate catalytic activity, but it remains remarkably responsive to activation by ADP and/or L-leucine.

Low basal activity is an important property of hGDH2 (see below), so we sought here to determine factors that influence this activity. We observed that the specific basal activity of hGDH2 correlated significantly with enzyme concentration ( $R = 0.94$ ,  $P < 0.0001$ ). In addition, lowering the temperature from 25°C to 20°C enhanced both the specific basal activity and the protein concentration effect on this specific activity (Fig. 3). Frieden (1962) had shown originally that changing the temperature from 32°C to 10°C affected the reversible polymerization of GDH, with the lower temperatures promoting this polymerization. As such, it is likely that the enzyme concentration effect observed here, may relate to enhanced hexamer-hexamer association. In this regard, ADP, which activates GDH, promotes polymerization (Frieden, 1959), whereas GTP, an enzyme inhibitor, impairs this polymerization (Huang and Frieden, 1969).

TABLE III. GTP Inhibition of Wild-Type and Human GDHs\*

	Inhibitor IC <sub>50</sub> (μM GTP)			Hill coefficient		
	hGDH1	hGDH2	R443S/G456A	hGDH1	hGDH2	R443S/G456A
No ADP	0.31 ± 0.03	78.5 ± 14.1	622.4 ± 19.5	1.51 ± 0.07	0.85 ± 0.14	0.67 ± 0.03
0.1 mM ADP	1.61 ± 0.02	23.9 ± 2.2	25.8 ± 6.6	2.13 ± 0.15	1.08 ± 0.09	0.99 ± 0.19
1 mM ADP	18.5 ± 0.5	166.8 ± 57.8	139.4 ± 21.0	1.94 ± 0.07	0.71 ± 0.08	0.64 ± 0.05

\*Assays were done in the direction of reductive amination of α-ketoglutarate, in 50 mM TRA pH 8.0 buffer, as described in Materials and Methods. The inhibitor IC<sub>50</sub> values (μM GTP) were calculated from the GTP inhibitory curves drawn with the use of the Origin program and represent means (±SEM) of at least three experimental determinations. Values for Hill coefficients (±SE) represent the slope of the linear regression line (Hill plot) drawn from the data above.

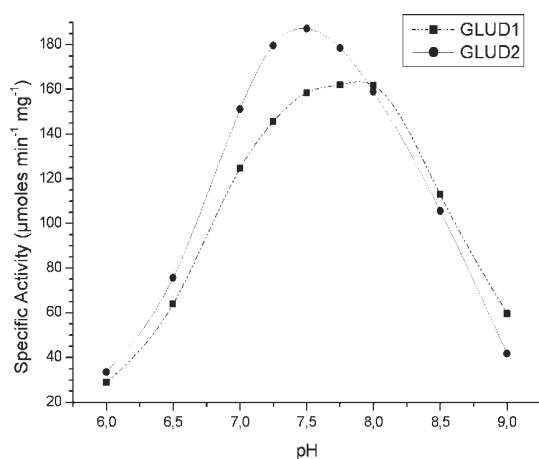


Fig. 5. Effect of pH on the specific activity of hGDH1 and hGDH2. Enzyme activity was measured in the direction of reductive amination of α-ketoglutarate in TRA buffer, the pH of which varied from 6.0 to 9.0, in the presence of 1 mM ADP. Data points represent mean values from at least three experimental determinations.

With regard to enzyme activation, ADP induced a proportionally greater stimulation of hGDH2 than of hGDH1, but with a different affinity for each isoenzyme. L-leucine also induced a proportionally higher activation of hGDH2 than hGDH1, but, in contrast to ADP, it displayed the same affinity for both human GDHs. Insofar as hGDH2 has acquired during its evolution amino acid changes that affected primarily the interaction of enzyme's subunits mediating allostery (see below), our data showing an altered ADP affinity for hGDH2 are consistent with modification of allosteric mechanisms. On the other hand, the finding that L-leucine displayed the same affinity for both hGDHs supports the possibility that L-leucine binds to the active site, in that the molecular evolution of hGDH2 did not affect directly the catalytic site.

The present studies also revealed that hGDH2 showed its maximal activity at pH 7.50, whereas hGDH1 showed its maximal activity at pH 7.75–8.0. The house-keeping GDH1 enzyme has been highly conserved during its evolution by strong purifying selection (Burki and Kaessmann, 2004). As the present studies showed, hGDH1 has maintained its ability to operate optimally at

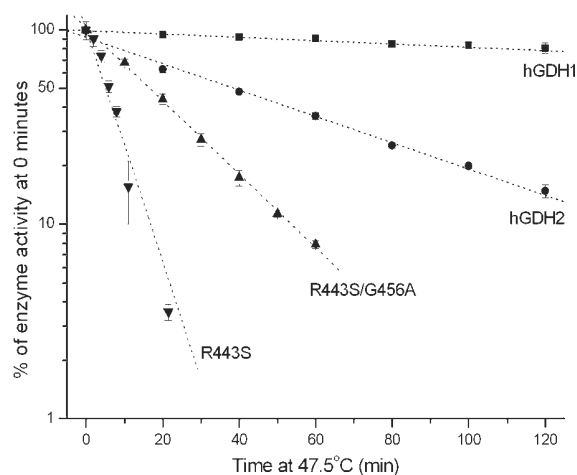


Fig. 6. Thermal stability of the wild-type human hGDH1 and hGDH2, the R443S single mutant, and the R443S/G456A double mutant. Samples containing 40–60 μg/ml purified enzyme protein and 4 mg/ml bovine serum albumin in 100 mM sodium phosphate pH 6.8 buffer were incubated at 47.5°C in Eppendorf tubes. Aliquots were removed at the intervals specified and assayed in the direction of reductive amination of α-ketoglutarate in TRA pH 8.0 buffer, in the presence of 1.0 mM ADP. Data are mean ± SEM (bars) of three determinations.

pH 7.80 and 8.0, which is the pH of the mitochondrial matrix of the various cells (Llopis et al., 1998). On the other hand, in the nerve tissue, GDH is enriched in synaptic astrocytes, the cells responsible for removing glutamate from the synaptic cleft. Uptake of glutamate during excitatory transmission is associated with significant intracellular acidification, with cytosolic pH dropping to 7.2–7.0, as a result of countertransport of OH<sup>-</sup> (Bouvier et al., 1992; Poitry et al., 2000). Such cytosolic acidification is shown to lower the pH of the mitochondrial matrix from 7.8 to about 7.50 (Llopis et al., 1998). Hence, it appears that hGDH2 is fine-tuned to operate in the environment that prevails in the mitochondrial matrix of synaptic astrocytes following glutamate uptake.

How are these properties of hGDH2 relevant at the molecular and genetic level? For this, we will briefly consider the tertiary structure of mammalian GDH, which is a hexameric molecule. X-ray crystal studies (Smith et al., 2001, 2002; Banerjee et al., 2003) have shown that

each subunit is composed of approximately three domains: the glutamate-binding domain at the N terminus, the NAD binding domain, and the regulatory domain. The latter includes the “pivot helix” and the antenna (residues 401–448), a protruding structure composed of an ascending 23-residue  $\alpha$ -helix and a descending strand (residues 425–448) ending with a small  $\alpha$ -helix (residues 439–448). The functional GDH hexamer is composed of two trimers, in each of which the antennae of the three subunits are intertwined, with the interaction of these subunits mediating allostery. During catalysis, the NAD domain pivots about the “pivot helix,” this movement being associated with opening and closing the catalytic cleft (Peterson and Smith, 1999). Cycling between the open and the closed conformation states is essential for the catalysis to occur. Observations on hGDH1 have shown that the small  $\alpha$ -helix of the descending strand also undergoes major conformational changes during opening and closing of the active site (Smith et al., 2002).

Previous studies, utilizing site-directed mutagenesis, showed that replacement of Gly456 by Ala made the enzyme resistant to GTP (Zaganas and Plaitakis, 2002), whereas substitution of Ser for Arg443 abolished its basal activity (Zaganas et al., 2002). Gly456 is located at the base of the “hinge region,” the turning point between the antenna and the pivot helix, and its replacement by Ala is thought to lead to local steric clashes, affecting subunit communication that mediate allostery. On the other hand, Arg443 is located in this small  $\alpha$ -helix of the antenna that undergoes major conformational changes during opening and closing of the active site. Its replacement by Ser, in the Arg443Ser mutant, is thought to disrupt the hydrogen bond that exists between Arg443 of one subunit and the side chain of Ser409 of a neighboring subunit, resulting in closure of the active catalytic cleft (Zaganas et al., 2002). This would abolish basal activity and abrogate L-leucine activation (in the absence of ADP), because L-leucine has to enter the catalytic site in order to act.

Our data showing that ADP, at concentrations (0.025–0.050 mM) sufficient to bring the activity of the Arg443Ser mutant to the baseline level of the wild-type hGDH2 (~2–4% of maximal activity), enabled L-leucine to exert its stimulatory effect are consistent with this model. Opening of the catalytic cleft by ADP (acting allosterically) should allow L-leucine to enter the active site. This being the case, maintaining a minimum basal catalytic activity might represent an important functional adaptation that occurred early in the evolution of hGDH2, rendering the brain-specific isoenzyme remarkably responsive to ADP and/or L-leucine.

After its birth, hGDH2 facing selection pressures acquired early in its evolution the Arg443Ser and the Gly456Ala substitutions along with five more amino acid changes (Ala3Leu, Glu34Lys, Asp142Glu, Ser174Asn, Asn498Ser; Burki and Kaessmann, 2004). Gly456Ala dissociated the enzyme from GTP regulation, but, in the absence of other modifying changes, this could have resulted in a mostly unregulated enzyme activity. On the

other hand, the Arg443Ser change markedly destabilized the enzyme, abolished its basal activity, and abrogated its activation by L-leucine (without ADP). In addition, it impaired its activation by relatively low concentrations of ADP and shifted its optimal pH from 7.75–8.0 to 7.0. These changes would have made the mutant enzyme unsuitable to operate in the mitochondrial matrix environment, the pH of which is close to 7.8 (Llopis et al., 1998).

The two amino acid changes described above provided hGDH2 with some but not all of its functional characteristics, so we tested here the possibility that the Gly456Ala substitution acting together with the Arg443Ser change can reproduce the unique properties of the isoenzyme. For this, we created a double mutant that had both amino acid changes (Arg443Ser and Gly456Ala) in the same polypeptide chain. Functional analyses of this mutant revealed that its properties were either between those of the wild-type hGDH2 and the Arg443Ser mutant or more closely related to the Arg443Ser single mutant than to the wild-type hGDH2.

In light of these observations, we must conclude that, in addition to Ser 443 and Ala456, other amino acid substitutions ought to be involved. Such changes should stabilize the enzyme and permit it to operate optimally in the environment that prevails in the nervous tissue. In this regard, study of additional single hGDH1 mutants (Ala3Leu, Glu34Lys, Arg39Gln, Asp142Glu, Ile166Val, Ser174Asn, Gly247Arg, Ala321Val, Ser331Thr, Met370Leu, Met415Leu, Arg470His, and Asn498Ser; Zaganas and Plaitakis, 2002; Zaganas et al., 2002; Mastorodemos et al., 2005; and unpublished data) have not shown detectable functional changes. Hence, further studies are needed to identify additional amino acid changes, which, acting in concert with Arg443Ser and Gly456Ala, are capable of recreating the functional properties of hGDH2.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ioannis Zaganas, Eleni Giourouki, and Maria-Martha Papachatzaki for their help.

## REFERENCES

- Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. 2003. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* 42:3446–3456.
- Bouvier M, Szatkowski M, Amato A, Attwell D. 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 360:471–474.
- Burki F, Kaessmann H. 2004. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet* 36:1061–1063.
- Cho SW, Yoon HY, Ahn JY, Lee EY, Lee J. 2001. Cassette mutagenesis of lysine 130 of human glutamate dehydrogenase: an essential residue in catalysis. *Eur J Biochem* 268:3205–3213.
- Colon A, Plaitakis A, Perakis A, Clarke DD. 1986. Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem* 46:1811–1819.
- Cornish-Bowden A. 1979. *Fundamentals of enzyme kinetics*. London: Butterworth. p 147–176.



- Fang J, Hsu B, MacMullen C, Poncz M, Smith T, Stanley C. 2002. Expression, purification and characterisation of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem J* 363:81–87.
- Frieden C. 1959. Glutamic dehydrogenase II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. *J Biol Chem* 234:815–820.
- Frieden C. 1962. The effect of pH and other variables on the Dissociation of beef liver glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 237:2396–2400.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126:941–954.
- Herrero-Yraola A, Bakhit SM, Franke P, Weise C, Schweiger M, Jorcke D, Ziegler M. 2001. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J* 20:2404–12.
- Huang CY, Frieden C. 1969. Rates of GDP-induced and GTP-induced depolymerization of glutamate dehydrogenase: a possible factor in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:338–344.
- Hussain MM, Zannis V, Plaitakis A. 1989. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J Biol Chem* 264:20730–20735.
- Lee EY, Yoon HY, Ahn JY, Choi SY, Cho SW. 2001. Identification of the GTP binding site of human glutamate dehydrogenase by cassette mutagenesis and photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 276:47930–47936.
- Llopis J, McCaffery M, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. 1998. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6803–6809.
- 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.
- 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 U S A* 85:3494–3498.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. 1996. Exogenous concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* 66:386–393.
- McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen H, Schousboe A. 2006. Energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. *Basic neurochemistry*. New York: Elsevier Academic Press. p 531–557.
- Peterson P, Smith TJ. 1999. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure* 7:769–782.
- Plaitakis A, Metaxari M, 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.
- Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. 2003. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem Int* 43:401–410.
- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish P, Tsakopoulos M. 2000. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 20:1809–1821.
- Shashidharan P, Michaelides TM, Robakis NK, Kretsovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. 1994. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem* 269:16971–16976.
- Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. 1997. Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J Neurochem* 68:1804–1811.
- Shen J. 2005. In vivo carbon-13 magnetization transfer effect. Detection of aspartate aminotransferase reaction. *Magn Reson Med* 54:1321–1326.
- Smith EL. 1979. The evolution of glutamate dehydrogenases and a hypothesis for the insertion or deletion of multiple residues in the interior of polypeptide chains. *Proc Am Phil Soc* 123:73–84.
- Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. 1975. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer PD, editor. *The enzymes*, vol 11. New York: Academic Press. p 293–367.
- Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. 2001. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J Mol Biol* 307:707–720.
- Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley C. 2002. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J Mol Biol* 318:765–777.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, 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.
- Wilkinson GM. 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem J* 80:324–332.
- Yoon HY, Cho EH, Kwon HY, Choi SY, Cho SW. 2002a. Importance of glutamate 279 for the coenzyme binding of human glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 277:41448–41454.
- Yoon HY, Lee EY, Cho SW. 2002b. Cassette mutagenesis and photoaffinity labeling of adenine binding domain of ADP regulatory site within human glutamate dehydrogenase. *Biochemistry* 41:6817–6823.
- Zaganas I, 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 behavior of the enzyme. *J Biol Chem* 277:26422–26428.
- Zaganas I, Spanaki C, Karpus M, Plaitakis A. 2002. Substitution of Ser for Arg443 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* 277:46552–46558.