ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Μελέτη φαινοτύπου διαγονιδιακών μυών που εκφράζουν την αγρίου τύπου hGDH2 (WT-hGDH2)

Διδακτορική Διατριβή

Πετράκη Ζωή

Δεκέμβριος 2019

Μελέτη φαινοτύπου (συμπεριφορική και μορφολογική) διαγονιδιακών μυών που εκφράζουν την αγρίου τύπου hGDH2 (WT-hGDH2)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Σπανάκη Κλεάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας

Καραγωγέως Δόμνα, Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας και Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας

Καστελλάκης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Επταμελής συμβουλευτική επιτροπή

Καραγωγέως Δόμνα, Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας και Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας

Καρδάσης Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας

Καστελλάκης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας

Μήτσιας Παναγιώτης, Καθηγητής Νευρολογίας

Νότας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας

Σπανάκη Κλεάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας

Ζαγανάς Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

Στην Σόφη που επιθυμούσε την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής περισσότερο από οποιονδήποτε άλλον

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3		
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10		
ABSTRACT	13		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15		
1.1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης	15		
1.2. Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες σε απλούστερους οργανισμούς	15		
1.3. Δομή γλουταμικής αφυδρογονάσης θηλαστικών	17		
1.4. Αλλοστερικοί τροποποιητές GDH θηλαστικών	20		
1.5. Βιολογικός ρόλος της GDH των θηλαστικών	23		
1.6. Οι 2 μορφές γλουταμικής αφυδρογονάσης στον άνθρωπο	25		
1.7. Λειτουργικές διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2	28		
1.8. Έκφραση της GDH σε νευρικούς ιστούς πειραματόζωων	31		
1.9. Έκφραση των hGDH1 και hGDH2 στους ανθρώπινους ιστούς	32		
1.10. Έκφραση στους περιφερικούς ιστούς	32		
1.11. Έκφραση της GDH στον εγκέφαλο	37		
1.12 Λειτουργικοί ρόλοι των ανθρώπινων μορφών της GDH σε διαφορετικούς ιστού			
	39		
1.13 GDH και μοριακός μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης	42		
1.14 Ασθένειες που σχετίζονται με τις ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες	45		
(ΕΦΑΛΑΙΟ 2° : ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4			
<ΕΦΑΛΑΙΟ 3° : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 5			

3.1. Διαχείριση πειραματόζωων - διασταυρώσεις			
3.2 Γονοτύπηση	51		
3.3. Ομογενοποίηση ιστών και απελευθέρωση κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσ	ματος		
	54		
3.4 Ενζυμικές μελέτες	55		
3.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης	(SDS-		
PAGE)	57		
3.6. Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	58		
3.7. Μονιμοποίηση Ιστών για κρυοτομές	60		
3.8. Μονιμοποίηση Ιστών σε παραφίνη	61		
3.9. Ανοσοφθορισμός	62		
3.10. Χρώση ιστών με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E)	64		
3.11. Μέτρηση Βάρους πειραματόζωων	65		
3.12. Αιμοληψία	66		
3.13. Μέτρηση επιπέδων γλυκόζης νηστείας αίματος (FBG)	66		
3.14. Δοκιμασία αντίστασης στη γλυκόζη	66		
3.15. Δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη	67		
3.16. Εκούσια χορήγηση λευκίνης	67		
3.17. Μέτρηση επιπέδων ινσουλίνης ορού με Δοκιμασία ELISA	69		
3.18. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field trial)	69		
3.19. Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας (Plantar test – Hargreaves' method)	70		
3.20. Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας (Hot plate test)	71		
3.21. Δοκιμασία φωτός/σκότους (light/dark trial)	72		
3.22. Δοκιμασία ανυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze trial)	73		

3.23. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (novel object recognition task)	73
3.24. Δοκιμασία Χωρικής Μετατόπισης Αντικειμένου (object location task)	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
4.1. Δημιουργία διαγονιδιακών μυών που φέρουν το ανθρώπινο γονίδιο	της
ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 (GLUD2)	78
4.2 Μελέτες έκφρασης της hGDH2 πρωτεΐνης στα διαγονιδιακά ζώα.	80
4.2.1. Μελέτη της έκφρασης του διαγονιδίου με ανοσοαποτύπωση κατά West	ern.
	80
4.2.1.a. Περιφερικοί ιστοί	81
4.2.1.β. Νευρικός Ιστός	83
4.2.2. Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας της GDH σε ιστούς διαγονιδιακών	και
αγρίου τύπου ζώων	84
4.2.2.α. Περιφερικοί ιστοί	84
4.2.2.β. Νευρικοί ιστοί	89
4.2.3. Μελέτες κυτταρικής έκφρασης της hGDH2 στα διαγονιδιακά ζώα	94
4.2.3.α. Πρότυπο έκφρασης της hGDH2 στους περιφερικούς ιστ	τούς
διαγονιδιακών ζώων	94
4.2.3.β. ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	99
4.2.4 Κυτταρική έκφραση της hGDH2 στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων	100
4.2.4.α. Έκφραση της hGDH2 σε ένα υποσύνολο νευρώνων του εγκεφαλ	ικού
φλοιού στα διαγονιδιακά ζώα.	102
4.2.5. Περιοχική Έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στο ΚΝΣ	των
διαγονιδιακών ζώων.	104
4.3 Μορφολογικές Μελέτες	108
4.4. Χαρακτηρισμός φαινοτύπου GLUD2 διαγονιδιακών ζώων	109

5

4.4.1. Προσδιορισμός γλυκόζης σε συνθήκες νηστείας 10						
4.4.2. Επίδραση του διαγονιδίου στη διαχείριση της προσλαμβανόμενης γλυκόζης						
(glucose dependent insulin release) 12						
4.4.3. Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη	126					
4.4.4. Επίδραση Λευκίνης στη διαχείριση γλυκόζης (έκκριση ινσο	υλίνης					
διεγειρόμενη από λευκίνη)	128					
4.4.5. Επίδραση Λευκίνης στη διαχείριση προσλαμβανόμενης γλυκόζης	133					
4.4.6. Αναπτυξιακές και άλλες Μετρήσεις	138					
4.5 Συμπεριφορικές Μελέτες	143					
4.5.1. Κινητικότητα-Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field)						
4.5.2. Ευαισθησία στον πόνο - Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας 1						
4.5.3. ΑΓΧΟΣ-Δοκιμασία Φωτός/Σκότους 1						
4.5.4 ΑΓΧΟΣ - Δοκιμασία Ανυψωμένου Λαβυρίνθου (elevated plus maze)	147					
4.5.5 ΧΩΡΙΚΗ ΜΝΗΜΗ - Δοκιμασία Χωρικής Μετατόπισης Αντικειμένου	(object					
location task)	148					
4.5.6. Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (object recognition task)	150					
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	153					
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165					

Πριν να ξεκινήσω τη συγγραφή της παρούσας διατριβής είχα πάντα στο μυαλό μου πως το πρώτο πράγμα που θα έγραφα θα ήταν αυτές οι προτάσεις. Έχοντας ολοκληρώσει πλέον τη διαδικασία της συγγραφής θα ομολογήσω πως αυτό το κομμάτι με δυσκόλεψε περισσότερο από οποιαδήποτε άλλο. Όχι επειδή δεν γνώριζα ποιους ήθελα να ευχαριστήσω αλλά γιατί δεν έβρισκα λέξεις κατάλληλες, που να μπορούν να εκφράσουν το πόσο πολύ ευχαριστώ μερικούς από τους ανθρώπους που ακολουθούν.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου κ.Κλεάνθη Σπανάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη στήριξη που μου προσέφερε και για όσα μου έμαθε όλα αυτά τα χρόνια. Αποτελεί για εμένα πρότυπο επιστήμονα. Θέλω να την ευχαριστήσω που πίστεψε σε εμένα και τις δυνατότητές μου και που με άφηνε να κάνω λάθη ξέροντας πως θα μάθω από αυτά. Κυρίως όμως θέλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στον άνθρωπο Κλειώ, για τον πλούτο της ψυχής της, την

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον ομότιμο καθηγητή κ.Ανδρέα Πλαϊτάκη που χωρίς την καθοδήγησή του αλλά κυρίως χωρίς την αγάπη του για αυτό που κάνει και πρεσβεύει η παρούσα διατριβή θα ήταν ελλιπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ.Ανδρέα Καστελλάκη, πολύτιμο σύμβουλο, καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Πάντα πρόθυμος να με καθοδηγήσει και να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε θέμα του έθετα. Τον ευχαριστώ θερμά για τον χρόνο και την ενεργεία που διέθεσε όλο αυτόν τον καιρό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Γεώργιο Νότα, τον οποίο γνώρισα πρώτη φορά στα Τ.Ε.Π του νοσοκομείου και που λίγα χρόνια αργότερα δέχθηκε με χαρά να διαβάσει και να αξιολογήσει τη δουλειά μου. Τον ευχαριστώ τόσο πολύ για

τον χρόνο που μου διέθεσε καθώς δεν ήταν λίγες οι φορές που ζήτησα τις συμβουλές του σε μία ποικιλία θεμάτων. Το εκτιμώ αφάνταστα.

Επιπρόσθετα, οφείλω ένα ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ.Ιωάννη Ζαγανά, έναν από τους πρώτους ανθρώπους που συνεργάστηκα στο εργαστήριο Νευρολογίας. Πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να με συμβουλέψει σε οποιοδήποτε θέμα προέκυπτε εντός εργαστηρίου.

Ευχαριστώ πολύ την καθηγήτρια κ.Δόμνα Καραγωγέως, τον καθηγητή κ. Δημήτριο Καρδάση και τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Μήτσια για το ενδιαφέρον που έδειξαν τον χρόνο που αφιέρωσαν για να διαβάσουν την διδακτορική μου διατριβή.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις δύο "Ειρήνες" του εργαστηρίου μας (την κ.Σκουλά και την κ.Τζανάκη αντίστοιχα) καθώς και όλα τα μέλη που κατά καιρούς συνεργάστηκα αυτά τα χρόνια.

Ένα τεράστιο ευχαριστήσω οφείλω στις κυρίες του παρασκευαστηρίου, στο Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πα.Γ.Ν.Η και ειδικά την αγαπημένη μου κ.Φωτεινή, που χωρίς τη συμβολή της δεν θα μπορούσαν να έχουν πραγματοποιηθεί πολλά από τα πειράματα της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου διέθεσε (ενώ δεν ήταν υποχρεωμένη).

Θέλω να πως ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια και που πολλές φορές έγιναν όλοι τους συνοδοιπόροι στη δύσκολη αυτή διαδρομή (πολλές φορές χωρίς να το θέλουν). Αυτή η διαδρομή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την παρουσία του Κλέαρχου και της αγαπημένης μου (και πάντα κουρασμένης) Νίκης. Οφείλω και στους δύο τους ένα τεράστιο ευχαριστώ, μία τεράστια αγκαλιά και το πιο τέλειο μπανόφι.

Οι παρακάτω φράσεις είναι αφιερωμένες στην αγαπημένη μου Κωνσταντίνα Μ. και Σταύρο Ντρου που χωρίς αυτούς η ζωή εντός και εκτός εργαστηρίου θα ήταν εντελώς διαφορετική. Στον Σταύρο και την Κωνσταντίνα δίνω τη χρυσή πιπέτα, τους βάζω 5

8

καρδούλες, γιατί παρόλο που είχαν μόνο 7 λεπτά και δεν πρόλαβαν κατάφεραν να μην αντιδράσει η κόλλα με το πλακάκι ενώ παράλληλα λικνίζονταν στους ρυθμούς του μπουμπουμπουλε μπουμπουλε, τρώγοντας με χάρη ένα στρόμπολι και όλα αυτά έχοντας πάντα την τύχη με το μέρος τους.

Ολοκληρώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους. Την μαμά Βίκυ και τον αδερφό μου Αριστοφάνη. Για την αγάπη τους, τη φροντίδα και την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και για τόσα πολλά άλλα. Τον παππού Αριστοφάνη και τη γιαγιά Σοφία, που είναι πάντα στη σκέψη και την καρδιά μου.

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε ακετογλουταρικό και αμμωνία, χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο το NAD⁺/NADP⁺. Απαντάται σε όλους τους οργανισμούς και έχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, τόσο σε καταβολικές όσο και σε αναβολικές βιοσυνθετικές διεργασίες. Σε αντίθεση με τα περισσότερα είδη θηλαστικών που διαθέτουν μία GDH (hGDH1 στον άνθρωπο) που εκφράζεται σε όλους του ιστούς, ο άνθρωπος και κάποια πρωτεύοντα έχουν αποκτήσει, μέσω ρετρομετάθεσης του GLUD1 γονιδίου στο χρωμόσωμα Χ, ένα δεύτερο ισοένζυμο (hGDH2) με διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης και ιστο-ειδική έκφραση. Το γονίδιο της GLUD2 εξελίχθηκε ταχέως υπό την πίεση της φυσικής επιλογής και απέκτησε μία σειρά από αμινοξικές αλλαγές, επιτρέποντας στην hGDH2 να λειτουργεί σε συνθήκες ανασταλτικές για την hGDH1. Οι μοναδικές ιδιότητες της hGDH2 θωρείται πως επέτρεψαν την προσαρμογή του ενζύμου στις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις του νευρικού συστήματος και στις ειδικές ανάγκες των άλλων ιστών. Η hGDH2 στον άνθρωπο εκφράζεται, μαζί με την hGDH1, στον ανθρώπινο εγκέφαλο, τους νεφρούς, τους όρχεις και τα στεροειδοπαραγωγά όργανα, αλλά δεν εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ.

Με σκοπό να κατανοήσουμε τον ρόλο της hGDH2 στη βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, δημιουργήσαμε ένα διαγονιδιακό ζωικό πειραματικό μοντέλο μυός που εκφράζει την αγρίου τύπου hGDH2 μαζί με την ενδογενή mGDH. Μελέτες διπλού ανοσοφθορισμού σε τομές περιφερικών ιστών και εγκεφάλου διαγονιδιακών ζώων, αποκάλυψαν πως η διαγονιδιακή hGDH2 πρωτεΐνη παρουσιάζει πρότυπο έκφρασης που δεν διαφοροποιείται από αυτό του ανθρώπου. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων διαπιστώσαμε ότι η hGDH2 εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli του όρχεως των διαγονιδιακών ζώων στα οποία η mGDH απουσιάζει ακριβώς όπως και στον άνθρωπο. Εκφράζεται επίσης μαζί με την ενδογενή mGDH στην πλειονότητα των υπολοίπων περιφερικών ιστών καθώς και στα β-κύτταρα του παγκρέατος των διαγονιδιακών ζώων. Με έναυσμα αυτές τις παρατηρήσεις, μελετήσαμε αν η έκφραση του διαγονιδίου επηρεάζει τον ομοιοστατικό μηχανισμό της γλυκόζης και διαπιστώσαμε πως τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων ήταν σημαντικά χαμηλότερα έναντι των αγρίου τύπου ζώων (Tg: 95% Cl: 90.6-96.8 mg/dL; N=26, WT:95% Cl: 136.2-151.4 mg/dL; N=23; p<0.0001), προσεγγίζοντας τις φυσιολογικές τιμές γλυκόζης νηστείας των υγιή ενήλικων ανθρώπων. Τα επίπεδα ινσουλίνης ορού νηστείας των διαγονιδιακών ζώων ήταν 2.6 φορές μεγαλύτερα (mean±SD: 1.63±0.15 ng/ml; N=12) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των αγρίου τύπου ζώων (0.63±0.05 ng/ml; N=12; p=0.0001). Η αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης μετά από φόρτιση με γλυκόζη (1 mg/g,i.p.) ήταν συγκρίσιμη μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων υποδηλώνοντας πως η έκφραση της διαγονιδιακής hGDH2 πρωτεΐνης δεν επηρέασε την γλυκοζο-εξαρτώμενη έκφραση ινσουλίνης. Η φόρτιση με το αμινοξύ L-λευκίνη (0.25 mg/g) είχε ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό των τιμών των επιπέδων ινσουλίνης των αγρίου ζώων, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στα ήδη υψηλές τιμές των επιπέδων ινσουλίνης των διαγονιδιακών ζώων, υποδηλώνοντας πως οι υψηλές συγκεντρώσεις του ADP που επικρατούν στα β-κύτταρα σε συνθήκες νηστείας έχουν ως αποτέλεσμα την μέγιστη ενεργοποίηση της hGDH2, οπότε και δεν επιτυγχάνεται περαιτέρω ενεργοποίηση παρά την προσθήκη ενός αλλοστερικού ενεργοποιητή. Παράλληλα η ύπαρξη του GLUD2 διαγονιδίου φαίνεται να προστατεύει τα διαγονιδιακά ζώα από την ανάπτυξη διαβήτη και παχυσαρκίας με το γήρας.

Η έκφραση της hGDH2 στον εγκέφαλο ήταν παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στον άνθρωπο. Η διαγονιδιακή πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στα αστροκύτταρα κατά μήκος των αποφυάδων τους και των ποδίσκων τους γύρω από τα αγγεία, σε ένα υποσύνολο νευρώνων με πυραμιδική μορφολογία και κυρίως στο νευροπίλημα. Σε αντίθεση με τον άνθρωπο, διαπιστώθηκε έκφραση της hGDH2 στα ολιγοδενδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών μελετών δεν ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στις δοκιμασίες κινητικότητας και χωρικής ή αναγνωριστικής μνήμης. Εντούτοις, τα διαγονιδιακά ζώα εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στον πόνο και αυξημένα επίπεδα άγχους. Η λεπτή μορφολογική μελέτη του εγκεφάλου με τη χρώση Golgi-Cox, αποκάλυψε πως η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων σχετίζεται με αυξημένο αριθμό ώριμων δενδριτικών ακάνθων στον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο λοβό, περιοχές με πλούσια γλουταματεργική νευροδιαβίβαση.

Συμπερασματικά, το GLUD2 διαγονιδιακό μοντέλο ζώου θα μπορούσε να θεωρηθεί εξανθρωποποιημένο με βάση το πρότυπο έκφρασης του. Η χαρτογράφηση του φαινοτύπου μέχρι στιγμής, υποστηρίζει ότι η hGDH2 έχει εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να λειτουργεί συμπληρωματικά της hGDH1 στους ιστούς στους οποίους εκφράζεται, με σκοπό την βέλτιστη εξυπηρέτηση των ειδικών αναγκών του καθενός. Υπό αυτό το πρίσμα, η έκφρασή της στο πάγκρεας είχε ως αποτέλεσμα την διασφάλιση, σε συνθήκες νηστείας, μια μικρού εύρους ευγλυκαιμίας, παρόμοιας με εκείνη του ανθρώπου. Φαίνεται επίσης να ασκεί προστατευτική δράση απέναντι στην ανάπτυξη διαβήτη και παχυσαρκίας κατά το γήρας. Τα πρώτα δεδομένα της επίδρασης της έκφρασης του διαγονιδίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα υποδηλώνουν ότι η παρουσία του διαγονιδίου οδήγησε σε αύξηση των ώριμων δενδριτικών ακάνθων σε περιοχές με πλούσια γλουταματεργική νευροδιαβίβαση όπως ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος λοβός. Αν αυτό σημαίνει ότι αυξήθηκε η συναπτογένεση και μέσω αυτής ενισχύθηκε η γλουταματεργική νευροδιαβίβαση μέσω της οποίας διαμεσολαβούνται οι τόσο εξελιγμένες γνωστικές λειτουργίες του ανθρώπου μένει να αποδειχτεί σε μελλοντικές μελέτες.

12

Mammalian glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) is a mitochondrial enzyme that catalyzes the reversible oxidative deamination of glutamate to α -ketoglutarate and ammonia using NAD⁺/NADP⁺ as cofactor .It links amino acid with carbohydrate metabolism, contributing to Krebs cycle anaplerosis, energy production, ammonia handling and redox homeostasis. While most mammals possess a single GDH1 protein (hGDH1 in the human) that is highly expressed in the liver, humans and other primates have acquired, via duplication, an hGDH2 isoenzyme with distinct functional properties and tissue expression profile. The novel hGDH2 underwent rapid evolutionary adaptation, acquiring unique properties that enable enhanced enzyme function under conditions inhibitory to its ancestor hGDH1. These are though to provide a biological advantage to humans with hGDH2 evolution occurring concomitantly with human brain development. hGDH2 is co-expressed with hGDH1 in human brain, kidney, testis and steroidogenic organs, but not in liver.

To better understand the role of hGDH2 in human biology, we generated a transgenic mouse model expressing hGDH2 by inserting a human DNA segment containing the GLUD2 gene and it regulatory elements into their genome. Study of the *GLUD2* Tg mice brain using double IF and confocal microscopy, revealed a hGDH2 cellular expression pattern similar to that observed in human brain. These observations provided credence to the hypothesis that, by finding a suitable promoter in the X chromosome, the duplicated *GLUD2* gene diversified its roles in human tissues.

In light of these considerations, we explored the hGDH2 expression in non-neural organs (including pancreatic tissue) of Tg mice and the effect of *GLUD2* gene on glucose homeostasis. Using specific antibodies we observed that hGDH2 is co-expressed with the endogenous murine GDH1 in pancreatic β -cells of Tg mice. Fasting blood glucose (FBG) levels were lower and of a narrower range in Tg (95% CI: 90.6-96.8 mg/dL; N=26)

than in WT (95% CI: 136.2-151.4 mg/dL; N=23; p<0.0001), closely resembling those of healthy humans. *GLUD2* also protected the host mouse from developing diabetes with advancing age. Tg animals maintained 2.6-fold higher fasting serum insulin levels (mean±SD: 1.63±0.15 ng/ml; N=12) than Wt mice (0.63±0.05 ng/ml; N=12; p b 0.0001). Glucose loading (1 mg/g, given i.p.) induced comparable serum insulin increases in Tg and Wt mice, suggesting no significant GLUD2 effect on glucose-stimulated insulin release.

L-leucine (0.25 mg/g given orally) induced a 2-fold increase in the serum insulin of the Wt mice, implying significant activation of the endogenous GDH1. However, L-leucine had little effect on the high insulin levels of the Tg mice, suggesting that, under the high ADP levels that prevail in β -cells in the fasting state, glutamate flux through hGDH2 is close to maximal. Hence, the present data, showing that GLUD2 expression in Tg mice improves in vivo glucose homeostasis by boosting fasting serum insulin levels, suggest that evolutionary adaptation of hGDH2 has enabled humans to achieve narrow-range euglycemia by regulating glutamate-mediated basal insulin secretion.

1.1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Η γλουταμική αφυδρογονάση (glutamate dehydrogenase, GDH) είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο ένζυμο το οποίο απαντάται σε όλους τους οργανισμούς και καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού οξέος σε α-κετογλουταρικό χρησιμοποιώντας ως συνένζυμα NAD⁺ ή/και NADP⁺ (Smith και συν. 1975, Hudson και Daniel 1993) **(Εικόνα 1**)



Εικόνα 1: Η αντίδραση οξείδωσης του γλουταμικού οξέος προς α-κετογλουταρικό οξύ και αμμωνία που καταλύεται από την γλουταμινική αφυδρογονάση (GDH)

1.2. Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες σε απλούστερους οργανισμούς

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες ανευρίσκονται στο σύνολο των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών επιτελώντας σημαντικότατο ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό λαμβάνοντας μέρος τόσο σε καταβολικές όσο και σε αναβολικές βιοσυνθετικές διεργασίες (Hudson and Daniel, 1993). Η αντίδραση της γλουταμικής

αφυδρογονάσης χρησιμοποιείται από πολλά φυτά και μικροοργανισμούς με σκοπό την ενσωμάτωση του αζώτου της αμμωνίας σε οργανικές ενώσεις, αποτελώντας έναν από τους κυριότερους τρόπους *de novo* σύνθεσης αμινοξέων στη φύση. Στα ζώα, των οποίων βασική πηγή αμινοξέων είναι η τροφή, το ένζυμο χρησιμοποιείται κυρίως για τον καταβολισμό του γλουταμικού σε α–κετογλουταρικό συνδέοντας έτσι τον μεταβολισμό των αμινοξέων με τον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες διαχωρίζονται ανάλογα με την ειδικότητα που έχουν για τα συνένζυμα NAD⁺ ή NADP⁺, σε αυτές που είναι ειδικές μόνο για το NAD(H) ή μόνο για το NADP(H) (κυρίως σε απλούστερους εξελικτικά οργανισμούς) και σε αυτές που χρησιμοποιούν αμφότερα τα δύο συνένζυμα (γλουταμικές αφυδρογονάσες σπονδυλωτών). Γενικώς θεωρείται πως οι γλουταμικές αφυδρογονάσες οι οποίες χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NAD(H) εξυπηρετούν τον καταβολισμό του γλουταμικού ενώ τα ειδικά για το NADP(H) ένζυμα, εξυπηρετούν βιοσυνθετικές διεργασίες.

Στην πορεία της εξέλιξης των ειδών, η GDH των θηλαστικών απέκτησε ειδικότητα τόσο ως προς το NAD(H) όσο και προς το NADP(H) συνένζυμο καταστώντας το ένζυμο ικανό να λαμβάνει μέρος τόσο σε καταβολικές όσο και σε αναβολικές αντιδράσεις ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου. Μία επιπρόσθετη αλλαγή που διαφοροποιεί τη GDH των θηλαστικών από αυτή των κατώτερων οργανισμών είναι η απόκτηση ενός σύνθετου συστήματος αλλοστερικής ρύθμισης που επιτρέπει στο ένζυμο να προσαρμόζεται στις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο κυτταρικό περιβάλλον. Υπάρχουν ενδείξεις πως η αλλοστερική ρύθμιση αναπτύχθηκε παράλληλα με την εμφάνιση και την ωρίμανση μιας δομής 50 αμινοξέων, της κεραίας ή αντένας που απουσιάζει στις GDH των κατωτέρων οργανισμών (**Εικόνα 2**). Η αντένα επέτρεψε μέσω αλλοστερικής ρύθμισης τον έλεγχο της ροής των αμινοξέων μέσω του κύκλου του Krebs ανάλογα με τα αποθέματα του κυττάρου σε ενέργεια – ένα εξελικτικό πλεονέκτημα το οποίο και συντηρήθηκε στο χρόνο. (Banerjeee και συν. 2003, Allen και συν.2004, Smith και Stanley 2008)



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης της αντένας και της αλλοστερικής ρύθμισης της GDH. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από την εργασία των Banerjee και συν. (2003)

1.3. Δομή γλουταμικής αφυδρογονάσης θηλαστικών

Μελέτες με κρυσταλλογραφία Χ, έχουν προσδιορίσει σε ατομικό επίπεδο τη μακρομοριακή δομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης διαφόρων οργανισμών. Η ερευνητική ομάδα με επικεφαλής των Thomas J.Smith ήταν αυτή που έφερε εις πέρας την επίλυση της δομής τόσο της βόειας GDH όσο και της ανθρώπινης GDH1 είτε ως αποένζυμο είτε με τη μορφή σύμπλοκου (Peterson και Smith 1999, Smith και συν. 2001, Smith και συν. 2002, Banerjee και συν. 2003).

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών είναι ένα ομοεξαμερές ένζυμο, της οποίας κάθε υπομονάδα αποτελείται από 500 περίπου αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ~ 56 KDa. Κάθε υπομονάδα περιλαμβάνει 3 λειτουργικές περιοχές:

i) την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος (γλουταμικό) στο αμινοτελικό άκρο

ii) την περιοχή πρόσδεσης του NAD(P) $^{+}$

 iii) τη ρυθμιστική (ή αλλοστερική) περιοχή που αποτελείται από την περιστρεφόμενη έλικά (pivot helix) και την αντένα (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του εξαμερούς της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Με διακεκομμένες γραμμές και βέλη αναπαρίσταται η κίνηση της περιοχής πρόσδεσης του NAD(P)⁺ (γκρι χρώμα) όταν προσδένεται το υπόστρωμα. Επισημαίνονται επίσης με πορτοκαλί χρώμα η θέση πρόσδεσης του GTP, με κίτρινο η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (γλουταμικό), ενώ με μωβ χρώμα επισημαίνεται η θέση πρόσδεσης του ADP. Αναδημοσίευση εικόνας από την εργασία των Li και συν.(2014).

Η αντένα είναι μία επιμήκης δομή 48 αμινοξέων που προβάλλει από την περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)⁺ προς τον «πόλο» του εξαμερούς, περίπου κατά μήκους ενός

νοητού οβελιαίου άξονα. Περιλαμβάνει ένα ανιόν σκέλος, μία α-έλικα 32 αμινοξέων, και ένα κατιόν σκέλος που τελειώνει με μία βραχεία α-έλικα της οποίας η δομή αλλάζει κατά το άνοιγμα και κλείσιμο του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Οι αντένες των τριών υπομονάδων που βρίσκονται προς την ίδια πλευρά του «ισημερινού» του εξαμερούς διαπλέκονται μεταξύ τους.

Σε κάθε υπομονάδα διακρίνονται δύο περιοχές οι οποίες χωρίζονται από την ύπαρξη μίας βαθιάς σχισμής, το «καταλυτικό στόμιο» ή «καταλυτική σχισμή» (catalytic cleft). Η πρώτη περιοχή αντιστοιχεί αδρά στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου (**Εικόνα 4)**



Εικόνα 4: Α. Απλοποιημένη αναπαράσταση ολόκληρου του εξαμερούς της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης. Κάθε υπομονάδα αναπαρίσταται με διαφορετικό χρώμα. Β. Σχηματική αναπαράσταση μίας εκ των έξι υπομονάδων της hGDH. Η περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού (GLU binding domain) απεικονίζεται με γαλάζιο χρώμα, η περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου (NAD binding domain) με κίτρινο, η περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix) με πράσινο χρώμα και η αντένα με μωβ. Παράλληλα επισημαίνονται και οι θέσεις πρόσδεσης του υποστρώματος (GLU), του συνενζύμου (NADH) και των αλλοστερικών τροποποιητών ADP και GTP. Αναδημοσίευση εικόνας από την εργασία των Allen και συν.(2004)

Η σύνδεση του υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την περιστροφή της περιοχής πρόσδεσης του συνενζύμου γύρω από την περιστρεφόμενη έλικά (pivot helix) και οδηγεί σε μία αλλαγή διαμόρφωσης και στο υπόλοιπο μόριο που έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο της σχισμής και την προσέγγιση των δύο περιοχών.

Η κίνηση αυτή οδηγεί σε εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης και στο υπόλοιπο μόριο όπως για παράδειγμα στην περιοχή της αντένας, η οποία περιστρέφεται ελαφρά γύρω από τον άξονά της, ενώ η βραχεία έλικά του κατιόντος σκέλους της συμπιέζεται σαν ελατήριο και ταυτόχρονα ωθείται προς το κεντρικό (οβελιαίο) άξονα του εξαμερούς. Μεταλλάξεις σε αμινοξέα της βραχείας αυτής έλικας στην hGDH1 οδηγούν στο σύνδρομο υπεραμμωνιαιμίας-υπερινσουλινισμού (HI/HA) στον άνθρωπο (Stanley και συν. 1998).

1.4. Αλλοστερικοί τροποποιητές GDH θηλαστικών

Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών σε αντίθεση με αυτή των κατώτερων οργανισμών υπόκειται σε αλλοστερική ρύθμιση (**Εικόνα 5**).

Ο σημαντικότερος αναστολέας της GDH είναι το GTP (Frieden 1959, Frieden 1965). Η αναστολή από GTP φαίνεται να εξυπηρετεί την παύση του καταβολισμού των αμινοξέων μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (όπου παράγεται GTP), όταν υπάρχει περίσσεια ενέργειας, λειτουργώντας έτσι ως ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback). Το GTP προσδένεται σε ένα θύλακο- ο οποίος δεν είναι προσβάσιμος στην ανοιχτή διαμόρφωση του μορίου. Η σύνδεση του GTP επιτυγχάνεται εάν και εφόσον έχει προηγηθεί η σύνδεση του υποστρώματος και του συνενζύμου με συνέπεια να έχει κλείσει η καταλυτική σχισμή και το ένζυμο έχει αποκτήσει τη λεγόμενη κλειστή διαμόρφωσή του. Η πρόσδεση του αναστολέα σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση εμποδίζοντας την απελευθέρωση του προϊόντος, οπότε και σχηματίζεται το λεγόμενο abortive complex («ατελέσφορο σύμπλοκο») (Koberstein και Sund 1983, Iwatsubo και Pantaloni 1967, Frieden 1963)



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της αλλοστερικής ρύθμισης της GDH. Οι πράσινες γραμμές αναπαριστούν την ενεργοποίηση του ενζύμου ενώ οι κόκκινες την αναστολή. Αναδημοσίευση από την εργασία των Smith και συν. (2017).

Το παλμιτοϋλο-συνένζυμο A (palmitoyl-CoA) είναι ένας ακόμα αναστολέας των GDH των θηλαστικών (Kawagucki και Block 1976, Fahien και Kmiotek 1981). Πιστεύεται πως ο ρόλος της αναστολής είναι η παύση του καταβολισμού των αμινοξέων όταν υπάρχει επάρκεια από άλλες πηγές ενέργειας κυρίως λόγω καταβολισμού των λιπών. Παρόλο που η θέση πρόσδεσης του παλμιτοϋλο-συνενζύμου Α δεν έχει προσδιοριστεί, η περιοχή με τη δομή αντένας του ενζύμου φαίνεται να είναι σημαντική, καθώς απαλοιφή της αντένας καταργεί πλήρως την ικανότητα αναστολής από τον συγκεκριμένο αναστολέα. Οι στεροειδείς ορμόνες όπως η προγεστερόνη, η τεστοστερόνη, η οιστραδιόλη καθώς και το τεχνητό οιστρογονικό ανάλογο διαιθυλσιλβεστρόλη αναστέλλουν επίσης ισχυρά το ένζυμο (Yielding και Tomkins 1960, Colon και συν. 1986, Li και συν. 2007) χωρίς όμως να έχουν προσδιοριστεί οι θέσεις πρόσδεσης των αναστολέων αυτών στο μόριο της GDH. Για την αναστολή του ενζύμου πιστεύεται, τουλάχιστον για τη βόειο GDH και το ανθρώπινο ανάλογο της hGDH1, πως απαιτούνται συγκεντρώσεις πιθανότατα πάνω από τις φυσιολογικές.

Σχετικά πρόσφατα αποκαλύφθηκε πως κάποια είδη κατεχινών που περιέχονται σε ικανές συγκεντρώσεις στο πράσινο τσάι (epigallocatechin gallate και epicatechin gallate) είναι ικανές να αναστέλλουν την ανθρώπινη γλουταμική αφυδρογονάση (Li και συν. 2006, Li και συν.2007) όταν προσδένονται στη θέση σύνδεσης του ADP (Li και συν.2012) χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η τροποποίηση αυτή.

Ο σημαντικότερος αλλοστερικός ενεργοποιητής του ενζύμου είναι το ADP (Frieden 1965, Markau και συν. 1972, Koberstein και συν. 1973, Bailey και συν. 1982,) και ο ρόλος της ενεργοποίησης αυτής δεν είναι άλλος από την κινητοποίηση του καταβολισμού των αμινοξέων μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος λόγω εξάντλησης των ενεργειακών αποθεμάτων και αύξησης των επιπέδων του ADP (μείωση ενεργειακού φορτίου) του κυττάρου. Το ADP προσδένεται στη βάση της δομής αντένας, σε μία περιοχή πίσω και κάτω από την περιστρεφόμενη έλικα (Banerjee και συν. 2003). Η σύνδεση του ADP έχεις ως αποτέλεσμα την μείωση της ενέργειας που απαιτείται για τη διάνοιξη της καταλυτικής σχισμής διευκολύνοντας έτσι την απελευθέρωση του προϊόντος από το καταλυτικό κέντρο, ανταγωνιζόμενο με αυτόν τον τρόπο τη δράση του GTP. Απαλοιφή της δομής της αντένας καταργεί τη ρύθμιση τόσο από το ADP όσο και από το GTP.

Η L-λευκίνη θεωρείται ένας εξίσου σημαντικός αλλοστερικός ενεργοποιητής της γλουταμικής αφυδρογονάσης, η οποία είναι ικανή να αυξήσει κατά ~50-80% τη δραστηριότητα του ενζύμου (Yieldning και Tomkins 1961). Πιστεύεται πως η αύξηση

22

της συγκέντρωσης του εν λόγω ενεργοποιητή «δίνει την άδεια» στο ένζυμο να καταβολίσει αμινοξέα λόγω επάρκειας. Η πιο πιθανή θέση πρόσδεσης της λευκίνης στο ένζυμο είναι στην «κάτω» πλευρά της περιοχής στην οποία προσδένεται το γλουταμικό, στον «πυρήνα» του εξαμερούς, εκεί δηλαδή που εφάπτονται οι υπομονάδες μεταξύ τους (subunit interface) (Tomita και συν. 2011). Ανεξάρτητα από τη θέση πρόσδεσης φαίνεται πως και η δράση της λευκίνης σχετίζεται με τις εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης του ενζύμου κατά την κατάλυση. Περιορισμένες αμινοξικές αλλαγές στην αντένα, μπορούν να καταργήσουν την ενεργοποίηση από λευκίνη (Zaganas και συν. 2002), ενώ η απαλοιφή ολόκληρης της δομής της αντένας την επηρεάζει σε ήπιο βαθμό (Allen και συν.2004)

Πέραν των αλλοστερικών τροποποιητών που αναφέρθηκαν παραπάνω υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός από ουσίες που αναστέλλουν τη δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης, σε συγκεντρώσεις όμως μάλλον απίθανες για τα μιτοχόνδρια οπότε είναι ασαφές αν η αναστολή αυτή έχει φυσιολογική σημασία. Αυτό που αξίζει να αναφέρουμε όμως είναι πως η δραστηριότητα του ενζύμου *in vitro* επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά του διαλύματος μέσα στο οποίο μελετάται. Στις περισσότερες GDH η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού λαμβάνει χώρα αποτελεσματικότερα σε αλκαλικό pH ~8.5-9.0 ενώ οι βέλτιστες συνθήκες για την αναγωγική αμίνωση του ακετογλουταρικού επιτυγχάνονται σε pH ~7.8-8.0 (Hudson και Daniel 1993). Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μέσα στο οποίο τελείται η αντίδραση φαίνεται να έχει και αυτή σημασία όσον αφορά τη σταθερότητα του μορίου (Engel και Dalziel 1969).

1.5. Βιολογικός ρόλος της GDH των θηλαστικών

Η γλουταμική αφυδρογονάση εκφράζεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών (housekeeping). Έχει υπολογιστεί πως σε ορισμένα κύτταρα αποτελεί μέχρι και το 10% της ολικής πρωτεΐνης του μιτοχονδριακού στρώματος (matrix) (Rothe και συν. 1994). Σύμφωνα με μελέτες το όργανο με τα υψηλότερα επίπεδα γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι το ήπαρ (Smith και συν. 1975) ενώ υψηλά επίπεδα του ενζύμου ανευρίσκονται στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο πάγκρεας, στους νεφρούς, στον σπλήνα και στους λεμφαδένες. Ανεξάρτητα από το είδος του ιστού που εκφράζεται το ένζυμο και τον ειδικό ρόλο που μπορεί να επιτελεί στον καθένα από αυτούς, υπάρχουν κάποιες κοινές λειτουργίες που αφορούν στην ομοιόσταση και τον μεταβολισμό.

Α. Ενεργειακή ομοιόσταση

Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό. Η σύνθεση του α-κετογλουταρικού οδηγεί μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος στην παραγωγή ενέργειας με άμεσο (παραγωγή ATP ή GTP) ή έμμεσο τρόπο (παραγωγή NADH, FADH₂). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει το GTP αποτελεί τον πιο σημαντικό αλλοστερικό αναστολέα του ενζύμου, ενώ το ADP δρα ως αλλοστερικός ενεργοποιητής. Πιστεύεται πως η GDH έχει ένα ρόλο «ενεργειακού αισθητήρα» (energy sensor) και μπορεί να χρησιμοποιήσει την οξείδωση των αμινοξέων (μέσω γλουταμικού) για την παραγωγής ενέργειας όταν το ενεργειακό φορτίο (όπως αυτό καθορίζεται από τον λόγο ATP/ADP) του κυττάρου εμφανίζεται μειωμένο.

Β. Σύνθεση και Αποικοδόμηση Αμινοξέων

Το γλουταμικό είναι το πρόδρομο μόριο στο σχηματισμό του αμινοξέος γλουταμίνη μέσω μιας αντίδρασης αμιδίωσης και τη δράση της συνθετάσης της γλουταμίνης. Είναι επίσης το πρόδρομο μόριο δύο άλλων μη απαραίτητων αμινοξέων, της προλίνης και της αργινίνης. Η αμινική ομάδα του γλουταμικού μπορεί να μεταφερθεί μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης σε ένα α-κετοξύ (α-κετογλουταρικό, οξαλοξικό και πυροσταφυλικό) και να παραχθούν και άλλα αμινοξέα πέραν των τριών που προαναφέραμε. Έτσι, το ασπαραγινικό και η αλανίνη μπορούν να παραχθούν με την προσθήκη μίας αμινικής ομάδας στο οξαλοξικό και στο πυροσταφυλικό

Οξαλοξικό + γλουταμικό	←	→	ασπαραγινικό + α-κετογλουταρικό
πυροσταφιλικό + γλουταμικό	←	→	αλανίνη + α-κετογλουταρικό

Οι αντιδράσεις τρανσαμίνωσης είναι πλήρως αντιστρεπτές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη σύνθεση αμινοξέων από α-κετοξέα όσο και για την αποικοδόμηση των αμινοξέων (απομάκρυνση της αμινομάδας του αμινοξέος). Ο ρόλος της GDH είναι σημαντικός στην ολοκλήρωση της αποικοδόμησης των αμινοξέων, καθώς καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία. Με αυτόν τον τρόπο η α-αμινική ομάδα πολλών αμινοξέων διοχετεύεται στο γλουταμικό και μέσω της GDH απελευθερώνεται ως ελεύθερο ιόν αμμωνίου(NH4⁺), ενώ οι ανθρακικοί σκελετοί που απομένουν μπορούν να εισέλθουν στο κύριο μεταβολικό ρεύμα ως πρόδρομα μόρια της γλυκόζης ή ως ενδιάμεσα του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Γ. Ομοιόσταση Αμμωνίας –Κύκλος Ουρίας

Η γλουταμική αφυδρογονάση κατέχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της αμμωνίας μέσα στο κύτταρο καθώς συμβάλλει μέσω της απαμίνωσης του γλουταμικού στον μεταβολισμό της α-αμινομάδας των περισσοτέρων αμινοξέων. Η αμινική αμινομάδα πρέπει να απομακρυνθεί καθώς δεν υπάρχουν αζωτούχες ενώσεις στις πορείες μεταγωγής ενέργειας. Μέρος του σχηματιζόμενου NH4⁺ κατά την αποικοδόμηση των αμινοξέων καταναλώνεται στη βιοσύνθεση αζωτούχων ενώσεων, η περίσσεια όμως σε NH4⁺ μετατρέπεται σε ουρία (μέσω του κύκλου της ουρίας) και στη συνέχεια απεκκρίνεται.

1.6. Οι 2 μορφές γλουταμικής αφυδρογονάσης στον άνθρωπο

Το 1984 η ομάδα των Plaitakis και συν. έκαναν τη διαπίστωση πως στον ανθρώπινο εγκέφαλο ενδέχεται να υπάρχουν 2 μορφές GDH με διαφορετική θερμοευαισθησία, ενώ λίγο αργότερα οι Hussain και συν. (1989) αποκάλυψαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, τέσσερις GDH ισοπρωτεΐνες και εν συνεχεία έδειξαν πως σε κύτταρα από γλοίωμα εκφράζεται μόνο μία από αυτές. Αναμενόμενο ήταν να τεθεί το ερώτημα αν αυτές οι διαφορετικές ισομορφές είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων ή προϊόντα του ίδιου γονιδίου που έχουν υποστεί διαφορετική επεξεργασία είτε σε μεταγραφικό

είτε σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο. Μέχρι τότε ήταν γνωστό πως η έκφραση της GDH1 στον άνθρωπο οφειλόταν στο γονίδιο *GLUD1*, ένα γονίδιο κυτταρικής οικονομίας (εκφράζεται σε όλους τους ιστούς) που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 10q23.3, έχει μέγεθος 45kb και περιέχει 13 εξόνια (Mavrothalassitis και συν. 1988, Anagnou και συν. 1993, Deloukas και συν. 1993). Τελικά, το 1994 οι Shashidharan και συν. ανίχνευσαν σε βιβλιοθήκη cDNA από ανθρώπινο αμφιβληστροειδή ένα καινούριο cDNA που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο χωρίς ιντρόνια και που εδράζεται στο χρωμόσωμα Χ. Το νέο αυτό γονίδιο ονομάστηκε *GLUD2* και έπειτα από απομόνωση ολικού RNA από διάφορους ιστούς και χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης διαπιστώθηκε πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *GLUD2* εκφράζεται στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή στους όρχεις και σε μικρότερο βαθμό, στον εγκέφαλο. Μελέτες που ακολούθησαν και πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριό μας έδειξαν πως το *GLUD2* εκφράζεται και σε άλλους ιστούς (Spanaki και συν. 2014, Spanaki και συν. 2015).

Όπως έχει γίνει αντιληπτό, στον άνθρωπο υπάρχουν 2 λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν την γλουταμινική αφυδρογονάση, το *GLUD1* και το *GLUD2*. Το γονίδιο *GLUD1* είναι ορθόλογο του βασικού γονιδίου για τη γλουταμινική αφυδρογονάση των θηλαστικών. Το γονίδιο *GLUD2* εκφράζεται μόνο στα ανώτερα πρωτεύοντα συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση Xq.24q.25.

26



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης της γλουταμικής αφυδρογονάσης από τους προκαρυώτες στους κατώτερους ευκαρυώτες, στα θηλαστικά και τελικά στους πιθήκους. Σε κίτρινα πλαίσια επισημαίνονται τα αποκτηθέντα χαρακτηριστικά αλλοστερικής ρύθμισης. Αναδημοσίευση εικόνα από την εργασία των Plaitakis και συν. (2018)

Δημιουργήθηκε μέσω ρετρομετάθεσης μίας περιοχής μήκους ~3.2 kb από mRNA του *GLUD1* στο χρωμόσωμα X (Shashidharan και συν. 1994, Burki και Kaessman 2004), γεγονός που εξηγεί την έλλειψη ιντρονίων.

Φυλογενετικά δεδομένα υποδεικνύουν πως το γονίδιο *GLUD2* εμφανίστηκε πριν από 23 εκατομμύρια χρόνια στον πρόγονο του ανθρώπου και με τη διαδικασία της θετικής επιλογής υπέστη ταχεία προσαρμογή. Οι Burki και Kaessman (2004) αναζήτησαν και συνέκριναν την αλληλουχία του *GLUD2* γονιδίου και των περιοχών που το πλαισιώνουν σε μία σειρά πρωτευόντων. Βάσει του διαθέσιμου φυλογενετικού δέντρου των πρωτευόντων και της πληροφορίας σε ποια από τα είδη υπάρχει ή απουσιάζει το γονίδιο, καθόρισαν πως η ρετρομετάθεση έλαβε χώρα μετά το διαχωρισμό των γενεαλογικών κλάδων των ανθρωποειδών πιθήκων του παλαιού κόσμου και του αφρικανικού πράσινου πιθήκου, αλλά πριν το διαχωρισμό των κλάδων του ανθρώπου και του γίββωνα, εκτιμώντας έτσι την ηλικία του μεταξύ 23 και 18 εκατομμύρια έτη (πριν την εποχή μας). Τέλος έδειξαν ότι το γονίδιο *GLUD2* εξελίχθηκε ταχέως υπό την πίεση της φυσικής επιλογής και απέκτησε μία σειρά από αμινοξικές αλλαγές, που φαίνονται να είναι προϊόν «θετικής επιλογής» (positive selection). Κάποιες από αυτές των 2 ενζύμων (**Εικόνα 6**).

1.7. Λειτουργικές διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2

Το πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) του ενζύμου προβλέπει ένα πολυπεπτίδιο μήκους 558 αμινοξέων. Από αυτά τα 558 αμινοξέα, τα πρώτα 53 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης αντιστοιχούν σε μία αμινοξική ακολουθία που ονομάζεται αλληλουχία «οδηγού πεπτιδίου» (leader peptide) που εξυπηρετεί τη μεταφορά της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων (Kotzamani and Plaitakis 2012, Mastorodemos και συν, 2009). Το οδηγό αυτό πεπτίδιο, εν συνεχεία, αποκόπτεται και παραμένουν τα 505 αμινοξέα που σχηματίζουν την ώριμη πρωτεΐνη και τις υπομονάδες του εξαμερούς. Τα δύο ισοένζυμα διαφέρουν στην κωδικοποίηση 9 εκ των 53 αυτών αμινοξέων. Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να επάγουν πιο αποτελεσματικά τη μετακίνηση της πρωτεΐνης προς το μιτοχόνδριο (Rosso και συν.2008). Όσον αφορά τα 505 αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης, οι δύο αμινοξικές αλληλουχίες διαφέρουν σε 15 αμινοξέα (ομολογία της τάξεως του 97%) - αλλαγές οι οποίες διαφοροποιούν σημαντικά τις δύο ισομορφές όσον αφορά τις κινητικές του ιδιότητες και τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζονται αλλοστερικά.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ADP είναι ο σημαντικότερος αλλοστερικός ενεργοποιητής της γλουταμινικής αφυδρογονάσης. Ενζυμικές μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα επιβεβαίωσαν πως τόσο η GDH1 όσο και η GDH2 ενεργοποιούνται πλήρως παρουσία 1 mM ADP (Shashidharan και συν. 1997) και εμφανίζουν συγκρίσιμες ειδικές δραστικότητες επιβεβαιώνοντας τον παραπάνω ισχυρισμό. Παρ' ολ' αυτά τα δύο ισοένζυμα επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών εμφανίζουν διαφορετική βασική δραστηριότητα (Shashidharan και συν. 1997, Plaitakis και συν. 2000, Plaitakis και συν. 2003, Zaganas και συν. 2009). Η μεν hGDH1 εμφανίζει δραστηριότητα ~35-40 % της μεγίστης σε αντίθεση με την hGDH2 που ευζύμου με 1 mM ADP. Η δραστηριότητα της hGDH2 αυξάνεται κατακόρυφα τόσο με την επίδραση ADP όσο με την επίδραση της L-λευκίνης, παρέχοντας τη δυνατότητα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις των ενεργοποιητών αυτών (ή σε συνεργική επίδρασή τους), να εξομοιωθεί με αυτή της hGDH1, με την οποία έχει παρόμοια μέγιστη ειδική δραστικότητα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η hGDH1 αναστέλλεται ισχυρά από το GTP, η hGDH2 είναι ανθεκτική στην ανασταλτική δράση του GTP παρουσία ή απουσία των ενεργοποιητών της (ADP και L-λευκίνη) (Plaitakis και συν. 2000, Zaganas και Plaitakis 2002). Η αντίσταση αυτή της hGDH2 στο GTP προσφέρει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στο ένζυμο, καθώς επιτρέπει τη λειτουργία του ακόμα και όταν ο κύκλος του κιτρικού οξέος παράγει GTP σε επίπεδα τέτοια που είναι ικανά να απενεργοποιούν πλήρως την hGDH1. Τέλος η hGDH2 είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη σε θερμική απενεργοποίηση και μπορεί να λειτουργήσει σε σχετικά πιο όξινο pH συγκριτικά με την hGDH1. Το σύνολο των μοναδικών αυτών ιδιοτήτων της hGDH2 εικάζεται πως επέτρεψαν την προσαρμογή του νέου ενζύμου στις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις του νευρικού συστήματος κατά τη διάρκεια της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης (Mastorodemos και συν. 2005, Kanavouras και συν. 2007). Η ελάττωση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 αποσκοπεί στο να αποτρέπει τη διατάραξη του κυτταρικού μεταβολισμού λόγω ανεξέλεγκτης λειτουργίας του ενζύμου.



Εικόνα 7: Παρουσίαση των αμινοξικών αντικαταστάσεων και των λειτουργικών συνεπειών τους στο ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο GLUD2. Η αντικατάσταση R443S είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 και την αύξηση της ευαισθησίας της στη θερμική απενεργοποίηση και την αναστολή από οιστρογόνα. Η αμινοξική αντικατάσταση G456A προσέδωσε στο ένζυμο ανθεκτικότητα στην αναστολή από GTP. Αναδημοσίευση από την εργασία των Plaitakis και συν.(2011).

Μελέτες βασισμένες σε στοχευμένες μεταλλαξιογενέσεις στις θέσεις που διαφέρει η hGDH1 από την hGDH2 αποκάλυψαν πως οι μοναδικές ιδιότητες της hGDH2 μπορούν

να αποδοθούν σε 2 αμινοξικές αντικαταστάσεις στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου (Zaganas και Plaitakis 2002, Yang και συν. 2003, Kanavouras και συν. 2007). Η αμινοξική αντικατάσταση Arg443Ser κατέστησε το ένζυμο σχεδόν ανενεργό απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών (βασική δραστηριότητα ~0.1% της μεγίστης) και ευαίσθητο στη θερμική απενεργοποίηση ενώ κατήργησε και την ευαισθησία στην Lλευκίνη. Η δεύτερη αμινοξική αντικατάσταση, Gly456Ala, προσέδωσε στο ένζυμο ανθεκτικότητα σε αναστολή από GTP, τόσο παρουσία όσο και απουσία ADP. Ωστόσο οι δύο αυτές αμινοξικές αντικαταστάσεις δεν επαρκούν για να εξηγήσουν τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης. Είναι συνετό λοιπόν να υποθέσουμε πως και οι υπόλοιπες αμινοξικές αντικαταστάσεις επηρέασαν τη λειτουργία του ενζύμου και καθόρισαν τελικά της μοναδικές ιδιότητες της hGDH2 (**Εικόνα 7**).

1.8. Έκφραση της GDH σε νευρικούς ιστούς πειραματόζωων

Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει πως η γλουταμική αφυδρογονάση παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια τόσο στην κατανομή όσο και στα επίπεδα έκφρασης στις διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος των ζώων. Μελέτες των Leon και Clark (1984) αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα της GDH προερχόμενης από συναπτικά μιτοχόνδρια σε σχέση με τα ελεύθερα – μη συναπτικά- μιτοχόνδρια. Οι Rothe και συν. (1983) έδειξαν πως στο μετά τη γέννηση στάδιο ανάπτυξης των αρουραίων η ενζυμική ενεργότητα της GDH αυξάνεται κατά 5.2 φορές στον ιππόκαμπο των νεαρών ζώων και 2.3 φορές στον εγκεφαλικό φλοιό. Η αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με τη συναπτογένεση και την ωρίμανση των γλουταματεργικών δομών. Οι Zaganas και συν. (2001) μελέτησαν τα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από κυτταροκαλλιέργιες αστροκυττάρων και νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού και της παρεγκεφαλίδας μυών και βρήκαν πως τα αστορκυτταρικά εκχυλίσματα εμφάνιζαν υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα. Οι Aoki και συν. (1987) πραγματοποίησαν μία εκτεταμένη μελέτη της έκφρασης της GDH στον εγκέφαλο αρουραίων και διαπίστωσαν πως η GDH εκφράζεται στα αστροκύτταρα και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων της γλοίας, κυρίως σε περιοχές με έντονη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση. Τόσο οι Wenthold και συν. (1987) όσο και οι Rothe και συν. (1994) έδειξαν πως η GDH εκφράζεται στα γλοιακά κύτταρα Bergmann αρουραίων.

1.9. Έκφραση των hGDH1 και hGDH2 στους ανθρώπινους ιστούς

Η έκφραση της γλουταμινικής αφυδρογονάσης διαφοροποιείται σημαντικά από ιστό σε ιστό (Schmidt και Schmidt 1963, Botman και συν. 1982, Treberg και συν. 2014. Το ήπαρ, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια και ο πλακούντας είναι τα όργανα με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (Smith και συν. 1975, Schmidt και Schmidt 1963, Rothe και συν. 1994, Treberg και συν. 2014, Spanaki και συν. 2014, Spanaki και συν. 2015α). Η GDH εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενζυμική δραστικότητα στο ήπαρ, όπου το ένζυμο αποτελεί το 1% της συνολικής πρωτεΐνης. Στους υπόλοιπους ιστούς η δραστηριότητα της GDH είναι χαμηλότερη. Υπολογίζεται πως το περιεχόμενο της GDH του ανθρώπινου νεφρού και εγκεφάλου αντιστοιχεί στο 20-25 % του περιεχομένου στο

1.10. Έκφραση στους περιφερικούς ιστούς

Η κατασκευή ειδικών αντισωμάτων ικανών να διακρίνουν μεταξύ των δύο ισοενζύμων έχουν καταστήσει δυνατή τη μελέτη της ειδικής έκφρασης του κάθε ισοενζύμου σε ιστούς προερχόμενους από άνθρωπο.

Στο ήπαρ, παρατηρείται υψηλή έκφραση της hGDH1 στα ηπατοκύτταρα. Το στικτό πρότυπο έκφρασης της hGDH1 στα ηπατικά κύτταρα υποδηλώνει εντοπισμό του ενζύμου στα μιτοχόνδρια (Spanaki και συν. 2015). Δεν διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη έκφραση της hGDH2 στο ήπαρ, γεγονός το οποίο συνάδει με μελέτες mRNA που δείχνουν έκφραση μόνο της hGDH1 στο ήπαρ (Shashidharan και συν. 1994).



Εικόνα 8: Ανοσοϊστοχημεία με χρωμογόνο DAB σε μονιμοποιημένες τομές ανθρώπινου ήπατος. Ανιχνεύεται μόνο η hGDH1 και σχεδόν καθόλου η hGDH2. Αναδημοσίευση από εργασία Spanaki και συν. (2015).

Στους νεφρούς, υπάρχει ισχυρό πρότυπο έκφρασης τόσο της hGDH1 όσο της hGDH2 στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρικού φλοιού, ενώ τα δύο ισοένζυμα εκφράζονται ασθενέστερα στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια.



Εικόνα 9: Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένες τομές ανθρώπινου νεφρού που αναδεικνύει την έκφραση της hGDH2 με χρωμογόνο DAB. Η hGDH2 εκφράζεται στα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων ενώ διαπιστώνεται απουσία χρώσης στο σπείραμα. Αναδημοσίευση από εργασία Spanaki και συν. (2014).

Τόσο η hGDH1 τόσο και η hGDH2 ανευρίσκονται σε κύτταρα των τριών στεροειδοπαραγωγών ζωνών (σπειροειδής, στηλιδωτή, δικτυωτή) του φλοιού των επινεφριδίων (Spanaki και συν. 2015) με το πρότυπο έκφρασης των δύο συνενζύμων να ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό. Στο μυελό των επινεφριδίων τα χρωμιόφιλα κύτταρα που εκκρίνουν κατεχολαμίνες, δεν εμφανίζουν ανοσοδραστικότητα για τα 2 ένζυμα. Οι συμπαθητικοί νευρώνες όμως εκφράζουν και τις 2 ισομορφές της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης.



Εικόνα 10: Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης ανθρώπινων επινεφριδίων που αναδεικνύουν την έκφραση της hGDH1 και hGDH2 με χρωμογόνο DAB. Σημαντική έκφραση της hGDH1 και hGDH2 διαπιστώνεται και στις τρεις στιβάδες του φλοιού των επινεφριδίων. Αντίθετα ο μυελός των επινεφριδίων δεν φαίνεται να εκφράζει ούτε την hGDH1 ούτε την hGDH2. Αναδημοσίευση από την εργασία των Spanaki και συν. (2015).

Όσον αφορά την ανθρώπινη ωοθήκη, τα δύο ισοένζυμα ανιχνεύονται εξίσου σε όλα τα ορμονοπαραγωγά κύτταρα (κύτταρα ωοθυλακίων και κύτταρα έσω θήκης) ενώ κύτταρα

που στερούνται ενδοκρινούς λειτουργίας (όπως τα κύτταρα της έξω θήκης και τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του ωοθηκικού στρώματος) εκφράζουν μόνο την hGDH1.



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης ιστού ανθρώπινης ωοθήκης με ειδικά αντι-hGDH1 και αντι-hGDH2 αντισώματα και χρωμογόνο DAB. Ενώ η hGDH1 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα ενός τριτογενούς ωοθυλακίου, η hGDH2 εκφράζεται κυρίως στα ορμονοπαραγωγά κύτταρα της έσω θήκης (ti) ενώ απουσιάζει από την έξω θήκη (te) και τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του στρώματος (s). Και οι δύο ισομορφές του ενζύμου εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα που συνιστούν το κυβοειδές ή πολυστιβαδωτό επιθήλιο γύρω από τα πρωτογενή και τα τριτογενή ωοθυλάκια καθώς και στο κυτταρόπλασμα των primordial ωοκυττάρων. Αναδημοσίευση από εργασία Spanaki και συν. (2015).

Στον όρχη, η hGDH2 εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli των σπερματοφόρων σωληναρίων και σε μικρότερο βαθμό στα στεροειδογόνα κύτταρα Leydig. Η hGDH1 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα Leydig. Τα δύο ισοένζυμα έχουν στικτό πρότυπο έκφρασης ενδεικτικό μιτοχονδριακής εντόπισης. Καμία από τις δύο μορφές της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης δεν εκφράζεται στα ανώριμα σπερματοκύτταρα (spermatogonia, spermatozoa).
Στον ανθρώπινο πλακούντα τα ορμονοπαραγωγά κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης που παράγουν προγεστερόνη και οιστριόλη εμφανίζουν ισχυρή ανοσοδραστικότητα και για τις 2 μορφές της hGDH ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα των εμβρυικών τριχοειδών είναι θετικά μόνο για την hGDH1.

Όσον αφορά τον προστάτη, τα κύτταρα του προστατικού αδένα εκφράζουν την hGDH αλλά όχι την hGDH2.



Εικόνα 12: Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης ανθρώπινου όρχη όπου αναδεικνύεται σημαντική έκφραση της hGDH2 στα κύτταρα Sertoli των σπερματοφόρων σωληναρίων του όρχεος. Αντίθετα η hGDH1 φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα Leydig. Τα κύτταρα Sertoli δεν παρουσιάζουν έκφραση της hGDH1. Τα σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα διαφόρων σταδίων ωρίμανσης δεν εκφράζουν καμία από τις δύο ισομορφές του ενζύμου. Αναδημοσίευση από εργασία Spanaki και συν. (2015).



Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό σε τομές παραφίνης ώριμου ανθρώπινου πλακούντα. Έκφραση τόσο της hGDH1 όσο και της hGDH2 διαπιστώθηκε στην συγκυτιοτροφοβλάστη (s) του ανθρώπινου πλακούντα. Η hGDH1, σε αντίθεση με την hGDH2, εκφράζεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των εμβρυικών τριχοειδών αγγείων (e). Αναδημοσίευση από εργασία Spanaki και συν. (2015).

Συνοψίζοντας, τα όργανα στα οποία η hGDH1 και hGDH2 έχουν ίδιο πρότυπο έκφρασης και συνεντοπίζονται στους ίδιους κυτταρικούς πληθυσμούς είναι οι νεφροί και τα επινεφρίδια, ενώ στο ήπαρ, στις ωοθήκες, τον πλακούντα, τους όρχεις και τον προστάτη, το κυτταρικό πρότυπο έκφρασης είναι διαφορετικό για κάθε ισομορφή του ενζύμου.

1.11. Έκφραση της GDH στον εγκέφαλο

Η έκφραση των hGDH1 και hGDH2 έχει μελετηθεί σε ιστολογικά παρασκευάσματα ανθρώπινου εγκεφαλικού φλοιού με την τεχνική του διπλού ανοσοφθορισμού (Spanaki και συν .2016, Spanaki και συν. 2010, Lai και συν. 1986) και τη χρήση αντισωμάτων ειδικών για το κάθε ισοένζυμο σε συνδυασμό με αντισώματα για ποικίλους κυτταρικούς/υποκυτταρικούς δείκτες. Το περικάρυο και οι αστροκυτταρικές αποφυάδες των αστροκυττάρων της φαιάς και της λευκής ουσίας του εγκεφάλου εκφράζουν τόσο τη hGDH1 όσο και τη hGDH2, εντός κυτταροπλασματικών δομών που είναι συμβατές με μιτοχόνδρια. Η hGDH1 ανιχνεύεται επίσης στην πυρηνική μεμβράνη ολιγοδενδροκύτταρων, στα οποία απουσιάζει η hGDH2. Αντίθετα, η hGDH2 φαίνεται να εκφράζεται σε νευρώνων (θετικοί σε σήμανση με NeuN) του εγκεφαλικού φλοιού. Ειδικότερα η hGDH2 εκφράζεται σε νευρώνες μεγάλου μεγέθους και πυραμιδική μορφολογία εντός δομών που είναι σύμμορφες με μιτοχόνδρια και εντοπίζονται στην περιφέρεια των κυττάρων αυτών. Επίσης εκφράζεται με διαφορετικό πρότυπο, στην πυρηνική μεμβράνη νευρώνων μικρού μεγέθους και στρογγυλής μορφολογίας. Η χρώση για hGDH1 είναι ιδιαίτερα ασθενής στους νευρώνες ή απουσιάζει εντελώς, επαληθεύοντας τα αποτελέσματα των μελετών των Aoki και συν. (1987) σε εγκεφάλους αρουραίων.



Εικόνα 14: Διπλός ανοσοφθορισμός σε μη μονιμοποιημένες τομές ανθρώπινου εγκεφάλου με αντισώματα κατά των hGDH1 και hGDH2 με NeuN (νευρωνικός δείκτης) και GFAP (αστροκυτταρικός δείκτης). Η hGDH1 φαίνεται να εκφράζεται στα αστροκύτταρα και σε πυρήνες μη νευρωνικών κυττάρων ενώ η hGDH2 εκφράζεται σε αστροκύτταρα και σε νευρικά κύτταρα. Αναδημοσίευση από την εργασία των Spanaki και συν. (2016)

1.12 Λειτουργικοί ρόλοι των ανθρώπινων μορφών της GDH σε διαφορετικούς ιστούς

Ο ρόλος της GDH στη βιολογία του κυττάρου δεν έχει αποσαφηνιστεί. Έχει γίνει όμως σαφές πως διαφορετικού κυτταρικοί πληθυσμοί εξυπηρετούν τις ιδιαίτερες ανάγκες τους μέσω του μονοπατιού της GDH (Spanaki και συν. 2016). Το πρότυπο έκφρασης των hGDH1 και hGDH2 στους ανθρώπινους ιστούς είναι πολυδιάστατο και παρουσιάζει χαρακτηριστική ετερογένεια τόσο μεταξύ διαφορετικών ιστών όσο και μεταξύ κυτταρικών πληθυσμών του ίδιου ιστού.

Στο ήπαρ, η υψηλή έκφραση της hGDH1 επιτρέπει στα ηπατοκύτταρα να πραγματοποιήσουν πολλαπλές μεταβολικές διεργασίες όπως το μεταβολισμό της αμμωνίας και τη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας. Καθώς οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας και του γλουταμικού στο περιβάλλον των ηπατοκυττάρων μεταβάλλονται συνεχώς, η αντίδραση της GDH ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων μπορεί να λάβει χώρα και προς τις δύο κατευθύνσεις (Krebs και Gascoyne 1968, Nissim και συν. 1999, Cooper και συν. 1987, 1988). Σε ιστούς που υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση της αμμωνίας είναι χαμηλή, και δεδομένου της χαμηλής συγγένειας του ενζύμου για το συγκεκριμένο υπόστρωμα - όπως αυτή εκφράζεται από την υψηλή Km (20-30mM), δεν ευνοείται η αντίδραση προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης (σύνθεση γλουταμικού), ειδικά όταν υπάρχει οξέωση.

Στο πάγκρεας, η GDH ενέχεται στον έλεγχο έκκρισης της ινσουλίνης. Μέσω της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού από την GDH παρέχεται α-κετογλουταρικό στον κύκλο του κιτρικού οξέος με συνέπεια την αύξηση παραγωγής ATP και άρα του λόγου ATP/ADP- ο οποίος οδηγεί μέσω ευαίσθητων σε ATP -διαύλων K⁺ στην εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης των β-κυττάρων με αποτέλεσμα την έκκριση ινσουλίνης, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που διεγείρει την εξωκυττάρωση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα η γλυκόζη (Sener και συν. 1981). Μεταλλάξεις που καθιστούν την hGDH1 ανθεκτική στην αναστολή από το GTP και για αυτό δραστήρια ευθύνονται για

39

το σύνδρομο υπερινσουλινισμού/υπεραμμωνίας (ΗΙ/ΗΑ) (Stanley και συν. 1998). Οι πάσχοντες παρουσιάζουν επεισόδια υπογλυκαιμίας (κυρίως μετά από την κατανάλωση γεύματος υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνης) λόγω αυξημένης έκκρισης ινσουλίνης.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί τόσο η hGDH1 όσο και η hGDH2 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα διαφόρων στεροειδοπαραγωγών οργάνων, όπως τα επινεφρίδια χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των δύο ισοενζύμων. Λόγω του συνεντοπισμού στους ίδιους κυτταρικούς πληθυσμούς των δύο ισομορφών της hGDH με το μιτοχονδριακό ένζυμο P450scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme) που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη (το πρώτο και βασικό στάδιο της σύνθεσης των στεροειδών ορμονών), πιθανολογείται πως η GDH προσφέρει το απαραίτητο για τη σύνθεση των στεροειδών NADPH (Spanaki και συν. 2015).

Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της hGDH2 στα κύτταρα Sertoli των όρχεων, ενισχύουν τον υποστηρικτικό ρόλο που έχουν τα εν λόγω κύτταρα στη θρέψη των σπερματοκυττάρων (Spanaki και συν. 2010). Η hGDH2 επιτρέπει το μεταβολισμό του γλουταμικού ακόμη και σε συνθήκες ενεργειακής επάρκειας, και έτσι πλεονεκτεί έναντι της hGDH1, οι λόγοι όμως για τους οποίους απουσιάζει πλήρως η hGDH1 δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμα.

Στους νεφρούς η ισορροπία της αντίδρασης της GDH εξωθείται προς την οξειδωτική απαμίνωση (σύνθεση NH₄⁺ και α-KG) συνεισφέροντας κατά τουλάχιστον 25% στην παραγωγή αμμωνίας (Van de Poll και συν. 2004). Με τον τρόπο αυτό η GDH ενέχεται στη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, κυρίως υπό συνθήκες οξέωσης. Έτσι, ενώ σε συνθήκες οξεοβασικής ισορροπίας το ένζυμο είναι σχετικά αδρανές, σε περιπτώσεις οξείας ή χρόνιας οξέωσης, ενεργοποιείται και προάγεται η έκφρασή της GDH. Οι λόγοι για τους οποίους στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρικού φλοιού εκφράζονται και οι δύο ισομορφές του ενζύμου δεν είναι πλήρως κατανοητοί, πιθανολογείται όμως πως οι μοναδικές ιδιότητες της hGDH2 να επιτρέπουν τη λειτουργία της σε συνθήκες που η hGDH1 είναι σε αναστολή (Spanaki και Plaitakis 2012).

Στον εγκέφαλο, τα αυξημένα επίπεδα γλουταμικού σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα αμμωνίας, ευνοεί την πορεία της οξειδωτικής απαμίνωσης στην αντίδρασης της GDH. Στα αστροκύτταρα η GDH θεωρείται πως συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλουταμικού που απελευθερώνεται στη σύναψη κατά τη διάρκεια της διεγερτικής νευροδιαβίβασης (Schousboe και συν. 2014). Στον άνθρωπο, οι διαφορετικές ρυθμιστικές ιδιότητες των δύο ισοενζύμων, επιτρέπουν στα αστροκύτταρα να μεταβολίζουν τον νευροδιαβιβαστή γλουταμικό ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου και τις συνθήκες pH του περιβάλλοντος που μεταβάλλονται συνεχώς. Έτσι, ενώ η hGDH1 λειτουργεί σε συνθήκες ενεργειακής ένδειας και αναστέλλεται όταν υπάρχει περίσσεια ενέργειας, η hGDH2 η οποία δεν αναστέλλεται από το GTP, λειτουργεί αποτελεσματικά τόσο σε συνθήκες ενεργειακής επάρκειας (που η GDH1 είναι σε καταστολή) (Mastorodemos και συν. 2005) όσο και στις συνθήκες οξέωσης που επικρατούν εντός του αστροκυττάρου κατά τη διάρκεια της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης. Είναι πιθανό στα αστροκύτταρα που υποστηρίζουν την ενεργειακά απαιτητική γλουταματεργική νευροδιαβίβαση και εκφράζουν και τις δύο ισομορφές, η hGDH2 να συμπληρώνει την hGDH1 στο ρόλο τους στην ανακύκλωση του γλουταμικού και την υποστήριξη των νευρώνων. Με το σκεπτικό αυτό, η hGDH1 και η hGDH2 να ενεργοποιούνται με τα υψηλά επίπεδα του ADP που κυριαρχούν στο αστροκύτταρο κατά τη διάρκεια της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης και η hGDH2 να συνεχίζει να μεταβολίζει το γλουταμικό παρά την αναπλήρωση της ενέργειας μέσω του κύκλου Krebs και την αυξημένη παραγωγή GTP που αναστέλλει πλήρως την hGDH1.

Η έκφραση της hGDH2 στους νευρώνες (και στις απολήξεις αυτών) θεωρείται πως προάγει τη σύνθεση του προ-συναπτικού γλουταμικού ενισχύοντας τη διεγερτική νευροδιαβίβαση. Δεν έχει καθοριστεί ακόμα με ποιο τρόπο η έκφραση της hGDH2 στις νευρικές απολήξεις προάγει τη σύνθεση του γλουταμικού, εικάζεται όμως ότι το ακετογλουταρικό που παράγεται μέσω της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού

41

(προερχόμενο από τα μιτοχόνδρια) μεταφέρεται στο κυτοσόλιο όπου και μετατρέπεται σε γλουταμικό. Επιπρόσθετα, η hGDH2 θεωρείται πως συμμετέχει στην ανάπτυξη και ωρίμανση του νευρικού συστήματος προάγοντας τη σύνθεση λιπιδίων στους νευρώνες (Li και συν. 2016).

1.13 GDH και μοριακός μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης

Η άρτια λειτουργία του β-κυττάρου εξαρτάται από την έκκριση ινσουλίνης στο σωστό χρονικό σημείο και σε ικανά ποσά ανάλογα με το ερέθισμα. Το β- κύτταρο αντιδρά στο ερέθισμα με αντιστροφή του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης σε δυναμικό ενεργείας, άνοιγμα των εξαρτώμενων από δυναμικό διαύλους ασβεστίου, με αποτέλεσμα εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο και αύξηση της συγκέντρωσής τους στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση αυτή προκαλεί την εξωκυττάρωση των εκκριτικών κοκκίων ινσουλίνης. Η γλυκοζη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης μέσω επαγωγής άμεσων (triggering) ενισχυτικών (amplifying) σηματοδοτικών όσο και μονοπατιών/οδών. Τα δύο μονοπάτια είναι διακριτά και ιεραρχημένα, με το άμεσο μονοπάτι (triggering pathway) να επάγει την ενεργοποίηση του ενισχυτικού μονοπατιού (amplifying pathway).

Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από την γλυκοκινάση και η 6-P-γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα (Matscinsky και συν. 1996) και ακολούθως μπαίνει στον κύκλο του Krebs στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP και συνεπώς του λόγου ATP/ADP. Η αύξηση αυτή οδηγεί στο κλείσιμο των εξαρτώμενων από το ATP διαύλους K⁺ (K_{ATP}) (Rorsman 1997) που αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα υποδοχέα σουλφονυλουρίας (SIR1) και πρωτεΐνης Kir6.2 και οι οποίοι συντηρούν σε μεγάλο βαθμό το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου (επιτρέποντας την έξοδο των ιόντων καλίου). Η αντιστροφή του δυναμικού της μεμβράνης και η έκλυση δυναμικού ενεργείας (επειδή κλείνουν οι KATP δίαυλοι) ανοίγει τους τασιοεξαρτώμενους διαύλους Ca²⁺, ιόντα Ca²⁺ εισρέουν στο κύτταρο και

διεγείρουν την εξωκύττωση ινσουλίνης (Lang 1999, Rorsman 1997). Η αλληλουχία αυτή αποτελεί το μονοπάτι της άμεσης απάντησης στην αύξηση των επιπέδων γλυκόζης (triggering pathway).



Εικόνα 15: Προτεινόμενο μοντέλο σύζευξης μεταβολισμού γλυκόζης και μηχανισμού έκκρισης ινσουλίνης στο β-κύτταρο. Η προσλαμβανόμενη γλυκόζη κατανέμεται στην πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από την γλυκοκινάση (GK). Μέσω της γλυκόλυσης παράγεται πυροσταφιλικό (Pyr) το οποίο εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και εν συνεχεία στον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA cycle). Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μεταφέρονται μέσω του NADH και του FADH2 στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) η οποία είναι εγκατεστημένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με συνέπεια την προώθηση παραγωγής ΑΤΡ. Το παραγόμενο ATP μεταφέρεται στο κυτοσόλιο, αυξάνοντας έτσι το λόγο ATP/ADP. Η έκλυση δυναμικού ενεργείας (επειδή κλείνουν οι ΚΑΤΡ δίαυλοι) ανοίγει τους και επάγεται η αύξηση της ενδοκυττάριας τασιοεξαρτώμενους διαύλους Ca++ συγκέντρωσης των ιόντων Ca++ , η οποία οδηγεί σε έκκριση ινσουλίνης. Τα μόρια που συμμετέχουν στο ενισχυτικό μονοπάτι (amplifying pathway) και τα οποία αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού της γλυκόζης (μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος) συντελούν στην ενίσχυση της δράσης των ιόντων Ca++ στην εξωκύττωση των κυστιδίων ινσουλίνης . Αναδημοσίευση από την εργασία των Karaca και συν. (2011)

Η έκκριση ινσουλίνης γίνεται σε δύο φάσεις. Η άμεση έκκριση ινσουλίνης της πρώτης φάσης προκύπτει από την εξωκύττωση των ήδη ενεργοποιημένων β-κοκκίων (που αποτελούν το 5-10% της αποθηκευμένης στα β-κύτταρα ινσουλίνης) και ενεργοποιείται από την αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου. Η έκκριση ινσουλίνης της δεύτερη φάσης (παρατεταμένη έκκριση) προκύπτει από την εξωκύττωση των κοκκίων που βρίσκονται στο εσωτερικό του β-κυττάρου και απαιτεί επιπρόσθετους παράγοντες οι οποίοι δρουν μέσω του μονοπατιού ενίσχυσης σήματος (amplifying pathway), το οποίο επίσης επάγεται από τη γλυκόζη και είναι ανεξάρτητο από τους K +ATP ελεγχόμενους διαύλους. Το ενισχυτικό αυτό μονοπάτι ενισχύει την εκκριτική απάντηση των β-κοκκίων χωρίς να αυξάνει περαιτέρω την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺.

Πολλαπλές μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο του γλουταμικού στην γλυκοζοεξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης μέσω του μονοπατιού ενίσχυσης σήματος (Bertrand και συν. 2002, Hoy και συν. 2002, Liu και συν. 2003, MacDonald και Fahien, 2000, Maechler και Wollheim 1999). H GDH εμπλέκεται στη διαχείριση των αποθεμάτων του γλουταμικού χάρη στο διττό ρόλο του ενζύμου να συμμετέχει τόσο σε καταπληρωτικές όσο και σε αναπληρωτικές αντιδράσεις. Συνεπώς το κατά πόσο το ένζυμο συνεισφέρει στην αποικοδόμηση ή τη δημιουργία γλουταμικού εξαρτάται από τον οξειδοαναγωγικό δυναμικό των μιτοχονδρίων, την επάρκεια των υποστρωμάτων (γλυκόζη έναντι αμινοξέων) και σε πιθανές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιούν το ένζυμο.

Η GDH εκφράζεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος και ενέχεται στον μηχανισμό έκκρισης ινσουλίνης (Sener και συν. 1981, Fahien και συν.1988, Stanley και συν. 1998, Li και συν.2014). Η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού από την GDH παρέχει ακετογλουταρικό στον κύκλο του Krebs, οδηγώντας στην αύξηση παραγωγής ATP και συνεπώς του λόγου ATP/ADP. Για να μην υπερλειτουργεί αυτός ο μηχανισμός η GDH βρίσκεται κάτω από την τονική ανασταλτική επίδραση του GTP. Σε περιόδους νηστείας, με τη συνεπακόλουθη μείωση των αποθεμάτων γλυκόζης και άρα του λόγου ATP/ADP, αμινοξέων. Με αυτόν τον τρόπο προσφέρεται ενέργεια στο κύτταρο και συντηρείται ο λόγος ATP/ADP για να διατηρηθεί η έκκριση ινσουλίνης. Η ενεργοποίηση της GDH από λευκίνη (αμινοξύ το οποίο βρίσκεται σε αφθονία σε πρωτεϊνικές τροφές) μετά από γεύμα, διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης με μη γλυκοζο-εξαρτώμενο τρόπο. Εντούτοις, άλλες μελέτες υποστηρίζουν την συμμετοχή της GDH στην έκκριση ινσουλίνης μέσω της παραγωγής γλουταμικού παρά μέσω της αναπληρωτικής αντίστροφης αντίδρασης.

1.14 Ασθένειες που σχετίζονται με τις ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες

Λόγω του σημαντικού ρόλου των hGDH στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού αλλά και των ιστο-ειδικών λειτουργιών που επιτελούν, τυχόν διαταραχές στη ρύθμιση ή τη λειτουργία τους μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση μιας σειράς ασθενειών στον άνθρωπο.

Η πρώτη ασθένεια που σχετίστηκε με την hGDH είναι το σύνδρομο υπερινσουλινισμούυπεραμμωνίας (HI/HA syndrome), το οποίο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπογλυκαιμικών επεισοδίων μετά από λήψη γεύματος πλούσιο σε πρωτεΐνες (Paladino και Stanley 2010) και το οποίο οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της GLUD1 που καθιστούν το ένζυμο ανθεκτικό στην αναστολή από το GTP (Stanley και συν. 1998). Η υπερενεργοποίηση της GDH στα β-κύτταρα του παγκρέατος οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης ως αποτέλεσμα της αυξημένης σύνθεσης ATP (Stanley και συν. 1998, Li και συν. 2014). Εκτός των επεισοδίων υπογλυκαιμίας πολλοί ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα σχετιζόμενα με το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως επιληπτικές κρίσεις (ανεξαρτήτως υπογλυκαιμικών επεισοδίων), πνευματική υστέρηση, δυστονία και διαταραχές συμπεριφοράς (Stanley και συν. 1998, Raizen και συν. 2005, Kapoor και συν. 2009). Η αιτιολογία των επιληπτικών κρίσεων δεν είναι πλήρως κατανοητή, παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να σχετίζονται με διεγερτικοτοξικότητα και όχι με ανώμαλη νευρωνική εκφόρτιση. Όσον αφορά τη δυστονία που παρατηρείται στους ασθενείς με τις ρυθμιστικές μεταλλάξεις στο GLUD1 γονίδιο. θεωρείται ότι οφείλεται στην εξάντληση των αποθεμάτων GABA (Bahi-Buisson και συν. 2008, Miyamoto και συν. 2012). Ειδικότερα, η υπερδραστηριότητα της μεταλλαγμένης hGDH1 πιθανόν οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων γλουταμικού που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του GABA, οδηγώντας σε εξασθένιση της διαμεσολαβούμενης από GABA αναστολής.

Οι μεταλλάξεις που οδήγησαν στην αντοχή της hGDH1 στην αναστολή από GTP εντοπίστηκαν αρχικά στα εξόνια 11 και 12 του γονιδίου της GLUD1 (Stanley και συν. 1998, 2001) και στη συνέχεια στα εξόνια 6 και 7 (De Lonlay και συν. 2001). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι σε θέσεις που είτε εμπλέκονται άμεσα στον σχηματισμό του θυλάκου του GTP είτε παρεμποδίζουν τις αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου που προκαλεί το GTP (περιοχές αντένας και περιστρεφόμενης έλικας). Εκτός από τα αυξημένα επίπεδα ATP, η υπερενεργοποίηση της hGDH1 μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της έκκρισης γλυκαγόνου από τα α-κύτταρα (Kribbey και συν. 2014, Anderson και συν. 2017).

Η απορρύθμιση της hGDH1 θεωρείται υπεύθυνη και για μία άλλη μορφή υπερινσουλινισμού (χωρίς υπεραμμωνιαιμία) η οποία προκαλείται από ανεπάρκεια της short-chain-3-hydroxy-acyl-CoA αφυδρογονάσης (SCHAD) η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *HADH1* (Stanley και συν. 2011, De Lonlay και συν. 2005). Έχει δειχθεί πως η SCHAD σχηματίζει σύμπλοκο με την hGDH1 αναστέλλοντας την λειτουργία του ενζύμου (Li και συν. 2010), οπότε απουσία της SCHAD η hGDH1 ενεργοποιείται.

Διαταραχές στη ρύθμιση της GDH στον εγκέφαλο σχετίζονται και με άλλες μορφές επιληψίας. Ο Malthankar-Phatak και συν. (2006) βρήκαν πως σε ασθενείς με κροταφική επιληψία (mesial temporal lobe epilepsy) η δραστηριότητα της GDH στον φλοιό και στον ιππόκαμπο ήταν μειωμένη ενώ οι Sherwin και συν. (1999) έδειξαν πως σε ενεργές επιληπτογόνες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού ασθενών με γενικευμένες και εστιακές επιληψίες η δραστηριότητα της GDH είναι σαφώς αυξημένη.

46

Πρόσφατα, η απορρύθμιση της hGDH2 έχει βρεθεί να επηρεάζει την έναρξη της νόσου του Parkinson (Plaitakis και συν. 2010). Ένας σπάνιος πολυμορφισμός (T1492G) στη ρυθμιστική περιοχή της hGDH οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση της Ser445 από Ala με αποτέλεσμα την αύξηση της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου (gain of function mutation). Άνδρες ημιζυγώτες για τον πολυμορφισμό T1492G εμφανίζουν την νόσο Parkinson 6-13 χρόνια νωρίτερα σε σχέση με ασθενείς που δε φέρουν τον πολυμορφισμό (Plaitakis και συν. 2010). Δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχετισμός στην ηλικία έναρξης της νόσου σε γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία. Λειτουργικές ενζυμικές μελέτες της μεταλλαγμένης αυτής μορφής της hGDH2 έδειξαν πως το ένζυμο έχει αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα (Plaitakis και συν. 2010), υποδηλώνοντας πως μέσω της hGDH2, απορρυθμίζεται ο μεταβολισμός του γλουταμικού με συνέπεια την επιτάχυνση της εν εξελίξει νευροεκφύλισης της νόσου του Parkinson. Η υπερδραστηριοποιημένη Ala445-hGDH2 αναστέλλεται ισχυρά από τις θηλυκές στεροειδείς ορμόνες, οπότε η αναστολή αυτή από τα οιστρογόνα ίσως να προστατεύει τις γυναίκες ασθενείς με ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό T1492G. Τόσο η hGDH1 όσο και η hGDH2 φαίνεται να ενέχονται στην παθογένεση νοσημάτων που σχετίζονται με την απορρύθμιση του μεταβολισμού του γλουταμικού καθώς τόσο υψηλές όσο και χαμηλές συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή αυτού είναι βλαβερές για τους ιστούς του νευρικού συστήματος.

Μία ακόμα νευροεκφυλιστική νόσος που φαίνεται να σχετίζεται με διαταραχές των επιπέδων του γλουταμικού λόγω μη φυσιολογικής ρύθμισης από τη GDH είναι η νόσος Alzheimer (Burbaeva και συν. 2005). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός πως η στοχευμένη υπερέκφραση της hGDH1 σε νευρώνες διαγονιδιακών μυών οδηγεί σε νευροεκφύλιση της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου με την την ηλικία.

Μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση της GDH είναι αυξημένη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενών με διαφόρου είδους νεοπλασίες. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κυτταρική σειρά H1299) και καρκινικά κύτταρα μαστού (MDAMB231) έδειξαν πως η παραγωγή του α-κετογλουταρικού γίνεται κυρίως μέσω του μονοπατιού της GDH (Jin και συν. 2015) και πως η απαλοιφή της GDH1 ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό τον καρκινικών κυττάρων και συνεπώς την ανάπτυξη του όγκου. Η GDH έχει συσχετιστεί και με τη βιολογία του ανθρώπινου γλοιώματος. Έχει δειχθεί πως κύτταρα γλοιώματος τα οποία φέρουν σωματικές μεταλλάξεις της IDH1 (isositrate dehydrogenase 1), του ενζύμου που μετατρέπει το ισοκιτρικό σε α-κετογλουταρικό, παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης (upregulation) των γονιδίων *GLUD1* και *GLUD2* (Chen και συν. 2014). Η προσαρμογή αυτή οδηγεί τα κύτταρα γλοιώματος να χρησιμοποιούν ως εναλλακτικό τρόπο παραγωγής του ακετογλουταρικού το μονοπάτι της GDH, το οποίο χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό τους. Η αναστολή της έκφρασης των *GLUD1* και *GLUD2* σε κύτταρα γλοιώματος που φέρουν τη μετάλλαξη IDH1-R132H ελαττώνει σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου (Chen και συν. 2014) Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη ενός πειραματικού διαγονιδιακού μοντέλου μυός στον οποίο έχει εισαχθεί με τυχαία ένθεση μέσω της τεχνολογίας BAC μέρος του ανθρώπινου χρωμοσώματος Χ που περιλαμβάνει το γονίδιο GLUD2 και τις προκινητικές και ρυθμιστικές του ακολουθίες. Το διαγονιδιακό αυτό μοντέλο φέρει μαζί με το γονίδιο *Glud1* που κωδικοποιεί την ενδογενή γλουταμική αφυδρογονάση του μυός (ομόλογη της hGDH1) και ένα δεύτερο γονίδιο που κωδικοποιεί την hGDH2.

Στόχοι της διατριβής ήταν :

- η επιβεβαίωση της έκφρασης του διαγονιδίου στους ιστούς του διαγονιδιακού ζώου με
 - μελέτες ανοσοαποτύπωσης ανά ιστό και σε επιμέρους περιοχές
 ιστών με ειδικό ενδιαφέρον (π.χ. εγκέφαλος)
 - μελέτες ανοσοϊστοχημείας και διπλού ανοσοφθορισμού με
 ειδικούς κυτταρικούς δείκτες
- η επίδραση της έκφρασης της GDH2 διαγονιδιακής πρωτεΐνης στη συνολική ενζυμική ενεργότητα κάθε ιστού με in vitro ενζυμικές μελέτες
- 3. η αναγνώριση του ιστικού και κυτταρικού προτύπου της διαγονιδιακής πρωτεΐνης hGDH2 στο πειραματικό μας μοντέλο και η σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα του ανθρώπου με το ερώτημα αν έχει επιτευχθεί ο στόχος για ένα εξανθρωποποιημένο GLUD2 διαγονιδιακό μοντέλο που θα επιτρέψει την μελέτη και κατανόηση του ρόλου της hGDH2 στη βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού
- 4. η χαρτογράφηση του φαινοτύπου του ζώου με
 - αναπτυξιακές μετρήσεις (γέννηση, ανάπτυξη, στερεοτυπική συμπεριφορά, τρίχωμα, λήψη τροφής, αύξηση βάρους, αναπαραγωγή, επιβίωση)

- b. βιοχημικές μετρήσεις (μέτρηση γλυκόζης, ινσουλίνης)
- c. μορφολογικές μελέτες περιφερικών οργάνων και νευρικού ιστού
 - i. ιστολογία βασικών οργάνων που εκφράζουν την hGDH2
 - ii. λεπτομερείς μορφολογικές μελέτες νευρικού συστήματος
 - αδρή μορφολογία ιστολογικές και ανοσοιστοχημικές χρώσεις
 - λεπτή μορφολογία ΚΝΣ-χρώση Golgi για μέτρηση δενδριτικών ακάνθων
- d. συμπεριφορικές μελέτες
 - ί. κινητικότητα
 - ii. άγχος
 - iii. μνήμη
 - iv. πόνος

3.1. Διαχείριση πειραματόζωων - διασταυρώσεις

Τα πειραματόζωα (μύες) που χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο της μελέτης στεγάστηκαν υπό τις προβλεπόμενες συνθήκες σε περιβάλλον θερμοκρασίας 22±2 °C, σχετικής υγρασίας 55±5% και εναλλαγής του κύκλου σκότους/φωτός κάθε 12 ώρες. Οι κλωβοί φύλαξης είχαν τις κατάλληλες διαστάσεις, έφεραν στρωμνή και την κατάλληλη ποσότητα τροφής και νερού. Αποφεύχθηκε η εκτροφή πολλών αρσενικών μυών στον ίδιο κλωβό λόγω αυξημένης επιθετικότητας μεταξύ τους. Οι πειραματικές μελέτες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των πρωτοκόλλων προστασίας και ορθής μεταχείρισης των ζώων. Τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν λάβει την έγκριση της επιτροπής πειραματόζωων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

3.2 Γονοτύπηση

Απομόνωση DNA από ιστούς

Τμήμα της ουράς ζώου ηλικίας 10 ημερών, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενετικού υλικού και την γονοτύπηση για την τεκμηρίωση της ύπαρξης του αλληλουχίας του διαγονιδίου στο DNA του ζώου.

Πειραματική διαδικασία:

- Η ουρά μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου eppendorf όγκου 1,5 ml που περιέχει
 400 μL διαλύματος λύσης.
- (tail lysis buffer : 50mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl, 1% SDS)
- Προσθήκη 10 μL πρωτεϊνάσης K (20 μg/μL) και επώση στης 55 °C O/N.
- Προσθήκη 100 μL 5M NaCl και στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση για 10 min.

- Φυγοκέντρηση στα 13000rpm, RT για 10 min απομόνωση του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για την ανάμειξη των
 2 φάσεων.
- Επώαση στους 4 °C για 30 min
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm, 4 °C για 5 min και απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
- Πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη
- Φυγοκέντρηση στα 13000rpm, RT για 2 min και απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 30 μ L ddH₂O.

Ποσοτικός προσδιορισμός και εκτίμηση καθαρότητας DNA

2 μL δείγματος (χωρίς προηγούμενη αραίωση) τοποθετούνται σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) τύπου Nanodrop. Ακουλουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm όπου και λαμβάνονται αυτόματα τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας (λόγος A₂₆₀/A₂₈₀) του εκάστοτε δείγματος.

Ενίσχυση του ενθέματος με την τεχνική PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των Tg13 και Tg32 ζώων είναι ειδικοί για την αλληλουχία του GLUD2 γονιδίου και παρουσιάζονται παρακάτω:

F: 5'-TGAATGCTGGAGAGTGACA-3'

R: 5'-TGGATTGACTTGTTGAGAATGG-3'

Αναγνωρίζουν και υβριδοποιούνται σε ειδικές για την GLUD2 περιοχές και πολλαπλασιάζουν μία περιοχή μεγέθους 421 bp.

PCR mix	
Buffer C Kapa Taq 5x	4
MgCl ₂ 25 mM	1
dNTPs 2 mM	2
Primer Forward 5pmol/µL	1
Primer Reverse 5pmol/µL	1
Kapa Taq DNA polymerase	0.2
DNA template 50ng/µL	1
ddH ₂ O	11.8
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20

Πίνακας 1: Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για μία αντίδραση PCR συνολικού όγκου 20 μL

Πρόγραμμα πολλαπλασιασμού τμήματος DNA μεγέθους 421bp:

Αρχική αποδιάταξη	95° για 5 min
Αποδιάταξη	95° για 1 min
Υβριδισμός Εκκινητών	56° για 1 min 🤳 40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72° για 1 min
Τελική Επιμήκυνση	72° για 10 min
Αποθήκευση δειγμάτων	4° ∞

Ποιοτική ανάλυση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ενός μίγματος γραμμικών μορίων DNA σε ζώνες, οι οποίες γίνονται ορατές με προσθήκη στο πήκτωμα χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Τα δείγματα αναμιγνύονται με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος φόρτωσης (4x Orange G loading dye) και ηλεκροφορούνται σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει τη χρωστική Gel RED (Gel RED Nucleic Acid 10.000X, Biotium, CA, USA) (3μL/100ml διαλύματος αγαρόζης) στα 100 V για 1h.

3.3. Ομογενοποίηση ιστών και απελευθέρωση κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Τα πειραματόζωα υποβάλλονται σε ευθανασία με εξάρθρωση της αυχενικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Με προσοχή αφαιρούνται οι απαιτούμενοι ιστοί και ξεπλένονται σε τρυβλίο που περιέχει διάλυμα 1Χ PBS και στη συνέχεια κόβονται σε μικρότερα τμήματα και τοποθετούνται στον πάγο αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή τοποθετούνται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

Οι απομονωμένοι ιστοί ζυγίζονται και αναμιγνύονται με τον απαιτούμενο όγκο διαλυμάτων λύσης ώστε να επιτευχθεί 20% διάλυμα ιστού (w/v) στο οποίο περιέχονται αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail, Calbiochem). Στη συνέχεια ο κάθε ιστός ομογενοποιείται μηχανικά σε γυάλινο ομογενοποιητή κωνικού σχήματος τύπου Dounce.

Πειραματική διαδικασία:

- Ομογενοποίηση δειγμάτων με χρήση διαλύματος λύσης
- Επώαση σε πάγο για 30 min
- Φυγοκέντρηση σε 11.000 x g για 20 min στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκείμενου (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) σε σωληνάριο τύπου
 Eppendorf όγκου 1,5 ml

10X PBS	
1,37 M NaCl	
27 mM KCl	
100 mMNaH ₂ PO ₄	
18 mM KH ₂ PO ₄	

Πίνακας 2: Παρασκευή διαλύματος 10X PBS

Lysis Buffer I pH 7,4	Lysis Buffer II pH 7,4
10 mM Tris HCl pH 7,4	10 mM Tris HCl pH 7,4
0,5 mM EDTA	0,5 mM NaCl
1% Triton X-100	1% Triton X-100

Πίνακας 3: Παρασκευή διαλυμάτων λύσης για την ομογενοποίηση ιστικών δειγμάτων

3.4 Ενζυμικές μελέτες

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε φασματοσκοπικά στα 340nm στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού (Colon και συν. 1986). Η μέθοδος στηρίζεται στην ελάττωση της απορρόφησης του NADPH (που παρουσιάζει φάσμα απορρόφησης με κορυφή μεγαλύτερης έντασης στα 340nm) ως συνέπεια της μείωσης της συγκέντρωσης του λόγω κατανάλωσης, κατά την αντίδραση. Η ταχύτητα της αντίδρασης μετράται ως μεταβολή της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου (λόγος dA_{340nm}/dt) στο τμήμα του γραφήματος απορρόφησης-χρόνου όπου η μεταβολή παραμένει γραμμική (κατά κανόνα για 30 sec).

Το μείγμα της πρότυπης αντίδρασης είχε όγκο 1 ml και περιείχε 50 mM Triethanolamine HCl buffer pH 8,0, 100 mM ammonium acetate, 150 mM NADPH και 2,6 mM EDTA (TRA buffer pH 8.0). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Για να καθοριστεί η ειδική δραστικότητα (specific activity) της GDH στα ομογενοποιήματα μετρήθηκε η μέγιστη δραστηριότητα (dA_{340nm}/dt) που εμφανίζει ορισμένος όγκος τους, και συγκεκριμένα η ενζυμική δραστηριότητά επί παρουσίας 1mM ADP. Στη συνέχεια μετρήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση (mg/ml) του ενζυμικού παρασκευάσματος. Ο υπολογισμός της ειδικής δραστικότητας έγινε με βάση τον τύπο :

SA =
$$\frac{(dA_{340nm}/min)}{6,222 \text{ x }\Pi}$$

όπου :

- SA (specific activity) η ειδική δραστικότητα σε μmoles NADPH/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό
- dA_{340nm}/min η μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm ανά λεπτό στην αντίδραση
- Π η ποσότητα της πρωτεΐνης που περιέχει το προς μελέτη δείγμα, η οποία ισούται με την πρωτεϊνική συγκέντρωση ομογενοποιήματος (σε mg/ml) επί τον όγκο (σε ml) του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην εκάστοτε μέτρηση.
- 6,222 είναι ο συντελεστής απορρόφησης του NADP στα 340 nm.

πρότυπη αντίδραση	
TRA buffer pH 8.0	1 ml
sample	xμL
NADPH	10 μL
100 mM ADP	10 μL
α-ketoglutarate	20 μL

Πίνακας 4: Όγκοι απαιτούμενων αντιδραστηρίων για 1 ml πρότυπης αντίδρασης μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητος της GDH στα 340 nm.

3.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται διαχωρισμός ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρους, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού (resolving gel) συγκέντρωσης 10% (w/v) ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης και στοίβαξης (stacking gel) 4% (w/v) ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης πάχους 1 ή 1,5mm ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Για τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται 0,01% TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 0,1% APS (Ammonium Persulfate).

Η προετοιμασία του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και η τοποθέτησή του στη συσκευή γίνονται σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Biorad).

πήκτωμα διαχωρισμού 10%		πήκτωμα επιστοίβαξης 4%	
ddH ₂ O	6,15 ml	ddH ₂ O	6,1 ml
30% acryl/Bis-acryl	4,95 ml	30% acryl/Bis-acryl	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	3,75 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml
10% SDS	150 μL	10% SDS	100 µL
10% APS	75 μL	10% APS	50 μL
TEMED	7,5 μL	TEMED	10 µL

Τα πηκτώματα παρασκευάστηκαν ως εξής:

Πίνακας 5: Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 1mm για SDS-PAGE

Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αφού προστεθεί σε αυτό το ειδικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης δείγματος (2x sample buffer) και επωαστούν για 5 λεπτά στους 95° για να αποδιαταχθούν. Η παρουσία μερκαπτοαιθανόλης στο διάλυμα προκαλεί αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Για τον σωστό έλεγχο τους και τη σύγκριση των δειγμάτων φορτώνεται και κατάλληλος πρωτεϊνικός δείκτης. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ειδική συσκευή με διάλυμα ηλεκτροδίων (1x Running Buffer). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 90V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο πήκτωμα επιστοίβαξης και στη συνέχεια στα 150V.

2x sample buffer	10x Running Buffer (1L pH8.3)
10 % SDS	30.3 g Tris Base
5 % 2-mercaptoethanol	144 g glycine
glycerol	10 g SDS
0,5 % bromophenol blue	dd H ₂ O
0,5 M Tris HCl	

Πίνακας 6: Παρασκευή διαλύματος ηλεκτροφόρησης δείγματος (sample buffer) και διαλύματος ηλεκτροδίων (running buffer)

3.6. Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Σκοπός της τεχνικής είναι η ανίχνευση μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα μείγμα πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων.

Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με ηλεκτροαποτύπωση και προσδένονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής μεταφοράς (Wet Transfer) σε συσκευή της Biorad και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διάταξη πηκτώματος-μεμβράνης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς μετά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (1x Transfer Buffer: 20% methanol in 1x Running Buffer) και εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 350 mA για 1h.

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων (blocking solution: 5% άπαχο αποξηραμένο γάλα σε σκόνη σε 1x PBS-Tween) με ταυτόχρονη

ήπια ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται (O/N στους 4 °C) με το εκάστοτε ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα, αραιωμένο σε 5% γάλα διαλυμένο σε 1x PBS-Tween, ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horse raddish peroxidase) το οποίο αντιδρά με εξωγενές προστιθέμενο υπόστρωμα, το οποίο περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O) και λουμινόλη (luminol) (Pierce ECL Western Blotting Substrate) και εκπέμπει φως (αντίδραση χημειοφωταύγειας). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η εμφάνιση των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών σε χαρακτηριστικές σκουρόχρωμες ζώνες (bands).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση κατά Western περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομα	Προέλευση	Τύπος	Εξειδίκευση	Αραίωση
αντισώματος		αντισώματος		σε WB
a-GDH (non-	Biodesing	Πολυκλωνικό	Mouse,Rat	1:5000
specific)	International	(rabbit)	Human,Bovine	
a-GDH2	Spanaki και	Πολυκλωνικό	Human	1:3000
	συν. 2010	(rabbit)		
a-GDH (specific	Aviva	Πολυκλωνικό	Mouse,Rat	1:5000
for hGDH1)	Systems	(rabbit)	Human	
	Biology			
Goat a-rabbit	Milliopore		Rabbit IgG	1:2000
HRP-conjugated			(H+L)	

Πίνακας 7: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση

3.7. Μονιμοποίηση Ιστών για κρυοτομές

Μύες κατάλληλης ηλικίας αναισθητοποιούνται βαθιά με ενδοπεροτοναϊκή χορήγηση πεντοβαρβιτάλης (DOLETHAL) σε συγκέντρωση 140μg/gr ζώου. Η εγκατάσταση και το βάθος της αναισθησίας του ζώου ελέγχεται μέσω της απώλειας του αντανακλαστικού του δακτύλου. Στη συνέχεια τα ζώα μεταφέρονται σε απαγωγό εστία όπου γίνεται η διαδικασία της ενδοκαρδιακής διήθησης (transcardial perfusion). Μετά από τη διατομή του θώρακος του ζώου, αποκαλύπτεται η καρδιά του, στην αριστερή κοιλία της οποίας εισάγεται βελόνα, από την οποία παροχετεύεται μέσα από ένα σωληνάκι και σταθερή ροή, αρχικά το PBS και στη συνέχεια η παραφορμαλδεϋδη (PFA). Χαρακτηριστική ένδειξη σωστής απομάκρυνσης του αίματος είναι η αλλαγή του χρώματος του ήπατος ενώ η αυθόρμητη κίνηση των άκρων του ζώου (π.χ. ουρά) είναι ένδειξη επιτυχής ροής του μονιμοποιητικού μέσου (PFA). Για κάθε ζώο απαιτούνται περί τα 30-40 ml διαλυμάτων PBS και PFA. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, απομονώνεται ο εγκέφαλος και τα περιφερικά όργανα.

Οι ιστοί τοποθετούνται σε 20 ml διαλύματος 4% παραμοφορμαλδεΰδης σε 1xPBS στους 4 °C για 30 min. Στη συνέχεια ακολουθεί η εξής πειραματική διαδικασία:

- 3 x πλύσεις με 1xPBS
- Τοποθέτηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1xPBS στους 4 °C, εώς ότου καταβυθιστούν
- Έγκλειση των ιστών σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5 % ζελατίνης σε 1xPBS
- Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45 °C και φύλαξη στους -80 °C
- Κατάτμηση των ιστών με τη χρήση κρυοτόμου (-25 °C) σε τομές πάχους 30μm.

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα του εγκεφάλου τεμαχίστηκαν σε στεφανιαίες τομές, οι οποίες εν συνεχεία κολλήθηκαν σειριακά σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες.

PFA 4%	διάλυμα σουκρόζης 30%	διάλυμα gelatin	
(500 ml)	(100 ml)	(500 ml)	
20 gr PFA	30 gr sucrose	75 gr sucrose	
1Χ PBS μέχρι τον τελικό	1Χ PBS μέχρι τον τελικό	37,5 gr gelatin	
όγκο	όγκο	1Χ PBS μέχρι τον τελικό	
		όγκο	

Πίνακας 8: Παρασκευή απαραίτητων διαλυμάτων για την μονιμοποίηση ιστών για κρυοτομές

3.8. Μονιμοποίηση Ιστών σε παραφίνη

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με την μονιμοποίηση ιστών για κρυοτομές με τη διαφορά πως ως μονιμοποιητικό μέσο χρησιμοποιείται ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%, ενώ μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ενδοκαρδιακής διήθησης οι αφαιρούμενοι ιστοί τοποθετούνται στο εν λόγω διάλυμα για 40 min ώστε στη συνέχεια οι ιστοί να εμποτιστούν σε παραφίνη.

Η εμπότιση των ιστών με παραφίνη, η οποία διεισδύει σε αυτούς δρώντας ως φυσικό στηρικτικό μέσο, καθιστά τους ιστούς δύσκαμπτους και πιο ανθεκτικούς κατά τη διαδικασία τεμαχισμού τους σε τομές. Έτσι είναι δυνατόν η λήψη ιδιαίτερα λεπτών τομών. Παράλληλα διατηρείται ακέραια η προ θανάτου αρχιτεκτονική δομή των ιστών. Πριν την σκήνωση των ιστολογικών παρασκευασμάτων προηγούνται 2 κύριες φάσεις η αφυδάτωση και η διαύγαση των δειγμάτων, οι οποίες πραγματοποιούνται αυτοματοποιημένα σε ιστοκινέτα (σύστημα επεξεργασίας ιστού). Τελικά τα ιστολογικά παρασκευάσματα σκηνώνονται σε κύβους παραφίνης με τη χρήση ειδικών εκμαγείων και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να τεμαχιστού σε τομές πάχους 10 (μικροτόμος) -30 μm (κρυοτόμος) ανάλογα με την πειραματική διαδικασία στην οποία

3.9. Ανοσοφθορισμός

Με την τεχνική του ανοσοφθορισμού ανιχνεύεται τοπογραφικά η έκφραση ενός γονιδίου σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η γενική αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων τα οποία στη συνέχεια σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές που επιτρέπουν την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος ανιχνεύθηκαν με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (πρωτογενή πολυκλωνικά αντισώματα άνευ φθοριοχρωμάτων - δευτερογενή αντισώματα επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική).

a. Ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές

Πειραματική διαδικασία :

- Δευτερογενής μονιμοποίηση των τομών σε διάλυμα ακετόνης 100% για 8 min στου-30 °C
- Πλύσεις των τομών για 5 min σε 1X PBS, RT (x3)
- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 5% Bovine Serum Albumin (BSA) σε 0,5% Triton X-100 σε 1X PBS (blocking solution) για 1 h ,RT
- Επώαση των τομών με το εκάστοτε πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος σε blocking solution, O/N στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση.
- Πλύσεις των τομών για 5 min σε 1X PBS, RT (x3)
- Επώαση των τομών με τα κατάλληλα δευτεροταγή αντισώματα για 1 h, υπό συνθήκες σκότους, RT
- Πλύσεις των τομών για 5 min σε 1X PBS, RT (x3)
- Επώαση των τομών με To-Pro3 iodide (Invitrogen) σε αραίωση 1:2000 σε 1X PBS (ώστε να σημανθούν οι πυρήνες) για 1 min, RT
- Πλύση των τομών με 1Χ PBS για 5 min, RT

- Επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδα και ειδική συγκολλητική ουσία.
- Αποθήκευση των τομών στους 4 °C μέχρι να παρατηρηθούν στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Β. Ανοσοφθορισμός τομές παραφίνης

Πριν την επώαση των τομών ιστών μονιμοποιημένων με φορμαλίνη και εγκλεισμένων σε παραφίνη με το πρωτογενές αντίσωμα, θα πρέπει ακολουθηθούν οι διαδικασίες της αποπαραφίνωσης, ενυδάτωσης και της θερμικώς επαγόμενης ανάκτησης του επίτοπου.

Πειραματική διαδικασία:

• Αποπαραφίνωση τομών:

Οι τομές τοποθετούνται σε κλίβανο στους 56 °C για 20 min και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξυλόλης για 10 min (x3).

Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα βαθμίδωση διαλυμάτων αλκοόλης:
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 100% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 96% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 80% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 70% για 1 min

- Εμβάπτιση των τομών σε απιονισμένο νερό (dH₂O)
- Θερμικώς επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με τη χρήση διαλύματος ανάκτησης στόχου.

Ακολουθεί η επώαση με τα κατάλληλα πρωτογενή αντισώματα όπως περιγράφεται στη διαδικασία για κρυοτομές.

Όνομα	Προέλευση	Τύπος	Εξειδίκευση	Αραίωση
αντισώματος		αντισώματος		σε IF
a-GDH (non-	Biodesing	Πολυκλωνικό	Mouse,Rat	1:5000
specific)	International	(rabbit)	Human,Bovine	
a-GDH2	Spanaki και	Πολυκλωνικό	Human	1:3000
	συν. 2010	(rabbit)		
a-GDH (specific	Aviva Systems	Πολυκλωνικό	Mouse,Rat	1:5000
for hGDH1)	Biology	(rabbit)	Human	
a- NeuN	Millipore	Μονοκλωνικό	Mouse, Rat	1:4000
		Mouse IgG1		
a- GFAP	Sigma	Μονοκλωνικό	Mouse, Rat,	1:2000
		Mouse IgG1	Human, Pig	
a- Olig2	Millipore	Μονοκλωνικό	Mouse, Rat,	1:1000
		Mouse IgG2	Human	
a-insulin	Thermo	Μονοκλωνικό	Mouse, Rat,	1:200
		Mouse IgG1	Human	

Πίνακας 9: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον ανασοφθορισμό.

3.10. Χρώση ιστών με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E)

Τα δείγματα των ιστών επεξεργάστηκαν με χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης (Η&Ε) προκειμένου να αξιολογηθεί μικροσκοπικά η αδρή τους μορφολογία τους. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να ελεγχθεί η μορφολογία των κυττάρων ή ο ιστός κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και να διαπιστωθούν τυχόν σημαντικές δομικές αλλοιώσεις. Τα βασεόφιλα στοιχεία των κυττάρων (πυρήνες, γλυκοζαμίνες) χρωματίζονται με αιματοξυλίνη (μπλε ή μωβ χρώμα) ενώ τα οξεόφιλα κυτταροπλασματικά συστατικά χρωματίζονται με ηωσίνη (ροδόχρωμα). Πειραματική διαδικασία:

Αποπαραφίνωση τομών:

Οι τομές τοποθετούνται σε κλίβανο στους 56 °C για 20 min και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξυλόλης για 10 min (x3).

Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα βαθμίδωση διαλυμάτων αλκοόλης:
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 100% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 96% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 80% για 1 min
 Εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 70% για 1 min

- Εμβάπτιση των τομών σε απιονισμένο νερό (dH₂O)
- Επώαση τομών σε αιματοξυλίνη (Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution, Merck Millipore) για 15 sec
- Έκπλυση με νερό βρύσης
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα οξινισμένης αλκοόλης 1%, στιγμιαία
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα λιθίου 10% για 15 έως 30 sec
- Έκπλυση με νερό βρύσης
- Επώαση των τομών σε ηωσίνη (Eosin Y solution 0,5% alcoholic, Merck Millipore)
- Έκπλυση με νερό βρύσης
- Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα βαθμίδωση διαλυμάτων αλκοόλης
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 10 min (x2)
- Επικάλυψη τομών με καλυπτρίδες και ειδική κόλλα.

3.11. Μέτρηση Βάρους πειραματόζωων

Για τον προσδιορισμό του βάρους των πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκε ζυγαριά ακριβείας και ένα πλαστικό δοχείο για την τοποθέτησή τους κατά τη διάρκεια της ζύγισής τους. Οι μετρήσεις γίνονταν πάντα την ίδια ώρα. Τα βάρη καταγράφηκαν και καταχωρήθηκαν σε βάση δεδομένων και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε πρόγραμμα για τη διεξαγωγή γραφημάτων.

3.12. Αιμοληψία

Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος (ποσότητα δείγματος, συχνότητα συλλογής δείγματος) συλλέχθηκαν ποσότητες αίματος είτε από την ουρά των πειραματόζωων είτε από την πρόσθια προσωπική φλέβα. Σε κάθε περίπτωση λήφθηκαν τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή περαιτέρω αιμορραγίας και μόλυνσης.



Εικόνα 15: Σχηματική Αναπαράσταση τοπογραφίας α. της πρόσθιας προσωπικής φλέβας. Εικόνα αναδημοσιευμένη από The anatomy of the laboratory mouse Margaret J.Cook Academic Press 1960 β. της πλευρικής φλέβας και κοιλιακής αρτηρίας της ουράς των ζώων.

3.13. Μέτρηση επιπέδων γλυκόζης νηστείας αίματος (FBG)

Οι μύες υποβλήθηκαν σε 12ωρη (κύκλος σκότους) ή 6ωρη νηστεία (κύκλος φωτός) και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα με τη χρήση γλυκόμετρου (Contour® Next One, Ascencia Diabetes Care) και χρήση ταινιών μέτρησης σακχάρου (Contour Next testing stripes, Bayer). Η αιμοληψία έγινε από πρόσθια προσωπική φλέβα σε ζώα που ήταν σε εγρήγορση.

3.14. Δοκιμασία αντίστασης στη γλυκόζη

Οι μύες ζυγίστηκαν και υποβλήθηκαν σε 12ωρη νηστεία (κύκλος σκότους). Ακολούθως μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο αίμα. Η αιμοληψία έγινε από την ουρά

των ζώων καθώς η πειραματική διαδικασία απαιτεί επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στη συνέχεια χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 1mg/g διαλύματος δεξτρόζης (35% (w/v) Dextrose Solution, Demo S.A). Τα επίπεδα της γλυκόζης μετρήθηκαν 30, 60, 90 και 120 min μετά τη χορήγηση του διαλύματος δεξτρόζης.

3.15. Δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη

Οι μύες ζυγίστηκαν ώστε να καθοριστεί το σωματικό τους βάρος και υποβλήθηκαν σε 5ωρη νηστεία (κύκλος φωτός). Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας αίματος. Η αιμοληψία έγινε από την ουρά των ζώων. Στη συνέχεια χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1IU/kg σωματικού βάρους ανθρώπινης ινσουλίνης (rDNA) (Actrapid 100 IU/ml, Novo Nordisk). Τα επίπεδα γλυκόζης αίματος μετρήθηκαν στα 15,30,60,90 και 120 min μετά τη χορήγηση της ινσουλίνης.

3.16. Εκούσια χορήγηση λευκίνης

Για να μειωθεί ο κίνδυνος τραυματισμού των ζώων καθώς και για να μην υποβληθούν σε μία στρεσογόνο δοκιμασία η οποία πιθανόν να αλλοιώσει τα πειραματικά αποτελέσματα, η χορήγηση λευκίνης δεν έγινε μέσω καθετήρα σίτισης (oral gavage) αλλά μέσω μιας διαδικασίας κατά την οποία τα ζώα εκούσια καταναλώνουν ένα ζελεδάκι το οποίο περιέχει την απαιτούμενη ποσότητα λευκίνης (0,25mg/g). Η λευκίνη ενσωματώνεται σε ένα στρογγυλού σχήματος σκεύασμα, του οποίου η γεύση έχει ενισχυθεί με σουκραλόζη, ένα μη θερμιδογόνο γλυκαντικό που δεν αυξάνει τα επίπεδα έκκρισης της ινσουλίνης και συνεπώς της γλυκόζης. Σκοπός είναι να καταφέρουν οι μύες να καταναλώσουν το ζελεδάκι σε μία και μόνο προσπάθεια. Για το λόγο αυτό προηγείται μία περίοδος εκπαίδευσης (training period) συνολικής διάρκειας 10 ημερών έτσι ώστε να ξεπεράσουν τη διατροφική νεοφοβία που τους χαρακτηρίζει. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής, τα ζώα στερούνται πρόσβασης στην τροφή τους αρχικά για 12 ώρες (κύκλος σκότους) για τρεις διαδοχικές ημέρες, ενώ το επόμενο διάστημα η στέρηση τροφής περιορίζεται στις 6 ώρες (κύκλος φωτός). Και στις δύο περιπτώσεις, στους μύες προσφέρεται πρώτα το ζελεδάκι (χωρίς λευκίνη) και μετά η τροφή τους. Τις τελευταίες τέσσερις ημέρες της περιόδου προσαρμογής τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση στην τροφή τους και σε συγκεκριμένη ώρα, τους προσφέρθηκε ένα ζελεδάκι (χωρίς λευκίνη).

Την ημέρα του πειράματος τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία και εν συνεχεία καταναλώνουν το σκεύασμα, το οποίο περιέχει λευκίνη. Ακολουθούν μετρήσεις γλυκόζης αίματος και ινσουλίνης ορού ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος.

σκεύασμα από gelatin και σουκραλόζη (για 1 ζελεδάκι)
40 μL 20% (w/v) sucralose (Splenda) in drinking H_2O
60 μL 14% (w/v) gelatin (Sigma) in 20% suclalose
leucine

Πίνακας 10: Παρασκευή σκευάσματος από gelatin και σουκραλόζη



Εικόνα 16: Στιγμιότυπο στο οποίο φαίνεται η χορήγηση του σκευάσματος γέλης και σουκραλόζης σε πειραματόζωο.

3.17. Μέτρηση επιπέδων ινσουλίνης ορού με Δοκιμασία ELISA

Οι μύες υποβλήθηκαν σε 12ωρη νηστεία και ακολούθησε αιμοληψία είτε από την πρόσθια προσωπική αρτηρία είτε από την ουρά των ζώων για τον καθορισμό των επιπέδων ινσουλίνης ορού. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια όγκου 1,5 ml τύπου Eppendorf και φυγοκεντρήθηκε στα 3.000 rpm για 10 min, RT. Το υπερκείμενο (ορός αίματος) συλλέχθηκε σε νέα σωληνάρια και διατηρήθηκε στους -80 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων ινσουλίνης ορού με τη μέθοδο ELISA απαιτούνται 10 μL ορού για κάθε δείγμα.

Η μέθοδος ELISA είναι μία υψηλής ευαισθησίας τεχνική ανίχνευσης πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το kit Mouse Insulin ELISA (Mercodia) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ινσουλίνης βρίσκεται ακινητοποιημένο στην στερεά επιφάνεια της μικροπλάκας και εν συνεχεία προστίθεται το δείγμα το οποίο περιέχει την υπό ανίχνευση πρωτεΐνη-στόχο σε άγνωστη συγκέντρωση. Ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δεύτερου αντισώματος. Τέλος προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα (σχηματισμός έγχρωμου προϊόντος) και μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται φωτομετρικά ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής της πρωτεΐνη-στόχου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

3.18. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field trial)

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από ένα κλωβό κινητικότητας (Ugo Basile, Varese, Italy). Ο κλωβός (41 cm x 33 cm x 41 cm) φέρει πλαστικά διαφανή τοιχώματα. Η κινητικότητα των μυών καταγράφηκε τόσο από φωτοκύτταρα τα οποία είναι προσαρμοσμένα στον κλωβό όσο και από κάμερα η οποία ήταν συνδεδεμένη με λογισμικό εντοπισμού (Smart 3.0 Panlab). Τα πειράματα διεξήχθησαν μεταξύ 09.30 πμ και 15.00 μμ. Για την αποφυγή οσφρητικών στοιχείων ο κλωβός καθαριζόταν εξολοκλήρου μετά από κάθε δοκιμασία με 70% αιθανόλη και σκουπιζόταν σχολαστικά με στεγνό χαρτί. Αρχικά το κάθε πειραματόζωο εξοικειώνεται (habituation) με τον κλωβό κινητικότητας για 3 συνεχόμενες ημέρες επί 45 λεπτά χωρίς να καταγράφονται οι κινήσεις του. Ο παρατηρητής αποχωρεί από το δωμάτιο ώστε η παρουσία του να μην επηρεάζει τη συμπεριφορά του πειραματόζωου. Την 4^η ημέρα οι μύες τοποθετούνται στον κλωβό (ένας κάθε φορά) για 60 λεπτά στη διάρκεια των οποίων βιντεοσκοπείται η δραστηριότητα του ζώου και καταγράφεται η συμπεριφορά του. Η ωριαία καταγραφή διαιρέθηκε σε 6 διαστήματα των 10 λεπτών. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων ελέγχθηκαν εκτός από την οριζόντια κινητική δραστηριότητα, οι χρόνοι παραμονής των πειραματόζωων στην κεντρική και περιφερειακή ζώνη του κλωβού όπως αυτές καθορίστηκαν από το λογισμικό εντοπισμού.

3.19. Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας (Plantar test – Hargreaves' method)

Το Plantar Test (Hargreaves' Method) δίνει τη δυνατότητα καταγραφής της αντίδρασης του ζώου στην περιφερικής προέλευσης επίδρασης ενός υπέρυθρου θερμικού ερεθίσματος. Ο ουδός του άλγους που μετράται υπολογίζεται με κριτήριο τη μέτρηση του λανθάνοντος χρόνου από τη στιγμή της εφαρμογής του ερεθίσματος στην πελματιαία επιφάνεια του οπίσθιου άκρου του πειραματόζωου έως και τη στιγμή της αυθόρμητης απόσυρσης αυτού. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από έξι θαλάμους σε σειρά, διαχωρισμένους μεταξύ τους, οι οποίοι βρίσκονταν πάνω σε μία υπερυψωμένη γυάλινη επιφάνεια. Κάθε μυς τοποθετούνταν σε έναν από τους έξι θαλάμους. Αρχικά τα πειραματόζωα εξοικειώθηκαν (habituation) στο χώρο των θαλάμων για έξι ημέρες. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας τοποθετήθηκε μία κινητή πηγή εκπομπής υπέρυθρης ακτινοβολίας (Plantar test, Ugo Basile, Varese, Italy) κάτω από την γυάλινη επιφάνεια και σε σημείο που στόχευε το οπίσθιο πέλμα του ζώου. Η δοκιμασία ξεκινούσε όταν ο πειραματιστής ενεργοποιούσε την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας ενώ ταυτόχρονα ξεκινούσε η χρονομέτρηση. Όταν το ζώο αισθανόταν πόνο (λόγω του θερμού ερεθίσματος) απέσυρε το πέλμα του ενώ συνήθως ακολουθούσε έντονη λείξη του πέλματος. Η απόσυρση του άκρου του πέλματος διέκοπτε την εκπομπή της υπέρυθρης ακτινοβολίας και ταυτόχρονα και την καταγραφή του χρόνου από το χρονόμετρο. Για να μην προκληθεί οποιαδήποτε βλάβη στον ιστό του πέλματος των ζώων η ακτινοβολία σταματούσε αυτόματα μετά την πάροδο 20 sec. Η δοκιμασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε πέλμα, με ενδιάμεσο διάστημα 5 λεπτών σε κάθε μέτρηση. Ως χρόνος απόσυρσης υπολογίστηκε η μέση τιμή των τριών χρόνων που καταγράφηκαν.

3.20. Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας (Hot plate test)

Η δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας με θερμική πλάκα μπορεί να θεωρηθεί ως μία απλουστευμένη πειραματική διάταξη του Plantar test, της οποίας το κύριο πλεονέκτημα είναι πως δεν απαιτεί περίοδο εξοικείωσης των μυών με την πειραματική διάταξη και έτσι επιτρέπει την αξιολόγηση μεγάλου αριθμού πειραματόζωων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το ζώο τοποθετείται πάνω σε θερμαινόμενη επιφάνεια θερμοκρασίας 54°C. Σκοπός του πειράματος είναι η καταγραφή του χρόνου αντίδρασης του ζώου (latency) στο θερμικό ερέθισμα από τη στιγμή που θα τοποθετηθεί πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα μέχρι τη στιγμή που θα δείξει τα πρώτα σημάδια δυσφορίας. Ο πειραματιστής αντιλαμβάνεται τη δυσφορία του ζώου ως έντονη λείξη του πέλματος του οπίσθιου άκρου. Κάποιες φορές τα ζώα αναπηδούν στην προσπάθειά τους να αποφύγουν την επαφή των άκρων τους με τη θερμαινόμενη πλάκα. Σε κάθε περίπτωση και για αποφυγή οποιασδήποτε βλάβης στον ιστό των πελμάτων των ζώων, τα ζώα
3.21. Δοκιμασία φωτός/σκότους (light/dark trial)

Για την αναπαραγωγή συμπτωμάτων άγχους επιλέχθηκε η δοκιμασία φωτός/σκότους (Forestiero και συν. 2006). Η πειραματική αυτή διάταξη εκμεταλλεύεται τη φυσική αποστροφή των μυών προς το φως και βασίζεται στη διαπίστωση πως ένα αγχογόνο ερέθισμα (έκθεση σε φως) μπορεί να αναστείλει μία έμφυτη συμπεριφορά των πειραματόζωων (εξερεύνηση χώρων) λόγω φόβου που αισθάνονται. Η πειραματική συσκευή αποτελείται από ένα αδιαφανές ξύλινο κουτί (48 cm x 24 cm x 27 cm) χωρισμένο σε 2 διαμερίσματα ίσων διαστάσεων τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους με μία μικρή θύρα. Το ένα διαμέρισμα έχει μαύρο χρώμα και φέρει κάλυμμα οροφής, ενώ το άλλο έχει λευκό χρώμα, είναι ανοιχτό και φωτίζεται με μία λάμπα των 60 W τοποθετημένη 40 cm πάνω από το κουτί. Στο δωμάτιο στο οποίο διενεργείται το πείραμα δεν υπάρχει άλλη πηγή φωτός πέρα από τη λάμπα που φωτίζει το λευκό διαμέρισμα της πειραματικής συσκευής. Την ημέρα του πειράματος τα ζώα που θα εκτελέσουν τη δοκιμασία μεταφέρονται στο δωμάτιο διεξαγωγής του πειράματος και παραμένουν στους κλωβούς τους για 1 ώρα. Τα ζώα τοποθετούνταν (ένα κάθε φορά) στη κέντρο του φωτεινού διαμερίσματος και αφέθηκαν να εξερευνήσουν το κουτί για 10 λεπτά, κατά την διάρκεια των οποίων η δραστηριότητά τους βιντεοσκοπήθηκε. Η έκθεση στο φως προκαλεί στρες στο πειραματόζωο και το αναγκάζει να αναζητήσει καταφύγιο στο σκοτεινό διαμέρισμα της συσκευής. Η μέτρηση απόδοσης των πειραματόζωων υπολογίζεται με το λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα, το συνολικό χρόνο που δαπάνησε το ζώο στο φωτεινό διαμέρισμα και με τον ολικό αριθμό διελεύσεων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο. Τα πειράματα διεξήχθησαν μεταξύ 09.30 πμ και 15.00 μμ. Για την αποφυγή οσφρητικών στοιχείων ο κλωβός καθαριζόταν εξολοκλήρου μετά από κάθε δοκιμασία με 70% αιθανόλη και σκουπιζόταν σχολαστικά με στεγνό χαρτί.

72

3.22. Δοκιμασία ανυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze trial)

Η δοκιμασία ανυψωμένου λαβυρίνθου επιτρέπει τη μελέτη συμπεριφοράς σχετιζόμενη με το άγχος. Η δοκιμασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση των μυών στον λαβύρινθο, ο οποίος αποτελείται από 4 βραχίονες (δύο εκ των οποίων είναι κλειστοί - φέρουν πλαϊνά τοιχώματα) που τέμνονται σε σχήμα σταυρού. Η διάταξη είναι τέτοια ώστε οι όμοιοι βραχίονες να είναι απέναντι ο ένας από τον άλλο. Η δοκιμασία βασίζεται στην έμφυτη προτίμηση των τρωκτικών για το σκοτάδι και τους κλειστούς χώρους (File και συν. 2004). Τα πειραματόζωα αφού τοποθετηθούν στο σημείο που τέμνονται οι βραχίονες αφήνονται ελεύθερα να εξερευνήσουν τον λαβύρινθο για 5 λεπτά, διάστημα κατά το οποίο η συμπεριφορά των ζώων καταγράφεται σε βίντεο. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν ο χρόνος παραμονής στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες αντίστοιχα και εκφράστηκαν ως ο λόγος του χρόνου παραμονής στους ανοικτούς βραχίονες προς το συνολικό χρόνο που ξόδεψε το ζώο τόσο στους ανοικτούς όσο και τους κλειστούς βραχίονες. Τα δεδομένα που προκύπτουν αντανακλούν το βαθμό προτίμησης των μυών σχετικά με την παραμονή τους στους κλειστούς ή ανοικτούς βραχίονες.

3.23. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (novel object recognition task)

Τα τρωκτικά παρουσιάζουν τη φυσική τάση να πλησιάζουν και να εξερευνούν αντικείμενα, τα οποία υποθετικά δεν έχουν καμία φυσική σημασία για αυτά και τα οποία δεν έχουν συσχετιστεί ποτέ με ανταποδοτικό ερέθισμα (Aggleton και συν. 1985). Οι μύες πλησιάζουν τα αντικείμενα και εξερευνούν τη φύση αυτών, αγγίζοντάς και μυρίζοντάς τα. Συνήθως τα ακουμπούν και προσπαθούν να τα διαχειριστούν με τα μπροστινά άκρα τους. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί εύκολα να ποσοτικοποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη απλών μορφών αναγνωριστικής μνήμης καθώς και για πιο πολύπλοκες όπως η χωρική. Η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου αποτελεί ένα μη ανταποδοτικό παράδειγμα και βασίζεται στην παραδοχή πως η παρουσία ενός πρωτόγνωρου αντικειμένου στο περιβάλλον του ζώου οδηγεί στην εκδήλωση συγκεκριμένων συμπεριφορικών προτύπων και αξιολογεί κατά κύριο λόγο την ικανότητα των πειραματόζωων να αναγνωρίσουν ένα καινούργιο αντικείμενο που εμφανίζεται για πρώτη φορά στο περιβάλλον τους.

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από ένα ανοιχτό πεδίο χρώματος λευκού και κατασκευασμένο από ξύλο. Τα αντικείμενα προς αναγνώριση αποτελούνται από διαφορετικά σχήματα και υλικά κατασκευής χωρίς οσφρητικά στοιχεία ώστε να διασφαλίσουμε πως τα αντικείμενα δεν προκαλούν διαφορές προτίμησης στα ζώα.

Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες διεξάγονταν μέσα σε χώρο όπου διέμεναν μόνο τα συγκεκριμένα ζώα και λάμβαναν χώρα μεταξύ 09.00 πμ και 14.00 μμ.

Κατά την εβδομάδα που προηγήθηκε της δοκιμασία τα ζώα εξοικειώθηκαν με τον ερευνητή μέσω της διαδικασίας χειρισμού ζώων (handling) (2 φορές την ημέρα επί πέντε συνεχόμενες ημέρες). Στη συνέχεια και για τις επόμενες ημέρες κάθε ζώο τοποθετούνταν στο κουτί ανοιχτού πεδίου – όπου δεν υπήρχαν αντικείμενα- και αφήνονταν ελεύθερα να εξερευνήσουν την πειραματική διάταξη για 10 λεπτά με σκοπό να εξοικειωθούν με το χώρο. Η δοκιμασία περιλαμβάνει 2 δοκιμές (trials) , τη δοκιμή εκπαίδευσης (sample trial, T1) και τη δοκιμή αναγνώρισης (choice trial, T2). Η διάρκεια κάθε δοκιμής καθορίζεται στα 10 λεπτά. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των 2 δοκιμών ήταν 1 ώρα. Δύο πανομοιότυπα αντικείμενα τοποθετούνται εντός της διάταξης σε δύο αντίθετες γωνίες του κουτιού και σε απόσταση 10 εκατοστών από τα τοιχώματα. Το ζώο αφήνεται στο κέντρο του ανοικτού πεδίου και αφήνεται να εξερευνήσει τα αντικείμενα για 10 λεπτά κατά τα οποία οι κινήσεις και η συμπεριφορά του ζώου καταγράφονται με βιντεοκάμερα. Μετά τη λήξη του Τ1 το ζώο επιστρέφει στο κλωβό φύλαξής του. Κατά τη διάρκεια της Τ2 ένα από τα δύο όμοια αντικείμενα του Τ1 αντικαθίσταται από ένα νέο. Έτσι πλέον μέσα στο κουτί υπάρχουν το γνωστό αντικείμενο (familiar object) και ένα νέο (novel object). Αν το ζώο θυμηθεί την προηγούμενη έκθεσή του στο οικείο αντικείμενο τότε εξερευνά το νέο αντικείμενο σε μεγαλύτερο βαθμό και με εντονότερο ενδιαφέρον. Για την αποφυγή οσφρητικών

74

στοιχείων, το ξύλινο κουτί και τα αντικείμενα καθαρίζονταν σχολαστικά με 70% αιθανόλη μετά από κάθε δοκιμασία.

Ως εξερευνητική δραστηριότητα των ζώων (περιέργεια) θεωρείται η κατεύθυνση της μύτης προς το αντικείμενο σε απόσταση όχι μεγαλύτερη των 2 εκατοστών ή το άγγιγμα του αντικειμένου με τη μύτη τους. Η περιστροφή γύρω από το αντικείμενο, το άγγιγμα του αντικειμένου με τα άκρα των ζώων, δεν θεωρείται εξερευνητική δραστηριότητα. Οι παράμετροι που λήφθηκαν υπόψη ήταν ο ολικός χρόνος εξερεύνησης και των δύο όμοιων αντικειμένων στην T1 δοκιμασία και ο χρόνος εξερεύνησης των δύο διαφορετικών αντικειμένων (familiar και novel) στην T2 δοκιμασία. Η διάκριση μεταξύ οικείου και νέου αντικειμένου κατά τη διάρκεια της T2 δοκιμασία αξιολογείται συγκρίνοντας το χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση του γνωστού. Ο υπολογισμός γίνεται μέσω ενός δείκτη διάκρισης (discrimination index , D.I) :

$$D.I = \frac{N-F}{N+F}$$

όπου N= ο χρόνος που δαπανήθηκε στο νέο αντικείμενο και F= ο χρόνος που δαπανήθηκε στο ήδη γνωστό. Η χρήση του D.Ι γίνεται διότι ο χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων στην T2 δοκιμασία ενδέχεται να επηρεάζεται από διαφορές στο συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων.

3.24. Δοκιμασία Χωρικής Μετατόπισης Αντικειμένου (object location task)

Η δοκιμασία χωρικής μετατόπισης αντικειμένου βασίζεται στις ίδιες παραδοχές με τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, με τη διαφορά πως αξιολογείται η ικανότητα των πειραματόζωων να αναγνωρίσουν τη νέα θέση ήδη γνωστών αντικειμένων. Κατά την εβδομάδα που προηγήθηκε της δοκιμασίας τα ζώα εξοικειώθηκαν με τον ερευνητή μέσω της διαδικασίας χειρισμού ζώων (handling) (2 φορές την ημέρα επί πέντε συνεχόμενες ημέρες). Στη συνέχεια και για τις επόμενες ημέρες κάθε ζώο τοποθετούνταν στο κουτί ανοιχτού πεδίου – όπου δεν υπήρχαν αντικείμενα- και αφήνονταν ελεύθερα να εξερευνήσουν την πειραματική διάταξη για 10 λεπτά με σκοπό να εξοικειωθούν με το χώρο. Η δοκιμασία περιλαμβάνει 2 δοκιμές (trials) , τη δοκιμή εκπαίδευσης (sample trial, T1) και τη δοκιμή αναγνώρισης (choice trial, T2). Η διάρκεια κάθε δοκιμής καθορίζεται στα 10 λεπτά. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των 2 δοκιμών ήταν 1 ώρα. Δύο πανομοιότυπα αντικείμενα τοποθετούνται εντός της διάταξης στις προσκείμενες γωνίες της μιας πλευράς του κουτιού και σε απόσταση 10 εκατοστών από τα τοιχώματα. Το ζώο αφήνεται στο κέντρο του ανοικτού πεδίου και αφήνεται να εξερευνήσει τα αντικείμενα για 10 λεπτά κατά τα οποία οι κινήσεις και η συμπεριφορά του ζώου καταγράφονται με βιντεοκάμερα. Μετά τη λήξη του Τ1 το ζώο επιστρέφει στο κλωβό φύλαξής του. Κατά τη διάρκεια της Τ2 ένα από τα δύο όμοια αντικείμενα του Τ1 μετακινείται σε νέα θέση – πάνω στη διαγώνιο του κουτιού. Έτσι πλέον μέσα στο κουτί υπάρχουν το γνωστό αντικείμενο που δεν έχει μετακινηθεί (familiar location) και το δεύτερο αντικείμενο το οποίο είναι μεν γνωστό στην όψη αλλά πλέον βρίσκεται σε νέα θέση (novel location). Αν το ζώο θυμηθεί την προηγούμενη διάταξη των αντικειμένων τότε εξερευνά το αντικείμενο στη νέα θέση σε μεγαλύτερο βαθμό και με εντονότερο ενδιαφέρον. Για την αποφυγή οσφρητικών στοιχείων, το ξύλινο κουτί και τα αντικείμενα καθαρίζονταν σχολαστικά με 70% αιθανόλη μετά από κάθε δοκιμασία. Ως εξερευνητική δραστηριότητα των ζώων θεωρείται η κατεύθυνση της μύτης προς το αντικείμενο σε απόσταση όχι μεγαλύτερη των 2 εκατοστών ή το άγγιγμα του αντικειμένου με τη μύτη τους. Η περιστροφή γύρω από το αντικείμενο, το άγγιγμα του αντικειμένου με τα άκρα των ζώων, δεν θεωρείται εξερευνητική δραστηριότητα. Οι παράμετροι που λήφθηκαν υπόψη ήταν ο ολικός χρόνος εξερεύνησης και των δύο όμοιων αντικειμένων στην Τ1 δοκιμασία και ο χρόνος εξερεύνησης των δύο διαφορετικών αντικειμένων (familiar και novel) στην Τ2 δοκιμασία. Η διάκριση μεταξύ οικείου και νέου αντικειμένου κατά τη διάρκεια της Τ2 δοκιμασία αξιολογείται συγκρίνοντας το χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση του αντικειμένου νέας θέσης με αυτόν που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση του αντικειμένου οικείας θέσης. Ο υπολογισμός γίνεται μέσω ενός δείκτη διάκρισης (discrimination index , D.I) :

$$D.I = \frac{N.L - F.L}{N.L + F.L}$$

όπου N.L= ο χρόνος που δαπανήθηκε αντικείμενο νέας θέσης και F.L= ο χρόνος που δαπανήθηκε στο αντικείμενο οικείας θέσης. Η χρήση του D.I γίνεται διότι ο χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων στην T2 δοκιμασία ενδέχεται να επηρεάζεται από διαφορές στο συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων

4.1. Δημιουργία διαγονιδιακών μυών που φέρουν το ανθρώπινο γονίδιο της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 (GLUD2)

Οι μύες, όπως και όλοι οι οργανισμοί, διαθέτουν τη δική τους ενδογενή γλουταμική αφυδρογονάση (mGDH), η οποία αντιστοιχεί στην γλουταμική αφυδρογονάση τύπου 1 (hGDH1) του ανθρώπου που εκφράζεται ευρέως στους ιστούς (housekeeping). Για να μελετήσουμε το ρόλο της ειδικής για τον άνθρωπο και τα ανώτερα πρωτεύοντα γλουταμικής αφυδρογονάσης τύπου 2 (hGDH2) στη βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε ένα εξανθρωποποιημένο μοντέλο μυός που εκφράζει, μαζί με τη δική του ενδογενή γλουταμική αφυδρογονάση κυτταρικής οικονομίας, και την ανθρώπινη ισομορφή hGDH2. Για την παραγωγή των διαγονιδιακών GLUD2 ζώων, χρησιμοποιήθηκε ένα γενωμικό τμήμα 177Kb που περιλάμβανε ολόκληρο το γονίδιο της hGDH2 μαζί με τις ρυθμιστικές του και προκινητικές του αλληλουχίες τόσο στην 5' όσο και στην 3' περιοχή 40 kb ανοδικά και 135 kb καθοδικά του γονιδίου που απομονώθηκε (μετά από πέψη με Not I) από έναν κλώνο βακτηριακού τεχνητού χρωμοσώματος (Bacterial Artificial Chromosome, BAC RP11-610G22 Ima Genes GmbH, Berlin Germany). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" από την ομάδα της κ.Ντούνη.

Το διαγονίδιο εισήχθη με μικροένεση σε έναν από τους δύο προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων, τα οποία απομονώθηκαν από μύες με γενετικό υπόβαθρο C57BL/6J x CBA/J. Τα θυγατρικά κύτταρα που επιβίωσαν της διαδικασίας έφεραν το επιθυμητό διαγονίδιο, και εμφυτεύτηκαν στη μήτρα θηλυκών ζώων. Με αυτό τον

78

τρόπο γεννήθηκαν 45 ποντίκια τα οποία και ελέγχθηκαν για την παρουσία του διαγονιδίου hGDH2.



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων με τη μέθοδο της μικροένεσης (microinjection). Αναπαραγωγή από την εργασία των Lampreht και συν. (2018)

Η ταυτοποίηση των ιδρυτών (founders) διαγονιδιακών μυών που φέρουν στο γονιδίωμά τους το διαγονίδιο της hGDH2 καθώς και των διαγονιδιακών απογόνων τους, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε γενωμικό DNA από ουρές ποντικών με τη χρήση ειδικών εκκινητών (primers) για την hGDH2. Ανιχνεύθηκαν έτσι, 9 ανεξάρτητες σειρές διαγονιδιακών μυών (9 founders) από τους οποίες μόνο δύο μετέδιδαν το διαγονίδιο στους απογόνους (Tg13, Tg32). Για τις ανάγκες των μελετών της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν απογοίου τύπου αδερφάκια τους, που προέκυψαν μετά από διασταυρώσεις διαγονιδιακών ζώων με αγρίου τύπου C57BL/6J.



Εικόνα 18: Ανίχνευση του διαγονιδίου με τους ειδικούς για την GLUD2 εκκινητές μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

4.2 Μελέτες έκφρασης της hGDH2 πρωτεΐνης στα διαγονιδιακά ζώα.

4.2.1. Μελέτη της έκφρασης του διαγονιδίου με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Για την τεκμηρίωση της έκφρασης του διαγονιδίου στους περιφερικούς και νευρικούς ιστούς των διαγονιδιακών μυών, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ομογενοποιήματα ιστών προερχόμενων από αρσενικά ετερόζυγα ζώα από τις δύο διαγονιδιακές σειρές. Οι ιστοί απομονώθηκαν έπειτα από υποβολή των πειραματόζωων σε ευθανασία με εξάρθρωση της αυχενικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Για να μελετήσουμε τους ιστούς συγκριτικά, σε κάθε πειραματική συνεδρία εξετάστηκαν ιστοί τόσο από διαγονιδιακά όσο και από αγρίου τύπου ζώα. Κατά τη δοκιμασία της ανοσοανίχνευσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες καθαρές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GDH1 και GDH2 ενώ η ανίχνευση επιτεύχθηκε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την hGDH1 και την hGDH2 αντίστοιχα. Το ειδικό αντι-hGDH1 αντίσωμα είναι ικανό να αναγνωρίζει με την ίδια ευαισθησία την GDH1 του ανθρώπου και την ενδογενή GDH (mGDH) των μυών, καθώς παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους, ενώ δεν αναγνωρίζει την hGDH2. Αντίστοιχα το ειδικό αντιhGDH2 αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά την GDH2 του ανθρώπου και του διαγονιδιακού GLUD2 μυός χωρίς να αναγνωρίζει την ενδογενή γλουταμινική αφυδρογονάση (mGDH) των ζώων.



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση κατά Western καθαρισμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών hGDH1 και hGDH2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπου φαίνεται η ειδικότητα του anti-hGDH2 αντισώματος (το οποίο αναπτύχθηκε από το εργαστήριό μας). Το anti-hGDH2 αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο την hGDH2 πρωτεΐνη και όχι την hGDH1. Και οι 2 ισομορφές της GDH αναγνωρίζονται από το anti-GDH αντίσωμα. Αναδημοσίευση από την εργασία των Spanaki και συν.(2010)

4.2.1.α. Περιφερικοί ιστοί

Μελετήθηκε το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, ο όρχις, το πάγκρεας,, ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός. Τα δείγματα φορτώθηκαν με βάση την ενζυμική τους ενεργότητα (με σκοπό να φορτωθεί η ίδια ποσότητα συνολικής GDH από κάθε ιστό) και όχι με βάση την πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος. Για αυτό και δεν χρησιμοποιήσαμε loading control με ακτίνη αλλά καθαρές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 συγκεκριμένης συγκέντρωσης σε ξεχωριστά wells. Η ανάλυση κατά Western έδειξε πως η ανθρώπινη πρωτεΐνη GDH2 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν και στις δύο σειρές των διαγονιδιακών ζώων, γεγονός που ήταν αναμενόμενο, καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε ιστοειδικός (tissue specific) για τη δημιουργία του διαγονιδιακού GLUD2 μοντέλου. Η hGDH2 είναι απούσα από τους ιστούς των αγρίων τύπων ζώων. Η έκφραση του διαγονιδίου δεν φαίνεται να επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της mGDH σε κανένα ιστό (καθώς δεν βρέθηκε να διαφορποιούνται μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων).

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της hGDH2 στους ιστούς των διαγονιδιακών μυών, φαίνεται πως στον όρχι η διαγονιδιακή πρωτεΐνη εκφράζεται σε βαθμό παρόμοιο με εκείνον που εκφράζεται η ενδογενής mGDH. Στους υπόλοιπους ιστούς τα επίπεδα έκφρασης της hGDH2 είναι σημαντικά χαμηλότερα από αυτά της ενδογενούς GDH των ζώων γεγονός που συνάδει με τα επίπεδα έκφρασης της στους ιστούς του ανθρώπου.



Εικόνα 20: Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε περιφερικούς ιστούς από WT και Tg ζώα. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκε ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ώστε η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα κάθε δείγματος (σε ADP 0.1 mM) να είναι ίση με 0.2 dA_{340nm/min}.

4.2.1.8. Νευρικός Ιστός

Στους νευρικούς ιστούς των διαγονιδιακών ζώων ανιχνεύθηκε έκφραση της hGDH2 σε όλες τις περιοχές που μελετήσαμε, όπως στα ημισφαίρια, την παρεγκεφαλίδα, τον κινητικό φλοιό, τον ιππόκαμπο, τον οσφρητικό λοβό και το νωτιαίο μυελό. Η έκφραση του διαγονιδίου δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς mGDH, καθώς τόσο τα διαγονιδιακά όσο και τα αγρίου τύπου ζώα έχουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά της ενδογενούς πρωτεΐνης.



Εικόνα 21: Έκφραση της hGDH2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα των διαγονιδιακών ποντικών. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική της ανάλυσης κατά Western των Tg ζώων που εκφράζουν την hGDH2 και την ενδογενή mGDH (που αντιστοιχεί στην hGDH1 του ανθρώπου και ανιχνεύεται με το ειδικό για την hGDH1 αντίσωμα) καθώς και των WT ζώων που εκφράζουν μόνο την ενδογενή mGDH. Έκφραση της hGDH2 παρατηρήθηκε στον οσφρητικό βολβό, τα ημισφαίρια, την παρεγκεφαλίδα, τον νωτιαίο μυελό, τον ιππόκαμπο και τον κινητικό φλοιό μόνο των διαγονιδιακών ζώων, ενώ φαίνεται να είναι απούσα στα WT ζώα. Αντίθετα η ενδογενής mGDH ανιχνεύεται τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα. Τα επίπεδα έκφρασης δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται ανά γονότυπο Tg13 ή Tg32 ή ανά περιοχή ΚΝΣ.

4.2.2. Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας της GDH σε ιστούς διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ειδική δραστικότητα (SA) των ιστολογικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καθορίστηκε με μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας (dA_{340nm/min}) στα 340 nm παρουσία 1mM ADP (αλλοστερικός ενεργοποιητής). Με τη συγκεκριμένη ενζυμική λειτουργική δοκιμασία προσδιορίζεται το σύνολο της ενζυμικής δραστηριότητας της GDH και δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ της GDH1 και της GDH2. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να μελετήσουμε και αν η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης hGDH2 ήταν σε επίπεδα τέτοια ώστε να επηρεάζει τη συνολική δραστικότητα της GDH σε περιφερικούς ιστούς καθώς και στο νευρικό σύστημα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν δεδομένα από την ίδια πειραματική συνεδρία, ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες και κοινά αντιδραστήρια. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε τουλάχιστον τέσσερις ή και περισσότερους πειραματικούς προσδιορισμούς της ενζυμικής δραστηριότητας στην ακριβώς ίδια συνθήκη, σε ιστούς από αρσενικά ετερόζυγα ζώα και ζώα αγρίου τύπου, ηλικίας 4-6 μηνών. Στο διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζεται η ειδική ενζυμική δραστικότητα της GDH ανά ιστό τόσο για τα αγρίου τύπου (WT) όσο και για τα ζώα που φέρουν το διαγονίδιο *GLUD2* (Tg). Όσον αφορά τα διαγονιδιακά ζώα μελετήθηκαν παράλληλα ιστοί και από τις 2 διαγονιδιακές σειρές (Tg13 και Tg32). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται τόσο στο σύνολο των διαγονιδιακών ζώων όσο και ανά γονότυπο.

4.2.2.α. Περιφερικοί ιστοί

Όπως είναι γνωστό, η ενζυμική δραστικότητα της GDH εμφανίζει σημαντικού βαθμού ετερογένεια από ιστό σε ιστό, παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στον άνθρωπο. Από το σύνολο των περιφερικών ιστών που μελετήθηκαν, ο ιστός με τη μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα είναι το ήπαρ ενώ ο ιστός με τη χαμηλότερη, είναι ο όρχις, τόσο στα Tg όσο στα WT ζώα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που λαμβάνονται κατά τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας της γλουταμικής αφυδρογονάσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από περιφερικούς ιστούς του ανθρώπου (Spanaki και συν.2014, Treberg και συν. 2014). Στην πλειονότητα των υπό μελέτη ιστών τα διαγονιδιακά ζώα εμφάνιζαν παρόμοια ενζυμική δραστικότητα με τα wt. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης δεν ήταν σε επίπεδα τόσο υψηλά, ώστε να επηρεάσουν τη συνολική ενζυμική δραστικότητα του ιστού. Ως αποτέλεσμα, η μετρήσιμη με τη συγκεκριμένη μέθοδο ενζυμική δραστικότητα της συνολικής GDH να καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς GDH των ζώων (mGDH).

Εξαίρεση αποτελεί ο όρχις, όπου η ενζυμική δραστικότητα της ενδογενούς GDH (όπως αυτό φαίνεται από την τιμή της ενζυμικής δραστικότητας στα WT ζώα) είναι πολύ χαμηλή. Τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα στον όρχι σε σχέση με τα wt. Συγκεκριμένα, η ενζυμική δραστικότητα (SA) του όρχι, σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ιστό Tg ζώων είναι σχεδόν διπλάσια $(2,26 \pm 0,27 \mu mol NADPH oxidized/mg tissue/min) από την ενζυμική δραστικότητα του$ ίδιου ιστού από WT ζώα (1,00 ± 0,14 μmol NADPH oxidized/mg tissue/min, p=0.0002). Όσον αφορά την επίδραση της έκφρασης του διαγονιδίου σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από ιστούς νεφρών και παγκρέατος διαγονιδιακών ζώων, ενώ η συνολική ενζυμική δραστικότητα εμφανίζεται αυξημένη σε σχέση με εκείνη των αγρίου τύπου ζώων δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά. Στο ήπαρ που εκφράζει και τα υψηλότερα επίπεδα mGDH, φαίνεται η ύπαρξη του διαγονιδίου να μην επηρεάζει καθόλου το σύνολο της δραστικότητας του ενζύμου στον εν λόγω ιστό, παρόλο που μελέτες με western blot έδειξαν πως η hGDH2 εκφράζεται σε πρωτεϊνικά ομογενοποιήματα ήπατος διαγονιδιακών ζώων. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει, ότι η έκφραση του διαγονιδίου είναι σε χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με την έκφραση της ενδογενής GDH σε όλους τους ιστούς. Η συμβολή της στην συνολική δραστηριότητα ανιχνεύθηκε μόνο στον όρχι, καθώς είναι ο μόνος ιστός που εκφράζει την ενδογενή σε αρκετά χαμηλά επίπεδα ώστε να επιτρέπει να φανεί ως στατιστικά σημαντική διαφορά η συνεισφορά της λειτουργίας της διαγονιδιακής hGDH2 πρωτεΐνης.

85



Εικόνα 22: Τιμές ειδικής ενζυμικής δραστικότητας της GDH σε περιφερικούς ιστούς Tg και WT ζώων. Η ενζυμική δραστικότητα μετρήθηκε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρουσία 50mM διαλύματος tirthalonamine (TRA), pH 8.0 και 1.0 mM ADP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.



Εικόνα 23: Τιμές ενζυμικής δραστικότητας σε περιφερικούς ιστούς διαγονιδιακών Tg13 και Tg32 και των αντίστοιχων WT ζώων. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές μόνο στον όρχι.

ΟΡΧΗΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	0.7014	2.190	1.832	1.832
maximum	1.090	2.202	2.644	2.644
μέσος όρος	0.9821	2.196	2.308	2.263
Std.Deviation	0.1564	0.008526	0.4239	0.3060
Std. Error of mean	0.0693	0.006029	0.2447	0.1319

Πίνακας 11: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα όρχεως διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΠΑΓΚΡΕΑΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	2	4
minimum	4.249	7.797	4.909	4.909
maximum	7.207	9.721	6.275	9.721
μέσος όρος	5.715	8.759	5.592	7.175
Std.Deviation	1.097	1.360	0.9663	2.067
Std. Error of mean	0.4904	0.9616	0.6833	1.033

Πίνακας 12: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα παγκρέατος διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΝΕΦΡΟΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	22.17	24.73	30.05	24.73
maximum	31.30	30.04	43.64	43.64
μέσος όρος	26.72	27.39	38.91	34.30
Std.Deviation	3.653	3.754	7.675	8.530
Std. Error of mean	1.634	2.655	4.431	3.815

Πίνακας 13: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα νεφρού διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

НПАР	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	60.13	84.04	77.73	77.33
maximum	112.2	105.3	105.8	105.8
μέσος όρος	94.60	94.65	87.64	90.45
Std.Deviation	20.58	15.01	15.74	13.96
Std. Error of mean	9.205	10.61	9.086	9.68

Πίνακας 14: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα ήπατος διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

4.2.2.β. Νευρικοί ιστοί

Τα επίπεδα έκφρασης της GDH στους νευρικούς ιστούς των ζώων είναι εν γένει χαμηλότερα από αυτά που παρατηρούνται στους περιφερικούς ιστούς. Με εξαίρεση τα ημισφαίρια, όπου η έκφραση του διαγονιδίου φαίνεται να έχει επηρεάσει τη συνολική ενζυμική δραστικότητα του ιστού (p=0.0039), στις υπόλοιπες περιοχές (παρεγκεφαλίδα, ιππόκαμπος, φλοιός, οσφρητικός λοβός, νωτιαίος μυελός) δεν εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων. Συνεπώς όπως ακριβώς και στους περιφερικούς ιστούς, τα επίπεδα έκφρασης της διαγονιδιακής πρωτεΐνης σε κάθε ιστό δεν ήταν τόσο υψηλά ώστε να μεταβάλλουν το σύνολο της ενζυμικής δραστικότητας.



Εικόνα 24: Τιμές ειδικής ενζυμικής δραστικότητας της GDH σε νευρικούς ιστούς Tg και WT ζώων. Η ενζυμική δραστικότητα μετρήθηκε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρουσία 50mM διαλύματος tirthalonamine (TRA), pH 8.0 και 1.0 mM ADP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.



Εικόνα 25: Τιμές ειδικής ενζυμικής δραστικότητας της GDH σε νευρκικούς ιστούς ανά γονότυπο(Tg13, Tg32 και WT). Οι τιμές είναι στατιστικά σημαντικές μόνο στα ημισφαίρια.

ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΑ	WT	Tg13	Tg32	Tg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	11.75	18.24	19.47	18.24
maximum	18.25	18.65	23.51	23.51
μέσος όρος	14.31	18.45	22.09	20.63
Std.Deviation	2.411	0.2937	2.264	2.560
Std. Error of mean	1.078	0.2077	1.307	1.145

Πίνακας 15: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΑ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	13.85	16.47	16.36	16.36
maximum	20.02	17.83	20.07	20.07
μέσος όρος	16.48	17.15	18.41	17.91
Std.Deviation	2.492	0.9625	1.884	1.576
Std. Error of mean	1.114	0.6806	1.088	0.7048

Πίνακας 16: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα παρεγκεφαλίδας διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΝΩΤ. ΜΥΕΛΟΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	2	3	5
minimum	6.204	18.39	13.03	13.03
maximum	20.27	20.16	14.31	20.16
μέσος όρος	14.03	19.28	13.66	14.51
Std.Deviation	5.475	1.251	0.6443	4.660
Std. Error of mean	2.448	0.8842	0.3720	2.084

Πίνακας 17: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα νωτιαίου μυελού διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	7	3	6	9
minimum	6.501	4.421	5.458	4.421
maximum	10.97	7.211	10.68	10.68
μέσος όρος	8.024	6.257	8.790	7.946
Std.Deviation	1.693	1.590	1.880	2.109
Std. Error of mean	0.6400	0.9180	0.7677	0.7029

Πίνακας 18: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα ιπποκάμπου διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων

ΦΛΟΙΟΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	5	4	5	9
minimum	4.158	7.408	6.013	6.013
maximum	16.25	8.031	9.976	9.976
μέσος όρος	9.333	7.688	7.652	7.668
Std.Deviation	4.732	0.2814	1.499	1.074
Std. Error of mean	2.116	0.1407	0.6703	0.3580

Πίνακας 19: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα φλοιού διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

ΟΣΦΡΗΤ.ΛΟΒΟΣ	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	2	2	2	4
minimum	10.23	6.905	9.567	6.905
maximum	11.06	11.37	10.76	11.37
μέσος όρος	10.64	9.140	10.16	9.652
Std.Deviation	0.5883	3.160	0.8424	1.979
Std. Error of mean	0.4160	2.235	0.5957	0.9893

Πίνακας 20: Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων την ενζυμικής δραστικότητας σε πρωτεϊνικό ομογενοποίημα οσφρητικού λοβού διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.

4.2.3. Μελέτες κυτταρικής έκφρασης της hGDH2 στα διαγονιδιακά ζώα

Η κυτταρική έκφραση της hGDH2 στους περιφερικούς ιστούς και στο νευρικό ιστό των διαγονιδιακών ζώων μελετήθηκε με μεθόδους ανοσοφθορισμού και ανοσοΐστοχημείας. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν η αποσαφήνιση του κυτταρικού προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου και η σύγκριση του με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης της hGDH2 στον άνθρωπο και εκείνο της ενδογενούς mGDH του μυός. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε κρυοτομές (ανοσοφθορισμός) και σε τομές παραφίνης (μονιμοποιημένοι ιστοί για ανοσοϊστοχημεία) σε αρσενικά ετερόζυγα διαγονιδιακά (Tg13 και Tg32) και αγρίου τύπου ζώας ίδιας ηλικίας.

4.2.3.α. Πρότυπο έκφρασης της hGDH2 στους περιφερικούς ιστούς διαγονιδιακών ζώων

ΟΡΧΙΣ

Ο όρχις είναι ένας ιστός που στον άνθρωπο διαφοροποιείται σαφώς το κυτταρικό πρότυπο της hGDH2 από εκείνον της hGDH1, με την hGDH1 να εκφράζεται μόνο στα στεροειδοπαραγωγά κύτταρα Leyding ενώ η hGDH2 να εκφράζεται έντονα στα κύτταρα Sertoli των σπερματοφόρων σωληναρίων και στα κύτταρα Leyding.



Εικόνα 26: Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης όρχεων διαγονιδιακού ζώου. Η mGDH (GDH1, πράσινο) ανιχνεύεται μόνο στο κύτταρα Leydig μεταξύ των σπερματοφόρων σωληναρίων στο διάμεσο ιστό, ενώ η hGDH2 (πράσινο) εκφράζεται τόσο στα Sertoli εντός των σπερματοφόρων σωληναρίων όσο και στα κύτταρα Leydig. Το πρότυπο κυτταρικής έκφρασης της hGDH2 στον όρχι των διαγονιδιακών ζώων διαφοροποιείται σαφώς από το αντίστοιχο της mGDH και είναι πανομοιότυπο με το πρότυπο της hGDH2 στον άνθρωπο.

Στον όρχι των GLUD2 διαγονιδιακών ζώων και των δύο γονοτύπων (σειρών), η hGDH2 εκφράζεται στα στηρικτικά κύτταρα Sertoli των σπερματοφόρων σωληναρίων και στα στεροειδοπαραγωγά κύτταρα Leydig του διάμεσου ιστού, όπως ακριβώς και στον άνθρωπο. Αντίθετα, η ενδογενής mGDH εκφράζεται μόνο στο κύτταρα Leydig και απουσιάζει πλήρως από τα κύτταρα Sertoli, σε απόλυτη συμφωνία με την hGDH1 του ανθρώπου. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει μια πιστή αναπαραγωγή του ανθρώπινου προτύπου έκφρασης στον όρχι των διαγονιδιακών ζώων. Η ειδική έκφραση της hGDH2 στα κύτταρα Sertoli πιστεύεται πως συνεισφέρει στην υποστήριξη των σπερματοκυττάρων κατά την ωρίμανσή τους με γαλακτικό οξύ, μέσω της οξείδωσης του γλουταμικού από την hGDH2 ανεξάρτητα από το ενεργειακό καθεστώς των κυττάρων.

ΠΑΓΚΡΕΑΣ

Στη συνέχεια μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης της hGDG2 στο πάγκρεας των διαγονιδιακών ζώων με την ταυτόχρονη χρήση αντισωμάτων για την hGDH2 και την ινσουλίνη αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η hGDH2 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του παγκρεατικού παρεγχύματος.



Εικόνα 27: Διπλός ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης παγκρέατος διαγονιδιακών ζώων. Η hGDH2 (πράσινο) εκφράζεται στα νησίδια του Langerhans και στα ινσουλινοπαραγωγά β-κύτταρα (κόκκινο) αλλά και σε κύτταρα εκτός των νησιδίων (objective 20x with numerical aperture 0.7, pinhoe 1 au)

Εντοπίζεται και στα ινσουλινοπαραγωγά κύτταρα (όπως αυτά σημάνθηκαν με το ειδικό για την ινσουλίνη αντίσωμα) των νησιδίων του Langerhans αλλά και σε κύτταρα εκτός των παγκρεατικών νησιδίων. Στο πάγκρεας το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου δεν διαφοροποιείται από το πρότυπο της ενδογενούς mGDH.



Εικόνα 28: Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης παγκρέατος διαγονιδιακών ζώων με τα ειδικά για την hGDH1/mGDH και hGDH2 αναδεικνύουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Τόσο η hGDH1 όσο και η hGDH2 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του παγκρεατικού παρεγχύματος (objective 20x with numerical aperture 0.7, pinhoe 1 au)

ΝΕΦΡΟΣ

Τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών μελετών σε τομές από ιστό νεφρών διαγονιδιακών ζώων έδειξαν πως τόσο η διαγονιδιακή πρωτεΐνη hGDH2 όσο και η ενδογενής mGDH εντοπίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων παρουσιάζοντας πανομοιότυπο πρότυπο έκφρασης (εικόνα 29). Όμοια κυτταρική εντόπιση των hGDH1 και hGDH2 έχει βρεθεί και στον άνθρωπο. Θεωρείται ότι η ικανότητα της hGDH2 να παραμένει ενεργή σε συνθήκες ανασταλτικές για την GDH1 (χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις GTP), ενισχύει την υπόθεση πως η παρουσία της διαγονιδίου στο νεφρικό επιθήλιο συνεισφέρει στην παραγωγή αμμωνία (μέσω απαμίνωσης του γλουταμικού) και τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, σε συνθήκες οξέωσης η ενεργειακής επάρκειας στις οποίες η hGDH1 είτε δεν λειτουργεί αποτελεσματικά είτε είναι σε καταστολή.



Εικόνα 29: Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης νεφρών διαγονιδιακών ζώων. Τόσο η hGDH2 όσο και η hGDH1 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων (objective 20x with numerical aperture 0.7, pinhole 1 au)

ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ

Στα επινεφρίδια η hGDH2 και η ενδογενής mGDH εκφράζονται στις τρεις στεροειδοπαραγωγές ζώνες του φλοιού των επινεφριδίων. Το πρότυπο έκφρασης που παρατηρήθηκε είναι το ίδιο για τις δύο ισομορφές και δεν διαφοροποιείται από το πρότυπο έκφρασης των δύο ισομορφών στα ανθρώπινα επινεφρίδια.



Εικόνα 30: Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένες τομές παραφίνης επινεφριδίων διαγονιδιακού ζώου.Η hGDH2 (πράσινο) εκφράζεται και στις 3 ζώνες του φλοιού των επινεφριδίων (objective 20x with numerical aperture 0.7, pinhoe 1 au)

4.2.3.6. ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

εΓκεΦΑΛΟΣ

Διαπιστώθηκε έκφραση της hGDH2 διαγονιδιακής πρωτεΐνης σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που μελετήθηκαν (κινητικός φλοιός, βασικά γάγγλια, ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα). Συγκεκριμένα στον εγκεφαλικό φλοιό διαπιστώθηκε έκφραση της διαγονιδιακής hGDH2 στο νευροπίλημα με πρότυπο παρόμοιο με αυτό της hGDH1



x20



x80



Εικόνα 31: Διπλός ανοσοφθορισμός με αντι-hGDH2 και anti-hGDH1 (πράσινα) και anti-NeuN (κόκκινο) αντισώματα σε μονιμοποιημένο εγκεφαλικό ιστό (ινιακός λοβός). Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης των δύο ισομορφών της GDH στο νευροπίλημα του εγκεφαλικού φλοιού. Απουσία έκφρασης των δύο ισομορφών στους απεικονιζόμενους νευρώνες (NeuN positive). Εικόνες από Tg32 αρσενικό ζώο ηλικίας 3 μηνών.

4.2.4 Κυτταρική έκφραση της hGDH2 στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων

Έκφραση της hGDH2 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε στα αστροκύτταρα της φαιάς και λευκής ουσίας του εγκεφάλου με πρότυπο παρόμοιο με εκείνο της mGDH και της hGDH2 στον άνθρωπο. Η hGDH2 ανιχνεύθηκε τόσο στα κυτταρικά σώματα όσο και στις αποφυάδες/processes αλλά και τους ποδίσκους (end-feet) με τους οποίους συμπληρώνουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό γύρω από τα αγγεία.



Εικόνα 32: Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού με anti-hGDH2 (πράσινο) και anti-GFAP (κόκκινο) αναδεικνύουν έκφραση της hGDH2 και συνεντοπισμό με το GFAP στα αστροκύτταρα της λευκής ουσίας του εγκεφάλου των διαγονιδιακών ζώων (A-C). Παρόμοιο πρότυπο έκφραση διαπιστώνεται και στα αστροκύτταρα των ανθρώπινου εγκεφάλου (D-F).



Εικόνα 33: Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού με anti-hGDH2 (πράσινο) και anti-GFAP (κόκκινο) αποκαλύπτουν έκφραση της GDH2 στα αστροκύτταρα που περιβάλλουν αγγεία στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης διαπιστώνεται και στα αστροκύτταρα των ανθρώπινου εγκεφάλου (D-F).

4.2.4.α. Έκφραση της hGDH2 σε ένα υποσύνολο νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού στα διαγονιδιακά ζώα.

Η πλειονότητα των νευρώνων στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων δεν φαίνεται να εκφράζουν την hGDH2. Μια πολύ μικρή κατηγορία νευρώνων με πυραμιδική μορφολογία φαίνεται ότι εμφανίζουν ένα πρότυπο κοκκώδους έκφρασης στο κυτταρόπλασμα που προσομοιάζει στο πρότυπο έκφρασης των πυραμιδικών νευρώνων στον ανθρώπινο εγκεφαλικό φλοιό.



Εικόνα 34: Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού με anti-hGDH2 (πράσινο) και anti-NeuN (κόκκινο) αναδεικνύουν έκφραση της hGDH2 σε ένα υποσύνολο νευρώνων με πυραμιδική μορφολογία και απουσία της από του περισσότερους νευρώνες που εκφράζουν το NeuN.



Εικόνα 35: Έκφραση της διαγονιδιακής hGDH2 πρωτεΐνης (πράσινο) σε νευρώνες πυραμιδικής μορφολογίας των διαγονιδιακών ζώων (A-F) με χρώση κοκκώδη με κατανομή στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος με πρότυπο πολύ παρόμοιο με το αντίστοιχο του ανθρώπου (G-L).

Αντίθετα με ό,τι γνωρίζουμε για τον άνθρωπο, η διαγονιδιακή μας πρωτεΐνη εκφράζεται στα ολιγοδενδροκύτταρα του ΚΝΣ των διαγονιδιακών μας ζώων.



Εικόνα 36: Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού με anti-hGDH2 και anti-Olig2 αναδεικνύουν έκφραση της hGDH2 στα ολιγοδενδροκύτταρα του ΚΝΣ των διαγονιδιακών Tg32 ζώων. Παρόμοια έκφραση δεν έχει τεκμηριωθεί στον άνθρωπο.

4.2.5. Περιοχική Έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στο ΚΝΣ των διαγονιδιακών ζώων.

Έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης hGDH2 διαπιστώθηκε σε όλες τις περιοχές του ΚΝΣ που εξετάστηκαν όπως στον ιππόκαμπο, τον κινητικό φλοιό, την παρεγκεφαλίδα και τον νωτιαίο μυελό.

Στον ιππόκαμπο διαπιστώθηκε έκφραση του διαγονιδίου στα αστροκύτταρα και στο νευροπίλημα, ιδίως της CA1 περιοχής και της οδοντωτής έλικας



Στην παρεγκεφαλίδα η hGDH2 ανιχνεύθηκε στο νευροπίλημα της κοκκώδους στιβάδας αλλά και κατά μήκος των προβολών των κυττάρων Bergman στην μοριώδη στιβάδα. Το πρότυπο έκφρασης της hGDH2 είναι παρόμοιο με το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς mGDH των ζώων. Η hGDH2 εκφράζεται επίσης, αν και ασθενέστερα, σε αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα της λευκής ουσίας.



Εικόνα 37: Εντοπισμός hGDH2 με διπλό ανοσοφθορισμό σε μη μονιμοποιημένες τομές παρεγκεφαλίδας διαγονιδιακού Tg32 αρσενικού ζώου. Η hGDH2 εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μοριώδη στιβάδα και το νευροπίλημα της κοκκιώδους στιβάδας ενώ η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στη λευκή ουσία είναι ασθενέστερη.



Εικόνα 38: Διπλός ανοσοφθορισμός για hGDH2 (πράσινο) και NeuN (κόκκινο, νευρωνικός δείκτης) σε μη μονιμοποιημένες τομές παρεγκεφαλίδας διαγονιδιακού Tg32 ζώου. Παρατηρείται κοκκώδης έκφραση του διαγονιδίου στο νευροπίλημα της κοκκιώδους μοίρας της παρεγκεφαλίδας και κατά μήκος των προεκβολών των κυττάρων Bergmann στη μοριώδη στιβάδα.

Στο νωτιαίο μυελό διαπιστώθηκε έκφραση της hGDH2 στο νευροπίλημα των προσθίων και οπισθίων κεράτων της φαιάς ουσίας αλλά και στις οπίσθιες ρίζες μετά την είσοδό του εντός του NM και πριν τη σύναψή τους στα οπίσθια κέρατα. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στην υπόλοιπη λευκή ουσία του NM π.χ. στα πλάγια ανιόντα και κατιόντα δεμάτια και τις οπίσθιες δέσμες.



Εικόνα 39: Εικόνες διπλού ανοσοφθορισμού με anti-GDH2 και αντι-GFAP αναδεικνύουν την έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στο νευροπίλημα των προσθίων και οπισθίων κεράτων του NM και κατά μήκος των οπισθίων ριζών μετά την είσοδό τους στο NM και πριν τη σύναψή τους με τα οπίσθια κέρατα.
4.3 Μορφολογικές Μελέτες

Τόσο οι περιφερικοί ιστοί όσο και το ΚΝΣ εξετάστηκαν συγκριτικά στις δύο ομάδες ζώων προκειμένου να διαπιστωθούν διαφορές στην αδρή μακροσκοπική μορφολογία τους αλλά και στην μικροσκοπική δομή τους σε τομές μονιμοποιημένων ιστών και από τις τρείς ομάδες κεχρωσμένες με την ιστολογική χρώση αιματοξυλινης ηωσίνης. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη μακροσκοπική μορφολογία και τη μικροσκοπική δομή των ιστών που μελετήθηκαν. Ειδικά για το πάγκρεας, προσδιορίστηκε επιπλέον ο αριθμός, το μέγεθος και η κατανομή των νησιδίων στο σύνολο του ιστού καθώς και ο αριθμός των β-κυττάρων ανά νησίδιο. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων στις παραμέτρους αυτές.

Ειδικά στον εγκέφαλο, εκτός από τη μελέτη της αδρής μορφολογίας με ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, προχωρήσαμε σε λεπτομερέστερη μορφολογική μελέτη των δενδριτικών ακάνθων των νευρώνων του εγκεφάλου, σε δύο περιοχές, τον ιππόκαμπο και τον μετωπιαίο λοβό (φλοιό) με χρώση Golgi-Cox. Διαπιστώσαμε ότι τα διαγονιδιακά ζώα έχουν σημαντικά περισσότερες ώριμες μανιταροειδείς δενδριτικές άκανθες σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα.



Εικόνα 40: Αυξημένος αριθμός ωρίμων μανιταροειδών ακάνθων εμφανίζουν τα GLUD2 διαγονιδικά ζώα σε σχέση με τα αγρίου τύπου στους νευρώνες του μετωπιαίου λοβού και του ιπποκάμπου που μελετήθηκαν με τη χρώση Golgi-Cox.

4.4. Χαρακτηρισμός φαινοτύπου GLUD2 διαγονιδιακών ζώων

4.4.1. Προσδιορισμός γλυκόζης σε συνθήκες νηστείας

Έχει δειχθεί πως η GDH1 παίζει ρόλο στην πλήρη ανάπτυξη της γλυκοζο-εξαρτώμενης έκκρισης ινσουλίνης (GSIS glucose stimulated insulin secretion) αλλά όχι στην ομοιόσταση της γλυκόζης υπό βασικές συνθήκες. Μελέτες αναστολής της λειτουργίας της GDH έχουν ως αποτέλεσμα την ελλειμματική πλήρη έκκριση ινσουλίνης (Bryla και συν. 1994, Li και συν. 2006. Maechler και συν. 2006) ενώ υπερλειτουργία του ενζύμου οδηγεί σε αυξημένη έκκριση ινσουλίνης όπως αποδεικνύεται από το σύνδρομο της υπερινσουλιναιμίας που σχετίζεται με μεταλλάξεις της hGDH1 που την καθιστούν υπερδραστήρια (Stanley και συν. 1998, Yorifuji και συν. 1999). Με δεδομένο τον σημαντικό ρόλο της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον μεταβολισμό της γλυκόζης και της έκκρισης ινσουλίνης (Sener και Malaise 1980) θεωρήσαμε σκόπιμο στα πλαίσια του

χαρακτηρισμού του φαινοτύπου των διαγονιδιακών ζώων να μετρήσουμε τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας νεαρών ενήλικων ζώων.

Για τις ανάγκες του πειράματος, διαγονιδιακά και αγρίου τύπου ζώα ηλικίας 3-6 μηνών στερήθηκαν τροφής για 12 ώρες κατά τη διάρκεια του κύκλου σκότους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποκάλυψαν πως τα διαγονιδιακά ζώα είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης (mean ± SD : 93.7 ±7.6 mg/dL, N=26) σε σχέση με τα αγρίου τύπου (mean ± SD : 143.8 ±17.5 mg/dL, N=23, p<0.0001). Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας μεταξύ των δύο διαγονιδιακών σειρών ήταν πολύ παρόμοια (p=0.678). Η δε διακύμανση των τιμών γλυκόζης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τη διακύμανση των τιμών των αγρίου τύπου ζώων. Τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας στα διαγονιδιακά ζώα και των δύο ομάδων ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα επίπεδα της ευγλυκαιμίας νηστείας του ανθρώπου.



Εικόνα 41: Επίπεδα γλυκόζης νηστείας (12h) WT και Tg ηλικίας 3-6 μηνών. Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των Tg ζώων είναι σημαντικά χαμηλότερα (Tg: 93.69 ± 7.62, WT: 143.8 ± 17.54 ,p<0.0001) από τα αντίστοιχα των WT.

	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	23	14	12	26
Minimum	119.0	79.00	79.00	79.00
Maximum	203	104.0	105.0	105.0
μέσος όρος	143.8	94.21	93.08	93.69
Std.Deviation	17.54	7.371	8.185	7.620
Std. Error of mean	3.658	1,970	2.363	1.494

Πίνακας 21: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (12h) μεταξύ WT , Tg13 και Tg32 ζώων ηλικίας 3-6 μηνών.

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω το κατά πόσο η σημαντική αυτή διαφορά στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας διατηρείται και υπό άλλες συνθήκες, μελετήσαμε τα επίπεδα γλυκόζης μετά από νηστεία 12h σε ζώα μεγαλύτερη ηλικίας. Ένας επιπλέον παράγοντας για την επιλογή μεγαλύτερης ηλικίας ζώων είναι το γεγονός πως το C57BL/6J στέλεχος μυός είναι επιρρεπές στην εμφάνιση διαβήτη με τη πρόοδο της ηλικίας και το γήρας. Οι μετρήσεις που πήραμε έδειξαν ότι η σημαντική αυτή διαφορά στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων εξακολουθεί να υφίσταται και μάλιστα επαυξημένη στα ηλικιωμένα ζώα.



Εικόνα 42: Επίπεδα γλυκόζης νηστείας (12h) WT και Tg ηλικίας >12 μηνών. Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των Tg ζώων είναι σημαντικά χαμηλότερα (Tg: 107.0 ± 14.64, WT: 161.1 ± 24.76, p<0.0001) από τα αντίστοιχα των WT.

	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	29	12	9	21
Minimum	109.0	100	67	67.0
Maximum	225.0	134	129	134.0
μέσος όρος	161.1	111.6	102	107.0
Std.Deviation	24.76	10.89	17.04	14.64
Std. Error of mean	4.598	3.284	5.389	3.195

Πίνακας 22: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (12h) μεταξύ WT , Tg13 και Tg32 ζώων ηλικίας >12 μηνών.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, παρατηρούμε πως τόσο τα διαγονιδιακά όσο και του αγρίου τύπου νεαρά ενήλικα ζώα έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας σε σχέση με τα ζώα μεγαλύτερη ηλικίας. Τα νεαρά αγρίου τύπου ζώα έχουν υψηλά (κάποια μάλιστα προ-διαβητικά) επίπεδα γλυκόζης νηστείας, τα οποία αυξάνονται ακόμα περισσότερο με το πέρας του χρόνου, αγγίζοντας σχεδόν διαβητικές τιμές σε κάποια από αυτά. Αντίθετα τα διαγονιδιακά ζώα διατηρούν τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη ηλικία αρκετά χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης όμοια με τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των υγιών ενήλικων ανθρώπων. Φαίνεται λοιπόν πως η διαγονιδιακή έκφραση της hGDH2 βελτιώνει την ομοιόσταση της γλυκόζης στο C57BL/6J στέλεχος και το προστατεύει από την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας και διαβήτη σε μεγάλη ηλικία.



Εικόνα 43: Σύγκριση επιπέδων γλυκόζης νηστείας (12h) μεταξύ νεαρών (3-6 μηνών) και γηραιών (>12 μηνών) WT και Tg ζώων. Τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας αυξάνονται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου (Tg νεαρά : 93.69 ± 7.62, Tg γηραιά : 107.0 ± 14.64, p=0.0007, WT νεαρά : 143.8 ± 17.54, WT γηραιά : 161.1 ± 24.76, p=0.0049)

	WT 3-6 μηνών	Tg 3-6 μηνών	WT >12 μηνών	Tg >12 μηνών
αριθμός ζώων	23	26	29	21
Minimum	119.0	79.00	109.0	67.00
Maximum	203.0	105.0	225.0	134.0
μέσος όρος	143.8	93.69	161.1	107.0
Std.Deviation	17.54	7.620	24.76	14.64
Std. Error of mean	3.658	1.494	4.590	3.195

Πίνακας 23: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (12h) μεταξύ νεαρών (3-6 μηνών) και γηραιών (>12 μηνών) WT και Tg ζώων.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της **Εικόνας 44** μελέτες συσχέτισης των επιπέδων γλυκόζης νηστείας με την ηλικία δείχνει μία αύξηση των επιπέδων γλυκόζης νηστείας σε αυξανόμενες ηλικίες τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα. Εντούτοις τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων παραμένουν χαμηλότερα σε όλο το ηλικιακό φάσμα των ζώων που μελετήθηκαν.



Εικόνα 44: Διάγραμμα των επιπέδων γλυκόζης νηστείας σε ζώα διαφορετικών ηλικιών και συσχέτισης του με την το χρόνο και την ηλικία (σε εβδομάδες). Και οι δύο ομάδες παρουσιάζουν αύξησης των τιμών γλυκόζης νηστείας με την πρόοδο της ηλικίας. Εντούτοις στα διαγονιδιακά ζώα οι τιμές παραμένουν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα και δεν αγγίζουν ποτέ τα προδιαβητικά ή διαβητικά επίπεδα που εμφανίζουν πολλά από τα αγρίου τύπου ζώα.

Προκειμένου να ελέγξουμε κατά πόσο η διάρκεια στέρησης τροφής, αλλά και το στάδιο του κύκλου φως-σκότους κατά το οποίο νηστεύουν τα ζώα, επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης (δεδομένου πως οι μύες είναι νυκτόβια ζώα), αποφασίσαμε να μετρήσουμε τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας σε γηραιά ενήλικα ζώα μετά από στέρηση τροφής διάρκειας έξι ωρών. κατά τη διάρκεια του κύκλου φωτός. Και σε αυτήν την συνθήκη τα διαγονιδιακά ζώα και των δύο γραμμών εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας. Τα αγρίου τύπου ζώα παρουσιάζουν ακόμα υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας (mean ± SD : 192.0 ±21.1 mg/dL, N=10) ενώ τα ζώα που φέρουν το διαγονίδιο εξακολουθούν να έχουν τιμές εντός των φυσιολογικών/ευγλυκαιμικών για τον άνθρωπο ορίων (mean ± SD : 119.7 ±12.8 mg/dL, N=9).

Παρόλο που μελετήθηκαν διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, η στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές γλυκόζης νηστείας διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων συνεχίζει να υπάρχει και να είναι αξιοσημείωτη (p<0.0001). Αναδεικνύεται επίσης το γεγονός ότι η έκφραση του διαγονιδίου σε ζώα με το συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην ανάπτυξη διαβητικών τιμών σε προχωρημένη ηλικία (γήρας).



Εικόνα 45: Επίπεδα γλυκόζης νηστείας (6h) WT και Tg ηλικίας >12 μηνών. Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των Tg ζώων είναι σημαντικά χαμηλότερα (Tg: 119.9 ± 12.77, WT: 192.0 ± 21.04, p<0.0001) από τα αντίστοιχα των WT.

	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	10	4	5	9
Minimum	158.0	109.0	102.0	102.0
Maximum	221.0	136.0	135.0	136.0
μέσος όρος	192.0	121.5	118.6	119.9
Std.Deviation	21.04	13.08	13.90	12.77
Std. Error of mean	6.653	6.538	6.219	4.257

Πίνακας 24: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (6h) μεταξύ γηραιών (>12 μηνών) WT και Tg ζώων.

Για να διαπιστώσουμε αν η σημαντική διαφορά στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας οφείλεται σε αντίστοιχη διαφορά στην παραγόμενη ινσουλίνη, προσδιορίσαμε με τη μέθοδο ELISA τα επίπεδα ινσουλίνης ορού (ταυτόχρονα με την μέτρηση γλυκόζης) αφού υποβάλαμε τα ζώα σε νηστεία 12h. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι τιμές ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ζώα είναι σημαντικά αυξημένες (mean ± SD : 1.67 ±0.15 ng/ml, N=12, p<0.0001) σε σχέση με τα WT ζώα (mean ± SD : 0.65 ±0.06 ng/ml, N=12). Φαίνεται λοιπόν πως η έκφραση της hGDH2 στο διαγονιδιακό μοντέλο αύξησε τη βασική έκκριση ινσουλίνης κατά 2.6 φορές με αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης νηστείας.



Εικόνα 46: Επίπεδα ινσουλίνης νηστείας (12h) νεαρών ενήλικων WT και Tg ζώων. Τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας των Tg ζώων είναι σημαντικά υψηλότερα (Tg: 1.67 ±0.15 ng/ml WT : 0.65 ±0.06 ng/ml, p<0.0001) από τα αντίστοιχα των WT.

	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	10	5	5	10
Minimum	0.1070	0.3110	0.3250	0.3110
Maximum	0.3930	0.6030	0.6750	0.6750
μέσος όρος	0.1757	0.4734	0.5064	0.4899
Std.Deviation	0.09363	0.1049	0.1368	0.1162
Std. Error of mean	0.02426	0.04689	0.06118	0.03675

Πίνακας 25: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων ινσουλίνης νηστείας (12h) μεταξύ WT και Tg ζώων ηλικίας 3-6 μηνών.

Για να εξετάσουμε και να αποκλείσουμε το γεγονός πως η παρουσία υψηλών επιπέδων ινσουλίνης νηστείας στον ορό των Τg ζώων, οφείλεται σε ανθεκτικότητα των μυών στην εν λόγω ορμόνη, εξετάσαμε την ευαισθησία νεαρών ενηλίκων μυών στην ινσουλίνη. Για το σκοπό αυτό, ζώα ηλικίας 3 μηνών στερήθηκαν τροφής για έξι ώρες κατά τη διάρκεια του κύκλου φωτός και στη συνέχεια υποβλήθηκαν στη δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 1 ΙU/Kg ανθρώπινης ινσουλίνης). Μετά τη χορήγηση ινσουλίνης παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα γλυκόζης αίματος μειώθηκαν τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα ακριβώς στον ίδιο βαθμό. Η στατιστική ανάλυση με repeated measurement ANOVA ανέδειξε ότι παρότι οι καμπύλες ανοχής στη γλυκόζη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων (p<0.0001), η διαφορά αυτή αποδίδεται εξολοκλήρου στα διαφορετικά αρχικά επίπεδα γλυκόζης νηστείας και όχι στον τρόπο και το βαθμό που αυτά μεταβάλλονται μετά τη χορήγηση ινσουλίνης, παράμετροι που είναι απολύτως συγκρίσιμες στις δύο ομάδες.



Εικόνα 47: Καμπύλες αντίστασης στην ινσουλίνη (1IU/kg) διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων. Η ύπαρξη της διαγονιδιακής πρωτεΐνης hGDH2 επηρεάζει το πως μεταβάλλονται τα επίπεδα γλυκόζης μετά από χορήγηση ινσουλίνης (p<0.0001 repeated measures ANOVA)

WT	0min	15min	30min	60min	90min	120min
αριθμός ζώων	10	10	10	10	10	10
Minimum	164.0	95.00	102.0	127.0	122.0	153.0
Maximum	208.0	145.0	158.0	179.0	194.0	181.0
μέσος όρος	185.0	120.5	129.7	150.5	158.0	162.2
Std.Deviation	15.03	17.30	18,97	16.18	20.96	8.991
Std. Error of	4.752	5.470	6.000	5.117	6.628	2.843
mean						

Πίνακας 26: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης κατά τη δοκιμασίας ανοχής στην ινσουλίνη σε WT ζώα.

Тg	0min	15min	30min	60min	90min	120min
αριθμός ζώων	10	10	10	10	10	10
Minimum	119.0	71.00	71.00	72.00	80.00	93.00
Maximum	157.0	99.00	90.00	105.0	107.0	126.0
μέσος όρος	137.7	82.80	81.90	86.40	95.30	110.0
Std.Deviation	13.33	8.892	5.216	9.571	10.00	8.705
Std. Error of	4.217	2.812	1.650	3.027	3.162	2.753
mean						

Πίνακας 27: Πίνακας αναλυτικών	αποτελεσμάτων των	ν τιμών	επιπέδων	γλυκόζης	κατά
τη δοκιμασίας ανοχής στην ινσουλ	ίνη σε Τg ζώα.				

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, δημιουργήσαμε μια γραφική παράσταση της μεταβολής των επιπέδων γλυκόζης μετά την χορήγηση ινσουλίνης σε σχέση με τον

χρόνο στις δύο ομάδες (Εικόνα 48). Έτσι παρά τη σημαντική διαφορά των επιπέδων γλυκόζης μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής στην ινσουλίνη (p<0.0001), η ποσοστιαία μεταβολή των τιμών της γλυκόζης σε σχέση με την αρχική τιμή γλυκόζης νηστείας σε κάθε ομάδα είναι παρόμοια και στις δύο ομάδες ζώων (repeated measures ANOVA, p=0.603). υποδηλώνοντας παρόμοια ευαισθησία στην ινσουλίνη μεταξύ διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων.



Εικόνα 48: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής των τιμών των επιπέδων γλυκόζης σε σχέση με τη τιμή των επιπέδων γλυκόζης νηστείας σε διαγονιδιακά και αγρίου τύπου ζώα. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των Tg και των WT ζώων (p= 0.603, repeated measures ANOVA).

Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας, που παρατηρήθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα, δεν μπορούν να αποδοθούν σε αντιρροπιστική αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης λόγω αυξημένης αντίστασης των ζώων σε αυτήν, καθώς οι δύο ομάδες εμφανίζουν ακριβώς την ίδια ευαισθησία στην χορήγηση ινσουλίνης.

4.4.2. Επίδραση του διαγονιδίου στη διαχείριση της προσλαμβανόμενης γλυκόζης (glucose dependent insulin release)

Με δεδομένο ότι τα διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γλυκόζης με υψηλά επίπεδα ινσουλίνης σε νηστεία και παρόμοια ευαισθησία στην ινσουλίνη, μελετήσαμε κατά πόσο διαφοροποιείται η διαχείριση της προσλαμβανόμενης γλυκόζης μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων. Για το λόγο αυτό χορηγήθηκε στα ζώα διάλυμα δεξτρόζης (35% (w/v), 1mg/g σωματικού βάρους, ενδοπεριτοναϊκά) μετά από νηστεία 12 ωρών και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης ορού. Όπως αναμενόταν, μία ώρα μετά τη χορήγηση δεξτρόζης τα επίπεδα γλυκόζης αίματος αυξήθηκαν τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα



Εικόνα 49: Διάγραμμα όπου απεικονίζονται τα επίπεδα γλυκόζης των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων πριν και μετά από χορήγηση δεξτρόζης. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης νηστείας στις δύο ομάδες.

0min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	133.0	90.00	91.00	90.00
maximum	185.0	100.0	101.0	101.0
μέσος όρος	157.4	94.67	96.00	95.43
Std. Deviation	18.37	5.033	4.397	4.315
Std. Error of mean	6.494	2.906	2.198	1.631

Πίνακας 28: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (πριν τη χορήγηση δεξτρόζης) Τg και WT ζώων.

60min	WT	Tg13	Tg32	Tg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	321.0	290.0	279.0	279.0
maximum	400.0	311.0	324.0	324.0
μέσος όρος	359.5	300.0	300.8	300.4
Std. Deviation	32.66	10.54	21.65	16.48
Std. Error of mean	11.55	6.083	10.83	6.229

Πίνακας 29: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης 60 min μετά τη χορήγηση δεξτρόζης Tg και WT ζώων.

Η αλγεβρική διαφορά (Δ_{f-i}) μεταξύ των αρχικών τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας και των επιπέδων μετά τη χορήγηση δεξτρόζης, φαίνεται να μην διαφοροποιείται μεταξύ των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων (WT: 202.1 ± 11.07, Tg: 205,0 ± 7,145, p=0.8310) (Παρ' όλα αυτά, η ποσοστιαία μεταβολή των αρχικών επιπέδων γλυκόζης μετά τη χορήγηση της δεξτρόζης στα διαγονιδιακά ζώα, είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου (WT: 130,5 ± 10,20, Tg: 215,7 ± 10,15

p<0.0001) λόγω των χαμηλότερων αρχικών τιμών τους. Εντούτοις, η μεταβολή μετά τη χορήγηση της δεξτρόζης ως απόλυτη τιμή, ήταν ακριβώς η ίδια στις δύο ομάδες, υποδηλώνοντας έναν κοινό υποκείμενο μηχανισμό που οφείλουμε να αποδώσουμε στην παρουσία ίσως της mGDH και όχι σε αυτήν την hGDH2.



Εικόνα 50: Διαγράμματα όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των επιπέδων γλυκόζης πριν και μετά τη χορήγηση δεξτρόζης στα Tg13, Tg32 και WT ζώων. α. ως αλγεβρική διαφορά τελικών και αρχικών τιμών και β. ως ποσοστιαία μεταβολή σε σχέση με τις αρχικές τιμές γλυκόζης νηστείας.

Κατ' αντίστοιχο τρόπο προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα ινσουλίνης ορού πριν και μετά τη χορήγηση δεξτρόζης. Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, μεταβλήθηκαν με τον ίδιο τρόπο (αυξήθηκαν) και κατά το ίδιο ακριβώς πόσο, τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα.



Εικόνα 51: Διάγραμμα όπου απεικονίζονται τα επίπεδα ινσουλίνης ορού των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων πριν και μετά από χορήγηση δεξτρόζης.Τα επίπεδα ινσουλίνης των διαγονιδιακών ζώων εξακολουθούν και είναι υψηλότερα και μετά τη χορήγηση δεξτρόζης (p<0.0001).

Η αλγεβρική διαφορά των τιμών πριν και μετά τη χορήγηση δεξτρόζης ήταν παρόμοια στα διαγονιδιακά (1,26 ± 0,19 ng/ml) και στα αγρίου τύπου ζώα (1,34 ± 0,45 ng/ml). Οι χαμηλές όμως τιμές των βασικών επιπέδων ινσουλίνης των αγρίου τύπου ζώων κάνουν την ποσοστιαία (σε σχέση με την αρχική τιμή) γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης να είναι μεγαλύτερη σε αυτά (214 ± 80%) σε σχέση με τα διαγονιδιακά (77 ± 10%) όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα. Για τον ίδιο λόγο, η στατιστική ανάλυση με repeated mesures ANOVA ανέδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της μεταβολής των επιπέδων ινσουλίνης μετά από χορήγηση γλυκόζης στις δύο ομάδες (p<0.0001) που αποδίδεται όμως στις διαφορετικές αρχικές τιμές και όχι σε διαφορετικού τύπου ή βαθμού μεταβολές στην έκκριση ινσουλίνης.



Εικόνα 52: Διαγράμματα όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των επιπέδων ινσουλίνης πριν και μετά τη χορήγηση δεξτρόζης στα Tg13, Tg32 και WT ζώων. α. ως αλγεβρική διαφορά τελικών και αρχικών τιμών. και β. ως ποσοστιαία μεταβολή σε σχέση με τις αρχικές τιμές ινσουλίνης νηστείας. Η ποσοστιαία γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης στα WT ζώα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα διαγονιδιακά (WT :214 ± 80%, Tg: 77 ± 10% p<0.001*)

4.4.3. Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη

Στη συνέχεια μελετήσαμε τη διαφοροποίηση των δοκιμασιών ανοχής γλυκόζης στις δύο ομάδες. Μετά τη χορήγηση δεξτρόζης, προσδιορίσαμε τα επίπεδα γλυκόζης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Από τις καμπύλες που παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα προκύπτει ότι τα διαγονιδιακά ζώα, καθώς ξεκινάνε από χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης, κινούνται σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα. Εντούτοις, και στις δύο ομάδες, το προσλαμβανόμενο φορτίο γλυκόζης οδηγεί σε υψηλές τιμές σακχάρου, όπως αυτό φαίνεται από τις καμπύλες ανοχής της γλυκόζης.



Εικόνα 53: Καμπύλες ανοχής στη γλυκόζη Tg και WT ζώων. Παρουσιάζονται οι μεταβολές των τιμών των επιπέδων γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου μετά από χορήγηση δεξτρόζης σε διαγονιδιακά και αγρίου τύπου ζώα. Η έκφραση του διαγονιδίου GLUD2 φαίνεται να επιδρά λίγο στον τρόπο με τον οποίο διαχειρίζονται τα Tg ζώα το προσλαμβανόμενο φορτίο γλυκόζης (p<0.0001, repeated measures ANOVA)

WT	0min	30min	60min	90min	120min
αριθμός ζώων	8	8	8	8	8
minimum	133.0	359.0	321.0	256.0	189.0
maximum	185.0	430.0	400.0	322.0	221.0
μέσος όρος	157.4	394.5	359.5	289.3	200.5
Std.Deviation	18.37	29.31	32.66	23.01	9.914
Std. Error of	6.494	10.36	11.55	8.134	3.505
mean					

Πίνακας 30: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης κατά τη δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη σε WT ζώα.

Tg	0min	30min	60min	90min	120min
αριθμός ζώων	8	8	8	8	
minimum	90.00	299.0	279.0	189.0	156.0
maximum	101.0	390.0	324.0	256.0	190.0
μέσος όρος	95.43	346.6	300.4	224.9	173.3
Std.Deviation	4.315	30.19	16.48	22.67	11.60
Std. Error of	1.631	11.41	6.229	8.567	4.385
mean					

Πίνακας 31: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης κατά τη δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη σε Tg ζώα.

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε πως τα διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν καλύτερη καμπύλη ανοχής στη γλυκόζης και πάλι λόγω των χαμηλότερων τιμών της αρχικά.

4.4.4. Επίδραση Λευκίνης στη διαχείριση γλυκόζης (έκκριση ινσουλίνης διεγειρόμενη από λευκίνη)

Η λευκίνη ανήκει στα απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία ο ανθρώπινος οργανισμός εξασφαλίζει δια μέσου γευμάτων, πλούσια σε ζωική πρωτεΐνη. Η λευκίνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα διακλαδιζόμενης αλύσου (μαζί με την ισολευκίνη και τη βαλίνη) και μπορεί να προάγει την έκκριση ινσουλίνης ως αμινοξύ (AASIS amino acid stimulated insulin secretion) ενώ είναι ένας σημαντικός αλλοστερικός ενεργοποιητής των hGDH1 και hGDH2. Εξετάσαμε λοιπόν πως η χορήγηση του αμινοξέος λευκίνη επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο διαχειρίζονται τα διαγονιδιακά ζώα τη γλυκόζη. Στη μεταγευματική περίοδο, τα αμινοξέα και κυρίως η λευκίνη διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης. Έχει βρεθεί πως ειδικά η λευκίνη αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης διεγείρου και αρουλίνης κυρίως μέσω

ενεργοποίησης της GDH1 (Sener και Malaise, 1979) στα β-κύτταρα και την επαγόμενη οξείδωση του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό που οδηγεί στη σύνθεση ATP στα βκύτταρα του παγκρέατος. Η αύξηση του λόγου ATP/ADP έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των K_{ATP} διαύλων, την ενεργοποίηση εισροής Ca²⁺ στο κύτταρο και έκκριση ινσουλίνης.



β - κύτταρο



Τα ζώα υποβλήθηκαν σε δωδεκάωρη νηστεία και αφού μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, χορηγήθηκαν σε αυτά 0.25 mg/g λευκίνης. Τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης επανεκτιμήθηκαν 1 h μετά τη χορήγηση του αμινοξέος. Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα (Εικόνα 55) σε αντίθεση με το αναμενόμενο, τα διαγονιδιακά ζώα δεν εμφάνισαν ουσιαστική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης ως απάντηση στη χορήγηση λευκίνης. Αντίθετα στα αγρίου τύπου ζώα, τα επίπεδα ινσουλίνης αυξήθηκαν σημαντικά (1.25 ± 0.076 ng/ml έναντι των αρχικών 0.68 ± 0.007, p<0.0001). Τα ήδη υψηλά επίπεδα ινσουλίνης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων παρέμειναν ουσιαστικά αμετάβλητα (1.90 ±0.26 ng/ml έναντι των αρχικών 1.71 ± 0.15, p=0.154)



Εικόνα 55: Διάγραμμα όπου απεικονίζονται τα επίπεδα ινσουλίνης ορού των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων πριν και 60 min μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη. Οι τιμές των επιπέδων ινσουλίνης ορού αυξήθηκαν στα WT ζώα (1.25 ± 0.076 ng/ml έναντι 0.68 ± 0.007, p<0.0001), ενώ στα Tg παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητα (1.90 ±0.26 ng/ml έναντι των 1.71 ± 0.15, p=0.154)

0min	WT	Tg13	Tg32	Tg
αριθμός ζώων	6	3	3	6
minimum	0.5900	1.671	1.458	1.458
maximum	0.7670	1.890	1.812	1.890
μέσος όρος	0.6772	1.776	1.640	1.708
Std.Deviation	0.07005	0.1098	0.1772	0.1514
Std. Error of mean	0.02860	0.06338	0.1023	0.06182

Πίνακας 32: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων ινσουλίνης νηστείας (πριν τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη) Τg και WT ζώων.

60min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	6	3	3	6
minimum	1.121	1.800	1.498	1.490
maximum	1.330	2.212	1.993	2.212
μέσος όρος	1.247	2.041	1.760	1.901
Std.Deviation	0.07554	0.2147	0.2488	0.2586
Std. Error of mean	0.03084	0.1240	0.1466	0.1056

Πίνακας 33: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων ινσουλίνης 60 min μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη Tg και WT ζώων.



Εικόνα 56: Διαγράμματα όπου απεικονίζονται οι μεταβολές των επιπέδων ινσουλίνης πριν και μετά τη χορήγηση L-λευκίνης στα Tg13, Tg32 και WT ζώων ως ποσοστιαία μεταβολή σε σχέση με τις αρχικές τιμές ινσουλίνης. Η ποσοστιαία έκκριση ινσουλίνης μετά από διέγερση με λευκίνη στα WT ζώα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα διαγονιδιακά εξαιτίας των διαφορετικών αρχικών τιμών των δύο ομάδων (WT : 86.10 ± 25.22%, Tg: 10.90 ± 6.240%, p= 0.0005)

Όσον αφορά τα επίπεδα γλυκόζης, αυτά παρέμειναν σχεδόν σταθερά στα διαγονιδιακά ζώα (100.4 ± 7.5 mg/dL έναντι των αρχικών 98.43 ± 5 mg/dL), ενώ η χορήγηση λευκίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στα αγρίου τύπου ζώα (136.9 ± 23.67 mg/dL έναντι 163.8 ± 23.92 mg/dL). Η στατιστική ανάλυση με repeated measures ANOVA ανέδειξε μια σημαντική επίδραση του γονοτύπου (wt v/s tg) στον τρόπο που η λευκίνη επιδρά στα επίπεδα γλυκόζης στις δύο ομάδες ζώων (p<0.0001).



Εικόνα 57: Διάγραμμα όπου απεικονίζονται οι τιμές επιπέδων γλυκόζης των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων πριν και 60 min μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη. Οι τιμές των επιπέδων γλυκόζης μειώθηκαν στα WT ζώα (136.9 ± 23.67 mg/dL έναντι 163.8 ± 23.92 mg/dL) ενώ στα Tg παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητα (100.4 ± 7 mg/dL έναντι 98.43 ± 5 mg/dL) (p=0.5680).

0min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	139.0	96.00	92.00	92.00
maximum	201.0	106.0	104.0	106.00
μέσος όρος	163.8	100.3	97.00	98.43
Std. Deviation	23.92	5.132	5.099	4.995
Std. Error of mean	8.455	2.963	2.550	1.888

Πίνακας 34: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (πριν τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη) Τg και WT ζώων.

60min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	116.0	102.0	88.0	88.0
maximum	187.0	107.0	108.0	108.0
μέσος όρος	136.9	104.7	97.25	100.4
Std. Deviation	23.67	2.517	8.694	7.458
Std. Error of mean	8.368	1.453	4.347	2.819

Πίνακας 35: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη Tg και WT ζώων.

4.4.5. Επίδραση Λευκίνης στη διαχείριση προσλαμβανόμενης γλυκόζης

Έχουμε λοιπόν δει ότι η χορήγηση διαλύματος δεξτρόζης μεταβάλει με τον ίδιο τρόπο τα διαφορετικά επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας των δύο ομάδων ενώ η χορήγησης του αμινοξέος λευκίνη δεν επηρεάζει καθόλου την έκκριση ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ενώ αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης των αγρίου τύπου ζώων. Στη συνέχεια μελετήσαμε το αν η χορήγηση λευκίνης πριν τη χορήγηση δεξτρόζης επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τις δύο ομάδες. Για το λόγο αυτό τα ζώα στερήθηκαν τροφής για 12 h κατά τον κύκλο σκότους και την επόμενη ημέρα, αφού μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, χορηγήθηκε σε αυτά με τη μορφή σκευάσματος γέλης λευκίνη (0.25 mg/g σωματικού βάρους). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του διαλύματος δεξτρόζης (35% (w/v), 1mg/g σωματικού βάρους) έγινε 30 min αργότερα. Τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης ορού μετρήθηκαν μία ώρα μετά τη χορήγηση λευκίνης (30 min μετά τη χορήγηση διαλύματος δεξτρόζης).

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, τα επίπεδα ινσουλίνης αυξήθηκαν τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα. Παρόλο που τα επίπεδα ινσουλίνης των αγρίου τύπου ζώων φαίνεται να τετραπλασιάστηκαν (2.5 ± 0.32 έναντι 0.63 ±0.05) ενώ τα τελικά επίπεδα ινσουλίνης των διαγονιδιακών ζώων ήταν διπλάσια των αρχικών (3.211 ± 0.28 έναντι των αρχικών 1.634 ± 0.15), η αλγεβρική διαφορά μεταξύ των τελικών και αρχικών επιπέδων ινσουλίνης προς το χρόνο είναι παρόμοια στις δύο ομάδες ζώων.





0min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	6	3	3	6
minimum	0.578	1.600	1.349	1.349
maximum	0.7010	1.765	1.720	1.765
μέσος όρος	0.6320	1.678	1.590	1.634
Std.Deviation	0.05417	0.08282	0.2087	0.1501
Std. Error of mean	0.02211	0.04781	0.1205	0.06126

Πίνακας 36: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων ινσουλίνης νηστείας (πριν τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη και δεξτρόζης) Τg και WT ζώων.

60min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	6	3	3	6
minimum	1.982	3.000	2.900	2.900
maximum	2.832	3.366	3.670	3.670
μέσος όρος	2.486	3.199	3.223	3.211
Std. Deviation	0.3213	0.1850	0.3995	0.2788
Std. Error of	0.1312	0.1068	0.2307	0.1138
mean				

Πίνακας 37: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων ινσουλίνης μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη και δεξτρόζης Tg και WT ζώων.

Όσον αφορά τα επίπεδα γλυκόζης, όπως και ήταν αναμενόμενο, αυξήθηκαν και στις δύο ομάδες ζώων, όταν μετρήθηκαν μία ώρα μετά τη χορήγηση του διαλύματος δεξτρόζης. Τα αρχικά επίπεδα γλυκόζης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων (100.6 ± 4.392 έναντι 162.0 ± 29.31) ήταν σημαντικά χαμηλότερα των επιπέδων γλυκόζης νηστείας των αγρίου τύπου επιβεβαιώνοντας για μία ακόμα φορά τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων. Η διαφορά αυτή παραμένει και μετά τη χορήγηση λευκίνης και δεξτρόζης (193.9 ± 15.59 έναντι 267.0 ± 20.4). Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι πως ενώ η χορήγηση λευκίνης δεν μεταβάλλει τη βασική έκκριση ινσουλίνης και τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων, φαίνεται να βελτιώνει τον τρόπο με τον οποίο διαχειρίζονται τα διαγονιδιακά ζώα το προσλαμβανόμενο φορτίο γλυκόζης. Το ίδιο παρατηρείται και στα επίπεδα γλυκόζης των αγρίου τύπου ζώων, τα οποία εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα αν έχει προηγηθεί λήψη λευκίνης πριν τη χορήγηση φορτίου γλυκόζης.



Εικόνα 59: Διάγραμμα όπου παριστάνονται οι τιμές των επιπέδων γλυκόζης Tg και WT ζώων πριν και μετά τη χορήγηση λευκίνης και δεξτρόζης. Οι τιμές των επίπεδων γλυκόζης μετά τη χορήγηση δεξτρόζης αυξάνονται τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα.

0min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	123.0	102.2	94.00	94.00
maximum	195.0	108.0	100.0	108.0
μέσος όρος	162.0	104.3	97.75	100.6
Std.Deviation	29.31	3.215	2.630	4.392
Std. Error of mean	10.36	1.856	1.315	1.660

Πίνακας 38: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης νηστείας (πριν τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη και δεξτρόζης) Τg και WT ζώων.

60min	WT	Tg13	Tg32	Тg
αριθμός ζώων	8	3	4	7
minimum	230.0	181.0	177.0	177.0
maximum	289.0	212.0	216.0	216.0
μέσος όρος	267.0	193.7	194.0	193.9
Std.Deviation	20.45	16.26	17.61	15.59
Std. Error of mean	7.228	9.387	8.803	5.894

Πίνακας 39: Πίνακας αναλυτικών αποτελεσμάτων των τιμών επιπέδων γλυκόζης μετά τη χορήγηση του αμινοξέος L-λευκίνη και δεξτρόζης Τg και WT ζώων.



Εικόνα 60: Σύγκριση τιμών επιπέδων γλυκόζης Tg και WT ζώων, μία ώρα μετά την χορήγηση δεξτρόζης, χωρίς και μετά από χορήγηση του αμινοξέος L- λευκίνης.

4.4.6. Αναπτυξιακές και άλλες Μετρήσεις

Πρόσληψη τροφής και Σωματικό Βάρος

Μία παράμετρος του φαινοτύπου του πειραματικού μας μοντέλου που μελετήθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής ήταν η ημερήσια πρόσληψη τροφής στην νεαρή ενήλικη ζωή και το σωματικό βάρος των πειραματόζωων. Δεν διαπιστώθηκε διαφορά στις δύο αυτές παραμέτρους. Συγκεκριμένα το βάρος των νεαρών ενήλικων ζώων (2-3 μηνών) ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες (Tg: 24.25 ± 0.96,WT: 24.54 ± 1.04) Ακολούθως μελετήθηκε η μεταβολή του βάρους του σώματος με το χρόνο και την αύξηση της ηλικίας. Όταν μελετήθηκαν ζώα μεγαλύτερης ηλικίας (>12 μηνών), διαπιστώσαμε ότι τα διαγονιδιακά ζώα είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σωματικού βάρους σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Tg: 34.26 ± 0.53 WT: 39.53 ± 1.5. p=0.0077).



Εικόνα 61: Τιμές σωματικού βάρους διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων δύο ηλικιακών σταδίων (2 και 14 μηνών). Ενώ δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών σωματικού βάρους μεταξύ διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων ηλικίας 2 μηνών, οι τιμές του σωματικού βάρους των αγρίου τύπου ζώων είναι σημαντικά μεγαλύτερες στην ηλικία των 14 μηνών (p= 0.0077, t-test)

Δεδομένου πως τα ζώα σε όλες τις ομάδες είχαν στη διάθεσή τους την ίδια ποιότητα και ποσότητα τροφής, και κατανάλωναν παρόμοιες ποσότητες με βάση τις καθημερινές μας μετρήσεις (ζύγισμα τροφής) επί σειρά εβδομάδων, υποθέσαμε ότι η διαφοροποίηση αυτή στη μεταβολή του σωματικού βάρους με την ηλικία πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό ενεργειακό μεταβολισμό των δύο ομάδων ζώων. Με βάση την υπόθεση αυτή, τα διαγονιδιακά ίσως καταφέρνουν και διαχειρίζονται αποτελεσματικότερα την ενέργεια που προσλαμβάνουν με την τροφή με συνέπεια να προσλαμβάνουν λιγότερο βάρος με την ηλικία. Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο εύρημα, μελετήσαμε 10 αγρίου τύπου και 8 διαγονιδιακά ζώα (4 από κάθε γονότυπο), σε βάθος εξαμήνου, όσον αφορά τις μεταβολές στο σωματικό τους βάρος σε βάθος χρόνου.



Εικόνα 62: Διάγραμμα τιμών σωματικού βάρους διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων όπως αυτές μετρήθηκαν στην ηλικία των 6 και 12 μηνών. Ενώ στους 6 μήνες δεν υπάρχει διαφοροποίηση των τιμών σωματικού βάρους, στους 12 μήνες τα αγρίου τύπου ζώα έχουν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές σωματικού βάρους (p=0.0109)

Η καταγραφή του σωματικού βάρους των ζώων ξεκίνησε από την ηλικία των 6 μηνών και ολοκληρώθηκε όταν τα ζώα συμπλήρωσαν το δωδέκατο μήνα. Ενώ στην ηλικία των 6 μηνών δεν υπήρχε διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών σωματικού βάρους των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων (30.26 ± 0.44 έναντι 30.96 ± 0.49), οι τιμές του σωματικού βάρους των αγρίου τύπου ζώων στην ηλικία των 12 μηνών ήταν σημαντικά μεγαλύτερες (WT : 36.14 ± 0.66, Tg : 33.30 ± 0.72, p=0.0109).



Εικόνα 63: Διάγραμμα μεταβολής των τιμών σωματικού βάρους σε χρονικό διάστημα 6 μηνών διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων. Τα βάρος των αγρίου τύπου ζώων αυξήθηκε κατά 16.86% ± 2.4 έναντι 10.05% ± 1.82 των διαγονιδιακών. Η αύξηση του σωματικού βάρους των αγρίου τύπου ζώων είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των διαγονιδιακών (p=0.0377)

Στη συνέχεια, καθώς διαπιστώσαμε ότι τα διαγονιδιακά ζώα παίρνουν δυσκολότερα βάρος με την πρόοδο της ηλικίας σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα που γίνονται παχύσαρκα με το χρόνο, μελετήσαμε αν τα ζώα μας χάνουν ευκολότερα βάρος μετά από στέρηση τροφής. Με βάση την υπόθεση εργασίας μας, ένας αποτελεσματικότερος και ταχύτερος μεταβολισμός ως αποτέλεσμα της παρουσίας της hGDH2, θα πρέπει να οδηγεί και σε ταχύτερη κινητοποίηση αποθηκευμένης ενέργειας με συνέπεια ευκολότερη απώλεια βάρους μετά από στέρηση τροφής. Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο ερώτημα, προσδιορίσαμε το βάρος σώματος 10 αγρίου τύπου και 8 διαγονιδιακών ζώων μετά από 24 και μετά από 48ωρη στέρηση τροφής, με χρονική απόσταση μεταξύ των πειραμάτων πάνω από έναν μήνα.



Εικόνα 64: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής των τιμών σωματικού βάρους Tg και WT ζώων μετά από στέρηση τροφής για 24h. Η ποσοστιαία μεταβολή του βάρους των διαγονιδιακών ζώων δεν διαφοροποιείται σε σχέση με τα ζώα αγρίου τύπου (Tg: 9.37 ± 1.21 %, WT : 9.62 ± 2.16 %, p= 0.7568)

Διαπιστώσαμε ότι, ενώ μετά την 24ωρη στέρηση τροφής το βάρος των ζώων μεταβλήθηκε το ίδιο στις δύο ομάδες, μετά από 48ωρη στέρηση τροφής τα διαγονιδιακά ζώα έχασαν μεγαλύτερο ποσοστό του αρχικού τους βάρους σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα (Tg: 15.33 ± 0.85 %, WT : 13.62 ± 2.0 % , p= 0.0293), επιβεβαιώνοντας την αρχική μας υπόθεση. Περαιτέρω μελέτες της κατανάλωσης ενέργειας σε ζώα των δύο ομάδων βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας και αναμένεται να απαντήσουν το συγκεκριμένο ερώτημα και να τεκμηριώσουν την ορθότητα της υπόθεσής μας.



Εικόνα 65: Διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής των τιμών σωματικού βάρους Tg και WT ζώων μετά από στέρηση τροφής για 48h. Η ποσοστιαία μεταβολή του βάρους των διαγονιδιακών ζώων είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα ζώα αγρίου τύπου (Tg: 15.33 ± 0.85 %, WT : 13.62 ± 2.0 %, p= 0.0293)

4.5 Συμπεριφορικές Μελέτες

Προκειμένου να ολοκληρώσουμε τη χαρτογράφηση του φαινοτύπου του πειραματικού μας μοντέλου μελετήσαμε κατά πόσο η προσθήκη και έκφραση του *GLUD2* γονιδίου είχε επιπτώσεις στη συμπεριφορά του ζώου.

Εξετάσαμε τη κινητικότητα, το άγχος, τη μνήμη και την ευαισθησία στον πόνο σε όλες τις ομάδες ζώων.

4.5.1. Κινητικότητα-Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field)

Με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field) μελετήθηκε η αυθόρμητη κινητικότητα (spontaneous locomotor activity) νεαρών ενήλικων ζώων (ηλικίας 3-5 μηνών), ο
κινητικός τους έλεγχος και η τάση τους για εξερεύνηση. Η έκφραση της hGDH2 στα διαγονιδιακά ζώα δεν επηρέασε την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα του ζώου και τον τρόπο με τον οποίο στέκεται ή κινείται με τα τέσσερα άκρα του καθώς τα αποτελέσματα της καταγραφόμενης συμπεριφοράς των Tg ζώων δεν διαφοροποιούνται από αυτά των αγρίου τύπου (Tg : 4240 ± 242.5, WT : 4584 ± 260.2, p=0.4323)



Εικόνα 66: Μέτρηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας ενήλικων μυών στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου, μετά από καταγραφή για μία ώρα. Η παρουσία του GLUD2 γονιδίου δεν φαίνεται να μεταβάλλει την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των διαγονιδιακών ζώων (p=0.4323)

4.5.2. Ευαισθησία στον πόνο - Δοκιμασία θερμικής υπεραλγησίας

Η παράμετρος της θερμικής αλγαισθησίας μελετήθηκε με τη χρήση δύο ξεχωριστών πειραματικών διατάξεων της θερμαινόμενης πλάκας (hot plate) και του Plantar test (Hargreaves' method). Για τους σκοπούς της μελέτης επιλέχθηκαν νεαρά ενήλικα διαγονιδιακά και αγρίου τύπου ζώα.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στον πόνο προκαλούμενο από θερμικό ερέθισμα σε σχέση με τα αγρίου τύπου τόσο κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας θερμαινόμενης πλάκας (hot plate) (p<0.0001) όσο και κατά τη δοκιμασία Plantar test (p=0.0098)



Εικόνα 67: Δοκιμασία Hot Plate. Οι χρόνοι απόκρισης των διαγονιδιακών ζώων ήταν σημαντικά μικρότεροι (p < 0.0001) σε σχέση με τα αγρίου τύπου υποδηλώνοντας πως τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία σε πόνο που προκαλείται από θερμικό ερέθισμα.



Εικόνα 68: Δοκιμασία Plantar Test (Hargreaves' method). Οι χρόνοι απόκρισης των διαγονιδιακών ζώων ήταν σημαντικά μικρότεροι (p< 0.0098) σε σχέση με τα αγρίου τύπου υποδηλώνοντας πως τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία σε πόνο που προκαλείται από θερμικό ερέθισμα.

4.5.3. ΑΓΧΟΣ-Δοκιμασία Φωτός/Σκότους

Για την αναπαραγωγή των συμπτωμάτων άγχους και την μελέτη της επίδρασης της έκφρασης του διαγονιδίου στα επίπεδα άγχους των ζώων επιλέχθηκε η δοκιμασία φωτός-σκότους (Forestiero και συν. 2006). Η έκφραση της διαγονιδιακής hGDH2 πρωτεΐνης δεν επηρέασε την απόδοση των διαγονιδιακών ζώων στη δοκιμασία καθώς τόσο οι χρόνοι παραμονής στα σκοτεινό και το φωτεινό διαμέρισμα όσο και ο αριθμός των διελεύσεων από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα είναι συγκρίσιμοι με τους αντίστοιχους χρόνους των αγρίου τύπου ζώων.



Εικόνα 69: Διάγραμμα συνολικού χρόνου παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα. Οι χρόνοι παραμονής των διαγονιδιακών ζώων στο φωτεινό διαμέρισμα δεν διαφέρουν από τους αντίστοιχους χρόνους των αγρίου τύπου ζώων (Tg: 203 ± 17.8, WT: 230 ± 16.8)



Εικόνα 70: Διάγραμμα συνολικού αριθμού διελεύσεων μεταξύ των διαμερισμάτων κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας φωτός/σκότους. Η ύπαρξη της διαγονιδιακής πρωτεΐνης δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στη παράμετρο αυτή. (Tg : 32.32 ± 3.19, WT: 32.40 ± 8.42)

4.5.4 ΑΓΧΟΣ - Δοκιμασία Ανυψωμένου Λαβυρίνθου (elevated plus maze)

Η πειραματική διάταξη του ανυψωμένου λαβυρίνθου χρησιμοποιήθηκε ως μία ακόμα δοκιμασία για τη μελέτη συμπεριφοράς σχετιζόμενη με το άγχος. Ο παρατεταμένος χρόνος παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες, σε σχέση με τον συνολικό χρόνο που ξοδεύει το ζώο και στα δύο είδη βραχιόνων, χρησιμοποιείται ως ένδειξη αγχώδους συμπεριφοράς. Τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά περισσότερο άγχος όπως αυτή αντικατοπτρίζεται από τους χρόνους παραμονής στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες αντίστοιχα (p= 0.0156).



Εικόνα 71: Φαίνεται πως στο σύνολό τους τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη συμπεριφορά σχετιζόμενη με το άγχος σε σχέση με τα ζώα αγρίου τύπου(p=0.0156). Επιμέρους ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών, φαίνεται πως το εύρημα αυτό περιορίζεται μόνο στη διαγονιδιακή σειρά Tg32 (Tg13 v/s WT p= 0.1180, Tg32 v/s WT p= 0.0181)

4.5.5 ΧΩΡΙΚΗ ΜΝΗΜΗ - Δοκιμασία Χωρικής Μετατόπισης Αντικειμένου (object location task)

Με σκοπό τη μελέτη του αν η έκφραση της hGDH2 στο νευρικό σύστημα των διαγονιδιακών ζώων επηρεάζει τη βραχυπρόθεσμη χωρική μνήμη (λειτουργία ραχιαίου ιπποκάμπου), τα ζώα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία χωρικής μετατόπισης αντικειμένου (OLT). Ο συνολικός χρόνος που δαπάνησαν τα διαγονιδιακά ζώα εξερευνώντας τα αντικείμενα στα οποία εκτέθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (sample trial, T1) δεν διαφοροποιείται από τον αντίστοιχο χρόνο των αγρίου τύπου ζώων (Tg:43.46 ± 5.3, WT: 41.99 ± 4.27, p=0.8306) υποδηλώνοντας "περιέργεια" ίδιου βαθμού στα ζώα των δύο ομάδων.



Εικόνα 72: Χρόνοι εξερεύνησης των δύο πανομοιότυπων αντικειμένων κατά τη διάρκεια δοκιμής εκπαίδευσης (T1) των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων. Η έκφραση της hGDH2 δεν φαίνεται να επηρεάζει την εξερευνητική συμπεριφορά των διαγονιδιακών ζώων.

Κατά την αξιολόγηση του δείκτη διάκρισης (D.I) όπως αυτός προέκυψε μετά και την ολοκλήρωση της δοκιμασίας αναγνώρισης (choice trial, T2), φαίνεται πως τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη δυνατότητα στο να διακρίνουν τη νέα θέση του αντικειμένου (Tg : 0.009 ± 0.063, WT: 0.304 ± 0.084, p=0.0498). Όταν αναλύθηκε κάθε διαγονιδιακή σειρά ξεχωριστά (Tg13 και Tg32), προέκυψε πως μόνο ο δείκτης διάκρισης της διαγονιδιακής σειράς Tg32 ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο δείκτη διάκρισης των αγρίου τύπου ζώων (p=0.0446), ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του δείκτη διάκρισης (D.I) της διαγονιδιακής σειράς Tg13 με τον D.I των WT ζώων (p=0.3534). Στατιστικά σημαντικά διαφορά δεν παρατηρείται εντούτοις ανάμεσα στους δείκτες διάκρισης των δύο διαγονιδιακών σειρών (p=0.3129)



Εικόνα 73: Δείκτης διάκρισης D.I, ο οποίος αντικατοπτρίζει την επίδοση των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων στη δοκιμασία αναγνώρισης (T2). Φαίνεται πως στο σύνολό τους τα διαγονιδιακά ζώα έχουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα διάκρισης της νέας θέσης του αντικειμένου, ενώ επιμέρους ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών, φαίνεται πως το εύρημα αυτό περιορίζεται μόνο στη διαγονιδιακή σειρά Tg32.

4.5.6. Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (object recognition task)

Η πραγμάτωση της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου είχε ως σκοπό τη μελέτη της ικανότητας των ζώων να αναγνωρίσουν μία σειρά από νέα ερεθίσματα σε οικείο περιβάλλον και κατά συνέπεια να δούμε την επίδραση του *GLUD2* στην αναγνωριστική μνήμη των διαγονιδιακών ζώων.

Ο συνολικός χρόνος που δαπάνησαν τα διαγονιδιακά ζώα εξερευνώντας τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα στα οποία εκτέθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (sample trial, T1) δεν διαφοροποιείται από τον αντίστοιχο χρόνο των αγρίου τύπου ζώων (Tg:53.95 ± 5.34, WT: 53.79 ± 5.27, p=0.9034) όπως και στη δοκιμασία T1 του πειράματος της χωρικής μνήμης (Εικόνα 72).



Εικόνα 74: Χρόνοι εξερεύνησης των δύο πανομοιότυπων αντικειμένων κατά τη διάρκεια δοκιμής εκπαίδευσης (T1) των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων. Η έκφραση της hGDH2 δεν φαίνεται να επηρεάζει την εξερευνητική συμπεριφορά των διαγονιδιακών ζώων.

Ανάλυση των δεικτών διάκρισης των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων όπως προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου, δεν αναδεικνύει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ Tg και WT ζώων (p=0.1796) αν και φαίνεται πως τα διαγονιδιακά ζώα να έχουν μία τάση για μειωμένη ικανότητα διάκρισης του νέου αντικειμένου από το οικείο (Tg : 0.143 ± 0.084, WT: 0.30 ± 0.07458). Επιμέρους ανάλυση των δεικτών διάκρισης των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg13 και Tg32) σε σχέση με τον δείκτη διάκρισης των Wt ζώων δεν αποκάλυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Tg13 v/s WT, p=0.2605 και g32 v/s WT p=0.3195).



Εικόνα 75: Δείκτης διάκρισης D.I, ο οποίος αντικατοπτρίζει την επίδοση των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων στη δοκιμασία αναγνώρισης (T2). Φαίνεται πως τόσο στο σύνολό τους, όσο κάθε μία από τις δύο διαγονιδιακές σειρές (Tg13 και Tg32) ξεχωριστά εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα διάκρισης του νέου αντικειμένου, χωρίς ωστόσο η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο που καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό, ανάγοντας NAD(P)+ σε NAD(P)Η. Παίζει σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την αναπλήρωση του κύκλου του krebs και την παραγωγή ενέργεια, την διατήρηση της οξειδοαναγωγική ισορροπίας και ομοιόστασης, τον έλεγχο συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών ειδικών για κάθε ιστό όπως π.χ. της έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος κ.α. Στον άνθρωπο και σε ορισμένα ακόμα πρωτεύοντα, η GDH κωδικοποιείται από 2 διαφορετικά γονίδια, τα GLUD1 και GLUD2. Το GLUD1 γονίδιο είναι το γονίδιο κυτταρικής οικονομίας που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς. Διατηρήθηκε ισχυρά κατά την εξέλιξη και εμφανίζει υψηλή ομολογία σε όλα τα θηλαστικά. Το GLUD2 είναι ένα εξελικτικά πολύ νεότερο γονίδιο, που προέκυψε από ρετρομετάθεση του GLUD1 γονιδίου στο χρωμόσωμα Χ, πριν από περίπου 23 εκατομμύρια χρόνια. Υπό την πίεση της φυσικής επιλογής, το GLUD2 εξελίχθηκε ταχέως μέχρι τον άνθρωπο, συσσωρεύοντας 15 αμινοξικές αλλαγές που τροποποίησαν σημαντικά την αλλοστερική ρύθμιση και πιθανά τη λειτουργία του, σε σύγκριση με το μητρικό hGDH1. Το εξελικτικό πλεονέκτημα που το νέο αυτό ένζυμο hGDH2 έχει διασφαλίσει για την βιολογία του ανθρώπου και ο συγκεκριμένος ρόλος που επιτελεί στους ιστούς που εκφράζεται, παραμένουν άγνωστα.

Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου του εξελικτικά νεότερου αυτού ενζύμου hGDH2 στη βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, δημιουργήσαμε ένα διαγονιδιακό ζωικό πειραματικό μοντέλο μυός, στο οποίο εισαγάγαμε με τυχαία ένθεση το γονίδιο GLUD2 και τις ρυθμιστικές του αλληλουχίες με την τεχνολογία του BAC χρωμοσώματος. Οι διαγονιδιακοί μύες που δημιουργήσαμε και αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, φέρουν το ανθρώπινο GLUD2 γονίδιο μαζί με το συντηρημένο γονίδιο Glud1, με συνέπεια να εκφράζουν εκτός από την ενδογενή mGDH (την ομόλογη της hGDH1), και την ανθρώπινη hGDH2.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης, ήταν να τεκμηριώσουμε κατά πόσο επιτύχαμε να δημιουργήσουμε ένα εξανθρωποποιημένο (humanized) πειραματικό μοντέλο στο οποίο το διαγονίδιό μας εκφράζεται στους ίδιους ιστούς με αυτούς του ανθρώπου. Γι' αυτό, μελετήσαμε αρχικά την έκφραση του διαγονιδίου στους περιφερικούς ιστούς και στο νευρικό ιστό των διαγονιδιακών ζώων, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στους ιστούς για τους οποίους γνωρίζαμε από προηγούμενες μελέτες ότι εκφράζεται στον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η hGDH2 εκφράζεται στα επινεφρίδια, τους νεφρούς, τους όρχεις και στο νευρικό ιστό, με πρότυπο έκφρασης πολύ παρόμοιο με εκείνο των αντίστοιχων ιστών του ανθρώπου. Όπως αναμενόταν, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση της hGDH2 στους ιστούς των αγρίου τύπου ζώων. Η έκφραση του διαγονιδίου δεν φάνηκε να επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς mGDH, καθώς δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των διαγονιδιακών και των αγρίου τύπου ζώων. Οι δύο διαγονιδιακές σειρές που μελετήθηκαν εμφάνιζαν ίδιο πρότυπο έκφρασης γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρέπει να υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ένθεση του διαγονιδίου στις δύο διαγονιδιακές σειρές ή στον αριθμό των αντιγράφων του.

Μελέτες ανοσοφθορισμού σε ιστολογικά παρασκευάσματα νεφρών από διαγονιδιακά ζώα αποκάλυψαν πως τόσο η mGDH όσο και η hGDH2 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων, όπως ακριβώς και στον άνθρωπο (Spanaki και συν.2012). Η ταυτόχρονη έκφραση και των δύο ισομορφών του ενζύμου στους νεφρούς στον άνθρωπο θεωρείται ότι καθιστά εφικτή την παραγωγή αμμωνίας (μέσω απαμίνωσης του γλουταμικού) κατά τη διάρκεια οξείας ή χρόνιας οξέωσης ακόμα και υπό συνθήκες ενεργειακής επάρκειας στις οποίες δεν λειτουργεί η hGDH1. Αυτό συμβαίνει, γιατί η hGDH2 έχει χαμηλότερο βέλτιστο pH από την hGDH1 και είναι ανθεκτική στο GTP αντίθετα από την hGDH1 που βρίσκεται σε τονική αναστολή από το GTP που παράγεται από τον κύκλο του Krebs. Αυτό το γεγονός επιτρέπει στην hGDH2 να λειτουργεί και σε συνθήκες απαγορευτικές για την hGDH1/mGDH, συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση ή αποκατάσταση της οξεοβασικής ισορροπίας του ανθρώπινου οργανισμού σε περιπτώσεις οξέωσης και ανεξάρτητα από το ενεργειακό status του κυττάρου.

Στους όρχεις των διαγονιδιακών ζώων η hGDH2 εκφράζεται στα στηρικτικά κύτταρα Sertoli και στα κύτταρα Leydig ενώ η έκφραση της ενδογενούς mGDH περιορίζεται μόνο στα κύτταρα Leydig. Το πρότυπο έκφρασης αυτό είναι εντυπωσιακά όμοιο με το πρότυπο έκφρασης των hGDH1 και hGDH2 στον άνθρωπο (Spanaki και συν. 2010, Spanaki και συν. 2015, Spanaki και συν. 2017). Η έκφραση της hGDH2 στα εν λόγω κύτταρα, φαίνεται να συνεισφέρει στην παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και κυρίως γαλακτικού οξέος στα σπερματοκύτταρα, ουσίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και ωρίμανση τους. Ο ρόλος των κυττάρων sertoli σε σχέση με την φροντίδα και στήριξη των σπερματοκυττάρων παρομοιάζει με τον ρόλο

Στο πάγκρεας των διαγονιδιακών ζώων, ανιχνεύθηκε έκφραση της hGDH2 σε όλα τα κύτταρα του παρεγχύματος συμπεριλαμβανομένων και των νησιδίων του Langerhans, ενώ μελέτες διπλού ανοσοφθορισμού ανέδειξαν εντοπισμό της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στα ινσουλινοπαραγωγά β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων. Καθώς είναι γνωστό το γεγονός ότι η hGDH1/mGDH εμπλέκεται στην έκκριση ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος και καθώς διαπιστώσαμε έκφρασης του διαγονιδίου στα β-κύτταρα, προχωρήσαμε στην μελέτη του μεταβολισμού της γλυκόζης στις δύο ομάδες ζώων. Μετρήσαμε τη γλυκόζη και την ινσουλίνη σε διαφορετικές συνθήκες (6ωρη ή 12ωρη νηστεία, μετά τη χορήγηση γλυκόζης, λευκίνης ή συνδυασμού λευκίνης και γλυκόζης) καθώς και σε ζώα διαφορετικών ηλικιών. Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του διαγονιδίου στα διαγονιδιακά ζώα, τους επιτρέπει να διατηρούν επίπεδα γλυκόζης νηστείας (FBG) παρόμοια με τα επίπεδα ευγλυκαιμίας ενός φυσιολογικού υγιούς ανθρώπου (91-97 mg/dL) σε νηστεία και μάλιστα με πολύ μικρή διακύμανση. Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας αίματος των αγρίου τύπου ζώων ήταν σημαντικά

υψηλότερα (136-151 mg/dL). Σε μεγάλης ηλικίας ζώα αγρίου τύπου άγγιζαν, μάλιστα, τα προ-διαβητικά ή διαβητικά επίπεδα. Αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε στα διαγονιδιακά μας ζώα. Για να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο η διαγονιδιακή έκφραση του GLUD2 γονιδίου οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, μετρήσαμε τα επίπεδα ινσουλίνης, σε συνθήκες νηστείας. Διαπιστώσαμε πως τα επίπεδα ινσουλίνης ορού νηστείας ήταν σημαντικά υψηλότερα (κατά 2.6 φορές) στα διαγονιδιακά ζώα από ότι στα αγρίου τύπου. Παρά τη διαφορά στις τιμές γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, η διαχείριση της προσλαμβανόμενης γλυκόζης γίνονταν με παρόμοιο τρόπο και στις δύο ομάδες. Αναλυτικότερα, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση γλυκόζης σε νεαρά ενήλικα ζώα είχε ως αποτέλεσμα την έκκριση της ίδιας ποσότητας ινσουλίνης στις δύο ομάδες ζώων και την ίδια επακόλουθη πτώση στις τιμές γλυκόζης ορού, υποδηλώνοντας έναν κοινό υποκείμενο μηχανισμό που μάλλον πρέπει να εμπλέκει την mGDH και όχι την hDGH2. Οι καμπύλες ανοχής γλυκόζης που πήραμε ήταν συγκρίσιμες μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά το ρυθμό μεταβολής των επιπέδων γλυκόζης με την πάροδο του χρόνου. Κατά συνέπεια, ενώ η έκφραση του GLUD2 διαγονιδίου οδήγησε σε αύξηση της βασικής έκκρισης ινσουλίνης σε συνθήκες νηστείας στα διαγονιδιακά ζώα, δεν φαίνεται να επηρέασε την εξαρτώμενη από τη χορήγηση γλυκόζης, διέγερση έκκρισης ινσουλίνης (Glucose Stimulated Insulin Secretion/GSIS). Εντούτοις, καθώς οι αρχικές τιμές γλυκόζης διαφοροποιούνταν σημαντικά στις δύο ομάδες, η καμπύλη γλυκόζης των διαγονιδιακών ζώων «κινήθηκε», στο σύνολό της, σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα, ενώ στα αγρίου τύπου ζώα άγγιξε προδιαβητικές τιμές στα 60 λεπτά μετά τη φόρτιση με γλυκόζη.

Για να αποκλείσουμε την πιθανότητα η αύξηση της βασικής έκκρισης ινσουλίνης στα διαγονιδιακά μας ζώα να οφείλεται σε αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, πραγματοποιήσαμε καμπύλες ανοχής στην ινσουλίνη και διαπιστώσαμε παρόμοια ευαισθησία (άρα και αντίσταση) στην ινσουλίνη στις δύο ομάδες. Κατά συνέπεια, η αυξημένη βασική έκκριση ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ζώα δεν οφείλεται σε αυξημένη αντίσταση τους στην ινσουλίνη, αλλά πρέπει να αποδοθεί στο βιολογικό αποτέλεσμα της δράσης του διαγονιδιακού ενζύμου εντός των β-κυττάρων. Καθώς είναι πιθανόν να εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και άλλοι ιστοί, αξίζει να σημειωθεί ότι, αν και τα διαγονιδιακά μας ζώα εκφράζουν την διαγονιδιακή πρωτεΐνη στο ήπαρ και τον εγκέφαλο, δεν εμφανίζουν έκφραση του διαγονιδίου σε άλλους ιστούς που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης όπως τον λιπώδη ιστό και τον μυ.

Ακολούθως, χορηγήσαμε λευκίνη, έναν από τους σημαντικότερους αλλοστερικούς ενεργοποιητές των ενζύμων mGDH/hGDH1 και hGDH2, τόσο σε νηστικά ζώα όσο και λίγο πριν τη χορήγηση γλυκόζης. Η χορήγηση της λευκίνης, σε συνθήκες νηστείας, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης μόνο στα αγρίου τύπου ζώα. Τα ήδη υψηλά επίπεδα ινσουλίνης νηστείας των διαγονιδιακών ζώων δεν επηρεάστηκαν καθόλου από τη χορήγηση λευκίνης. Η αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης μετά τη χορήγηση λευκίνης είναι αναμενόμενη καθώς η λευκίνη δύναται να ενεργοποιήσει την ενδογενή mGDH στα β-κύτταρα του παγκρέατος και να οδηγήσει, μέσω της αναπληρωτικής αντίδρασης μετατροπής του γλουταμικού σε α-Kg και την παραγωγή ενέργειας, στην έκκριση ινσουλίνης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η mGDH όπως και η hGDH1 στα β-κύτταρα του παγκρέατος του μυός και του ανθρώπου δεν είναι ενεργή σε συνθήκες νηστείας καθώς πιθανά βρίσκεται σε τονική αναστολή από το GTP. Φαίνεται λοιπόν, ότι η εξωγενής χορήγηση λευκίνης οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης της εντός του β-κυττάρου in vivo, σε επίπεδα τέτοια που ήταν επαρκή ώστε να δράσουν συνεργικά με τα υψηλά επίπεδα ADP που επικρατούν στο βκύτταρο σε συνθήκες νηστείας, για να αντιρροπήσουν/αναιρέσουν την αναστολή της mGDH από το GTP και να οδηγήσουν στην ενεργοποίησή της και την έκκριση ινσουλίνης. Αντίθετα η χορήγηση λευκίνης δεν επηρέασε τα ήδη πολύ υψηλά επίπεδα ινσουλίνης των διαγονιδιακών ζώων. Αυτό ήταν ένα αναπάντεχο εύρημα καθώς θα περιμέναμε η λευκίνη να ενεργοποιήσει και στα διαγονιδιακά ζώα τόσο την mGDH όσο και την hGDH2. Μια υπόθεση για την ερμηνεία αυτού του αποτελέσματος η οποία φυσικά μένει να αποδειχθεί είναι η ακόλουθη. Είναι πιθανό στα διαγονιδιακά βκύτταρα η αντίδραση μετατροπής του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό μέσω της

hGDH2 να λειτουργεί ήδη σε μέγιστο βαθμό και να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί περαιτέρω. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από ενζυμικές μελέτες που έχουν δείξει πως ο βαθμός συγγένειας της hGDH2 για το ADP είναι μεγαλύτερος (SC₅₀ =0.06 mM) από το βαθμό συγγένειας της για την L-leucine (SC₅₀= 1.00 mM). Μάλιστα, είναι γνωστό ότι συγκεντρώσεις ADP της τάξεως του 1 mM είναι ικανές να ενεργοποιήσουν πλήρως την hGDH2 (Kanavouras και συν. 2007). Υπό το πρίσμα αυτής της γνώσης και με δεδομένο τον πολύ χαμηλό λόγο ΑΤΡ/ΑDΡ που επικρατεί στα β-κύτταρα σε συνθήκες νηστείας, η αντίδραση μετατροπής του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό μέσω της διαγονιδιακής GDH2 είναι πιθανά η μέγιστη δυνατή και το ένζυμο πιθανά να βρίσκεται σε κατάσταση κορεσμού από το γλουταμικό. Η υπόθεση αυτή συνάδει με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έχουν δείξει πως για συγκεντρώσεις γλυκόζης μικρότερες των 2.8 mM (όπως σε συνθήκες νηστείας), οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ADP εντός του β-κυττάρου κυμαίνονται στο 1.20 mM (Detimary και συν. 1998). Συνεπώς η μη περαιτέρω αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ζώα μετά από φόρτιση με L-leucine υποδηλώνει ότι η hGDH2 λειτουργεί ήδη σε μέγιστο βαθμό και δεν δύναται να ενεργοποιηθεί παραπάνω. Η δε απουσία ενδείξεων ενεργοποίησης της mGDH στα διαγονιδιακά ζώα πιθανόν να οφείλεται στην εξάντληση του υποστρώματος γλουταμικού από τη μέγιστη δράση της hGDH2,

Παρότι η φόρτιση με L-leucine δεν άλλαξε τα επίπεδα βασικής έκκρισης ινσουλίνης και τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, είχε ως αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη διαχείριση του προσλαμβανόμενου φορτίου γλυκόζης τόσο στα διαγονιδιακά όσο και στα αγρίου τύπου ζώα.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι βελτιωμένες καμπύλες γλυκόζης των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων μετά τη χορήγηση λευκίνης, μπορούν να αποδοθούν στην ενεργοποίηση την ενδογενούς mGDH των ζώων από την L-leucine. Είναι γνωστό άλλωστε ότι η hGDH1 και η mGDH συμμετέχει στο πολλαπλασιαστικό μονοπάτι έκκρισης της ινσουλίνης που ενεργοποιείται μετά από πρόσληψης υψηλού φορτίου γλυκόζης. Η ακόμα αποδοτικότερη διαχείριση του προσλαμβανόμενου φορτίου γλυκόζης από τα διαγονιδιακά ζώα ίσως να οφείλεται στην αθροιστική/συνεργική δράση των ενεργοποιημένων mGDH1 και hGDH2. Το κατά πόσο όμως αυτό ισχύει θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με επιπρόσθετες μελέτες στις οποίες θα πρέπει να αποσαφηνιστεί, μεταξύ άλλων, και αν οι 2 ισομορφές του ενζύμου έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροεξαμερή με ιδιαίτερες ιδιότητες σε κύτταρα όπου εκφράζονται τόσο η GDH1 όσο και η GDH2.

Σύγκριση των δεδομένων μας για την επίδραση της GDH2 στο μεταβολισμό της γλυκόζης με αντίστοιχα άλλων πειραματικών προτύπων .

Οι Stanley και συν. (1998) βρήκαν πως μεταλλάξεις στο γονίδιο της hGDH1 (GLUD1) που καταργούν την αναστολή της από το GTP και την καθιστούν ενεργή, ευθύνονται για την εμφάνιση του συνδρόμου υπερινσουλινισμού υπεραμμωνίας (HI/HAsyndrome). Οι πάσχοντες που φέρουν τις ετερόζυγες αυτές μεταλλάξεις, παρουσιάζουν επεισόδια υπογλυκαιμίας που εκδηλώνονται μεταξύ άλλων και με επιληπτικές κρίσεις (Stanley και συν. 1998). Τα επεισόδια αυτά οφείλονται στην παθολογικά αυξημένη έκκριση ινσουλίνης λόγω της υπερδραστήριας GDH. Μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα που φέρουν μια τέτοια μετάλλαξη στη mGDH, την His454TyrhGDH1, έδειξαν πως η ενεργοποίηση της GDH1 (αποτέλεσμα της άρσης της αναστολής της από το GTP) οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα οξείδωσης του γλουταμικού προς α-Kg, τα οποία ακολούθως είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση στη βασική έκκριση ινσουλίνης. Το αποτέλεσμα ήταν τα διαγονιδιακά ζώα να εμφανίζουν υπογλυκαιμικό φαινότυπο (FBG: 50-70 mg/dL) ο οποίος επηρέασε την αναπαραγωγική λειτουργία και τη διάρκεια ζωής των ζώων (Li και συν. 2006). Οι παραπάνω διαπιστώσεις ενισχύουν τη θεωρία πως η GDH1 στα βκύτταρα του παγκρέατος είναι κατά κύριο λόγο ανενεργή λόγω της αναστολής από το GTP (Plaitakis και συν. 2017). Σε αντίθεση με το His454Tyr-hGDH1 διαγονιδιακό στέλεχος μυών, οι διαγονιδιακοί GLUD2 μύες οι οποίοι μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, δεν εμφάνισαν τόσο βαριά υπογλυκαιμία, ούτε σε συνθήκες

στέρησης τροφής για 6 ή 12 ώρες, ούτε όταν χορηγήθηκε σε αυτά δια στόματος το αμινοξύ λευκίνη. Αντίθετα έχουν επίπεδα γλυκόζης παρόμοια με τα επίπεδα που παρατηρούνται στην ευγλυκαιμία νηστείας του ανθρώπου και μάλιστα με πολύ χαμηλή διακύμανση σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα. Επιπρόσθετα όλες οι αναπτυξιακές μετρήσεις, οι αναπαραγωγικές λειτουργίες και η διάρκεια ζωής των ζώων ήταν εντός φυσιολογικών ορίων. Συμπερασματικά λοιπόν, ενώ μεταλλάξεις που καθιστούν υπερδραστήρια την hGDH1 λόγω κατάργησης της αναστολής της από το GTP οδηγούν σε ένα έλεγχο που λειτουργεί ανεξέλεγκτα και οδηγεί σε απορρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης και βαρύτατη υπογλυκαιμία, η παρουσία της hGDH2 εντός του β-κυττάρου του παγκρέατος φαίνεται να βελτιώνει την ομοιόσταση αυτή, ενισχύοντας κυρίως τη βασική έκκριση ινσουλίνης. Αυτό οφείλεται στο ότι η hGDH2 διαφοροποιείται από τη μεταλλαγμένη υπερδραστήρια μορφή της GDH1, καθώς, αν και έχει χάσει την ευαισθησία της στην αναστολή από το GTP, δεν δρα ανεξέλεγκτα αρά ρυθμίζεται με άλλους μηχανισμούς που καθορίστηκαν από τις 15 αμινοξικές αλλαγές που απέκτησε κατά την εξέλιξή της. Είναι λοιπόν πιθανό η hGDH2, με τον τρόπο με τον οποίο εξελίχθηκε σε βάθος εκατομμυρίων ετών να έχει αποκτήσει αμινοξικές αλλαγές που ευθύνονται για μια αλλοστερική ρύθμιση και λειτουργία τέτοια ώστε να παρέχει στον ανθρώπινο οργανισμό (και στα διαγονιδιακά μας ζώα), ένα εξελικτικό πλεονέκτημα. Αν αυτό το εξελικτικό πλεονέκτημα μεταφράζεται, μεταξύ άλλων, και σε βελτιωμένη ομοιόσταση γλυκόζης και προστασία από τις διαταραχές της που σχετίζονται με τη γήρας (διαβήτης, παχυσαρκία) μένει να αποδειχθεί με περισσότερες μελέτες λειτουργικού χαρακτήρα.

In vitro ενζυμικές μελέτες σε καθαρισμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 αποκάλυψαν πως το ADP και η L-leucine ενεργοποιούν κατά πολύ μεγαλύτερο βαθμό την hGDH2 από ότι την hGDH1. Παράλληλα η ταυτόχρονη παρουσία ADP και Lleucine επιδεικνύουν μία συνέργεια στη ενεργοποίηση της hGDH2 που δεν παρατηρείται στην hGDH1 (Kanavouras και συν. 2007, Plaitakis και συν. 2011, Plaitakis και συν. 2017). Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνηγορούν πως η παρουσία ADP και L-

leucine θα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δραστικότητας της hGDH2 και *in vivo*. Πρόσφατα έχει τεκμηριωθεί η έκφραση της hGDH2 σε κυτταροκαλλιέργειες από καρκινικά κύτταρα γλοιώματος (νεοπλασματικά αστροκύτταρα) στα οποία παρατηρήθηκε αυξημένη μετατροπή του γλουταμικού προς α-κετογλουταρικό για την αναπλήρωση του κύκλου του Krebs και την ευόδωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Κατ' αναλογία, πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες από διαγονιδιακά GLUD2 ζώα (μύες) που δημιουργήθηκαν από ανεξάρτητη (από τη δική μας) ερευνητική ομάδα, αποκάλυψαν ότι τα αστροκύτταρα που εκφράζουν hGDH2, εμφανίζουν σε στέρηση γλυκόζης, αυξημένο οξειδωτικό μεταβολισμό του γλουταμικού και αυξημένη δραστηριότητα του κύκλου του Krebs σε σχέση με τα αστροκύτταρα των αγρίου τύπου ζώων. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει σημαντική δραστικότητα της αντίδρασης της GDH2 προς την κατεύθυνση της αναπληρωτικής παραγωγής α-κετογλουταρικού από την οξείδωση του γλουταμικού. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης των διαγονιδιακών ζώων σε συνθήκες νηστείας μπορούν να αποδοθούν στην, μέσω της GDH2, ενεργοποίηση του κύκλου του Krebs και την επαγόμενη αύξηση των επιπέδων ΑΤΡ στα β-κύτταρα. Η hGDH2 θα πρέπει να είναι ενεργοποιημένη κατά το μέγιστο εντός του β-κυττάρου, καθώς οι ενδοκυττάριες συγκεντρώσεις ADP είναι υψηλές σε συνθήκες νηστείας λόγω ενεργειακής ένδειας. Τα αποτελέσματα μελετών σε μύες όπου έχει απενεργοποιηθεί το Glud1 γονίδιο ενισχύουν την παραπάνω θεωρία καθώς η απουσία της ενδογενούς mGDH στα β-κύτταρα του παγκρέατος δεν επηρέασε την έκκριση ινσουλίνης σε συνθήκες νηστείας ή φυσιολογικής σίτισης (π.χ. μετά από φόρτιση 2.8 mM γλυκόζης) (Carrobio και συν.2009) παρά που η ικανότητα έκκρισης αυτών των κυττάρων που στερούνταν την mGDH ήταν υπομέγιστη.

Παρότι η GDH1 είναι σημαντική για να επιτευχθεί η μέγιστη έκκριση ινσουλίνης, δεν φαίνεται συμμετέχει καθόλου στην ομοιόσταση της γλυκόζης και τη διατήρηση της ευγλυκαιμίας σε συνθήκες νηστείας (Carrobio και συν. 2009). Ο μηχανισμός της βασικής έκκρισης ινσουλίνης επί απουσία τροφής παραμένει ασαφής. Στο πειραματικό

161

μας μοντέλο, φαίνεται ότι η διαγονιδιακή πρωτεΐνη hGDH2 συμμετέχει στη ρύθμιση της βασικής έκκρισης ινσουλίνης ενισχύοντάς την, ώστε να διατηρείται ευγλυκαιμία παρόμοια με εκείνη του ανθρώπου σε συνθήκες νηστείας. Αυτόν τον ρόλο, η hGDH2 τον επιτυγχάνει λόγω των μοναδικών της ιδιοτήτων που της επιτρέπουν να λειτουργεί σε πλήρη ισχύ σε συνθήκες ενεργειακής ένδειας.

Παρόλο που είναι πιθανό και άλλοι μηχανισμοί να ενέχονται στην βελτιωμένη ομοιόσταση της γλυκόζης που παρατηρήθηκε στα διαγονιδιακά ζώα, δεν βρέθηκε αξιοσημείωτη έκφραση της διαγονιδιακής μας πρωτεΐνης σε άλλους ιστούς που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στα υπόλοιπα ινσουλινο-ευαίσθητα όργανα πέραν του παγκρέατος και του ήπατος όπως είναι ο μυς και ο λιπώδης ιστός. Μελέτες έκφρασης (enzymatic assays, WB, IF) των επιπέδων του διαγονιδίου σε ιστολογικά παρασκευάσματα σκελετικών μυών και λιπώδους ιστού δεν ανέδειξαν καμία έκφραση της hGDH2.

Για να αποκλείσουμε την πιθανότητα τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ζώα να οφείλονται σε αυξημένο αριθμό, πυκνότητα ή μέγεθος των νησιδίων Langerhans ή των β-κυττάρων τους, έγιναν μορφολογικές μελέτες σε μονιμοποιημένο ιστό παγκρέατος με ιστολογική χρώση ινσουλίνης και χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης που δεν αποκάλυψαν διαφορές από τα αγρίου τύπου ζώα στις παραπάνω παραμέτρους. Τέλος για να ελεγχθεί κατά πόσο τα επίπεδα ινσουλίνης στα διαγονιδιακά ζώα αυξήθηκαν αντιρροπιστικά στο πλαίσιο αυξημένης αντίστασης στην ινσουλίνη, διενεργήθηκαν μελέτες ανοχής στην ινσουλίνη. Τα διαγονιδιακά ζώα είχαν την ίδια ακριβώς ευαισθησία με τα αγρίου τύπου στη χορήγηση ινσουλίνης, υποδηλώνοντας ότι η αυξημένη παραγωγή ινσουλίνης σε νηστεία δεν μπορεί παρά να θεωρηθεί το βιολογικό αποτέλεσμα της παρουσίας της hGDH2 στα εκκριτικά κύτταρα του παγκρέατος των διαγονιδιακών ζώων. Τέλος, το γεγονός ότι και οι 2 διαγονιδιακές σειρές Τg13 και Tg32 εκδηλώνουν τον ίδιο φαινότυπο όσον αφορά τον μεταβολισμό της γλυκόζης, υποδηλώνει ότι δεν έχουν γίνει ουσιαστικές διαφοροποιήσεις ή στοχαστικά λάθη στην ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο DNA των ζώων στις δύο

διαγονιδιακές σειρές ούτε περιμένουμε σημαντικές διαφορές στον αριθμό των αντιγράφων του διαγονιδίου, τα οποία δεν έχουμε προσδιορίσει.

Όσον αφορά τον νευρικό ιστό, το διαγονίδιό μας εκφράζεται στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών μυών με παρόμοιο πρότυπο με αυτό που εκφράζεται στον ΝΣ του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στα αστροκύτταρα όλως των περιοχών του εγκεφάλου που μελετήθηκαν, τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Η πλειονότητα των νευρώνων δεν εκφράζουν την hGDH2. Όμως, μια μικρή κατηγορία νευρώνων με μορφολογία πυραμιδικών κυττάρων (με μεγάλο πυρήνα με εμφανή πυρηνίσκο) φαίνεται να εκφράζουν την διαγονιδιακή πρωτεΐνη hGDH2 στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματός τους. Παρόμοια έκφραση έχει παρατηρηθεί και σε νευρώνες πυραμιδικής μορφολογίας στον εγκέφαλο του ανθρώπου. Κατά πόσον, η ειδική αυτή έκφραση εντοπίζεται σε περιοχές με πλούσια γλουταματεργική νευροδιαβίβαση και αποσκοπεί στην υποστήριξη και ενίσχυσή της μένει να αποδειχτεί.

Εντούτοις, η λεπτή μορφολογική μελέτη του εγκεφάλου με τη χρώση Golgi, αποκάλυψε ότι η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών μας ζώων σχετίζεται με αυξημένο αριθμό δενδριτικών ακάνθων. Το εύρημα αυτό διαπιστώθηκε και στις δύο περιοχές που μελετήθηκαν (ιππόκαμπος και μετωπιαίος λοβός). Εντούτοις η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης, παρά την αύξηση των δενδριτικών ακάνθων, δεν συσχετίστηκε με σημαντικά καλύτερη απόδοση τους στις συμπεριφορικές δοκιμασίες που διενεργήθηκαν. Μάλιστα οι δύο σειρές των διαγονιδιακών μας ζώων, στο σύνολό τους, δεν διαφοροποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό στα τεστ μνήμης. Εντούτοις η μία από αυτές εμφάνιζε σημαντικά μειωμένη ικανότητα χωρικής μνήμης και λιγότερο αναγνωριστικής μνήμης. Η αξία αυτών των ευρημάτων δεν είναι σαφείς. Είναι πιθανόν μια διάχυτη και μη στοχευμένη ενίσχυση της συναπτογένεσης και μέσω αυτής της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης να μην συντελεί στη βελτίωση συγκεκριμένων ικανοτήτων που ελέγχονται από συγκεκριμένες περιοχές.

163

Τέλος τα διαγονιδιακά μας ζώα παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα άγχους και αυξημένη ευαισθησία στον πόνο σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Είναι πιθανόν, η παρουσία της hGDH2 στην περιοχή των εισερχόμενων ινών αλγαισθησίας πλησίον και εντός του οπισθίου κέρατος του νωτιαίου μυελού όπου εδράζεται το κύκλωμα ελέγχου της πύλης του πόνου να οδηγεί σε αύξηση της διεγερτικής γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης και σε ενίσχυση του σηματοδότησης του άλγους στο ΚΝΣ. Τα παραπάνω μένει να μελετηθούν περαιτέρω για την τελική τεκμηρίωσή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggleton, J. P., & Mishkin, M. (1985). Mamillary-body lesions and visual recognition in monkeys. *Experimental Brain Research*, 58, 190-197.
- Allen, A., Kwagh, J., Fang, J., Stanley, C. A., & Smith, T. J. (2004). Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry*, *43*, 14431-14443.
- 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. *Human Heredity, 43*, 351-356.
- Aoki, C., Milner, T. A., Sheu, K. F., Blass, J. P., & Pickel, V. M. (1987). Regional distribution of astrocytes with intense immunoreactivity for glutamate dehydrogenase in rat brain: implications for neuron-glia interactions in glutamate transmission. *Journal of Neuroscience*, 7, 2214-2231.
- Bahi-Buisson, N., Roze, E., Dionisi, C., Escande, F., Valayannopoulos, V., Feillet, F., Heinrichs, C., Chadefaux-Vekemans, B., Dan, B., & de Lonlay, P. (2008). Neurological aspects of hyperinsulinism-hyperammonaemia syndrome. Developmental Medicine and Child Neurology, 50, 945-949.
- Bailey, J., Bell, E. T., & Bell, J. E. (1982). Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. The effects of pH and ADP. *Journal of Biological Chemistry*, *257*, 5579-5583.
- Banerjee, S., Schmidt, T., Fang, J., Stanley, C. A., & Smith, T. J. (2003). Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry*, *42*, 3446-3456.
- Bertrand, G., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M. A., & Henquin, J. C. (2002). The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32883-32891.
- Botman, D., Tigchelaar, W., & Van Noorden, C. J. (2014). Determination of glutamate dehydrogenase activity and its kinetics in mouse tissues using metabolic mapping (quantitative enzyme histochemistry). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 62*, 802-812.

- Burbaeva, G., Boksha, I. S., Tereshkina, E. B., Savushkina, O. K., Starodubtseva, L. I., & Turishcheva, M. S. (2005). Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurochemical Research*, *30*, 1443-1451.
- Burki, F., & Kaessmann, H. (2004). Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nature Genetics*, *36*, 1061-1063.
- Chen, R., Nishimura, M. C., Kharbanda, S., Peale, F., Deng, Y., Daemen, A., Forrest, W. F., Kwong, M., Hedehus, M., Hatzivassiliou, G., Friedman, L. S., & Phillips, H. S. (2014). Hominoid-specific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 14217-14222.
- Colon, A. D., Plaitakis, A., Perakis, A., Berl, S., & Clarke, D. D. (1986). Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *Journal of Neurochemistry*, *46*, 1811-1819.
- Cooper, A. J., Nieves, E., Coleman, A. E., Filc-DeRicco, S., & Gelbard, A. S. (1987). Shortterm metabolic fate of [13N]ammonia in rat liver in vivo. *Journal of Biological Chemistry, 262*, 1073-1080.
- Cooper, A. J., Nieves, E., Rosenspire, K. C., Filc-DeRicco, S., Gelbard, A. S., & Brusilow, S.
 W. (1988). Short-term metabolic fate of 13N-labeled glutamate, alanine, and glutamine(amide) in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 12268-12273.
- de Lonlay, P., Giurgea, I., Sempoux, C., Touati, G., Jaubert, F., Rahier, J., Ribeiro, M., Brunelle, F., Nihoul-Fekete, C., Robert, J. J., Saudubray, J. M., Stanley, C., & Bellanne-Chantelot, C. (2005). Dominantly inherited hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28, 267-276.
- Deloukas, P., Dauwerse, J. G., Moschonas, N. K., van Ommen, G. J., & van Loon, A. P. (1993). Three human glutamate dehydrogenase genes (GLUD1, GLUDP2, and GLUDP3) are located on chromosome 10q, but are not closely physically linked. *Genomics*, 17, 676-681.
- Detimary, P., Dejonghe, S., Ling, Z., Pipeleers, D., Schuit, F., & Henquin, J. C. (1998). The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 33905-33908.
- Engel, P. C., & Dalziel, K. (1969). Kinetic studies of glutamate dehydrogenase with glutamate and norvaline as substrates. Coenzyme activation and negative homotropic interactions in allosteric enzymes. *Biochemical Journal*, 115, 621-631.

- Fahien, L. A., & Kmiotek, E. (1981). Regulation of glutamate dehydrogenase by palmitoyl-coenzyme A. Archives of Biochemistry and Biophysics, 212, 247-253.
- File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., & Lippa, M. T. (2004). Animal tests of anxiety. *Current Protocols in Neuroscience, Chapter 8*, Unit 8.3.
- Forestiero, D., Manfrim, C. M., Guimaraes, F. S., & de Oliveira, R. M. (2006). Anxiolyticlike effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology*, *184*, 166-172.
- Frieden, C. (1959a). Glutamic dehydrogenase. II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry, 234*, 815-820.
- Frieden, C. (1959b). Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 234, 2891-2896.
- Frieden, C. (1962). The effect of pH and other variables on the dissociation of beef liver glutamic dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry, 237*, 2396-2400.
- Frieden, C. (1963a). Glutamate dehydrogenase. IV. Studies on enzyme inactivation and coenzyme binding. *Journal of Biological Chemistry, 238*, 146-154.
- Frieden, C. (1963b). Glutamate dehydrogenase.V The relation of enzyme structure to the catalyrtic function. *Journal of Biological Chemistry, 238*, 3286-3299.
- Frieden, C. (1965). Glutamate dehydrogenase.VI.Survey of purine nucletotide and other effects on the enzyme from various sources. *Journal of Biological Chemistry, 240*, 2028-2035.
- Hoy, M., Maechler, P., Efanov, A. M., Wollheim, C. B., Berggren, P. O., & Gromada, J. (2002). Increase in cellular glutamate levels stimulates exocytosis in pancreatic beta-cells. *FEBS Letters*, 531, 199-203.
- Hudson, R. C., & Daniel, R. M. (1993). L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 106, 767-792.
- Hussain, M. M., Zannis, V. I., & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 20730-20735.

- Iwatsubo, M., & Pantaloni, D. (1967). [Regulation of the activity of glutamate dehydrogenase by effectors GTP and ADP: study by means of "stopped flow"]. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 49, 1563-1572.
- Jin, L., Li, D., Alesi, G. N., Fan, J., Kang, H. B., Lu, Z., Boggon, T. J., Jin, P., Yi, H., Wright, E. R., Duong, D., Seyfried, N. T., Egnatchik, R., DeBerardinis, R. J., Magliocca, K. R., He, C., Arellano, M. L., Khoury, H. J., Shin, D. M., Khuri, F. R., & Kang, S. (2015). Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer Cell, 27*, 257-270.
- 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. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 3398-3406.
- Kapoor, R. R., Flanagan, S. E., Fulton, P., Chakrapani, A., Chadefaux, B., Ben-Omran, T., Banerjee, I., Shield, J. P., Ellard, S., & Hussain, K. (2009). Hyperinsulinismhyperammonaemia syndrome: novel mutations in the GLUD1 gene and genotype-phenotype correlations. *European Journal of Endocrinology of the European Federation of Endocrine Societies*, 161, 731-735.
- Karaca, M., Frigerio, F., & Maechler, P. (2011). From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis. *Neurochemistry International, 59*, 510-517.
- Kawaguchi, A., & Bloch, K. (1976). Inhibition of glutamate dehydrogenase and malate dehydrogenases by palmitoyl coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 1406-1412.
- Koberstein, R., & Sund, H. (1973). Studies of glutamate dehydrogenase. The influence of ADP, GTP, and L-glutamate on the binding of the reduced coenzyme to beef-liver glutamate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry, 36*, 545-552.
- Kotzamani, D., & Plaitakis, A. (2012). Alpha helical structures in the leader sequence of human GLUD2 glutamate dehydrogenase responsible for mitochondrial import. *Neurochemistry International, 61*, 463-469.
- Krebs, H. A., & Gascoyne, T. (1968). The redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotides in rat liver homogenates. *Biochemical Journal, 108*, 513-520.
- Lai, J. C., Sheu, K. F., Kim, Y. T., Clarke, D. D., & Blass, J. P. (1986). The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochemical Research*, 11, 733-744.

- Lampreht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Frontiers in Oncology*, *8*, 268.
- Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry, 259*, 3-17.
- Leong, S. F., & Clark, J. B. (1984). Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, *43*, 106-111.
- Li, C., Matter, A., Kelly, A., Petty, T. J., Najafi, H., MacMullen, C., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., Kwagh, J., Collins, H. W., Hsu, B. Y., Nissim, I., Yudkoff, M., Matschinsky, F. M., & Stanley, C. A. (2006). Effects of a GTP-insensitive mutation of glutamate dehydrogenase on insulin secretion in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 15064-15072.
- Li, M., Allen, A., & Smith, T. J. (2007). High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors. *Biochemistry*, *46*, 15089-15102.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A., & Smith, T. J. (2012). The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *519*, 69-80.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A., & Smith, T. J. (2014). Glutamate dehydrogenase: structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis. *Neurochemical Research*, *39*, 433-445.
- Li, Q., Guo, S., Jiang, X., Bryk, J., Naumann, R., Enard, W., Tomita, M., Sugimoto, M., Khaitovich, P., & Paabo, S. (2016). Mice carrying a human GLUD2 gene recapitulate aspects of human transcriptome and metabolome development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 5358-5363.
- Liu, Y. J., Cheng, H., Drought, H., MacDonald, M. J., Sharp, G. W., & Straub, S. G. (2003). Activation of the KATP channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 285*, E380-389.
- MacDonald, M. J., & Fahien, L. A. (2000). Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 34025-34027.
- Maechler, P., & Wollheim, C. B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*, *402*, 685-689.

- Malthankar-Phatak, G. H., de Lanerolle, N., Eid, T., Spencer, D. D., Behar, K. L., Spencer, S. S., Kim, J. H., & Lai, J. C. (2006). Differential glutamate dehydrogenase (GDH) activity profile in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 47, 1292-1299.
- Markau, K., Schneider, J., & Sund, H. (1972). Kinetic studies on the mechanism of the action of ADP on the glutamate dehydrogenase reaction. *FEBS Letters, 24*, 32-36.
- Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Bessa, M., & Plaitakis, A. (2005). Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *Journal of Neuroscience Research*, *79*, 65-73.
- Matschinsky, F. M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, *45*, 223-241.
- Mavrothalassitis, G., Tzimagiorgis, G., Mitsialis, A., Zannis, V., Plaitakis, A., Papamatheakis, J., & Moschonas, N. (1988). Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 3494-3498.
- Miyamoto, R., Goto, S., Sako, W., Miyashiro, A., Kim, I., Escande, F., Harada, M., Morigaki, R., Asanuma, K., Mizobuchi, Y., Nagahiro, S., Izumi, Y., & Kaji, R. (2012). Generalized dystonia in a patient with a novel mutation in the GLUD1 gene. *Movement Disorders, 27*, 1198-1199.
- Nissim, I., Brosnan, M. E., Yudkoff, M., & Brosnan, J. T. (1999). Studies of hepatic glutamine metabolism in the perfused rat liver with (15)N-labeled glutamine. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 28958-28965.
- Peterson, P. E., & Smith, T. J. (1999). The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure*, *7*, 769-782.
- Plaitakis, A., Kalef-Ezra, E., Kotzamani, D., Zaganas, I., & Spanaki, C. (2017). The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel)*, 6.
- 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. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1862-1869.
- Plaitakis, A., Spanaki, C., Mastorodemos, V., & Zaganas, I. (2003). Study of structurefunction relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel

molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochemistry International, 43,* 401-410.

- Raizen, D. M., Brooks-Kayal, A., Steinkrauss, L., Tennekoon, G. I., Stanley, C. A., & Kelly,
 A. (2005). Central nervous system hyperexcitability associated with glutamate dehydrogenase gain of function mutations. *Journal of Pediatrics*, *146*, 388-394.
- Rorsman, P. (1997). The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, 40, 487-495.
- Rothe, F., Brosz, M., & Storm-Mathisen, J. (1994). Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience*, *62*, 1133-1146.
- Rothe, F., Schmidt, W., & Wolf, G. (1983). Postnatal changes in the activity of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the rat nervous system with special reference to the glutamate transmitter metabolism. *Brain Research*, 313, 67-74.
- Schmidt, E., & Schmidt, F. W. (1963). Distributin pattern of several enzymes in Ihuman liver and its variation during cell damage. III. On the methodology of enzyme determination in human organ extracts and serum. *Enzymologia Biologica et Clinica*, 35, 73-79.
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., & McKenna, M. C. (2014). Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol*, 11, 13-30.
- Sener, A., Malaisse-Lagae, F., & Malaisse, W. J. (1981). Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 5460-5464.
- Sener, A., & Malaisse, W. J. (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature, 288,* 187-189.
- Sener, A., & Malaisse, W. J. (1981). The stimulus-secretion coupling of amino acidinduced insulin release: insulinotropic action of branched-chain amino acids at physiological concentrations of glucose and glutamine. *European Journal of Clinical Investigation*, 11, 455-460.
- 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. *Journal of Neurochemistry, 68*, 1804-1811.

- Shashidharan, P., Michaelidis, T. M., Robakis, N. K., Kresovali, A., Papamatheakis, J., & Plaitakis, A. (1994). Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 16971-16976.
- Sherwin, A., Quesney, F., Gauthier, S., Olivier, A., Robitaille, Y., McQuaid, P., Harvey, C.,
 & van Gelder, N. (1984). Enzyme changes in actively spiking areas of human epileptic cerebral cortex. *Neurology*, *34*, 927-933.
- Smith, H. Q., Li, C., Stanley, C. A., & Smith, T. J. (2019). Glutamate Dehydrogenase, a Complex Enzyme at a Crucial Metabolic Branch Point. *Neurochemical Research*, 44, 117-132.
- Smith, T. J., Peterson, P. E., Schmidt, T., Fang, J., & Stanley, C. A. (2001). Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *Journal of Molecular Biology*, 307, 707-720.
- Smith, T. J., Schmidt, T., Fang, J., Wu, J., Siuzdak, G., & Stanley, C. A. (2002). The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *Journal of Molecular Biology*, *318*, 765-777.
- Smith, T. J., & Stanley, C. A. (2008). Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*, 557-564.
- Spanaki, C., Kotzamani, D., Kleopa, K., & Plaitakis, A. (2016). Evolution of GLUD2 Glutamate Dehydrogenase Allows Expression in Human Cortical Neurons. *Molecular Neurobiology*, 53, 5140-5148.
- Spanaki, C., Kotzamani, D., Petraki, Z., Drakos, E., & Plaitakis, A. (2014). Heterogeneous cellular distribution of glutamate dehydrogenase in brain and in non-neural tissues. *Neurochemical Research*, *39*, 500-515.
- Spanaki, C., Kotzamani, D., Petraki, Z., Drakos, E., & Plaitakis, A. (2015). Expression of human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenases in steroid producing tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 1-11.
- Spanaki, C., Kotzamani, D., & Plaitakis, A. (2017). Widening Spectrum of Cellular and Subcellular Expression of Human GLUD1 and GLUD2 Glutamate Dehydrogenases Suggests Novel Functions. *Neurochemical Research*, 42, 92-107.
- Spanaki, C., & Plaitakis, A. (2012). The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotoxicity Research, 21*, 117-127.

- Spanaki, C., Zaganas, I., Kleopa, K. A., & Plaitakis, A. (2010). Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 16748-16756.
- Spanaki, C., Zaganas, I., Kounoupa, Z., & Plaitakis, A. (2012). The complex regulation of human glud1 and glud2 glutamate dehydrogenases and its implications in nerve tissue biology. *Neurochemistry International*, 61, 470-481.
- 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., & Poncz, M. (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *New England Journal of Medicine*, 338, 1352-1357.
- Tomita, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2011). Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 37406-37413.
- Tomkins, G. M., & Yielding, K. L. (1961). Regulation of the enzymic activity of glutamic dehydrogenase mediated by changes in its structure. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 26*, 331-341.
- Treberg, J. R., Banh, S., Pandey, U., & Weihrauch, D. (2014). Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. *Neurochemical Research*, *39*, 516-526.
- van de Poll, M. C., Soeters, P. B., Deutz, N. E., Fearon, K. C., & Dejong, C. H. (2004). Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *American Journal of Clinical Nutrition, 79*, 185-197.
- Wenthold, R. J., Altschuler, R. A., Skaggs, K. K., & Reeks, K. A. (1987). Immunocytochemical characterization of glutamate dehydrogenase in the cerebellum of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 48, 636-643.
- Yang, S. J., Huh, J. W., Lee, J. E., Choi, S. Y., Kim, T. U., & Cho, S. W. (2003). Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2538-2546.
- Yielding, K. L., & Tomkins, G. M. (1960). STRUCTURAL ALTERATIONS IN CRYSTALLINE GLUTAMIC DEHYDROGENASE INDUCED BY STEROID HORMONES. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 46, 1483-1488.

- Yielding, K. L., & Tomkins, G. M. (1961). An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 983-989.
- Zaganas, I., Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Latsoudis, H., Spanaki, C., & Plaitakis, A. (2009). The human GLUD2 glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects. *Neurochemistry International*, *55*, 52-63.
- 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. *Journal of Biological Chemistry, 277*, 26422-26428.
- Zaganas, I., Spanaki, C., Karpusas, M., & Plaitakis, A. (2002). Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46552-46558.
- Zaganas, I., Waagepetersen, H. S., 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. *Journal of Neuroscience Research, 66*, 909-913.



Contents lists available at ScienceDirect

Metabolism Clinical and Experimental

journal homepage: www.metabolismjournal.com

Transgenic expression of the positive selected human *GLUD2* gene improves *in vivo* glucose homeostasis by regulating basic insulin secretion

Check for updates

Zoe Petraki ^a, Stavros Droubogiannis ^a, Konstantina Mylonaki ^a, Gregory Chlouverakis ^b, Andreas Plaitakis ^a, Cleanthe Spanaki ^{a,*}

^a Department of Neurology, School of Medicine, University of Crete, Voutes Place, 71500 Heraklion, Crete, Greece
 ^b Department of Social Medicine, Biostatistics Lab, School of Medicine, University of Crete, Voutes Place, 71500 Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history: Received 9 April 2019 Accepted 4 August 2019 Available online xxxx

Keywords: GLUD2 transgenic mice hGDH2 Expression Glucose homeostasis Body weight Metabolism

ABSTRACT

Glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) contributes to glucose-stimulated insulin secretion in murine β-cells, but not to basic insulin release. The implications of these findings for human biology are unclear as humans have two GDHspecific enzymes: hGDH1 (GLUD1-encoded) and hGDH2 (GLUD2-encoded), a novel enzyme that is highly activated by ADP and L-leucine. Here we studied in vivo glucose homeostasis in transgenic (Tg) mice generated by inserting the GLUD2 gene and its putative regulatory elements into their genome. Using specific antibodies, we observed that hGDH2 was co-expressed with the endogenous murine GDH1 in pancreatic β -cells of Tg mice. Fasting blood glucose (FBG) levels were lower and of a narrower range in Tg (95% CI: 90.6–96.8 mg/dI; N = 26) than in Wt mice (95% CI: 136.2–151.4 mg/dl; N = 23; p < 0.0001), closely resembling those of healthy humans. *GLUD2* also protected the host mouse from developing diabetes with advancing age. Tg animals maintained 2.6-fold higher fasting serum insulin levels (mean \pm SD: 1.63 \pm 0.15 ng/ml; N = 12) than Wt mice (0.63 \pm 0.05 ng/ml; N = 12; p < 0.0001). Glucose loading (1 mg/g, given i.p.) induced comparable serum insulin increases in Tg and Wt mice, suggesting no significant GLUD2 effect on glucose-stimulated insulin release. L-leucine (0.25 mg/g given orally) induced a 2-fold increase in the serum insulin of the Wt mice, implying significant activation of the endogenous GDH1. However, L-leucine had little effect on the high insulin levels of the Tg mice, suggesting that, under the high ADP levels that prevail in β-cells in the fasting state, glutamate flux through hGDH2 is close to maximal. Hence, the present data, showing that GLUD2 expression in Tg mice improves in vivo glucose homeostasis by boosting fasting serum insulin levels, suggest that evolutionary adaptation of hGDH2 has enabled humans to achieve narrow-range euglycemia by regulating glutamate-mediated basal insulin secretion.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glutamate dehydrogenase (GDH) (E.C. 1.4.1.3) catalyzes the reversible conversion of glutamate to α -ketoglutarate and ammonia while

E-mail address: kspanaki@uoc.gr (C. Spanaki).

reducing NAD(P)⁺ to NAD(P)H [1]. It occurs in all forms of life with most mammalian species possessing the single *Glud1* gene (*GLUD1* in the human) that encodes the evolutionary conserved GDH1 enzyme [2,3]. GDH1 is subject to strong allosteric regulation with structurally diverse compounds shown to influence its velocity [3]. Of the endogenous effectors, ADP and GTP serve as the main positive and negative modulators [3–5], with GTP interacting with GDH1 with >100-fold higher affinity (IC₅₀ = 0.1–0.2 μ M) than ADP (SC₅₀ = 18.0 μ M) [5,6]. The high sensitivity of GDH1 to GTP inhibition represents a fundamental enzyme property that largely determines glutamate flux through this pathway [3].

While GDH1 is housekeeping, its expression levels and cellular distribution are highly heterogeneous in mammalian tissues [7,8]. In most of these tissues, the direction of GDH1 reaction is towards glutamate oxidation, generating α -ketoglutarate that enters the TCA cycle leading to ATP production [3,9]. There is evidence that specialized mammalian cells utilize the GDH-catalyzed reaction to accomplish some of their unique functions [10]. In pancreatic β -cells, in particular,

Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFAP, glial fibrillary acidic protein; hGDH1, human glutamate dehydrogenase isoenzyme; hGDH2, human glutamate dehydrogenase isoenzyme 2; IF, immunofluorescence; mGDH1, mouse glutamate dehydrogenase 1; Tg, transgenic; Wt, wild-type; WB, Western blot; TCA, tricarboxylic acid cycle.

[★] This work was supported by the European Union (European Social Fund-ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: THALIS-UOA, Title "Mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease" (Grant Code 70/3/11679).

^{*} Corresponding author at: Department of Neurology, School of Medicine, University of Crete, Voutes Place, 71500 Heraklion, Crete, Greece.

glutamate oxidation *via* GDH1 leads to the synthesis of ATP that serves as a signal for insulin secretion [9,11,12]. Sener and Malaise [12] originally showed that L-leucine and its non-metabolized analogue BCH promote insulin release through allosteric activation of GDH1. More recent observations on mice with selective β -cell deletion of the *Glud1* gene revealed that GDH1 is essential for the full development of (glucose-stimulated) insulin secretory response, not required for glucose homeostasis under normo-caloric conditions [11].

In addition to *GLUD1*, humans have acquired *via* a recent duplication event (retro-position of GLUD1 to the X chromosome) a novel GLUD2 gene that encodes hGDH2 [13]. The novel gene evolved under positive Darwinian selection [14,15] indicative of adaptive DNA sequence evolution. It acquired 15 evolutionary amino acid replacements that equipped hGDH2 with unique properties [13-15]. Specifically, evolutionary replacement of Gly456 by Ala conferred resistance to GTP inhibition [16], a major functional adaptation that permits enhanced catalytic activity under conditions inhibitory to its ancestor hGDH1. Instead, hGDH2 activity is regulated via distinct molecular mechanisms conferred by additional evolutionary amino acid substitutions with the Arg443Ser change being the dominant player [17]. For this, hGDH2 drastically downregulates its basal activity (to 4–6% of maximal), while remaining remarkably responsive to activation by ADP (by 2500% at 1.0 mM) and L-leucine (by 1358% at 10 mM) [18]. As a result, hGDH2 has become dependent on ADP and/or Leucine for its catalysis [19]. In addition, hGDH2 shows a distinct tissue expression pattern in human tissues, including the brain, kidney, testis and steroid producing organs [10].

To better understand the role of hGDH2 in human biology, we recently generated transgenic mice expressing hGDH2 by inserting a human DNA segment containing the *GLUD2* gene and its regulatory elements into their genome [20]. Study of the *GLUD2* Tg mice brain, using double IF and confocal microscopy, revealed a hGDH2 cellular expression pattern similar to that observed in human brain [10,20]. These observations provided credence to the hypothesis that, by finding a suitable promoter in the X chromosome, the duplicated *GLUD2* gene diversified its roles in human tissues [20].

In light of these considerations, we explored here hGDH2 expression in non-neural organs (including pancreatic tissue) of Tg mice and the effect of the *GLUD2* gene on glucose homeostasis. Results revealed that hGDH2 is co-expressed with the endogenous GDH1 in pancreatic parenchyma, where it localizes to insulin-expressing cells of pancreatic islets. This hGDH2 expression "humanized" the blood glucose levels of the host by boosting fasting state serum insulin concentrations. Detailed results and the potential implications of these findings in human biology are presented below.

2. Material/methods

2.1. Reagents

The anti-hGDH1 and anti-hGDH2 specific antibodies were obtained as previously described [8,22] and used in dilutions 1:5000 and 1:2000 respectively. A mouse anti-insulin antibody (Thermo Scientific Cat.#MS-1379-P0;1:200), a goat anti-mouse secondary antibody conjugated to Alexa–Fluor 555 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, A21422, 1:200), a biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories Cat.BA-1000; 1:200) and streptavidin/FITC (Dako Code No. F 0422; 1:800) were used. Food pellets were from Mucedola 4RF21-GLP and sucralose from Splenda. Glucose was measured by a Contour NextOne glucose meter (Ascensia) and insulin with the MERCODIA Mouse Insulin ELISA10-1247-01 kit.

2.2. Generation and study of GLUD2 transgenic mice

Two independent lines of transgenic mice (Tg13 and Tg32) carrying the human *GLUD2* gene and its putative regulatory elements were constructed independently as previously described [20]. Animals were bred under specific pathogen-free conditions in the animal facility at Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB-FORTH) of Crete. The presence of the transgene was monitored by PCR from tail genomic DNA using primers specific for *GLUD2* [20]. Male Tg mice and their Wt littermates were studied.

2.3. Animal health

Animals were housed in standard cages (4 mice per cage), on a sawdust bedding, at constant temperature (23 ± 2 °C), humidity ($55\% \pm$ 5%) and under a normal 12 h light/dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00). Food and water were available ad libitum. All experimental procedures were approved by the local ethics committee for animal experimentation, meeting the governmental guidelines. Mice were sacrificed by cervical dislocation or by inhalation of an overdose of CO₂.

2.3.1. Food intake and weight comparison

Mice were weighed and food consumption was measured daily. Several physical health measures were also evaluated, including body posture, physical condition of the fur and home cage behaviors.

2.4. Enzyme assays and immunoblots

About 0.1–0.5 g of tissue (adrenals, kidney, liver, pancreas and testis) of Tg and Wt mice was homogenized (glass to glass) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 buffer containing 0.1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitors [22]. Tissue homogenates were centrifuged (11,000 \times g) and the obtained extracts were used for measuring GDH activity and for immunoblot analyses. GDH activity was assayed spectrophotometrically (at 340 nm) in 50 mM triethanolamine, pH 8.0, buffer in the direction of reductive amination of α -ketoglutarate, as previously described [18]. Enzyme velocity during the first 30 s after initiation of the reaction was recorded. The amount of tissue extract loaded to immunoblots was based on its GDH activity. For WB analyses, tissue extracts were run on an 8.5% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane and incubated with either the anti-GDH1 or the anti-hGDH2 antibody [22]. Protein bands were visualized with the use of the ChemiLucent Detection System kit (Chemicon International, Temecula, CA).

2.5. Immunofluorescence

2.5.1. Tissue slice preparation

The animals were deeply anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.) and perfused with 30 ml PBS followed by 30 ml 4% paraformaldehyde (PFA). Tissues were removed and fixed in 4% PFA for 40 min, cryoprotected in sucrose (30% in phosphate buffer, pH 7.4), embedded in gelatin (7.5% gelatin/15% sucrose in phosphate buffer, pH 7.4) and snap frozen in isopentane.

2.5.2. Immunofluorescence

Tissue sections were cut in cryotome and fixed in acetone for 8 min. Non-specific binding sites were blocked at RT for 40 min in 5% BSA in 0.5% Triton x-100 PBS and then incubated at 4 °C for 18 h with the rabbit primary antibodies (specific for either hGDH1 or hGDH2) and with the mouse primary antibody for insulin. Tissue slides were washed 3 times in PBS and incubated with fluorescence-labeled secondary antibodies, either biotinylated goat anti-rabbit followed by Streptavidin FITC or goat anti-mouse Alexa Fluor 555. Nuclei were visualized with TOPRO. In the negative control experiments, the primary antibodies were omitted and every other step was performed as in the experimental group. For IF studies in paraffin embedded formalin fixed tissue, the slidemounted sections were baked for 10 min at 60 °C, deparaffinized with two xylene washes, rehydrated through a series of graded alcohol washes, rinsed in water and washed with PBS (0.1 M, pH 7.4) containing 0.01% Tween 20. Heat-induced antigen retrieval was performed in a steamer using a Target Retrieval Solution (DAKO, S1700). Visualization was performed in a confocal microscope (TCS SP2; Leica; objective 20X, numerical aperture 0.70, pinhole 1 airy unit).

2.5.3. β-Cell mass and pancreatic insulin content

Immunostaining for insulin was performed as described above. Images were collected at ×4 or ×40 magnifications. Insulin stained area, as a percentage of the whole pancreatic area, was multiplied by pancreas weight to calculate β -cell mass. Islet area was calculated by dividing the insulin-positive area by the islet number for each tissue section. β -Cell cross-sectional area was calculated by dividing the insulin-positive area by the number of β -cell nuclei. β -Cell density was determined by dividing the number of β -cell nuclei by total pancreatic area.

2.6. Blood glucose and insulin determination

For determining blood glucose levels, the facial vein was punctured with a 31G needle and blood drops were collected in a tube. Insulin concentrations were determined in the serum. Glucose tolerance tests (GTT) were performed by administering i.p. 1 mg/g of body weight of glucose solution after fasting for 6 or 12 h. Blood samples were collected from the tail tip at 0, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration. Tg and Wt mice were studied in parallel. Insulin tolerance test was performed by administering i.p. 1 IU/kg body weight of human insulin (rDNA) (Actrapid 100 IU/ml, Novo Nordisk), following a 5 h-long morning fasting period (light cycle). Glucose concentration was monitored every 15 min for up to 2 h (120 min). Three-month-old mice of similar body weight were selected for this study. Ten Tg and ten Wt mice were studied in parallel.

2.6.1. Oral leucine loading

Mice were fed L-leucine via a non-invasive voluntary method. For this, L-leucine powder was incorporated into an artificially sweetened jelly containing sucralose, a sucrose-derived non-caloric sweetener that does not stimulate insulin release and does not interfere with our measurements. The jelly was prepared using 40 μl of 20% w/v sucralose solution in drinking H₂O with 60 µl of 14% w/v gelatin in 20% sucralose solution. The mixture was poured into a mold and let it set at 4 °C. L-leucine was then added to the jelly in an amount that provided 0.25 mg/g body weight. To overcome neophobia, a training period preceded the experiments, during which mice were exposed to the sweetened jelly without leucine. Once the animals were able to eat the jelly, single housed mice were fed the L-leucine-containing jelly after overnight fasting. A vehicle jelly preparation without L-leucine was used as control. Blood samples were collected at 0, 30 and 60 min after L-leucine administration for glucose and insulin determination.

2.6.2. Statistical analysis

Summary descriptive statistics are given as mean \pm SD. Independent samples *t*-tests were used to compare continuous variables between the Tg and Wt groups. One-way ANOVA was used to evaluate differences between the three mice groups (Tg13, Tg32, Wt). Repeated Measures ANOVA was used to assess time, group and time-group interaction effects of continuous variables measured at several time points. Posthoc Bonferroni adjusted tests were used to pinpoint differences. Linear regression analyses of glucose levels with the age of the animals were performed. *p*-Values <5% was the criterion for significance. All analyses were performed using the IBM-SPSS 25. Graphical representations were done using the GraphPad Prism 6.

3. Results

3.1. Health measures of GLUD2 transgenic mice

Two lines of transgenic mice (Tg13 and Tg32), generated independently [20], were used for these studies. The breeding rates of Tg and Wt mice were comparable, with the Tg mice passing their developmental milestones at about the same time as their wild-type littermates. Also, no differences were detected between Wt and Tg mice regarding food consumption, home cage behavior, body posture, and the physical appearance of the animals' fur. Similarly, irregular behaviors such as excessive grooming, digging, rearing, or stereotypies were not different between the two groups. Survival rates were also comparable between Tg and Wt mice.

3.2. Effect of the GLUD2 gene on tissue GDH activity

Enzyme assays, performed on tissue homogenates from Tg and Wt mice, revealed marked inter-tissue GDH differences within each group, with the highest GDH activity found in the liver and the lowest in the testis (Fig. 1). These results are consistent with the inter-tissue GDH disparities detected in several mammalian species, including the human [7,8]. A significant GLUD2 gene effect on tissue GDH activity was detected for the testis. Thus, as shown in Fig. 1, the GDH activity of Tg mice testis (2.26 \pm 0.27 μ mol NADPH oxidized/mg tissue/min) was about twice as high as that of Wt testis (1.00 \pm 0.14 μmol NADPH oxidized/mg tissue/min; p = 0.0002). As such, assaying enzyme activity proved sensitive for detecting a GLUD2 gene effect in a tissue characterized by low endogenous GDH1 activity. In the kidney and pancreas of Tg mice, GDH activity was 25-30% higher than that of Wt mice; however, due to inter-animal variability, these differences did not reach statistical significance, although WB and IF studies revealed hGDH2 expression in Tg mice tissues (see below). In the liver, GDH activity was essentially the same in Tg and Wt mice, although WB detected hGDH2 expression in Tg liver. As our enzyme assay measures the sum of the GDH1 and hGDH2, determination of total GDH activity (as done here) lacks the sensitivity needed for detecting hGDH2 expression in tissues with relatively high levels of endogenous GDH1.



Fig. 1. Tissue GDH activity of *GLUD2* transgenic (Tg) mice and their wild type (Wt) littermates. Enzyme activity was measured in whole homogenates from the tissues shown in the figure as described in the Material/methods. Assays were performed in 50 mM, pH 8.0, triethanolamine (TRA) buffer in the presence of 1.0 mM ADP. Activities are expressed as µmol NADPH oxidized per mg wet tissue per min. Black filled and white columns represent mean values for Wt and Tg mice respectively, and bars SEM. Three wild-type (Wt) and six *GLUD2* transgenic mice (Tg) were studied. The Tg group consisted of three Tg13 and three Tg32 mice. Differences between Tg and Wt animals reached significance only for testis (*p = 0.0002).



Fig. 2. hCDH2 expression in testis, pancreas, kidney and adrenals of Tg and Wt mice. A–J. Adult (6-month-old) *GLUD2* transgenic (Tg) mice and their wild-type (Wt) littermates were used for these experiments. A, D, G. Western blots were probed with either the anti-hGDH2 or the anti-hGDH1 antibody; purified recombinant hGDH1 and hGDH2 were used as controls. Tissue homogenates with comparable GDH activity (as determined by enzyme assays) were loaded into the gels. All tissues shown in this figure were from Tg32 mice. Similar results were obtained with the use of Tg13 mice. A. Immunoblots of testicular tissue extracts detected a hGDH1-postive band in Tg and Wt mice that corresponds to recombinant hGDH1 and represents the endogenous mouse-GDH1. In contrast, a hGDH2-specific band was detected in the Tg mice only, corresponding to recombinant hGDH2. B. IF on paraffin embedded fixed Tg testis using the anti-hGDH2 antibody (green). (White empty arrow: GDH1-specific labelling of Sertoli cells). C. IF of paraffin embedded fixed Tg testis using the anti-hGDH2 or the anti-hGDH2 antibody and a mouse anti-insulin specific antibody. hGDH2-specific band, detected in bdt the Tg and Wt mice, corresponds to recombinant hGDH1. E. Double IF studies on paraffin embedded fixed pancreatic tissue using the anti-hGDH2 or the anti-GDH1 antibody. F. The hGDH1-specific band, detected in bdt hag visualized both pancreatic islets and cells surrounding the Langerhans islets (green). G. Immunoblots of renal tissue from Tg and Wt mice corresponds to the purified recombinant hGDH2, whereas the hGDH1-specific band, seen in renal tissue from Tg and Wt mice using the anti-hGDH2 or the anti-GDH1 antibody. F. The hGDH2-specific antibody also visualized both pancreatic islets and cells surrounding the Langerhans islets (green). G. Immunoblots of renal tissue from Tg and Wt mice using the anti-hGDH1 or the an

3.3. Western blots show expression of hGDH2 in Tg mice tissues

Two antibodies specific for either hGDH2 or hGDH1 [10] were used for WB analyses. Results revealed that the anti-hGDH1 antibody interacted with the endogenous mouse GDH1 (mGDH1) with the same affinity as with hGDH1, without recognizing the expressed hGDH2 (Fig. 2A, D, G). These results are expected as hGDH1 and mGDH1 are essentially identical, having been conserved via purifying selection [14]. Conversely, our anti-hGDH2 antibody recognized the expressed hGDH2 protein without interacting with the endogenous mGDH1 enzyme. In GLUD2 Tg mice, hGDH2 was expressed in the adrenals, kidney, liver, pancreas and testis (Fig. 2). In testicular tissue, hGDH2 and mGDH1 were expressed at equal levels (Fig. 2A), whereas in other tissues hGDH2 was expressed at lower levels than the endogenous mGDH1. In addition, hGDH2 expression did not affect the endogenous mGDH1 levels in all Tg animal tissues studied, as detected with the use of the anti-hGDH1-specific antibody (Fig. 2A, D, G). No significant hGDH2 expression was identified in adipose tissue and skeletal muscle.

3.4. Cellular expression of the GLUD2 gene in Tg mice tissues

Immunofluorescence (IF) studies on testicular tissue revealed that hGDH2 was expressed in the Sertoli cells located inside the seminiferous tubules (Fig. 2B), and in the Leydig cells located in the interstitium. In contrast, mGDH1 was absent from the Sertoli cells, but was instead expressed in the Leydig cells (Fig. 2C). This expression pattern is identical to that observed in human testis where hGDH2 localizes to Sertoli cells, which lack hGDH1 [10]. Also, our observations showing that hGDH2 and mGDH1 attained in Tg testis equivalent levels are again strikingly similar to those previously reported for human testis, in which hGDH2 and hGDH1 are expressed at equal levels [10]. The unique expression of hGDH2 in Sertoli cells, as shown here, is thought to contribute to glutamate oxidation-derived lactate that is provided to sperm cells [10].

In the pancreas, double IF experiments showed that hGDH2 was expressed along with mGDH1 throughout the parenchyma, where it localized to insulin-expressing cells of pancreatic islets (Fig. 2E, F). We then tested whether transgenic expression of the human *GLUD2* gene affected the morphology or quantity of the β -cells. For this, we studied haematoxylin–eosin stained sections of pancreatic tissue as well as sections of fixed frozen pancreatic tissue immunostained with an antibody against insulin. Results revealed no significant differences between Tg and Wt mice with respect to the number or size of Langerhans islets or in the number and mass of β -cells (data not shown).

In the kidney, hGDH2 co-localized with the endogenous mGDH1 in the epithelial cells that line the proximal convolutional tubules (Fig. 2H, I), in accordance with previous observations on human renal cortex [21]. Given the ability of hGDH2 to work efficiently at relatively low pH and at GTP concentrations inhibitory to hGDH1 [18], expression of the novel enzyme in renal epithelial cells is thought to enhance glutamate deamination-derived ammoniagenesis (particularly during acidosis), thus contributing to acid-base balance [21].

In the adrenals, hGDH2 was co-expressed along with mGDH1 in all three layers of adrenal cortex that produce steroid hormones, including the zona glomerulosa (mineralocorticoid-secreting), the zona fasciculata (glucocorticoid-producing) and the zona reticularis (androgen-producing) (Fig. 2J). This cellular distribution pattern is similar to that previously observed for hGDH1 and hGDH2 in human adrenals [22]. Expression of hGDH2 in these cells is thought to provide a GTP-independent source of reducing equivalents (NADPH) needed for pregnenolone synthesis (initial step in steroidogenesis), as well as, an additional mechanism for feedback control of steroid synthesis [22].

3.5. Effect of the GLUD2 transgene on fasting glucose and insulin levels

Biochemical analyses of blood samples, obtained from young adult animals (3-6 months of age) after overnight (12-h long) fasting, revealed that blood glucose levels were significantly lower and of a narrower range in Tg mice (mean \pm SD: 93.7 \pm 7.6 mg/dl; 95% CI: 90.6–96.8 mg/dl; N = 26) as compared to their Wt littermates (mean \pm SD: 143.8 \pm 17.5 mg/dl; 95% CI: 136.2–151.4 mg/dl; N = 23; p < 0.0001) (Fig. 3A). As such, Tg mice had fasting blood glucose (FBG) values essentially identical to those of healthy (non-diabetic) humans. It is known that the C57BL/6J mouse strain used here is prone to diabetes, particularly with advancing age [23]. Our data indeed showed that Wt mice >12 months of age had significantly higher FBG levels (mean \pm SD: 161.1 \pm 24.8 mg/dl; N = 29; p = 0.005) than younger Wt animals (Fig. 3B). This aging effect was substantially attenuated in Tg mice (Fig. 3B). As shown in Fig. 3E, FBG levels correlated with the age (in weeks) of both Tg ($R^2 = 0.429$) and of Wt ($R^2 = 0.235$) mice. We also found that fasting for 6 h (prior to blood drawing) was associated with even higher FBG levels in aged Wt mice (192.0 \pm 21.1 mg/dl; 95% CI: 176.9–207.1 mg/dl (N = 10)), with about half of these values being >200 mg/dl (considered to be pre-diabetic for C57BL/6J mouse strain) (Fig. 3D) [23]. Remarkably, GLUD2 exerted a considerable protective effect against the propensity of the host mice to develop diabetes with aging. Thus, after fasting for 6 h, the FBG levels of Tg mice were $119.9 \pm 12.8 \text{ mg/dl} (95\% \text{ CI: } 110-130 \text{ mg/dl}; \text{ N} = 9; p < 0.0001)$ (Fig. 3D). Measurement of insulin concentrations in both animal groups revealed that fasting serum insulin levels were about 2.6-fold higher in Tg (mean \pm SD: 1.67 \pm 0.15 ng/ml; 95% CI: 1.58–1.77; N = 12; p < 0.0001) than in Wt mice (0.65 \pm 0.06 ng/ml; 95% CI: 0.61–0.69; N = 12) (Fig. 3C). The same GLUD2 gene effect on FBG and serum insulin levels was found in both of our Tg lines (Tg13 and Tg32) (Fig. 3A, B, C and D).

3.6. The GLUD2 gene does not affect glucose-stimulated serum insulin increase

Serum insulin levels rose robustly in Tg and Wt mice following administration of glucose (1 mg/g body weight, given i.p.) (Fig. 4A). This increase was in absolute value comparable between Wt (by 1.34 ± 0.45 ng/ml) and Tg mice (1.26 ± 0.19 ng/ml). However, because baseline insulin levels were lower in Wt mice (Fig. 4A), the glucose-stimulated serum insulin increases were proportionally greater in Wt (by 214 \pm 80%) than in Tg animals (77 \pm 10%). Similarly, blood glucose levels rose significantly in both animal groups after glucose administration (Fig. 4B). While this increase was in absolute value identical in Wt (by $202 \pm 31 \text{ mg/dl}$) and in Tg mice ($205 \pm 18.9 \text{ mg/dl}$), the Wt group showed proportionally smaller blood glucose increases due to its higher FBG levels. Analysis of our data (Fig. 4A and B) using repeated measures ANOVA revealed a significant effect of genotype (Wt v/s Tg) on both serum insulin (p < 0.001) and glucose levels change (p < 0.001) following glucose administration, a finding attributed to the significantly different baseline insulin and glucose levels of the Tg and Wt animals. Our two transgenic lines, Tg13 and Tg32 behaved similarly (p = 0.999). A second independent experiment, performed at a different date, yielded nearly identical results for both of our Tg lines.

3.7. L-leucine loading boosts serum insulin levels in Wt mice

To evaluate glucose-independent insulin secretion, we performed Lleucine loading experiments by administering orally 0.25 mg/g body weight to Tg and Wt mice. L-leucine resulted in a robust increase in the serum insulin levels of the Wt mice (before loading 0.68 \pm 0.07, after loading: 1.25 \pm 0.076 ng/ml; p < 0.0001), but it had little effect on the high fasting insulin levels of the Tg mice (baseline: 1.71 \pm 0.15,


Fig. 3. Glucose homeostasis in Tg and Wt mice of different ages. A–E: Fasting blood glucose (FBG) levels of Tg and Wt mice. The age of the animals and the fasting interval (prior to blood drawing) are shown below each figure. The *p* value above the figures refers to comparison between Tg and Wt mice of the same age. A. FBG levels of young adult (3–6-month-old) mice (Wt: N = 23, Tg: N = 26; Tg32: N = 12, Tg13: N = 14). B. FBG levels of 12–24-month-old (212-month-old) animals (Wt: N = 29, Tg: N = 21; Tg32: N = 9, Tg13: N = 12). FBG levels were significantly higher in aged (>12-month-old) Wt mice as compared to young adult (3–6-month-old) Wt animals (p = 0.005). Similarly, FBG were higher in older Tg mice as compared to young adult (3–6-month-old) Wt animals (p = 0.005). Similarly, FBG were higher in older Tg mice as compared to young adult (3–6-month-old) Wt animals (p = 0.005). Similarly, FBG were higher in older Tg mice as compared to young adult (3–6-month-old) Wt animals (p = 0.005). Similarly, FBG were higher in older Tg mice as compared to young adult (3–6-month-old) (212-month-old) Wt animals (p = 0.007). C. Blood insulin levels were obtained after overnight fasting in young adult (3–6-months) Tg (N = 9, Tg32: N = 5). D. FBG levels of a deter a 12-month-old (mean age; 15 months) Tg (N = 9, Tg32: N = 5), Tg13: N = 10. B. Correlation of glucose levels (obtained after a 12-hour fasting in 12–24-month-old (mean age; 15 months) Tg (N = 9, Tg32: N = 5, Tg13: N = 4) and Wt mice (N = 10). E. Correlation of glucose levels (obtained after a 12-hour fasting) with the age of the animals ($r^2 = 0.24$ for Wt and $r^2 = 0.43$ for Tg mice). Each dot represents the FBG levels of a single animal.

after loading: 1.90 ± 0.26 ng/ml; p = 0.154) (Fig. 4C). In addition, L-leucine loading reduced the blood glucose levels of Wt mice (baseline: 164 \pm 24 mg/dl; after loading: 137 ± 24 mg/dl; N = 6), but had essentially no effect on the glucose levels of the Tg mice (baseline: 100 ± 5 md/dl; after loading: 104 ± 2 ; N = 6) (Fig. 4D). Analysis of our data (Fig. 4C and D) with repeated measures ANOVA revealed a significant effect of the genotype (Wt v/s Tg) on insulin and glucose changes following leucine administration (p < 0.001 for insulin and p = 0.001 for glucose) (Fig. 4C

and D). Leucine differentially affected insulin and glucose levels in the two groups (repeated measures ANOVA interaction effect p < 0.001).

3.8. L-leucine loading improves glucose tolerance in Tg and Wt mice

To test whether L-leucine pre-treatment affects glucose handling, we administered 1 mg/g glucose (i.p.) to Wt and Tg mice half an hour after an L-leucine load (0.25 mg/g). Insulin and glucose levels were determined

Fig. 4. A & B: The *GLUD2* gene does not affect glucose-stimulated insulin release. Young adult (4-month old) Tg and Wt mice received i.p. 1.0 mg/g weight of glucose after a 12 hour-long fasting. Insulin (A) and glucose levels (B) were measured before (0 time) and 60 min after glucose administration. Compared to Wt mice, the Tg animals had, both at baseline and following glucose administration, higher insulin (p < 0.001) and lower blood glucose levels (p < 0.001). Repeated measures ANOVA suggested a significant genotype effect (Wt v/s Tg) on insulin (p < 0.001) and glucose changes (p < 0.001) following glucose administration, attributed to baseline level differences. C & D: L-leucine loading differentially affects serum insulin levels of Wt and Tg mice. Young adult (5-month old) Tg and Wt mice received orally L-leucine (0.25 mg/g of body weight) after fasting for 12 h. Serum insulin and blood glucose levels were then determined at 0 time and 60 min later. Repeated measures ANOVA revealed a significant genotype effect on insulin (p < 0.001) and glucose (p = 0.001) changes following leucine loading in Tg and Wt mice received orally L-leucine (0.25 mg/g of body weight) after fasting for 12 h. Half an hour after L-leucine treatment, the animals received i.p. 1.0 mg/g weight of glucose. Serum insulin levels were measured before (0 min) and 60 min after glucose administration (E). Repeated measures ANOVA revealed a significant genotype effect on insulin changes induced by glucose administration, following leucine pre-treatment (p < 0.001).

1 h later. Results revealed enhanced insulin release in both Wt and Tg mice (Fig. 4E). While in absolute values, these insulin increases were comparable in the two animal groups, Wt mice again experienced greater proportional increases (4-fold) than Tg animals (2-fold). Insulin levels were somewhat higher than those obtained following glucose administration but without L-leucine pre-treatment in both groups (Fig. 4A). Blood

glucose levels also increased comparably in Tg and Wt mice as shown in Fig. 5A. However, blood glucose increases were of a lesser magnitude that those found in animals not pre-treated with L-leucine. Analysis of the data presented in Fig. 4E with repeated measures ANOVA revealed a significant genotype effect (Wt v/s Tg) on insulin changes induced by glucose administration following leucine pre-treatment (p < 0.001).



Changes in Insulin and Glucose levels after Glucose administration to Wt and Tg mice



Changes in Insulin and Glucose levels after L-leucine administration to Wt and Tg mice



Changes in Insulin levels after Glucose administration to Wt and Tg mice pre-treated with L-leucine. Changes in Glucose levels are shown in Figure 5A



Fig. 5. A & B: L-leucine effect on the GTT curves of Tg and Wt mice. A. GTT was performed in 5-month-old Wt (N = 8) and Tg (N = 7; Tg13 = 3 and Tg 32 = 4) mice either without pretreatment (untreated) or $\frac{1}{2}$ h after administration of 0.25 mg/g of L-leucine (Leucine pre-treatment). Repeated measures ANOVA revealed a significant genotype effect (p < 0.001) on glucose changes over time. B. The differences in glucose levels induced by leucine pre-treatment were plotted over time. No differential effect of L-leucine on the GTT curves of Tg and Wt mice was detected (p = 0.730). C & D. Insulin tolerance test in Wt and Tg mice. Wt (N = 10) and Tg (N = 10; Tg13 = 5 and Tg32 = 5) mice received i.p. 1 IU/kg of insulin after a 5 h-long morning fasting period. Blood glucose levels induced by insulin administration (expressed as percentage of initial) were plotted over time. There was no differential effect of insulin on blood glucose levels in the two groups (ANOVA p = 0.603).

3.8.1. Glucose tolerance studies

GTTs were also performed by administering a glucose load (1 mg/g body weight, i.p.) with and without L-leucine pre-treatment (given 30 min prior to glucose administration). Tg mice showed improved glucose curves as compared to their wild type littermates in both conditions (with and without L-leucine pre-treatment). Repeated measures ANOVA analysis of the data presented in Fig. 5A suggested a significant effect of genotype (Wt v/s Tg) on blood glucose changes over time regardless of leucine pre-treatment (p < 0.001). On the other hand, L-leucine pre-treatment resulted in a better handling of glucose in both groups. A significant effect of leucine pre-treatment on glucose changes over time (GTT curves) was detected for both groups (ANOVA p < 0.001for Wt and for Tg mice). The net changes in glucose levels during the GTT induced by L-Leucine pre-treatment were plotted over time (Fig. 5B). Results revealed that leucine pre-treatment affected similarly the GTT curves of Wt and Tg animals (repeated measures ANOVA p =0.730).

3.8.2. Insulin sensitivity studies

Insulin tolerance test were also performed in young adult (3-month old) Wt (N = 10) mice and Tg (N = 10; Tg13 = 5 and Tg32 = 5)

animals by administering i.p. 1 IU/kg body weight of human insulin following a 5 h morning fasting period (light cycle). Determination of blood glucose levels was done at 15, 30, 60, 90 and 120 min after insulin administration. Results revealed that glucose levels declined in both animal groups (Fig. 5C and D). Analysis of data presented in Fig. 5C with repeated measures ANOVA suggested a differential effect of genotype (Wt v/s Tg) on the insulin induced change of blood glucose levels over time (p < 0.001). This was attributed to the significantly different baseline glucose levels of the two groups. However, blood glucose levels decreased proportionally following insulin administration in both animal groups (Fig. 5D). Furthermore, the course of insulin-induced drop in glucose levels over time did not differ between the two groups (repeated measures ANOVA showed no significant genotype effect; p =0.603). These results, revealing similar insulin tolerance tests for Wt and Tg mice, suggest that the two groups are comparably sensitive to insulin.

3.8.3. Effect of aging on food consumption and body weight

Food consumption, studied at different ages, was found to be comparable between the two experimental groups. The body weight of young adult (2-month-old) Tg and Wt mice did not differ significantly

8



Fig. 6. Effect of aging and food deprivation on body weight balance. A. Comparison of 2-month-old Tg (N = 9) and Wt mice (N = 9) with 14-month-old Tg (N = 9) and Wt (N = 9) mice, reveals that aged animals were significantly heavier than younger mice (p < 0.001 for each group). While young adult Tg and Wt mice had a similar body weight, aged Wt mice were significantly heavier that aged Tg mice (p = 0.0077). B & C. The body weight of the same Tg or Wt animals was determined at the age of 6 months and then at 12 months. Repeated measures ANOVA revealed a significant genotype effect on body weight changes over time (p = 0.023). D & E. Weight loss of Tg and Wt mice following food deprivation. While the two groups lost a comparable amount of weight when deprived of food for 24 h, Tg animals lost significantly more weight than Wt mice after a 48-hour long food deprivation (p = 0.0293).

(Fig. 6A). In contrast, aged (14-month-old) Wt mice were significantly heavier (39.5 \pm 4.5 g) than aged Tg mice (32.57 \pm 1.58 g; *p* = 0.0077) (Fig. 6A). We then followed the animals longitudinally from 6 to 12 months of age and found that, while food consumption was similar in the two groups, Wt mice gained more weight than Tg mice as they grew older (Fig. 6B). Thus, while Wt mice weighed 30.96 ± 1.4 g at 6 months and 36.14 ± 2.09 g at 12 months, Tg mice weighed 30.26 ± 1.40 g at 6 months and 33.30 ± 2.06 g at 12 months (Fig. 6B). As such, Wt and Tg mice were $17 \pm 7\%$ and $10 \pm 5\%$ heavier, respectively, at 12 months than at 6 months of age (Fig. 6C), suggesting that weight gain was significantly less for Tg than for Wt mice. Analysis of our data with repeated measures ANOVA revealed a significant effect of time on body weight (*p* < 0.001) but also a significant effect of genotype on weight change over time (Wt v/s Tg; *p* = 0.023).

3.8.4. Effect of fasting on body weight

The effect of food deprivation on body weight was also studied. Results revealed that, when deprived of food for 24 h Tg and Wt mice lost a comparable amount of weight (9.4% and 9.6% respectively of their initial weight) (Fig. 6D). However, after 48 hour food deprivation, the Wt mice lost 13.6% and the Tg mice 15.3% of their initial weight (p = 0.0293) (Fig. 6E).

4. Discussion

GLUD2 is a primate-specific gene that emerged *via* duplication in the hominoid and evolved on the lineage that descended to the human [3,14]. As such, *GLUD2* is not present in the C57BL/6] mouse

strain used here to create our Tg model. Instead, the mouse possesses Glud1, the single conserved mammalian gene that is essentially identical to human GLUD1. Here we studied hGDH2 expression in the non-neural tissues of Tg mice carrying the human GLUD2 gene and its regulatory elements. Results showed that hGDH2 is expressed in the adrenals, kidney and testis of the host in a pattern similar to that previously described in human tissues [10]. In the pancreas of Tg mice, hGDH2 was expressed in Langerhans islets, where it localized to insulin-expressing cells of pancreatic islets. In addition, functional studies provided evidence for an enhanced in vivo biological action of the novel human enzyme. Specifically, hGDH2 Tg expression "humanized" glucose homeostasis in the host C57BL/6J, a mouse strain prone to diabetes [23]. Thus, while the Wt mice had FBG levels in the pre-diabetic range (136–151 mg/dl), GLUD2 Tg animals maintained lower FBG levels (91-97 mg/dl) closely resembling those of healthy humans. Also, GLUD2 exerted a considerable protective effect against the propensity of the host to develop diabetes and to gain weight with advancing age.

To understand the mechanisms by which *GLUD2* transgenic expression affects glucose homeostasis, we determined serum insulin levels before and after administration of glucose or L-leucine, and obtained the following results: Firstly, fasting serum insulin levels were about 2.6-fold higher in the Tg than in the Wt mice. Secondly, in young adult animals, glucose loading produced blood glucose curves and insulin increases, which were comparable in the Tg and Wt mice, thus suggesting that the *GLUD2* gene did not affect glucose-stimulated insulin release. Thirdly, L-leucine loading raised the low insulin levels of the Wt mice, implying a significant activation of the endogenous mGDH1 in β -cells

[12]. These data suggest that L-leucine reached *in vivo*, concentrations sufficient to act synergistically with ADP in counteracting the GTP inhibitory effect on mGDH1 that prevails in β cell [18].

In contrast, L-leucine loading had little effect on Tg mice, which in their fasting state had serum insulin levels higher than those achieved in Wt mice by L-leucine administration. Previous observations have shown that ADP interacts with hGDH2 with higher affinity (SC₅₀ = 0.06 mM) than L-leucine (SC₅₀ = 1.00 mM) [18] and that 1.00 mM ADP is sufficient to maximally activate hGDH2 [18]. As such, under the low ATP/ADP ratio that prevails in β -cells in the fasting state, glutamate flux through hGDH2 should be close to maximum. Previous studies have indeed showed that ADP attains 1.20 mM at <2.8 mM glucose [24]. Hence, lack of additional L-leucine effect on the high insulin levels of Tg mice support the concept that glutamate flux is close to saturation.

The present studies also revealed that pre-treatment with L-leucine improved glucose handling in both animal groups. Previous investigations on mice with β -cell-specific GDH1 deletion have shown that glutamate deamination *via* GDH1 accounts for about 40% of glucosestimulated insulin secretion with the enzyme being essential for the full development of the insulin secretory response in β -cells [11]. Hence, the observed improved GTT curves following L-leucine pretreatment, likely reflect activation of the endogenous mGDH1 possessed by both, the Wt and the Tg mice. Moreover, the stronger L-leucine effect in Tg mice may reflect an additive effect of mGDH1 and hGDH2 in β -cells. Additional studies are required to test this hypothesis and whether hGDH2 and GDH1 form hetero-hexamers with distinct properties in cells co-expressing the two highly homologous isoenzymes.

In recent years, study of mutations in hGDH1 that attenuate GTP inhibition has provided further insight into glutamate-dependent insulin secretory responses [9]. Human subjects, carrying these heterozygous mutations suffer from the HI/HA syndrome, characterized by bouts of hypoglycemia and seizures due to inappropriate release of insulin as a result of an overactive hGDH1 [9]. Similarly, Tg mice, carrying the His454Tyr hGDH1 hyperactive mutant, developed hypoglycemia (blood glucose levels ranging from 50 to 70 mg/d1) that impaired the breeding efficiency and the survival of these animals [25]. These observations have re-enforced the belief that GDH1 in β -cells is largely inactive due to tonic inhibition by GTP generated by the TCA cycle [3].

In contrast to the His454Tyr-hGDH1 Tg mouse, our *GLUD2* Tg mice evidenced no hypoglycemia either during a 6 or 12-hour fasting state or even after L-leucine administration. They also had normal physical health measures, survival and reproduction rates. While hGDH1 mutations result in loss of the physiological hGDH1 regulation, hGDH2 has developed novel molecular mechanisms for regulating its activity as noted above. As such, the beneficial effects of transgenic *GLUD2* expression on glucose homeostasis are likely due to the refined properties acquired by hGDH2 over millions of years of evolution. While these properties include resistance to GTP inhibition (conferred by the Gly456Ala change), the enzyme's functional behavior is multifaceted, being determined by combined actions of other evolutionary amino acid substitutions [15,18]. As a result, *GLUD2* adaptation bestowed human cells with physiologically enhanced glutamate metabolizing capacity that is biologically advantageous.

Regarding the cellular-molecular mechanisms responsible for the observed hGDH2 effects on glucose homeostasis, enzymatic studies, performed *in vitro* using recombinant hGDH1 and hGDH2, have predicted an enhanced *in vivo* biological function for hGDH2 (as compared to hGDH1) in the presence of ADP and L-leucine [3,15,18]. This prediction has been borne out by metabolic studies on cultured human cells expressing hGDH2. Specifically, glioma cells exhibited an enhanced glutamate flux through hGDH2 that non-redundantly increased TCA substrates (α -ketoglutarate, citrate and cis-aconitate) through glutamate oxidation-dependent anaplerosis [26,27]. Similarly, cultured astrocytes isolated from the *GLUD2* Tg mice expressing hGDH2 (constructed independently [28]) exhibited augmented TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate, particularly during glucose deprivation [29].

These observations suggested that hGDH2 expression decreased oxidative metabolism of glucose due to increased entrance of carbon skeletons into the TCA from glutamate and other amino acids [29].

In light of the above considerations, augmentation of the bioenergetic and biosynthetic function of the TCA cycle by the expressed hGDH2 in β -cells should account for the observed enhanced insulin secretion in the fasting state. As noted above, hGDH2 should be fully active under the relatively high ADP intracellular concentrations (and low glucose levels) of the fasting state, while mGDH1 is relatively inactive due to tonic inhibition by GTP. Observations in *Glud1* null mice support this concept by showing that absence of mGDH1 in β -cells had no effect on insulin release at 2.8 mM of glucose [11].

While GDH1 is not required for glucose hemostasis under normo-caloric conditions [11], our present data suggest that this role is taken up by the novel positively selected hGDH2 enzyme adapted to function optimally under the high ADP levels of the fasting state. In addition to stimulating hGDH2, the low ATP/ADP ratio of the fasting state increases glutaminolysis (through phosphate-activated glutaminase) [25], thus generating substrate (glutamate) needed for sustaining enhanced oxidative flux through hGDH2. Glutamine is known to be the source of intracellular glutamate and, while glutamine does not promote insulin release, it becomes a secretagogue only when GDH is simultaneously activated [30].

Whereas other mechanisms could play a role on the observed improved glucose homeostasis of Tg mice, we found no significant *GLUD2* expression in non-pancreatic insulin sensitive organs, such as in adipose tissue and skeletal muscle (except for the liver). We also tested here the sensitivity of our animal groups to insulin administration (1 IU/kg body weight, given i.p.). Determination of blood glucose levels every 15 min after insulin administration revealed that glucose levels declined similarly in Wt and Tg mice. These similar insulin tolerance tests for Wt and Tg mice, suggest that the two groups are comparably sensitive to insulin and as such, the high insulin levels of the Tg mice cannot be attributed to a compensatory increased release due to insulin insensitivity. Instead these data support the thesis that hGDH2 expression boosts insulin release through its metabolic function in β -cells (increased ATP synthesis *via* enhanced glutamate oxidation) as described above.

Microscopic examination of the pancreas revealed no changes in the appearance of Langerhans islets, particularly with respect to β -cell mass, density and distribution. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that the enhanced basal insulin release could relate to increased overall insulin content in pancreatic β -cell. While additional studies are needed to explore these possibilities, a possible DNA derangement, resulting from stochastic insertion of the human DNA segment into the mouse genome can be essentially excluded as we obtained the same results in two *GLUD2* Tg lines constructed independently.

The present studies also revealed that Wt animals gained more weight than *GLUD2* mice as they grew older. In addition, Wt mice lost less weight than Tg mice following a 48 hour-long food deprivation. Besides the tendency of our C57BL/6J mouse model to develop diabetes, this strain also becomes obese with advancing age [31]. Notably, the *GLUD2* gene attenuated these aging effects, probably by improving cellular energy metabolism. Hence, advent of the *GLUD2* gene may have contributed to the maintenance not only of euglycemia, but also to body weight balance in the human. Whether the novel gene provides protection from disorders of glucose metabolism and obesity associated with senescence is an exciting possibility that remains to be further studied.

Author contributions

CS and AP conceived and coordinated the study and wrote the paper. CS and ZP performed the experimental studies and prepared the Figures. SD and KM contribute to experimental studies. GC designed and performed the statistical analyses. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Konstantina Aggelaki, Lambros Mathioudakis, Mara Bourbouli and Irene Skoula for their help in these studies.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer PD, editor. The enzymes, vol. 11, New York. Academic Press; 1975. p. 293–367.
- [2] Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, et al. Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85:3494–8.
- [3] Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. Biology (Basel). 2017;6.
- [4] Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. Arch Biochem Biophys. 2012;519:69–80.
- [5] Mastorodemos V, Kanavouras K, Sundaram S, Providaki M, Petraki Z, Kokkinidis M, et al. Side-chain interactions in the regulatory domain of human glutamate dehydrogenase determine basal activity and regulation. J Neurochem. 2015;133:73–82.
- [6] Spanaki C, Zaganas I, Kounoupa Z, Plaitakis A. The complex regulation of human glud1 and glud2 glutamate dehydrogenases and its implications in nerve tissue biology. Neurochem Int. 2012;61:470–81.
- [7] Spanaki C, Kotzamani D, Petraki Z, Drakos E, Plaitakis A. Heterogeneous cellular distribution of glutamate dehydrogenase in brain and in non-neural tissues. Neurochem Res. 2014;39:500–15.
- [8] Treberg JR, Banh S, Pandey U, Weihrauch D. Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. Neurochem Res. 2014;39:516–26.
- [9] Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, et al. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. N Engl J Med. 1998;338:1352–7.
- [10] Spanaki C, Kotzamani D, Plaitakis A. Widening spectrum of cellular and subcellular expression of human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenases suggests novel functions. Neurochem Res. 2017;42:92–107.
- [11] Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, Vetterli L, Bloksgaard M, Gjinovci A, et al. Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. | Biol Chem. 2009;284:921–9.
- [12] Sener A, Malaisse WJ. L-Jeucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. Nature. 1980;288:187–9.
- [13] Shashidharan P, Michaelidis TM, Robakis NK, Kresovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. J Biol Chem. 1994;269:16971–6.
- [14] Burki F, Kaessmann H. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. Nat Genet. 2004;36:1061–3.

- [15] Plaitakis A, Latsoudis H, Spanaki C. The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease. Neurochem Int. 2011;59:495–509.
- [16] Zaganas I, Plaitakis A. 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. 2002;277:26422–8.
- [17] Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M, Plaitakis A. Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. J Biol Chem. 2002;277:46552–8.
- [18] 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;85:3398–406.
- [19] Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. J Neurochem. 1997;68:1804–11.
- [20] Plaitakis A, Kotzamani D, Petraki Z, Delidaki M, Rinotas V, Zaganas I, et al. Transgenic mice carrying GLUD2 as a tool for studying the expressional and the functional adaptation of this positive selected gene in human brain evolution. Neurochem Res. 2019;44:154–69.
- [21] Spanaki C, Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. Neurotox Res. 2012;21:117–27.
- [22] Spanaki C, Kotzamani D, Petraki Z, Drakos E, Plaitakis A. Expression of human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenases in steroid producing tissues. Mol Cell Endocrinol. 2015;415:1–11.
- [23] Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. Dis Model Mech. 2010;3:525–34.
- [24] Detimary P, Dejonghe S, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F, Henquin JC. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. J Biol Chem. 1998; 273:33905–8.
- [25] Li C, Matter A, Kelly A, Petty TJ, Najafi H, MacMullen C, et al. Effects of a GTP-insensitive mutation of glutamate dehydrogenase on insulin secretion in transgenic mice. J Biol Chem. 2006;281:15064–72.
- [26] Chen R, Nishimura MC, Kharbanda S, Peale F, Deng Y, Daemen A, et al. Hominoidspecific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:14217–22.
- [27] Waitkus MS, Pirozzi CJ, Moure CJ, Diplas BH, Hansen LJ, Carpenter AB, et al. Adaptive evolution of the GDH2 allosteric domain promotes gliomagenesis by resolving IDH1 (R132H)-induced metabolic liabilities. Cancer Res. 2018;78(1):36–50.
- [28] Li Q, Guo S, Jiang X, Bryk J, Naumann R, Enard W, et al. Mice carrying a human GLUD2 gene recapitulate aspects of human transcriptome and metabolome development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:5358–63.
- [29] Nissen JD, Lykke K, Bryk J, Stridh MH, Zaganas I, Skytt DM, et al. Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. Glia. 2017;65:474–88.
- [30] Vetterli L, Carobbio S, Pournourmohammadi S, Martin-Del-Rio R, Skytt DM, Waagepetersen HS, et al. Delineation of glutamate pathways and secretory responses in pancreatic islets with beta-cell-specific abrogation of the glutamate dehydrogenase. Mol Biol Cell. 2012;23:3851–62.
- [31] The Jackson Laboratory. C57BL/6J mouse strain data sheet. https://www.jax.org/ strain/000664. Accessed date: 19 March 2019.

ORIGINAL PAPER



Transgenic Mice Carrying *GLUD2* as a Tool for Studying the Expressional and the Functional Adaptation of this Positive Selected Gene in Human Brain Evolution

Andreas Plaitakis^{1,2} · Dimitra Kotzamani¹ · Zoe Petraki¹ · Maria Delidaki¹ · Vagelis Rinotas³ · Ioannis Zaganas¹ · Eleni Douni^{3,4} · Kyriaki Sidiropoulou⁵ · Cleanthe Spanaki¹

Received: 8 February 2018 / Revised: 3 May 2018 / Accepted: 4 May 2018 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Human evolution is characterized by brain expansion and up-regulation of genes involved in energy metabolism and synaptic transmission, including the glutamate signaling pathway. Glutamate is the excitatory transmitter of neural circuits sub-serving cognitive functions, with glutamate-modulation of synaptic plasticity being central to learning and memory. GLUD2 is a novel positively-selected human gene involved in glutamatergic transmission and energy metabolism that underwent rapid evolutionary adaptation concomitantly with prefrontal cortex enlargement. Two evolutionary replacements (Glv456Ala and Arg443Ser) made hGDH2 resistant to GTP inhibition and allowed distinct regulation, enabling enhanced enzyme function under high glutamatergic system demands. GLUD2 adaptation may have contributed to unique human traits, but evidence for this is lacking. GLUD2 arose through retro-positioning of a processed GLUD1 mRNA to the X chromosome, a DNA replication mechanism that typically generates pseudogenes. However, by finding a suitable promoter, GLUD2 is thought to have gained expression in nerve and other tissues, where it adapted to their particular needs. Here we generated GLUD2 transgenic (Tg) mice by inserting in their genome a segment of the human X chromosome, containing the GLUD2 gene and its putative promoter. Double IF studies of Tg mouse brain revealed that the human gene is expressed in the host mouse brain in a pattern similar to that observed in human brain, thus providing credence to the above hypothesis. This expressional adaptation may have conferred novel role(s) on GLUD2 in human brain. Previous observations, also in GLUD2 Tg mice, generated and studied independently, showed that the non-redundant function of hGDH2 is markedly activated during early post-natal brain development, contributing to developmental changes in prefrontal cortex similar to those attributed to human divergence. Hence, GLUD2 adaptation may have influenced the evolutionary course taken by the human brain, but understanding the mechanism(s) involved remains challenging.

Keywords GLUD2 Transgenic mice · GLUD2 Adaptation · Brain hGDH2 expression · Human evolution

	Andreas Plaitakis andreasplaitakis@gmail.com
1	Department of Neurology, School of Medicine, University of Crete, Voutes Place, 71500 Heraklion, Crete, Greece
2	Present Address: Neurology Department, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA
3	Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Fleming 34, 16672 Vari, Athens, Greece
4	Laboratory of Genetics, Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece
5	

⁵ Department of Biology, University of Crete, Voutes Place, 71500 Heraklion, Crete, Greece

Abbreviations

BAC	Bacterial artificial chromosome
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
hGDH1	Human glutamate dehydrogenase isoenzyme
hGDH2	Human glutamate dehydrogenase isoenzyme 2
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IF	Immunofluorescence
mGDH1	Mouse glutamate dehydrogenase 1
MTS	Mitochondrial targeting sequence
Tg	Transgenic
Wt	Wild-type
WB	Western blot
TCA	Tricarboxylic acid cycle

Introduction

Human evolution is characterized by brain expansion and acquisition of unique traits, including language function, symbolic thought and other complex cognitive processes. There is disproportional enlargement of the prefrontal cortex (PFC), the excitatory pyramidal neurons of which exhibit increased dendritic branching and synaptic spine density [1]. In addition, human PFC displays increased neuropil space (to accommodate synapses and dendritic processes) and a high density of glial cells relative to neurons [2]. This adaptation is thought to reflect increased metabolic demands arising from the high neuronal activity that characterizes the human brain [2-4]. To meet these demands, a rapid metabolic evolution has taken place [3, 4], with large-scale mRNA analyses of human brain having shown up-regulation of genes involved in synaptic transmission and energy metabolism [5].

While the underlying molecular-genetic mechanisms that drive these adaptations remain unclear, glutamatergic transmission is a major player with glutamate release and recycling thought to consume about 60-80% of energy supplied by glucose [3, 4]. Energy demands are even greater in the developing nervous system, with fetal brain consuming about 65% of the body's total metabolic energy [3]. Glutamate, by activating a subclass of glutamate receptors and calcium influx, can induce long-lasting modification of synapses associated with structural plasticity, including increased dendritic spine density [6]. This ability of synapses to change their strength, known as "synaptic plasticity", is thought to represent the "cellular correlate of long-term memory" [7]. Such experiencedependent plasticity may promote the sculpting of neural circuits in response to environmental influences [8, 9], thus contributing to a synergy between nature and nurture, processes of fundamental importance in human brain evolution [8, 9].

In support of these considerations, comparative studies on the brain of primates have shown that the glutamatergic signaling pathway is the primary target of human brain evolution [10]. Specifically, there is up-regulation of genes encoding proteins involved both in pre-synaptic glutamatergic mechanisms (glutamate storage and release) and in post-synaptic excitatory transmission (glutamate receptors, synaptic scaffolding proteins and calcium signaling proteins) [10]. However, the genetic determinants of this up-regulation remain largely unknown, with DNA analyses providing no evidence for accelerated evolution of genes and their regulatory elements that encode the above proteins [11].

While it has proven difficult to assign evolutionary genomic changes to specific human traits, several genes

expressed in human brain underwent positive Darwinian selection, a process indicative of adaptive DNA sequence evolution [12]. Such positive selection is known to generate new phenotypes from existing ones [13] and can lead to the development of new genes in an environment shaped by social and cultural influences [9]. To this end, a number of genes involved in brain size, neurotransmission, vision, memory and neural cell metabolism are shown to have evolved under positive Darwinian selection [12, 14, 15].

GLUD2 is a novel gene [16] that evolved in the human lineage under positive selection and that underwent rapid evolutionary adaptation, concomitantly with pre-frontal cortex expansion [15]. It encodes the hGDH2 isoform of glutamate dehydrogenase, an enzyme involved both in glutamatergic transmission and in energy metabolism, two processes pivotal to human brain evolution. There is tantalizing evidence that birth and adaptation of *GLUD2* may have contributed to human brain development and perhaps to acquisition of cognitive capabilities [15, 17] possibly by enhancing glutamatergic transmission and the bioenergetic and biosynthetic function of the TCA cycle [17].

GLUD2 was born through gene duplication, a process thought to have played a major role in the evolution of eukarvotes [13]. Thus, duplicated genes often undergo positive selection, which as noted above, can lead to sequence, function and/or expression divergence [18]. Whereas new genes typically arise through genomic duplication or gene conversion events [19], GLUD2 was born through retro-positioning of a processed GLUD1 mRNA, a process known to generate pseudogenes [19]. It has been hypothesized, however, that, by finding a suitable promoter, GLUD2 gained expression in nerve and other tissues where it adapted to their specific metabolic needs [15, 19]. To test this hypothesis, we generated GLUD2 transgenic (Tg) mice by inserting in their genome a 176.6 Kb segment of human X chromosome, containing the GLUD2 gene and its putative regulatory elements (including its promoter). Using antibodies that specifically recognize hGDH2 (encoded by the GLUD2 gene) or GDH1 (encoded by the endogenous mouse Glud1 gene), we studied the expressional pattern of the human gene in the host brain. Results obtained were then compared with those derived from the study of human brain, as described below.

Materials and Methods

Reagents

A human BAC clone (RP11-610G22) was obtained from ImaGenes, GmbH and used for constructing the *GLUD2* transgenic mice. Nitrocellulose membrane (Porablot NCP) was from Macherey–Nagel. The anti-hGDH1-specific antibody was obtained from Aviva Systems Biology. The anti-hGDH2-specific antibody was raised in rabbits as previously described [20]. Other primary antibodies used included mouse raised anti-NEUN (Millipore 1:400) and anti-GFAP (Sigma-Aldrich; 1:2000) antibodies. Secondary antibodies used included fluorescein- and rhodamine-conjugated donkey cross-affinity purified secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:100), biotinylated anti-rabbit and anti-mouse IgG (Vector Laboratories; 1:200), streptavidin/FITC (Dako; 1:800).

The Anti-hGDH1 and Anti-hGDH2 Antibodies

For specifically detecting the hGDH2 protein, we used a polyclonal antibody raised in rabbits using a 12-amino acid long hGDH2-specific peptide containing the Arg443Ser evolutionary replacement that induces drastic changes in the enzyme's behavior, including its migration in SDS-PAGE [20]. The antibody has been previously characterized [20]. It specifically recognizes hGDH2 without interacting with hGDH1 [20]. For detecting the endogenous mouse GDH1 we used a polyclonal antibody raised in rabbits (Aviva Systems Biology) against a 50 amino acid-long hGDH1-specific peptide that contains three amino acid residues evolutionary replaced in hGDH2 [21]. Characterization of this antibody showed that it specifically recognizes hGDH1 without interacting with hGDH2 [21].

Generation of GLUD2 Transgenic Mice

The above BAC clone, containing a segment of the human X chromosome that encompasses the *GLUD2* gene and 40 kb of upstream and 135 kb of downstream DNA sequences, was used to construct the transgenic mice. A *Not*I fragment of 176,610 bp was isolated from the above BAC clone and microinjected into the pronuclei of fertilized (C57BL/6J × CBA/J) F2 oocytes as previously described [22, 23]. Micro-injections and embryo implantations were carried out by the Transgenics & Gene Targeting Facility at the Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming'. The resulting offspring, first obtained in May 2013, were genotyped by PCR using the primers described below.

DNA Analysis

Mouse tail DNA was extracted using the phenol/chloroform method. Founders were identified by PCR analysis using primers specific for coding sequences of the *GLUD2* gene (F: 5'-TGAATGCTGGAGGAGT GACA-3'and R: 5'-TGG ATTGACTTGTTGAGAATGG-3'). Founders were crossed with C57BL/6 mice. F1 offspring were genotyped to identify germ line transmission using the same method. Transgenic offspring, used to maintain the transgenic line, were bred under specific pathogen-free conditions in the animal

facility at the Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB) of FORTH, Crete, Greece. The presence of the transgene was monitored throughout the course of the study by PCR from tail genomic DNA using the above primers. To produce heterozygous transgenic lines, *GLUD2* Tg mice were crossed with wild-type C57BL/6 animals. The control mice that were used in our experiments were wild-type littermates of the *GLUD2* Tg animals. The animals were housed 4 mice per cage in standard cages, with a sawdust bedding, at constant temperature (23 + 2 °C), humidity (55 + 5%) and under normal 12 h light/dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00). Food and water were available ad libitum.

All experimental procedures were approved by the local ethics committee for animal experiments and met the governmental guidelines. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. Two *GLUD2* Tg strains (lines Tg13 and Tg32) showing comparable levels of hGDH2 expression in the brain were used and studied in parallel.

Western Blot Analyses

Crude Brain Extract Preparation

About 50–100 mg of nerve tissue from different CNS regions (for olfactory bulbs about 20 mg) of young adult Tg and Wt mice was dissected and homogenized (glass to glass) in 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 0.1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, and protease inhibitors. Crude extracts obtained by centrifugation $(11,000 \times g$ for 10 min) of the cell lysates were used.

Western Blots

Tissue extracts, obtained as described above, were run on an 8.5% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane and incubated with the primary anti-hGDH1 or the primary anti-hGDH2 specific antibody described above. Proteins bands were visualised with the use of the ChemiLucent Detection System kit (Chemicon).

Immunofluorescence Studies

Brain Slice Preparation of Tg Mice

All animals were deeply anesthetized using pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p) and then perfused with 30 ml PBS followed by 30 ml 4% paraformaldehyde (PFA). After successful perfusion, the brains were removed immediately and fixed in 4% PFA for 40 min. Upon fixation, tissues were sucrose cryoprotected (30% sucrose in phosphate buffer, pH 7.4) and embedded in gelatin (7.5% gelatin/15% sucrose in phosphate buffer, pH 7.4) and then were snap-frozen

by exposure to isopentane. Coronal serial sections were obtained via cryotome and transferred to gelatin coated glass slides (or in positively charged SuperFrost slides, ThermoFischer Scientific).

Preparation of Human Brain Slices

Postmortem human brain samples from donors, not suffering from a neurologic disorder while alive, were provided to us by the UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank as previously described [21] (http://www.ukmstissuebank.imperial. ac.uk). These were collected after informed donor consent approved by the UK Ethics Committee (08/MRE09/31). Tissues had been frozen, unfixed or fixed (in 4% PFA for a minimum of 4 h), cryo-protected in 30% sucrose/PBS and stored at - 80 °C. Sequential cryostat sections of 10-µm thickness from frontal, parietal and temporal lobes were obtained and processed for immunofluorescence (IF).

Double Immunofluorescence Staining

Brain sections were fixed in acetone for 8 min. Non-specific binding sites were blocked at RT for 40 min in 5% BSA in 0.5% Triton x-100 PBS and then incubated at 4 °C for 18 h with rabbit primary antibodies recognizing either the hGDH1 or hGDH2 protein and with mouse primary antibodies for NEUN or GFAP. After three washes in PBS, incubation with fluorescence-labeled secondary antibodies was performed with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody followed by Streptavidin FITC or goat anti-mouse Alexa Fluor 555 secondary antibody. Nuclei were visualized with TOPRO. Images were obtained using a Leica Confocal microscope.

Results

Generation of GLUD2 Transgenic Mice

Two lines of *GLUD2* transgenic mice (T13 and T32), constructed independently, were obtained. Similar breeding rates were observed between the Tg and control mice. Moreover, Tg mice from our two lines passed their developmental milestones at about the same time as their wild-type littermates. All studies described here were performed using male Tg mice and their male wild-type (Wt) littermates. No differences in physical health measures, food consumption, posture, physical condition of the fur and home cage behaviors, were detected between Wt and Tg animals. Also, irregular spontaneous behaviors such as excessive grooming, digging, rearing, or stereotypies were not different between the two groups.

Immunoblotting

Western blot analyses revealed that the anti-hGDH1 antibody recognized the endogenous mouse GDH1 (mGDH1) with the same affinity as with the hGDH1 (used as Standard), without recognizing the expressed hGDH2 (Fig. 1). These results are expected, as hGDH1 and mGDH1 are essentially identical, having been conserved via purifying selection. Conversely, our anti-hGDH2 antibody recognized the expressed hGDH2 protein without interacting with the endogenous mGDH1 enzyme. Immunoblots of brain extracts revealed that hGDH2 is expressed in all CNS regions of the Tg mice studied and that this expression did not affect the levels of the endogenous mouse GDH1 (Fig. 1, upper panel). Analyses of brain extracts from our two Tg lines by WB yielded similar results.

Double Immunofluorescence

IF experiments, using cerebral cortical tissue from the *GLUD2* Tg mice, revealed a dense hGDH2-specific expression in the neuropil, where it co-localized with GFAP (Fig. 2a–c). Specifically, hGDH2-specific punctate-like stain was detected in GFAP-positive astrocytes and their processes (Fig. 2a–c). As previously described for human brain [20, 21], the endogenous GDH1 mouse enzyme was also co-expressed in astrocytes (data not shown). Examination of human cortical sections by IF also revealed a dense hGDH2-specific expression in the neuropil, where it co-localized with GFAP (Fig. 2d–f). As shown in Fig. 2d–f, human astrocytes, labelled by the anti-hGDH2 and anti-GFAP antibodies are substantially larger and exhibit a much greater degree of arborisation than mouse astrocytes. In addition, the anti-hGDH2 antibody labelled a subpopulation of large cortical



Fig. 1 *GLUD2* expression in the central nervous system of Tg mice. Immunoblots were performed in brain extracts from 6-month old male Tg32 and Wt mice. Tissue extracts (50 μ g protein) from various CNS regions were run on a 8.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the primary antihGDH1 or anti-hGDH2-specific antibody (dilutions 1:5000 and 1:2000 respectively). Proteins bands were visualised with the use of the ChemiLucent Detection System kit (Chemicon), Recombinant human GDH1 and GDH2 were used as standards. *GLUD2* Tg mice show specific hGDH2 expression in spinal cord (SC), cerebellum (CER), cerebral hemispheres (HEM) and olfactory bulb (OB). The endogenous mouse GDH1 is detected at comparable levels in all brain regions of both Tg and Wt mice. WB analyses of the CNS from the second (T13) transgenic line yielded similar findings



Fig. 2 hGDH2 expression in cerebral cortical astrocytes. IF images of snap frozen fixed brain sections from the cerebral cortex of a 6-month old male *GLUD2* Tg13 mouse (**a**–**c**) and of a neurologically normal human subject (**d**–**f**) immunostained with a mouse monoclonal antibody against GFAP (1:2000; red) and our rabbit anti-hGDH2 specific antibody (1:2000; green). In both tissues there is punctate-like GDH2-specific immunoreactivity in the perinuclear cytoplasm and

neurons with pyramidal morphology, with hGDH2-positive "puncta" observed in the peripheral cytoplasm of these neurons (Fig. 3a-c, e, f). These structures are similar to hGDH2positive "puncta" observed on the cytoplasmic membrane of human cortical neurons (Fig. 3g-i) and may represent clusters of hGDH2-positive mitochondria in presynaptic nerve terminals [21]. As shown in Fig. 3j–l, the periphery of a large hGDH2-positive neuron was delineated by GFAP-specific staining of astrocytic processes enwrapping excitatory synapses [21]. In this neuron, large "puncta" lie in close proximity (but do not co-localize with) to the GFAP positive structures on the cell membrane (Fig. 3j-l). In contrast, the hGDH1 antibody did not label any neurons of the host mouse brain. These results accord those obtained in human brain, which showed that cortical neurons are devoid of hGDH1-specific expression [21].

Implications of the Expressional GLUD2 Adaptation

The present morphological studies on *GLUD2* Tg mice revealed that expression of hGDH2 in the host brain is very similar to that of human brain. This involves dense

along the proximal and distal processes of GFAP-positive astrocytes. Human astrocytes are larger showing more extensive arborization than mouse astrocytes. These results are consistent with previous observations on human brain [20, 21]. Similar results were obtained using brain tissue from the Tg32 line. Images obtained using a Leica confocal microscope (×40). (Color figure online)

expression in the perikaryon of astrocytes and their processes and in the peripheral cytoplasm of large cortical neurons of pyramidal morphology. In these neurons, large hGDH2 "puncta" that may represent clusters of hGDH2-positive mitochondria of pre-synaptic nerve endings, were found on the cell membrane in close proximity to GFAP-labeled labeled astrocytic structures. In contrast, the endogenous GDH1 was expressed only in astrocytes. As shown here, human astrocytes are larger than the host mouse astrocytes and exhibit increased arborisation. These results accord observations by Oberheim et al. [24] showing that human protoplasmic astrocytes are 2.6-fold larger in diameter and extend tenfold more GFAP-positive primary processes than rodent astrocytes. There is increasing evidence that astrocytes are involved in synaptic transmission and plasticity, including LTP emergence and maintenance [25].

As we have obtained comparable morphological data on both of our Tg lines (T13 and T32), the present findings cannot be attributed to alterations of the mouse genome induced by the random (stochastic) insertion of the human DNA segment. Because our Tg mice were constructed using a segment of the human X chromosome that contains the *GLUD2*



Fig. 3 hGDH2 expression in cerebral cortical neurons. IF images of snap frozen fixed cerebral cortical sections from a 6-month old male *GLUD2* Tg13 mouse (**a**–**c**) and a 6-month old male *GLUD2* Tg32 mouse (**d**–**f**) immunostained with a mouse monoclonal antibody against NeuN (1:400; red) and our rabbit antiserum against hGDH2 (1:2000; green). **g**–**I** IF images of unfixed human cerebral cortical sections from a neurologically normal male subject obtained using the same protocol. There is punctate hGDH2-specific immunoreactivity in the peripheral cytoplasm of large NEUN-positive neurons of Tg13 (arrow) and Tg32 mice cerebral cortex, and of human cerebral. Blue staining in C represents TOPRO labelled nuclei. Images

gene and its regulatory elements, the observed cellular distribution of hGDH2 in the host brain represents an expressional adaptation driven by the gene's new promoter. Under the influence of this promoter, the duplicated *GLUD2* gene may have diversified its roles in human brain and perhaps in other tissues where is expressed. While the precise role(s) of obtained using a Leica Confocal microscope (×80). **j–l** Composite figure of superimposed consecutive confocal images of unfixed human cortex immunostained with a mouse antibody against GFAP (1:2000; red) and our rabbit antiserum against hGDH2 (1:2000; green). As shown here, the periphery of a large hGDH2-positive neuron is delineated by GFAP-positive astrocytic-end feet enwrapping excitatory synapses on the cell membrane. These lie in close proximity (but do not co-localize with) to large hGDH2-specific "puncta" that may represent clusters of hGDH2-positive mitochondria of presynaptic nerve terminals as previously described [21]. Figures **g–l** are reproduced with permission from [21]. (Color figure online)

hGDH2 in brain remain to be better understood, endowment of human cortical astrocytes and some of pyramidal neurons and their terminals with enhanced glutamate metabolizing capacity by hGDH2 expression is thought to strengthen cortical excitatory transmission [21]. Previous studies have shown that transgenic expression of GDH1 in the neurons of Tg mice increases pre-synaptic glutamate release [26, 27]. In addition to this expressional diversification, *GLUD2* underwent rapid sequence adaptation acquiring novel properties that include resistance to GTP control and development of a novel mechanism for activity regulation. These major functional adaptations permit enhanced hGDH2 function in the nervous system, where GTP levels are greater than those found in other tissues. Given the observed close similarities between the animal and the human brain in hGDH2 expression, the *GLUD2* Tg mice are expected to serve as a useful model for studying the role of this novel, positively selected, gene in human evolution.

The thesis that *GLUD2* is a functional, non-redundant, human gene is supported not only by its unique expressional and functional profile, by also by extensive sequencing data involving > 1000 normal humans of diverse genetic background showing that the gene did not accumulate any disabling mutations, as typically seen in pseudogenes [28]. Also, highly consistent sequence data have been obtained in over a 1000 subjects of diverse genetic background affected by neurodegenerative disorders. However, a rare normal polymorphism (Leu445Ser) interacted significantly with age at disease onset in Parkinson's disease patients [28]. These results accord phylogenetic data showing that the structure of the human *GLUD2* gene has been preserved by purifying selection [15].

Functional and Molecular Adaptation of GLUD2

Functional Properties of the Ancestral Glutamate Dehydrogenase 1

Mammalian housekeeping GDH1 catalyzes the reversible conversion of glutamate to α -ketoglutarate and ammonia while reducing NAD(P)⁺ to NAD(P)H. The enzyme shows dual co-enzyme specificity, being able to utilize either NAD⁺ or NADP⁺ for catabolic and synthetic reactions, respectively [17]. Also, mammalian GDH1 is subject to strong allosteric regulation as described below. Structurally, mammalian GDH1 is a hexameric molecule composed of six identical subunits, each of which consists of 505 amino acids (molecular mass: ~56 kDa). Three functional domains have been identified: the NAD⁺ binding, the glutamate binding and the regulatory domain (Fig. 4a).



Fig. 4 Structural models and functional consequences of amino acid replacements in the regulatory domain of hGDH1. Shown in **a** is a cartoon diagram of human GDH in open conformation in the absence of ligands based on X-ray crystallographic data (PDB entry ILIF) showing the three functional domains of the enzyme. For simplicity only two of the six subunits (painted in different color). The regulatory domain consists of "antenna" and the "pivot helix". The antenna is composed of an ascending alpha-helix and a descending random coil that terminates in a small alpha-helix (**a**, **b**). The antennas of adjacent subunits are intertwined mediating allostery [29]. Interaction of Ser409 in the ascending alpha-helix with Arg443 in the small N terminal a-helix in the wild-type hGDH1 permits the enzyme to maintain basal activity (-activator) that is 30–40% of maximal and to be stimulated by L-leucine (4.5 mM) and ADP (1.0 mM) (**b**). The Ser409-Arg443 interaction is affected in the wild-type hGDH2

via the evolutionary substitution of Ser for Arg-443. This results in major functional consequences as described in the text. As shown in **b** replacement of Ser409 by Arg (S409R-1) results in loss of basal activity (-activator) and abrogation of L-leucine stimulation. Also, replacement of Arg443 by Ser (R443S-1) resulted in similar functional consequences, while a swap mutant (S409R-1/R443S-1) restored basal activity and regulation. Molecular dynamics simulation predicted that Ser409 and Arg443 (as in wild type hGDH1) come in close proximity in the open conformation and that introduction of Ser443 (as in the wild-type hGDH2) or of Arg409 (in the S409-R-1 mutant) causes them to separate with the swap mutant re-instating this proximity [30]. The cartoon diagrams were created using the PolyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4, Schrodinger, L.L.C. Fig. 4b reproduced with permission from [30]. (Color figure online)

The latter consists of the pivot helix and the "antenna", a 48 amino acid-long structure composed of an ascending α -helix, a random coil and a small C-terminal α -helix (Fig. 4a, b). The antennas of adjacent subunits are intertwined with this subunit communication thought to mediate allosteric regulation [29]. Mastorodemos et al. [30] recently showed that interaction between Ser409 in the ascending α -helix of the antenna with Arg443 in the terminal small α -helix of the adjacent subunit is of importance for catalysis, regulation and pH dependency (Fig. 4b). It is of particular interest that this interaction was the target of the evolutionary adaptation of the *GLUD2* gene as described below.

There is increasing evidence that GDH1 functions both in the metabolism of neurotransmitter glutamate and in TCA cycle anaplerosis, as noted above. The neurotransmitter role is supported by immunohisto-chemical studies on rat brain showing that the enzyme is densely expressed in the mitochondria of astrocytes, the regional distribution of which corresponds to glutamatergic pathways [32]. In these glial cells, GDH1 attains very high levels (up to 10 mg/ml of mitochondrial matrix) [33], thus endowing these cells with high glutamate metabolizing capacity. The role of GDH1 in energy metabolism and in TCA anaplerosis is supported by several lines of evidence [34-38]. Specifically, astrocytes isolated from normal mice generated ATP on glutamate exposure in a GDH1-dependent manner [35], while astrocytes from mice with brain-specific deletion of Glud1 exhibited deficient glutamate oxidation and handling [36]. Also, siRNA knock down of GDH1 in cultured astrocytes was associated with a dysfunctional TCA cycle [37].

In spite of high GDH1 expression levels, early observations on cultured astrocytes showed little glutamate flux through this pathway [39], suggesting that the enzyme is highly regulated in vivo. In this regard, previous in vitro studies on GDH1, purified from various sources, had established that the enzyme is subject to strong allosteric regulation, with chemically diverse compounds (ADP, GTP, NADH, L-leucine, steroid hormones and neuroleptic agents) found to influence its velocity [17]. GTP, generated by TCA cycle, serves as the main negative modulator, whereas ADP as the main endogenous activator. As a result, GDH1 function is thought to depend primarily on the opposing actions of ADP and GTP. This energy sensing mechanism, permits glutamate flux through this pathway according to cellular energy requirements [17, 31]. Thus, under conditions of adequate energy charge, associated with low ADP levels, GTP generated by an active TCA cycle exerts a powerful inhibitory effect on GDH1. In contrast, when low energy states prevail, GTP levels decrease while those of ADP increase allowing glutamate to fuel the TCA cycle [31].

Evolutionary Adaptation of Glutamate Dehydrogenase 2

As noted above, after achieving expression in the nerve and other tissues, GLUD2 evolved rapidly by adapting to the particular needs of these tissues. The cloning of GLUD2 gene [16] and the ancestral housekeeping GLUD1 gene [40], allowed us to study pure hGDH2 and hGDH1 enzymes obtained in recombinant form. When assayed in the presence of 1.0 mM ADP, both hGDH1 and hGDH2 showed comparable catalytic activities and kinetic properties (Vmax and Km for α -ketoglutarate, NADPH and ammonia) [41]. However, hGDH2 differed markedly from hGDH1 in its regulation profile. Thus, while hGDH1 is potently inhibited by GTP, hGDH2 is resistant to this compound [41]. By dissociating its function from GTP control, hGDH2 permits glutamate flux independently of the rate of GTP production by the TCA cycle. However, to prevent unregulated activity from perturbing cell metabolism, hGDH2 downregulated its basal activity while remaining remarkably responsive to activation by ADP/L-leucine. Thus, physiological levels of ADP (0.05-0.25 mM) induced a proportionally greater enhancement of hGDH2 (up to 1300%) than of hGDH1 (up to 150%) activity. Similarly, L-leucine activated hGDH2 by 1600% and hGDH1 by 75% [31]. While L-leucine concentrations required for this activation (5-10 mM) are substantially higher than those found in mammalian tissues, low concentrations of ADP (0.01-0.05 mM) permitted enzyme activation by physiologically relevant levels of L-leucine (synergistic effect) [31]. Also, hGDH2 is more sensitive than hGDH1 to inhibition by steroid hormones, spermidine and neuroleptic agents [42, 43]. In addition, hGDH2 shows a lower optimal pH than hGDH1 [41], an adaptation that may facilitate enzyme function under conditions of acidification that prevail in astrocytes following transmitter glutamate uptake [44].

To understand the role of these amino acid replacements in hGDH2 function, we carried out mutagenesis studies on the GLUD1 gene at sites that underwent evolutionary change in GLUD2. As hGDH2 differs from hGDH2 primarily in its regulation profile, our initial efforts were concentrated on the regulatory domain of the protein. Two changes located in the "antenna" (M415L and R443) and another two in the "pivot helix" (G456A and R470V) were studied. Results revealed that substitution of Ala for Gly456 in hGDH1 made the enzyme markedly resistant to GTP inhibition without altering its catalytic properties [45]. On the other hand, replacement of Arg443 by Ser in hGDH1 diminished basal activity, abrogated activation by L-leucine and provided sensitivity to steroid hormones and neuroleptic agents [42, 43, 46]. In addition, the Arg443Ser mutation made hGDH1 thermo-sensitive, concentration-dependent and shifted its migration in SDS-PAGE and its optimal pH from 8.0 to 7.0

[46]. Molecular modeling suggested that Arg443Ser interrupts hydrogen bonds between the 443 residue (in the small helix of the descending part of the antenna) of one monomer and the 409 residue (in the ascending helix of the antenna) of the opposing monomer leading to closed enzyme conformation [30] (Fig. 4b). The Arg443Ser mutation, however, does not disrupt the tertiary structure of the protein as revealed by native gradient PAGE analyses, which showed that the molecular weight of the Arg443Ser mutant (360 kDa) is comparable to that of the wild-type hGDH1 and wild-type hGDH2 [47]. This molecular size is consistent with the hexameric structure of these proteins. Although the Arg443Ser substitution was a crucial event in GLUD2 evolution, its introduction in hGDH1 as single mutant is too disruptive, rendering the mutant enzyme non-functional. Hence, other amino acid substitutions, acquired during hGDH2 evolution, must act in concert to moderate the functional consequences of Arg443Ser. Indeed, additional evolutionary substitutions, acquired by *GLUD2* evolution, are shown to affect hGDH2 function (Fig. 5), thus providing its unique functional properties.

In sharp contrast to the evolutionary adaptation of *GLUD2*, the housekeeping *GLUD1* gene has been conserved via strong purifying selection. Indeed, *GLUD1* accumulated no amino acid substitutions after the duplication event. As a result, alignment of the human *GLUD1* sequence with mouse, rat or bovine Glud1 sequences reveals less divergence than alignment of *GLUD1* with the *GLUD2* sequence.

Molecular Evolution of GLUD2 in the Ape Lineages

Phylogenic evidence suggest that the Arg443Ser and Gly456Ala evolutionary mutations occurred soon after the birth of the *GLUD2* gene, along with the Glu34Lys, Asp142Glu, Ser174Asn and Asn498Ser changes (Fig. 5). These are thought to be under positive natural selection



Fig. 5 Evolutionary amino acid substitutions acquired by hGDH2 and their functional consequences. Shown here is evolutionary adaptation of the *GLUD2* gene on the ape lineages. Mya: approximate divergence in millions of years. As shown here, evolutionary substitution of Ala for Gly456 made hGDH2 resistant to GTP, thus dissociating its function from this energy switch. On the other hand, evolutionary

substitution of Ser for Arg443 diminished basal activity, abrogated L-leucine sensitivity and shifted the optimal pH from 8.0 to 7.0. The drastic effects of the Arg443Ser change are modified by the opposing action of the Arg39Gln, Ser174Asn Met370Leu and Gly456Ala evolutionary changes, thus providing the unique functional properties of the wild-type hGDH2. Reproduced with permission from [48]

[15]. Moreover, the Ser331Thr, Met370Leu and Arg470His mutations, which occurred just before the separation of the human from the orangutan lineage (Fig. 5), may have also been positively selected [15]. As shown in Fig. 5, five amino acid changes occurred in the orangutan lineage after its separation from the common ancestor of the gorilla, chimpanzee and human. Also, four amino acid changes occurred in the gorilla lineage after its split from the common ancestor of the humans and chimpanzees. Additionally, since the human and the chimpanzee lineages diverged about 4.6-6.2 million years ago, two amino acid changes occurred in the human lineage (one was a recurrent mutation) and two changes occurred in the chimpanzee lineage (Fig. 5). As a result, the chimpanzee GDH2 differs from the human by four amino acid residues, whereas the gorilla and orangutan GDH2 differ from the hGDH2 and chimpanzee GDH2 by 6 and 10 amino acid residues, respectively. Also, gorilla GDH2 differs from orangutan GDH2 by 12 amino acid changes. These phylogenetic data accord evidence that molecular evolution rates were slower in humans and chimpanzees than in gorillas and orangutans, probably due to longer generation times and improved mechanisms of DNA repair and genome integrity maintenance [8]. In addition, the cleavable mitochondrial targeting sequence (MTS) of hGDH2 evolved under positive selection acquiring a higher positive charge than that of hGDH1 [49]. Whether this enhanced mitochondrial targeting of hGDH2 facilitates the import of the protein into astrocytic mitochondria, the inner membrane potential of which is lower than that of hepatic cells [50], it remains to be further studied.

Putative Role of *GLUD2* in Human Brain Development

Whereas, humans and chimpanzees share 98% of their DNA sequence [51, 52], human brain is larger and shows a greater degree of complexity. Also, a substantial expansion of interneuronal connections and a formation of new neuronal circuits occur early in human post-natal life [1]. Phylogenetic data suggest that genesis and adaptation of the GLUD2 gene coincided with the time period of increased structural and functional complexity of ape brain (Fig. 6), suggesting that the novel gene contributed to these processes [15]. That GLUD2 may have helped the divergence of humans from the chimpanzees, is supported by data showing that human newborns have higher levels of expression of GLUD2 than chimpanzee newborns [4]. Moreover glutamate levels are lower in the human brain than in non-human primates indicative of an increased glutamate turnover [4]. While the mechanisms underlying these changes have not been understood, endowment of human cortical astrocytes and neurons with GLUD2 expression could have played a role by providing these cells with a non-redundant pathway for enhancing glutamatergic



Fig. 6 Schematic representation of GDH evolution from prokaryotes to lower eukaryotes, animals and the great apes. Yellow boxes display the appearance of major allosteric characteristics. As shown here, the antenna first emerged in the Ciliophora, enabling enzyme activation by ADP and partial inhibition by fatty acids. However, the GDH of ciliates is not sensitive to activation by L-leucine or inhibition by GTP inhibition [54]. In subsequent evolutionary steps, GDH1 acquired additional properties linking enzyme function with energy metabolism [55]. The novel hGDH2 isoenzyme was born through retropositioning in the hominoid ancestor and evolved in the ape linages. It underwent rapid evolutionary adaptation concomitantly with brain expansion and acquisition of unique traits. It is likely that emergence and evolution of GLUD2 resulted from selective pressures on the genome that probably relate to the increased glutamatergic transmission demands of the expanding ape brain. Evolution of GDH1 regulation in Ciliates and in Vertebrates has been described by Allen et al. [54] and Banerjee et al. [55] respectively. (Color figure online)

mechanisms and TCA cycle efficiency. Whether *GLUD2* adaption has contributed to the high neuronal activity and energy consumption that characterize the human brain [4] or even to cognitive human abilities remains to be further investigated. As *Glud1* is one of genes upregulated during memory formation in the rat [53], it is likely that emergence and evolution of *GLUD2* has resulted from selective pressures on the genome related to the expanding role of glutamatergic transmission in ape brain.

Evidence favoring a role of GLUD2 in human brain development was recently provided by Li et al. [56] who generated independently GLUD2 transgenic mice by inserting in their genome the above described BAC clone containing the GLUD2 gene and its regulatory elements. Large scale analyses of polyA-plus RNA isolated from the brain of these mice revealed that the developmental expression trajectory of GLUD2 in Tg mouse brain was distinct from that of *GLUD1*, but it was strikingly similar to the developmental expression trajectory of GLUD2 in human PFC [56]. The differential effects of the *GLUD2* gene were mostly prominent during early post-natal development, affecting the expression of several genes, some of which encode transcription factors involved in neural development. A large divergence (between the GLUD2 Tg and the wild-type mice) was detected in the developing PFC with these changes being similar to those that distinguish human from macaque brain [56]. Moreover, metabolomic analyses revealed that GLUD2 expression affected pathways surrounding the TCA cycle. Li et al. [56] accordingly concluded that a non-redundant GLUD2 metabolic function supports early brain development. The authors further hypothesized that, since hGDH2 function in isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutant glioma cells (see below) provides α -ketoglutarate for the oxidative generation of citrate through the TCA cycle, *GLUD2* may influence early brain development by promoting the synthesis of lipids [56].

Obviously, these important observations raise a number of issues: First, shunting of glutamate-derived carbons via GLUD2 to citrate synthesis, as observed in IDH1 mutant glioma, represents a metabolic reprogramming of neoplastic cells (needed for their survival), necessitated by the inability of the mutant IDH1 to synthesize α -ketoglutarate from isocitrate [57]. Whether this pathway is activated in developing human brain expressing the wild-type (non-mutant) IDH it remains to be established. As shown in Fig. 7, oxidative deamination of glutamate α -ketoglutarate by GDH1/2 enhances the bioenergetic and biosynthetic function of the TCA cycle, leading to formation of several compounds of importance for cell growth. Moreover, dividing cells need to maintain high levels of α -ketoglutarate required by the nuclear α-ketoglutarate ketoglutarate-dependent dioxygenases [58]. Efforts to explain the observed biological effects of GLUD2 on the basis of its metabolic functions should take into consideration the specificity of the GLUD2 related changes for the prefrontal lobe.

Second, the high non-redundant activity of *GLUD2*, detected during the early post-natal period, coincides with



Fig.7 The GDH pathway and TCA cycle function. Oxidative deamination of glutamate by hGDH1 and hGDH2 generates α -ketoglutarate, ammonia and NADH or NADPH. α -ketoglutarate enters the TCA cycle enhancing its bio-energetic and biosynthetic functions. GTP, synthesized at the succinyl-CoA/succinate step, serves as a potent inhibitor of hGDH1. This control links hGDH1 function to the rate of the TCA cycle. On the other hand, hGDH2 can operate independently of GTP control and therefore of TCA cycle rate. Both enzymes are activated by ADP and L-leucine (acting synergistically), with this activation being proportionally greater for

hGDH2 than hGDH1 [41]. Fumarate, generated after succinate, can stimulate glutathione peroxidase 1, thus contributing to homeostasis against oxidative stress [59]. As shown here, α -ketoglutarate metabolism via the TCA cycle can boost lactate production [60]. Also, citrate, generated by the TCA cycle can support the biosynthesis of lipids. Lastly, NADPH resulting from glutamate oxidation can be used for various biosynthetic reactions requiring reducing equivalents [61]. There is evidence that glutamate flux through hGDH1/2 is used by different cells to serve some of their unique functions [61]. Reproduced from [17]

the burst of synaptogenesis and new nerve circuit formation, processes mediated by transmitter glutamate. Indeed previous studies have shown that NMDA glutamate receptor activation and Ca²⁺ influx is crucial to neurogenesis, survival of neurons, neuronal migration and synapse formation [27, 62–65]. Nissen et al. [37] grew astrocytes from the brain of 7 day old Tg mice, constructed by Li et al. [56], expressing GLUD2 and found that these cells had an increased capacity for uptake and oxidative metabolism of glutamate, particularly during intense glutamatergic activity and glucose deprivation. It is well established that strong glutamatergic stimulation, induced by high-frequency stimuli, results in potentiation of synaptic responses or long-term potentiation (LTP) [6, 7]. As such, the ability of hGDH2 to support intense glutamatergic activity suggests an important role of the new enzyme in brain plasticity. Hence, given the complexities of the metabolic pathways served by GLUD2 as well as the complexities of the developmental processes influenced by neurotransmitter glutamate, identifying the mechanisms by which a highly activated GLUD2 promotes the early postnatal development and the human-specific differentiation of PFC represents challenging experimental question.

Evolutionary Adaptation *GLUD2* Confers hGDH2 a Non-redundant Glioma IDH1 Promoting Property

Since the pioneering work of Warburg demonstrating that cancer cells use alternate pathways to compensate for lack of nutrients or oxygen, metabolic reprogramming has been recognized as the defining characteristic of these cells. Thus, when glucose supply is limited, glutaminolysis is activated generating glutamate. This is turn is converted (either by GDH1/2 or by GOT1/2) to α -ketoglutarate which enters the TCA cycle providing anabolic carbons for the biosynthesis of amino acids, nucleotides and lipids, in addition to leading to ATP synthesis [57]. There is increasing evidence that oxidative deamination of glutamate by GDH (rather than transamination by GOT) is the main pathway for α -ketoglutarate production with up-regulation of hGDH1/2 expression shown to occur in various cancers, including gliomas [66]. Recently, somatic mutations in IDH1, an enzyme that inter-converts isocitrate to α -ketoglutarate, were identified in the vast majority (70-90%) of low grade glioma and secondary glioblastoma multiform [67]. The IDH mutants aberrantly reduce α -ketoglutarate to D-2-hydroxyglutarate, which accumulates at high concentrations in glioma cells acting as oncometabolite [67]. Because the IDH mutants cannot convert isocitrate to α -ketoglutarate, glioma cells upregulate alternative metabolic pathways, including hGDH1 and hGDH2 [66]. Chen et al. [68] showed that over expression of GLUD2 (but not GLUD1) promoted tumor expansion in IDH1 mutant glioma. Labeling studies further revealed that glutamate flux through hGDH2 provides α-ketoglutarate for oxidative generation of citrate through the Krebs cycle [68]. More recently, Waitkus et al. [69] showed that hGDH2 expression non-redundantly increases several TCA cycle substrates (including α -ketoglutarate, citrate and aconitate) through glutamate-dependent anaplerosis [69]. Importantly, using site directed mutagenesis the authors showed that the two evolutionary substitutions (Arg443Ser and Gly456Ala) in the regulatory domain of hGDH2 that provide novel functional properties to hGDH2 (as described above) conferred the glioma-supporting ability of hGDH2 [69]. Specifically, when Ser443 and Ala456 were mutated back to Arg443 and Gly456, the effect on glioma growth was attenuated. As such, the ability of hGDH2 to supply TCA substrates in glioma cells, a process disrupted by IDH1 mutations, is conferred by the adaptive evolution of the allosteric domain of hGDH2. This property is not shared by hGDH1. These observations on a neoplastic system that requires a high glutamate flux confirms the above described model according to which, while hGDH1 function is subject to control by GTP generated by the TCA cycle, hGDH2 is freed of this control owing to the Arg443Ser and Gly456Ala evolutionary amino acid changes.

The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Species Evolution

The GDHs of Prokaryotes and Lower Eukaryotes

The GDH pathway is present in all domains of life. Study of early life forms revealed that GDHs from different species are involved in two metabolic pathways: one in glutamate catabolism (generally NAD⁺-dependent, EC 1.4.1.2) and another in ammonia assimilation (generally NADP⁺-dependent, EC 3.4.1.4). In Pseudomonas aeruginosa and Neurospora crassa tetrameric ("catabolic") and hexameric ("anabolic") GDH forms exist [70] that acquired NAD⁺ or NADP⁺ specificity through independent evolutionary processes [71]. In the yeast Saccharomyces cerevisiae, two NADP-specific (ScGDH1 and ScGDH3) and one NAD⁺-specific (sGDH2) isoforms, all of which are extra-mitochondrial, have been described [72]. The NAD⁺-specific enzyme (sGDH2) functions in the oxidative deamination of glutamate, while the NADP⁺-specific isoforms (ScGDH1 and ScGDH3) in glutamate synthesis under either fermentative or respiratory conditions [73]. The ScGDH3 and ScGDH1 genes arose from whole genome duplication and evolved under selective pressure to sustain glutamate production under different metabolic conditions [74]. In lower eukaryotes, cytosolic, nuclear and mitochondrial localizations have been reported [75]. In plants, the catabolic NAD⁺-specific GDH isoform that localizes to the mitochondria predominates [76]. However, in the presence of high ammonium concentrations, enzyme activity is detected in the cytosol. On the other hand, low activities of NADP⁺-depended GDHs have been demonstrated in a range of higher plants, including *Arabidopsis* and *Oryza*. These NADP⁺-specific GDHs localize to the chloroplasts, probably involved in the assimilation of the photo-respiratory NH3 into glutamate [77]. In prokaryotes and lower eukaryotes GDH activity is not regulated, with regulation being accomplished at the transcription level.

The Animal GDHs

In contrast to prokaryotes and lower eukaryotes in which GDH exists in distinct NAD⁺ and NADP⁺-specific forms, most animals possess a single GDH with dual co-enzyme specificity, the activity of which is subject to strong regulation as noted above. There is evidence that this regulation evolved concomitantly with the evolution of the antenna thus enabling control of GDH activity according to the cell's energy needs (Figs. 4, 6). The antenna first appeared in ciliates, permitting a primitive regulation of GDH in these protozoans by fatty acids and coinciding with a gradual transfer of fatty acid oxidation from peroxisomes to mitochondria [54, 55]. Control of enzyme activity by Palmitoyl CoA is retained in mammalian GDH [17]. Moreover, further evolution of the antenna equipped mammalian GDH1 with a sophisticated allosteric regulation profile as noted above. Interestingly, evolutionary adaptation of the novel hGDH2 isoenzyme that first appeared in the apes targeted the regulatory domain of the enzyme as described above. During animal evolution oxidative metabolism was transferred to the mitochondria with mammalian GDH having acquired a MTS needed for import of the enzyme into the mitochondrial matrix [78, 79]. The use of the yeast mitochondria import system, in conjunction with studies on mammalian cell lines, permitted detailed structure/function investigations of the MTS of hGDH1 and hGDH2. These studies revealed that the 53 amino acid long MTS represents a highly efficient mitochondrial import system. This is due to the positive charge and to a complex interplay between two amphipathic α helices predicted by these pre-sequences [79]. Although all mammals possess a single GDH (hGDH1 in the human) humans and other great apes have acquired through duplication a novel hGDH2 isoenzyme with distinct regulation and tissue expression profile as noted above. Phylogenetic evidence suggests that this duplication event occurred in the hominoid ancestor and as such is found in all members of the hominoid radiation (Figs. 5, 6). As described above, all mammals except for the apes possess a single GDH-specific gene (GLUD1 in the human) that appears to suffice for their metabolic needs. Deletion of the single *Glud1* in mice was found to alter energy metabolism without affecting glutamatergic transmission, suggesting that in the absence of GDH1 alternative metabolic pathways or mechanisms compensate allowing glutamatergic

transmission to proceed. This is consistent with the model described above that hGDH1 function is essentially controlled by GTP which acts as an energy switch.

Future Perspectives

As detailed here, GLUD2 is a novel human gene that, driven by positive selection, underwent rapid evolutionary adaptation concomitantly with neocortical brain expansion. Its emergence may thus reflect selective pressures on the genome arising from increased primate brain demands in glutamatergic transmission and energy metabolism. As hGDH2 functions mainly during intense excitatory transmission (needed for LTP formation), the novel gene may have enabled the glutamatergic signaling pathway to amplify its role in synaptic plasticity and cognitive processes. These exciting possibilities and whether GLUD2 evolution has provided humans with a genetic/molecular basis for expanding experience-dependent formation of new neural circuits remain to be further investigated. Additional morphological, neurochemical and electrophysiological investigations, using this Tg model, are expected to shed light on these important questions. A crucial experimental aim is to evaluate whether transgenic expression of the human gene modulates long-lasting modification of excitatory synapses (LTP) and structural plasticity (dendritic spine density). Moreover, the animal model can be used to test whether brain areas involved in cognitive functions are specifically targeted by GLUD2 expression and whether this is associated with behavioral changes. Lastly, as there is increasing evidence that astrocytes can modulate LTP dynamics (formation and maintenance), the Tg model may prove useful to investigate whether adaptation in the astrocytic metabolism, induced by hGDH2 expression, affects synaptic transmission and plasticity. Understanding the precise role of the novel gene in human evolution and brain biology represents a challenging and exciting endeavor expected to yield useful information.

Acknowledgements We are grateful to Stavros Drouboyiannis, Kostantina Mylonaki, Kostantina Aggelaki, Lambros Mathioudakis, Mara Bourbouli and Irene Skoula for their help in these studies.

Funding This work was supported by the European Union (European Social Fund-ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)- Research Funding Program: THALIS-UOA, Title "Mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease" Grant Code (70/3/11679).

References

 Bianchi S, Stimpson CD, Bauernfeind AL, Schapiro SJ, Baze WB, McArthur MJ, Bronson E, Hopkins WD, Semendeferi K, Jacobs B, Hof PR, Sherwood CC (2013) Dendritic morphology of pyramidal neurons in the chimpanzee neocortex: regional specializations and comparison to humans. Cereb Cortex 23(10):2429-2436

- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR (2006) Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA 103(37):13606–13611
- Grossman LI, Schmidt TR, Wildman DE, Goodman M (2001) Molecular evolution of aerobic energy metabolism in primates. Mol Phylogenet Evol 18(1):26–36
- Fu X, Giavalisco P, Liu X, Catchpole G, Fu N, Ning ZB, Guo S, Yan Z, Somel M, Paabo S, Zeng R, Willmitzer L, Khaitovich P (2011) Rapid metabolic evolution in human prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA 108(15):6181–6186
- Caceres M, Lachuer J, Zapala MA, Redmond JC, Kudo L, Geschwind DH, Lockhart DJ, Preuss TM, Barlow C (2003) Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. Proc Natl Acad Sci USA 100(22):13030–13035
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. Trends Neurosci 16(12):521–527
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. Physiol Rev 84(1):87–136
- Goodman M, Sterner KN (2010) Colloquium paper: phylogenomic evidence of adaptive evolution in the ancestry of humans. Proc Natl Acad Sci USA 107(Suppl 2):8918–8923
- Gomez-Robles A, Hopkins WD, Schapiro SJ, Sherwood CC (2015) Relaxed genetic control of cortical organization in human brains compared with chimpanzees. Proc Natl Acad Sci USA 112(48):14799–14804
- Muntane G, Horvath JE, Hof PR, Ely JJ, Hopkins WD, Raghanti MA, Lewandowski AH, Wray GA, Sherwood CC (2015) Analysis of synaptic gene expression in the neocortex of primates reveals evolutionary changes in glutamatergic neurotransmission. Cereb Cortex 25(6):1596–1607
- Varki A, Altheide TK (2005) Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. Genome Res 15(12):1746–1758
- 12. Biswas S, Akey JM (2006) Genomic insights into positive selection. Trends Genet 22(8):437–446
- O'Bleness M, Searles VB, Varki A, Gagneux P, Sikela JM (2012) Evolution of genetic and genomic features unique to the human lineage. Nat Rev Gen 13(12):853–866
- Nielsen R, Bustamante C, Clark AG, Glanowski S, Sackton TB, Hubisz MJ, Fledel-Alon A, Tanenbaum DM, Civello D, White TJ, Adams JJS, Cargill MD M (2005) A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. PLoS Biol 3(6):e170
- Burki F, Kaessmann H (2004) Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. Nat Genet 36(10):1061–1063
- Shashidharan P, Michaelidis TM, Robakis NK, Kresovali 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(24):16971–16976
- Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C (2017) The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. Biology 6(1):E11. https ://doi.org/10.3390/biology6010011
- Li WH, Yang J, Gu X (2005) Expression divergence between duplicate genes. Trends Gen 21(11):602–607. https://doi. org/10.1016/j.tig.2005.08.006
- Varki A (2004) How to make an ape brain. Nat Gen 36(10):1034–1036

- Spanaki C, Zaganas I, Kleopa KA, Plaitakis A (2010) Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. J Biol Chem 285(22):16748–16756
- Spanaki C, Kotzamani D, Kleopa K, Plaitakis A (2016) Evolution of GLUD2 glutamate dehydrogenase allows expression in human cortical neurons. Mol Neurobiol 53(8):5140–5148
- 22. Douni E, Alexiou M, Kollias G (2004) Genetic engineering in the mouse: tuning TNF/TNFR expression. Methods Mol Med 98:137–170
- 23. Rinotas V, Niti A, Dacquin R, Bonnet N, Stolina M, Han CY, Kostenuik P, Jurdic P, Ferrari S, Douni E (2014) Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice. J Bone Miner Res 29(5):1158–1169
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. J Neurosci 29(10):3276–3287
- 25. Paixao S, Klein R (2010) Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol 20(4):1–8
- 26. Bao X, Pal R, Hascup KN, Wang Y, Wang WT, Xu W, Hui D, Agbas A, Wang X, Michaelis ML, Choi IY, Belousov AB, Gerhardt GA, Michaelis EK (2009) Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: in vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. J Neurosci 29(44):13929–13944
- 27. Wang X, Patel ND, Hui D, Pal R, Hafez MM, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Michaelis EK (2014) Gene expression patterns in the hippocampus during the development and aging of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) transgenic and wild type mice. BMC Neurosci 15:37
- Plaitakis A, Latsoudis H, Kanavouras K, Ritz B, Bronstein JM, Skoula I, Mastorodemos V, Papapetropoulos S, Borompokas N, Zaganas I, Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Spanaki C (2010) Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. Eur J Hum Genet 18(3):336–341
- Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley CA (2002) The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. J Mol Biol 318(3):765–777
- Mastorodemos V, Kanavouras K, Sundaram S, Providaki M, Petraki Z, Kokkinidis M, Zaganas I, Logothetis DE, Plaitakis A (2015) Side-chain interactions in the regulatory domain of human glutamate dehydrogenase determine basal activity and regulation. J Neurochem 133(1):73–82
- 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(1-2):65-73
- 32. 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(2):305–318
- Rothe F, Wolf G, Schunzel G (1990) Immunohistochemical demonstration of glutamate dehydrogenase in the postnatally developing rat hippocampal formation and cerebellar cortex: comparison to activity staining. Neuroscience 39(2):419–429
- McKenna MC (2013) Glutamate pays its own way in astrocytes. Front Endocrinol 4:191
- 35. Karaca M, Frigerio F, Migrenne S, Martin-Levilain J, Skytt DM, Pajecka K, Martin-del-Rio R, Gruetter R, Tamarit-Rodriguez J, Waagepetersen HS, Magnan C, Maechler P (2015) GDH-dependent glutamate oxidation in the brain dictates peripheral energy substrate distribution. Cell Rep 13(2):365–375
- Frigerio F, Karaca M, De Roo M, Mlynarik V, Skytt DM, Carobbio S, Pajecka K, Waagepetersen HS, Gruetter R, Muller D, Maechler P (2012) Deletion of glutamate dehydrogenase 1 (Glud1) in the

central nervous system affects glutamate handling without altering synaptic transmission. J Neurochem 123(3):342–348

- Nissen JD, Pajecka K, Stridh MH, Skytt DM, Waagepetersen HS (2015) Dysfunctional TCA-cycle metabolism in glutamate dehydrogenase deficient astrocytes. Glia 63(12):2313–2326
- Nissen JD, Lykke K, Bryk J, Stridh MH, Zaganas I, Skytt DM, Schousboe A, Bak LK, Enard W, Paabo S, Waagepetersen HS (2017) Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. Glia 65(3):474–488
- Farinelli SE, Nicklas WJ (1992) Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. J Neurochem 58(5):1905–1915
- 40. Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N (1988) Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. Proc Natl Acad Sci USA 85(10):3494–3498
- 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(15):3398–3406
- Borompokas N, Papachatzaki MM, Kanavouras K, Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Plaitakis A (2010) Estrogen modification of human glutamate dehydrogenases is linked to enzyme activation state. J Biol Chem 285(41):31380–31387
- 43. Spanaki C, Zaganas I, Kounoupa Z, Plaitakis A (2012) The complex regulation of human glud1 and glud2 glutamate dehydrogenases and its implications in nerve tissue biology. Neurochem Int 61(4):470–481
- 44. Azarias G, Perreten H, Lengacher S, Poburko D, Demaurex N, Magistretti PJ, Chatton JY (2011) Glutamate transport decreases mitochondrial pH and modulates oxidative metabolism in astrocytes. J Neurosci 31(10):3550–3559
- 45. 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(29):26422–26428
- 46. Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M, Plaitakis A (2002) Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. J Biol Chem 277(48):46552–46558
- Zaganas I, Kanavouras K, Mastorodemos V, Latsoudis H, Spanaki C, Plaitakis A (2009) The human GLUD2 glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects. Neurochem Int 55(1–3):52–63
- Plaitakis A, Latsoudis H, Spanaki C (2011) The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease. Neurochem Int 59(4):495–509
- Rosso L, Marques AC, Reichert AS, Kaessmann H (2008) Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. PLoS Genet 4(8):e1000150. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.10001 50
- Matthews GD, Gur N, Koopman WJ, Pines O, Vardimon L (2010) Weak mitochondrial targeting sequence determines tissue-specific subcellular localization of glutamine synthetase in liver and brain cells. J Cell Sci 123(Pt 3):351–359
- Nowick K, Gernat T, Almaas E, Stubbs L (2009) Differences in human and chimpanzee gene expression patterns define an evolving network of transcription factors in brain. Proc Natl Acad Sci USA 106(52):22358–22363
- 52. Uddin M, Wildman DE, Liu G, Xu W, Johnson RM, Hof PR, Kapatos G, Grossman LI, Goodman M (2004) Sister grouping of

chimpanzees and humans as revealed by genome-wide phylogenetic analysis of brain gene expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA 101(9):2957–2962

- Cavallaro S, Meiri N, Yi CL, Musco S, Ma W, Goldberg J, Alkon DL (1997) Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. Proc Natl Acad Sci USA 94(18):9669–9673
- 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):14431–14443
- 55. 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(12):3446–3456
- 56. Li Q, Guo S, Jiang X, Bryk J, Naumann R, Enard W, Tomita M, Sugimoto M, Khaitovich P, Paabo S (2016) Mice carrying a human GLUD2 gene recapitulate aspects of human transcriptome and metabolome development. Proc Natl Acad Sci USA 113(19):5358–5363. https://doi.org/10.1073/pnas.1519261113
- 57. Boroughs LK, DeBerardinis RJ (2015) Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. Nat Cell Biol 17(4):351–359
- Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB (2015) Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. Nature 518(7539):413–416
- 59. Jin L, Li D, Alesi GN, Fan J, Kang HB, Lu Z, Boggon TJ, Jin P, Yi H, Wright ER, Duong D, Seyfried NT, Egnatchik R, DeBerardinis RJ, Magliocca KR, He C, Arellano ML, Khoury HJ, hin DM, Khuri FR, Kang S (2015) Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. Cancer Cell 27:257–270
- 60. Sonnewald U, Westergaard N, Petersen SB, Unsgard G, Schousboe A (1993) Metabolism of [U-13C] glutamate in astrocytes studied by 13C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. J Neurochem 61(3):1179–1182
- Spanaki C, Kotzamani D, Plaitakis A (2017) Widening spectrum of cellular and subcellular expression of human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenases suggests novel functions. Neurochem Res 42(1):92–107
- Bhatt DH, Zhang S, Gan WB (2009) Dendritic spine dynamics. Annu Rev Physiol 71:261–282
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260(5104):95–97
- Mattson MP, Dou P, Kater SB (1988) Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 8(6):2087–2100
- Kwon HB, Sabatini BL (2011) Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. Nature 474(7349):100–104
- 66. Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, McDonald JG, DeBerardinis RJ (2009) Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. Cancer Res 69(20):7986–7993
- 67. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H (2016) Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. Neuro-oncology 18(1):16–26
- Chen R, Nishimura MC, Kharbanda S, Peale F, Deng Y, Daemen A, Forrest WF, Kwong M, Hedehus M, Hatzivassiliou G, Friedman LS, Phillips HS (2014) Hominoid-specific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma. Proc Natl Acad Sci 111(39):14217–14222
- 69. Waitkus MS, Pirozzi CJ, Moure CJ, Diplas BH, Hansen LJ, Carpenter AB, Yang R, Wang Z, Ingram BO, Karoly ED, Mohney RP, Spasojevic I, McLendon RE, Friedman HS, He Y, Bigner DD, Yan H (2018) Adaptive evolution of the GDH2 allosteric domain

promotes gliomagenesis by resolving IDH1(R132H)-induced metabolic liabilities. Cancer Res 78(1):36–50

- 70. Smits RA, van de Wijngaard WM, Stassen AP, van der Drift C (1984) Mutants of pseudomonas aeruginosa unable to inactivate allantoinase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Arch Microbiol 140(1):40–43
- Britton KL, Baker PJ, Rice DW, Stillman TJ (1992) Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. Eur J Biochem 209(3):851–859
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. Nature 425(6959):686–691
- DeLuna A, Avendano A, Riego L, Gonzalez A (2001) NADPglutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. J Biol Chem 276(47):43775–43783
- 74. Campero-Basaldua C, Quezada H, Riego-Ruiz L, Marquez D, Rojas E, Gonzalez J, El-Hafidi M, Gonzalez A (2017) Diversification of the kinetic properties of yeast NADP-glutamate-dehydrogenase isozymes proceeds independently of their evolutionary origin. Microbiol Open 6 (2):e00419

- Duschak VG, Cazzulo JJ (1991) Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett 67(2):131–135
- Labboun S, Terce-Laforgue T, Roscher A, Bedu M, Restivo FM, Velanis CN, Skopelitis DS, Moschou PN, Roubelakis-Angelakis KA, Suzuki A, Hirel B (2009) Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. In vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. Plant Cell Physiol 50(10):1761–1773
- Cammaerts D, Jacobs M (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. Planta 163(4):517–526
- Kotzamani D, Plaitakis A (2012) Alpha helical structures in the leader sequence of human GLUD2 glutamate dehydrogenase responsible for mitochondrial import. Neurochem Int 61(4):463–469
- Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Katrakili N, Plaitakis A, Tokatlidis K (2016) Import of a major mitochondrial enzyme depends on synergy between two distinct helices of its presequence. Biochem J 473(18):2813–2829