



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

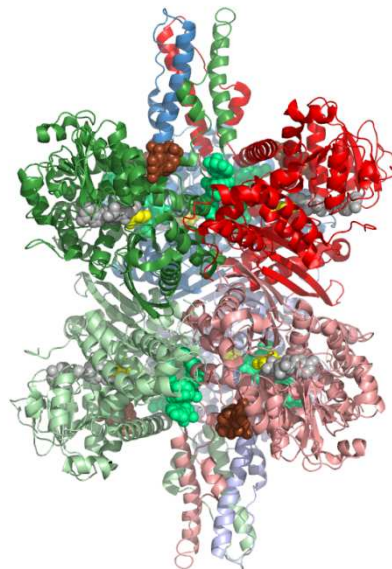


**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ**

**ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΕΙΔΙΚΗ ΓΙΑ ΤΟ  
ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ:  
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ  
ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ  
ΕΝΖΥΜΟΥ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Κωνσταντίνος Ε. Καναβούρας**



**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2012**

**Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή:**

**Κυριακή Θερού,** Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (επιβλέπουσα)

**Ανδρέας Πλαϊτάκης,** Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας

**Μιχαήλ Κοκκινίδης,** Καθηγητής Δομικής Βιολογίας

**Επταμελής επιτροπή:**

**Κυριακή Θερού,** Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

**Ανδρέας Πλαϊτάκης,** Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας

**Μιχαήλ Κοκκινίδης,** Καθηγητής Δομικής Βιολογίας

**Δημήτριος Καρδάσης,** Καθηγητής Βιοχημείας

**Δόμνα Καραγωγέως,** Καθηγήτρια Νευροεπιστημών

**Κλεάνθη Σπανάκη,** Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας

**Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος,** Λέκτωρ Φαρμακολογίας



Habe nun, ach! Philosophie,  
Juristerei und Medizin,  
Und leider auch Theologie  
Durchaus studiert, mit heißem Bemühn.  
Da steh ich nun, ich armer Tor!  
Und bin so klug als wie zuvor;  
Heiße Magister, heiße Doktor gar  
Und ziehe schon an die zehen Jahr  
Herauf, herab und quer und krumm  
Meine Schüler an der Nase herum –  
Und sehe, daß wir nichts wissen können!  
Das will mir schier das Herz verbrennen.  
Zwar bin ich gescheiter als all die Laffen,  
Doktoren, Magister, Schreiber und Pfaffen;  
Mich plagen keine Skrupel noch Zweifel,  
Fürchte mich weder vor Hölle noch Teufel –  
Dafür ist mir auch alle Freud entrissen,  
Bilde mir nicht ein, was Rechts zu wissen,  
Bilde mir nicht ein, ich könnte was lehren,  
Die Menschen zu bessern und zu bekehren.  
Auch hab ich weder Gut noch Geld,  
Noch Ehr und Herrlichkeit der Welt;  
Es möchte kein Hund so länger leben!

Faust, eine Tragödie. Teil I.

J.W. Goethe

## Ευχαριστίες

Η διατριβή αυτή είναι το αποτέλεσμα μελετών που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Προ δεκαετίας, έχοντας ολοκληρώσει τις προπτυχιακές μου σπουδές σε άλλη ιατρική σχολή της ημεδαπής, και έχοντας έλθει στο Ηράκλειο για να παρακολουθήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στις Νευροεπιστήμες, εξεπλάγην ευχάριστα από το περιβάλλον του Πανεπιστημίου Κρήτης: την ποιότητα των σπουδών, την ηθική και επιστημονική αρτιότητα των διδασκόντων, την άοκνη ερευνητική δραστηριότητα με αξιοθαύμαστες, εφάμιλλες φημισμένων κέντρων του εξωτερικού επιδόσεις, παρά τους υλικούς περιορισμούς, τον ακαδημαϊκό πολιτισμό εν γένει. Δέκα χρόνια μετά, και κατά αρκετές εμπειρίες –μεταξύ αυτών και αρνητικές- πλουσιότερος, εξακολουθώ να θεωρώ εαυτόν τυχερό που εργάστηκα εδώ. Έτσι, η πρώτη από τις ευχαριστίες ίσως αξίζει στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης συνολικά, για το ζηλευτό, τουλάχιστον για τα ελληνικά δεδομένα, ακαδημαϊκό περιβάλλον που μου παρείχε. Με τον τρόπο αυτό θέλω να συμπεριλάβω στις ευχαριστίες μου όσους ανθρώπους ενδεχομένως παραλείψω εκ παραδρομής να αναφέρω ονομαστικά στη συνέχεια.

Την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου θέλω να εκφράσω, καταρχήν, προς τον καθηγητή Ανδρέα Πλαϊτάκη, στο εργαστήριο του οποίου εκπονήθηκε η παρούσα μελέτη. Το πρότυπο που εκπροσωπεί, του ιατρού και βασικού επιστήμονα, είναι παράδειγμα για όλους όσους εργάστηκαν και εργάζονται μαζί του. Η όρεξη με την οποία, έχοντας μόλις αντιμετωπίσει δύσκολα κλινικά προβλήματα στο νοσοκομείο, θα ανασκουμπωθεί για να βοηθήσει, εξ' ίσου αποτελεσματικά, στην επίλυση τεχνικής φύσεως ζητημάτων στις ενζυμικές μελέτες, είναι άξια θαυμασμού. Η αφοσίωση, η επιμονή και ο ενθουσιασμός του, η πλούσια εμπειρία του, που πάντα είναι έτοιμος να μοιραστεί, η ικανότητα να αφομοιώνει νέες ιδέες, η ηθική που διέπει την επιστημονική και ιατρική του πράξη – όλα τα παραπάνω τον καθιστούν πραγματικό δάσκαλο.

Στην καθηγήτρια Κική Θερμού επίσης χρωστώ ένα μεγάλο ευχαριστώ: ήταν και είναι η ψυχή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Νευροεπιστημών, που είχε συμβουλή και λύση για πολλά από τα προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου ως μεταπτυχιακός και διδακτορικός φοιτητής.

Τον καθηγητή Μιχάλη Κοκκινίδη οφείλω να ευχαριστήσω για τα εποικοδομητικά σχόλια πάνω στο ζήτημα της δομής του ενζύμου και των πιθανών δομικών επιπτώσεων των μεταλλάξεων, καθώς και για τη κοινοποίηση και συζήτηση συμπεράσματος από τις δομικές μελέτες του εργαστηρίου του.

Από τους λοιπούς ερευνητές του εργαστηρίου μας, πρώτον θα πρέπει να ευχαριστήσω τον –εκλεγμένο επίκουρο καθηγητή πλέον- Γιάννη Ζαγανά. Έχοντας ανοίξει πρώτος το δρόμο με τις μελέτες μεταλλαξιογένεσης στη γλουταμική αφυδρογονάση, έχει εισαγάγει στο εργαστήριό μας πολλές από τις τεχνικές που χρησιμοποίησα στη μελέτη μου. Παράλληλα, τα συμπεράσματα των μελετών του πάνω στην επίδραση μεταλλάξεων στη λειτουργία του ενζύμου ήταν η αφετηρία των δικών μου ερευνών, ενώ μου παρείχε και κάποια από τα μεταλλάγματα που κατασκεύασε για περαιτέρω μελέτη και ως πρώτη ύλη άλλων.

Ειδική μνεία αξίζει και στην επίκουρη καθηγήτρια Κλειώ Σπανάκη. Ήταν δίπλα μου κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, που υπήρξε το έναυσμα της περαιτέρω ενασχόλησής μου με το

θέμα, και -μαζί με τον κ. Πλαϊτάκη- με καθοδήγησε στα πρώτα βήματά μου στις ενζυμικές λειτουργικές μελέτες.

Χρωστώ αρκετά, φυσικά, και σε όλους εκείνους που δουλέψαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο:

Στο Βασίλη Μαστοροδήμο, που με καθοδήγησε στα πρώτα βήματα της ενασχόλησής μου με τη μεταλλαξιγένεση και που επίσης μου παρείχε προϊόντα των εργασιών του για περαιτέρω μελέτη.

Στη Μαρία-Μάρθα Παπαχατζάκη και -κυρίως- στο Νικόλα Μπορομπόκα, που, στα πλαίσια της διπλωματικής και της διδακτορικής διατριβής τους αντίστοιχα, ανέλαβαν να συνεχίσουν τις μελέτες μας πάνω στις επιδράσεις των οιστρογόνων στο ένζυμο και, με τα αποτελέσματά τους, συμπληρώνουν τα συμπεράσματά μας.

Στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γιοβάννα Αριάνογλου, που ανέλαβε, στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας, να μελετήσει μερικά από τα μεταλλάγματα μας ως προς τις επιδράσεις της λευκίνης.

Στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Λένα Λατσούδη, που είχε σχόλια και λύσεις για κάθε πρόβλημα σχετικό με PCR, αλληλούχιση και συναφείς τεχνικές, αλλά και για πάμπολλα άλλα θέματα πάνω στις μελέτες μας.

Στην τεχνικό Ρένα Σκουλά, την αφανή και ήρεμη δύναμη του εργαστηρίου μας, χωρίς την οποία ίσως τίποτε στο εργαστήριο δεν θα λειτουργούσε όπως πρέπει, καθώς και στη γραμματέα Ειρήνη Τζανάκη, που επιτελεί παρόμοια λειτουργία σε διοικητικό επίπεδο.

Στους πρώην προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές Δήμητρα Κοτζαμάνη, Δώρα Πάνου, Αργύρη Σταγκουράκη, Πηνελόπη Πλιώτα, Ελένη Γιουρούκη, Αφροδίτη Πετσάκου, Μαρία Ρογδάκη και Ρανιώ Τζώρτζη, με τους οποίους κατά περιόδους συνεργαστήκαμε.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους -πρώην ως επί το πλείστον- μεταπτυχιακούς φοιτητές και ερευνητές από άλλα εργαστήρια, που πολλές φορές μου παρείχαν υλική και τεχνική -συχνά δε και ηθική- συμβουλή και υποστήριξη. Αναφέρω εδώ το Μιχάλη Βερυκοκάκη, τον Κώστα Θεοδωράκη, το Μάνο Κάττουλα, το Νίκο Παπανικολάου, το Γιώργο Παπαφωτίου, τη Νίκη Μαστροδήμου, τον Κωστή Γκουντέλια, τη Βάσω Πελεκάνου, τον -νυν λέκτορα- Γιώργο Νότα, το Γιώργο Βρέντζο, το λέκτορα Γιάννη Ηλιοπούλο, την επίκουρη καθηγήτρια Μαριλένα Καμπά, τον καθηγητή Ηλία Καστανά - πιθανότατα μου διαφεύγουν αρκετοί. Ξεχωριστή αναφορά αρμόζει στη φίλη, συμφοιτήτρια, συγκάτοικο και πρώην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ηρώ Ευλαμπίδου, στην οποία οφείλω πολλά.

Τέλος, πρέπει να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που ποτέ δεν έπαυσε να με στηρίζει: τους γονείς μου, Βαγγέλη και Μαρούλα, που με δίδαξαν την κριτική σκέψη και την αγάπη για το βιβλίο· τον αδελφό μου Αντώνη, που, με τον τρόπο του, εδώ και 35 χρόνια μου δείχνει ότι όλα τα πράγματα -η ζωή, η γνώση, η τέχνη, η επιστήμη- έχουν πάντα και μια άλλη πλευρά. Και, φυσικά, τη σύζυγό μου Κατερίνα και το γιό μου Βαγγέλη, που μου έδιναν δύναμη και υπέμεναν στωικά την απουσία μου όλα αυτά τα χρόνια.

Σε όλους τους παραπάνω, εκείνους που είχα την τύχη να γνωρίσω μέσα από το μακρύ αυτό ταξίδι, και εκείνους που με στερήθηκαν για να μπορέσει να γίνει πραγματικότητα, αφιερώνω τη μελέτη μου.

K.K.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1-52</b>
<b>1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΕΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΕΣ</b>	<b>1-4</b>
1.1.1 Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ	1
1.1.2 ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ GDH ΣΕ ΑΠΛΟΥΣΤΕΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	2
<b>1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ GDH ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ</b>	<b>4-16</b>
1.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ.	4
1.2.2 ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΟΥΣ	7
1.2.3 Ο ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ	13
<b>1.3 ΤΑ ΔΥΟ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>GLUD1</i> ΚΑΙ <i>GLUD2</i> ΚΑΙ ΟΙ ΔΥΟ GDH ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.</b>	<b>17-23</b>
1.3.1 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>GLUD1</i> ΚΑΙ <i>GLUD2</i>	17
1.3.2 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ <i>GLUD1</i> ΚΑΙ <i>GLUD2</i>	23
<b>1.4 ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΗGDH1 ΚΑΙ ΗGDH2</b>	<b>24-31</b>
1.4.1 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	24
1.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ	25
1.4.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ADP ΚΑΙ L-ΛΕΥΚΙΝΗ	26
1.4.4 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΠΟ GTP	28
1.4.5 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	29
<b>1.5 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΕΝΕΣΗ ΠΑΝΩ ΣΤΟ ΔΟΜΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΗGDH1 ΚΑΙ ΗGDH2</b>	<b>31-36</b>
1.5.1 Η ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ GLY456ALA ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΟ GTP	32
1.5.2 Η ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ ARG443SER ΕΚΜΗΔΕΝΙΖΕΙ ΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ, ΚΑΙ ΑΛΛΑΖΕΙ ΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ADP ΚΑΙ ΛΕΥΚΙΝΗ.	33
1.5.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ARG443SER ΚΑΙ GLY456ALA ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ.	35
1.5.4 ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΟΙ ΛΟΙΠΕΣ ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΗGDH2;	35
<b>1.6 Ο ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GDH ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΟΡΓΑΝΑ, ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΥΤΗΝ.</b>	<b>37-52</b>
1.6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ GDH ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ	37
1.6.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ	39
1.6.3 Η GDH ΣΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟΥ-ΥΠΕΡΑΜΜΩΝΙΑΙΜΙΑΣ	43
1.6.4 Η ΠΙΘΑΝΗ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ GDH ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΗΨΙΑ	48
1.6.5 Η GDH ΣΕ ΝΕΥΡΟΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	49
1.6.6 Η GDH ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ	50
<b>2. ΣΚΟΠΟΙ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	<b>53-56</b>

### **3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ** **57-81**

---

<b>3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ</b>	<b>57-68</b>
3.1.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΕΣΕΩΝ	57
3.1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ CDNAS	59
3.1.3 ΈΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Sf21	66
<b>3.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ</b>	<b>69-70</b>
<b>3.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ</b>	<b>71-76</b>
<b>3.4 ΜΕΛΕΤΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ</b>	<b>77-81</b>
3.4.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)	77
3.4.2 ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (“BLUE” NATIVE PAGE)	79

### **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** **82-140**

---

<b>4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΗGDH1 ΚΑΙ ΗGDH2 ΣΕ ΚΑΘΑΡΗ ΜΟΡΦΗ</b>	<b>83-97</b>
4.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΗ, ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	83
4.1.2 ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΗGDH1 ΚΑΙ ΗGDH2	87
4.1.3 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΗGDH1 ΚΑΙ ΗGDH2	89
4.1.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ADP ΚΑΙ L-ΛΕΥΚΙΝΗ	89
4.1.5 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΠΟ GTP	92
4.1.6 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΠΟ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ	93
4.1.7 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	95
<b>4.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ ΗGDH2-SER445ALA</b>	<b>98-103</b>
4.2.1 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΗGDH2-SER445ALA	98
4.2.2 ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΗGDH2-SER445ALA	101
4.2.3 Η ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΗGDH2-SER445ALA	102
<b>4.3 ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ ΔΙΠΛΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ ΗGDH1-ARG443SER/GLY456ALA</b>	<b>104-108</b>
<b>4.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ ΗGDH2-SER443ARG</b>	<b>109-114</b>
<b>4.5 ΟΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΤΡΙΠΛΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ ΗGDH1-SER174ASN/ARG443SER/GLY456ALA ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΕΤΡΑΠΛΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ ΗGDH1-MET415LEU/ARG443SER/GLY456ALA/ARG470HIS</b>	<b>115-126</b>
4.5.1 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	116
4.5.2 ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	118
4.5.3 ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	123
4.5.4 ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ	125



<b>4.6 ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ, ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ GLU441ARG, SER445LEU, SER448PRO, LYS450GLU ΚΑΙ HIS454TYR ΤΗΣ HGDH2</b>	<b>127-133</b>
4.6.1 ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	128
4.6.2 ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	129
4.6.3 ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ	132
<b>4.7. ΜΕΛΕΤΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΑΓΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ HGDHS</b>	<b>134-140</b>
4.7.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	134
4.7.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	101
<b><u>5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	<b><u>141-166</u></b>
5.1 ΝΕΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ HGDH2	141-142
5.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΜΒΙΚΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ HGDH1 ΚΑΙ HGDH2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ, ΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.	143-151
5.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ HGDH2-SER445ALA ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ HGDH2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ, ΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ .	152-154
5.4. ΟΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΠΟΥ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ HGDH2.	155-159
5.5. ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΡΜΗΝΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΟΣ ΤΗΣ HGDH2 ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.	160-162
5.6. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΟΣ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ HGDH2.	163-164
5.5. ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΡΜΗΝΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΟΣ ΤΗΣ HGDH2 ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.	165-166
<b><u>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	<b><u>167-181</u></b>
<b><u>7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</u></b>	<b><u>182-183</u></b>
7.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	182
7.2 ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ABSTRACT)	183





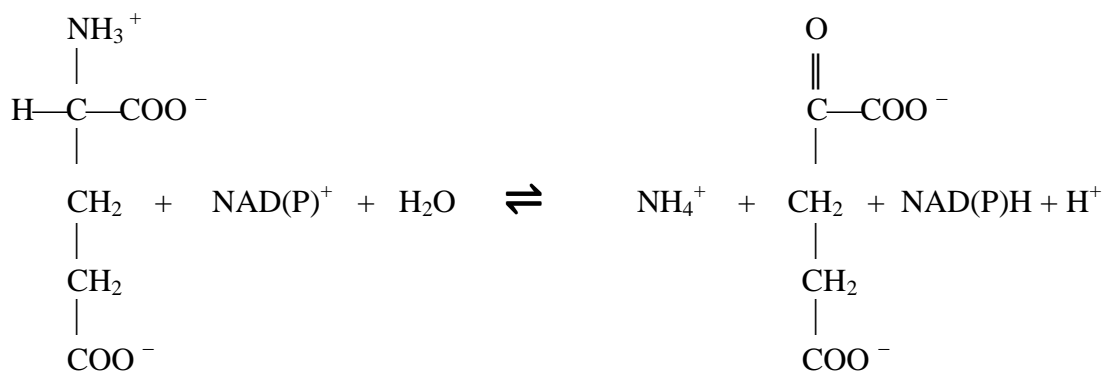
# 1. Εισαγωγή

Η εισαγωγή αυτή έχει σκοπό να εξοικειώσει τον αναγνώστη με τις γνώσεις πάνω στο αντικείμενο που απαιτούνται για την κατανόηση της αφετηρίας και του σκοπού των μελετών μας. Μακράν απέχει από το να αποτελεί μια ολοκληρωμένη μονογραφία για τη γλουταμική αφυδρογονάση, ένα ένζυμο που έχει μελετηθεί και εξακολουθεί να μελετάται σε πολλούς οργανισμούς, από πλήθος ερευνητών, εδώ και πάνω από εξήντα χρόνια. Έτσι, θα περιοριστούμε ως επί το πλείστον στα βασικά στοιχεία για τη δομή, την εξέλιξη και τη λειτουργία του ενζύμου στον άνθρωπο και τα συγγενικά του είδη.

## 1.1. Γενικά για τις γλουταμικές αφυδρογονάσες

### 1.1.1 Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες (Glutamate Dehydrogenases, GDH) καταλύουν την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού οξέος σε α-κετογλουταρικό:



Γλουταμικό

α-κετογλουταρικό

Χρησιμοποιούν ως συνένζυμο για την οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση το  $\text{NAD}^+$  ή/και το  $\text{NADP}^+$ , και διαχωρίζονται με βάση την ειδικότητα για το συνένζυμο σε γλουταμικές αφυδρογονάσες ειδικές για το  $\text{NAD(H)}$  (E.C. 1.4.1.2), σε ειδικές για το  $\text{NADP(H)}$  (E.C. 1.4.1.4), και σε αυτές που χρησιμοποιούν αμφότερα (E.C. 1.4.1.3),

στις οποίες ανήκουν όλες οι γλουταμικές αφυδρογονάσεις των σπονδυλωτών. Παρ' ότι το ένζυμο καλείται γλουταμική αφυδρογονάση, στην πραγματικότητα η ισορροπία της αντίδρασης, όπως εκφράζεται από τη σταθερά ισορροπίας της, σε όλες τις γλουταμικές αφυδρογονάσεις ευνοεί την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού σε γλουταμικό. Έτσι, η  $K_m$  για το α-κετογλουταρικό είναι κατά κανόνα αρκετά μικρότερη αυτής για το γλουταμικό, πράγμα που σημαίνει ότι, επί στοιχειομετρικών ποσοτήτων όλων των αντιδρώντων, το ένζυμο απαμινώνει α-κετογλουταρικό. Αυτό είναι δεν είναι παράδοξο, καθ' ότι η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης χρησιμοποιείται από πάρα πολλά φυτά και μικροοργανισμούς για την ενσωμάτωση του αζώτου της αμμωνίας σε οργανικές ενώσεις, αποτελώντας έναν από τους κυριότερους τρόπους de novo σύνθεσης αμινοξέων στη φύση. Στα ζώα, ωστόσο, που η βασική πηγή των αμινοξέων τους είναι η τροφή, το ένζυμο χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την καταβολική αντίδραση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό, συνδέοντας έτσι το μεταβολισμό των αμινοξέων με τον κύκλο του κιτρικού οξέως. Η ισορροπία της αντίδρασης, ακόμη και στα θηλαστικά, εξακολουθεί να ευνοεί την αναγωγική αμίνωση του κετογλουταρικού, όμως αυτό που εν τέλει στρέφει την αντίδραση προς την κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης είναι η –εξαιρουμένων ειδικών καταστάσεων- ένδεια της ελεύθερης αμμωνίας στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον.

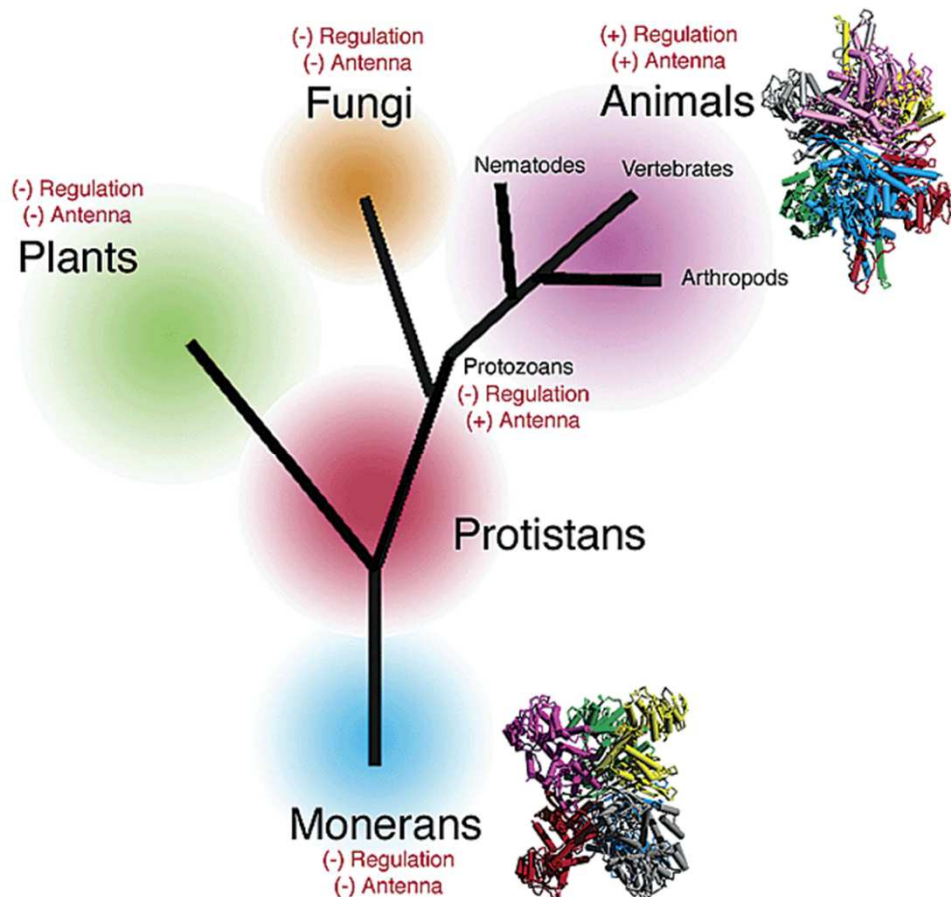
### **1.1.2. Λίγα λόγια για τη δομή της GDH σε απλούστερους οργανισμούς**

Καθώς οι γλουταμικές αφυδρογονάσεις επιτελούν σημαντικότατο ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, είναι αναμενόμενο ότι ανευρίσκονται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς (Hudson και Daniel, 1993). Οι γλουταμικές αφυδρογονάσεις έχουν τη δομή ομοπολυμερούς, αποτελούμενου είτε από τέσσερις, είτε -πολύ συχνότερα- από έξι υπομονάδες. Οι τετραμερείς GDH χρησιμοποιούν κατά κανόνα ως συνένζυμο το NAD(H), ενώ οι εξαμερείς το NAD(H), το NADP(H) ή και τα δύο συνένζυμα, όμως αυτός ο κανόνας έχει και εξαιρέσεις. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι τετραμερείς και εξαμερείς GDH έχουν αποκτήσει στην πορεία τις εξελιγμένες ειδικότητες προς τα ίδια συνένζυμα με ανεξάρτητες, συγκλίνουσες εξελικτικές διαδικασίες (Britton και συν. 1992, Lilley και συν. 1991). Γενικώς θεωρείται, επίσης, ότι οι γλουταμικές αφυδρογονάσεις που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NAD(H) εξυπηρετούν κυρίως

τον καταβολισμό γλουταμικού, ενώ εκείνες που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NADP(H) εξυπηρετούν βιοσυνθετικές λειτουργίες. Πρότυπο αυτής της σχέσης αποτελεί ο μύκητας *Neurospora crassa*, οποίος διαθέτει μία «καταβολική», ειδική για το NAD(H) τετραμερή GDH, από υπομονάδες των ~120kD και μία «βιοσυνθετική» ειδική για το NADP(H) εξαμερή GDH, από υπομονάδες των ~49kD (Veronese και συν. 1974, Blumenthal και Smith, 1975). Άλλα παραδείγματα οργανισμών που διαθέτουν δύο ξεχωριστές GDH με διαφορετική ειδικότητα για το συνένζυμο είναι αυτά του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (Smits και συν. 1984, Lu και Abdelal 2001), αλλά και του πρωτοζώου *Trypanosoma cruzi* (Carneiro και Caldas 1983, Barderi και συν. 1998), στο οποίο όμως και οι δύο GDH είναι εξαμερείς.

Στο λίκνι περίπλοκο φυλογενετικό δέντρο των γονιδίων για τις διάφορες GDH που έχει προταθεί (Andersson και Roger 2003), οι τετραμερείς GDH συγκροτούν τις τάξεις GDH-3 και GDH-4, ενώ οι εξαμερικές GDH τις τάξεις GDH-1 και GDH-2.

Στην τελευταία αυτή υποκατηγορία των εξαμερικών γλουταμικών αφυδρογονασών (GDH-2), ανήκουν, εκτός από πολλές GDH άλλων βασιλείων, όλες οι GDH του ζωικού βασιλείου, συμπεριλαμβανομένων φυσικά και αυτών των θηλαστικών, και μόνο με αυτές τις GDH θα ασχοληθούμε στη συνέχεια. Σε κάποιον κλάδο της εξέλιξης αυτής της τάξης των GDH, και δὴ στα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα (ciliates), πρωτοεμφανίστηκε –πιθανότατα συνεπεία μιας τυχαίας ενθέσεως- μία προεξοχή του μορίου ~50 αμινοξέων, η λεγόμενη κεραία ή αντέννα, που, όπως θα δούμε στη συνέχεια, παίζει σημαντικότατο ρόλο στην αλλοστερική ρύθμιση των ζωϊκών GDH (βλ. εικόνα 1). Φαίνεται ότι η εμφάνιση της αντέννας συνέπεσε με τη σταδιακή μετακίνηση του καταβολισμού των λιπιδίων από τα λυσοσώματα στα μιτοχόνδρια, και, καθώς επέτρεπε -αρχικά μέσω της αλλοστερικής ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου από λιπίδια και εν συνεχεία από ADP - τον έλεγχο της ροής αμινοξέων προς τον κύκλο του Krebs ανάλογα με την ενεργειακή επάρκεια ή ένδεια του κυττάρου, παρείχε εξελικτικό πλεονέκτημα και συντηρήθηκε. Η ύπαρξη της αντέννας ήταν προϋπόθεση για την αλλοστερική ρύθμιση από GTP, που εμφανίστηκε σε επόμενο στάδιο της εξέλιξης (βλ. σχετικά Banerjee και συν. 2003, Allen και συν. 2004, Smith και Stanley 2008).



**Εικ. 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης της αντέννας και της αλλοστερικής ρύθμισης της GDH από πουργίνες, όπου απεικονίζεται η -στηριγμένη σε συγκρίσεις αλληλουχιών και δομών, αλλά και λειτουργικών ενζυμικών ιδιοτήτων- υπόθεση, ότι η δημιουργία της αντέννας αποτέλεσε την προϋπόθεση για τη ρύθμιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης των ζώων από ADP και GTP. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από την εργασία των Banerjee και συν. (2003)

## 1.2. Δομή και ρύθμιση της GDH των θηλαστικών

### 1.2.1 Η δομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών.

Η δομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης είχε προσεγγιστεί με διάφορους τρόπους (μελέτες χημικής τροποποίησης, φωτοσκέδασης κλπ.) στο παρελθόν. Σήμερα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, έχει επιλύσει τη δομή αρκετών GDH. Στα θηλαστικά, χάρη στις εργασίες της ερευνητικής ομάδας υπό τον Thomas J. Smith έχουμε εικόνες της βοείου GDH και της -ομόλογής της και λίαν παρόμοιας δομικά και λειτουργικά- ανθρώπινης GDH1, σε διάφορες καταστάσεις: ως αποένζυμο χωρίς προσθήματα

(Smith και συν. 2002), σε σύμπλοκο με γλουταμικό, NADH και GTP (Peterson και Smith 1999), σε σύμπλοκο με  $\alpha$ -κετογλουρικό και NAD<sup>+</sup> (Smith και συν. 2001), σε σύμπλοκο με ADP (Banerjee και συν. 2003), με γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (Li και συν. 2011), με εξαχλωροφαίνιο και άλλους υδρόφοβους αναστολείς (Li και συν. 2009). Όσα θα περιγράψουμε στη συνέχεια για τη δομή του ενζύμου και τις θέσεις πρόσδεσης των υποστρωμάτων και τροποποιητών είναι βασισμένα στις παραπάνω μελέτες.

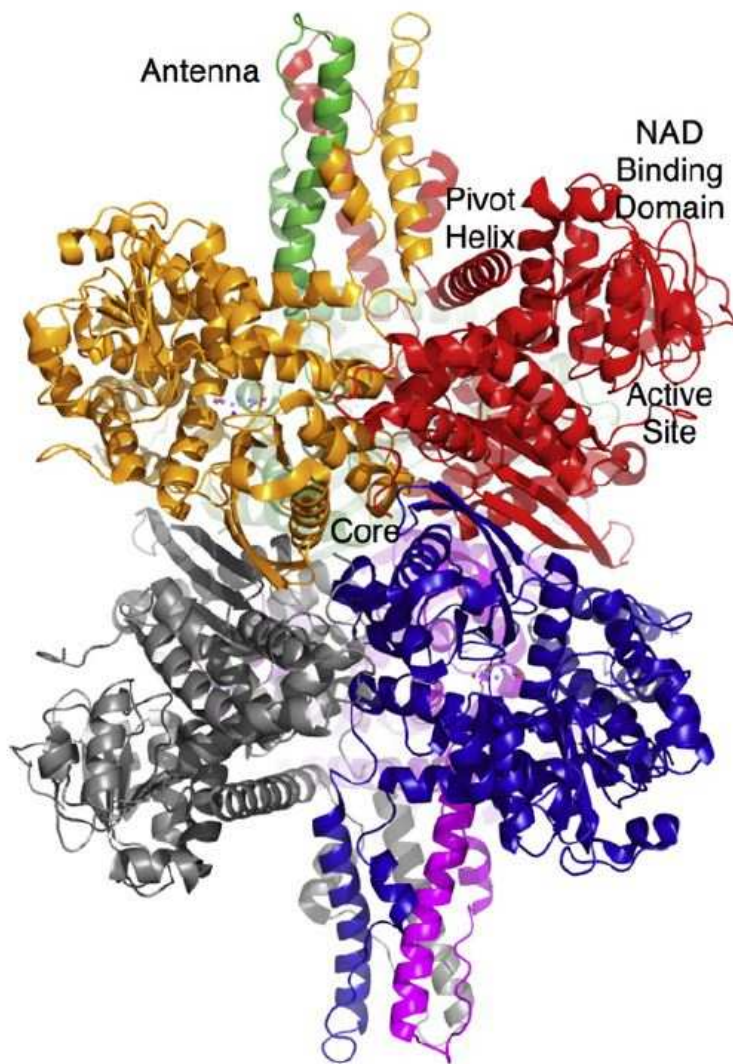
Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών είναι ένα συμμετρικό ομοεξαμερές (εικ 1.2) της οποίας κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος ~56kDa αποτελούμενη από ~500 αμινοξέα (505 στην ανθρώπινη, 501 στη βόειο). Σε κάθε υπομονάδα ξεχωρίζουμε τρεις περιοχές (Εικ. 1.3):

α) την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος (γλουταμικού) στο αμινοτελικό άκρο, που αποτελεί και τη «βάση» της υπομονάδος όπως αυτή εντάσσεται στο εξαμερές,  
β) την -υπερκείμενη της προηγούμενης- περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)[H] και  
γ) την ρυθμιστική (ή αλλοστερική) περιοχή, που περιλαμβάνει την αντέννα (αμινοξέα 402–447 στην ανθρώπινη αρίθμηση, που θα χρησιμοποιούμε εφ' εξής) και την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix, αμινοξέα 449–475).

Η αντέννα είναι μια επιμήκης δομή που προβάλλει από την κορυφή της περιοχής πρόσδεσης του NAD(P)[H] προς τον «πόλο» του εξαμερούς, περίπου κατά μήκος ενός νοητού οβελιαίου άξονα. Περιλαμβάνει ένα ανιόν σκέλος, αποτελούμενο από μία  $\alpha$ -έλικα 21 αμινοξέων (αμινοξέα 403-422) και ένα κατιόν σκέλος (αμινοξέα 425–447) που τελειώνει με μία μικρή  $\alpha$ -έλικα (αμινοξέα 438–445). Οι αντέννες των τριών υπομονάδων που βρίσκονται προς την ίδια πλευρά του «ισημερινού» του εξαμερούς διαπλέκονται μεταξύ τους.

Σε κάθε υπομονάδα, μία βαθιά σχισμή, το «καταλυτικό στόμιο» ή «καταλυτική σχισμή», χωρίζει δύο περιοχές, των οποίων η πρώτη περιοχή, αποτελούμενη από τα αμινοξέα 4-204 και 428-453, αντιστοιχεί αδρά σε αυτό που περιγράψαμε ως περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, ενώ η δεύτερη (κατάλοιπα 205-427), που δομικά ομοιάζει με μία κλασική περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου, αντιστοιχεί αδρά στην

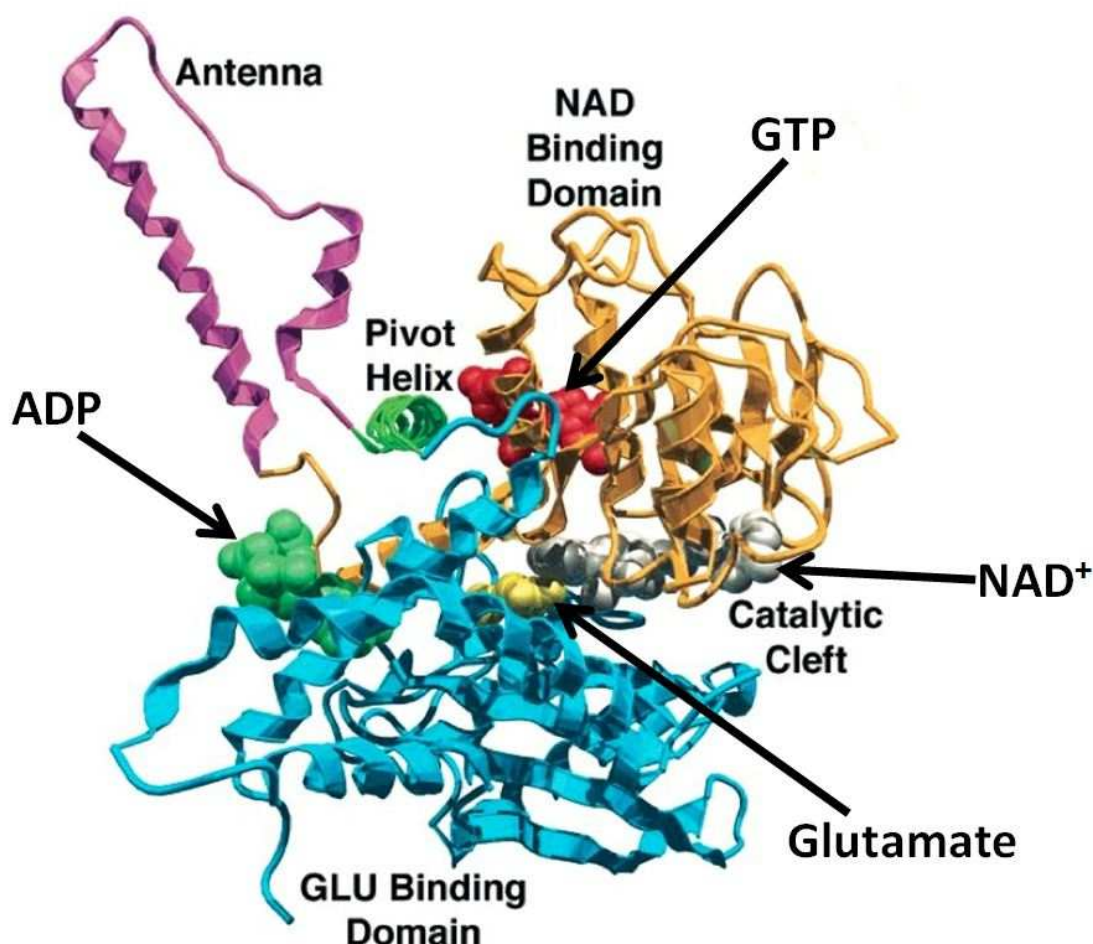




**Εικ. 1.2:** Σχηματική αναπαράσταση του εξαμερούς της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης. Οι έξι υπομονάδες απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα. Ο κύριος όγκος των δύο από τις έξι υπομονάδες παραμένει κρυμμένος. Σημειώνονται στην άνω δεξιά υπομονάδα η αντέννα, η περιστρεφόμενη έλικα, η περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου και η καταλυτική σχισμή· κάτωθεν της τελευταίας βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Σημειώνεται επίσης ο «πυρήνας» του εξαμερούς. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από την εργασία των Li και συν. (2012)

περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου. Η σύνδεση του υποστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα τη περιστροφή της περιοχής πρόσδεσης του συνενζύμου κατά  $\sim 18^\circ$  γύρω από την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix) και παρατηρείται μία αλλαγή διαμόρφωσης που έχει σαν αποτέλεσμα το κλείσιμο της σχισμής και την προσέγγιση των δύο περιοχών. Η κίνηση αυτή οδηγεί σε εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης και στο υπόλοιπο μόριο, όπως π.χ. στην αντέννα, που περιστρέφεται ελαφρά γύρω από τον άξονά της, ενώ η βραχεία α-έλικα του κατιόντος σκέλους της συμπιέζεται σαν ελατήριο και ταυτόχρονα ωθείται προς τον κεντρικό (οβελιαίο) άξονα του εξαμερούς.

Ολόκληρο το εξαμερές, τώρα, «διογκώνεται» ελαφρά κατά τη διάνοιξη της καταλυτικής σχισμής, με αποτέλεσμα να φαίνεται σαν να «αναπνέει» κατά τη διαδραστική εναλλαγή μεταξύ κλειστής και ανοικτής διαμόρφωσης. Κατά την κίνηση αυτή, αλλάζει και το μέγεθος και η γεωμετρία του θυλάκου που βρίσκεται στον «πυρήνα» (core) του εξαμερούς, μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης γλουταμικού και των έξι υπομονάδων (βλ. εικ. 1.2).



**Εικ. 1.3:** Σχηματική αναπαράσταση μίας υπομονάδος της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης. Η περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού απεικονίζεται κυανή, η περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου κίτρινη, η περιστρεφόμενη έλιξ πράσινη και η αντέννα ροδόχρους. Απεικονίζονται και οι θέσεις πρόσδεσης του υποστρώματος, του συνενζύμου, καθώς και των αλλοστερικών τροποποιητών ADP και GTP. Επισημαίνεται ότι το σχήμα είναι τεχνητό και απεικονίζει μια μη υπαρκτή κατάσταση του μορίου, καθώς το ADP και το GTP δεν μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα. Η εικόνα αναδημοσιεύεται ελαφρά τροποποιημένη από την εργασία των Allen και συν. (2004)

Έχοντας περιγράψει τα γενικά χαρακτηριστικά της δομής του μορίου, ας εξετάσουμε τις θέσεις σύνδεσης του υποστρώματος και των συνενζύμων..

Η σύνδεση του  $\text{NAD}^+$  γίνεται στο καταλυτικό στόμιο, σε μία εκτεταμένη επιφάνεια της περιοχής πρόσδεσης του συνενζύμου, με το νικοτιναμιδικό τμήμα του μορίου

θαμμένο βαθιά μέσα στην καταλυτική σχισμή. Ας αναφέρουμε εδώ ότι το συνενζύμιο έχει και μία δεύτερη, αλλοστερική θέση σύνδεσης, που θα περιγραφεί παρακάτω.

Το γλουταμικό συνδέεται στο απώτατο βάθος της καταλυτικής σχισμής. Η γ-καρβοξυλομάδα του αλληλεπιδρά με τη Λυσίνη 94, ενώ η α-καρβοξυλομάδα του με τη Λυσίνη 118. Όταν η περιοχή πρόσδεσης του συνενζύμου «κλείνει» πάνω στα προσδέματα, φέρνει σε άμεση γειτνίαση το δακτύλιο του νικοτιναμιδίου με τη Λυσίνη 130 και το συνδεδεμένο γλουταμικό, πιθανότατα εκτοπίζοντας και μόρια νερού και δημιουργώντας ένα ευνοϊκό για την αντίδραση υδρόφοβο περιβάλλον. Σημειωτέον ότι η περιοχή της καταλυτικής σχισμής και ο μηχανισμός της αντίδρασης, όπως περιγράφηκαν συνοπτικά, είναι συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό και στα βασικά τους σημεία δε διαφέρουν από τα όσα είχαν προταθεί με βάση παλαιότερες κρυσταλλογραφικές αναλύσεις για τη GDH του *Clostridium symbiosum* (Stillmann και συν. 1993, 1999).

### **1.2.2 Αλλοστερικοί τροποποιητές του ενζύμου και οι θέσεις πρόσδεσης τους**

Το GTP είναι ο σημαντικότερος αναστολέας του ενζύμου των θηλαστικών, όπως έχει παρατηρηθεί από πολύ παλιά (Frieden 1959b, Frieden 1962a, Talal και Tomkins 1964), αλλά δεν αναστέλλει τις GDH μυκήτων και βακτηρίων (Frieden 1965). Η αναστολή αυτή φαίνεται να εξυπηρετεί την παύση του καταβολισμού αμινοξέων μέσω του κύκλου του Krebs (όπου παράγεται GTP), όταν αυτός ήδη υπερλειτουργεί συνεπεία ύπαρξης άλλων πηγών ενέργειας. Πρόκειται, δηλαδή, ως ένα βαθμό, για ένα «κύκλωμα αρνητικής ανατροφοδότησης» (negative feedback), που προϋποθέτει, φυσικά, ότι η αντίδραση προχωρά προς την πλευρά της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού. Προσδένεται σε ένα θύλακο που σχηματίζεται ανάμεσα στο άνω-πίσω τμήμα της περιοχής πρόσδεσης του συνενζύμου και την περιστρεφόμενη έλικα. Αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δημιουργία του θυλάκου και είναι σημαντικά για τη σύνδεσή του νουκλεοτιδίου είναι η Ιστιδίνη 213, η Αργινίνη 221, η Αργινίνη 265, η Αργινίνη 269, η Λυσίνη 293, το Γλουταμικό 296, η Λυσίνη 450 και η Ιστιδίνη 454. Όπως αναφέραμε, η θέση σύνδεσης του GTP δεν υφίσταται στις GDH των κατώτερων οργανισμών. Ο θύλακος αυτός δεν σχηματίζεται όταν το μόριο έχει την ανοικτή διαμόρφωση. Το GTP μπορεί να συνδεθεί μόνο επί της κλειστής

διαμόρφωσης του ενζύμου -όταν δηλαδή έχει συνδεθεί το υποστρώμα και το συνένζυμο και έχει κλείσει η καταλυτική σχισμή- και, συνδεδεμένο, σταθεροποιεί αυτή την κλειστή διαμόρφωση, εμποδίζοντας την απελευθέρωση του προϊόντος, οπότε και σχηματίζεται το λεγόμενο abortive complex («ατελέσφορο σύμπλοκο»).

Το ADP, ο σημαντικότερος ενεργοποιητής του ενζύμου, έχει επίσης αναφερθεί από πολύ παλαιά ότι αυξάνει τη δραστηριότητα του ενζύμου κατά ~2½ φορές στη βόειο GDH (Frieden 1959b), και κατά 1½ έως 6 φορές σε GDH από άλλες ζωικές πηγές, αλλά όχι σε GDH από βακτήρια και μύκητες (Frieden 1965). Ο φυσιολογικός ρόλος της ενεργοποίησης αυτής θεωρείται ότι είναι η κινητοποίηση του καταβολισμού αμινοξέων μέσω του κύκλου του Krebs όταν οι αποθήκες ενέργειας εξαντλούνται. Σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των Banerjee και συν. (2003), το ADP προσδέεται πίσω από τις περιοχές πρόσδεσης του υποστρώματος και του συνενζύμου, οπισθίως και κάτωθεν της περιστρεφόμενης έλικας, κοντά στη βάση της αντέννας, σε μια περιοχή όπου αλληλεπιδρά και με αμινοξικά κατάλοιπα της γειτονικής υπομονάδας. Συγκεκριμένα, φαίνεται στη σύνδεσή του να συμμετέχουν τα κατάλοιπα Γλουταμίνη 89, Αργινίνη 90, Ασπαρτικό 123, Σερίνη 397 και Αργινίνη 463 της ίδιας υπομονάδας, καθώς και η Λυσίνη 391 και η Αργινίνη 400 της γειτονικής, αριστερά κείμενης υπομονάδας. Το ADP, συνδεδεμένο, μειώνει την ενέργεια που χρειάζεται για τη διάνοιξη της καταλυτικής σχισμής και διευκολύνει την απελευθέρωση του προϊόντος από το καταλυτικό κέντρο, ανταγωνιζόμενο έτσι τη δράση του GTP. Σημειώνεται ότι αυτό ισχύει στις συνήθειες, επαρκείς συγκεντρώσεις υποστρώματος και συνενζύμου, όπου το “rate limiting step” της αντίδρασης είναι η απελευθέρωση του προϊόντος. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και συνενζύμου, όπου το “rate limiting step” της αντίδρασης είναι η σύνδεση υποστρώματος και συνενζύμου, το ADP λειτουργεί ως αναστολέας, καθ’ ότι μειώνει τη συγγένεια προς αυτά

Στη θέση πρόσδεσης του ADP βρίσκεται και η δεύτερη θέση πρόσδεσης του συνενζύμου. Είχε παρατηρηθεί παλαιόθεν ότι το ένζυμο παρουσιάζει ανώμαλη κινητική συμπεριφορά ως προς το συνένζυμο: το NADH (όχι όμως το NADPH) λειτουργούσε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ως αναστολέας, ενώ το NAD<sup>+</sup> φαινόταν να λειτουργεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως ενεργοποιητής, και είχε υποτεθεί η ύπαρξη μιας επιπλέον, ρυθμιστικής θέσης σύνδεσης του συνενζύμου (Frieden 1959a, Dalziel και Engel, 1968). Είχε προταθεί από τους Dieter και συν.

(1981), ότι η δεύτερη, αλλοστερική θέση πρόσδεσης του συνενζύμου ταυτίζεται με αυτήν του ADP. Αυτό επιβεβαιώθηκε και κρυσταλλογραφικά (Smith και συν. 2001, Banerjee και συν. 2003). Παρότι προσδένονται στο ίδιο σημείο (αν και με ελαφρώς διαφορετικό προσανατολισμό), το NADH και το ADP έχουν αντίθετη δράση: το «αλλοστερικό» NADH δείχνει συνεργατικότητα με το GTP και το υπόστρωμα στη διατήρηση του ενζύμου σε κλειστή διαμόρφωση, ενώ το ADP εκτοπίζει το NADH και βοηθά στη διάνοιξη της καταλυτικής σχισμής.

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι κάποιες πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε ικανές συγκεντρώσεις στο πράσινο τσάι (epigallocatechin gallate και epicatechin gallate) είναι ισχυροί αναστολείς της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης (Li και συν. 2006, 2007). Και οι αναστολείς αυτοί αποδείχθηκε κρυσταλλογραφικά ότι προσδένονται στη θέση σύνδεσης του ADP (Li και συν. 2011), τροποποιώντας με τρόπο που δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη τη δραστηριότητα του ενζύμου.

Ο δεύτερος σημαντικότερος αλλοστερικός ενεργοποιητής του ενζύμου είναι η L-λευκίνη, της οποίας η τροποποιητική δράση επί της GDH αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Yielding και Tomkins (1961), που παρατήρησαν ότι η λευκίνη μπορούσε να αυξήσει κατά ~50-80% τη δραστηριότητα του ενζύμου. Ο φυσιολογικός ρόλος της ενεργοποίησης από λευκίνη πιθανώς είναι να «δίνει την άδεια» στο ένζυμο να καταβολίσει αμινοξέα, καθώς οι υψηλές της συγκεντρώσεις (η  $SC_{50}$  κυμαίνεται περί το ~0.5-1 mM) σηματοδοτούν επάρκεια της πηγής αυτής. Μέχρι πρόσφατα δεν ήταν γνωστή η θέση πρόσδεσης της λευκίνης στο ένζυμο, θεωρούνταν δε πιθανή ακόμη και η σύνδεσή της εντός της καταλυτικής σχισμής. Λίαν προσφάτως (Tomita και συν. 2011) δείχθηκε με κρυσταλλογραφικές μελέτες της δομής της GDH από το βακτήριο *Thermus thermophilus*, ότι η λευκίνη πιθανότατα προσδένεται στην «κάτω» πλευρά της περιοχής πρόσδεσης του γλουταμικού, στον «πυρήνα» του εξαμερούς, όπου εφάπτονται οι υπομονάδες μεταξύ τους (subunit interface). Σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα για τη σύνδεση αυτή, όπως επιβεβαιώθηκε με μεταλλαξιγένεση στην ανθρώπινη GDH2, φαίνεται να είναι -ακολουθώντας την αρίθμηση των αμινοξέων της ανθρώπινης GDH- η Αργινίνη 151 και το Ασπαρτικό 185 (Tomita και συν. 2011). Ανεξάρτητα από τη θέση πρόσδεσης, φαίνεται ότι και η δράση της λευκίνης σχετίζεται με τις εκτεταμένες αλλαγές διαμόρφωσης του ενζύμου κατά την κατάλυση. Έτσι, όπως θα δούμε στη συνέχεια, αμινοξικές αλλαγές στην αντένα, μακριά από τη θέση σύνδεσης της λευκίνης, μπορούν να καταργήσουν την

ενεργοποίηση από αυτήν (Zaganas και συν. 2002). Ωστόσο, η απαλειφή ολόκληρης της αντέννας καταργεί τη ρύθμιση από ADP και GTP, αλλά επηρεάζει ήπια την ενεργοποίηση από λευκίνη (Allen και συν. 2004).

Ένας άλλος αναστολέας του ενζύμου είναι το παλμιτοϋλο-συνένζυμο A (Palmitoyl-CoA), που φαίνεται να αναστέλλει το ένζυμο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις (Kawaguchi και Bloch 1976, Fahien και Kmietek 1981). Και εδώ, ο φυσιολογικός ρόλος της αναστολής πιστεύεται ότι είναι η παύση του καταβολισμού αμινοξέων όταν υπάρχει επάρκεια σε άλλες πηγές ενέργειας (δηλ. λίπη). Η θέση πρόσδεσης του παλμιτοϋλο-συνένζυμου A δεν έχει προσδιοριστεί. Πάντως, η αντέννα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή αυτή, καθώς η απαλειφή της αντέννας καταργεί παντελώς την αναστολή από παλμιτοϋλο-συνένζυμο A, αλλά και η αντικατάσταση της αντέννας της ανθρώπινης GDH1 από αυτήν του πρωτόζωου *Paramecium tetraurelia* την εξασθενεί κατά πολύ (Allen και συν. 2004).

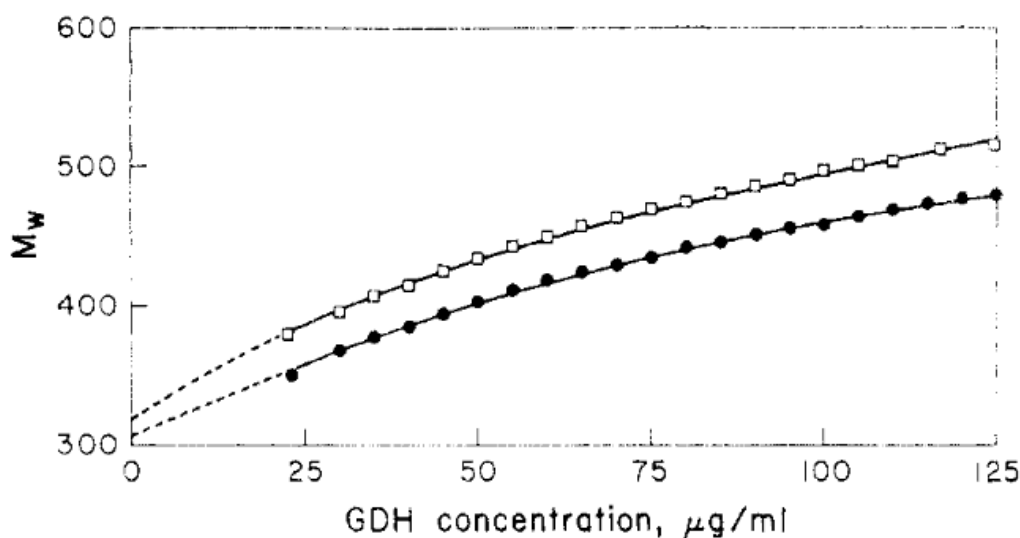
Οι στεροειδείς ορμόνες, όπως η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη, η τεστοστερόνη και το τεχνητό οιστρογονικό ανάλογο διαιθυλστιλβεστρόλη, αναστέλλουν επίσης ισχυρά το ένζυμο (Yielding και Tomkins 1960, Colon και συν. 1986, Li και συν. 2007), αν και σε συγκεντρώσεις που, τουλάχιστον για τη βόειο GDH και το ανθρώπινο ανάλογό της hGDH1, είναι πιθανότατα πάνω από τις φυσιολογικές. Και εδώ, η ακριβής θέση πρόσδεσης των στεροειδών δεν έχει προσδιοριστεί. Ωστόσο, κρυσταλλογραφικές μελέτες που έχουν γίνει με δομικά παρόμοια υδρόφοβα μόρια, όπως το αντισηπτικό εξαχλωροφαίνιο και το αντιελμινθικό διθειονόλη (bithionol), δείχνουν ότι οι ενώσεις αυτές προσδένονται στον «πυρήνα» του εξαμερούς, στο χώρο που σχηματίζεται ανάμεσα στις υπομονάδες (Li και συν. 2009), έτσι πιθανότατα στην ίδια περιοχή του μορίου βρίσκεται και η θέση σύνδεσης των οιστρογόνων, χωρίς όμως να είναι σαφές με ποιά αμινοξικά κατάλοιπα αλληλεποδρούν. Πάντως, και η σύνδεση των υδρόφοβων αυτών μορίων φαίνεται να ευνοεί την «κλειστή» διαμόρφωση του μορίου, την οποία πιθανότατα και ευνοεί. Ας σημειωθεί ότι η αναστολή από τις ουσίες αυτές δεν είναι ίδιον των GDH από θηλαστικά: η GDH του βλεφαριδοφόρου πρωτόζωου η *Tetrahymena thermophila* αναστέλλεται παρόμοιες με την hGDH1 συγκεντρώσεις, ενώ σε αρκετά μεγαλύτερες αναστέλλεται και η GDH του κολοβακτηριδίου *Escherichia coli* (Li και συν. 2009).

Πέραν των αλλοστερικών τροποποιητών που περιγράψαμε, υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός από ουσίες που επίσης αναστέλλουν τη δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης, οι περισσότερες σε συγκεντρώσεις μάλλον απίθανες για τα μιτοχόνδρια -οπότε είναι ασαφές αν η αναστολή από αυτές έχει φυσιολογική σημασία- και τις οποίες απλά θα απαριθμήσουμε: διάφορα κλασικά αντιψυχωσικά (Shemisa και Fahien 1971, Tamir και συν. 1981, Couee και Tipton 1990a,b, Ghous και Townshend 1999), η θυροξίνη (Caughey και συν. 1957, DiPrisco και συν. 1965, Ghous και Townshend 2000), μέταλλα όπως ο άργυρος, ο ψευδάργυρος, το μαγνήσιο και το αλουμίνιο (Hellerman και συν. 1958, Fahien και συν. 1985, Fahien και συν. 1990, Kuo και συν. 1994, Zatta και συν. 2000, Yang και συν. 2003), διάφορα παράγωγα του ισοφθαλικού οξέος (Rogers και συν. 1972, Boots και συν. 1976), ισοκινολινικά αλκαλοειδή (Konár 1983).

Ας αναφέρουμε, τέλος, ότι πέραν των αλλοστερικών τροποποιητών που περιγράψαμε, η δραστηριότητα του ενζύμου *in vitro* επηρεάζεται και από τα χαρακτηριστικά του διαλύματος στο οποίο μετράται. Φαίνεται ότι η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού από τις περισσότερες GDH γίνεται καλύτερα σε αλκαλικό pH ~8.5-9.0, ενώ το βέλτιστο pH για την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού είναι συνήθως λίγο χαμηλότερο γύρω στο 7.8-8.0 (Hudson και Daniel. 1993). Παράλληλα, σε χαμηλά pH (~7.0) φαίνεται ότι το ADP αναστέλλει αντί να ευοδώνει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού, ενώ ενεργοποιεί ελάχιστα την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού (Bailey και συν. 1982). Η αναστολή από GTP φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά σε ένα εύρος pH από 7.0 έως 9.0 (Smith και Piszkiwicz, 1973). Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος επίσης έχει σημασία. Σε διαλύματα Tris-Acetate, το ένζυμο συχνά ήταν ασταθές· σε διαλύματα φωσφορικού νατρίου ή καλίου το ένζυμο είναι αρκετά σταθερότερο (Engel και Dalziel 1969), φαίνεται όμως ότι στα φωσφορικά αυτά διαλύματα, ιδιαίτερα σε υψηλή ιοντική ισχύ, η ανασταλτική δράση του GTP εξουδετερώνεται (DiPrisco και Strecker 1969, DiPrisco 1975), πιθανώς λόγω δράσης του φωσφορικού ανιόντος στο θύλακο του GTP.

### 1.2.3 Ο πολυμερισμός της γλουταμικής αφυδρογονάσης

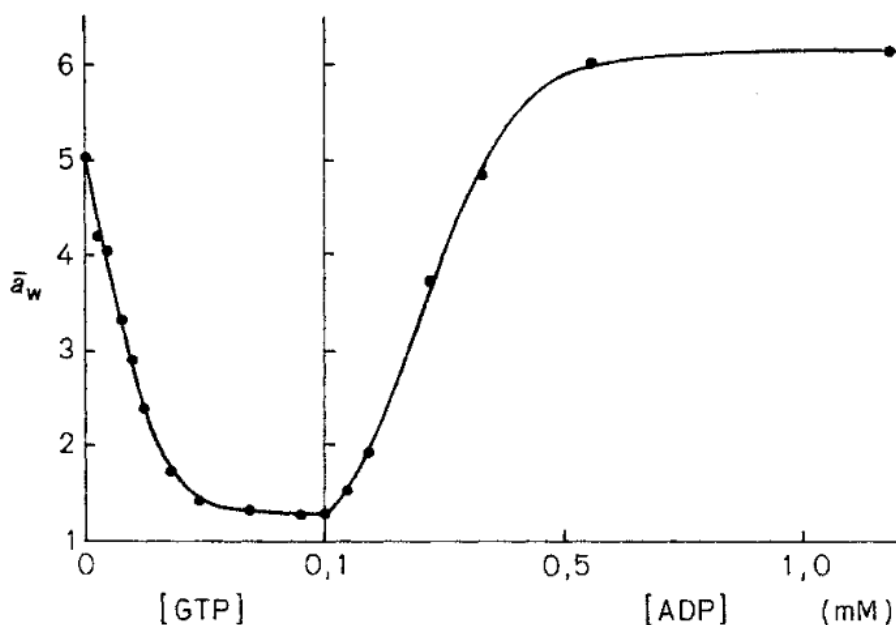
Ήδη από τη δεκαετία του '50 είχε δειχθεί, αρχικά με πειράματα υπερφυγοκέντρωσης, ότι η βόειος GDH, σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο διάλυμα (κατά κανόνα πάνω από 0.1-0.5 mg/ml), μπορεί να έχει μεγαλύτερο φαινομενικό μοριακό βάρος, μέχρι και πάνω από 1300 kD (Olsen και Anfinsen 1952). Αυτό ισχύει και για το ηπατικό ένζυμο από άνθρωπο (Kubo και συν. 1959), όπως και για τις GDH μιας πληθώρας από άλλα ζωϊκά είδη (π.χ. χοίρο, κοτόπουλο, βάτραχο κ.α.), αλλά όχι για τα ένζυμα από τόνο και αρουραίο (βλ. σχετική ανασκόπηση Smith και συν. 1975). Τα πολυμερή που σχηματίζονται, αποδείχθηκε με μελέτες crosslinking ότι έχουν τη μορφή επιμήκων αλυσίδων (Josephs και συν. 1973). Ο πολυμερισμός αυτός είναι αναστρέψιμος, και το «μέσο μοριακό βάρος» των πολυμερών εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα μέσα από μια δυναμική διαδικασία που επηρεάζεται από πάρα πολλούς παράγοντες. Έτσι, ο πολυμερισμός αυτός φαίνεται να ευνοείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Frieden 1962b, Reisler και Eisenberg 1971, Gauper και συν. 1974, Cassman και Schachman 1971), σε χαμηλότερα pH (Bitensky και συν. 1965, Markau και συν. 1971, Gauper και συν. 1974), σε υψηλή ιοντική ισχύ (Bitensky και συν. 1965, Markau και συν. 1971, Gauper και συν. 1974) και σε παρουσία φωσφορικών αλάτων (Frieden 1962b). Παραθέτουμε ενδεικτικά την εικόνα 1.4, από παλαιά μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμου.



**Εικ. 1.4:** Πολυμερισμός της βοείου GDH σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενζύμου σε θερμοκρασία 4°C (λευκά τετράγωνα) και 19°C (μαύροι κύκλοι). Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Cassman και Schachman (1971).



Το ανηγμένο συνένζυμο NADH φάνηκε σε αρκετές μελέτες ότι αναστέλλει τον πολυμερισμό αυτό (Frieden, 1959a,b, Huang και Frieden 1969 & 1972, Fisher και συν. 1972). Επιπλέον, οι αλλοστερικοί ανστολείς του ενζύμου, όπως το GTP (Frieden 1959b, Huang και Frieden 1969 & 1972, Dessen και Pantaloni 1973, Dieter και συν. 1981) και τα οιστρογόνα (Yielding και Tomkins 1960) φαίνεται ότι εμποδίζουν τον πολυμερισμό, ενώ αυτή η «αποπολυμεριστική» δράση τους αναστέλλεται από το ADP (Frieden 1959b, Fisher και συν. 1972, Dessen και Pantaloni 1973) και τη λευκίνη (Yielding και Tomkins 1961). Παραθέτουμε ενδεικτικά την εικόνα 1.5, από παλαιά μελέτη της επίδρασης πουρινικών αλλοστερικών τροποποιητών στον πολυμερισμό του ενζύμου.



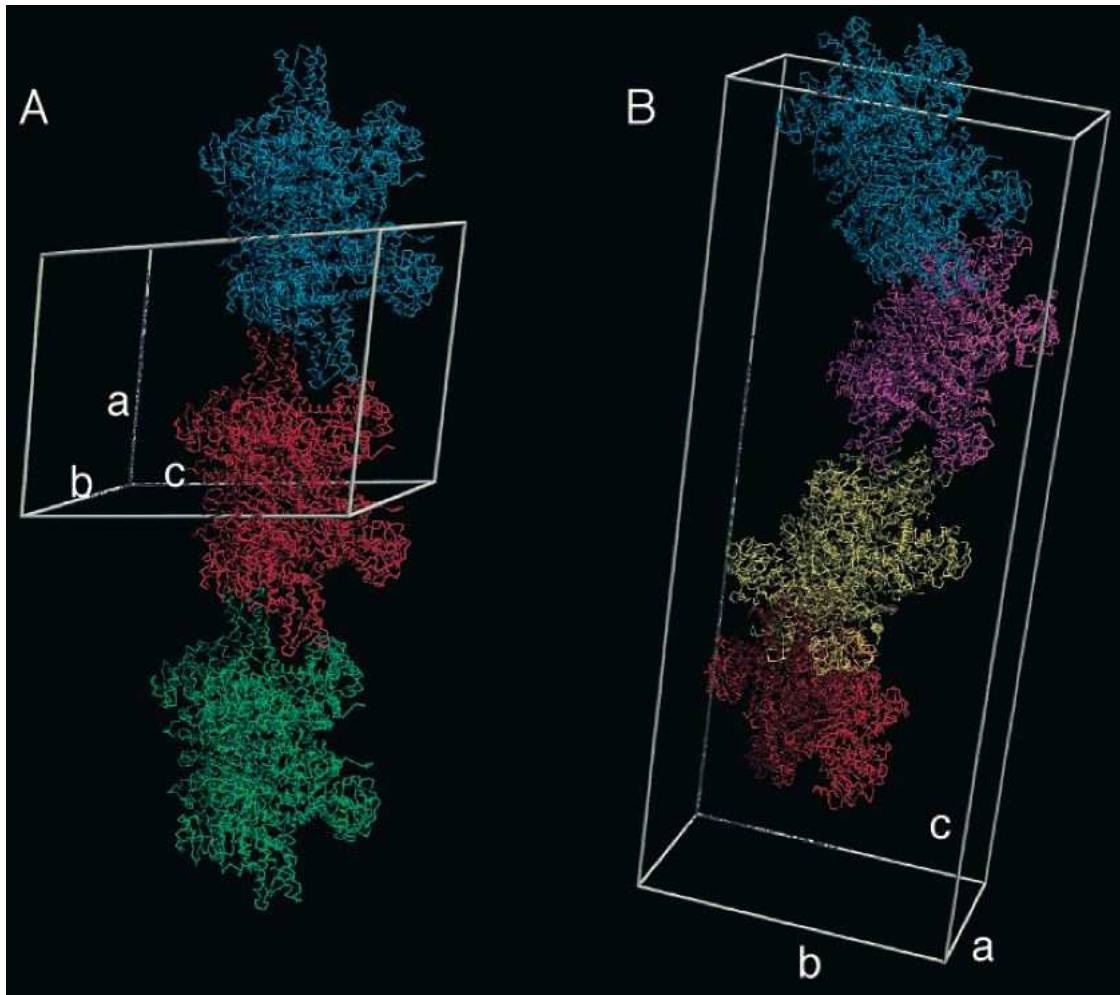
**Εικ. 1.5:** Πολυμερισμός-αποπολυμερισμός βοείου GDH σε σταθερή συγκέντρωση 2 mg/ml με την επίδραση πουρινικών νουκλεοτιδίων. Ο δείκτης  $\bar{a}_w$  υποδηλώνει το «βαθμό πολυμερισμού», ήτοι το μέσο αριθμό εξαμερών ανά αλυσίδα. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Dessen και Pantaloni (1973).

Βάσει των ευρημάτων αυτών είχε προταθεί από αρκετούς ερευνητές ότι, όχι μόνο η αλλοστερική ρύθμιση, αλλά και η ίδια η δραστηριότητα της βοείου GDH σε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών, εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού των εξαμερών του ενζύμου, υποθέτοντας μια λειτουργική σχέση ανάμεσα στον πολυμερισμό και την καταλυτική δραστηριότητα (Frieden 1959a, Yielding και Tomkins 1960, Frieden 1962a, 1967, Kempfle και συν. 1972). Βασική μεθοδολογική αδυναμία των μελετών

αυτών θεωρήθηκε πως ήταν ότι οι δύο ιδιότητες, δηλαδή η μεταβολή της δραστηριότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του ενζύμου αφ' ενός και ο πολυμερισμός του ενζύμου αφ' ετέρου, ήταν τεχνικά δύσκολο να ελεγχθούν στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Τελικά, τουλάχιστον στην περίπτωση της βοείου GDH, η υπόθεση αυτή καταρρίφθηκε με διάφορες προσεγγίσεις (Fisher και συν. 1962, Josephs και συν. 1973, Zeiri και Reisler, 1978) και σήμερα θεωρείται ότι ο βαθμός πολυμερισμού και η δραστηριότητα της GDH δεν αλληλοεξαρτώνται, τουλάχιστον όσον αφορά τη δραστηριότητα σε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών («βασική δραστηριότητα») και όσον αφορά τη βόειο GDH.

Όπως είπαμε, όλα τα παραπάνω αφορούν τη συμπεριφορά του ενζύμου σε διάλυμα *in vitro*. Το αν ο πολυμερισμός που παρατηρείται στο διάλυμα συμβαίνει και *in vivo*, εντός του μιτοχονδρίου, δεν έχει διερευνηθεί. Έτσι, δε μπορεί να αποκλειστεί εντελώς το ενδεχόμενο να είναι ο πολυμερισμός ένας *in vivo* ρυθμιστικός μηχανισμός, καθώς η συγκέντρωση της GDH σε ορισμένους ιστούς (>2mg/ml στο ήπαρ) είναι αρκετά υψηλή ώστε να πολυμεριστούν τα εξαμερή της.

Πάντως, ο πολυμερισμός αυτός συμβαίνει και στο κρυσταλλωμένο ένζυμο, τόσο στην «κλειστή» διαμόρφωση του (ατελέσφορο σύμπλοκο με γλουταμικό, NADH και GTP), όσο και στην «ανοικτή» (απο-ένζυμο). Όμως, όταν το ένζυμο είναι «ανοικτό», τα εξαμερή σχηματίζουν πολυμερή, τα οποία είναι μεγαλύτερα και διαθέτουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξαμερών (και πιο συγκεκριμένα μεταξύ των αντενών τους και των περιοχών πρόσδεσης NAD<sup>+</sup>), απ' ότι τα πολυμερή των «κλειστών» ατελέσφορων συμπλόκων (Smith και συν. 2002). Αυτός ο μεγαλύτερος βαθμός πολυμερισμού παρατηρείται και επί παρουσίας ADP στο διάλυμα κρυστάλλωσης (Banerjee και συν. 2003) και είναι συμβατός με το γεγονός ότι το ADP ευνοεί την ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου, η οποία επιτρέπει μεγαλύτερο βαθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξαμερών (βλ. εικ. 1.6). Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά ρίχνουν φως στις παρατηρήσεις ότι το ADP προάγει τον πολυμερισμό των εξαμερών του ενζύμου, ενώ το GTP και το NADH τον ανταγωνίζεται. Και, εφ' όσον καταστάσεις που επάγουν την ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου (η οποία, όπως είδαμε, συνδέεται κατά κανόνα με αυξημένη δραστηριότητα) συνεπάγονται και ευκολότερο πολυμερισμό, ίσως ξαναθέτουν το ζήτημα του κατά πόσο η δραστηριότητα της GDH και ο πολυμερισμός της μπορούν να συνδεόνται.



**Εικ. 1.6:** Πολυμερή της γλουταμικής αφυδρογονάσης όπως παρατηρήθηκαν σε κρυσταλλωμένο «ατελέσφορο» σύμπλοκο με γλουταμικό, NADH και GTP (A) και αποένζυμο (B). Φαίνεται η μεγαλύτερη έκταση των αλληλεπιδράσεων δεξιά. Τα λευκά παραλληλόγραμμα υποσημαίνουν τα όρια της κρυσταλλογραφικής μονάδας. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Banerjee και συν. (2003).

### **1.3. Τα δύο γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* και οι δύο γλουταμικές αφυδρογονάσες (hGDH1 και hGDH2) στον άνθρωπο.**

Υπήρχαν ενδείξεις ότι στον εγκέφαλο των θηλαστικών ενδεχομένως υπάρχουν περισσότερες της μίας GDH πρωτεΐνες. Έτσι, π.χ., στον εγκέφαλο αρουραίου είχαν φανεί υψηλά επίπεδα GDH δραστηριότητας, αλλά με διαφορετικές κινητικές ιδιότητες από αυτές του ηπατικού ενζύμου (Chee και συν. 1979), και αργότερα οι Colon και συν. (1986) απομόνωσαν 2 ισομορφές GDH μετά από υπερφυγοκέντριση. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, οι Plaitakis και συν. (1984) είχαν διαπιστώσει ότι πιθανώς υπάρχουν δύο μορφές GDH με διαφορετική θερμοευαισθησία, ενώ οι Hussain και συν. (1989) αποκάλυψαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων 4 GDH ισοπρωτεΐνες, και έδειξαν ότι σε κύτταρα από γλοιώμα εκφράζεται μία μόνο από αυτές. Εύλογο ήταν το ερώτημα εάν αυτές οι διαφορετικές ισομορφές προέρχονται από διαφορετικά γονίδια ή από επεξεργασία σε μεταγραφικό είτε μετα-μεταφραστικό επίπεδο από το ίδιο γονίδιο. Οι αρχικές μελέτες (Mavrothalassitis και συν. 1988, Michaelidis και συν. 1993) έδειξαν ότι υπάρχουν πολλαπλών ειδών μεταγραφήματα και ότι υπάρχει μια οικογένεια από περισσότερα του ενός γονίδια, τα οποία, όμως δεν κατέστη αρχικά δυνατόν να διευκρινιστεί κατά πόσο, πλην του γονιδίου *GLUD1* (για το χαρακτηρισμό του βλ. Mavrothalassitis και συν. 1988, Anagnou και συν. 1989 και 1993, Deloukas και συν. 1993) αντιπροσωπεύουν μη λειτουργικά ψευδογονίδια ή εκφραζόμενα γονίδια. Τελικά, οι Shashidharan και συν. (1994) ανίχνευσαν σε βιβλιοθήκη cDNA από ανθρώπινο αμφιβληστροειδή ένα καινούργιο cDNA που κωδικοποιούνταν από ένα γονίδιο χωρίς ιντρόνια στο χρωμόσωμα X, το οποίο ονόμασαν *GLUD2*, ενώ με την απομόνωση ολικού RNA από διάφορους ιστούς και με τη χρήση ανάστροφης τρανσκριπτάσης διαπίστωσαν πως η προερχόμενη από το *GLUD2* πρωτεΐνη εκφραζόταν στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, στους όρχεις και, σε μικρότερο βαθμό, στον εγκέφαλο.

#### **1.3.1 Τα γονίδια *GLUD1* και *GLUD2***

Στον άνθρωπο υπάρχουν, λοιπόν, δύο λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν την γλουταμική αφυδρογονάση, το *GLUD1* και το *GLUD2*. Το γονίδιο *GLUD1* είναι ορθόλογο του βασικού γονιδίου για τη γλουταμική αφυδρογονάση που ανευρίσκεται

σε όλα τα θηλαστικά. Το γονίδιο *GLUD2* υπάρχει, εκτός από τον άνθρωπο, μόνο σε ανώτερα πρωτεύοντα όπως ο γίββων, ο χιμπατζής και ο γορίλλας, όπως θα δούμε στη συνέχεια. Ας σημειωθεί ότι, εκτός από τα δυο λειτουργικά γονίδια της GDH, έχουν ανιχνευθεί και ψευδογονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι Michaelidis και συν. (1993) αναγνώρισαν 4 υποτιθέμενα κολοβωμένα ψευδογονίδια. Τα *GLUDP2* και *GLUDP3* εντοπίστηκαν στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q11.2 και 10q22.1 αντίστοιχα. Το *GLUDP5*, τα χαρακτηριστικά του οποίου δείχνουν ότι πρόκειται για ένα κολοβωμένο ψευδογονίδιο, εντοπίστηκε επίσης στο χρωμόσωμα 10p11.2, ενώ το *GLUDP4* εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 18. Ανάλυση BLAST του ανθρώπινου γονιδιώματος με αλληλουχία αναζήτησης του mRNA του *GLUD1* δείχνει την πιθανότητα ύπαρξης και άλλων γονιδιακών τόπων, που η ανάλυση των χαρακτηριστικών τους δείχνει ότι πρόκειται για επιπλέον ψευδογονίδια, όπως λ.χ. τρία ψευδογονίδια στην θέση 10q11.22 με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, τα οποία αντιστοιχούν στο *GLUDP2* και τα ονομάζουμε *GLUDP2A*, *GLUDP2B*, *GLUDP2C* αντιστοίχως. Η πλειοψηφία των ψευδογονιδίων αυτών φαίνεται να έχουν προκύψει με μηχανισμούς γονιδιακού διπλασιασμού, όπως η ρετρομετάθεση.

Το γονίδιο *GLUD1*, που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 10q23.3, είναι ένα γονίδιο εκφραζόμενο σε όλους τους ιστούς (housekeeping), και περιέχει 13 εξόνια. Τα 13 αυτά εξόνια είναι ταυτόσημα με τα αντίστοιχα μέρη του *GLUD1*-cDNA, και δεν έχει μέχρι στιγμής δειχθεί τροποποίηση του μεταγραφήματος με εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) ή συναφείς μηχανισμούς. Το πρώτο εξόνιο (540 bp), το οποίο είναι και το μεγαλύτερο, περιέχει την 5'-αμετάφραστη αλληλουχία (5'-UTR), την κωδικοποιούσα αλληλουχία για το μιτοχονδριακό οδηγό πεπτίδιο (leader peptide) και τα πρώτα 91 κωδικόνια της ώριμης hGDH1 πρωτεΐνης. Το συνολικό μέγεθος του γονιδίου είναι περίπου 45 kb, ενώ το μέγεθος των ιντρονίων ποικίλλει σε μήκος από 89 bp (ιντρόνιο 6) έως και 18 kb (ιντρόνιο 1).

Το γονίδιο *GLUD2*, που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση Xq24- q25, φάνηκε αρχικά να εκφράζεται μόνο στον νευρικό ιστό και στους όρχεις – θα δούμε στη συνέχεια ότι, σύμφωνα με πιο πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας, μάλλον εκφράζεται και σε άλλα όργανα. Δεν διαθέτει καθόλου ιντρόνια, γεγονός που εξηγείται από τον τρόπο δημιουργίας του μέσω μιας ρετρομετάθεσης μιας περιοχής

μήκους ~3.2 kb από mRNA του *GLUD1* στο χρωμόσωμα X (Shashidharan και συν. 1994, Burki και Kaessman, 2004).

Και στα δύο γονίδια, το πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) προβλέπει ένα πολυπεπτίδιο μήκους 558 αμινοξέων, η αμινοξική αλληλουχία του οποίου για το *GLUD1* συμφωνεί με τα δεδομένα της αμινοξικής αλληλουχίας του ηπατικού ενζύμου που είχε δημοσιευθεί από παλιά (Julliard και Smith 1979). Από αυτά τα 558 αμινοξέα, τα πρώτα 53 στο αμινοτελικό άκρο αντιστοιχούν σε μια αμινοξική αλληλουχία «οδηγού πεπτιδίου» (leader peptide) για τη μεταφορά της πρωτεΐνης προς το εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Το οδηγό αυτό πεπτίδιο αποκόπτεται στη συνέχεια και παραμένουν τα 505 αμινοξέα που σχηματίζουν τις υπομονάδες του εξαμερούς.

Στο οδηγό πεπτίδιο, τα δύο γονίδια διαφέρουν στην κωδικοποίηση 9 από τα 53 αμινοξέα. Έχει αποδειχθεί (Μαστοροδήμος, 2007, Mastorodemos και συν. 2009) ότι και η hGDH2, δηλ. η ανθρώπιος γλουταμική αφυδρογονάση εκ του *GLUD2*, εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια, όπως ακριβώς και η hGDH1 (δηλ. το προϊόν του *GLUD1* γονιδίου), για την οποία αυτό ήταν ήδη γνωστό (Aoki και συν. 1987, Rothe και συν. 1994). Επίσης, είναι σαφές ότι τη μιτοχονδριακή του εντόπιση το ένζυμο την οφείλει στο οδηγό πεπτίδιο, καθώς σε ολική ή μερική απαλειφή του leader peptide η ειδική αυτή εντόπιση καταργείται (Κοτζαμάνη, 2006, Mastorodemos και συν. 2009). Μάλιστα, οι Rosso και συν. (2008) έδειξαν ότι μερικές από αυτές τις 9 αμινοξικές αλλαγές φαίνεται να έχουν γίνει στο *GLUD2* υπό «εξελικτική πίεση», και ότι το leader peptide του *GLUD2* ίσως επάγει ακόμη πιο αποτελεσματικά τη μετακίνηση της πρωτεΐνης προς το μιτοχόνδριο. Ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στη διδακτορική διατριβή του Β. Μαστοροδήμου (2007) και στη διπλωματική εργασία της Δ. Κοτζαμάνη (2006), που πραγματεύονται το θέμα της υποκυτταρικής εντόπισης των hGDH1 και hGDH2

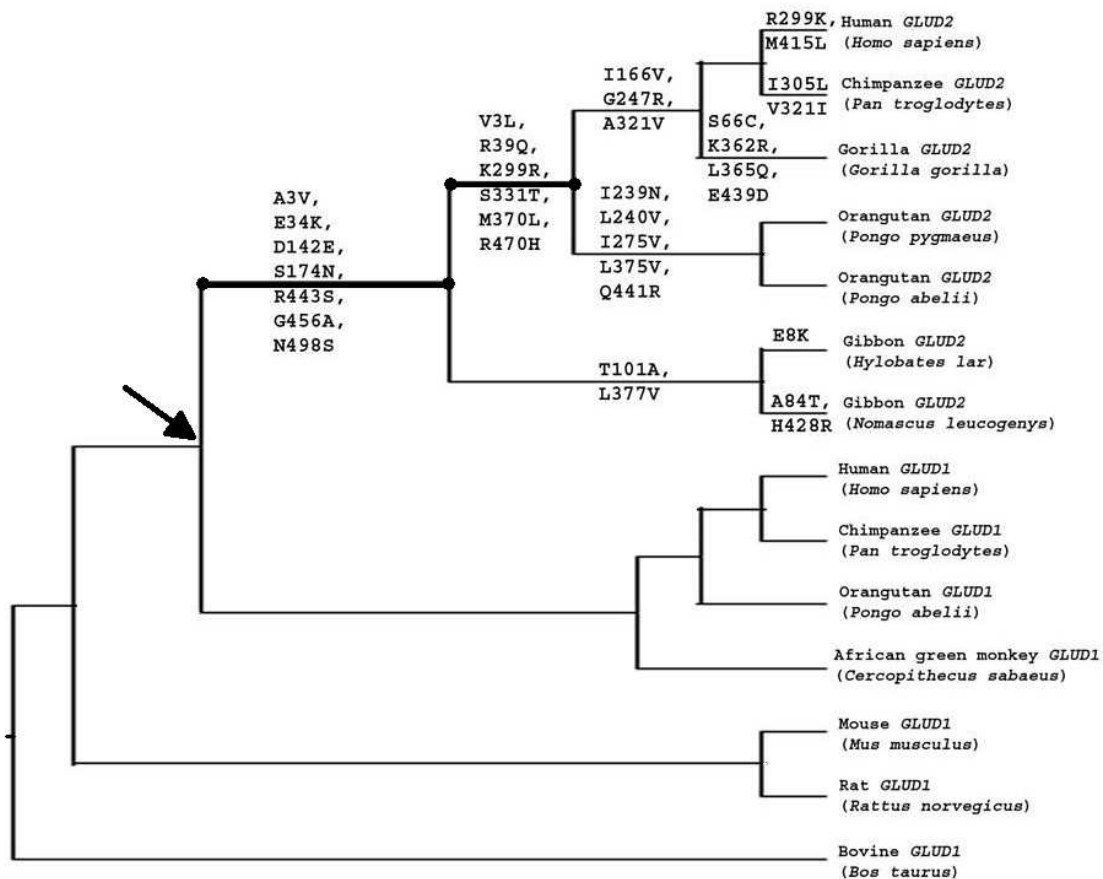
Όσον αφορά τα 505 αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης, τα δύο γονίδια διαφέρουν στην κωδικοποίηση μόνο 15 αμινοξέων (βλ. εικ. 1.7 και υπόμνημα), παρουσιάζοντας 97% ομολογία. Στις 15 αυτές αμινοξικές διαφορές λοιπόν, θα πρέπει να αποδοθούν οι όποιες διαφορές στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των δύο ισοενζύμων hGDH1 και hGDH2. Πριν προχωρήσουμε στις λειτουργικές αυτές διαφορές των ισοπρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα δύο γονίδια, έχει σημασία να εξετάσουμε τα συμπεράσματα της

GLUD1 1 SEAVADREDDPNFFKMVEGFFDRGASIVEDKLVKDLRTKESEEQKRNRVR  
 GLUD2 1 SEAVADREDDPNFFKMVEGFFDRGASIVEDKLVKDLRTKESEEQKRNRVR  
  
 GLUD1 51 GILRIIKPCNHVLSLSFPIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCCKGGIRYS  
 GLUD2 51 GILRIIKPCNHVLSLSFPIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCCKGGIRYS  
  
 GLUD1 101 TDVSVDEVKALASLMTYKCAVVDVPPFGGAKAGVKINPKNYTENELEKITR  
 GLUD2 101 TDVSVDEVKALASLMTYKCAVVDVPPFGGAKAGVKINPKNYTENELEKITR  
  
 GLUD1 151 RFTMELAKKGFIGPGVDVPAPDMTGEREMSWIADTYASTIGHYDINAHA  
 GLUD2 151 RFTMELAKKGFIGPGVDVPAPDMTGEREMSWIADTYASTIGHYDINAHA  
  
 GLUD1 201 CVTGKPI SQGGIHGRI SATGRGVFHG IENF INEASYMS ILGMPGFADKT  
 GLUD2 201 CVTGKPI SQGGIHGRI SATGRGVFHG IENF INEASYMS ILGMPGFADKT  
  
 GLUD1 251 FVVQGF GNVGLHSMRYLHRFGAKC IAVGESD GSIWNPDGIDPKELEDFKL  
 GLUD2 251 FVVQGF GNVGLHSMRYLHRFGAKC IAVGESD GSIWNPDGIDPKELEDFKL  
  
 GLUD1 301 QHGSILGF PKAKPYEGSILEADCDILIPAAEKQLTKSNAPRVKAKIIAE  
 GLUD2 301 QHGSILGF PKAKPYEGSILEADCDILIPAAEKQLTKSNAPRVKAKIIAE  
  
 GLUD1 351 GANGPTTPEADKIFLERNIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKNLNHVSYGR  
 GLUD2 351 GANGPTTPEADKIFLERNIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKNLNHVSYGR  
  
 GLUD1 401 LTFKYERDSNYHLLSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDRISGASEK  
 GLUD2 401 LTFKYERDSNYHLLSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDRISGASEK  
  
 GLUD1 451 DIVHSLAYTMERSARQIMTAMKYNLGLDLRTAAYVNAIEKVFVKVYEA  
 GLUD2 451 DIVHSLAYTMERSARQIMTAMKYNLGLDLRTAAYVNAIEKVFVKVYEA  
  
 GLUD1 501 GVTFT  
 GLUD2 501 GVTFT

**Εικ. 1.7:** Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ώριμων πολυπεπτιδίων που προβλέπονται από τις αλληλουχίες του *GLUD1* και του *GLUD2*. Σημειώνονται οι 15 αμινοξικές αλλαγές Ala3Leu, Glu34Lys, Arg39Gln, Asp142Glu, Ile166Val, Ser174Asn, Gly247Arg, Ala321Val, Ser331Thre, Met370Leu, Met415Leu, Arg443Ser, Gly456Ala, Arg470His, Asn498Ser. Το γράφημα είναι μια ευγενική προσφορά του Ι. Ζαγανά.

εργασίας των γενετιστών Burki και Kaessman (2004) σχετικά με τη δημιουργία και την εξέλιξη του γονιδίου. Στην εργασία τους αυτή, καταρχήν αναζήτησαν και –επί ανευρέσεώς του- αλληλούχισαν το γονίδιο *GLUD2* και τις περιοχές που το πλαισιώνουν σε μία σειρά πρωτευόντων. Έτσι, καταρχάς τεκμηρίωσαν, βάσει συγκρίσεων των περιοχών που πλαισιώνουν το γονίδιο, ότι πρόκειται όντως για ρετρομετάθεση μεταγραφήματος του *GLUD1*. Εν συνεχεία, βάσει διαθέσιμου φυλογενετικού δέντρου των πρωτευόντων και της πληροφορίας σε ποιά από τα είδη υπάρχει ή απουσιάζει το γονίδιο, καθόρισαν ότι η ρετρομετάθεση αυτή έγινε μετά το χωρισμό των γενεαλογικών κλάδων των ανθρωποειδών πιθήκων του παλαιού κόσμου και του αφρικανικού πράσινου πιθήκου, αλλά πριν το χωρισμό των κλάδων του ανθρώπου και του γίββωνα, χρονολογώντας την έτσι ανάμεσα στα 23 και τα 18 εκατομμύρια έτη πριν από την εποχή μας. Τέλος, έχοντας καταρτίσει φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου (βλ. εικόνα 1.8), βάσει του λόγου των μη συνώνυμων προς τις συνώνυμες μεταλλάξεις ( $K_A/K_S$ ) που έγιναν σε κάθε στάδιο, καθόρισαν ότι σε τουλάχιστον δύο από τα στάδια αυτά, στην αρχική φάση της εξέλιξης του *GLUD2*, όπου ο λόγος  $K_A/K_S$  είναι ιδιαίτερα υψηλός, υπήρξε πίεση της φυσικής επιλογής για την εξέλιξη της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, οι αμινοξικές αλλαγές Ala3Val, Glu34Lys, Asp142Glu, Ser174Asn, Arg443Ser, Gly456Ala και Asn498Ser που έγιναν στο πρώτο στάδιο (αμέσως μετά τη ρετρομετάθεση του *GLUD2* και πριν την απόσχιση των επί μέρους κλάδων του φυλογενετικού του δέντρου) και οι αμινοξικές αλλαγές Val3Leu, Arg39Gln, Lys299Arg, Ser331Thr, Met370Leu και Arg470His, που έλαβαν χώρα στο αμέσως επόμενο στάδιο (μετά την απόσχιση του κλάδου του *GLUD2* του γίββωνα), φαίνεται να ήταν προϊόν «θετικής επιλογής» (positive selection) και να έλαβαν χώρα κάτω από εξελικτική πίεση. Όπως θα δούμε σε επόμενο υποκεφάλαιο της εισαγωγής, αλλά και στα αποτελέσματά μας, τουλάχιστον κάποιες από αυτές τις αμινοξικές αλλαγές σχετίζονται με σημαντικότερες διαφορές στις λειτουργικές ιδιότητες των δύο ισοενζύμων.





**Εικ. 1.8:** Φυλογενετικό δέντρο του *GLUD2*, (ενταγμένο αδρά μέσα στο ευρύτερο φυλογενετικό δέντρο των *GLUD* των θηλαστικών), όπου φαίνονται οι αμινοξικές αλλαγές που έλαβαν χώρα σε κάθε στάδιο της εξέλιξης του *GLUD2*. Το μαύρο βέλος δείχνει το σημείο όπου χωρίζεται η φυλογενετική γραμμή του *GLUD2* από του *GLUD1*, μετά τη ρετρομετάθεση που έλαβε χώρα πριν ~18-23 εκατομμύρια έτη. Στους δύο διαδοχικούς κλάδους αμέσως μετά τη δημιουργία του *GLUD2*, που επισημαίνονται με παχύτερη γραμμή, οι Burki και Kaessman (2004) υπολόγισαν βάσει του λόγου  $K_A/K_S$  ότι οι αμινοξικές αλλαγές έλαβαν χώρα υπό την πίεση της φυσικής επιλογής. Πρόκειται για τις αμινοξικές αλλαγές Ala3Val, Glu34Lys, Asp142Glu, Ser174Asn, Arg443Ser, Gly456Ala, Asn498Ser και Val3Leu, Arg39Gln, Lys299Arg, Ser331Thr, Met370Leu, Arg470His. Το φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζεται είναι μια ευγενική παραχώρηση του I. Ζαγανά, που το κατασκεύασε βάσει των διαθέσιμων σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων αλληλουχιών, δεν διαφέρει όμως στα βασικά του στοιχεία από αυτό των Burki και Kaessman (2004).

### 1.3.2 Η έκφραση των *GLUD1* και *GLUD2*

Πολύ λίγα πράγματα θα πούμε σε αυτήν την ενότητα, καθώς λίγα είναι επί του παρόντος τα δημοσιευμένα στοιχεία για το ζήτημα. Όπως αναφέραμε προηγουμένως, οι Shashidharan και συν. (1994) έδειξαν με reverse-transcription PCR ότι υπάρχει έκφραση του *GLUD2* στους όρχεις και τον αμφιβληστροειδή, καθώς και -σε μικρότερο βαθμό- στον εγκέφαλο, αλλά όχι στο ήπαρ, το οποίο φάνηκε να εκφράζει μόνο *GLUD1*. Το ζήτημα της έκφρασης για πολλά χρόνια δεν διερευνήθηκε περαιτέρω συστηματικά. Σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης εστιασμένες σε εντελώς διαφορετικά ερωτήματα, έχουν προκύψει κατά καιρούς και έχουν καταχωρηθεί στις σχετικές ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων και cDNA με αλληλουχίες *GLUD2*, τα περισσότερα από τα οποία αφορούν κακοήθεις νεοπλασίες, ιδίως μελάνωμα, ενώ έχουν προκύψει και μερικές *GLUD2* αλληλουχίες από όρχι και νευρικό ιστό, όπως π.χ. από ιππόκαμπο. Πρόσφατα το ζήτημα έχει ανακινηθεί στο εργαστήριό μας, με την κατασκευή ειδικών αντισωμάτων ικανών να διακρίνουν μεταξύ των δύο ισοενζύμων, hGDH1 και hGDH2. Έτσι, οι Spanaki, Zaganas και συν. (2010) επιβεβαίωσαν με Western-blotting την ύπαρξη hGDH2 πρωτεΐνης στους όρχεις, και μάλιστα σε ποσότητες συγκρίσιμες με αυτές της hGDH1, ενώ με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους έδειξαν ότι η hGDH2 πρωτεΐνη εντοπίζεται στα κύτταρα του Sertoli. Επίσης, τεκμηρίωσαν την ύπαρξη hGDH2 πρωτεΐνης στον εγκεφαλικό φλοιό, και δη στο μετωπιαίο, τον βρεγματικό και τον κροταφικό λοβό, αν και σε ποσότητες σαφώς μικρότερες της hGDH1, και κατέδειξαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ότι η hGDH2 πρωτεΐνη υπάρχει σε ικανές ποσότητες στα αστροκύτταρα, πιθανώς σε πολύ μικρότερες ποσότητες στους νευρώνες, αλλά όχι στα ολιγοδενδροκύτταρα. Σε όλες τις ως άνω ανοσοϊστοχημικές μελέτες, η hGDH2 εμφανιζόταν ως στικτή κυτταροπλασματική χρώση, εύρημα συμβατό με τη μιτοχονδριακή εντόπιση του ενζύμου στο υποκυτταρικό επίπεδο, στην οποία ήδη έχουμε αναφερθεί. Περαιτέρω έρευνες, λίαν πρόσφατες και αδημοσίευτες επί του παρόντος, δείχνουν ότι η hGDH2 πιθανότατα εκφράζεται σε μικρές ποσότητες και σε άλλους ιστούς, όπως στο νεφρό, στα επινεφρίδια (I. Ζαγανάς, Κ. Σπανάκη και συν., αδημοσίευτα δεδομένα). Αυτά τα ευρήματα –καθώς και όσα προκύψουν από τις συνεχιζόμενες έρευνες πάνω στο ζήτημα- είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς ενδέχεται να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση του λειτουργικού ρόλου της hGDH2 στο εγγύς μέλλον.

## **1.4. Οι λειτουργικές διαφορές hGDH1 και hGDH2**

Μετά την ανακάλυψη της ύπαρξης δύο GDH ισοενζύμων, εύλογο ήταν το ερώτημα κατά πόσο αυτά διαφέρουν λειτουργικά. Καθώς η μεν hGDH1 μπορεί να απομονωθεί από ανθρώπινο ιστό (πχ. από ήπαρ, όπου υπάρχει αμιγής σε μεγάλες ποσότητες), αλλά η hGDH2, όπως είδαμε προηγουμένως, δεν εκφράζεται σε κάποιον ιστό κατ' αποκλειστικότητα, οι Shashidharan και συν. (1994, 1997) επέλεξαν να εκφράσουν και τις δύο ισοπρωτεΐνες σε ένα ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, και συγκεκριμένα σε κύτταρα του εντόμου *Spodoptera frugiperda* (Sf9/Sf21). Πριν τις μελέτες που έγιναν στα πλαίσια της παρούσης διατριβής, είχαν γίνει συγκριτικές ενζυμικές μελέτες της hGDH1 και της hGDH2, οι οποίες ωστόσο είχαν πραγματοποιηθεί είτε σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (Shashidharan και συν. 1997, Plaitakis και συν. 2000), είτε σε μερικώς καθαρισμένο ένζυμο (Plaitakis και συν. 2003), ενώ πολύ λίγα πειράματα είχαν γίνει με τη χρήση καθαρισμένου ενζύμου (Mastorodemos και συν. 2005). Τα συμπεράσματα των ως άνω μελετών θα παρουσιάσουμε στη συνέχεια.

### **1.4.1 Κινητικές ιδιότητες και βασική δραστηριότητα**

Οι αρχικές μελέτες (Plaitakis και συν. 2000) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν ότι δύο ισομορφές διέφεραν σημαντικά στις κινητικές ιδιότητες ιδιαίτερα στη συγγένεια σύνδεσης με τα υποστρώματα ( $\alpha$ -κετογλουταρικό και γλουταμικό). Στην αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού, απουσία αλλοστερικών τροποποιητών η  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό ήταν 3-4 φορές μικρότερη για την hGDH2 έναντι της hGDH1. Η προσθήκη L-leucine ή ADP ελάττωνε την  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό στη hGDH1 και την αύξανε στη hGDH2, με αποτέλεσμα η διαφορά τους αυτή να μειώνεται ή και να αντιστρέφεται. Στην αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού, τόσο παρουσία L-leucine (10 mM), όσο και ADP (0.05-0.1 mM), η  $K_m$  για το γλουταμικό ήταν 2-3 φορές μικρότερη για την hGDH2 έναντι της hGDH1 (Plaitakis και συν. 2000). Να σημειώσουμε, ωστόσο ότι αυτή η μεταβολή της  $K_m$  για το υπόστρωμα με την προσθήκη ADP δεν επιβεβαιώθηκε, όταν η ανασυνδασμένη hGDH1 και η ανθρώπινη ηπατική GDH μελετήθηκαν συγκριτικά σε καθαρή μορφή (Zaganas και Plaitakis 2002).

Σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, οι Shashidharan και συν. (1997) διαπίστωσαν ότι σε pH 8.0, τα δύο ισοένζυμα, ενεργοποιημένα πλήρως με 1 mM ADP, παρουσίαζαν συγκρίσιμες ειδικές δραστηριότητες. Ωστόσο, η hGDH1 εμφάνιζε επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών δραστηριότητα ~35% αυτής που μετράται σε πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου με 1 mM ADP (δηλ. της μέγιστης), ενώ η hGDH2 ~2% της μέγιστης. Παρόμοια ήταν τα ευρήματα και στις επόμενες μελέτες με αδρά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν. 2000), όπου η hGDH1 εμφάνιζε βασική δραστηριότητα ~40%, ενώ η hGDH2 ~4% της μέγιστης, καθώς και με τη χρήση καθαρισμένου ενζύμου (Mastorodemos και συν. 2005), όπου η hGDH1 εμφάνιζε βασική δραστηριότητα ~35%, ενώ η hGDH2 ~6%.

Έτσι, όσον αφορά τη hGDH2, οι μελέτες συμφωνούσαν μεταξύ τους στο ότι έχει μια βασική δραστηριότητα κατά πολύ (από 6 έως και ~20 φορές) χαμηλότερη της hGDH1. Όσον αφορά τη hGDH1, τα ευρήματα ήταν συμβατά με όσα ήταν γνωστά για την ομόλογή της βόειο ηπατική GDH, που, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 1.2.2, αυξάνει τη δραστηριότητά της κατά 2½ φορές με την επίδραση του ADP (άρα έχει ~40% βασική δραστηριότητα), αλλά και με τα ευρήματα από διάφορες μελέτες για την απομονωμένη από ανθρώπινο ιστό ή ανασυνδυασμένη hGDH1 (π.χ. Zaganas και συν. 2002, Stanley και συν. 2000).

#### **1.4.2 Επίδραση του pH στη δραστηριότητα του ενζύμου**

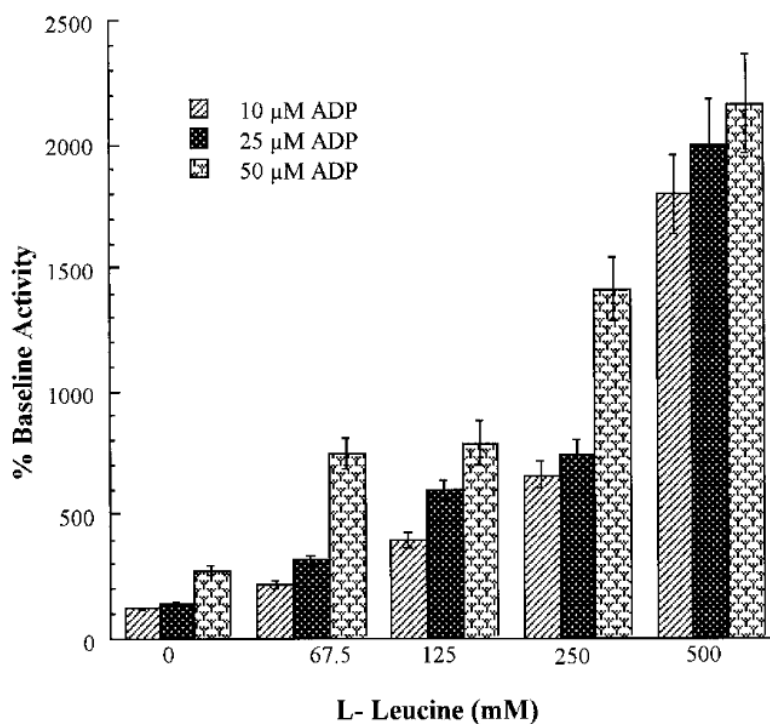
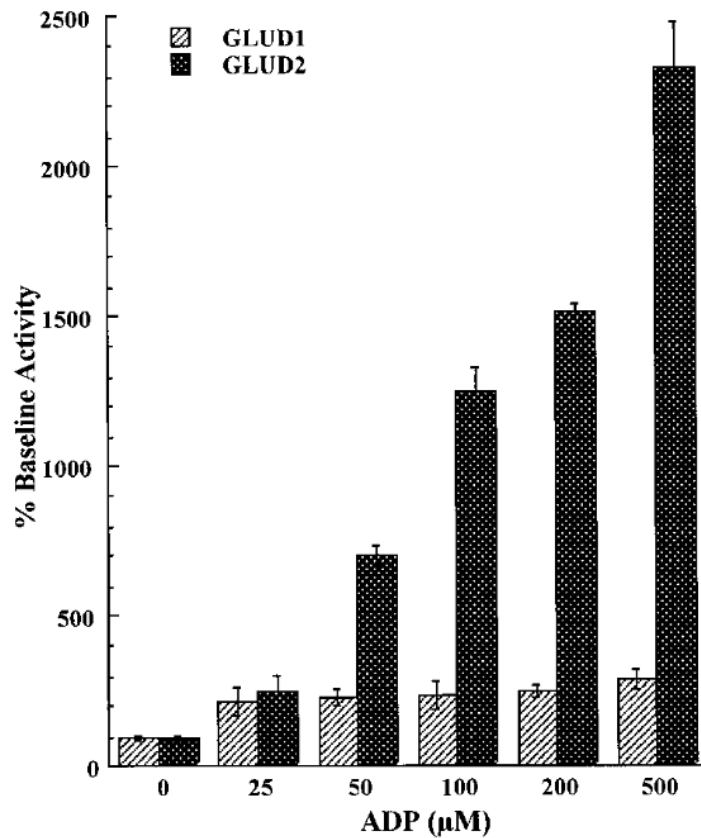
Στην αρχική μελέτη με αδρά εκχυλίσματα των Shashidharan και συν. (1997), τα σχετικά πειράματα, που έγιναν σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M, έδειξαν ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH1 είναι μεγαλύτερη σε pH 8.0, και ότι ήταν μειούμενη σε χαμηλότερο pH, (έως κατά 75% σε pH 6.5), ενώ αντίθετα η βασική δραστηριότητα της hGDH2 παρέμενε ανεπηρέαστη. Η πτώση του pH ελάττωνε την ενεργοποίηση από ADP και των δύο ισοενζύμων, που εμφάνιζαν αμφοτέρα μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε pH 8.0, όμως συγκριτικά η επίδραση αυτή ήταν ηπιότερη στη hGDH2. Σε μερικώς καθαρισμένο ένζυμο, οι Plaitakis και συν. (2003) είδαν ότι η hGDH2 είχε σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα σε pH 7.5, τόσο παρουσία 1 mM ADP όσο και παρουσία 0.1 mM ADP, απ' ότι σε pH 8.0 ή 7.0. Στη hGDH1, με τις ίδιες συγκεντρώσεις ADP, οι διαφορές ανάμεσα στη δραστηριότητα

σε pH 8.0 και 7.5 δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, όμως η δραστηριότητα σε pH 7.0 ήταν σαφώς μειωμένη.

### 1.4.3 Ενεργοποίηση από ADP και L-λευκίνη

Οι Shashidharan και συν. (1997) σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξαν σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα ότι η προσθήκη μικρών, φυσιολογικών (δηλ. εντός των *in vivo* συγκεντρώσεων) ποσοτήτων ADP (0.010 - 0.050 mM τελικές συγκεντρώσεις) ενεργοποιούσε στην αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης τη hGDH2 κατά 200-1000 % ενώ τη hGDH1 κατά 25-100%. Προσθήκη ADP 1.0 mM ενεργοποιούσε τη hGDH2 κατά ~6000% (δηλ. αύξανε 60 φορές τη δραστηριότητά του σε σχέση με τη βασική), ενώ την hGDH1 ~250 % ( 2½ φορές). Οι Plaitakis και συν. (2000) εξέτασαν την επίδραση του ADP στην αντίδραση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού και βρήκαν πως η προσθήκη 0.025–1.0 mM ADP ενεργοποίησε τη hGDH2 κατά 170–2230% ενώ τη hGDH1 ισοένζυμο κατά 150–250% (βλ. εικ. 1.9). Και πάλι σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, οι Plaitakis και συν. (2003), στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης διαπίστωσαν αντίστοιχου μεγέθους ενεργοποίηση των δύο ισοενζύμων όπως στις προηγούμενες μελέτες, και προσδιόρισαν την SC<sub>50</sub> της hGDH1 στα 27.4±2.2 μM ADP και της hGDH2 στα 85.1±7.9 μM ADP.

Και στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη, η hGDH2, ξεκινώντας από χαμηλότερη βασική δραστηριότητα, ενεργοποιείται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Έτσι, στα πειράματα των Plaitakis και συν. (2000) σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, η παρουσία 1.0 mM L-λευκίνης στο διάλυμα ενίσχυσε την δραστηριότητα της hGDH2 κατά ~1600%, ενώ της hGDH1 κατά ~75 %. Συγκεντρώσεις λευκίνης θεωρούμενες φυσιολογικές (67.5–125 μM) ελάχιστα ενεργοποιούσαν την hGDH2 (μόνο κατά 5 και 30% αντίστοιχα). Όμως, σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων λευκίνης, η προσθήκη μικρών ποσοτήτων ADP (10, 25, ή 50μM) επέτρεπε στη λευκίνη να ενισχύσει την δραστηριότητα της hGDH2 κατά 300, 500 και 700% αντίστοιχα. Μόνο του το ADP σε αυτές τις συγκεντρώσεις ενίσχυε τη δραστηριότητα της hGDH2 κατά 20, 40 και 170% αντίστοιχα. Έτσι, στην hGDH2, το ADP και η λευκίνη επεδείκνυαν (σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις των δύο ενεργοποιητών) μια συνέργεια, που δεν παρατηρείτο στη hGDH1 (βλ. εικ. 1.9).



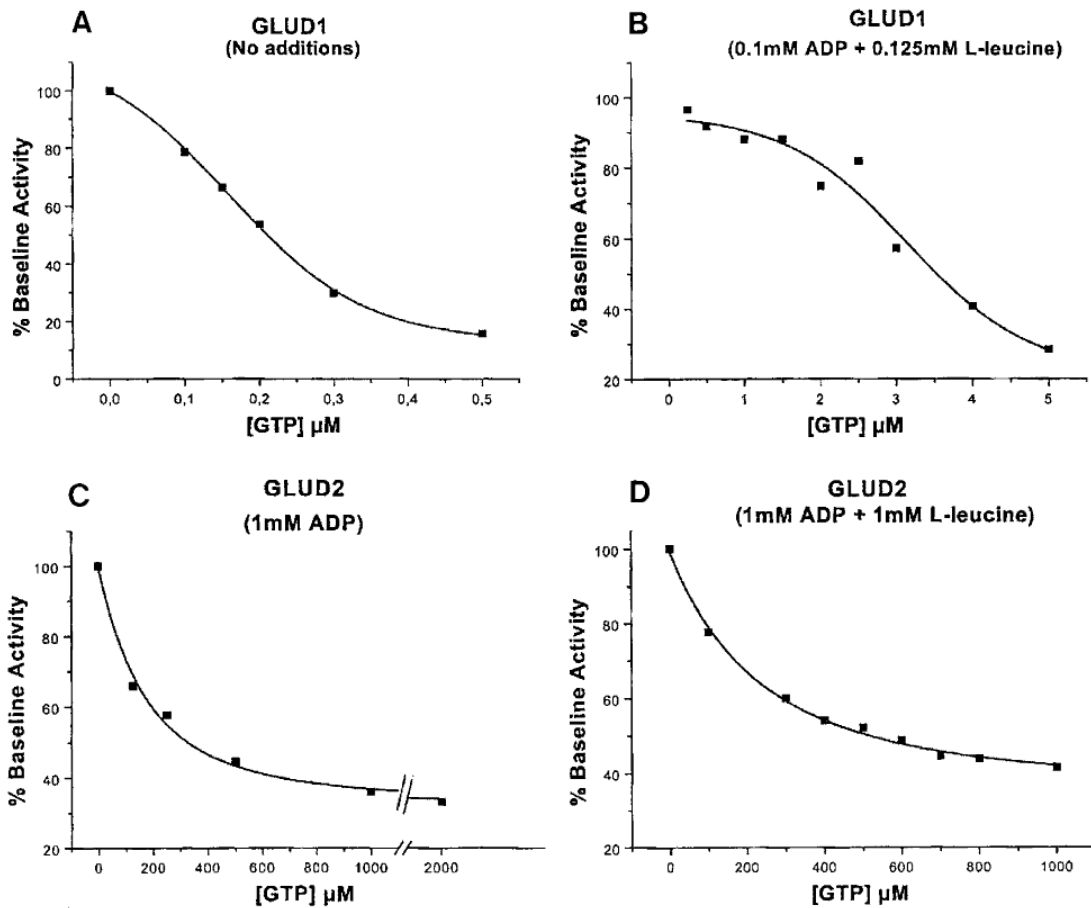
**Εικ. 1.9:** Ανω: Ενεργοποίηση αδρών εκχυλισμάτων hGDH1 και hGDH2 από ADP. Κάτω: Ενεργοποίηση hGDH2 από χαμηλές συγκεντρώσεις ADP και L-λευκίνης. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις λευκίνης, ιδίως στα 67.5 μM, φαίνεται η συνέργεια των δύο ενεργοποιητών. Αμφότερα τα γραφήματα προέρχονται από την εργασία των Plaitakis και συν. (2000).

#### 1.4.4 Αναστολή από GTP

Η hGDH1 σε απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών αναστέλλεται ισχυρότατα από GTP ( $IC_{50} \sim 0.2 \mu\text{M}$ ), εύρημα που αναπαράχθηκε τόσο σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν. 2000), όσο και σε καθαρισμένη πρωτεΐνη (Zaganas και Plaitakis 2002). Στις παρόμοιες συνθήκες, η hGDH2 από αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα είναι εντυπωσιακά ανθεκτική στο GTP. Λόγω της χαμηλής βασικής δραστηριότητας της hGDH2, η εκτέλεση πειράματος αναστολής σε απουσία ενεργοποιητή είναι δυσχερής και γίνεται με μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου, αλλά η  $IC_{50}$  που μετράται είναι τουλάχιστον 20 φορές μεγαλύτερη (έως και 5000  $\mu\text{M}$  κατά τους Plaitakis και συν. (2000), τιμή που ενδέχεται όμως να είναι προϊόν των πειραματικών περιορισμών που είπαμε).

Το ADP μετριάξει την ανασταλτική δράση του GTP: Με την προσθήκη 0.1 mM ADP, οι  $IC_{50}$  που μετρήθηκαν είναι  $\sim 0.6 \mu\text{M}$  για τη hGDH1 και  $\sim 20 \mu\text{M}$  για τη hGDH2, ενώ σε παρουσία 1.0 mM ADP, οι  $IC_{50}$  ήταν  $\sim 2.5 \mu\text{M}$  για τη hGDH1 και  $\sim 300 \mu\text{M}$  για τη hGDH2 (Plaitakis και συν. 2000). Η L-λευκίνη επίσης μπορεί να μετριάσει την ανασταλτική δράση του GTP, αν και σε μικρότερο βαθμό· σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.125 mM λευκίνη) δε φαίνεται να επηρεάζει την αναστολή, όμως σε μεγάλες συγκεντρώσεις (1 mM λευκίνη) ή σε μικρές συγκεντρώσεις παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP (0.125 mM λευκίνη και 0.1 mM ADP) αυξάνει σημαντικά τις  $IC_{50}$  και των δύο ισοενζύμων, ιδιαίτερα της hGDH1 (μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, Plaitakis και συν. 2000).

Εκτός από τις διαφορές στις  $IC_{50}$ , σημαντική είναι και η διαφορά στη συνεργατικότητα, όπως αυτή εκφράζεται από το σχήμα της καμπύλης αναστολής και, μαθηματικά, από το συντελεστή του Hill: η hGDH1, τόσο απουσία αλλοστερικών τροποποιητών, όσο και παρουσία ADP σε συγκέντρωση 0.1 mM ή 1.0 mM, δείχνει θετική συνεργατικότητα (συντελεστής Hill  $>1.9$ ) και η καμπύλη της αναστολής από GTP είναι σιγμοειδής. Αντίθετα, η hGDH2 σε κάθε συνθήκη δείχνει αρνητική συνεργατικότητα (συντελεστής Hill  $<1$ ) και η καμπύλη αναστολής από GTP είναι σχεδόν υπερβολική (Εικ. 1.10).



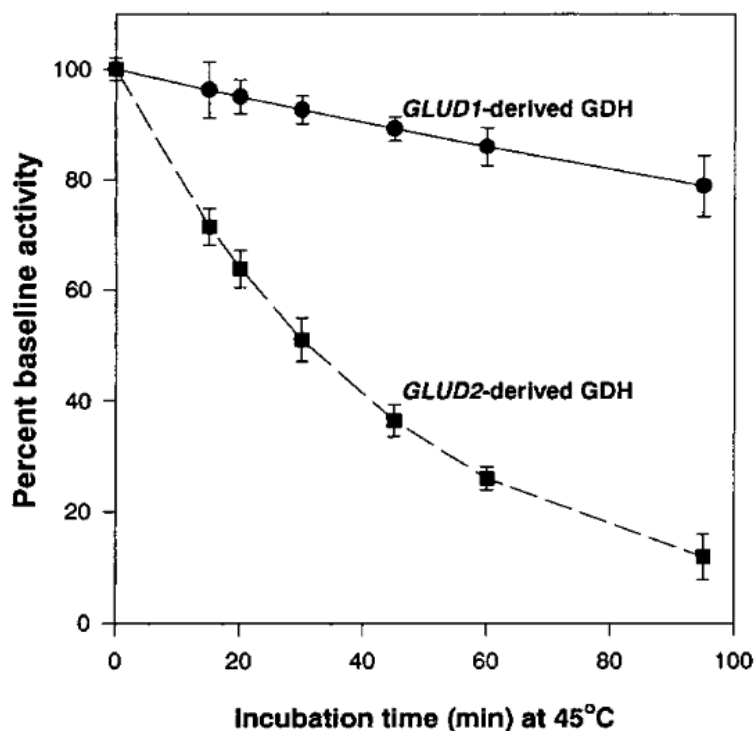
**Εικ. 1.10:** Γραφικές παραστάσεις αναστολής αδρών εκχυλισμάτων hGDH1 και hGDH2 από GTP. Οι συνθήκες (παρουσία και συγκέντρωση αλλοστερικού ενεργοποιητή) αναγράφονται σε κάθε γράφημα. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Plaitakis και συν. (2000).

#### 1.4.5 Αντοχή στη θερμική απενεργοποίηση

Οι Shashidharan και συν. (1997), έχοντας υπ' όψιν τους τις παρατηρήσεις σε GDH από ανθρώπινα λευκοκύτταρα ασθενών με ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδική ατροφία, που έδειχναν πως υπήρχαν δύο isoμορφές GDH, μια σωματιδιακή (particulate), που ήταν θερμοευσίσθητη, και μία διαλυτή (soluble), η οποία ήταν θερμοσταθερή (Plaitakis και συν. 1984), αλλά και αντίστοιχη μελέτη σε GDH από εγκέφαλο αρουραίου (Colon και συν. 1986), υπέβαλαν τα δύο isoένζυμα σε δοκιμασία θερμικής απενεργοποίησης. Τα αποτελέσματά τους, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.11, δείχνουν ότι η hGDH2 είναι πολύ πιο ευαίσθητη από τη hGDH1 στην επίδραση της θερμότητας. Όπως έδειξαν οι Yang και συν. (2004), η θερμική αντοχή και των δύο



ισοενζύμων, αλλά και μεταλλαγμάτων τους, μπορεί να αποκατασταθεί σχεδόν πλήρως αν προστεθεί στο διάλυμα ADP ή/και L-λευκίνη προτού τα ένζυμα εκτεθούν στη θερμική επίδραση.



**Εικ. 1.11:** Δοκιμασία θερμικής απενεργοποίησης αδρών εκχυλισμάτων hGDH1 και hGDH2 με επώαση στους 45°C. Τα αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα αναμείχθηκαν 1:1 με 8 μg/ml BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7.4. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής που υπολογίστηκαν ήταν ~½ ώρα για τη hGDH2 και ~3½ ώρες για τη hGDH1. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Shashidharan και συν. (1997).

Επομένως, για να συνοψίσουμε τα ευρήματα των συγκριτικών μελετών που προηγήθηκαν της διατριβής μας, η hGDH2 φαίνεται να έχει πολύ χαμηλή δραστηριότητα απουσία ενεργοποιητών (δηλ. βασική δραστηριότητα). Η δραστηριότητά της, όμως, αυξάνεται κατακόρυφα με την επίδραση ADP ή/και λευκίνης, έχοντας τη δυνατότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις των ενεργοποιητών αυτών (ή σε συνεργική επίδρασή τους) να εξομοιωθεί με αυτήν της hGDH1, με την οποία έχει παρόμοια μέγιστη ειδική δραστηριότητα. Παρουσιάζει πολύ μεγάλη αντίσταση στην αναστολή από GTP, από το οποίο δεν αναστέλλεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με την λίαν ευαίσθητη hGDH1. Τέλος, είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη απ' ότι η hGDH1 στη θερμική αδρανοποίηση.

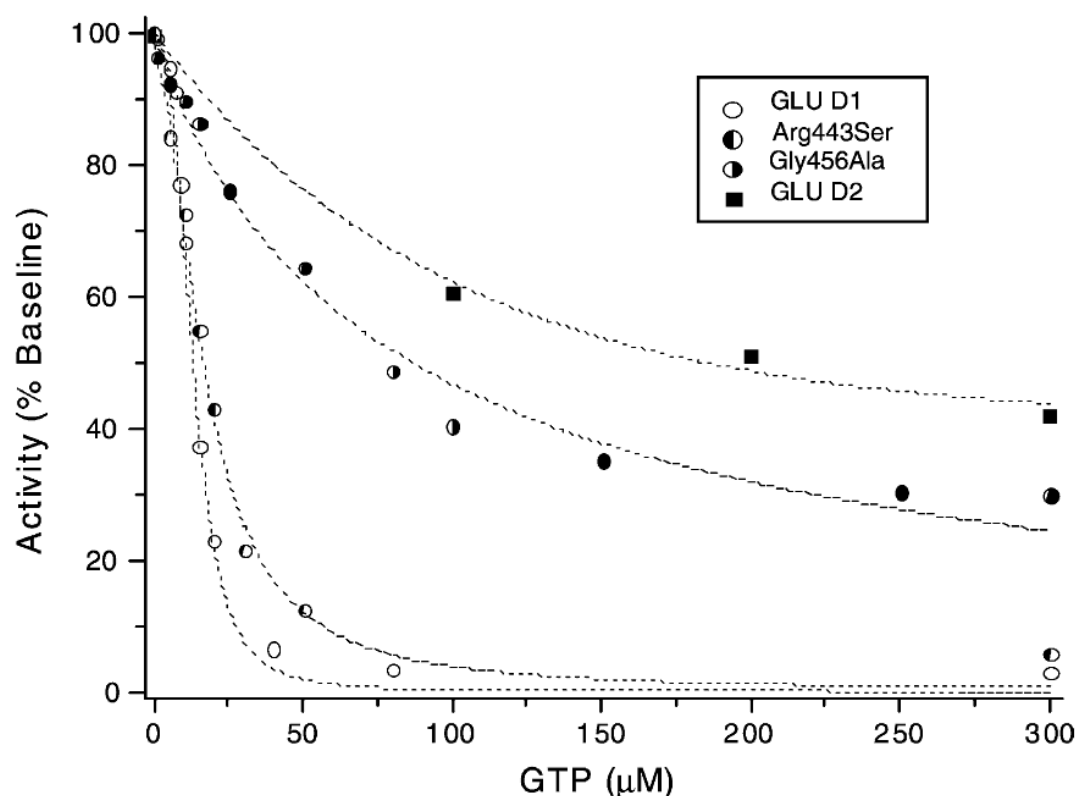
## **1.5. Μελέτες με μεταλλαξιογένεση πάνω στο δομικό υπόβαθρο των λειτουργικών διαφορών hGDH1 και hGDH2**

Έχοντας υπ' όψιν όσα παρουσιάσαμε παραπάνω για τις λειτουργικές διαφορές των δύο ισοενζύμων, ανακύπτει το ερώτημα σε ποιές δομικές διαφορές μπορούν να αποδοθούν οι ξεχωριστές ιδιότητες της hGDH2. Καθώς, όπως είδαμε προηγουμένως, τα δύο ισοένζυμα στην ώριμη μορφή τους διαφέρουν σε μόλις 15 αμινοξικά κατάλοιπα, η απάντηση θα μπορούσε να δοθεί με τη δημιουργία μεταλλάξεων στις θέσεις όπου διαφέρει η hGDH2 από τη hGDH1 με στοχευμένη, ειδική ως προς τη θέση μεταλλαξιογένεση. Η προσέγγιση που επελέγη ήταν η παραγωγή hGDH1-μεταλλαγμάτων που να διαφέρουν έκαστο κατά ένα μόνο αμινοξύ από την αγρίου τύπου hGDH1, φέροντας το αμινοξικό κατάλοιπο που έχει η hGDH2 στη συγκεκριμένη θέση. Το έργο αυτό ανέλαβε στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής ο Ι. Ζαγανάς, που κατασκεύασε, εξέφρασε και μελέτησε τις αμινοξικές αλλαγές Ser331Thre, Met370Leu, Met415Leu, Arg443Ser, Gly456Ala, Arg470His, Asn498Ser στη hGDH1, οι οποίες εντοπίζονται ως επί το πλείστον στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου, που αντιστοιχεί αδρά, όπως είδαμε προηγουμένως, στη λεγόμενη «αλλοστερική περιοχή». Τα μεταλλάγματα hGDH1-Arg443Ser και hGDH1-Gly456Ala τα μελέτησε και σε καθαρισμένη μορφή, παράλληλα με την hGDH1 αγρίου τύπου. Επίσης, κατασκεύασε και τα μεταλλάγματα Glu34Lys, Arg39Gln, Asp142Glu, Ile166Val, Ser174Asn, Gly247Arg και Ala321Val της hGDH1, που εκφράστηκαν και μελετήθηκαν με τη συνδρομή άλλων μελών του εργαστηρίου μας, όπως της τότε προπτυχιακής φοιτήτριας Ε. Γιουρούκη και του Β. Μαστοροδήμου. Τα ευρήματα όλων των μελετών αυτών θα συνοψίσουμε στις επόμενες σελίδες.

Από τις μεταλλάξεις στο καρβοξυτελικό άκρο της hGDH1, οι Ser331Thre, Met370Leu, Met415Leu, Arg470His και Asn498Ser, μελετημένες σε αδρά εκχυλίσματα, δε φάνηκαν να έχουν αξιόλογη επίδραση στην κινητική συμπεριφορά, τη βασική δραστηριότητα και τις αλλοστερικές ιδιότητες του ενζύμου (βλ. Ζαγανάς 2005, διδ. διατριβή). Οι αμινοξικές αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala, όμως, έδωσαν άκρως ενδιαφέροντα αποτελέσματα, τα οποία θα εξετάσουμε στη συνέχεια.

### 1.5.1 Η αμινοξική αλλαγή Gly456Ala μειώνει την ευαισθησία στο GTP

Το μετάλλαγμα hGDH1-Gly456Ala επίσης δε διέφερε σημαντικά από την hGDH1 όσον αφορά τις κινητικές ιδιότητες, την ενεργοποίηση από ADP και λευκίνη και τη βασική δραστηριότητα (η οποία παρουσίαζε μια ελαφρότατη, μη στατιστικά σημαντική αύξηση) – βλ. Ζαγανάς, διδακτ. διατριβή (2005). Όμως, ήταν εντυπωσιακά ανθεκτικότερο στην αναστολή από GTP, τόσο σε απουσία, όσο και σε παρουσία ADP, εμφανίζοντας σε όλες τις συνθήκες  $IC_{50}$  που προσομοιάζαν αυτές της hGDH2, καθώς και συντελεστές Hill ενδεικτικούς μη συνεργατικής συμπεριφοράς ( $\leq 1.3$ , έναντι  $>2$  στη hGDH1 και στα λοιπά μεταλλάγματα αυτής). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και στην καθαρισμένη πρωτεΐνη (Zaganas και Plaitakis 2002). Παραθέτουμε ενδεικτικό γράφημα από πειράματα σε αδρά εκχυλίσματα (εικ. 1.12).



**Εικ. 1.12:** Αναστολή από GTP αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH1-Gly456Ala, hGDH1-Arg443Ser και hGDH2 σε παρουσία 1.0 mM ADP. Εμφανής η διαφορά της hGDH2 και της hGDH1-Gly456Ala από την hGDH1 και την hGDH1-Arg443Ser. Τα άλλα μεταλλάγματα, που δεν απεικονίζονται, επίσης δε διέφεραν σημαντικά από την αγρίου τύπου hGDH1. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Plaitakis και συν. (2003).

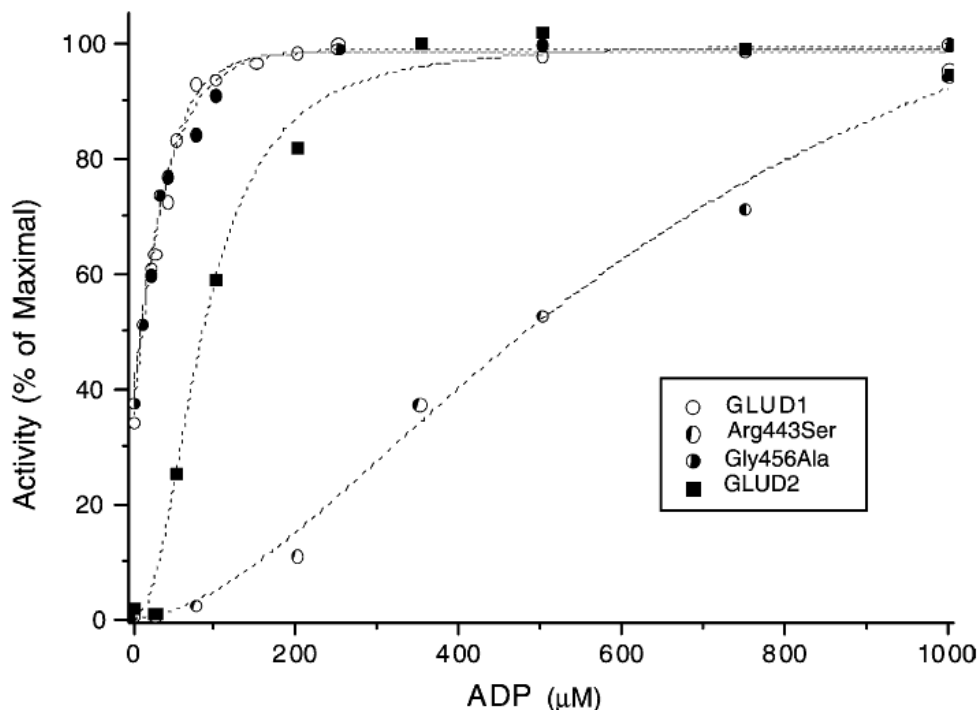
### **1.5.2 Η αμινοξική αλλαγή Arg443Ser εκμηδενίζει τη βασική δραστηριότητα και τη θερμοαντοχή του ενζύμου, και αλλάζει τη συμπεριφορά του σε σχέση με την ενεργοποίηση από ADP και λευκίνη.**

Το μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser, όπως είδαμε και στην εικόνα 1.12, δεν διέφερε ως προς την αναστολή από το GTP. Σε παρουσία 1.0 mM ADP, η μέγιστη ειδική δραστηριότητά του ήταν συγκρίσιμη με αυτήν της hGDH1, όπως και οι κινητικές του παράμετροι. Όμως, είχε μηδαμινή βασική δραστηριότητα απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών (~0.1% της μέγιστης), σχεδόν μη μετρήσιμη στις συνήθεις συγκεντρώσεις του ενζύμου που χρησιμοποιούνται πειραματικά. Η βασική αυτή δραστηριότητα υπολειπόταν κατά πολύ ακόμη και της βασικής δραστηριότητας της hGDH2, που, όπως είδαμε, είναι ήδη πολύ χαμηλότερη από αυτήν της hGDH1 (βλ. Ζαγανάς, διδακτ. διατριβή 2005 και Zaganas και συν. 2002).

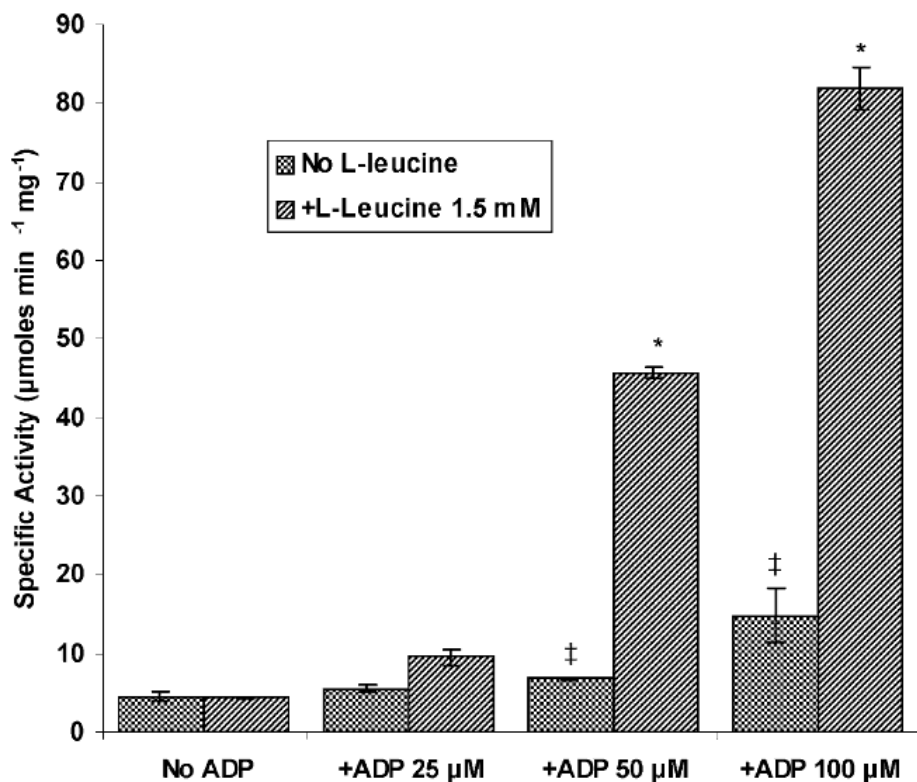
Το ADP ενεργοποιούσε μεν το ένζυμο, αλλά σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με την  $SC_{50}$  να κυμαίνεται περί τα 400  $\mu\text{M}$  σε επίπεδα σχεδόν δεκαπενταπλάσια της  $SC_{50}$  της hGDH1 (βλ. εικόνα 1.13). Μόνη της η L-λευκίνη, αντίθετα, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις, δεν ενεργοποιούσε το ένζυμο. Μόνο με την προσθήκη ADP σε μικρές ποσότητες, η λευκίνη, δρώντας συνεργικά με το ADP, μπορούσε να ενεργοποιήσει το μετάλλαγμα (βλ. εικόνα 1.14).

Επίσης, το μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser παρουσίαζε κάπως μεγαλύτερη βασική δραστηριότητα σε pH 7.0 απ' ό τι σε pH 7.5-8.0 (όπου εμφάνιζε τη βέλτιστη βασική δραστηριότητά της η αγρίου τύπου hGDH1), ενώ σε pH 7.0 εμφάνιζε και καλύτερη ενεργοποίηση (δηλ. μικρότερες  $SC_{50}$ ) από ADP (Zaganas και συν. 2002).

Τέλος, όπως έδειξαν οι Yang και συν. (2004), το μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία στη θερμική απενεργοποίηση απ' ό τι η hGDH1. Η θερμική αντοχή της hGDH1-Arg443Ser μπορούσε να αποκατασταθεί σχεδόν πλήρως με τη προσθήκη ADP ή/και λευκίνης στο διάλυμα πριν τη θερμική απενεργοποίηση. Το ότι η αμινοξική αλλαγή Arg443Ser είναι η κύρια υπεύθυνη για τη θερμοευαισθησία της hGDH2, τεκμηριώθηκε και με τον έλεγχο της ανάστροφης μεταλλαγής (δηλ. Ser443Arg στη hGDH2), που φάνηκε να αποκαθιστά τη θερμική αντοχή του ενζύμου στα επίπεδα της hGDH1 (Yang και συν. 2004).



**Εικ. 1.13:** Ενεργοποίηση αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH1-Gly456Ala, hGDH1-Arg443Ser και hGDH2 από ADP. Εμφανής η διαφορετική συμπεριφορά της hGDH1-Arg443Ser. Η εικόνα προέρχεται από την εργασία των Plaitakis και συν. (2003).



**Εικ. 1.13:** Ενεργοποίηση hGDH1-Arg443Ser από L-λευκίνη (1.5 mM) σε απουσία ή παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ADP. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις λευκίνης. Εμφανής η αδυναμία της λευκίνης να ενεργοποιήσει μόνη της το ένζυμο, αλλά και η συνέργεια των δύο ενεργοποιητών. Το γράφημα προέρχεται από την εργασία των Plaitakis και συν. (2003).

### **1.5.3 Ερμηνεία της επίδρασης των αμινοξικών αλλαγών Arg443Ser και Gly456Ala στις ιδιότητες του ενζύμου.**

Η αμινοξική θέση 456 βρίσκεται στην περιστρεφόμενη έλικα, που σχηματίζει, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 1.2.2, το περιφερικό τμήμα του θυλάκου πρόσδεσης του GTP. Συγκεκριμένα, η Ιστιδίνη 454, που απέχει λιγότερο από ένα βήμα της έλικας από την Γλυκίνη 456, φαίνεται να αλληλεπιδρά το GTP, και συγκεκριμένα με τη γ' φωσφορική ρίζα του (Smith και συν. 2002). Έτσι, δεν προκαλεί εντύπωση ότι μία αμινοξική αλλαγή στην περιοχή αυτή μπορεί είτε να δυσχεραίνει την πρόσδεση του GTP (π.χ. μέσω στερικών συγκρούσεων με γειτονικά της Γλυκίνης 456 αμινοξέα, όπως η Λευκίνη 401 ή η Φαινυλαλανίνη 387), είτε να παρεμποδίζει μεταβολές της διαμόρφωσης της περιστρεφόμενης έλικας που «διαμεσολαβούν» την επίδραση της πρόσδεσης του GTP στο άνοιγμα/κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής (βλ. Ζαγανάς, διδακτ. Διατριβή, 2005).

Η αμινοξική θέση 443 εντοπίζεται στο κατιόν σκέλος της αντέννας, και συγκεκριμένα στη μικρή α-έλικα. Εδώ, εκτός από πιθανές επιδράσεις στη σταθερότητα της έλικας καθ' αυτής, κυρίαρχη είναι η αλληλεπίδραση της Αργινίνης 443 με την Σερίνη 409 στο ανιόν σκέλος της αντέννας της γειτονικής (κατά τη φορά του ρολογιού κείμενης) υπομονάδας – υπενθυμίζουμε ότι οι τρεις αντέννες διαπλέκονται μεταξύ τους (βλ. και εικόνα 5.6 στο κεφάλαιο της συζήτησης). Έτσι, η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να χάνεται με την αντικατάσταση από Σερίνη και αυτό να αποσταθεροποιεί την «κοτσίδα» που σχηματίζουν οι τρεις έλικες (Zaganas και συν. 2002, Ζαγανάς, διδακτ. Διατριβή, 2005). Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το εύρημα ότι η αμινοξική αλλαγή Ser409Arg στη hGDH1 έχει παρόμοια επίδραση με την Arg443Ser στη βασική δραστηριότητα, αν και δεν επηρεάζει τόσο σημαντικά τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου (Μαστοροδήμος, διδ. διατριβή, 2007).

### **1.5.4 Επηρεάζουν οι λοιπές αμινοξικές αλλαγές τις ιδιότητες της hGDH2;**

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν κατά πόσο οι δύο αυτές αμινοξικές αλλαγές αρκούν για να ερμηνεύσουν τις ιδιότητες της hGDH2. Από τον έλεγχο των μεταλλάξεων της hGDH1 Ser331Thre, Met370Leu, Met415Leu, Arg470His και Asn498Ser σε αδρά ενζυμικά εκχυλίσματα, που έγινε στα πλαίσια της διατριβής του

I. Ζαγανά, δεν αναφέρθηκαν σημαντικές αποκλίσεις από τις ιδιότητες της hGDH1 αγρίου τύπου (βλ. Ζαγανάς, διδ. διατριβή, 2005). Στα μεταλλάγματα Glu34Lys, Arg39Gln, Asp142Glu, Ile166Val και Ser174Asn, που μελετήθηκαν σε αδρά εκχυλίσματα από τον B. Μαστοροδήμο και την E. Γιουρούκη, επίσης δεν διαπιστώθηκαν αξιόλογες αποκλίσεις στις κινητικές και τις αλλοστερικές ιδιότητες. Παρατηρήθηκαν σε μερικά από τα μεταλλάγματα ποικίλου βαθμού αποκλίσεις στη βασική δραστηριότητα, που θεωρήθηκαν τότε ως επί το πλείστον επουσιώδεις, δεδομένου και του γεγονότος ότι, ιδίως στα αδρά εκχυλίσματα, η συμπεριφορά του ενζύμου εύκολα παρουσιάζει διακυμάνσεις λόγω διαφόρων παραγόντων (π.χ. επίπεδο έκφρασης). Εντυπωσιακότερες αυτών των αποκλίσεων ήταν η χαμηλή βασική δραστηριότητα του μεταλλάγματος hGDH1-Glu34Lys (κυμαινόμενη από 7% έως και 37% της μέγιστης, έναντι ~40% για την hGDH1) και η υψηλή βασική δραστηριότητα του μεταλλάγματος hGDH1-Ser174Asn (~55-60%, έναντι ~40% της hGDH1) που όμως, καθώς αφ' ενός παρουσίαζαν σημαντικές διακυμάνσεις, αφ' ετέρου δεν συνοδευόταν από αλλαγές στις κινητικές ή αλλοστερικές ιδιότητες, δεν θεωρήθηκαν εξέχουσας σημασίας (E. Γιουρούκη και B. Μαστοροδήμος, αδημοσίευτα δεδομένα).

Έτσι, θεωρήθηκε ότι ο συνδυασμός των δύο αμινοξικών αλλαγών Arg443Ser και Gly456Ala πιθανώς επαρκεί για να αναπαραχθούν οι ιδιότητες της hGDH2. Το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala κατασκευάστηκε και εκφράστηκε από τον B. Μαστοροδήμο, ο οποίος πραγματοποίησε και τις πρώτες λειτουργικές μελέτες σε αδρά εκχυλίσματα, που έδειξαν ότι το ένζυμο είχε πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα (~1-2% της μέγιστης, έναντι ~5-10% στη hGDH2 κατά τη συγκριτική τους μελέτη) καθώς και κάποιες από τις μελέτες σε κεκαθαρισμένο ένζυμο, ενώ τις λοιπές μελέτες σε κεκαθαρισμένο ένζυμο ανέλαβε -καθώς παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το θέμα μας- ο υποφαινόμενος, που τότε μόλις σχεδίαζε την εκπόνηση της παρούσης διατριβής. Από τα αποτελέσματα φάνηκε, ήδη από τα αδρά εκχυλίσματα, ότι, στην αναστολή από GTP και, σε μικρότερο βαθμό, την ενεργοποίηση από ADP, το διπλό μετάλλαγμα προσέγγιζε τις ιδιότητες της hGDH2 (βλ. Μαστοροδήμος, διδ. διατριβή, 2007), όχι όμως στη βασική δραστηριότητα, την ενεργοποίηση από λευκίνη και τη θερμοαντοχή, όπου ελάχιστα διέφερε από την hGDH1-Arg443Ser - αυτό θα φανεί και στα αποτελέσματά μας (υποκεφ. 4.3), γι' αυτό και δεν θα πούμε τώρα περισσότερα.

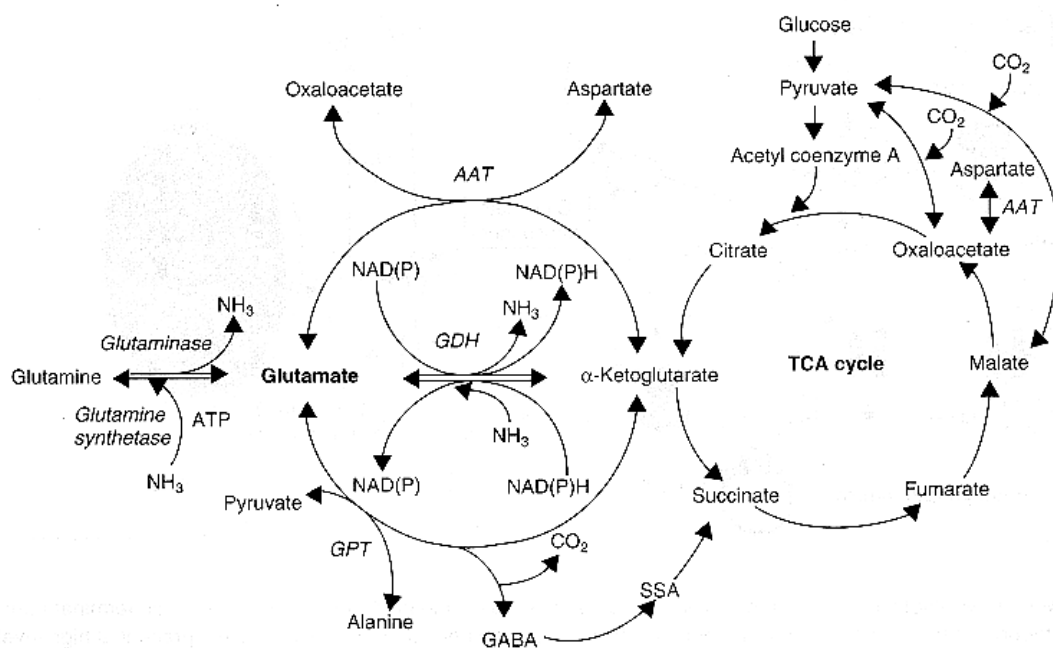
Γενικό συμπέρασμα, πάντως, είναι ότι οι ιδιότητες του ενζύμου δεν εξηγούνται μόνο από τις αμινοξικές αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala.

## 1.6. Ο πιθανός ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον εγκέφαλο και άλλα όργανα, και παθήσεις που σχετίζονται με αυτήν.

Αφήσαμε σκόπιμα για το τέλος το συγκεκριμένο τμήμα της εισαγωγής, καθώς στο τελευταίο μέρος του, όπου θα αναφερθούμε στην πιθανή εμπλοκή της hGDH σε νευροεκφυλιστικές διαδικασίες, θα γίνουν σαφείς οι λόγοι που μας οδήγησαν να μελετήσουμε ιδιαίτερα τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου.

### 1.6.1 Γενικά για τη λειτουργία της GDH στο μεταβολισμό

Η σημασία της γλουταμικής αφυδρογονάσης για το κύτταρο έγκειται στο ότι συνδέει τον μεταβολισμό του γλουταμικού –και, μέσω αυτού, των περισσότερων άλλων αμινοξέων- με τον κύκλο του κιτρικού οξέος, παρέχοντας ένα σημαντικό μονοπάτι για την αναστρέψιμη μετατροπή των αμινοξέων σε α-κετοξέα, συνδέοντας έτσι τον μεταβολισμό των αμινοξέων με των υδατανθράκων (εικ. 1.14).



**Εικ. 1.14:** Η αντίδραση της GDH ενταγμένη μέσα στον κυτταρικό μεταβολισμό. AAT: Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, GPT: Αλανινική αμινοτρανσφεράση, SSA: Ηλεκτρική ημιαλδεύδη, TCA cycle: κύκλος του κιτρικού οξέος (του Krebs)

Η αναστρέψιμη μετατροπή γλουταμικού  $\rightleftharpoons$  α-κετογλουταρικού μπορεί να γίνει και από τις αμινοτρανσφεράσες· όμως, οι δύο αυτοί δρόμοι διαφέρουν ριζικά, καθώς οι



αντιδράσεις τρανσαμίνωσης δεν έχουν «ξεκάθαρο» αναβολικό ή καταβολικό χαρακτήρα, καθώς δεν είναι οξειδοαναγωγικές και ο λόγος των συνολικών ποσοτήτων αμινοξέων/κετοξέων με τις τρανσαμινώσεις δε μεταβάλλεται.

Έτσι, η αντίδραση της GDH εξυπηρετεί τρεις βασικές λειτουργίες: τη βιοσύνθεση αμινοξέων, το μεταβολισμό της αμμωνίας και την ενεργειακή ομοιόσταση.

Καταρχάς, καθώς, όπως είδαμε ήδη στην αρχή της εισαγωγής, η αντίδραση της GDH αποτελεί μία από τις κυριότερες οδούς ενσωμάτωσης της αμμωνίας στο μεταβολισμό και *de novo* σύνθεσης αμινοξέων (Hudson και Daniel 1993). Από το γλουταμικό σχηματίζονται, μέσω τρανσαμινώσεων και άλλων αντιδράσεων, τα υπόλοιπα αμινοξέα. Χρησιμοποιείται για τη βιοσυνθετική αυτή λειτουργία ευρύτατα από φυτά και βακτήρια – θα μπορούσε να πει κανείς ότι η προέλευση των αμινοξέων του οργανισμού μας, έστω και πολύ έμμεσα, ανάγεται σε μεγάλο βαθμό στην αντίδραση της GDH.

Παρ' ότι, όπως έχουμε πεί, η ισορροπία της αντίδρασης ευνοεί ακόμη και στα θηλαστικά την αναγωγική αμίνωση, κατά κανόνα η GDH δεν λειτουργεί στην κατεύθυνση αυτή, λόγω της απουσίας αξιόλογων συγκεντρώσεων ελεύθερης αμμωνίας στο κύτταρο. Ωστόσο, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις με συνοδό αύξηση των συγκεντρώσεων αμμωνίας, η ηπατική GDH μπορεί να λειτουργήσει και «αντίστροφα», συνεπικουρώντας τη δράση των ενζύμων του κύκλου της ουρίας και της συνθάσης της γλουταμίνης στην ενσωμάτωση αμμωνίας (βλ. Cooper 2011). Λιγότερο πιθανό είναι να λειτουργεί αυτός ο τρόπος απομάκρυνσης της αμμωνίας στον εγκέφαλο, όπου κυρίαρχη οδός ενσωμάτωσης της αμμωνίας είναι η συνθάση της γλουταμίνης (Butterworth 2002).

Ωστόσο, ακόμη και λειτουργώντας στην κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης, η GDH έχει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των πρωτεϊνών και στην ομοιόσταση της αμμωνίας, καθώς συμβάλλει μέσω απαμίνωσης του γλουταμικού στο μεταβολισμό των περισσότερων αμινοξέων: κατά την αποδόμηση των αμινοξέων, η α-αμινομάδα τους μεταφέρεται μέσω αμινοτρανσφερασών στο α-κετογλουταρικό για να σχηματιστεί γλουταμικό, το οποίο στη συνέχεια απαμινώνεται οξειδωτικά από τη GDH για να παραχθεί  $\text{NH}_4^+$ , που μετατρέπεται σε ουρία και αποβάλλεται.

Η κυριότερη, όμως, λειτουργία της GDH στα θηλαστικά φαίνεται να είναι ο καταβολισμός αμινοξέων για την παραγωγή ενέργειας. Δεν είναι τυχαίο ότι οι μοριακοί «διακόπτες» του αλλοστερικού ελέγχου του ενζύμου δείχνουν να

εξυπηρετούν τη ρύθμιση αυτής της καταβολικής λειτουργίας, όπως είδαμε και στο υποκεφάλαιο 1.2.2: Η ενεργειακή ένδεια (ADP) και η περίσσεια αμινοξέων (L-λευκίνη) ευοδώνουν τη δρομολόγηση του γλουταμικού προς τον κύκλο του Krebs, ενώ η υπερλειτουργία του κύκλου του Krebs (GTP, NADH στην αλλοστερική θέση) και η επάρκεια άλλων πηγών ενέργειας (παλμιτοϋλο-συνένζυμο-A) την αναστέλλουν. Έτσι, η γλουταμική αφυδρογονάση μπορεί να λειτουργεί ως «ενεργειακός αισθητήρας», ανταποκρινόμενη στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Υπάρχουν, μάλιστα, πρόσφατες ενδείξεις (Islam και συν. 2010, Hutson και συν. 2011), ότι, προκειμένου να ανταποκρίνεται ακόμη ευχερέστερα στην καταβολική της λειτουργία, η γλουταμική αφυδρογονάση σχηματίζει χαλαρό σύμπλοκο («μεταβολόνιο») με τη μιτοχονδριακή αμινοτρανσφεράση των διακλαδισμένων αμινοξέων (BCATm).

Σε διάφορους ιστούς, οι λειτουργίες αυτές μπορεί να εξειδικεύονται. Έτσι, λόγω χάριν, στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια η GDH πιθανώς συμμετέχει εμμέσως στους μηχανισμούς αποβολής αμμωνίας (βλ. Plaitakis και Spanaki, 2012), ενώ, όπως θα εξετάσουμε αναλυτικότερα σε επόμενο υποκεφάλαιο, η GDH στα β-κύτταρα του παγκρέατος ενέχεται στο μηχανισμό έκκρισης ινσουλίνης. Στον εγκέφαλο, καθώς το γλουταμικό έχει έναν επιπρόσθετο, ξεχωριστό ρόλο, η GDH αποκτά ιδιαίτερη σημασία, όπως θα δούμε ακολούθως.

### **1.6.2 Ο ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον εγκέφαλο**

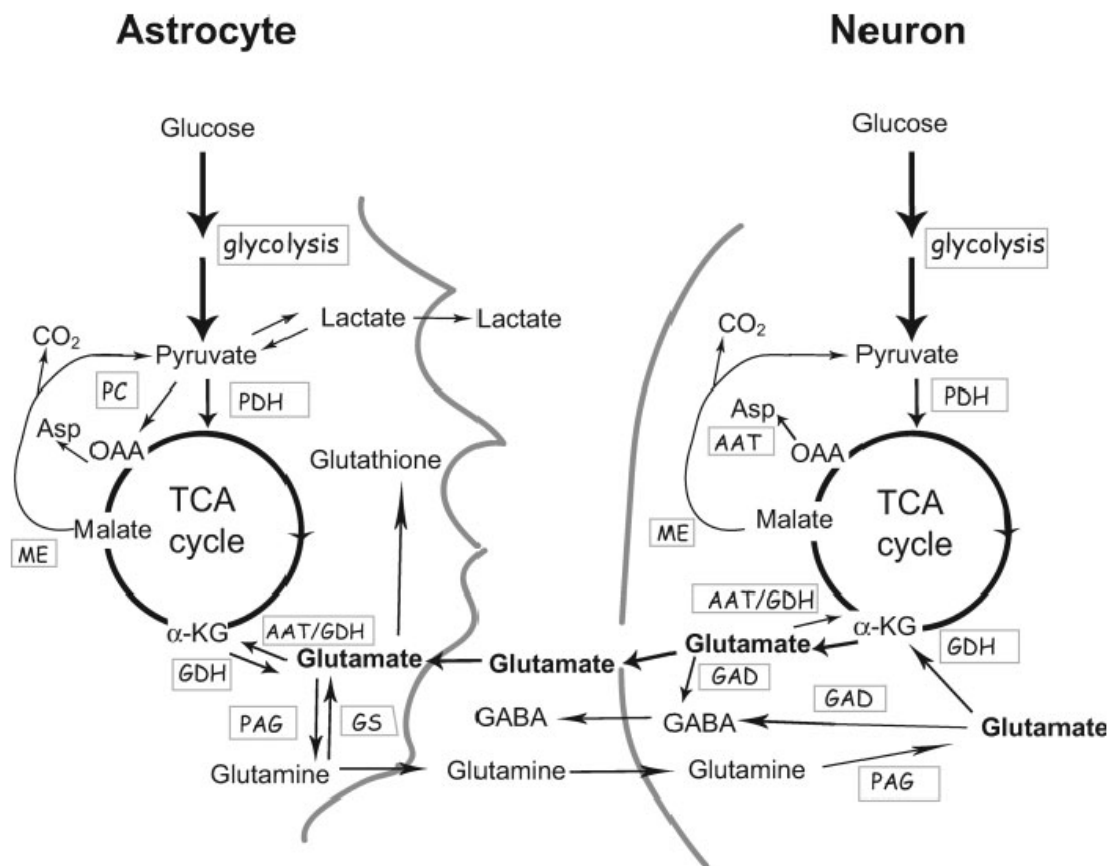
Το γλουταμικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, καθώς χρησιμοποιείται σε περισσότερες από το 40-60% των συνάψεων και εμπλέκεται σε εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, η κινητικότητα, η σωματισθητικότητα και οι ειδικές αισθήσεις (Kandel 2000). Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός γλουταματεργικών νευρώνων στο ΚΝΣ, που είναι ευρύτατα κατανεμημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Περιοχές με τη μεγαλύτερη πυκνότητα γλουταματεργικών συνάψεων θεωρούνται τα βασικά γάγγλια, ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας, ο ιππόκαμπος, και οι θάλαμοι (Aoki και συν 1987, Liu και συν. 1989). Πέραν του ρόλου του ως νευροδιαβιβαστής, το γλουταμικό είναι και πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό του γ-αμινοβουτυρικού

οξέος (GABA), που αποτελεί τον κυριότερο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ, μέσω της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού (GAD).

Στον εγκέφαλο, η GDH ανευρίσκεται σε ικανές ποσότητες, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στις περιοχές που δέχονται πυκνή γλουταματεργική νεύρωση (Aoki και συν. 1987). Σε αυτές τις περιοχές, η GDH ανευρίσκεται κυρίως στην περιοχή των γλουταματεργικών συνάψεων, και δή στις αστροκυτταρικές προσεκβολές: οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Subbalakshmi και Murthy 1985, Aoki και συν. 1987, Rothe και συν. 1994, Spanaki και συν. 2010) δείχνουν ότι το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα, ενώ μικρότερη ανοσοδραστικότητα ανευρίσκεται στα νευρικά κύτταρα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η GDH ενέχεται στο μεταβολισμό του γλουταμικού στη σύναψη.

Όσον αφορά τον ακριβή της ρόλο, αυτός αποτελεί ακόμη πεδίο έρευνας. Σίγουρο θεωρείται ότι η γλουταμική αφυδρογονάση δεν συμμετέχει άμεσα στη σύνθεση γλουταμικού μέσω αναγωγικής αμίνωσης, καθώς φαίνεται, σύμφωνα με μελέτες tracing ραδιοσημασμένων μορίων, να λειτουργεί προς την κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης (Cooper 1979, Sonnewald και συν. 1997). Έτσι, η σύνθεση του γλουταμικού στους νευρώνες πιστεύεται ότι γίνεται από α-κετογλουταρικό, μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, ή από γλουταμίνη με τη δράση του ενζύμου γλουταμινάση.

Αντίθετα, η γλουταμική αφυδρογονάση φαίνεται να εμπλέκεται στην απομάκρυνση του «χρησιμοποιημένου» γλουταμικού. Σύμφωνα με την κυρίαρχη στις μέρες μας υπόθεση, το γλουταμικό προσλαμβάνεται μετά την απελευθέρωσή του στη συναπτική σχισμή από τα αστροκύτταρα που περιβάλλουν τη σύναψη μέσω ειδικών μεταφορέων. Εκεί, κατά το μεγαλύτερο μέρος του μετατρέπεται μέσω της γλουταμινικής συνθάσης (που εντοπίζεται αποκλειστικά στα αστροκύτταρα) σε γλουταμίνη, η οποία κατόπιν επαναπροωθείται στους νευρώνες όπου, με την γλουταμινάση, μετατρέπεται εκ νέου σε γλουταμικό. Έτσι το γλουταμικό ανακυκλώνεται μέσω του λεγόμενου «κύκλου γλουταμικού-γλουταμίνης» (βλ. Daikhin και Yudkoff 2000). Ένας εναλλακτικός δρόμος επεξεργασίας του γλουταμικού από το αστροκύτταρο, στα πλαίσια του μοντέλου αυτού, είναι η μετατροπή του σε α-κετογλουταρικό, είτε με τρανσαμίνωση, είτε με απαμίνωση, και ο καταβολισμός του στον κύκλο του Krebs (βλ. εικ. 1.15).



**Εικ. 1.15:** Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού του γλουταμικού και του κύκλου γλουταμίνης-γλουταμικού μεταξύ νευρώνα και αστροκυττάρου. GAD: Αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού, PAG: γλουταμινάση, GS: συνθάση της γλουταμίνης, AAT:ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, PC: πυροσταφυλική καρβοξυλάση, ME: αφυδρογονάση του μηλικού. PDH: πυροσταφυλική αφυδρογονάση (αναδημοσίευση από McKenna, 2007)

Υπάρχουν ενδείξεις ότι, στις συνήθεις συνθήκες λειτουργίας της σύναψης, η δράση της GDH είναι στενά ρυθμιζόμενη και δυσανάλογα μικρή σε σχέση με τη συγκέντρωσή της (Kuo και συν. 1994), οπότε το μεγαλύτερο ποσό του γλουταμικού μετατρέπεται σε γλουταμίνη, ενώ ακόμη και η μετατροπή του γλουταμικού σε ακετογλουταρικό γίνεται κυρίως μέσω τρανσαμινασών (Shen 2005). Όμως, σε συνθήκες έντονης γλουταματεργικής διαβίβασης, άρα και αυξημένων ποσοτήτων γλουταμικού σε συνδυασμό με αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, η οδός της γλουταμικής αφυδρογονάσης μπορεί να κατευθύνει >50% του γλουταμικού προς τον κύκλο του Krebs (McKenna και συν. 1996, Westergaard και συν. 1996, Sonnwald και συν. 1997). Είναι ευνόητο ότι, σε τέτοιες συνθήκες, η οξειδωτική απαμίνωση υπερτερεί της τρανσαμίνωσης: ο καταβολισμός του γλουταμικού με τη βοήθεια της GDH αφ' ενός βοηθά το αστροκύτταρο να αναπληρώσει μέρος της ενέργειας που

καταναλίσκεται στην ανακύκλωση του γλουταμικού (η αντίδραση της συνθάσης της γλουταμίνης απαιτεί ATP, αλλά και η μεταφορά του γλουταμικού εντός του κυττάρου με τους EAAT2 και EAAT1 μεταφορείς γίνεται με συμμεταφορά νατρίου, οπότε αυξάνει το φόρτο εργασίας της  $K^+/Na^+$ -ATPάσης), και αφ' ετέρου παράγει μέρος της αμμωνίας που χρειάζεται ως υπόστρωμα η συνθάση της γλουταμίνης. Έτσι, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ενδεχόμενη ανεπάρκεια της γλουταμικής αφυδρογονάσης μπορεί θεωρητικά να συντελέσει στη διαταραχή της ενεργειακής ομοιόστασης των αστροκυττάρων, τη συνεπακόλουθη ελλιπή απομάκρυνση του γλουταμικού από τη σύναψη και, τελικά, στη διεγερτοτοξικότητα από γλουταμικό.

Οφείλουμε να πούμε ότι η περιγραφή που δώσαμε είναι πολύ απλοποιημένη, και ότι υπάρχουν πολλές μελέτες που είτε θέτουν σε αμφισβήτηση πτυχές του μοντέλου, είτε το συμπληρώνουν με την εμπλοκή και άλλων μεταβολικών οδών που συνεχονται με αυτές που περιγράψαμε, και των οποίων ο ρόλος είχε παραμεληθεί παλαιότερα, όπως π.χ. ο κύκλος μηλικού-ασπαρτικού. Καθώς η λεπτομερής ανασκόπηση των οδών του μεταβολισμού του γλουταμικού στη γλουταματεργική σύναψη υπερβαίνει τους σκοπούς της διατριβής μας, ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στην σχετική ανασκόπηση της M. McKenna (2007).

Σε κάθε περίπτωση, πάντως, το μοντέλο προβλέπει ότι η δραστηριότητα της GDH βρίσκεται υπό στενό μεταβολικό έλεγχο. Αυτός επιτυγχάνεται, εκτός από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος, και με την ρύθμιση της δραστηριότητάς της, που, καθώς έχουμε πεί, εξαρτάται με διάφορους τρόπους από τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου. Πιθανώς εκεί εντοπίζεται και ο ειδικός ρόλος της hGDH2, που, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 1.5, έχει σαφώς χαμηλότερη βασική δραστηριότητα από τη hGDH1, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί ισχυρά από ADP. Ταυτόχρονα, όντας ανθεκτική στο GTP (του οποίου οι συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες στον εγκέφαλο απ' ότι σε άλλους ιστούς), μπορεί να παραμένει ενεργή ακόμη και όταν ο κύκλος του Krebs ήδη λειτουργεί και παράγει GTP, εφόσον η ενεργειακή ένδεια ( $\uparrow$ ADP) παρατείνεται. Το δε γεγονός ότι λειτουργεί σχετικά καλά σε χαμηλό pH, ίσως της επιτρέπει να ανταπεξέρχεται στην πτώση του ενδομιτοχονδριακού pH που συνοδεύει ενεργοβόρες κυτταρικές διεργασίες, όπως η νευροδιαβίβαση. Έτσι, η hGDH2 πιθανώς προσφέρει αμεσότερο έλεγχο της δραστηριότητας σε σχέση με τις μεταβαλλόμενες κατά τη νευροδιαβίβαση μεταβολικές ανάγκες του αστροκυττάρου.

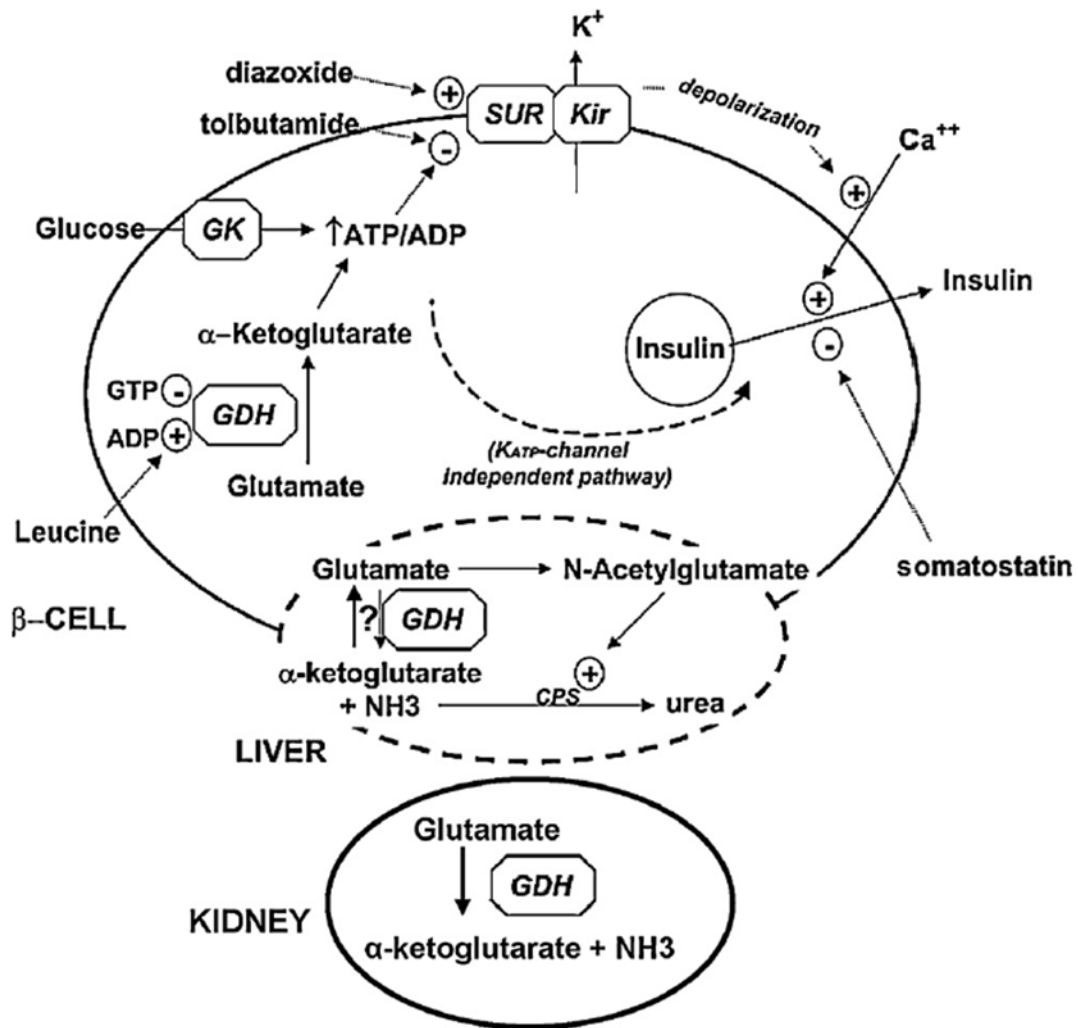
### 1.6.3 Η GDH στο σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας

Η γλουταμική αφυδρογονάση, έχοντας τόσο σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, θα περίμενε κανείς να εμπλέκεται σε μια σειρά από γενετικής αρχής παθήσεις. Ωστόσο, ίσως ακριβώς λόγω της σημαντικότητάς της, δεν έχει συσχετισθεί μέχρι στιγμής με πολλές παθολογίες – μια ολική ανεπάρκεια του ενζύμου, π.χ., θα ήταν πιθανότατα θανατηφόρος.

Η καλύτερα μελετημένη πάθηση που σχετίζεται με τη GDH είναι το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας. Όπως αναφέραμε, σε ειδικούς ιστούς το ένζυμο μπορεί να αναλαμβάνει ειδικούς ρόλους. Στα β-κύτταρα του παγκρέατος, συγκεκριμένα, η GDH ενέχεται στον έλεγχο της έκκρισης ινσουλίνης, κάτι που προτάθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του '80 (Sener και συν. 1981, Fahien και συν. 1988) ακριβώς διότι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση της, όπως η λευκίνη, φαινόταν να τροποποιούν την έκκριση ινσουλίνης *ex vivo*, με την ενεργοποίηση της GDH να συνοδεύεται από αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης (και αντίστροφα).

Σύμφωνα με το αποδεκτό σήμερα μοντέλο για τον έλεγχο της έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα (βλ. εικ. 1.16, στο άνω μέρος του γραφήματος, στο οβάλ σχήμα με το συνεχόμενο περίγραμμα), ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός της γλυκόζης αυξάνει το λόγο ATP/ADP στο κυτταρόπλασμα (καθώς και τις συγκεντρώσεις του GTP, που παράγεται από τον κύκλο του Krebs). Η αύξηση του λόγου ATP/ADP οδηγεί σε κλείσιμο των ευαίσθητων στο ATP καναλιών  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ), που αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα υποδοχέα σουλφονουλουρίας (SUR1)/διαύλου  $K^+$  (Kir6.2), και εκπόλωση της (υπερπολωμένης λόγω της δράσης των  $K_{ATP}$ ) κυτταρικής μεμβράνης. Η εκπόλωση επιτρέπει (μέσω τασεοεξαρτώμενων διαύλων  $Ca^{2+}$ ) σε ιόντα  $Ca^{2+}$  να εισέλθουν στο κύτταρο και να διεγείρουν την εξωκύτωση ινσουλίνης. Η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού από την GDH παρέχει ακετογλουταρικό στον κύκλο του Krebs, οδηγώντας επίσης στην αύξηση της παραγωγής ATP και άρα και του λόγου ATP/ADP. Για να μην υπερλειτουργεί, όμως, αυτός ο μηχανισμός, η GDH βρίσκεται κάτω από την τονική ανασταλτική επίδραση του GTP. Στη νηστεία, με τη συνεπακόλουθη μείωση των κυτταρικών αποθεμάτων γλυκόζης και του λόγου ATP/ADP, ενισχύεται η οξείδωση γλουταμικού (δηλαδή του καταβολισμού των αμινοξέων γενικότερα), προσφέροντας ενέργεια στο κύτταρο και

συντηρώντας παράλληλα το λόγο ATP/ADP για να διατηρηθεί η έκκριση ινσουλίνης. Η ενεργοποίηση της GDH από λευκίνη, λ.χ. μετά από ένα πρωτεϊνικό γεύμα, επίσης διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης



**Εικ. 1.16:** Σχηματική απεικόνιση της εμπλοκής της GDH στο σύνδρομο υπερινσουλινισμού-υπεραμμωναιμίας. Πάνω, στο οβάλ σχήμα με το συνεχόμενο περίγραμμα, περιγράφεται η εμπλοκή της GDH στο μηχανισμό έκκρισης ινσουλίνης στα  $\beta$ -κύτταρα του παγκρέατος. Χαμηλότερα, στο οβάλ με το διακεκομμένο περίγραμμα, και το μικρό οβάλ πιο κάτω, απεικονίζεται η εμπλοκή της GDH στην υπεραμμωναιμία. GK: γλυκοκινάση CPS: συνθετάση του καρβαμυλοφωσφορικού. (Αναδημοσίευση από Stanley, 2011)

Εδώ και πάνω από μία δεκαετία (Stanley και συν. 1998), βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της hGDH1 (*GLUD1*) ευθύνονται για ένα ποσοστό παιδιών με συγγενή υπερινσουλινισμό που εμφανίζουν μια ιδιαίτερη εικόνα, το σύνδρομο υπερινσουλινισμού υπεραμμωναιμίας (ΣΥΥ). Οι ασθενείς, συνήθως βρέφη,

παρουσιάζουν υποτροπιάζοντα επεισόδια υπογλυκαιμίας -κυρίως μεταγευματικά και δὴ μετά από γεύμα πλούσιο σε πρωτεΐνες- που εκδηλώνονται, μεταξύ άλλων, και με επιληπτικές κρίσεις. Τα επεισόδια υπογλυκαιμίας απαντούν στη χορήγηση διαζοξιδης. Επιληπτικές κρίσεις μπορούν, ωστόσο, να εμφανιστούν και ανεξαρτήτως υπογλυκαιμικών επεισοδίων (De Lonlay και συν. 2001, Raizen και συν. 2005). Ένα άλλο χαρακτηριστικό, που διαφοροποιεί την πάθηση από άλλου τύπου συγγενείς υπερινσουλινισμούς, είναι η υπεραμμωναιμία (επίπεδα 2-5 φορές μεγαλύτερα του φυσιολογικού), η οποία είναι σταθερή, δεν εξαρτάται από τα επίπεδα γλυκόζης και δεν αυξάνεται σημαντικά μετά σίτιση με πρωτεΐνες. Στο πλείστο των περιπτώσεων η υπεραμμωναιμία θεωρείται ασυμπτωματική, καθώς οι ασθενείς δεν παρουσίαζαν συμπτώματα τοξικότητας (Stanley και συν. 1998, 2000· De Lonlay και συν. 2001).

Το γενετικό υπόστρωμα της πάθησης διευκρινίστηκε άμεσα: επρόκειτο για ετερόζυγες μεταλλάξεις του *GLUD1* που οδηγούσαν σε αντοχή της hGDH1 στην αναστολή από GTP. Οι πρώτες μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν βρισκόταν στα εξόνια 11 και 12 του γονιδίου, προκαλώντας αμινοξικές αλλαγές στην περιοχή της αντέννας και της περιστρεφόμενης έλικας (Stanley και συν. 1998, 2000), ενώ κατόπιν εντοπίστηκαν και μεταλλάξεις στα εξόνια 6 και 7 (De Lonlay και συν. 2001, Mc Mullen και συν. 2001). Στις περισσότερες περιπτώσεις (~2/3) επρόκειτο για μεταλλάξεις de novo, ενώ στο 1/3 των περιπτώσεων ήταν κληρονομημένες. Κοινό γνώρισμα των μεταλλάξεων αυτών, όταν μελετήθηκαν λειτουργικά, ήταν ότι αύξαναν σημαντικά την αντοχή της hGDH1 στο GTP. Οι μεταλλάξεις στα εξόνια 6 και 7, καθώς και όσες του εξονίου 12 βρίσκονται επί της περιστρεφόμενης έλικας (π.χ. οι Lys450Glu και His454Tyr), είναι σε θέσεις που εμπλέκονται άμεσα στο σχηματισμό του θυλάκου του GTP. Οι μεταλλάξεις στα εξόνια 11 και 12 που εντοπίζονται στην αντέννα πιθανότατα δρουν έμμεσα, παρεμποδίζοντας τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλεί το GTP. Σχετικά με τη βασική δραστηριότητα των μεταλλάξεων που επηρεάζουν την αναστολή από GTP, αυτή δεν παρουσιάζει διαταραχή στις περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν ελεγχθεί σχετικά, αν και σε κάποιες εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη (κυρίως στην Ser445Leu), ή πολύ ελαττωμένη (Ser448Pro). Μοναδική εξαίρεση στον παραπάνω κανόνα είναι η μετάλλαξη Asn410Thr, που δε φαίνεται να παρεμποδίζει τη δράση του GTP, αλλά αυξάνει πολύ σημαντικά τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου. Στον πίνακα 1.1 φαίνονται οι μέχρι στιγμής αναγνωρισμένες μεταλλάξεις και η επίδρασή τους στην αλλοστερική ρύθμιση και τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου.



<i>Mutant</i>	GTP IC <sub>50</sub>	ADP SC <sub>50</sub>	L-leucine SC <sub>50</sub>	Βασική δραστηρ.	Βιβλ. Αναφορά
S217C	↑	Μικρή ↑	↔	Μικρή ↓	3
R221C	↑	↔, Μικρή ↓	↔	↔	3, 7, 8
R265T	↑	↔	↔	Μικρή ↓	3, 7
R265K	-	-	-	-	4
Y266C	↑	Μικρή ↑	-	↔	6, 7
R269H	↑	↔	↔	↔, Μικρή ↓	3, 8
R269C	↑	↔	↔	Μικρή ↓	3
E296A	-	-	-	-	4
N410T	↔	↔	-	↑↑	9
N410D	-	-	-	-	13
L413V	Μικρή ↑	-	-	↑	10
P436L	↑	-	-	-	13
F440L	↑	↔	↔	↔	1, 5
Q441R	↑	↔	↔	↔	1, 5
Q441L	-	-	-	-	5
I444M	↑	-	-	↔	12
S445L	↑	↔, Μικρή ↑ή↓	↔	↔, Μικρή ↑	1, 2, 4, 5, 7
G446A	↑	↑	-	↔	7
G446S	-	-	-	-	2, 5
G446D	↑	Μικρή ↑, ↔	↔	↔	1, 2, 5, 10, 11
G446V	-	-	-	-	5
G446R	↑	↔	↔	↔	1, 5
A447T	-	-	-	-	5
S448P	↑	↑	Μικρή ↑	↓↓	2
K450E	↑	Μικρή ↑	Μικρή ↑	↔	1, 5
D451V	-	-	-	-	13
H454Y	↑	↔	↔	↔	1, 2, 5

**Πίνακας. 1.1. Μεταλλάξεις της hGDH1 σε ασθενείς με ΣΥΥ και η επίδραση τους στις λειτουργικές ιδιότητες του ενζύμου.** 1: Kelly και Stanley 2001, 2: Stanley και συν. 1998, 3: MacMullen και συν, 2001, 4: Miki και συν. 2000, 5: Stanley και συν. 2000, 6: Tanizawa και συν. 2002, 7: DeLonlay και συν. 2001, 8: Santer και συν, 2001, 9: Yorifuji και συν. 1999, 10: Fujioaka και συν. 2001, 11: Yasuda και συν. 2001, 12: Aso και συν. 2011, 13: Kapoor και συν. 2009. Οι παύλες υποδηλώνουν ότι για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχουν δημοσιευθεί στοιχεία ως προς την αντίστοιχη ιδιότητα. Ο πίνακας είναι τροποποιημένη και συμπληρωμένη εκδοχή σχετικού πίνακα από τη διδακτορική διατριβή του Ι. Ζαγανά (2005)

Πρέπει να αναφερθεί ότι το μοντέλο λειτουργίας των β-κυττάρων που περιγράψαμε είναι αρκετά απλουστευμένο, με πολλούς άλλους παράγοντες να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης σε συνεργασία με τη GDH. Έτσι, η ανεπάρκεια της short-chain 3-OH-acyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) προκαλεί μια ακόμη πιο σπάνια μορφή υπερέκκρισης ινσουλίνης –χωρίς υπεραμμωναιμία- που αποδίδεται σε απορρύθμιση της GDH, με την οποία η SCHAD ενδεχομένως σχηματίζει σύμπλοκο (βλ. Stanley, 2011, για σχετική ανασκόπηση). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας επιπλέον μηχανισμός ελέγχου της απελευθέρωσης ινσουλίνης από τα κύτταρα των

νησιδίων του παγκρέατος, ο οποίος εξαρτάται από τη λειτουργία της GDH, αλλά είναι ανεξάρτητος της ευοδωτικής δράσης της λευκίνης. Οι Herrero-Yraola και συν. (2001) έδειξαν πως η GDH ηπατικών μιτοχονδρίων μπορεί να ανασταλεί μέσω αναστρέψιμης ADP ριβοζυλίωσης σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Σύμφωνα με τους Choi και συν. (2005), και τα δύο ισοένζυμα (hGDH1 και hGDH2) επέδειξαν *in vitro* παρόμοιο βαθμό αναστολής από τη ριβοζυλίωση, που πιθανόν αφορά την Κυστεΐνη 119. Οι Haigis και συν. (2006) απέδειξαν πως μία sirtuin, η πρωτεΐνη SIRT4, είναι το μιτοχονδριακό ένζυμο που, χρησιμοποιώντας το NAD, επιτελεί τη ADP ριβοζυλίωση και δι' αυτού του μηχανισμού καταστέλλει την δραστηριότητα της GDH. Σε κύτταρα ινσουλινώματος *ex vivo*, η απώλεια SIRT4 είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της GDH και συνεπώς την ευόδωση ενεργοποιούμενης από αμινοξέα έκκρισης ινσουλίνης. Η SIRT4 εκφράζεται στο ήπαρ, στα παγκρεατικά κύτταρα, όπου φαίνεται να ελέγχει την έκκριση ινσουλίνης, πιθανώς και με τη βοήθεια άλλων «στόχων» προς ριβοζυλίωση (Ahuja και συν. 2007), καθώς και σε άλλους ιστούς, αλλά δεν λεχει αναφερθεί δράση της στον εγκέφαλο. Όλα τα παραπάνω, ωστόσο, δεν έχουν άμεση σχέση με γενετική διαταραχή της GDH καθ' αυτής.

Κλείνουμε την ενότητα αυτή με μια παρατήρηση που αφορά τις επιληπτικές κρίσεις που συνοδεύουν την εικόνα του ΣΥΥ. Οι De Lonlay και συν. (2001) και Raizen και συν. (2005) αναφέρουν ότι οι κρίσεις των ασθενών, που συνήθως είναι γενεικευμένες κρίσεις του τύπου των αφαιρέσεων, δεν συνδεόνται απαραίτητα με υπογλυκαιμικά επεισόδια, ούτε με έκδηλη υπεραμμωναιμία. Σε πολλούς από τους ασθενείς τους, οι κρίσεις συνοδεύονταν από αναπτυξιακές ανωμαλίες του εγκεφάλου και από διαταραχές της μάθησης και της συμπεριφοράς. Αντίστοιχες είναι και οι παρατηρήσεις των Bahi-Buisson και συν. (2008a). Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι συγγενείς των ασθενών με ΣΥΥ, που είναι φορείς της μετάλλαξης, αλλά δεν εκδηλώνουν κλινικά ή βιοχημικά το ΣΥΥ (υπενθυμίζουμε ότι πρόκειται για gain-of-function μεταλλάξεις για τις οποίες ακόμη και οι βαρύτερα νοσούντες είναι ετερόζυγοι) μπορεί να έχουν ως μόνη εκδήλωση την επιληψία (Bahi-Buisson και συν. 2008b, De las Heras και συν. 2010) Έτσι, θεωρείται ότι, με μηχανισμό που δεν είναι γνωστός, οι κρίσεις σχετίζονται τουλάχιστον εν μέρει με τη διαταραχή της GDH δραστηριότητας στον εγκέφαλο.

#### 1.6.4 Η πιθανή εμπλοκή της GDH στην επιληψία

Όπως είδαμε προηγουμένως, στο ΣΥΥ η διαταραχή της δραστηριότητας της GDH στον εγκέφαλο μπορεί να σχετίζεται με τις επιληπτικές κρίσεις των ασθενών. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει σε μια κατάσταση αυξημένης δραστηριότητας του ενζύμου. Σύμφωνα, ωστόσο, με όσα είπαμε στο υποκεφάλαιο 1.6.2, θα περίμενε κανείς κυρίως η χαμηλή δραστηριότητα της GDH να σχετίζεται με αυξημένη νευρωνική διεγερσιμότητα λόγω υπερεπάρκειας γλουταμικού στη σύναψη. Πράγματι, οι Malthankar-Phatak και συν. (2006) διαπίστωσαν, αναλύοντας χειρουργικά παρασκευάσματα από ασθενείς με φαρμακοανθεκτική κροταφική επιληψία, ότι σε ασθενείς με «έσω» κροταφική επιληψία (mesial temporal lobe epilepsy, MTLE), π.χ. σε ιπποκάμπεια σκλήρυνση, αλλά όχι σε ασθενείς με κροταφική επιληψία στα πλαίσια όγκων ή άλλης δευτεροπαθούς αιτίας, η δραστηριότητα της GDH στο φλοιό (όχι στον ιππόκαμπο) ήταν σαφώς μειωμένη (κατά ~50%), ενώ της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης και της γαλακτικής δεϋδρογονάσης ελαφρά αυξημένη. Χωρίς να μπορούν να αποδείξουν αν αυτή η μείωση είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής, συμπέραναν ότι, σε κάθε περίπτωση, θα μπορούσε να επιδεινώνει τις κρίσεις τους. Σε διαγονιδιακό μοντέλο επιληψίας σε αρουραίους, οι Dutuit και συν. (2000) είχαν δείξει ότι η έκφραση της GDH ήταν όχι μειωμένη, αλλά αυξημένη στο θάλαμο και το φλοιό των πειραματοζώων, και μάλιστα ήδη από νεότετη ηλικία, πριν την εκδήλωση της επιληψίας. Σύμφωνα με άλλη μελέτη των Hammer και συν. (2008), που μελέτησαν μοντέλο κροταφικής επιληψίας σε ποντικούς, η μείωση της έκφρασης της GDH είναι δευτεροπαθής, καθώς εμφανίζεται μετά την εκδήλωση των κρίσεων. Οι Kang και συν. (2006) εκτιμούν ότι πιθανότατα η διαταραχή της έκφρασης της GDH σχετίζεται με τις γενικότερες διαταραχές της αστροκυτταρικής λειτουργίας και με τη διαδικασία αστροκυτταρικής νέκρωσης και αναγέννησης που αποδίδεται στις επιληπτικές κρίσεις. Δεν έχει αναφερθεί, αλλά ούτε και διερευνηθεί, απ' όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, συσχέτιση μεταλλάξεων των γονιδίων *GLUD1* και *GLUD2* με επιληψίες. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η πιθανή εμπλοκή της GDH στην παθογένεση των επιληψιών αξίζει να διερευνηθεί λεπτομερέστερα στο μέλλον.

### 1.6.5 Η GDH σε νευροκφυλιστικά νευρολογικά νοσήματα

Στη δεκαετία του '70 είχε γίνει η παρατήρηση ότι η συστηματική χορήγηση 3-ακετυλοπυριδίνης, που θεωρείται ότι δρα νευροτοξικά μέσω αναστολής των εξαρτώμενων από NADP(H) οξειδοαναγωγασών, σε αρουραίους, οδηγούσε σε διαταραχές της ισορροπίας λόγω εκλεκτικής βλάβης των κάτω ελαιών, των ελαιοπαραεγκεφαλιδικών ινών, πυρήνων εγκεφαλικών νεύρων και περιοχών της γέφυρας και της μέλαινας ουσίας (Desclin και Escubi, 1974), που προσομοίαζε την ελαιογεφυροπαραεγκεφαλική ατροφία (olivopontocerebellar atrophy, OPCA – σήμερα κατατάσσεται, με το όνομα MSA-C, ως υπότυπος της πολυσυστηματικής ατροφίας). Έγινε, λοιπόν, η υπόθεση, ότι τα κοινά νευρωνικά συστήματα που εκφυλίζονται σε τοξικότητα από 3-ακετυλοπυριδίνη και σε OPCA μπορεί να είναι εκλεκτικά ευαίσθητα σε δυσλειτουργία μίας από αυτές τις οξειδοαναγωγάσες και ότι η λειτουργική ανεπάρκεια μίας εξ αυτών ίσως αποτελεί την αιτία της OPCA. Για να διερευνήσουν αυτήν την υπόθεση, οι Plaitakis και συν. (1980) μέτρησαν την δραστηριότητα ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NADP(H) σε καλλιέργειες ινοβλαστών από ασθενείς με OPCA. Από τα ένζυμα που μελέτησαν, μόνο η δραστηριότητα της GDH ήταν σημαντικά μειωμένη στους ινοβλάστες, αλλά και στα λευκοκύτταρα τριών ασθενών. Πειράματα ανάμειξης απέκλεισαν την ύπαρξη αναστολέα της GDH στα κύτταρα, ενώ η δράση αλλοστερικών τροποποιητών ήταν παρόμοια με αυτή σε κύτταρα από φυσιολογικούς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν περισσότερο υπέρ της μειωμένης ποσότητας GDH, παρά υπέρ μιας μεταβολής της συγγένειας του ενζύμου προς τα υποστρώματα ή ποιοτικών αλλαγών στον τρόπο ρύθμισής της. Περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις (Dunvoisin και συν. 1983, Sorbi και συν. 1986, Konagaya και συν. 1986, Tatsumi και συν. 1989), ενώ μερική ανεπάρκεια GDH μετρήθηκε και σε λευκοκύτταρα ασθενών με διαφορετικούς της OPCA τύπους πολυσυστηματικών ατροφικών διαταραχών (Plaitakis και συν. 1984). Στην τελευταία αυτή μελέτη, οι Plaitakis και συν. διαπίστωσαν ότι, κατά τις διαδικασίες ομογενοποίησης και διαχωρισμού των κυτταρικών κλασμάτων, η GDH διακρινόταν σε μια «διαλυτή» και μια «σωματιδιακή» μορφή, εκ των οποίων η πρώτη ήταν θερμοανθεκτική και η δεύτερη θερμοευαίσθητη, η δε μείωση στην GDH αφορούσε κυρίως την θερμοευαίσθητη μορφή (Plaitakis και συν. 1984). Παρ' ότι, με βάση τα όσα είπαμε για τις ιδιότητες των δύο ανθρώπινων ισοενζύμων, είναι μεγάλος ο πειρασμός να υποθέσει κανείς ότι

η θερμοευαίσθητη μορφή αντιστοιχεί στη hGDH2, κάτι τέτοιο δεν αποδείχθηκε. Άλλωστε, έχειδειχθεί ότι απομονώνονται και από εγκεφαλο αρουραίου δύο μορφές, μία δεσμευμένη σε μεμβράνες και μία διαλυτή, που επίσης διαφέρουν ως προς την θερμοευαίσθησία τους (Colon και συν. 1986). Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι, σε νεκροτομικό παρασκεύασμα εγκεφάλου ασθενούς με OPCA, δεν φάνηκε έλλειμμα στη GDH παρόμοιο με αυτό που είχε εμφανίσει ο ίδιος ασθενής εν ζωή σε επανειλημμένους ελέγχους των λευκοκυττάρων του (Chokroverty και συν. 1990). Παρά το γεγονός ότι το θέμα δεν έπαυσε να αποτελεί αντικείμενο έρευνας για πολλά χρόνια, και βοήθησε να αναδειχθεί –καθώς αποτελούσε την πλέον λογική ερμηνεία- το ζήτημα της διεγερτοτοξικότητας στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, μέχρι στιγμής το ακριβές υπόβαθρο της δυσλειτουργίας της γλουταμικής αφυδρογονάσης σε αυτούς τους ασθενείς με πολυσυστηματικές ατροφίες δεν έχει διαλευκανθεί.

#### **1.6.6 Η GDH στη Νόσο του Πάρκινσον**

Επιλέξαμε να κλείσουμε την εισαγωγή της διατριβής μας με λίγα λόγια για την εμπλοκή της GDH στη νόσο του Πάρκινσον, γιατί αποτελεί ένα από τα βασικά εναύσματα των μελετών μας.

Η νόσος του Πάρκινσον θεωρείται ότι είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, και ένα πλήθος γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για τη σποραδική μορφή της νόσου. Πολλοί εξ αυτών σχετίζονται με την –ιδιοπαθή ή δευτεροπαθή- μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ενώ και η διεγερτοτοξικότητα έχει προταθεί ως επικουρικός μηχανισμός. Το τελευταίο ακούγεται παράδοξο, καθώς οι γλουταματεργικοί νευρώνες των βασικών γαγγλίων δεν δείχνουν ιδιαίτερα σημεία εκφύλισης, ενώ, όπως ξέρουμε, τα κυρίαρχα συμπτώματα της νόσου σχετίζονται με την εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου. Ωστόσο, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες τις μέλαινας ουσίας φαίνεται ότι διαθέτουν τόσο υποδοχείς και μεταφορείς του γλουταμικού, όσο και ικανές ποσότητες ενζύμων για να το καταβολίζουν, όπως η GDH, η αναστολή της έκφρασης οποίας σε καλλιέργειας μεσεγκεφαλικών νευρώνων έχειδειχθεί ότι μειώνει την επιβίωσή τους (Plaitakis και Shashidharan, 2000). Κατά τα λοιπά, τα στοιχεία που επιτρέπουν να συνδέσει κανείς την νόσο του Πάρκινσον με διαταραχές της

γλουταματεργικής διαβίβασης είναι μάλλον πενιχρά και έμμεσα. Λόγου χάριν, έχει δειχθεί ότι οι τροποποιητές των μεταβοτροπικών γλουταματεργικών υποδοχέων, που έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται δοκιμαστικά για τον έλεγχο των υπερκινησιών που συνοδεύουν τη θεραπεία με L-DOPA και ντοπαμινεργικούς αγωνιστές, ενδέχεται να έχουν και νευροπροστατευτική δράση (βλ. για ανασκόπηση Duty, 2010). Λίαν πρόσφάτως έχει αναφερθεί ότι η προστατευτική επίδραση του καφέ, που έχει δειχθεί σε επιδημιολογικές μελέτες ότι μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, πιθανώς σχετίζεται με την παρουσία πολυμορφισμών στο γονίδιο *GRIN2A* που κωδικοποιεί υπομονάδα του NMDA υποδοχέα του γλουταμικού (Hamza και συν. 2012) – ένα πολύ καλο παράδειγμα για να τονισθεί η πολυπλοκότητα της παθογένειας της νόσου και η εξάρτησή της από ένα πλέγμα περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα δεν είχε αναφερθεί εμπλοκή γονιδίου σχετιζόμενου με το μεταβολισμό του γλουταμικού στη νόσο του Parkinson.

Στο εργαστήριό μας, είχε ελεγχθεί το γονίδιο *GLUD2* σε μερικές δεκάδες ασθενών με διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, μεταξύ των οποίων και σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον, με SSCP. Ανιχνεύθηκε ένας πολυμορφισμός (T1492G) στο καρβοξυτελικό άκρο της κωδικεύουσας περιοχής του γονιδίου, που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλλαγή Ser445Ala, ο οποίος, αν και υπήρχε και σε υγιείς controls, φαινόταν να είναι συχνότερος στους παρκινσονικούς ασθενείς. Ο υποφαινόμενος ανέλαβε, στα πλαίσια της διπλωματικής του εργασίας για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, να ερευνήσει την παρουσία του πολυμορφισμού σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών και υγιών μαρτύρων. Σε 217 ασθενείς και 205 υγιείς μάρτυρες, όλοι κρητικής καταγωγής και σταθμισμένοι ως προς την ηλικία, βρέθηκαν συνολικά 18 θετικά για τον πολυμορφισμό δείγματα (11 ετερόζυγων γυναικών και 7 ημίζυγων ανδρών), που αντιστοιχούν σε συχνότητα πολυμορφισμού ~3%. Ασθενείς και μάρτυρες δεν διέφεραν σημαντικά ως προς τη συχνότητα παρουσίας του πολυμορφισμού. Όμως, ανάλυση για την ηλικία έναρξης της νόσου των ασθενών, έδειξε ότι και οι τρεις ημίζυγοι για τον πολυμορφισμό άνδρες ασθενείς είχαν πολύ μικρότερη (κατά >15 έτη) ηλικία έναρξης της νόσου από όλους τους υπόλοιπους ασθενείς, των ετερόζυγων γυναικών συμπεριλαμβανομένων (με στατιστική σημαντικότητα της τάξης του  $p < 0.01$  για κάθε δοκιμασία). Αντίθετα, οι τέσσερις ετερόζυγες γυναίκες δεν διέφεραν ως προς την ηλικία έναρξης από το σύνολο των ασθενών και τις αρνητικές για τον πολυμορφισμό γυναίκες (Καναβούρας, MSc

Thesis, 2004). Παράλληλα, ο πολυμορφισμός υποκλωνοποιήθηκε (από τον I. Ζαγανά) και εκφράστηκε σε κύτταρα Sf21. Τα αποτελέσματα των αρχικών λειτουργικών μελετών σε αδρά εκχυλίσματα ήταν σε μεγάλο βαθμό αντιφατικά μεταξύ τους, διαφαινόταν ωστόσο, παρά τις διακυμάνσεις, μία ήπια αύξηση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2-Ser445Ala (~8-10%, έναντι ~6% της hGDH2). Αυτό ήταν συμβατό με τα αποτελέσματα των Stanley και συν. (2000) για την ανιχνευθείσα σε ασθενείς με ΣΥΥ ομοειδή μετάλλαξη Ser445Leu στην hGDH1, που, πλην της αντοχής στο GTP, παρουσίαζε και αυξημένη βασική δραστηριότητα (βλ. πίνακα 1.1). Όμως, δημιουργούσε το ερώτημα γιατί μία φυλοσύνδετη gain-of-function μετάλλαξη δεν είχε επίδραση σε ετερόζυγες γυναίκες, παρά μόνο σε ημίζυγους άνδρες. Έτσι, αφ' ενός δρομολογήθηκε η προσπάθεια να ελεγχθεί το ένζυμο λεπτομερώς σε καθαρή μορφή –αυτό απετέλεσε έναν από τους στόχους της διατριβής μας και θα εξεταστεί σε επόμενο κεφάλαιο- , και αφ' ετέρου τέθηκε ο στόχος να ελεγχθούν περισσότεροι ασθενείς για την παρουσία του πολυμορφισμού, ώστε να επαληθευθεί κατά πόσο ευσταθούν τα ευρήματά μας.

Ο έλεγχος σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού ασθενών (808 ασθενείς από διαφορετικούς πληθυσμούς, ελληνικής και μη προελεύσεως), που έγινε με τη συνδρομή και άλλων κέντρων, τελικώς τεκμηρίωσε τα ευρήματά μας στους κρητικούς ασθενείς (βλ. Plaitakis και συν. 2010): Ο πολυμορφισμός hGDH2-Ser445Ala δεν σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη νόσου του Πάρκινσον, όμως δείχνει να επιφέρει επιτάχυνση της εκδήλωσης της νόσου σε ημίζυγους άρρενες. Και όπως θα δούμε και στη συνέχεια, πιθανότατα το κάνει αυτό με την τροποποίηση της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου.

## 2. Σκοποί και γενικός σχεδιασμός της μελέτης

Όπως είδαμε, η GDH παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος, το οποίο είναι σημαντικό για τον μεταβολισμό όλων των κυττάρων και αποτελεί επίσης τον κύριο διεγερτικό διαβιβαστή στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο άνθρωπος διαθέτει, σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα θηλαστικά, ένα επιλέον GDH ισοένζυμο, την hGDH2, που φαίνεται ότι έχει τροποποιηθεί σύμφωνα με τις επιταγές της φυσικής επιλογής, και το οποίο εκφράζεται εκλεκτικά, μεταξύ άλλων οργάνων, και στον εγκέφαλο. Διαταραχές στο μεταβολισμό του γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή πιστεύεται ότι σχετίζονται με μηχανισμούς νευροεκφύλισης, και η μεταβολή της δραστηριότητας της GDH πιθανώς ενέχεται σε τέτοιες διαδικασίες. Η δραστηριότητα της GDH εμφανίζεται μειωμένη σε ασθενείς με πολυσυστηματικά νευρολογικά νοσήματα, ενώ μεταλλάξεις στο *GLUD1* γονίδιο, που αυξάνουν τη δραστηριότητα της hGDH1, προκαλούν το ΣΥΥ, το οποίο συνοδεύεται και από νευρολογικές επιλοκές. Επίσης, ο πολυμορφισμός Ser445Ala στο *GLUD2* γονίδιο φαίνεται να επιταχύνει την εκδήλωση της νόσου του Πάρκινσον, ενδεχομένως διά της αύξησης της δραστηριότητας της hGDH2. Έτσι, ο έλεγχος της δραστηριότητας της γλουταμικής αφυδρογονάσης φαίνεται να είναι μεγάλης σημασίας για τη λειτουργία, μεταξύ άλλων οργάνων, και του εγκεφάλου. Τα δύο ισοένζυμα, hGDH1 και hGDH2, διαφέρουν σημαντικότερα όχι μόνο ως προς την αλλοστερική ρύθμιση της δραστηριότητάς τους, αλλά και ως προς τη δραστηριότητα σε απουσία ρυθμιστών, δηλ. τη βασική δραστηριότητα. Θεωρούμε, με βάση τα παραπάνω, ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH2 είναι κομβικής σημασίας.

Γενικός στόχος της διατριβής είναι, λοιπόν, η διερεύνηση των μηχανισμών, μοριακών και μή, με τους οποίους επιτυγχάνεται ο έλεγχος της βασικής δραστηριότητας στη hGDH2.

Παρ' ότι η βασική δραστηριότητα είναι μια από τις ιδιότητες στις οποίες διαφέρουν εντονότερα τα δύο ισοένζυμα, αυτό δεν είχε μελετηθεί σε καθαρισμένα ένζυμα, ούτως ώστε να διερευνηθούν ιδιαίτερες πτυχές της διαφοράς αυτής. Η σημασία λεπτών διαφορών τονίζεται από τα πρώτα αποτελέσματα εκ του ελέγχου του μεταλλάγματος hGDH2-Ser445Ala σε αδρά εκχυλίσματα, που υποδηλώνουν ότι μικρές διαφορές στη βασική δραστηριότητα ίσως ευθύνονται για την επιταχυντική



της νευροεκφύλισης δράση του πολυμορφισμού αυτού. Όσον αφορά, τέλος, τη διαφοροποίηση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 από αυτή της hGDH1, η αμινοξική αλλαγή Arg443Ser δεν επαρκεί για να εξηγήσει τη χαμηλή μεν, αλλά σε καμιά περίπτωση μηδαμινή βασική δραστηριότητα της hGDH2, που δεν φαινόταν να αναπαράγεται ούτε από το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, σύμφωνα με τα πρώτα αποτελέσματα σε αδρά εκχυλίσματα.

Τα ερωτήματά που τέθηκαν, λοιπόν, ήταν:

α) Σε τί βαθμό διαφέρει η βασική δραστηριότητα της hGDH2 από αυτή της hGDH1 σε διάφορες συνθήκες; Πώς ελέγχεται η δραστηριότητά τους, πέραν της δράσης αλλοστερικών τροποποιητών;

β) Μπορεί να εξηγηθεί η βασική δραστηριότητα και οι λοιπές ιδιότητες της hGDH2 μόνο από τις δύο αμινοξικές αλλαγές στην αλλοστερική του ενζύμου, που, μελετημένες ως μονά μεταλλάγματα, προσέδωσαν σημαντικά διαφορετικές ιδιότητες στο ένζυμο; Αν όχι, οι αμινοξικές αλλαγές που συνεπικουρούν στη ρύθμιση του ενζύμου βρίσκονται και αυτές στην αλλοστερική περιοχή, ή εντοπίζονται και σε άλλα σημεία;

γ) Η αμινοξική αλλαγή Ser445Ala μεταβάλλει όντως τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, και, αν ναι, σε τί βαθμό; Επάγει άλλες μεταβολές στη ρύθμιση του ενζύμου, όπως π.χ. η συναφής μετάλλαξη Ser445Leu στη hGDH1, που προκαλεί το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας; Επίσης, οι λοιπές μεταλλάξεις στη hGDH1, που προκαλούν το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας, στην υποθετική περίπτωση που επισυνέβαιναν στη hGDH2, θα ήταν πιθανό να προκαλέσουν επιτάχυνση της νευροεκφύλισης όπως η Ser445Ala;

Έτσι, οι σκοποί μας εξειδικεύθηκαν ως εξής:

1) Να παράξουμε και να μελετήσουμε συγκριτικά τα δύο ισοένζυμα hGDH1 και hGDH2 σε καθαρή μορφή, με έμφαση στη βασική δραστηριότητα και τους παράγοντες που την καθορίζουν ή σχετίζονται με αυτήν. Συμπληρωματικά, να μελετήσουμε συγκριτικά τη βασική δραστηριότητα της hGDH2 και του διπλου

μεταλλάγματος hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala σε καθαρή μορφή, για να διερευνηθεί επακριβώς σε τί βαθμό η βασική δραστηριότητά τους διαφέρει.

2) Να παράξουμε και να μελετήσουμε σε καθαρή μορφή το μετάλλαγμα hGDH2-Ser445Ala, για να επαληθεύσουμε κατά πόσο διαφέρει ως προς τη βασική του δραστηριότητα και, ενδεχομένως, ως προς άλλες ιδιότητες.

3) Με το –προσωρινό- δεδομένο ότι οι ιδιότητες της hGDH2 δε φαίνεται να αναπαράγονται από το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala στο σύνολό τους, να ελέγξουμε κατά πόσο άλλες μεταλλάξεις είναι απαραίτητο συμπλήρωμα για να αναπαραχθούν αυτές οι ιδιότητες, και το αν αυτές βρίσκονται επίσης στη ρυθμιστική περιοχή (δηλ. την αντέννα και την περιστρεφόμενη έλικα) ή σε άλλες περιοχές του μορίου.

4) Τέλος, εφ' όσον αποδειχθεί ότι η αμινοξική αλλαγή Ser445Ala αντιπροσωπεύει μια gain-of-function μετάλλαξη, να διαπιστώσουμε κατά πόσο άλλες, αντίστοιχες αμινοξικές αλλαγές, όπως αυτές που έχουν εντοπισθεί στη hGDH1 στο σύνδρομο υπερινσουλισμού-υπεραμμωναιμίας και αυξάνουν τη δραστηριότητά της, μπορούν να έχουν παρόμοια επίδραση στη hGDH2.

Όσον αφορά το γενικό σχεδιασμό της μελέτης, σχετικά με τους δύο πρώτους σκοπούς η στοχοθεσία είναι σαφής: προβλέπει την παραγωγή των αντίστοιχων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDH πρωτεϊνών (hGDH1, hGDH2, hGDH2-Ser445Ala, hGDH1-Arg443Ser και hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala) που ήδη είχαν εκφραστεί από άλλους ερευνητές, σε μεγάλη κλίμακα, εν συνεχεία τον καθαρισμό τους, και κατόπιν τη λειτουργική ενζυμική μελέτη τους, με τεχνικές που θα εξετάσουμε στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας.

Σχετικά με τον τρίτο στόχο, επιλέξαμε καταρχάς να σχεδιάσουμε και να μελετήσουμε ένα «ανάστροφο» της hGDH1-Arg443Ser μετάλλαγμα, το hGDH2-Ser443Arg, για να διαπιστώσουμε αν αυτό ομοιάζει, όσον αφορά ιδίως τη βασική δραστηριότητα, περισσότερο στη hGDH1 (που θα ήταν το αναμενόμενο) ή στη hGDH2, προκειμένου να ελεγχθεί η συνολική επίδραση των λοιπών –πλην της Arg443Ser- αμινοξικών αλλαγών στη βασική δραστηριότητα της hGDH2. Επίσης, σχεδιάσαμε την παραγωγή ενός πολλαπλού μεταλλάγματος που να περιέχει όλες τις

αμινοξικές διαφορές στην αλλοστερική περιοχή (αντέννα και rivot helix) του ενζύμου, για να ελεγχθεί αν αυτές επαρκούν για την αναπαραγωγή των ιδιοτήτων της hGDH2. Συμπληρωματικά, με το δεδομένο ότι η αμινοξική αλλαγή Ser174Asn φαίνεται να αυξάνει τη βασική δραστηριότητα της hGDH1, αποφασίσαμε την «προσθήκη» της αμινοξικής αυτής αλλαγής στο διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, προσδοκώντας ότι το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala μπορεί να αποτελεί καλύτερη προσομοίωση της hGDH2. Η μελέτη όλων των μεταλλαγμάτων αυτών θα γινόταν αρχικά σε αδρά εκχυλίσματα, και, επί ενδείξεως, και σε καθαρισμένη μορφή.

Τέλος, όσον αφορά τον τέταρτο στόχο, σχεδιάσαμε την παραγωγή μιας σειράς μεταλλαγμάτων της hGDH2, που να φέρουν κάποιες από εκείνες τις μεταλλάξεις που στη hGDH1 προκαλούν –κυρίως διά της άρσης της αναστολής από GTP- αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, και συγκεκριμένα μεταλλάξεις εντοπιζόμενες στην αντέννα και την περιστρεφόμενη έλικα, δηλαδή εγγύς των αμινοξικών αλλαγών Arg443Ser, Ser445Ala και Gly456Ala. Επελέγησαν ως αντιπροσωπευτικές της θέσης και της πιθανής επίδρασής τους στο ένζυμο (σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία από τη μελέτη των ίδιων μεταλλάξεων στη hGDH1) οι μεταλλάξεις Gln441Arg, Ser445Leu, Ser448Pro, Lys450Glu και His454Tyr. Και η μελέτη των μεταλλαγμάτων αυτών θα γινόταν αρχικά σε αδρά εκχυλίσματα, και, στο βαθμό που θα κρινόταν απαραίτητο, και σε καθαρισμένη μορφή.

Συμπληρωματικά στους ως άνω στόχους, προσπαθήσαμε, στο βαθμό που μας επιτρέπουν τα μέσα μας, να ελέγξουμε αν προκαλούνται, από τις σημαντικότερες των παραπάνω αμινοξικών αλλαγών, μείζονες αλλαγές στη δομή του ενζύμου, ανιχνεύσιμες με αδρές ηλεκτροφορητικές μεθόδους. Ας αναφερθεί ότι στην ευρύτερη στοχοθεσία των ερευνών μας πάνω στη δομή της hGDH2 ήταν και παραμένει η κρυσταλλογραφική ανάλυση της αγρίου τύπου hGDH2 και μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου, που όμως, καθώς η πραγματοποίησή της αφορά ερευνητές άλλων, εξειδικευμένων στις τεχνικές αυτές εργαστηρίων, δεν εντάσσεται στους στόχους της παρούσης διατριβής.

## 3.Μεθοδολογία

### 3.1.Παραγωγή μεταλλαγμένων ενζύμων

#### 3.1.1 Σχεδιασμός και επιλογή θέσεων

Για να μελετηθούν η επίδραση συγκεκριμένων αμινοξικών θέσεων στις λειτουργικές ιδιότητες της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης σχεδιασθηκε και εκτελέστηκε η μεταλλαξιογένεση του *GLUD2* γονιδίου ενζύμου σε θέσεις που αντιστοιχούν στην ρυθμιστική περιοχή του hGDH2 ενζύμου οι οποίες δυνητικά εμπλέκονται στη ρύθμιση της βασικής δραστηριότητας και τις αλλοστερικές του ιδιότητες. Ο σχεδιασμός περιελάμβανε την μεταλλαξιογένεση και, εν συνεχεία, την έκφραση των μεταλλαγμένων και των αγρίου τύπου cDNAs σε καλλιέργειες κυττάρων Sf21 (*Sporoptera fugiperda*) με το σύστημα διαμόλυνσης του βακουλοϊού (*baculovirus*), με στόχο την απομόνωση των διαφόρων αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένων μορφών της ανθρώπινης GDH από τα διαμολυσμένα Sf21 κύτταρα για να καταστεί δυνατή η λειτουργική ενζυμική μελέτη τους, είτε σε αδρά εκχυλίσματα, είτε μετά από πρωτεϊνικό καθαρισμό.

Ας αναφερθεί καταρχήν ότι, προκειμένου να γίνει σαφής η σπουδαιότητα των αμινοξικών διαφορών μεταξύ των δυο ανθρώπινων ισοενζύμων της GDH, και να γίνουν κατανοητές οι ιδιότητες της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης, μελετήθηκαν, φυσικά, εκτός από τα μεταλλάγματα που παρήχθησαν στα πλαίσια της παρούσης διατριβής και που θα περιγραφούν στη συνέχεια, και οι αγρίου τύπου hGDH2 και hGDH1, των οποίων το cDNA είχε κλωνοποιηθεί παλαιότερα (Shashidharan et al. 1994). Επίσης, μελετήθηκαν σε κάποια πειράματα και hGDH1-μεταλλάγματα, και τα οποία έφεραν το αντίστοιχο αμινοξύ της hGDH2 στην επιλεγμένη θέση (Arg443Ser, Ser174Asn), η μεταλλαξιογένεση των όποιων είχε γίνει παλαιότερα στο εργαστήριο μας από τον Ι. Ζαγανά, καθώς και διπλό μετάλλαγμα το οποίο διαφέρει από την φυσιολογική πρωτεΐνη του hGDH1 σε δύο θέσεις (Arg443Ser/Gly456Ala), που είχε παραχθεί από τον Β. Μαστοροδήμο, στα πλαίσια της διδακτορικών τους διατριβών στο εργαστήριο μας. Τέλος, μελετήθηκε ενζυμικά και το μετάλλαγμα hGDH2-Ser445Ala, που αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό

T1492G του *GLUD2*, ο οποίος είχε κλωνοποιηθεί παλαιότερα από το γένομα ανθρώπου ημίζυγου για τον πολυμορφισμό αυτό από τον I. Ζαγανά.

Για τις ανάγκες της παρούσης διατριβής παρήχθησαν τα κάτωθι νέα μεταλλάγματα:

A) Μεταλλάγματα του hGDH2 σε θέσεις της ρυθμιστικής περιοχής του ενζύμου, για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία από προηγούμενες μελέτες ότι επηρεάζουν τη βασική δραστηριότητα ή/και την αλλοστερική ρύθμιση στο hGDH1. Πρόκειται για μεταλλάξεις στο γονίδιο *GLUD1* που ανιχνεύθηκαν, όπως έχουμε αναφέρει προηγουμένως, σε ασθενείς με σύνδρομο υπερινσουλιτισμού- υπεραμμωνιασίου (HI/HA) από την ομάδα του C.A. Stanley (Stanley και συν. 1998 & 2000, Fang και συν. 2004). Συγκεκριμένα, επελέγησαν και παρήχθησαν με σημειακή μεταλλαξιογένεση τα μεταλλάγματα Glu441Arg, Ser445Leu, Ser446Arg, Ser448Pro, Lys450Glu και His454Tyr της hGDH2.

B) Το μετάλλαγμα hGDH2-Ser443Arg. Το μετάλλαγμα αυτό ουσιαστικά αποτελεί το «ανάστροφο μετάλλαγμα» του μεταλλάγματος hGDH1- Arg443Ser, δηλαδή είναι είναι μία hGDH2 στην οποία έχει αποκατασταθεί η Αργινίνη στη θέση 443, που όπως έχει δείχθει σχετίζεται με τη βασική δραστηριότητα και τη θερμοαντοχή του ενζύμου.

Γ) Παρήχθησαν το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και το τετραπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His. Τα μεταλλάγματα αυτά αποτελούν συνδυασμούς αμινοξικών αλλαγών στο μόριο της hGDH1 σε θέσεις όπου διαφέρει από το hGDH2, με αντικατάσταση από το εκάστοτε αμινοξύ που υπάρχει στο τελευταίο, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση μερικών μεταλλάξεων σε συνδυασμό μεταξύ τους και να διευκρινιστεί αν οι υπό μελέτη ιδιότητες της hGDH2 μπορούν να αποδοθούν ή όχι σε αμινοξικές αλλαγές της αλλοστερικής μόνο περιοχής του ενζύμου. Το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asp/Arg443Ser/Gly456Ala αντιστοιχεί στο συνδυασμό του διπλού μεταλλάγματος hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, που αναφέραμε παραπάνω, με την αλλαγή Ser174Asp, που είχε φανεί σε προκαταρκτικές μελέτες να αυξάνει κάπως τη βασική δραστηριότητα της hGDH1. Το τετραπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His αντιπροσωπεύει ουσιαστικά μία hGDH1 που ολόκληρη η αλλοστερική περιοχή της, δηλαδή η αντένα και η περιστρεφόμενη έλικα, έχει αντικατασταθεί από την αντίστοιχη περιοχή της hGDH2. Καθώς οι επιμέρους αμινοξικές αλλαγές είχαν παραχθεί παλαιότερα στο εργαστήριό μας, τα ως άνω πολλαπλά μεταλλάγματα παρήχθησαν με αποκοπή και ένθεση των

αντίστοιχων περιοχών στο cDNA του *GLUD1* με τη βοήθεια ενδονουκλεασών περιορισμού και λιγασών.

### 3.1.2 Παραγωγή μεταλλαγμένων cDNAs

Συνοπτικά, για τις σημειακές μεταλλάξεις, η μεταλλαξιογένεση έγινε στο *GLUD2* cDNA κλωνοποιημένο σε πλασμίδιο pBSKII+. Το μικρό μέγεθος του πλασμιδιακού αυτού φορέα κλωνοποίησης (2.9 Kb) σε σχέση με το pVL1392 (9.6 Kb) διευκολύνει σε σημαντικό βαθμό την συγκεκριμένη τεχνική. Η μεταφορά του μεταλλαγμένου πλέον *GLUD2* cDNA στο πλασμίδιο pVL1392 (το οποίο αποτελεί πλασμίδιο φορέα για τον ανασυνδυασμό του ενθέματος με το DNA του Baculovirus) έγινε σε δεύτερο στάδιο.

Το cDNA του *GLUD2* γονιδίου μεταλλάχτηκε σε συγκεκριμένες θέσεις με χρήση του συστήματος μεταλλαξιογένεσης Gene Editor (Promega, Madison WI) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι εκκινητές (βλ. Πίν. 3.1) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή κατασκευάστηκαν με τη χρήση του διαδικτυακού τύπου Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) και παραγγέλθηκαν από την εταιρεία MWG (Ebersberg, Γερμανία). Οι μεταλλαξιόγονοι εκκινητές, μήκους ~25 νουκλεοτιδίων, σχεδιάστηκαν ώστε να διαφέρουν στο κέντρο τους κατά 1 ή 2 νουκλεοτίδια από την αλληλουχία του *GLUD2* cDNA, για να αλλάζει η μετάφραση του κωδικίου στο επιθυμητό αμινοξύ. Τα μεταλλαξιόγονα ολιγονουκλεοτίδια φωσφορυλιώθηκαν και προσκολλήθηκαν στο cDNA μόριο του *GLUD2* θερμαίνοντας το μείγμα της αντίδρασης στους 75°C και έπειτα ψύχοντάς το αργά στους 37°C. Η αντίδραση προσκόλλησης περιείχε επίσης εκκινητές σχεδιασμένους να μεταλλάξουν το γονίδιο της β-λακταμάσης του φορέα pBSKII+, ώστε να προσδίδει αντοχή και σε αντιβιοτικά πέραν της αμπικιλίνης. Κατόπιν το πλασμίδιο αντιγράφηκε με την T4 DNA πολυμεράση, τα κενά του συγκολλήθηκαν με την T4 DNA λιγκάση και έπειτα χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό του στελέχους BMH 71-18 mutS της *Escherichia coli*. Προκειμένου να επιλεγούν και να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα στα οποία είχε μεταλλαχτεί το γονίδιο της β-λακταμάσης, και συνεπώς με μεγάλη πιθανότητα και το *GLUD2* cDNA, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία ενός κατάλληλου μείγματος αντιβιοτικών. Από τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους JM109 της *Escherichia*

*coli*. Οι κλώνοι με τα πλασμίδια που έφεραν τις προαναφερόμενες μεταλλάξεις επιλέχθηκαν με ταυτοποίηση αλληλουχίας (sequencing).

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα βήματα της σημειακής μεταλλαξιγένεσης και της μεταφοράς του μεταλλαγμένου *GLUD2* cDNA σε φορέα pVL1392.

### 3.1.2.1. Σημειακή Μεταλλαξιγένεση στο pBSKII+ *GLUD2* cDNA

#### Φωσφορυλίωση μεταλλαξιγόνων ολιγονουκλεοτιδίων

1. Προσθήκη διαδοχικά (όγκοι σε  $\mu\text{l}$ ):

ddH <sub>2</sub> O	18.5
Εκκινητής προς 5' φωσφορυλίωση (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
Ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης 10X	2.5
T4 Πολυνουκλεοτιδική Κινάση (10 u/ $\mu\text{l}$ )	0.5
ATP 10mM	2.5
Συνολικός Όγκος	25

2. Επώαση στους 37°C για 30 min και στη συνέχεια απενεργοποίηση της κινάσης στους 70°C για 10 min.

#### Αλκαλική αποδιάταξη pBSKII+ *GLUD2* cDNA

1. Προσθήκη διαδοχικά (όγκοι σε  $\mu\text{l}$ ):

ddH <sub>2</sub> O	16.5
2M NaOH, 2mM EDTA	2
pBSKII+ <i>GLUD2</i> cDNA (1400ng/ $\lambda$ )	1.5
Σύνολο	20

2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά.

3. Προσθήκη 2  $\mu\text{l}$  δ/ματος Οξεικού Αμμωνίου 2M (pH 4.6) και 75  $\mu\text{l}$  100% αιθανόλης (4°C) για εξουδετέρωση.

4. Επώαση στους -70°C για 30min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση (12000g, 4°C) για κατακρήμνιση αποδιαταγμένου DNA. Έκπλυση πελέττας με 70% αιθανόλη, στέγνωμα και επαναδιάλυση σε διάλυμα TE (Tris-EDTA). Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1.5% για επιβεβαίωση της επιτυχούς αποδιάταξης.

### Προσκόλληση φωσφορυλιωμένων μεταλλαξιογόνων ολιγονουκλεοτιδίων στο αποδιαταγμένο pBSKII+ *GLUD2* cDNA

1. Προσθήκη διαδοχικά (όγκοι σε  $\mu\text{l}$ ):

Αλκαλικά αποδιαταγμένο <i>GLUD2</i> cDNA	10
Φωσφορυλιωμένο Ολιγονουκλεοτίδιο Επιλογής (2.9 ng/ $\mu\text{l}$ )	1
Φωσφορυλιωμένο Μεταλλαξιγόνο Ολιγονουκλεοτίδιο (1.25 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
Ρυθμιστικό Διάλυμα Προσκόλλησης (10X)	2
ddH <sub>2</sub> O	6
Συνολικός Όγκος	20

2. Επώαση στους 75°C (5 min), έπειτα αργή (1.5°C/min) μείωση της θερμοκρασίας στους 37°C.

### Σύνθεση μεταλλαγμένης αλύσου και συγκόλληση

1. Προσθήκη διαδοχικά (όγκοι σε  $\mu\text{l}$ ):

ddH <sub>2</sub> O	5
Αντίδραση προσκόλλησης (βλ. άνω)	20
10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Σύνθεσης	3
T4 DNA πολυμεράση	1
T4 DNA λιγάση	1
Σύνολο	30

2. Επώαση στους 37°C για 90 min.

### Μετασηματισμός σε BMH71-18mutS βακτήρια.

1. Προσθήκη ~3 $\lambda$  της αντίδρασης μεταλλαξιογένεσης σε 100  $\mu\text{l}$  επιλεκτικά σε μετασηματισμό (competent) βακτήρια BMH71-18mutS .
2. Επώαση σε πάγο για 10min.
3. Επώαση στους 42°C για 45-50 sec (θερμικό σοκ) και στη συνέχεια σε πάγο.
4. Προσθήκη 900  $\mu\text{l}$  LB και επώαση στους 37°C με ανάδευση για 1 ώρα.
5. Προσθήκη 4 ml LB και 100  $\mu\text{l}$  Gene Editor Antibiotic Selection Mix (Promega). Επώαση για 24-36 ώρες στους 37°C με ανάδευση στις  $\geq 180$  στροφές/min.



### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα BMH71-18mutS βακτήρια.**

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από περίπου 4ml της καλλιέργειας των μετασχηματισμένων BMH71-18mutS βακτηρίων με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, BRD), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

### **Μετασχηματισμός σε JM109 βακτήρια**

1. Προσθήκη ~5 ng από το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τα BMH71-18mutS βακτήρια σε 100 μl JM109 βακτήρια.
2. Σε πάγο για 30min.
3. Στους 42°C για 45-50 sec (θερμικό σοκ) και στη συνέχεια σε πάγο για 2 min.
4. Προσθήκη 900 μl SOC και επώαση στους 37°C με ανάδευση για 1 ώρα.
5. Σπορά σε τρυβλία άγαρος με αμπικιλίνη (125μg/ml) και Gene Editor Antibiotic Selection mix (7.5 μl/ml). Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

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

1. Ενοφθαλμισμός σε περίπου 2ml LB με αμπικιλίνη από τις βακτηριακές αποικίες των JM109. Επώαση στους 37°C με ανάδευση για 15-18 ώρες.
2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες των JM109 βακτηρίων με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid. Διάλυση DNA σε ddH<sub>2</sub>O και ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση.

### **Επιλογή μεταλλαγμένων κλώνων**

Εν συνεχεία, έγινε επιλογή μεταλλαγμένων κλώνων με αλληλούχιση. Αρχικά έγινε έλεγχος περίπου 10 κλώνων από το προηγούμενο στάδιο για την παρουσία της επιθυμητής μετάλλαξης στην αντίστοιχη περιοχή. Κατόπιν, απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον επιλεγμένο μεταλλαγμένο βακτηριακό κλώνο σε μεγάλη κλίμακα (από ~75ml υγρής καλλιέργειας σε LB) και φωτομέτρηση του DNA για ποσοτικοποίηση και έλεγχο καθαρότητας. Έγινε επιβεβαίωση μετάλλαξης, αλλά και έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου με αλληλούχιση σε όλο το μήκος του γονιδίου καθώς και «διαγνωστική» πέψη ολόκληρου του πλασμιδίου για αποκλεισμό μειζόνων αλλαγών στη δομή του με το περιοριστικό ένζυμο FspI. Η αλληλούχιση

έγινε στον αλληλουχητή ABI 3100 (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας τα υλικά και τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εκκινητές αλληλούχισης σχεδιάστηκαν ούτως ώστε να καλύπτουν ανά ζεύγη όλο το μήκος του *GLUD2* cDNA και προς τις δύο κατευθύνσεις.

### **3.1.2.2. Υποκλωνοποίηση μεταλλαγμένου *GLUD2* ενθέματος σε pVL1392**

Το μεταλλαγμένο πλέον *GLUD2* cDNA κόπηκε από τον pBSKII+ φορέα με χρησιμοποίηση των BamHI και NotI περιοριστικών ενδονουκλεασών και συγκολλήθηκε στο μεταφορικό πλασμίδιο pVL1392 του συστήματος Baculovirus. Τα προϊόντα της συγκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του στελέχους JM109 της *E.coli*. Στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από αυτά τα βακτήρια ο σωστός προσανατολισμός του ενθέματος επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση. Μάλιστα, η αλληλουχία DNA του υποκλωνοποιημένου μεταλλαγμένου *GLUD1* cDNA προσδιορίστηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις σε όλο το μήκος του ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία της επιθυμητής μετάλλαξης και να αποκλειστούν τυχόν ανεπιθύμητες μεταβολές του συγκεκριμένου cDNA κατά τη διάρκεια της μεταλλαξιογένεσης.

#### **Πέψη - απομόνωση μεταλλαγμένου ενθέματος και πλασμιδιακού φορέα**

- i. Πέψη 6-8μg από το μεταλλαγμένο κλωνοποιημένο σε pBSKII+ *GLUD2* cDNA με τα ένζυμα BamHI και NotI, ταυτόχρονα (με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος BamHI και BSA).
- ii. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% και απομόνωση μεταλλαγμένου *GLUD2* cDNA ενθέματος (μπάντα μεγέθους ~1.8 Kb) με χρήση του Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen).
- iii. Πέψη 10-15 μg του πλασμιδίου pVL1392/*GLUD2* με τα ένζυμα BamHI και NotI, ταυτόχρονα (με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος BamHI και BSA).
- iv. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% και απομόνωση πλασμιδιακού φορέα pVL1392 (μπάντα μεγέθους ~9.6 Kb).
- v. Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA (πλασμιδιακού φορέα και μεταλλαγμένου ενθέματος) σε πήκτωμα αγαρόζης συγκρίνοντας με γνωστές ποσότητες DNA.

### Συγκόλληση πλασμιδιακού φορέα και μεταλλαγμένου *GLUD2* ενθέματος.

1. Προσθήκη διαδοχικά για κάθε αντίδραση συγκόλλησης (Fast Link Ligation Kit, Epicentre):

Fast Link Ligation Buffer	1.5 $\mu$ l
10mM ATP	1.5 $\mu$ l
pVL1392 πλασμιδιακός φορέας	x $\mu$ l (=300ng)
μεταλλαγμένο ένθεμα	y $\mu$ l (=100ng)
Fast Link DNA λιγάση	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελ. όγκου 15 $\mu$ l

Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100 ng ενθέματος (y  $\mu$ l) και 300 ng πλασμιδιακού φορέα (x  $\mu$ l). Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τον τύπο: ng ενθέματος = ng πλασμιδιακού φορέα x [μέγεθος ενθέματος / μέγεθος πλασμιδιακού φορέα] x 2, ούτως ώστε στην αντίδραση να υπάρχει μοριακός λόγος ενθέματος/φορέα 1:2. Αφού χρησιμοποιήσαμε 300 ng φορέα pVL1392 για κάθε αντίδραση, η ποσότητα του ενθέματος έπρεπε να είναι 100 ng [300ng x (1800/9600) x 2].

2. Επώαση περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
3. Επώαση στους 70°C για 15min προς αδρανοποίηση της λιγάσης.
4. Μετασχηματισμός ~5 $\mu$ l της αντίδρασης συγκόλλησης σε Supercompetent JM109 βακτήρια (Promega), όπως αναφέρεται παραπάνω.
5. Ανακαλλιέργεια από τις αποικίες των τρυβλίων που προέκυψαν στο στάδιο 4 σε ~4 ml LB και απομόνωση πλασμιδιακού DNA, όπως αναφέρεται παραπάνω.
6. Επιλογή κατάλληλου κλώνου (φέροντος το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pVL1392/μεταλλαγμένο *GLUD2* cDNA) με ανάλυση με αλληλούχιση.
7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον επιλεγμένο μεταλλαγμένο βακτηριακό κλώνο σε μεγάλη κλίμακα (από 75 ml υγρή καλλιέργεια). Φωτομέτρηση DNA για ποσοτικοποίηση και καθαρότητα. Επιβεβαίωση μετάλλαξης και ορθότητας πλασμιδίου με αλληλούχιση και ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (Nsp I). Αποκλεισμός άλλων μεταλλάξεων με αλληλούχιση δύο κατευθύνσεων σε όλο το μήκος του ενθέματος. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές αλληλούχισης που καλύπτουν ανά ζεύγη όλο το μήκος του *GLUD2* cDNA και επιπλέον τις περιοχές ενθεσης εκατέρωθεν του πλασμιδιακού φορέα pVL1392.

### 3.1.2.3. Δημιουργία πολλαπλών μεταλλαγμάτων

Για το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asp/Arg443Ser/Gly456Ala και το τετραπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία παραγωγής τους με αποκοπή και ένθεση περιοχών του γονιδίου:

1) Για το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, από το μεταλλαγμένο για την αμινοξική θέση 174 (Ser174Asn) pBSKII+ *GLUDI* cDNA, που είχε παραχθεί παλαιότερα από τον Ι. Ζαγανά, αφαιρέθηκε αρχικά με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BsmI και BsrGI περιοχή μήκους 361 βάσεων που αντιστοιχεί στο σύνολο της περιοχής της αντέννας και της περιστρεφόμενης έλικας. Εν συνεχεία έγινε ένθεση αντίστοιχης, ίσου μήκους περιοχής που αφαιρέθηκε από το μεταλλαγμένο στις θέσεις 443 και 456 (Arg443Ser/Gly456Ala) pBSKII+ *GLUDI* cDNA, που είχε παραχθεί παλαιότερα από τον Β. Μαστοροδήμο.

2) Για το μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία, με την αφαίρεση περιοχής 361 βάσεων με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BsmI και BsrGI από το αγρίου τύπου pBSKII+ *GLUDI* cDNA και εν συνεχεία ένθεσης της αντίστοιχης περιοχής από το αγρίου τύπου pBSKII+ *GLUD2* cDNA, δημιουργώντας ουσιαστικά ένα χμιαϊκό υβρίδιο hGDH1/hGDH2.

#### Αντιδράσεις πέψης - απομόνωσης ενθέματος και φορέα, συγκόλληση

- i. Πέψη 3-4μg του πλασμιδίου pBSKII+ *GLUDI* cDNA- Arg443Ser/Gly456Ala ή του pBSKII+ *GLUD2* cDNA (βλ. άνω) με τα ένζυμα BsrGI και BsmI, διαδοχικά στο ίδιο μείγμα αντίδρασης, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος NEB2 και BSA. Επώση μόνο με BsrGI αρχικά στους 37°C (βέλτιστη θερμοκρασία για το BsrGI) για 2 ώρες και εν συνεχεία προσθήκη του BsmI και επώση για άλλες 2 ώρες στους 65°C
- ii. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και απομόνωση ενθέματος (μπάντα μεγέθους ~350 bp) με χρήση του Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen).
- iii. Πέψη 6-8 μg από το (μεταλλαγμένο ή μη στη θέση 174, βλ. άνω) pBSKII+ *GLUDI* cDNA με τα ένζυμα BsrGI και BsmI, όπως παραπάνω.
- iv. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% και απομόνωση φορέα (μπάντα μεγέθους ~4.5 Kb).
- v. Αντίδραση συγκόλλησης φορέα και ενθέματος όπως παραπάνω (βλ. 3.1.1.2), και πάλι με μοριακό λόγο ενθέματος/φορέα 1:2.

Για την υποκλωνοποίηση των δύο πολλαπλών μεταλλαγμάτων σε μεταφορικό πλασμίδιο pVL, ούτως ώστε να καταστεί δυνατή η συνδιαμόλυνση με Baculovirus και η έκφραση σε κύτταρα Sf21, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο που περιγράφεται στο 3.1.1.2, με μόνη διαφορά τη χρήση του υποτύπου pVL1393 του φορέα και των περιοριστικών ενδονουκλεασών BamHI και PstI (αντί του pVL1392 και των ενδονουκλεασών BamHI και NotI, αντίστοιχα), λόγω μικρών διαφορών στις περιοχές ένθεσης του *GLUDI* cDNA κατά την αρχική κλωνοποίησή του στον φορέα pBSKII+.

Όνομασία Εκκινήτη	Αλληλουχία	Χρήση
Glu441Arg	ACGGCAGAGTTCCGAGACAGTATATCG	Μεταλλαξιογένεση
Ser445Leu	CAAGACAGTATATTGGGTGCATCTGAG	Μεταλλαξιογένεση
Glu446Arg	CAAGACAGTATATCGCGTGCATCTGAGAAAG	Μεταλλαξιογένεση
Ser448Pro	GTATATCGGGTGCACCTGAGAAAGACATTG	Μεταλλαξιογένεση
Lys450Glu	GGTGCATCTGAGGAAGACATTGTGC	Μεταλλαξιογένεση
His454Tyr	GAAAGACATTGTGTACTCTGCCTTGGC	Μεταλλαξιογένεση
Ser443Arg	TTCCAAGACAGGATATCGGGTGC	Μεταλλαξιογένεση
K1S	AGTCTGAGAAAGCGCACCT	sequencing
K1AS	ATGGTGAACCTCCTTGTGAT	sequencing
K2S	CAAGTGTGCAGTGGTTGAT	PCR, sequencing
K2AS	TGATCTTGGCTTTGACTCTG	PCR, sequencing
K3S	ATG AAG GAA GCA TCT TGG AG	PCR, sequencing
K3AS	TGTCAGGAGAGAAAGGGATT	PCR, sequencing
ZAGS	ACCGGTGGATCCTCCTCCGCCTCCCATCTTTGTGAA	PCR, sequencing
GLUDEND	CTTCGAATTCAAAGCGCACCTGTTCCGCGACCGTCA	PCR, sequencing
PolyhFWD	AAATGATAACCATCTCGC	sequencing
PolyhREV	GTCCAAGTTTCCCTG	sequencing

**Πιν. 3.1.** Όνομασία και αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Με έντονη γραφή και υπογραμμισμένες είναι οι νουκλεοτιδικές αλλαγές στους μεταλλαξιογόνους εκκινήτες

### 3.1.3. Έκφραση σε κύτταρα Sf21

Τα κύτταρα Sf21 προέρχονται από τις ωοθήκες του εντόμου *Spodoptera frugiperda* και επιλέχθηκαν για την έκφραση της ανθρώπινης GDH για δύο λόγους. Καταρχήν, επειδή αποτελούν ένα ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης όπου πρωτεϊνικά μόρια με πολύπλοκη πρωτεϊνική δομή υφίστανται τις φυσιολογικά προβλεπόμενες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, ενώ παράλληλα επιτρέπουν την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης σε σχέση με ανθρώπινης προέλευσης κυτταρικές σειρές. Έπειτα, για το εξ' ίσου σημαντικό λόγο ότι, παρ' ότι διαθέτουν ενδογενή GDH, αυτή

έχει απόλυτη ειδικότητα για το συνένζυμο NAD(H). Έτσι, τα μη διαμολυσμένα με ανασυνδυασμένο με *GLUD* Baculovirus ιό Sf21 κύτταρα δείχνουν μηδενική GDH δραστηριότητα όταν χρησιμοποιείται το NADP(H) ως συμπάραγοντας. Συνεπώς, οι ενζυμικές μελέτες των εκχυλισμάτων των (διαμολυσμένων με ανασυνδυασμένο με *GLUD* Baculovirus ιό) κυττάρων Sf21 έγιναν με χρήση του NADP(H) ως συνενζύμου, πράγμα που επέτρεψε την μελέτη των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων ενζύμων ακόμη και σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα χωρίς την παρεμβολή της ενδογενούς GDH των κυττάρων Sf21.

Τα κύτταρα Sf21 αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο TNM-FH (“Grace’s full medium”), δεν απαιτούν διοξείδιο του άνθρακος και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και μόλυνσης είναι οι 27°C. Τα μεταλλαγμένα (ή αγρίου τύπου) *GLUD1* και *GLUD2* cDNAs εκφράστηκαν σε κύτταρα Sf21 με χρήση του συστήματος έκφρασης πρωτεϊνών Baculovirus. Κύτταρα Sf21 συνδιαμολύνθηκαν με καθαρισμένο πλασμιδιακό pVL1392-*GLUD2*-cDNA και τροποποιημένο DNA baculovirus (Baculo Gold, BD Pharmingen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή όπως περιγράφεται παρακάτω, και επώαστηκαν στους 27°C για 4-5 ημέρες.

#### **Συνδιαμόλυνση του pVL-*GLUD* cDNA με Baculovirus DNA σε Sf21 cells.**

1. Σπορά από  $2 \times 10^6$  κύτταρα σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup>. Επώαση στους 27°C για ~16 ώρες.
2. Την άλλη μέρα, στο hood σε αποστειρωμένο Eppendorf του 1.5ml ανάμειξη 5μl από το Baculogold DNA (=0.5μg) και 2 μg από το καθαρισμένο pVL/ *GLUD* cDNA.
3. Επώαση για 5-10 min σε RT στο hood και προσθήκη 1ml Transfection Buffer B.
4. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από την φλάσκα και προσθήκη 1ml Baculogold Transfection Buffer A, ανάμειξη.
5. Προσθήκη στην φλάσκα του μείγματος DNA+Transfection Buffer B. Η προσθήκη γίνεται με πιπέτα Pasteur, αργά, στάγδην. Κάθε 2-3 σταγόνες απαλή ανάδευση της φλάσκας. Το διάλυμα DNA+ Transfection Buffer A + Transfection Buffer B πρέπει να πάρει όψη σχεδόν γαλακτώδη.
6. Επώαση στους 27°C για 4 ώρες
7. Αφαίρεση του Transfection Medium και προσθήκη 5ml TNM-FH, ελαφρά ανάδευση, απόρριψη με 5ml πιπέτα του TNM-FH και προσθήκη 5ml φρέσκου TNM-FH. Επώαση στους 27°C για 4-5 μέρες και ακολούθως συγκομιδή.

Ο ανασυνδυασμένος με *GLUD*-cDNA ιός, που απελευθερώνεται από τα κύτταρα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, πολλαπλασιάστηκε αρχικά με 2-3 κύκλους διαμόλυνσης. Γινόταν συγκομιδή των κυττάρων στις 4-5 ημέρες μετά την διαμόλυνση με φυγοκέντριση (400g, 10min, 4°C), αφού προηγείτο προσεκτική αποκόλληση των κυττάρων Sf21 με πιπέττα pasteur (“flushing”) από την επιφάνεια της φλάσκας. Το υπερκείμενο, που περιέχει τα σωματίδια του ανασυνδυασμένου ιού, χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση νέων Sf21 καλλιιεργειών. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι υπήρχε η επιθυμητή μετάλλαξη στον ανασυνδυασμένο ιό, έγινε αλληλούχιση του DNA, κατόπιν πολλαπλασιασμού περιοχής του γονιδίου με PCR, αφού απομονώθηκε ιικό DNA από τα θρεπτικά υλικά που περιείχαν τους ανασυνδυασμένους Baculoviruses με τη χρήση μικροστηλών καθαρισμού DNA (Andersen, 2004).

Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανασυνδυασμένων hGDH πρωτεϊνών. Για να γίνει η εξαγωγή της hGDH, τα καλλιιεργημένα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.05 M Tris HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1mM PMSF & 0.5 M NaCl. Χρησιμοποιήθηκε υάλινος (“glass-to-glass”) κωνικός ομογενοποιητής μικρής απόστασης (clearance) μεταξύ των επιφανειών τριβής 0.010-0.015 mm, και τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με προσθήκη τριπλάσιου όγκου του ως άνω διαλύματος για 5 λεπτά σε ~200 στροφές/min. Το προκύπτον 25% κ.ο. (v/v) πλήρες ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000g, 4°C, για 10 min και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για ενζυμικές μελέτες με ακατέργαστα αδρά εκχυλίσματα ή για περαιτέρω καθαρισμό των επιλεχθέντων πρωτεϊνών. Υπενθυμίζεται ότι τα αδρά εκχυλίσματα περιέχουν και GDH των Sf21, που όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει το NAD(P)H ως συνένζυμο.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων πρωτεϊνών στα αδρά εκχυλίσματα έγινε με την με τη χρήση του DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Inc.), η λειτουργία του οποίου στηρίζεται στις αναγωγικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου του Lowry (Lowry και συν. 1951), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες βοείου ορολευκωματίνης (bovine serum albumin, BSA) ως δείγμα ελέγχου.

### **3.2. Καθαρισμός γλουταμικής αφυδρογονάσης**

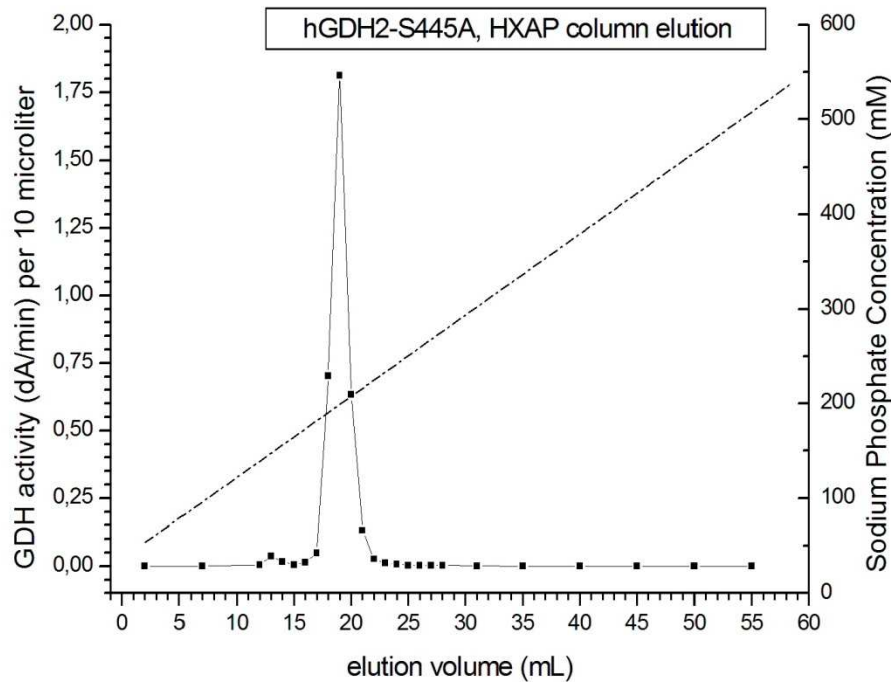
Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών έγινε από αδρά εκχυλίσματα μολυσμένων Sf21 κυττάρων (περίπου  $300 \times 10^6$  κύτταρα, που αντιστοιχούν σε 40-50 φλάσκες) τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris HCL, pH 7.4, που περιείχε 0.1mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100 & 0.1mM PMSF.

Στην συνέχεια στα ομογενοποιημένα εκχυλίσματα κυττάρων έγινε καθίζηση των μεγαλομοριακών συμπλεγμάτων και των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους με προσθήκη (αργά, υπό ανάδευση, στους 4°C) θειϊκού αμμωνίου μέχρι κορεσμού 30%. Μετά από 3-5 ώρες, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και κρατήθηκε το υπερκείμενο (το οποίο περιέχει την hGDH), στο οποίο προστέθηκε επιπλέον θειϊκό αμμώνιο μέχρι τελικού κορεσμού 65%. Το προκύπτον ίζημα μετά από φυγοκέντρηση του παραπάνω διαλύματος επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCl, pH 6.0 και 15% κ.ο. (w/v) θειϊκό αμμώνιο.

Το παραπάνω διάλυμα φορτώθηκε σε στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης με φαινυλσεφαρόζη (Phenyl-Sepharose High Performance, GE Healthcare) και εξισορροπημένη με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με διπλή βαθμίδωση μειούμενης συγκέντρωσης θειϊκού αμμωνίου (15%→0%) και αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλενογλυκόλης (0→90%). Τα κλάσματα (fractions) που συλλέγονταν ελέγχθηκαν για την παρουσία ενζυμικής δραστηριότητας GDH.

Για τον περαιτέρω καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, τα κλάσματα από την στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης με φαινυλσεφαρόζη που περιείχαν GDH, υπεβλήθησαν σε διαπίδυση διαμέσου ημιδιαπερατής μεμβράνης έναντι δύο αλλαγών περισσειας ρυθμιστικού διαλύματος 100mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH 7.15, στους 4°C υπό ανάδευση και στην συνέχεια φορτώθηκαν σε στήλη υγρής χρωματογραφίας με υδροξυαπατίτη (Hydroxyapatite gel, Bio-Rad Inc.). Η στήλη εκλούσθηκε με κλίση συγκέντρωσης 50mM→600mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου με pH 6.8. Στην εικόνα 3.1 φαίνεται παράδειγμα καμπύλης έκλυσης ανασυνδυασμένης hGDH από στήλη υδροξυαπατίτη κατά το τελευταίο στάδιο του καθαρισμού.





**Εικ. 3.1**

Η καθαρή πλέον GDH χρησιμοποιήθηκε για λειτουργικές ενζυμικές μελέτες ή μελέτες ηλεκτροφόρησης. Η καθαρή πρωτεΐνη ήταν σταθερή όσον αφορά την ενζυμική της δραστηριότητα για αρκετούς (2-4) μήνες διατηρούμενη στους 4°C στο διάλυμα στο οποίο εκλούστηκε (~200 mM φωσφορικού νατρίου, pH 6.8).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των καθαρισμένων hGDHs έγινε με πυκνομέτρηση (densitometry) επί σαρωμένων πηκτωμάτων (gels) SDS-πολυακρυλαμίδης βαμμένων με κυανό του Coomassie (βλ. παρακάτω για τη σχετική μεθοδολογία), χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες βοείου ορολευκωματίνης (bovine serum albumin, BSA) ως δείγμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση. Η πυκνομέτρηση και οι αναγωγικοί υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα TINA 2.0. (RayTests, Germany).

Η διαδικασία που περιγράψαμε αποδίδει πρωτεΐνη  $\geq 95\%$  καθαρή, κρίνοντας με βάση τη σάρωση ολόκληρης της λωρίδας (lane) του πηκτώματος. Δεδομένου ότι οι καθαρισμένες πρωτεΐνες είχαν παρουσία 1 mM ADP ειδική ενζυμική δραστηριότητα  $\sim 150\text{-}200 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  καταναλωθέντος NADPH ανά λεπτό ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης), ενώ τα αδρά εκχυλίσματα μετά την πρώτη φυγοκέντριση  $\sim 1\text{-}2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , έπεται ότι με τη μέθοδό μας έχουμε καθαρισμό κατά  $\sim 100$  φορές ως προς τις πρωτεΐνες (αγγλιστί “100-fold purification with respect to proteins”), δηλαδή απομακρύνουμε  $\sim 99\%$  των αρχικών πρωτεϊνών.

### **3.3. Λειτουργικές ενζυμικές μελέτες**

Για τον καθορισμό των κινητικών ιδιοτήτων των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ισοενζύμων της GDH έγιναν μια σειρά από ενζυμικές δοκιμασίες τόσο σε αδρά εκχυλίσματα όσο και σε καθαρισμένες πρωτεΐνες. Για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών των ενζύμων που μελετήθηκαν ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $IC_{50}$ , και  $SC_{50}$  και τις γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης), οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν με μεταβολή της συγκέντρωσης του μελετώμενου υποστρώματος ή αλλοστερικού τροποποιητή διατηρώντας τις συγκεντρώσεις των άλλων παραγόντων της αντίδρασης σταθερές.

#### **3.3.1. Η πρότυπη αντίδραση**

Για τις πιο πολλές ενζυμικές δοκιμασίες, η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο (340nm) στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του ακετογλουταρικού (Colon et al., 1986). Η μέθοδος στηρίζεται στην ελάττωση της απορρόφησης του NADPH (που παρουσιάζει φάσμα απορρόφησης με τη μεγαλύτερη κορυφή του στα 340nm), συνεπεία της μείωσης της συγκέντρωσής του στο μείγμα κατά την αντίδραση. Η ταχύτητα της αντίδρασης μετρήθηκε ως μεταβολή της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου (λόγος  $dA_{340nm}/dt$ ) στο τμήμα του γραφήματος απορρόφησης-χρόνου όπου η μεταβολή παρέμενε γραμμική, κατά κανόνα για 30 δευτερόλεπτα.

Το μείγμα της πρότυπης (“standard”) αντίδρασης είχε όγκο 1 ml και περιείχε 50 mM triethanolamine HCl buffer, pH 8.0, 100 mM οξικό αμμώνιο, 150 mM NADPH και 2.6 mM EDTA. Η έναρξη της αντίδρασης γινόταν με την προσθήκη ακετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8 mM. Όπου δεν αναφέρεται διαφορετικά, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C.

Για να καθοριστεί η ειδική δραστηριότητα των καθαρισμένων ενζύμων μετρήθηκε η δραστηριότητα ( $dA_{340nm}/min$ ) ενός ορισμένου όγκου τους υπό ορισμένες συνθήκες (π.χ. σε απουσία ADP ή επί παρουσίας ADP 1mM). Στη συνέχεια μετρήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση (mg/ml) του ενζυμικού παρασκευάσματος. Ο υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας έγινε με βάση τον τύπο  $SA = [dA_{340nm} / min] / (6.222 * \Pi)$ , όπου SA (Specific activity) η ειδική δραστηριότητα (σε  $\mu moles$  NADPH/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό),  $dA_{340nm} / min$  η μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm ανά λεπτό στην αντίδραση, και  $\Pi$  η ποσότητα της πρωτεΐνης που περιείχε το

δείγμα που μελετήσαμε, η οποία ισούται με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του καθαρισμένου ενζυμικού παρασκευάσματος (σε mg/ml) επί τον όγκο (σε ml) του παραπάνω παρασκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση. Ο αριθμός 6.222 αντιπροσωπεύει το συντελεστή απορρόφησης του NADPH στο μήκος κύματος όπου παρουσιάζει τη μέγιστη φωτοαπορρόφηση, ήτοι στα 340nm.

### 3.3.2. Κινητικές αναλύσεις (Προσδιορισμός $K_m$ και $V_{max}$ )

Για τον καθορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) και της  $V_{max}$  για το α-κετογλουταρικό, την αμμωνία και το NADPH στα καθαρισμένα ένζυμα, έγιναν κινητικές αναλύσεις με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων όσον αφορά το α-κετογλουταρικό, η συγκέντρωση του α-κετογλουταρικού μεταβαλλόταν από 0.4 έως 12 mM, ενώ η συγκέντρωση των λοιπών στοιχείων της αντίδρασης παρέμενε σταθερή όπως περιγράφεται παραπάνω, και η συγκέντρωση του ADP ήταν 1 mM. Όσον αφορά τις κινητικές παραμέτρους για το NADPH, για τον προσδιορισμό τους η συγκέντρωση του NADPH μεταβαλλόταν από 20 έως 250  $\mu$ M σε παρουσία 1 mM ADP, με τα λοιπά στοιχεία της αντίδρασης σταθερά. Παρομοίως για την αμμωνία, όπου η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου μεταβαλλόταν από 10 έως 120 mM σε παρουσία 1 mM ADP, ενώ η συγκέντρωση των λοιπών υποστρωμάτων παρέμενε αμετάβλητη.

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων όσον αφορά το γλουταμικό οξύ, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης του L-γλουταμικού. Το μείγμα αντίδρασης περιείχε 50 mM triethanolamine HCl buffer, pH 8.0, 1.4 mM NADP και 2.6 mM EDTA και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-γλουταμικού (2-50 mM), ενώ μετρήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, που αντιστοιχεί στο σχηματιζόμενο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης NADPH.

### 3.3.3. Μέτρηση βασικής δραστηριότητας

Για τη μέτρηση της βασικής δραστηριότητας σε αδρά εκχυλίσματα, μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου με την προαναφερθείσα μέθοδο, χωρίς την παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών, χρησιμοποιώντας ποσότητα αδρού εκχυλίσματος τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) παρουσία 1 mM ADP να είναι περίπου 0.15. Η βασική δραστηριότητα εκφράστηκε ως ποσοστό βασικής

δραστηριότητα ως προς τη μέγιστη (basal/maximal), όπου ως μέγιστη ορίστηκε η δραστηριότητα παρουσία 1 mM ADP.

Για τις καθαρισμένες πρωτεΐνες, έγινε στις περισσότερες hGDH μελέτη της εξάρτησης της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση της hGDH στο δείγμα. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η βασική δραστηριότητα χωρίς την παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις καθαρισμένου ενζύμου. Σε προκαταρκτικά πειράματα προστίθετο BSA σε συγκέντρωση 0.1 mg/ml στην κυβέττα, για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η παρατηρούμενη αύξηση της ειδικής βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση του ενζύμου να οφείλεται στην επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεΐνης γενικότερα, και όχι ειδικά της hGDH. Η βασική δραστηριότητα εκφράστηκε είτε ως ποσοστό βασικής δραστηριότητα ως προς τη μέγιστη (basal/maximal), όπου ως μέγιστη ορίστηκε η δραστηριότητα παρουσία 1 mM ADP, είτε, όπου ήταν αναγκαίο, ως ειδική δραστηριότητα (βλ. παραπάνω για τον υπολογισμό της), ενώ έγιναν και γραφικές αναλύσεις για την εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

#### **3.3.4. Ενεργοποίηση από ADP**

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από ADP έγινε σύμφωνα με την παραπάνω «βασική» αντίδραση, με προσθήκη σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις ADP και ποσότητα ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) σε παρουσία 1mM ADP να είναι περίπου 0.18-0.22.

Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει η ενεργοποίηση από ADP ήταν η:

$$V = V_0 + (V_{max} * x^H) / (x^H + SC_{50}^H)$$

όπου  $V$  η ταχύτητα της αντίδρασης και  $x$  η συγκέντρωση του ADP. Ενώ οι  $V_0$ ,  $V_{max}$ ,  $H$ ,  $SC_{50}$  είναι θεωρητικές σταθερές που αφορούν την αρχική ταχύτητα, απουσία ADP, τον βαθμό συνεργατικότητας των υπομονάδων και την συγκέντρωση ADP όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι  $V_{max}/2$ . Ο υπολογισμός του  $SC_{50}$  έγινε από τις γραφικές παραστάσεις ενεργοποίησης του ADP με την χρήση του προγράμματος Origin.

#### **3.3.5. Αναστολή από GTP**

Η μελέτη της αναστολής των ανασυνδυασμένων ενζύμων από GTP έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση, με προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις

GTP και ποσότητα ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) απουσία GTP να είναι περίπου 0.10-0.15.

Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί η ενεργοποίηση από ADP ήταν η:  $V = V_{max} / (1 + x^H / IC_{50}^H)$ ,

όπου V η ταχύτητα της αντίδρασης και x η συγκέντρωση του GTP. Ενώ οι  $V_{max}$ , H,  $IC_{50}$  είναι θεωρητικές σταθερές που αφορούν την αρχική ταχύτητα, απουσία GTP, τον βαθμό συνεργατικότητας των υπομονάδων και την συγκεντρωση GTP όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι  $V_{max}/2$ . Ο υπολογισμός του  $IC_{50} \pm SE$  έγινε από τις γραφικές παραστάσεις ενεργοποίησης του ADP με την χρήση του προγράμματος Origin. Ο συντελεστής Hill (h) για την συνεργατικότητα της αναστολής από GTP υπολογίστηκε με βάση την «εξίσωση του Hill»:  $dA_{340nm}/min = [GTP]^h / (K + [GTP]^h)$

Επειδή η γραφική παράσταση της παραπάνω εξίσωσης είναι σιγμοειδική, δυσκολεύοντας τους υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός της στον τύπο:  $\text{Log}[(dA_{340nm}/min) / (1 - dA_{340nm}/min)] = h \log[GTP] - \log K$ .

Η γραφική παράσταση της τελευταίας εξίσωσης  $[(dA_{340nm}/min) / (1 - dA_{340nm}/min)]$  έναντι  $\log [GTP]$  είναι γραμμική και η κλίση της δίνει τον h.

### 3.3.6. Ενεργοποίηση από L-λευκίνη

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από L-λευκίνη έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση, με την προσθήκη σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης (0-9 mM) διελυμένης σε ddH<sub>2</sub>O και ποσότητα ενζύμου τόση, ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) παρουσία L-λευκίνης 6 mM, να είναι περίπου 0.10-0.15. Για την μελέτη της συνεργατικότητας του ADP με την L-λευκίνη, μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης (0-9 mM) προστέθηκαν σε μείγμα της αντίδρασης που περιείχε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις ADP (0.025, 0.05, 0.1 mM).

### 3.3.7. Θερμική απενεργοποίηση

Για τις μελέτες θερμικής απενεργοποίησης σε αδρά εκχυλίσματα, εκχυλίσματα των ενζύμων με όμοιες συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης και όμοια GDH δραστηριότητα στη μονάδα του όγκου παρουσία 1.0 mM ADP (άρα με παρόμοια ειδική δραστηριότητα) αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 με διάλυμα 4mg/ml βοείου ορολευκωματίνης (BSA) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 100 mM, pH

7.4 και θερμαίνονταν στους 49.5°C. Τα δείγματα απομακρύνονταν από την θερμοκρασία αυτή σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και τοποθετούνταν σε πάγο, για να μετρηθεί αμέσως μετά η δραστηριότητα τους παρουσία 1mM ADP.

Για τις μελέτες θερμικής απενεργοποίησης σε καθαρισμένες hGDH, ετοιμάστηκαν δείγματα των ενζύμων περιεκτικότητας 40-60 μg/ml σε (>95% καθαρή) πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6.8 τελικής συγκέντρωσης 100 mM και με περιεκτικότητα 4mg/ml σε βόειο ορολευκωματίνη (BSA). Τα δείγματα θερμαίνονταν στους 47.5 °C και απομακρύνονταν από την θερμοκρασία αυτή σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές οπότε και τοποθετούνταν σε πάγο, για να μετρηθεί αμέσως μετά η δραστηριότητα τους παρουσία 1mM ADP. Προκαταρκτικές μελέτες θερμικής απενεργοποίησης έγιναν και σε άλλα ρυθμιστικά διαλύματα, όπως θα αναφερθεί λεπτομερώς παρακάτω στα αποτελέσματα.

### **3.3.8. Επίδραση του pH και της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος**

Για να μελετηθεί η επίδραση του pH στις ενζυμικές ιδιότητες πραγματοποιήσαμε ενζυμικές αντιδράσεις με καθαρισμένα ένζυμα σε ρυθμιστικά διαλύματα TRA με pH κυμαινόμενο από 6.0 έως 9.0 και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50 mM, με pH κυμαινόμενο από 6.0 έως 9.0. Επιπλέον, για να μελετήσουμε την επίδραση της σύστασης και της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης στη βασική δραστηριότητα και την ενεργοποίηση από ADP πραγματοποιήσαμε μελέτες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50 mM, 125 mM και 250 mM, pH 8.0, καθώς και σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, 125 mM και 250 mM, pH 8.0.

### **3.3.9. Αναστολή από οιστρογόνα**

Η ανασταλτική δράση των στεροειδών ελέγχθηκε με την προσθήκη στο μείγμα της αντίδρασης σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις στεροειδών (Διαιθυλστυλβεστρόλη 0-50μM, οιστραδιόλη 0-750 μM) διελυμένων σε αιθυλενογλυκόλη, παρουσία ή απουσία ADP, διατηρώντας τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών της αντίδρασης σταθερές. Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα καθαρού ενζύμου ή αδρών εκχυλισμάτων ούτως ώστε η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης ( $dA_{340nm}/min$ ) απουσία αναστολέα να είναι περίπου 0.10-0.15

### **3.3.10. Στατιστική ανάλυση στις λειτουργικές ενζυμικές μελέτες**

Όλες οι γραφικές παραστάσεις πάνω στα πειραματικά δεδομένα, εξαιρουμένων των κινητικών αναλύσεων, και οι υπολογισμοί των σχετικών παραμέτρων έγιναν με τη χρήση του προγράμματος Origin 6.0 (MicroCal Software, Northampton, MA). Οι τιμές  $IC_{50}$  και  $SC_{50}$  υπολογίστηκαν από τα γραφήματα με το λογισμικό Origin, χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις που αναφέρονται παραπάνω. Οι κινητικές παράμετροι  $K_m$  και  $V_{max}$  υπολογίστηκαν από την υπερβολική καμπύλη Michaelis-Menten με το λογισμικό Hyper32 (J. S. Esterby, University of Liverpool, UK). Όπου χρειάστηκε να γίνει σύγκριση παραμέτρων προκειμένου να φανεί αν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t του Student.

## **3.4 Μελέτες ηλεκτροφόρησης**

### **3.4.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

Η κινητικότητα ενός μορίου μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο του. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, η προσθήκη του απορρυπαντικού SDS, οδηγεί στο να προσδένονται οι πρωτεΐνες σε αυτό με μία σταθερή αναλογία (1.4 gr SDS ανά gr πρωτεΐνης). Το SDS αποδιατάσσει την πρωτεΐνη, εξουδετερώνοντας δεσμούς υδρογόνου, ενώ παράλληλα προσδένεται ομοιόμορφα καθ' όλο το μήκος του πεπτιδίου. Το αρνητικό φορτίο του SDS υπερνικά κατά πολύ το φορτίο της πρωτεΐνης, ούτως ώστε το φορτίο της πρωτεΐνης τελικώς γίνεται ανάλογο της ποσότητας SDS που δεσμεύει, και άρα του μήκους της, δηλαδή (σε αποδιαταγμένη μορφή) του μοριακού της βάρους. Έτσι, η κινητικότητα μίας πρωτεΐνης σε ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS είναι ανάλογη μόνο του μοριακού βάρους της. Αυτό βεβαίως με την προϋπόθεση ότι έχει γίνει και κατεργασία με κάποιον αναγωγικό αποδιατακτικό παράγοντα, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη ή η διθειοθρεϊτόλη (DTT), για να σπάσουν οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Η μέθοδος ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε SDS-πολυακρυλαμίδιο που συνήθως χρησιμοποιείται σήμερα, και που χρησιμοποιήσαμε και εμείς για τις ανάγκες της παρούσης διατριβής, ανάγεται στη μελέτη του Laemmli (1970).

Το διάλυμα των πρωτεϊνών, αφού αναμειχθεί με πυκνό (5x) διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (“loading buffer”), που περιέχει SDS καθώς και τον αναγωγικό παράγοντα

και θερμανθεί για να επιτευχθεί η αποδιάταξη, φορτώνεται σε πήκτωμα SDS πολυακρυλαμιδίου στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης. Το ασυνεχές αυτό πήκτωμα αποτελείται από ένα πήκτωμα συμπύκνωσης (συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 4%, stacking gel) και από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) του οποίου η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να διαχωριστεί (στα πειράματά μας, για να καταστεί ορατή η υπομονάδα της hGDH μεγέθους ~56kD, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού 11%). Το πήκτωμα συμπύκνωσης, με τη χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και το αραιότερο ρυθμιστικό διάλυμα σε χαμηλότερο pH, χρησιμεύει για την αδρή εστίαση όλων των πρωτεϊνών στο πέρας του και, έτσι, την ταυτόχρονη είσοδο όλων των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού, ούτως ώστε να έχουν κοινό «σημείο εκκίνησης». Παρατίθεται παρακάτω η συνταγή που χρησιμοποιήσαμε κατά τις παρούσες μελέτες. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ηλεκτρικό πεδίο με διαφορά δυναμικού περίπου 100 Volt αρχικά (όσο οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο πήκτωμα συμπύκνωσης) και 150-200 Volt στη συνέχεια, μέχρι η χρωστική που βρίσκεται στο loading buffer των πρωτεϊνών να προσεγγίσει το κάτω όριο του πηκτώματος.

Για να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρηση, αυτό εμβαπτίζεται (υπό ανάδευση, για περίπου μία ώρα) σε διάλυμα χρώσης 0.025% Coomassie brilliant blue (διαλυμένο σε 60% ddH<sub>2</sub>O, 30% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ). Στη συνέχεια γίνεται αποχρωματισμός των περιοχών του πηκτώματος που δεν περιέχουν ζώνες πρωτεϊνών με ανάδευση σε διάλυμα αποχρωματισμού (60% ddH<sub>2</sub>O, 30% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ), το οποίο αντικαθίσταται 3-4 φορές. Μετά των αποχρωματισμό το gel μπορεί να φωτογραφηθεί απευθείας ή να ξηραθεί σε ειδικό στεγνωτήρα (υπό θέρμανση και κενό)

#### **Διαλύματα SDS-PAGE και διαδικασία παρασκευής gel:**

*Ρυθμιστικό διάλυμα 4X για το stacking gel (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS):*

Διαλύουμε 6.05 gr Tris-Base σε 60ml ddH<sub>2</sub>O και προσαρμόζουμε το pH σε 6.8 με HCl. Προσθέτουμε ddH<sub>2</sub>O για τελικό όγκο 100ml. Φιλτράρουμε από φίλτρο 0.45μm, προσθέτουμε 0.4gr SDS και αποθηκεύουμε στους 4<sup>0</sup>C.



*Ρυθμιστικό διάλυμα 4X για το separating gel (1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS):*

Διαλύουμε 91 gr Tris-Base σε 400ml ddH<sub>2</sub>O και προσαρμόζουμε το pH σε 8.8 με 1 N HCl. Προσθέτουμε ddH<sub>2</sub>O για τελικό όγκο 500ml. Φιλτράρουμε από φίλτρο 0.45μm, προσθέτουμε 2gr SDS και αποθηκεύουμε στους 4°C.

*Παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel):*

Για 15ml διάλυμα αναμειγνύουμε x ml διαλύματος ακρυλαμιδίου 40%, 3.75ml 4X Tris-Cl/SDS (pH 8.8) και (15-x-3.75) ml ddH<sub>2</sub>O. Η ποσότητα (x) του διαλύματος ακρυλαμιδίου 40% που προσθέτουμε υπολογίζεται ανάλογα με την επιθυμητή περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα διαχωρισμού. Προσθέτουμε 50μl APS 10% και 10μl TEMED λίγο πριν τη χρήση. Αναδεύουμε ελαφρά και το χύνουμε μεταξύ των υάλινων πλακών που σχηματίζουν το «καλούπι», αφήνοντας από πάνω ~3 cm κενό χώρο. Αφήνουμε να πήξει για >½ ώρα, έχοντας καλύψει την επιφάνεια του separating gel με νερό.

*Παρασκευή πηκτώματος συμπύκνωσης (stacking gel):*

Αναμειγνύουμε 0.5 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου 40%, 1.25ml 4X Tris-Cl/SDS (pH 6.8) και 3.25 ml ddH<sub>2</sub>O. Προσθέτουμε 25μl APS 10% και 5μl TEMED λίγο πριν τη χρήση. Ανακατεύουμε ελαφρά και χρησιμοποιούμε αμέσως, χύνοντας το πάνω από την επιφάνεια του separating gel. Με ειδική κτένα σχηματίζουμε τα πηγαδάκια για τα δείγματα, προσέχοντας να μην εγκλωβίσουμε φυσαλίδες.

*Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνών 10X (Running Buffer)*

Προσθέτουμε 30.2 gr Tris-Base, 144 gr Glycine και 10gr SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 Lt με ddH<sub>2</sub>O. Αραιώνουμε 1:10 πριν τη χρήση. Αποθήκευση στους 4°C.

*Διάλυμα Φόρτωσης Πρωτεϊνών 4X (sample buffer)*

Προσθέτουμε 2.5 ml διαλύματος 0.5M Tris-Cl με pH 6.8, 0.4 gr SDS, 2 ml γλυκερόλης, 20mg bromophenol blue, 400μl μερκαπτοαιθανόλης (2-mercaptoethanol) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 5 ml. Η μερκαπτοαιθανόλη πρέπει να προστίθεται λίγο πριν να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα. Το δείγμα πρωτεϊνών αναμειγνύεται 1:4 (ή και

σε μεγαλύτερη αραίωση) και κατόπιν βράζεται (95-100°C) για 5 λεπτά πριν την ηλεκτροφόρηση.

Επισημαίνουμε ότι σε κάποια πειράματα ηλεκτροφόρησης σε SDS-πολυακρυλαμίδιο, όπως αναφέρουμε στο υποκεφάλαιο 4.7 των αποτελεσμάτων, προηγήθηκε απόπειρα εφαρμογής ισχυρότερων αποδιατακτικών συνθηκών στα δείγματα. Δοκιμάστηκαν η επίδραση ουρίας σε συγκέντρωση 6M, η παρατεταμένη θέρμανση (100°C για ½ ή 1 ώρα), η επίδραση NaOH σε τελική συγκέντρωση από 0.1N έως και 0.5N, και η επίδραση HCl σε τελική συγκέντρωση 0.05N έως και 0.25N, καθώς και συνδυασμοί των παραπάνω (με διαδοχική εφαρμογή). Όλα τα δείγματα υφίσταντο τελικά και την επίδραση διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο.

Επίσης, σε κάποια πειράματα ηλεκτροφόρησης σε SDS-πολυακρυλαμίδιο προηγήθηκε επίδραση φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης (Lambda Protein Phosphatase, New England Biolabs). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις οδηγίες καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα και το διάλυμα MnCl<sub>2</sub> που παρέχει ο κατασκευαστής, με 400 μονάδες του ενζύμου ανά αντίδραση, που επέδρασαν για 1 ώρα στους 30°C στα ~1-2 μg πρωτεϊνικού δείγματος.

### **3.4.2 Μή αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη χρήση κυανού του Coomassie (“Blue” Native PAGE)**

Όπως ειπώθηκε στην εισαγωγή, η hGDH αποτελείται από έξι υπομονάδες που σχηματίζουν ένα εξαμερές χάρη κυρίως σε δεσμούς υδρογόνου. Καθώς η διαδικασία του SDS-PAGE που περιγράψαμε παραπάνω αποδιατάσσει το μόριο, για να γίνει εμφανές το μέγεθος του εξαμερούς στην ηλεκτροφόρηση πρέπει να ακολουθηθεί μή αποδιατακτική μέθοδος. Ενώ πολλές πρωτεΐνες μπορούν να ηλεκτροφορηθούν μη αποδιαταγμένες σε σύστημα παρόμοιο με αυτό που περιγράφηκε παραπάνω, με μοναδική τροποποίηση την παράλειψη του SDS και του αναγωγικού παράγοντα από τα διαλύματα, στην περίπτωση της hGDH αυτό δεν είναι εφικτό, καθ’ ότι το pI της πρωτεΐνης δεν ευνοεί την κίνησή της στο πήκτωμα, ακόμη και σε ακραίους συνδυασμούς pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση αυτή η μέθοδος “Blue Native PAGE”, που στηρίζεται στη χρήση κυανού του Coomassie όχι ως χρωστικής ουσίας, αλλά ως δότη

φορτίου στην πρωτεΐνη. Το κυανό του Coomassie έχει την ιδιότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες περίπου όπως και το SDS και με τρόπο μη εκλεκτικό, ανάλογο του μεγέθους της πρωτεΐνης, αλλά χωρίς να προκαλεί αποδιάταξη, και να τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Έτσι, το κυανό του Coomassie επιτρέπει η κινητικότητα μίας πρωτεΐνης στην μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση να είναι ανάλογη του μοριακού βάρους της, αν και όχι με τόση ακρίβεια όσο το SDS, καθώς δεν ακυρώνεται παντελώς η επίδραση του φορτίου της πρωτεΐνης στην ηλεκτροκινητικότητά της.

Χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη των πρωτεϊνών μας τη μέθοδο Schägger-Von Jagow (Schägger και συν. 1994), κατά την οποία χρησιμοποιείται διαφορετικό σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (Tris-Tricin) που περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω, ενώ για τις ανάγκες αυτών των πειραμάτων παρασκευάσαμε πηκτώματα βαθμιδωτής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου σε gradient mixer. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ηλεκτρικό πεδίο 120-150 Volt για 5-8 ώρες στους 4°C, με την προσθήκη 0.02% Coomassie Blue στο ρυθμιστικό διάλυμα της καθόδου (δηλ. του άνω διαμερίσματος της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης). Το πήκτωμα κατόπιν βάφεται και ξηραίνεται όπως ακριβώς και στο SDS-PAGE, αν και, όταν περιέχει γλυκερόλη (βλ. κάτω), είναι ιδιαίτερα εύθρυπτο και δύσκολο στο χειρισμό του.

#### **Διαλύματα Blue Native PAGE και διαδικασία παρασκευής gel:**

<i>5x Gel buffer</i>	250 mM Tris Base 170 mM HCl 25 % γλυκερόλη H <sub>2</sub> O	3.03 g 1.5 mL (37 %) 25 mL έως τα 100 mL
<i>20x Cathode buffer</i>	500 mM Tris Base 1M Tricin H <sub>2</sub> O	6.05 g 17.9 g έως τα 100 mL
<i>20x Anode buffer</i>	1 M Tris Base 680 mM HCl H <sub>2</sub> O	12.1 g 6.0 mL (37 %) έως τα 100 mL

(pH ~7.9 σε θερμ. δωματίου → pH ~ 8.5 στους 4 °C)

Παρασκευάζουμε επίσης stock solution ακρυλαμιδίου 40 % κ.ο. (w/v) με λόγο Acrylamid/Bisacrylamid 33.3 προς 1

Για παρασκευή gel διαστάσεων 1.5 x 80 x 60 mm (~8 mL) με βαθμίδωση 3.5-15%:

	<u>Διάλυμα A (3.5%)</u>	<u>Διάλυμα B (15 %)</u>
40% ακρυλαμ.	0.55 mL	1.5 mL
5x gel buffer	1.2 mL	0.8 mL
50 % γλυκερόλη	-	1.7 mL
ddH <sub>2</sub> O	3.85 mL	-
TEMED	4.8 μL	3.2 μL
10% Amm. Persulfate	9.6 μL	6.4 μL
	-----	-----
	6 mL	4 mL

4 mL Διάλυμα A (3.5%) and 4 mL Διάλυμα B (15%) τοποθετούνται στο gradient mixer και γίνεται ταχύ «καλούπωμα» του gel στους 4 °C. Τα υπόλοιπα 2 mL από Διάλυμα A τοποθετούνται κατόπιν από πάνω και με τη βοήθεια κτένας σχηματίζονται τα πηγαδάκια (όπως στο stacking gel του SDS-PAGE, χωρίς όμως να περιμένουμε να πήξει το υποκείμενο). Κατόπιν μπορεί το πήκτωμα να αφηθεί να πήξει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στους 4 °C όπως περιγράφεται παραπάνω, με το άνω διαμέρισμα της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης να περιέχει 1x «ρυθμ. διάλυμα καθόδου» (Cathode buffer) στο οποίο έχει προστεθεί Coomassie Blue 0.025% κ.ο. και το κάτω διαμέρισμα 1x «ρυθμ. διάλυμα ανόδου» (Anode buffer). Απαιτείται τακτικός έλεγχος, καθώς λόγω υπερθέρμανσης το διάλυμα της καθόδου έχει την τάση να εξατμίζεται. Επίσης, χρειάζεται πολλή προσοχή κατά το χειρισμό του gel μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

## 4. Αποτελέσματα

Προχωρώντας στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων μας, να διευκρινίσουμε κατ' αρχάς ότι επιδιώξαμε, για λόγους αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων μας, στα ένζυμα που μελετήθηκαν συγκριτικά, οι ενζυμικές λειτουργικές δοκιμασίες να γίνουν παράλληλα. Έτσι, όπου εμφανίζονται ομοειδή αποτελέσματα σε κοινό γράφημα ή πίνακα, αυτά αφορούν δεδομένα από την ίδια πειραματική συνεδρία ή, σπανιότερα, από διαδοχικές πειραματικές συνεδρίες εντός 2-3 ημερών, με κοινές συνθήκες και αντιδραστήρια. Όπου, πάλι, κάποιες δοκιμασίες έγιναν στο ίδιο ένζυμο σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, σε σύγκριση με άλλα ένζυμα κάθε φορά, θα δούμε και ελαφρά διαφορετικές τιμές στα αντίστοιχα αποτελέσματα που αφορούν το ένζυμο αυτό. Όπου χρησιμοποιούνται δεδομένα από πειράματα που εκτελέστηκαν από άλλους ερευνητές ή σε συνεργασία μαζί τους, αυτό επισημαίνεται δεόντως.

Στα γραφήματα που ακολουθούν, κάθε σημείο αντιστοιχεί σε τουλάχιστον τρεις (πολύ συχνά περισσότερους) πειραματικούς προσδιορισμούς της ενζυμικής δραστηριότητας στην ίδια ακριβώς συνθήκη. Αυτό ισχύει και για τον μεγάλο όγκο πειραμάτων που τα αποτελέσματά τους δεν παρουσιάζονται ως γραφήματα, αλλά σε πίνακες ή στο κείμενο υπό μορφήν αριθμητικών δεδομένων. Όπου μία γραφικά προσδιορισμένη τιμή μεταβλητής, σε γράφημα ή σε πίνακα, ακολουθείται από το σύμβολο « $\pm$ », το στοιχείο που την ακολουθεί είναι το τυπικό σφάλμα (standard error), εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Αποφύγαμε την άσκοπη χρήση στατιστικών δοκιμασιών στο κείμενο, τόσο εκεί που οι διαφορές είναι οφθαλμοφανείς, όσο και εκεί που η διαφορά σε κάποια τιμή είναι μεν τύποις στατιστικά σημαντική, στερείται όμως σπουδαιότητας (π.χ. διαφορές της τάξης του 10%-20% στην  $K_m$ ), παρουσιάζοντας τους αντίστοιχους δείκτες μόνο όπου έχουν πραγματικά να προσφέρουν στη σύγκριση μεγεθών.

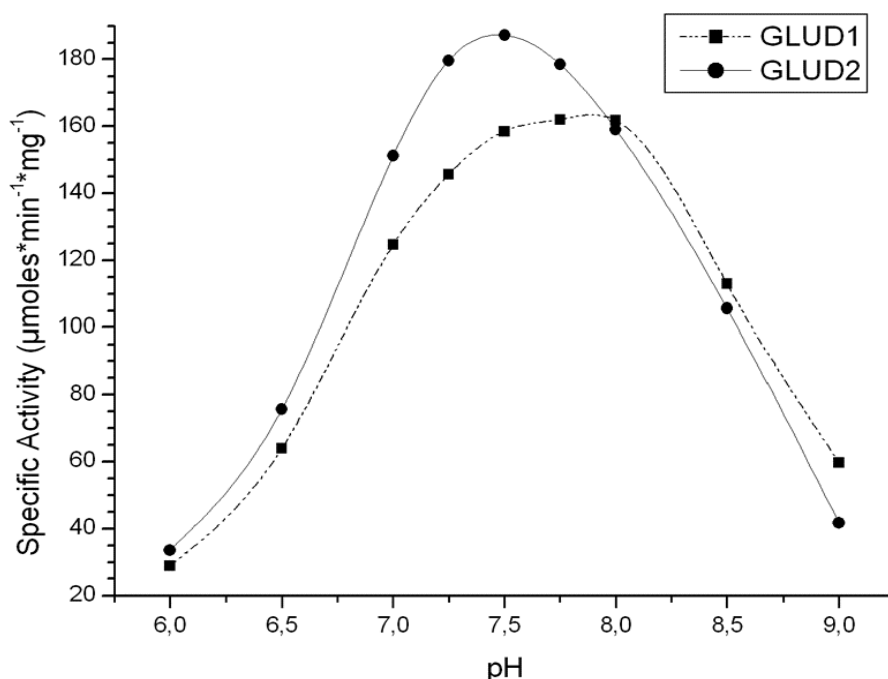
Ξεκινούμε την παρουσίαση από τη σύγκριση των ιδιοτήτων hGDH1 και hGDH2, όχι μόνο επειδή προηγήθηκε χρονικά των λοιπών μελετών, αλλά και για να αποκτήσει ο αναγνώστης μια καλύτερη εικόνα των διαφορών τους, που εν τέλει είναι και το έναυσμα της μελέτης μας. Για το λόγο αυτό, καθώς και με σκοπό να εξοικειώσουμε τον αναγνώστη με τη φύση των πειραμάτων μας, θα είμαστε στο κομμάτι αυτό ιδιαίτερα αναλυτικοί, ενώ στη συνέχεια θα μπορέσουμε να γίνουμε πιο συνοπτικοί και να εστιάσουμε στα πλέον ουσιώδη.

#### **4.1. Σύγκριση ιδιοτήτων των hGDH1 και hGDH2 σε καθαρή μορφή**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την έκθεση των στόχων της παρούσης διατριβής, πρώτο μέλημα μας ήταν να μελετήσουμε τις ιδιότητες της hGDH2 για πρώτη φορά σε καθαρισμένη μορφή και να τις συγκρίνουμε με αυτές της hGDH1. Ως εκ τούτου, σε κάποια πειράματα απλώς επιβεβαιώθηκαν ιδιότητες που είχαν παλαιότερα ελεγχθεί μόνο σε αδρά εκχυλίσματα και μερικώς κεκαθαρισμένες πρωτεΐνες, ενώ σε άλλα ερευνήθηκαν νέες ιδιότητες και παράμετροι.

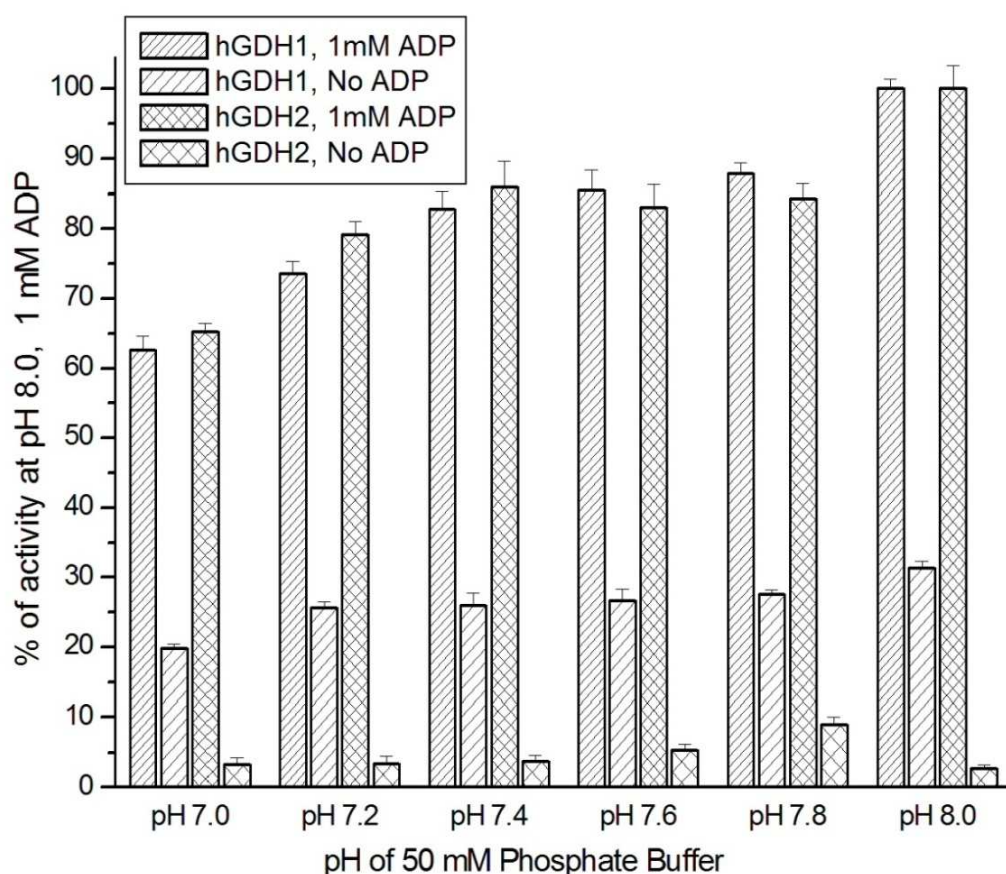
##### **4.1.1. Επίδραση του pH, της σύστασης και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος αντίδρασης στη δραστηριότητα της hGDH1 και της hGDH2**

Οι πρώτες μελέτες που έγιναν στις καθαρισμένες hGDH1 και hGDH2 αφορούσαν το κατά πόσο οι χαρακτήρες του διαλύματος αντίδρασης επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, τόσο σε ενεργοποιημένη μορφή, όσο και σε μη ενεργοποιημένη (δηλ. τη βασική δραστηριότητα). Αρχικά ελέγχθηκε η δραστηριότητα των ενεργοποιημένων ενζύμων σε διάλυμα τριαιθανολαμίνης (TRA) με pH από 6.0 έως 9.0. (Εικόνα 4.1)



**Εικ. 4.1:** Επίδραση του pH διαλύματος TRA 50 mM στους 25°C σε ενεργοποιημένες (με 1 mM ADP) hGDH1 και hGDH2.

Φάνηκε ότι, ενώ η hGDH1 παρουσιάζει το μέγιστο της δραστηριότητός της σε pH 7.8-8.0, η hGDH2 εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε pH ~7.5. Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα εν απουσία ADP, αυτή φαινόταν να κυμαίνεται από 2.2% έως 4.3% της μέγιστης για τη hGDH2 και 33.4% έως 44.3% της μέγιστης για τη hGDH1, κυρίως λόγω της διακύμανσης της μέγιστης δραστηριότητος και χωρίς να διαφαίνεται κάποιο σαφές pattern, πράγμα όμως που εν μέρει φάνηκε να οφείλεται στις ασταθείς συνθήκες που επικρατούν στο εν λόγω διάλυμα σε ακραία pH, σε συνδυασμό με την ευαισθησία της βασικής δραστηριότητος ειδικά της hGDH2 σε ελάχιστες μεταβολές. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση του pH στη μέγιστη (με 1 mM ADP) και βασική δραστηριότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Εικ. 4.2)



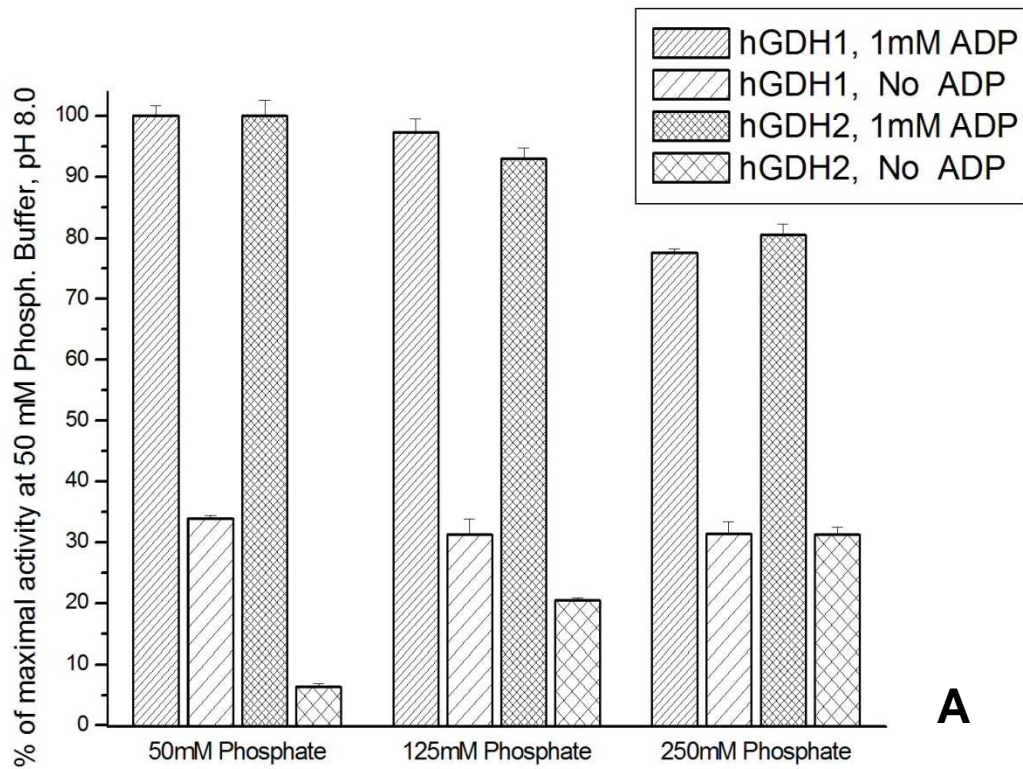
**Εικ. 4.2:** Επίδραση του pH ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 50 mM στους 25°C στη βασική και τη μέγιστη (παρουσία 1 mM ADP) δραστηριότητα hGDH1 και hGDH2. Για λόγους ευκρίνειας, η δραστηριότητα αποδίδεται ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητος που παρουσιάζει κάθε ένζυμο σε pH 8.0.

Φαίνεται ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν το μέγιστο της δραστηριότητός τους παρουσία 1 mM ADP σε pH 8.0. Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα, αυτή φάνηκε γενικώς να είναι κατά τι μικρότερη στην hGDH1 και ελαφρά μεγαλύτερη στη hGDH2 απ' ότι σε διάλυμα TRA. Ενώ, ωστόσο, η βασική δραστηριότητα της hGDH1 δείχνει να είναι μεγαλύτερη σε αυξανόμενα pH, η hGDH2 εμφανίζει μεγαλύτερη βασική δραστηριότητα σε pH ~7.8. (βλ. εικόνα 4.2)

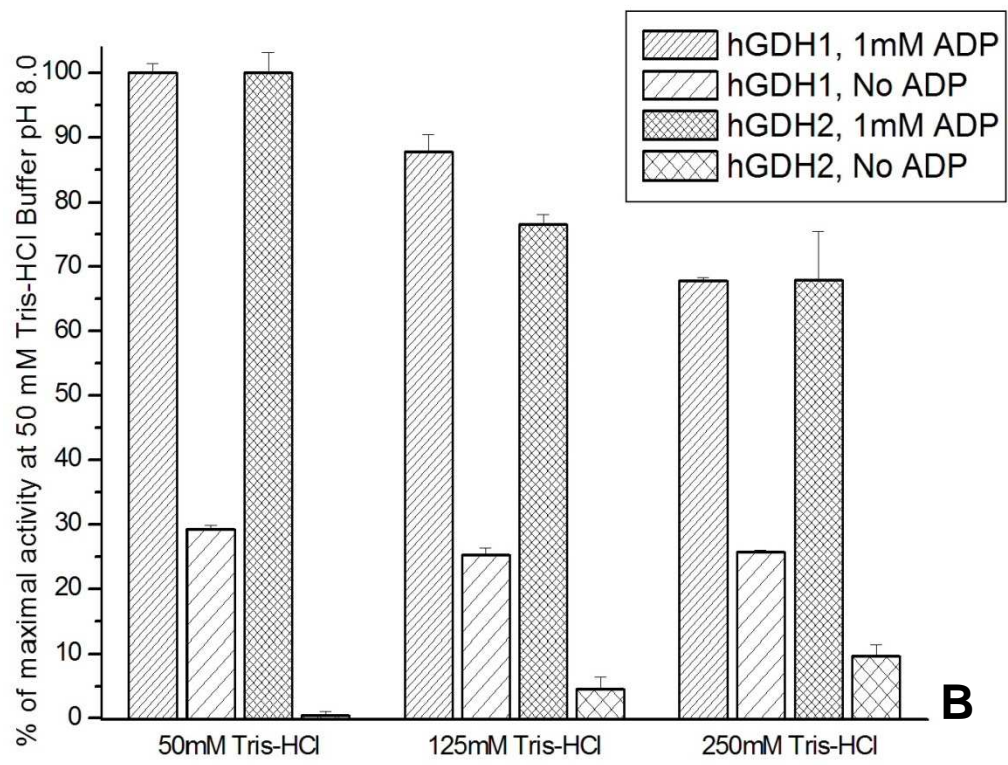
Στη συνέχεια ελέγξαμε κατά πόσο η σύσταση και η ιοντική ισχύς του διαλύματος επιδρούν στη βασική και τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα και επιλέξαμε για το σκοπό αυτό διαλύματα Tris-HCl και φωσφορικού νατρίου pH 8.0 σε διάφορες συγκεντρώσεις (εικ. 4.3). Φαίνεται ότι η αυξανόμενη ιοντική ισχύς των ρυθμιστικών διαλυμάτων έχει ήπια ανασταλτική δράση στην ταχύτητα της αντίδρασης και των δύο ισοενζύμων σε παρουσία ADP. Ταυτόχρονα, οι αυξανόμενες ιοντικές συγκεντρώσεις ενισχύουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, ενώ δε φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στη βασική δραστηριότητα της hGDH1, που παραμένει στα επίπεδα του 30-35%.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου σε όλες τις συγκεντρώσεις δείχνει να ευοδώνει σημαντικά τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, η οποία εμφανίζεται αυξημένη τόσο σε σχέση με αυτή σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις Tris-HCl, όσο και, στα 50 mM, με αυτή (~2-5%) που μετράται σε διάλυμα TRA 50 mM ίδιου pH. Η βασική δραστηριότητα της hGDH1 ήταν ελάχιστα μόνο ενισχυμένη στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου σε σχέση με το Tris-HCl και το TRA.





**A**



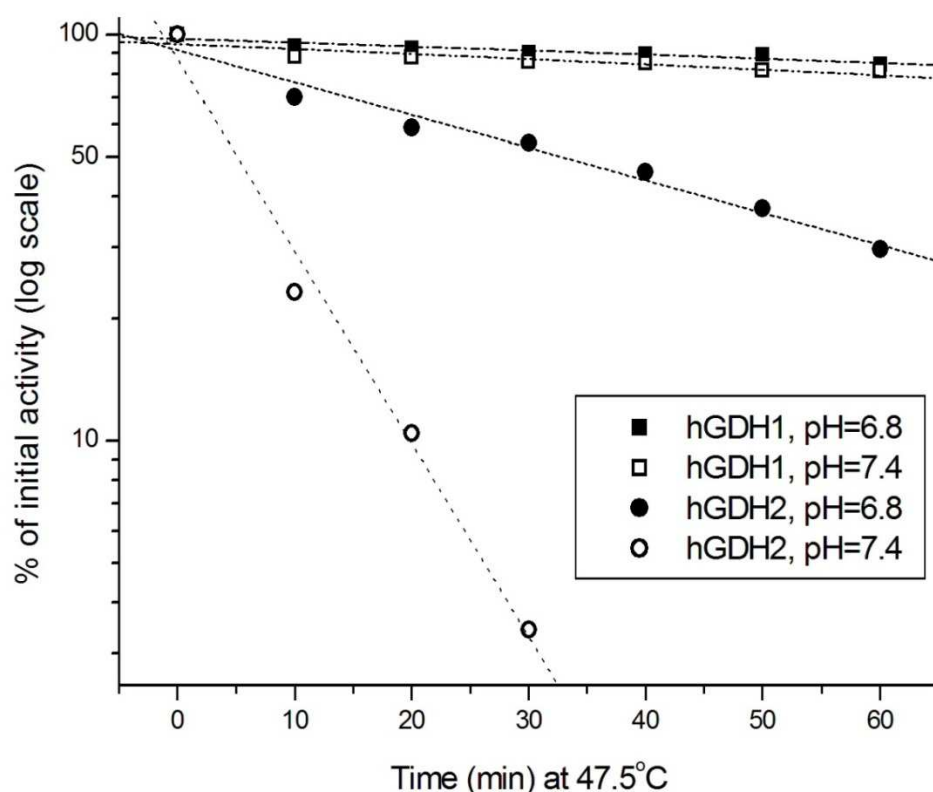
**B**

**Εικ. 4.3:** Επίδραση της συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου **(A)** ή Tris-HCl **(B)**, αμφότερα σε pH 8.0 και θερμοκρασία 25°C, στη βασική και τη μέγιστη (παρουσία 1 mM ADP) δραστηριότητα hGDH1 και hGDH2. Η δραστηριότητα αποδίδεται ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας που παρουσιάζει κάθε ένζυμο σε συγκέντρωση διαλύματος 50 mM

#### 4.1.2. Θερμική απενεργοποίηση hGDH1 και hGDH2

Το ότι η hGDH2 είναι σημαντικά πιο θερμοευαίσθητη σε σχέση με τη hGDH1 ήταν γνωστό από προηγούμενη μελέτη σε αδρά εκχυλίσματα (Shashidharan και συν. 1997). Γνωστό ήταν, επίσης, ότι η προσθήκη ADP ή/και λευκίνης στο διάλυμα προλαμβάνει τη θερμική απενεργοποίηση (Yang και συν. 2004). Εμείς, πέραν του να επιβεβαιώσουμε τη διαφορά στη θερμοαντοχή της hGDH1 και της hGDH2 σε καθαρά ένζυμα, θελήσαμε να ερευνήσουμε τις συνθήκες που επηρεάζουν τη θερμοαντοχή.

Σε μια σειρά πειραμάτων, επιβεβαιώθηκε καταρχήν ότι η hGDH2 είναι πολύ πιο ευαίσθητη στη θερμική απενεργοποίηση, εμφανίζοντας χρόνους ημίσειας ζωής περίπου υποδεκαπλάσιους της hGDH1, σε κάθε πειραματική συνθήκη που δοκιμάστηκε. Παρατίθεται γραφική παράσταση από το πείραμα σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου σε pH 6.8 ή 7.4 (εικόνα 4.4).



**Εικ. 4.4:** Επίδραση του pH ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 100 mM στη θερμοαντοχή καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής που υπολογίστηκαν ήταν για τη hGDH1, 463 min. σε pH 6.8 και 362 min. σε pH 7.4, ενώ για τη hGDH2, 32.9 min. σε pH 6.8 και 7.2 min. σε pH 7.4

Κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών πειραμάτων, δοκιμάστηκαν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού νατρίου και Tris-HCl και μελετήθηκαν οι επιδράσεις τους στη θερμοαντοχή των ενζύμων, ενώ να τυποποιήθηκαν και οι πειραματικές συνθήκες, ούτως ώστε να είμαστε σε θέση κατόπιν να μελετήσουμε αξιόπιστα και άλλα ένζυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 100 mM, pH 6.8, με 4 mg/ml BSA (μία από τις συνθήκες του πειράματος της εικόνας 4.4) είναι αυτό που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση και άλλων ανασυνδυασμένων hGDHs σε καθαρισμένη μορφή, περιγράφονται δε λεπτομερώς στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας.

Είδαμε, στα προκαταρκτικά αυτά πειράματα, ότι η υψηλή ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος ενισχύει τη θερμοαντοχή της hGDH. Έτσι, παραδείγματος χάριν, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6.8, 250 mM, ο χρόνος ημίσειας ζωής της hGDH2 ήταν ~ 1¼ ώρες, ενώ στο αραιότερο διάλυμα των 50 mM ήταν λιγότερο από 10 λεπτά (οι χρόνοι ημίσειας ζωής για τη hGDH1 ήταν ~8 ώρες και ~1½ ώρα αντίστοιχα). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και όταν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM ή 500 mM: στο αραιό ρυθμιστικό διάλυμα, η hGDH1 είχε χρόνο ημίσειας ζωής ~80 λεπτά και η hGDH2 ~5 λεπτά, ενώ στο πυκνό η η hGDH1 είχε χρόνο ημίσειας ζωής ~2 ώρες και η hGDH2 ~75 λεπτά.

Επίσης, όπως φαίνεται και στο πείραμα της εικόνας 4.4, στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, το χαμηλότερο pH (6.8 αντί για 7.4) φάνηκε να προστατεύει τις hGDHs από τη θερμική αποδιάταξη.

Συγκρίνοντας τα επιμέρους πειράματα μεταξύ τους φάνηκε ότι, σε παρεμφερείς συγκεντρώσεις και pH, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου ενισχύει τη θερμοσταθερότητα των ενζύμων σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι το Tris-HCl.

Πριν προχωρήσουμε, επισημαίνουμε ότι, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε, η hGDH2, παραμένοντας πιο θερμοευαίσθητη σε κάθε συνθήκη που δοκιμάσαμε, δείχνει να είναι πιο δεκτική στην προστατευτική επίδραση αυτών των «σταθεροποιητικών» παραγόντων (δηλ. χαμηλό pH, υψηλή ιοντική ισχύς, παρουσία φωσφορικών αλάτων) και να παρουσιάζει μεγαλύτερες αναλογικά διακυμάνσεις του χρόνου ημίσειας ζωής της σε μεταβολές τους, συγκρινόμενη με την hGDH1.

### 4.1.3. Κινητικές ιδιότητες hGDH1 και hGDH2

Ο προσδιορισμός της  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, την αμμωνία και το NADPH καθώς και το L-γλουταμικό όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας παρουσία 1 mM ADP. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1

	$V_{max}$	$K_m$		
		$\alpha$ -κετογλουταρικό	αμμωνία	L-γλουταμικό
	$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	mM	mM	mM
<b>hGDH1</b>	161.9	2.0 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 0.7
<b>hGDH2</b>	159.1	2.1 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 0.8

**Πιν. 4.1:** Οι  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, την αμμωνία και το L-γλουταμικό σε καθαρισμένες hGDH1 και hGDH2 παρουσία 1 mM ADP. Η  $V_{max}$  προσδιορίστηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού και μετράται σε  $\mu\text{mol}$  καταναλωθέντος NADPH ανά λεπτό ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης.

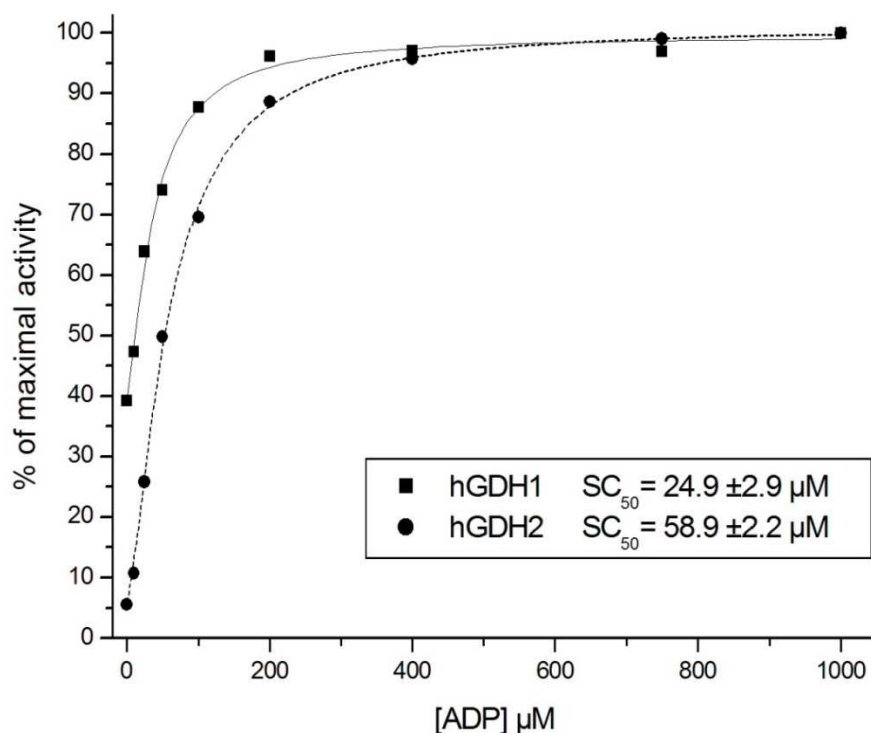
Οι κινητικές ιδιότητες των δύο ισοενζύμων στην κεκαθαυμένη μορφή τους δε φάνηκαν να διαφέρουν σημαντικά, πράγμα που ήταν σε γενικές γραμμές ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας σε αδρά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν. 2000)

### 4.1.4. Ενεργοποίηση από ADP και L-λευκίνη

Όσον αφορά την ενεργοποίηση από ADP και L-λευκίνη, και εδώ ως επί το πλείστον αναπαρήχθησαν στα καθαρά ένζυμα οι διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2 που ήταν γνωστές από τις μελέτες σε αδρά εκχυλίσματα (Shashidharan και συν. 1997, Plaitakis και συν. 2000, Plaitakis και συν. 2003)

Αναφορικά με το ADP, τη hGDH2 ήταν ευαίσθητο την ενεργοποίηση από τον ουσία αυτή, με  $SC_{50}$  περίπου 2-3 φορές μεγαλύτερο από αυτό της hGDH1. Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα από μία μεγάλη σειρά πειραμάτων (βλ. και πιν. 4.5 και εικ. 4.16). Καθώς σε παρουσία  $>400 \mu\text{M}$  ADP και τα δύο ισοένζυμα έφταναν το μέγιστο της δραστηριότητός τους (που βρισκόταν στα ίδια επίπεδα, όπως βλέπουμε από τη  $V_{max}$  στον πίνακα 4.1), το ADP ήταν σε θέση να αυξήσει τη

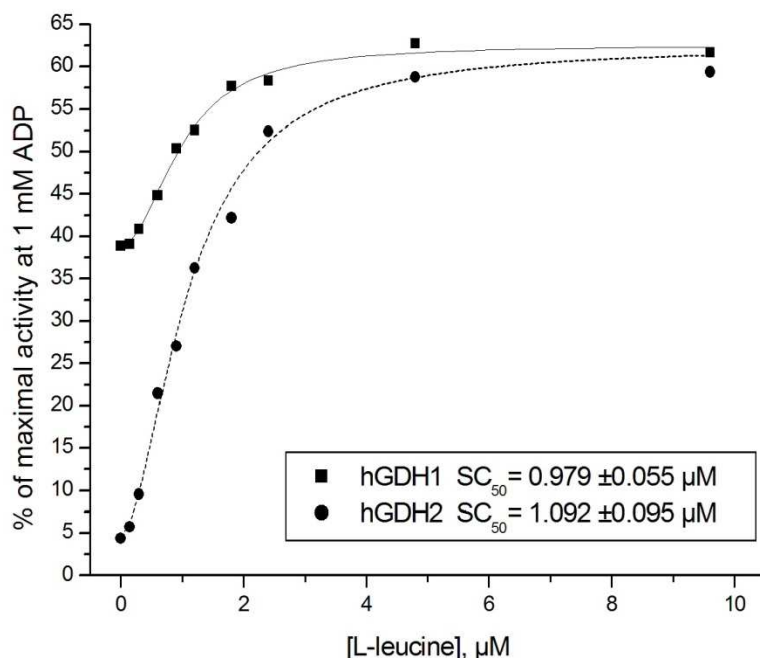
δραστηριότητα της hGDH2 (που στα πειράματα αυτά είχε βασική δραστηριότητα 2.5%-5%) κατά 20 έως 40 φορές, ενώ της hGDH1 (με βασική δραστηριότητα 35%-40%) κατά ~1½ φορά. Οι διαφορές στις  $SC_{50}$  αντιπροσωπεύουν ως ένα βαθμό το διαφορετικό «σημείο εκκίνησης», χωρίς να είναι σαφές κατά πόσο η hGDH2 έχει, λόγω των αλλαγών στην αλλοστερική της περιοχή, μειωμένη συγγένεια για το ADP.



**Εικ. 4.5:** Ενεργοποίηση καθαρismένων hGDH1 και hGDH2 από ADP.

Όσον αφορά την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, οι hGDH1 και hGDH2 επέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά. Και τα δύο ισοένζυμα ενεργοποιούνταν από τη λευκίνη με παρόμοια  $SC_{50}$ , τόσο σε απουσία όσο και παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP. Η δραστηριότητα τόσο της hGDH1 όσο και της hGDH2 σε συγκεντρώσεις L-λευκίνης >4mM σε απουσία ADP έφτανε το ~60% της μέγιστης ειδικής δραστηριότητας (δηλ. της μετρούμενης με 1 mM ADP), με παρόμοια  $SC_{50}$ . Με την παρουσία μικρών ποσοτήτων ADP παρατηρείτο συνεργική δράση και τα δύο ισοένζυμα μπορούσαν να ανακτήσουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους (δηλ. αυτή που μετράται σε 1 mM ADP) με μικρότερες συγκεντρώσεις L-λευκίνης, χωρίς όμως και πάλι να εμφανίζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους όσον αφορά τις  $SC_{50}$ s.

Παρατίθεται ενδεικτικά γράφημα της ενεργοποίησης hGDH1 και hGDH2 από λευκίνη σε απουσία ADP (εικ. 4.4), καθώς και πίνακας των  $SC_{50}$ s σε διάφορες συγκεντρώσεις ADP (Πίνακας 4.2).



Εικ. 4.6: Ενεργοποίηση καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2 από λευκίνη.

	hGDH1			hGDH2		
	$SC_{50}$ (mM)	Βαθμός ενεργοπ.	Αύξηση κατά:	$SC_{50}$ (mM)	Βαθμός ενεργοπ.	Αύξηση κατά:
<b>L-Leucine</b>	$0.979 \pm 0.055$	62.5%	~60%	$1.092 \pm 0.095$	62.4%	~1300%
<b>L-Leucine + 25 <math>\mu</math>M ADP</b>	$0.493 \pm 0.123$	95.4%	~30%	$0.455 \pm 0.070$	93.3%	~950%
<b>L-Leucine + 50 <math>\mu</math>M ADP</b>	$0.393 \pm 0.082$	98.8%	~15%	$0.362 \pm 0.079$	98.7%	~130%

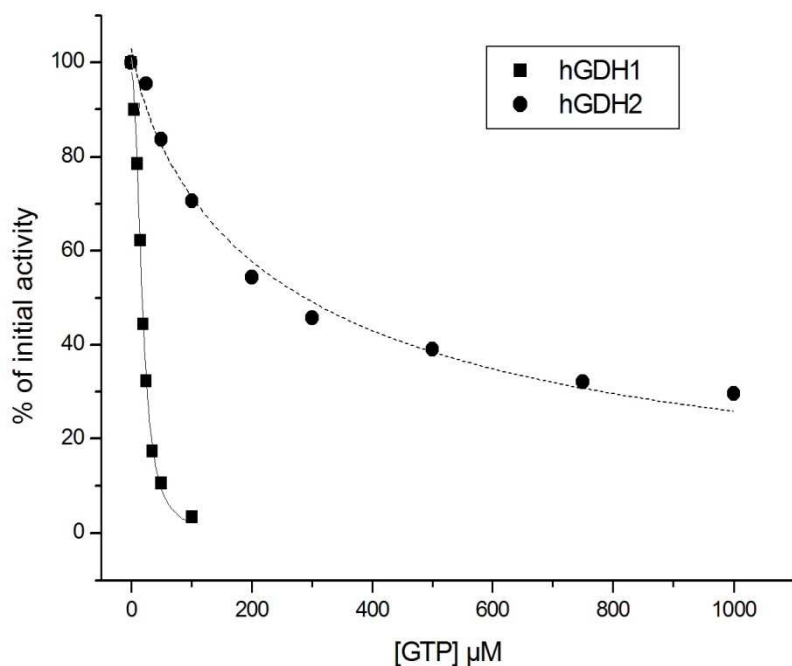
Πιν. 4.2: Ενεργοποίηση καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2 από λευκίνη απουσία ADP καθώς και παρουσία 25  $\mu$ M ή 50  $\mu$ M ADP στο μείγμα αντίδρασης. Η δεύτερη στήλη («βαθμός ενεργοποίησης») για κάθε ισοένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη δραστηριότητα που επετεύχθη με την προσθήκη λευκίνης στις αντίστοιχες συνθήκες, ως ποσοστό της δραστηριότητας του ισοενζύμου σε 1 mM ADP. Η τρίτη στήλη (ποσοστό αύξησης) παρουσιάζει το ποσοστό κατά το οποίο αυξήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου κατά τη μέγιστη ενεργοποίηση με λευκίνη, στην εκάστοτε συνθήκη, σε σχέση με τη δραστηριότητα πριν την προσθήκη λευκίνης (αλλά παρόντος του ADP).

#### 4.1.5. Αναστολή από GTP

Οι διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων στην αναστολή από GTP είχαν επίσης μελετηθεί προηγουμένως σε αδρά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν. 2000, Plaitakis και συν. 2003). Και στα πειράματα σε καθαρές πρωτεΐνες επιβεβαιώθηκε η αντοχή της hGDH2 στο GTP, για το οποίο, σε αντίθεση με τη hGDH1, επιδεικνύει μη συνεργατική συμπεριφορά των υπομονάδων, κρίνοντας από τους συντελεστές Hill. Παρουσιάζεται πίνακας των σχετικών αποτελεσμάτων (Πίνακας 4.3) καθώς και ενδεικτικό γράφημα αναστολής από GTP παρουσία 1 mM ADP (Εικόνα 4.5).

	IC <sub>50</sub> (μM)		Hill Coefficient	
	hGDH1	hGDH 2	hGDH 1	hGDH2
<b>No ADP</b>	0.31 ±0.03	78.54 ±14.08	1.507±0.067	0.846 ±0.139
<b>0.1 mM ADP</b>	1.61 ±0.02	23.88 ± 2.18	2.125±0.154	1.080 ±0.086
<b>1 mM ADP</b>	18.51 ±0.49	269.18 ±32.01	1.944±0.074	0.769 ±0.097

**Πιν. 4.3:** Αναστολή καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2 από GTP απουσία ADP και παρουσία 100 μM ή 1000 μM ADP στο μείγμα αντίδρασης.



**Εικ. 4.7:** Αναστολή καθαρισμένων hGDH1 & hGDH2 από GTP σε 1 mM ADP. Οι IC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν ήταν 18.51 ±0.49 μM για τη hGDH1 και 269.18 ±32.01 μM για τη hGDH2.

Να σημειωθεί πως, παρ' ότι το ADP και στα δύο ισοένζυμα γενικώς μετριάζει την ανασταλτική επίδραση του τόσο στη GTP, ειδικά στην hGDH2 η IC<sub>50</sub> που μετρήθηκε σε απουσία ADP είναι μεγαλύτερη από τη μετρηθείσα σε 0.1 mM ADP. Αυτό το φαινόμενο είχε παρατηρηθεί και παλιότερα σε αδρά εκχυλίσματα (Plaitakis και συν. 2000) αλλά και στο μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, που σε κάποιες ιδιότητές του, όπως θα δούμε παρακάτω, προσομοιάζει τη hGDH2. Να σημειωθεί ωστόσο ότι αυτό σε μεγάλο βαθμό αντιπροσωπεύει την πολλαπλάσια (10 φορές ή και παραπάνω) ποσότητα του μη ενεργοποιημένου ενζύμου με χαμηλή βασική δραστηριότητα (π.χ. hGDH2 ή hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala) που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να καταστεί δυνατή μια μελέτη αναστολής.

#### **4.1.6. Αναστολή από οιστρογόνα**

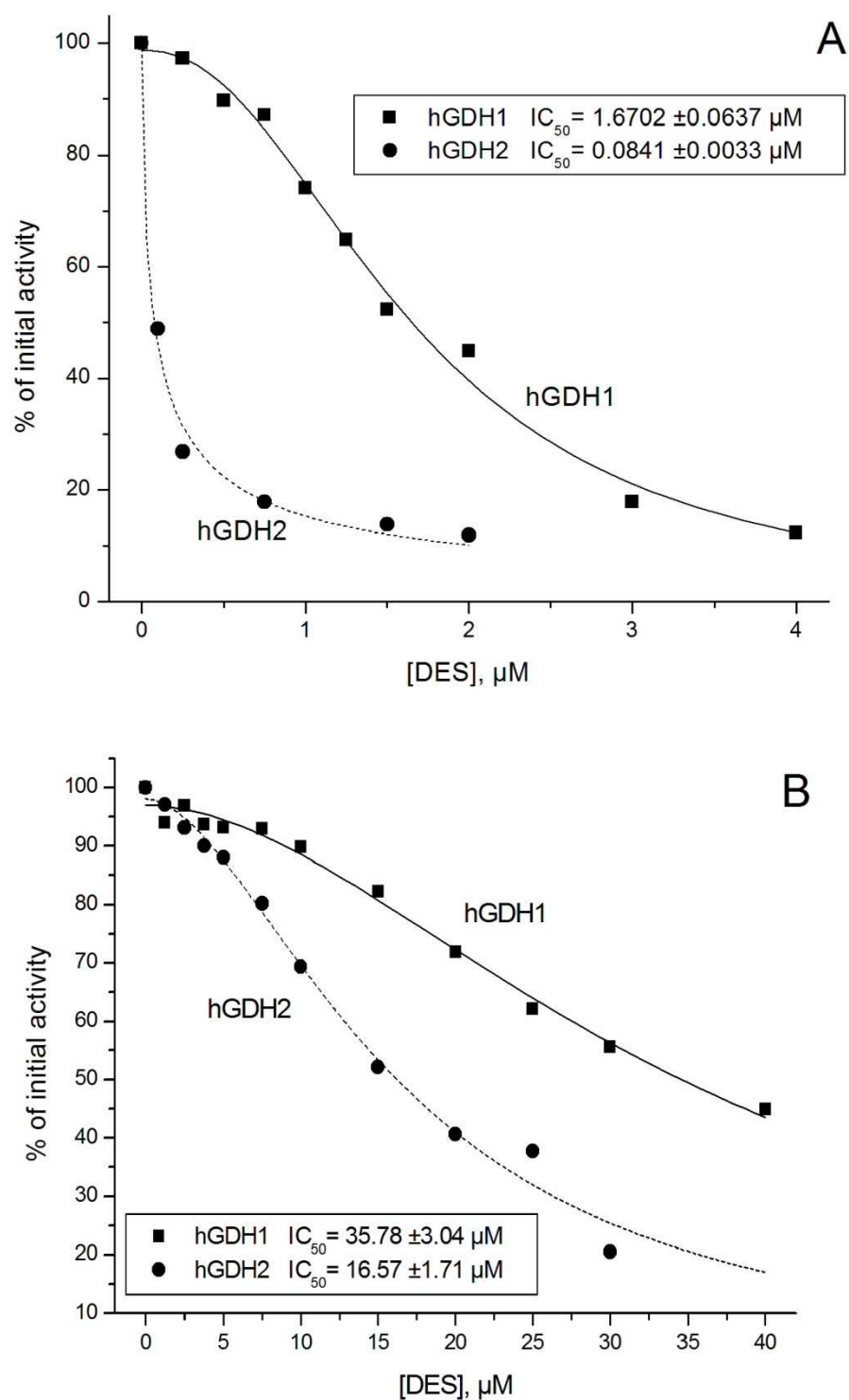
Κατά τη συγκριτική μελέτη των ιδιοτήτων hGDH1 και hGDH2 στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσης διατριβής δοκιμάστηκε για πρώτη φορά και η συμπεριφορά τους όσον αφορά την αναστολή από οιστρογόνα.

Η hGDH1 φάνηκε να είναι αρκετά πιο ανθεκτική από τη hGDH2 στην ανασταλτική επίδραση της διαιθυλστυλβεστρόλης (DES). Και τα δύο ισοένζυμα προστατεύονταν μερικώς από το ADP από την αναστολή αυτή. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ADP και, ακόμη περισσότερο, σε απουσία αυτού, οι διαφορές στην IC<sub>50</sub> γινόταν αναλογικά πολύ μεγαλύτερη εις βάρος της hGDH2. Παρουσιάζεται ενδεικτικά στην εικόνα 4.8 γραφική παράσταση της αναστολής hGDH1 και hGDH2 από διεθυλστυλβεστρόλη σε απουσία ADP και παρουσία 1 mM ADP.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όπου φάνηκε ότι η hGDH2 είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την hGDH1 στην αναστολή αυτή, αντίθετα απ' ότι συμβαίνει με την αναστολή από GTP, γεγονός που σημαίνει ότι οι δύο αναστολές λειτουργούν με διαφορετικό μηχανισμό, λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους οδήγησαν σε σειρά εκτενών μελετών που ξεπερνούσαν κατά πολύ τους στόχους της διατριβής αυτής, έτσι την περαιτέρω μελέτη ανέλαβαν η Μ.Μ. Παπαχατζάκη στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας της και ο Ν. Μπορομπόκας στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής. Οι ερευνητές αυτοί μελέτησαν πληθώρα ανασυνδυασμένων μορφών hGDH σε συνδυασμό με διάφορα οιστρογόνα – παρακάτω, αλλά και στο κεφάλαιο της



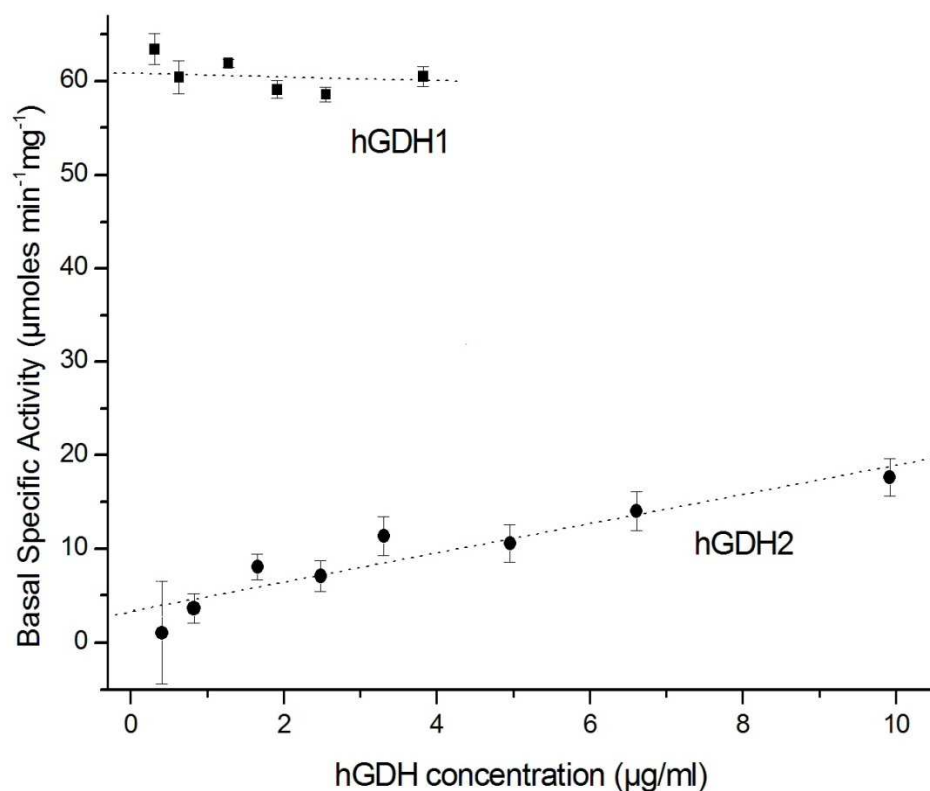
συζήτησης, θα αναφερθούν μερικά από τα δεδομένα και θα συσχετισθούν αυτά με τα δικά μας ευρήματα.



**Εικ. 4.8:** Αναστολή καθαρισμένων hGDH1 & hGDH2 από διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) σε μη ενεργοποιημένο ένζυμο (A) ή παρουσία 1 mM ADP (B).

#### 4.1.7. Εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση

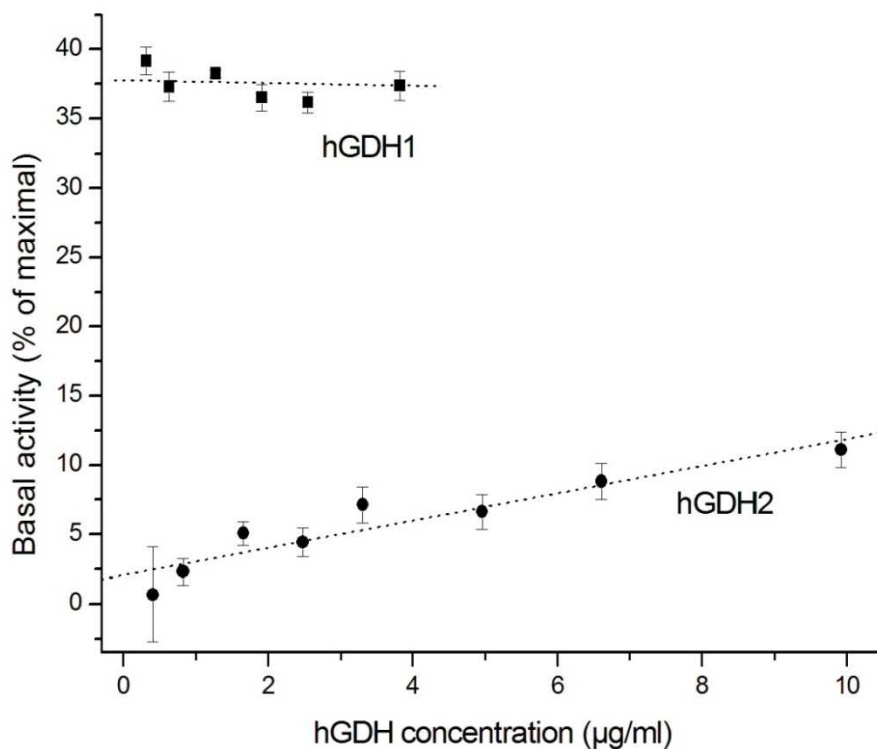
Κατά τη διάρκεια των ως άνω μελετών παρατηρήθηκε ότι, σε αντίθεση με τη βασική δραστηριότητα (δηλ. απουσία ενεργοποιητών) της hGDH1, που γενικώς παρέμενε σταθερή σε επίπεδα ~35%-40% της μέγιστης, η δραστηριότητα της hGDH2 φαινόταν να εξαρτάται από διάφορες συνθήκες. Μία από αυτές τις συνθήκες φάνηκε να είναι η συγκέντρωση του ενζύμου. Ενώ η μέγιστη –παρουσία ADP-δραστηριότητα της hGDH2 μεταβαλλόταν αναλογικά με την ποσότητα που ενζύμου που χρησιμοποιούνταν (δηλ. η μέγιστη ειδική δραστηριότητα παρέμενε σταθερή), η βασική δραστηριότητα αύξανε δυσανάλογα με την ποσότητα, δηλαδή η βασική *ειδική* δραστηριότητα του ενζύμου αυξανόταν όσο αυξανόταν η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιούσαμε σε κάθε αντίδραση, δηλαδή όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα (εικ. 4.9)



**Εικόνα 4.9:** Η συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση. Ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας της hGDH2, όπως υπολογίστηκε από την ευθεία, ήταν  $1.564 \pm 0.232$   $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου. ( $R=0.9397$ ,  $p<0.001$ ). Για τη hGDH1 υπολογίστηκε  $R= -0.5564$ ,  $p=0.25$ . Το πείραμα έγινε σε θερμοκρασία 25°C.

Καθώς, όπως είπαμε, η μέγιστη ειδική δραστηριότητα δε μεταβαλλόταν, το παραπάνω γράφημα μπορεί να σχεδιαστεί και με τιμές βασικής δραστηριότητας ως ποσοστό επί

της μέγιστης (εικ. 4.10). Αυτό τον τρόπο έκφρασης θα προτιμήσουμε εφ' εξής, για να έχουμε μέτρο σύγκρισης και για τα ανασυνδυασμένα ένζυμα που θα μελετήσουμε στη συνέχεια.

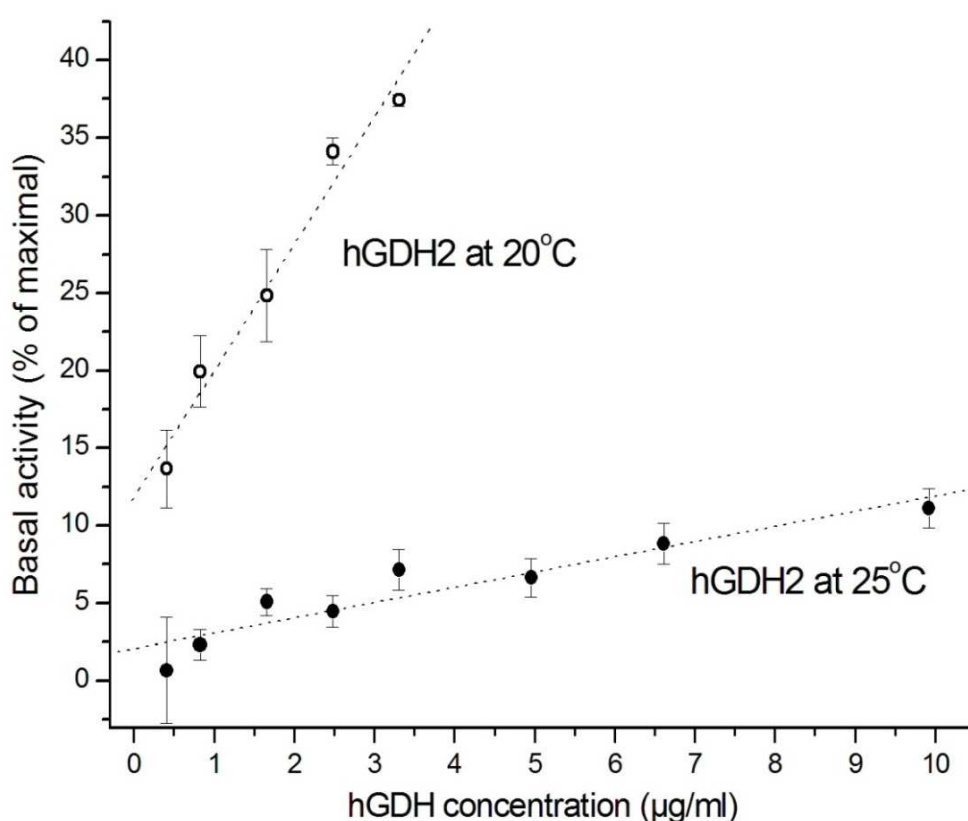


**Εικόνα 4.10:** Συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση. Το πείραμα της εικόνας 4.9 με τη βασική δραστηριότητα εκπεφρασμένη ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας παρουσία 1 mM ADP που παρουσιάζει κάθε ισοένζυμο.

Ας σημειωθεί πως, παρ' ότι οι συγκεντρώσεις της hGDH2 στο διάλυμα της αντίδρασης στα πειράματα αυτά δεν ξεπερνούσαν τα 10-12 µg/ml (κατά κανόνα για μία ενζυμική αντίδραση χρησιμοποιούμε συγκέντρωση ~0.7-1.2 µg/ml καθαρού ενζύμου, ούτως ώστε να επιτυγχάνεται, παρουσία ADP,  $dA_{340nm}/min \sim 0.15-0.20$ ), ελέγχθηκε αρχικά αν η παρουσία άλλης πρωτεΐνης, και συγκεκριμένα βόειου ορολευκωματίνης (BSA), μεταβάλλει αυτή τη συμπεριφορά, και φάνηκε ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Με αντίστοιχο τρόπο αποκλείστηκε το ενδεχόμενο το παρατηρούμενο φαινόμενο να οφείλεται στην επίδραση των μικρών ποσοτήτων διαλύματος φωσφορικού νατρίου που συνοδεύουν το δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι η παρατηρούμενη εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση δεν είναι αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης γενικότερα ή άλλου συναφούς παράγοντα, αλλά οφείλεται στην αλληλεπίδραση των μορίων του ενζύμου.

Μία συνθήκη, ωστόσο, που φάνηκε να επηρεάζει την εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αύξηση της βασικής δραστηριότητας, ήταν η θερμοκρασία της

αντίδρασης: Πραγματοποιώντας το ίδιο πείραμα σε θερμοκρασία 20°C, τόσο η βασική δραστηριότητα (εκπεφρασμένη είτε ως ποσοστό επί της μέγιστης, είτε ως ειδική δραστηκότητα σε απόλυτες τιμές), όσο και ο ρυθμός της μεταβολής της σε σχέση με τη συγκέντρωση, δηλ. η κλίση της ευθείας της γραφικής παράστασης, φάνηκαν να αυξάνονται σε σχέση με τους 25°C (εικ. 4.11). Κάτι τέτοιο δεν συνέβαινε για τη βασική δραστηριότητα της hGDH1, αλλά ούτε και για τις μέγιστες δραστηριότητες και των δύο ισοενζύμων, που μάλιστα είχαν την τάση να είναι κατά ~5% χαμηλότερες στους 20°C. Η σημασία του ευρήματος αυτού, που αναπαρήχθη και σε άλλες ανασυνδυασμένες hGDH, θα συζητηθεί αργότερα.



**Εικόνα 4.11:** Η βασική δραστηριότητα της hGDH2 σε σχέση με τη συγκέντρωση σε θερμοκρασία 25°C (βλ. εικόνες 4.9 και 4.10) και 20°C. Ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηκότητας της hGDH2 στους 20°C ήταν  $13.025 \pm 1.267 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε µg αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου. ( $R=0.9861$ ,  $p=0.002$ ).

Έχοντας ολοκληρώσει τη συγκριτική μελέτη hGDH1 και hGDH2, όπου ήμασταν ιδιαίτερα αναλυτικοί προκειμένου να υπενθυμίσουμε στον αναγνώστη τις διαφορές τους και να εξηγήσουμε τη φύση των πειραμάτων μας, προχωρούμε στα αποτελέσματα από τα μεταλλάγματά τους, εστιάζοντας πλέον περισσότερο σε σημαντικά αποτελέσματα.

## **4.2. Ιδιότητες του μεταλλάγματος hGDH2-Ser445Ala**

Προχωρούμε στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του μεταλλάγματος hGDH2-Ser445Ala, που, όπως έχουμε πεί στην εισαγωγή, αντιστοιχεί στη hGDH2 που σχηματίζεται από την έκφραση του πολυμορφισμού T1492G στο *GLUD2* γονίδιο. Η πρωτεΐνη εκφράστηκε και καθαρίστηκε με τον τρόπο που αναφέρεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας, όπως και οι hGDH1 και hGDH2, και μελετήθηκε ως επί το πλείστον παράλληλα με αυτές.

### **4.2.1. Κινητικές και αλλοστερικές ιδιότητες της hGDH2-Ser445Ala**

Όσον αφορά τις κινητικές ιδιότητες της hGDH2-Ser445Ala, αυτές δε φάνηκαν να διαφέρουν σημαντικά από αυτές της hGDH2 αγρίου τύπου, αλλά και από της hGDH1 (Πιν. 4.4), με εξαίρεση μια κάπως μειωμένη  $K_m$  για το γλουταμικό.

	$V_{max}$	$K_m$		
		α-κετογλουταρ.	αμμωνία	L-γλουταμικό
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	mM	mM	mM
<b>hGDH2-S445A</b>	154.9	2.6 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 1.9
<b>hGDH2</b>	159.1	2.1 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 0.8
<b>hGDH1</b>	161.9	2.0 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 0.7

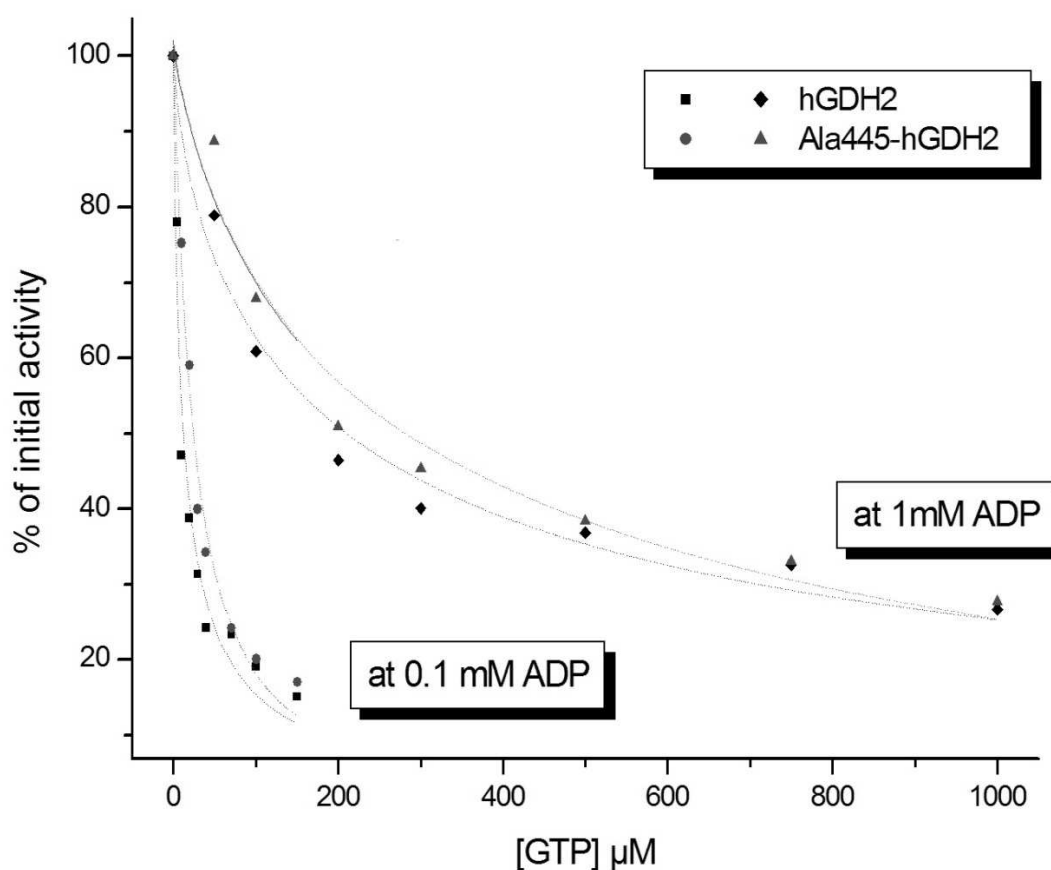
**Πιν. 4.4:** Η  $V_{max}$  καθώς και οι  $K_m$  για το α-κετογλουταρικό, την αμμωνία και το L-γλουταμικό σε καθαρισμένες hGDH2-Ser445Ala, hGDH1 και hGDH2 παρουσία 1 mM ADP. Τα δεδομένα για τις hGDH1 και hGDH2, που εμφανίζονται και στον πίνακα 4.1, προέρχονται από σύγχρονα πειράματα με αυτά για την hGDH2-Ser445Ala.

Τόσο στην ενεργοποίηση από το ADP, όσο και στην ενεργοποίηση από την L-λευκίνη, η hGDH2-Ser445Ala φάνηκε να έχει παρόμοιες  $SC_{50}$  με την hGDH2, συνήθως οριακά (στατιστικά ασήμαντα) χαμηλότερες, γεγονός αποδοτέο στο ότι ξεκινούσε από περίπου διπλάσια βασική δραστηριότητα. Στον πίνακα 4.5 αναγράφονται ενδεικτικές τιμές από πειράματα που έγιναν σε καθαρισμένες hGDH2-Ser445Ala, hGDH2 και hGDH1 παράλληλα για το ADP καθώς και για την L-λευκίνη απουσία ADP. Η προσθήκη μικρών ποσοτήτων ADP επίσης δεν είχε διαφορετική επίδραση στην hGDH2-Ser445Ala απ' ότι στην αγρίου τύπου hGDH2.

	ADP SC <sub>50</sub> (μM)	L-leucine SC <sub>50</sub> (mM)
<b>hGDH2-S445A</b>	58.2 ±5.5	0.955 ±0.045
<b>hGDH2</b>	68.5 ±2.3	1.015 ±0.213
<b>hGDH1</b>	22.4 ±2.1	0.860 ±0.139

**Πιν. 4.5:** Οι SC<sub>50</sub> κατά την ενεργοποίηση καθαρισμένων hGDH2-Ser445Ala, hGDH2 και hGDH1 από ADP καθώς και από λευκίνη απουσία ADP

Και κατά την αναστολή από GTP, οι καθαρισμένες hGDH2-Ser445Ala και hGDH2 δεν διέφεραν σημαντικά. Παρ' ότι η ομοειδής μετάλλαξη Ser445Leu στην hGDH1 αυξάνει δραματικά την αντίσταση του ενζύμου στο GTP (Stanley και συν. 2000), η hGDH2, όντας ανθεκτική στο GTP χάρη στην αλλαγή Gly456Ala (Zaganas και Plaitakis, 2002) ελάχιστα επηρεάστηκε από την αλλαγή Ser445Ala (όπως άλλωστε και από την ίδια την αλλαγή Ser445Leu, όπως θα δούμε παρακάτω). Στην εικόνα 4.12



**Εικ. 4.12:** Αναστολή καθαρισμένων hGDH2 και hGDH2-S445A από GTP παρουσία 0.1 mM και 1 mM ADP. Οι IC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν σε 0.1 mM ADP ήταν 12.2 ±2.7 μM για τη hGDH2 και 24.4 ±2.6 μM για την hGDH2-Ser445Ala, ενώ στο 1 mM ADP οι IC<sub>50</sub> ήταν 204.1 ±36.4 μM και 257.8 ±42.2 μM, αντίστοιχα.

και στον πίνακα 4.6 παρατίθενται αντίστοιχα γράφημα από χαρακτηριστικό πείραμα αναστολής καθώς και τα στοιχεία από τη συγκριτική μελέτη hGDH2 και hGDH2-Ser445Ala σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν.

	IC <sub>50</sub> (μM)		Hill Coefficient	
	hGDH2	hGDH2-S445A	hGDH 2	hGDH2-S445A
No ADP	40.07 ±4.46	29.06 ±4.48	0.72 ±0.05	0.80 ±0.05
0.1 mM ADP	12.22 ±2.65	24.39 ±2.62	1.06 ± 0.16	1.01 ±0.09
1 mM ADP	204.1 ±36.4	257.8 ±42.2	0.82 ±0.11	0.71 ±0.04

**Πιν. 4.6:** Αναστολή καθαρσιμένων hGDH2-Ser445Ala και hGDH2 αγρίου τύπου από GTP απουσία ADP και παρουσία 0.1 mM ή 1 mM ADP στο μείγμα αντίδρασης.

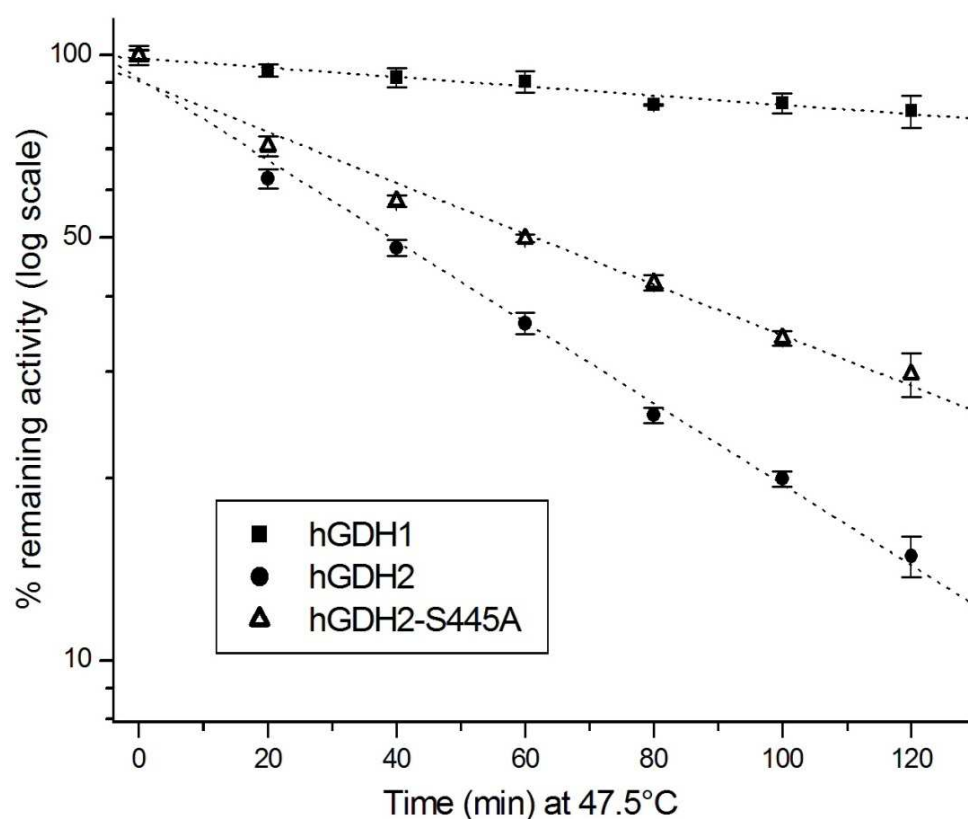
Στην αναστολή από οιστρογόνα, οι hGDH2 και hGDH2-Ser445Ala εμφάνισαν επίσης μικρές έως αμελητέες διαφορές, με μια ήπια (αλλά μη στατιστικά σημαντική) τάση για μεγαλύτερες IC<sub>50</sub>, και άρα μεγαλύτερη αντοχή, της hGDH2-Ser445Ala σε σχέση με την hGDH2, που όμως επ' ουδενί δεν προσέγγιζε την αντοχή της hGDH1. Παρατίθενται ενδεικτικά αποτελέσματα, από πειράματα που έγιναν σε συνεργασία με τη Μαρία-Μάρθα Παπαχατζάκη (Πίν. 4.7)

IC <sub>50</sub> (μM) για:		hGDH2	hGDH2-S445A	hGDH1
Estradiol,	No ADP	1.54 ±0.23	2.69 ±0.51	26.94 ±1.08
Estradiol,	0.1 mM ADP	15.10 ±1.22	25.88 ±3.62	69.23 ±1.31
DES,	0.1 mM ADP	1.05 ±0.09	1.37 ±0.25	7.06 ±0.41

**Πιν. 4.7:** Αναστολή καθαρσιμένων hGDH2-Ser445Ala, hGDH2 αγρίου τύπου και hGDH1 από οιστραδιόλη και διαιθυλστυλβεστρόλη (DES). Μερικές από τις αντιδράσεις αναστολής από οιστραδιόλη εκτέλεσε η Μ.Μ. Παπαχατζάκη (βλ. και Παπαχατζάκη, 2006)

#### 4.2.2. Θερμοαντοχή της hGDH2-Ser445Ala

Η αντίσταση της hGDH2-Ser445Ala στη θερμική απενεργοποίηση ελέγχθηκε με τον τρόπο που είδαμε, σε παράλληλη σύγκριση όχι μόνο με τη hGDH2 και τη hGDH1, αλλά και με τα δύο μεταλλάγματα που θα εξετάσουμε στο αμέσως επόμενο υποκεφάλαιο. Η θερμική αντοχή της φάνηκε να είναι αρκετά μικρότερη μεν από αυτήν της hGDH1 αλλά σημαντικά μεγαλύτερη της αγρίου τύπου hGDH2, από την οποία παρουσίαζε σχεδόν διπλάσιο χρόνο ημίσειας ζωής (εικ. 4.13).



**Εικ. 4.13:** Θερμική απενεργοποίηση καθαρισμένων hGDH2-Ser445Ala, hGDH2 και hGDH1. Το πείραμα έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής που υπολογίστηκαν ήταν: για τη hGDH1, 384 min· για τη hGDH2, 38.9 min· για την hGDH2-Ser445Ala, 61.5 min.

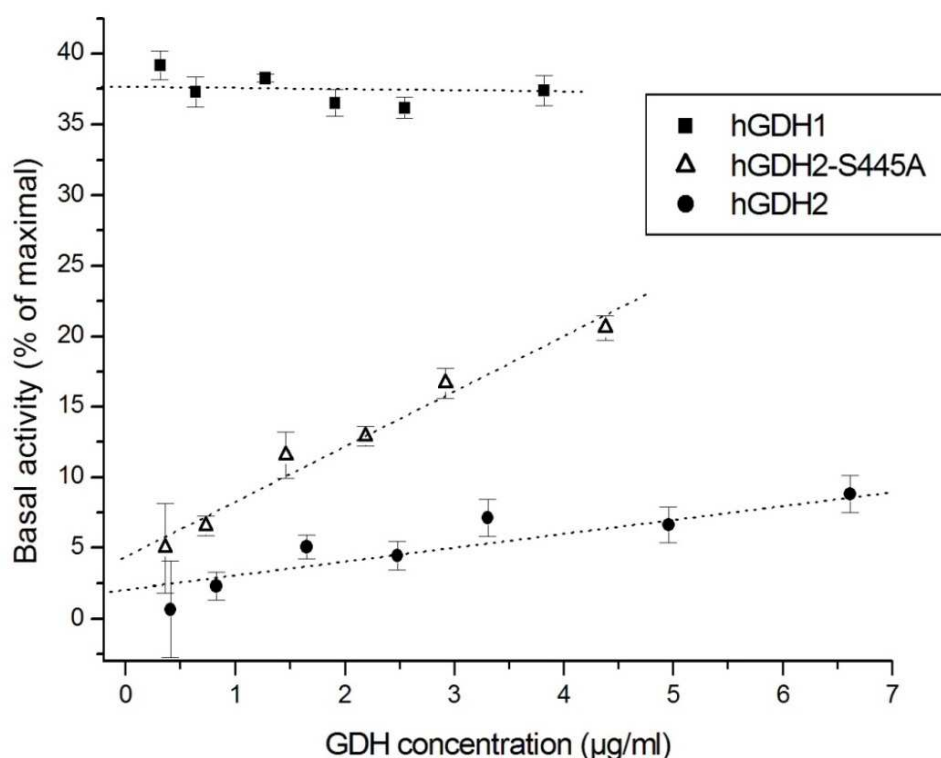
Τη σημασία αυτού του ευρήματος σε σχέση με τη θερμική αντοχή των λοιπών hGDHs θα συζητήσουμε αργότερα, όταν θα έχουμε δει τα αντίστοιχα δεδομένα.



### 4.2.3. Η βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala

Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala, αυτή φάνηκε να εμφανίζει βασική δραστηριότητα μεγαλύτερη από αυτήν της αγρίου τύπου hGDH2 ήδη από τα πειράματα πάνω στους αλλοστερικούς ενεργοποιητές, όπου στις συνήθεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση (~1  $\mu\text{g}$  καθαρισμένης πρωτεΐνης ανά ml) είχε βασική δραστηριότητα ~8-10% της μέγιστης (δηλ. αυτής παρουσία 1 mM ADP).

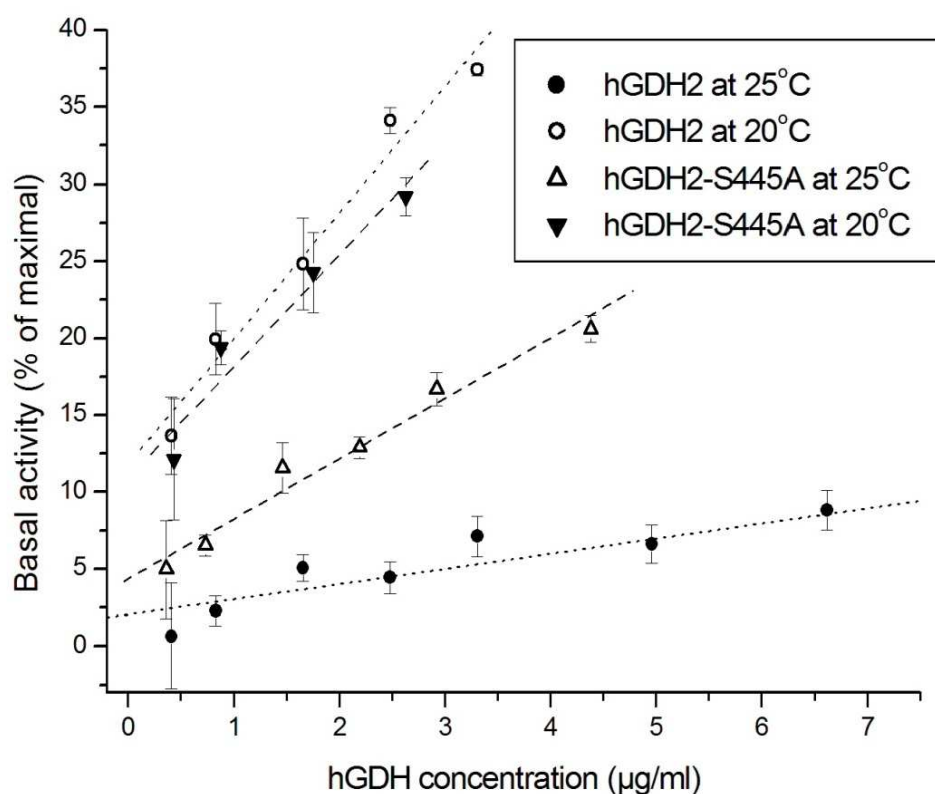
Όταν ελέγξαμε τη βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala σε σχέση με τη συγκέντρωση, κάτι που έγινε παράλληλα με τις hGDH2 και hGDH1 που είδαμε προηγουμένως, είδαμε ότι και στην hGDH2-Ser445Ala η βασική δραστηριότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση, μόνο που σε κάθε συγκέντρωση η βασική αυτή δραστηριότητα είχε μεγαλύτερη τιμή της hGDH2 και μάλιστα αύξανε με μεγαλύτερο ρυθμό (εικόνα 4.14)



**Εικόνα 4.14:** Η συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση στη hGDH2-Ser445Ala, σε θερμοκρασία 25°C, συγκριτικά και με τις hGDH2 και hGDH1 (βλ. και εικ. 4.9). Ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας της hGDH2-Ser445Ala, όπως υπολογίστηκε από την ευθεία, ήταν  $6.065 \pm 0.518 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου. ( $R=0.9857$ ,  $p<0.001$ ).

Έτσι, σύμφωνα με τις γραμμικές αυτές συσχετίσεις, η βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala στους 25°C σε συγκέντρωση ενζύμου στην κυβέττα 1  $\mu\text{g/ml}$  υπολογίζεται στο 8.27% της μέγιστης (δηλ. της μετρούμενης σε 1 mM ADP), ενώ αντίθετα της hGDH2 στο 3.05%, τιμή που αναταποκρινόταν και στις παρατηρήσεις μας κατά την τέλεση άλλων πειραμάτων. Επίσης, σε ελάχιστα αυξημένες συγκεντρώσεις (~5  $\mu\text{g/ml}$ ), η βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala ξεπερνούσε το 20%, ενώ η hGDH2 ακόμη και σε διπλάσιες συγκεντρώσεις (~10  $\mu\text{g/ml}$ ) μετά βίας έφτανε το 10-11%.

Όπως και η hGDH2, έτσι και η hGDH2-Ser445Ala σε χαμηλότερη θερμοκρασία εμφάνιζε μεγαλύτερες βασικές δραστηριότητες και πιο «απότομη» σχέση μεταβολής αυτών με την αύξηση της συγκέντρωσης (δηλ. μεγαλύτερη κλίση της ευθείας κατά τη γραμμική συσχέτιση συγκέντρωσης - βασικής δραστηριότητας), χωρίς όμως να ξεπερνά στο σημείο αυτό την hGDH2 (βλ. εικόνα 4.15).



**Εικόνα 4.15:** Η βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala και της hGDH2 (βλ. και εικ. 4.10 και 4.11) σε σχέση με τη συγκέντρωση σε θερμοκρασία 25°C και 20°C. Ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας της hGDH2-Ser445Ala στους 20°C ήταν  $11.268 \pm 1.994 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου. ( $R=0.9701$ ,  $p=0.03$ ).

### **4.3. Βασική δραστηριότητα και θερμοαντοχή του διπλού μεταλλάγματος hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala**

Όπως είδαμε στην εισαγωγή, οι αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala είναι δύο από τις αλλαγές που έλαβαν χώρα στο *GLUD2* γονίδιο μετά τη γένεση του με τη διαδικασία της ρετρομετάθεσης και οι οποίες είναι κομβικής σημασίας για κάποιες από τις ιδιότητες της hGDH2: Η αλλαγή Gly456Ala κάνει τη hGDH2 ανθεκτική στην αναστολή από GTP (Zaganas & Plaitakis, 2002), ενώ η αλλαγή Arg443Ser εκμηδενίζει την βασική δραστηριότητα και δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση από λευκίνη απουσία ADP (Zaganas και συν. 2002), ενώ ταυτόχρονα κάνει το ένζυμο πολύ θερμοευαίσθητο (Yang και συν. 2004). Η επίδραση εκάστης των αλλαγών αυτών ξεχωριστά μελετήθηκε από τον I. Ζαγανά, που κατασκεύασε τα μεταλλάγματα hGDH1-Arg443Ser και hGDH1-Gly456Ala στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής (Ζαγανάς, 2006). Θέλοντας να διερευνήσουμε κατά πόσο ο συνδυασμός των δύο μεταλλάξεων αναπαράγει τις ιδιότητες της hGDH2, δημιουργήθηκε από το B. Μαστοροδήμο το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, το οποίο μελετήσαμε σε σύγκριση με τα ένζυμα που είδαμε παραπάνω καθώς και με την hGDH1-Arg443Ser, την οποία επανεκφράσαμε. Όλες οι πρωτεΐνες αυτές μελετήθηκαν σε καθαρή μορφή.

Οι κινητικές και αλλοστερικές ιδιότητες της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala περιγράφονται εν μέρει στη διατριβή του B. Μαστοροδήμου (Μαστοροδήμος, 2007). Συνοπτικά, το διπλό μετάλλαγμα δεν έχει σημαντικές διαφορές από τη hGDH2 όσον αφορά τις κινητικές παραμέτρους. Δεν είχε επίσης διαφορές στην αναστολή από GTP, ως προς το οποίο, σε αντίθεση με την hGDH1, εμφανίζει μη συνεργατική συμπεριφορά. Αυτό επιβεβαιώνει το ότι η αλλαγή Gly456Ala αρκεί για να εξηγήσει την αντοχή της hGDH2 στο GTP. Στον πίνακα 4.3 αναδημοσιεύεται πίνακας (βλ. και Kanavouras και συν. 2007) που παρουσιάζει τα δεδομένα από τη συγκριτική μελέτη hGDH1, hGDH2 και hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala όσον αφορά την αναστολή από GTP. Ας σημειωθεί η υψηλή  $IC_{50}$  της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala σε απουσία ADP, που ίσως οφείλεται στις μεγάλες συγκεντρώσεις ενζύμου που χρησιμοποιήσαμε για τις αντιδράσεις αυτές.

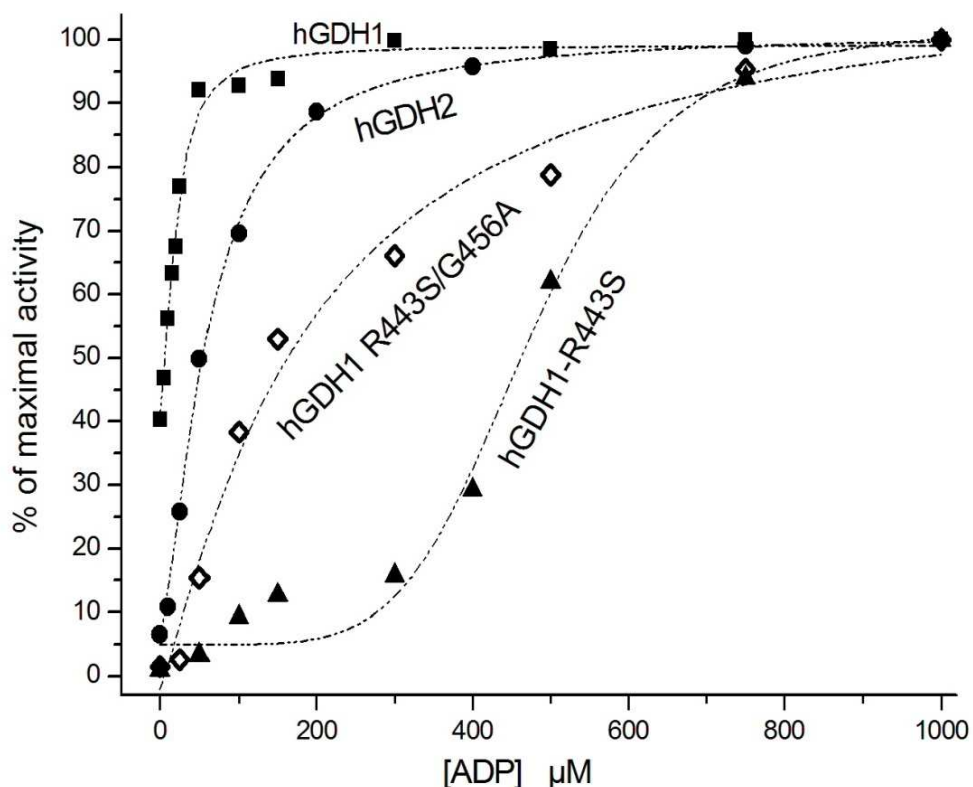
	IC <sub>50</sub> (μM)			Hill Coefficient		
	hGDH1	hGDH2	hGDH1- R443S/ G456A	hGDH 1	hGDH2	hGDH1- R443S/ G456A
No ADP	0.31 ±0.03	78.54±14.08	622.4 ±19.5	1.51±0.07	0.85 ±0.14	0.67 ±0.03
0.1 mM ADP	1.61 ±0.02	23.88 ±2.18	25.75 ±6.62	2.13±0.15	1.08 ±0.09	0.99 ±0.19
1 mM ADP	18.51±0.49	166.8 ±57.8	139.3 ±20.9	1.94±0.07	0.71 ±0.08	0.64 ±0.05

**Πιν. 4.8:** Αναστολή καθαρισμένων hGDH1, hGDH2 και hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala από GTP απουσία ADP και παρουσία 0.1 mM ή 1 mM ADP στο μείγμα αντίδρασης. Ο πίνακας αναδημοσιεύεται από το Kanavouras και συν. 2007. Τα στοιχεία για τη hGDH2 σε 1 mM ADP διαφέρουν από αυτά του πίνακα 4.3, καθώς επελέγησαν δεδομένα από πείραμα εκτελεσθέν παράλληλα με το αντίστοιχο για το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala.

Αναφορικά με την αναστολή από οιστρογόνα, η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala φάνηκε να είναι ακόμη πιο ευαίσθητη στα οιστρογόνα από τη hGDH2, κατέχοντας μία ενδιάμεση θέση μεταξύ της hGDH2 και της hGDH1-Arg443Ser, η οποία αναστελλόταν ισχυρά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Οι IC<sub>50</sub>, λόγω χάριν, για την οιστραδιόλη σε παρουσία 0.1 mM ADP ήταν (βλ. και πίν. 4.7): 69.23 ±1.31 μM για τη hGDH1, 15.10 ±1.22 μM για τη hGDH2, 4.35 ±0.36 μM για την hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και 2.22 ±0.76 μM για την hGDH1-Arg443Ser. Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από πειράματα της M.M. Παπαχατζάκη και του N. Μπορομπόκα πάνω στα καθαρισμένα ένζυμά μας (βλ. Borompokas και συν.,2010). Αν καταρτίσουμε τη «σειρά» της αντοχής τους στα οιστρογόνα, όπως εκφράζεται από την IC<sub>50</sub> τους στην οιστραδιόλη (παρόμοια είναι η σειρά και για τη διαιθυλστυλβεστρούλη, την προγεστερόνη κ.α. ουσίες, βλ. Παπαχατζάκη, 2006 και Μπορομπόκας, 2009), εντάσσοντας και την hGDH2-Ser445Ala (που εμφάνιζε IC<sub>50</sub> 25.88 ±3.62 μM για την οιστραδιόλη, βλ. Πίν. 4.7), έχουμε την εξής ακολουθία: *hGDH1* > *hGDH2-Ser445Ala* > *hGDH2* > *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala* > *hGDH1-Arg443Ser*.

Στην ενεργοποίηση από ADP παρατηρήθηκε ότι η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala μπορεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις ADP να προσεγγίσει τη μέγιστη δραστηριότητα των ισοενζύμων που παρουσιάσαμε παραπάνω, είχε δε συγκρίσιμη με αυτά V<sub>max</sub> (145.7 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) παρουσία 1 mM ADP. Παρουσίαζε

εντούτοις σημαντικά μεγαλύτερη  $SC_{50}$  για το ADP, που όμως δεν έφτανε αυτήν της hGDH1-Arg443Ser (εικόνα 4.16). Αν και ξεκινούσε, όπως θα δούμε στη συνέχεια, από πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα, δεν αρκεί αυτή από μόνη της να εξηγήσει τη μικρή ευαισθησία στο ADP.

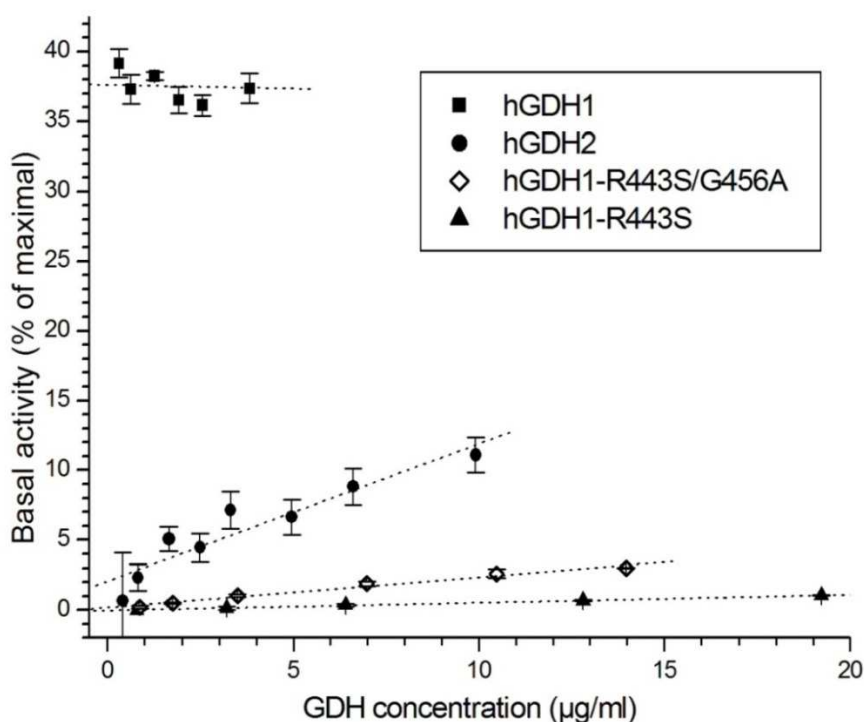


**Εικόνα 4.16:** Ενεργοποίηση καθαρισμένων hGDH1, hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Arg443Ser από ADP. Οι  $SC_{50}$  που υπολογίστηκαν ήταν: για τη hGDH1,  $17.1 \pm 3.3$   $\mu\text{M}$ ; για τη hGDH2,  $58.6 \pm 2.4$   $\mu\text{M}$ ; για τη hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala,  $188.4 \pm 50.7$   $\mu\text{M}$ ; για τη hGDH1-Arg443Ser,  $474.3 \pm 17.7$   $\mu\text{M}$ .

Στα πειράματα ενεργοποίησης από L-λευκίνη, η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala σε απουσία ADP μπορούσε να ενεργοποιηθεί οριακά μόνο, και αυτό σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις λευκίνης, παραμένοντας ουσιαστικά ανθεκτική στην επίδρασή της (βλ. εικόνα 4.25 στο υποκεφ. 4.5.2), ενώ σε παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP γινόταν ευαίσθητη – για λεπτομέρειες ο αναγνώστης παραπέμπεται στη διπλωματική εργασία της Ι. Αριάνογλου (Αριάνογλου 2011) που ασχολήθηκε επισταμένως με το θέμα της ενεργοποίησης από λευκίνη. Στο σημείο αυτό η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala δεν διέφερε ουσιαστικά από την hGDH1-Arg443Ser, η οποία επίσης δεν ενεργοποιείται από λευκίνη σε απουσία ADP (Zaganas και συν. 2002).

Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα, ήταν ήδη γνωστό ότι, στις συνήθεις ποσότητες ενζύμου που χρησιμοποιούμε, η hGDH1-Arg443Ser έχει μηδαμινή βασική

δραστηριότητα (Zaganas και συν. 2002). Η προσθήκη της αλλαγής Gly456Ala στο μόριο, πέραν της επίδρασής της στην αναστολή από GTP, φάνηκε να αυξάνει ελαφρά τη βασική δραστηριότητα, που πλέον γινόταν μετρήσιμη στην hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, αν και παρέμενε σημαντικά χαμηλότερη από της hGDH2. Η βασική δραστηριότητά και της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala ήταν και αυτή, με τον τρόπο που είδαμε παραπάνω, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση, αν και με χαμηλότερο «ρυθμό αύξησης» απ' ότι η hGDH2. Επίσης, φάνηκε ότι ακόμη και η hGDH1-Arg443Ser σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αποκτά και αυτή μετρήσιμη, αν και πολύ χαμηλή, βασική δραστηριότητα, που επίσης ακολουθεί μια γραμμική σχέση με τη συγκέντρωσή της. Σε συγκέντρωση ενζύμου 1  $\mu\text{g/ml}$ , η υπολογιζόμενη βασική δραστηριότητα είναι 0.39% της μέγιστης για την hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και 0.18% της μέγιστης για την hGDH1-Arg443Ser (για τη hGDH2 είναι 3.05%, βλ. υποκεφάλαιο 4.2.2). Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στην εικόνα 4.17.:

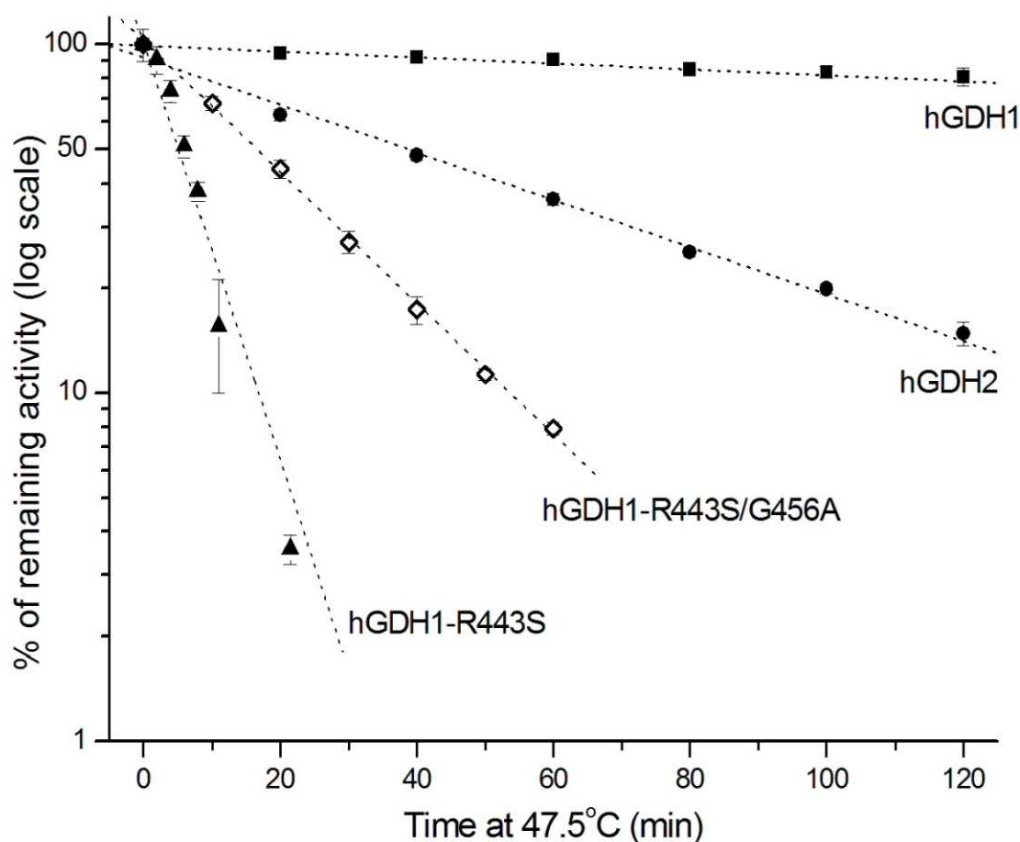


**Εικόνα 4.17:** Η συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση. Ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala όπως υπολογίστηκε από τη γραμμική συσχέτιση, ήταν  $0.316 \pm 0.024 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου ( $R=0.9890$ ,  $p<0.001$ ). Για τη hGDH1-Arg443Ser ήταν  $0.077 \pm 0.002 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ανά  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου. ( $R=0.9986$ ,  $p<0.001$ ). Για τα αντίστοιχα μεγέθη των hGDH1 και hGDH2, βλ. εικ. 4.9. Το πείραμα έγινε σε θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$ .

Αν κατατάξουμε τα ένζυμα με κριτήριο τη βασική δραστηριότητά τους, συμπεριλαμβάνοντας και την hGDH2-Ser445Ala που ελέγχθηκε παράλληλα με τα

ένζυμα αυτά (βλ. εικ. 4.14) παίρνουμε και πάλι την εξής σειρά: *hGDH1* > *hGDH2-Ser445Ala* > *hGDH2* > *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala* > *hGDH1-Arg443Ser*.

Τέλος, όσον αφορά τη θερμοαντοχή των ενζύμων αυτών, η *hGDH1-Arg443Ser* αποδείχθηκε εξαιρετικά θερμοευαίσθητη, όπως ήταν αναμενόμενο (βλ. Yang και συν. 2004), ενώ η επιπλέον αμινοξική αλλαγή *Gly456Ala* στο διπλό μετάλλαγμα *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala* αποκατέστησε μερικώς, αν και σε μικρό βαθμό, τη θερμοαντοχή της. Στην εικόνα 4.18 βλέπουμε τα σχετικά αποτελέσματα.



**Εικόνα 4.18:** Θερμική απενεργοποίηση καθαρισμένων *hGDH1*, *hGDH2*, *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala* και *hGDH1-Arg443Ser*. Το πείραμα έγινε όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία, παράλληλα και με την *hGDH2-Ser445Ala* (βλ. εικ. 4.13). Οι χρόνοι ημίσειας ζωής ήταν: για την *hGDH1*, 384 min· για την *hGDH2*, 38.9 min· για την *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala*, 16.6 min· για την *hGDH2-Arg443Ser*, 5.2 min.

Κατατάσσοντας τα ένζυμα αυτά, καθώς και την *hGDH2-Ser445Ala*, που ελέγχθηκε παράλληλα, ως προς τη θερμοαντοχή τους, παίρνουμε ξανά τη σειρά: *hGDH1* > *hGDH2-Ser445Ala* > *hGDH2* > *hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala* > *hGDH1-Arg443Ser*. Ας τη συγκρατήσουμε, καθ' ότι θα επανέλθουμε στο θέμα αυτό.

#### **4.4. Ιδιότητες του μεταλλάγματος hGDH2-Ser443Arg**

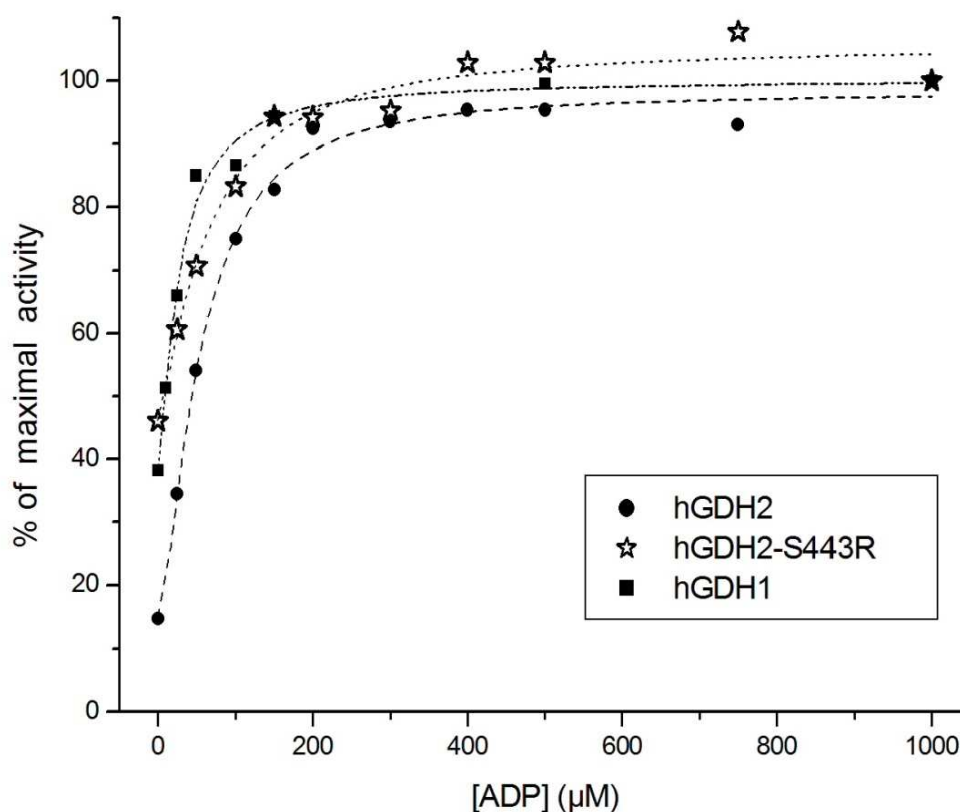
Από τη συγκριτική μελέτη της hGDH2 με την hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και με την hGDH1-Arg443Ser, γίνεται σαφές ότι, με εξαίρεση την αντοχή στο GTP, οι δύο αμινοξικές αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala δεν αναπαράγουν τις ιδιότητες της hGDH2, ιδίως όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα, τη θερμοανθεκτικότητα και την αντοχή στην αναστολή από οιστρογόνα. Παρ' ότι η αλλαγή Gly456Ala μερικώς αντιμάχεται την επίδραση της Arg443Ser, το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala υπολείπεται σημαντικότερα της hGDH2.

Έτσι, σκεφτήκαμε ότι και κάποιες ακόμη τουλάχιστον από τις λοιπές αμινοξικές διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2 έχουν σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της βασικής δραστηριότητας, της θερμοανθεκτικότητας και της αντίστασης στα οιστρογόνα, και ότι το «αλγεβρικό άθροισμα» των επιδράσεων όλων των λοιπών αμινοξικών αλλαγών πλην της Arg443Ser θα είναι «θετικό», ενισχύοντας αυτές τις ιδιότητες. Αν το τελευταίο είναι αληθές, τότε το μετάλλαγμα hGDH2-Ser443Arg (δηλ. το «αρνητικό» της hGDH1-Arg443Ser, ή με άλλα λόγια, μια hGDH1 στην οποία έχουν γίνει όλες οι αμινοξικές αλλαγές προς την κατεύθυνση της hGDH2 πλην της Arg443Ser) θα έπρεπε να είναι ενισχυμένο ακόμη και ως προς τη hGDH1 στη βασική του δραστηριότητα, τη θερμοαντοχή του και την αντίσταση του στα οιστρογόνα.

Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση, σχεδιάσαμε, κατασκευάσαμε και εκφράσαμε το μετάλλαγμα hGDH2-Ser443Arg με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας, και πραγματοποιήσαμε λειτουργικές ενζυμικές μελέτες πάνω σ' αυτό, σε σύγκριση πάντα με τις hGDH1 και hGDH2. Οι μελέτες αυτές εκτελέστηκαν σε αδρά εκχυλίσματα κυττάρων Sf21 που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη μας χάρη στο σύστημα Baculovirus. Καθώς η υπόθεσή μας, όπως θα δούμε στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε με σαφήνεια ήδη από τα πειράματα στα αδρά εκχυλίσματα, ο καθαρισμός των πρωτεϊνών, όντας λίαν χρονοβόρος και πολυέξοδος, κρίθηκε περιττός για τις μελέτες αυτές. Παραθέτουμε στη συνέχεια τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας.



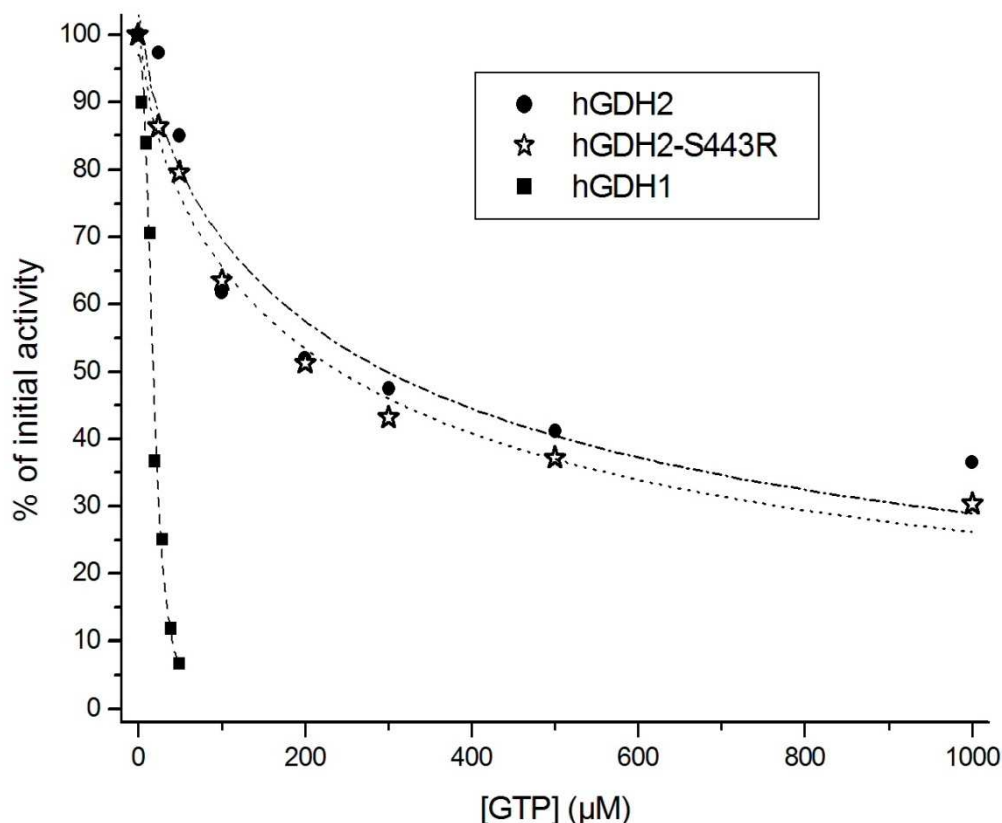
Όσον αφορά τις αλλοστερικές ιδιότητες της hGDH2-Ser443Arg, το μετάλλαγμα είχε όσον αφορά την ενεργοποίηση από ADP ιδιότητες παρόμοιες με τη hGDH2, με την οποία δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην  $IC_{50}$ , οποία ήταν, όπως και της hGDH2, 2-3 φορές μεγαλύτερη αυτής για τη hGDH1, παρ' ότι είχε ως αφετηρία - θα το δούμε και παρακάτω- μεγαλύτερη βασική δραστηριότητα απ' ότι η hGDH1 (βλ. εικόνα 4.19). Το εύρημα αυτό γεννά τη σκέψη ότι, πλην της θέσης 443 (όπου η Σερίνη, με βάση τα όσα ξέρουμε για την hGDH1-Arg443Ser, εκτός του ότι εκμηδενίζει τη βασική δραστηριότητα, επηρεάζει σοβαρά και την ικανότητα του ενζύμου να ενεργοποιείται από ADP), ενδεχομένως και κάποιες άλλες αμινοξικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων σχετίζονται με την κάπως αυξημένη συγγένεια της hGDH1 με το ADP.



**Εικόνα 4.19:** Ενεργοποίηση αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και hGDH2-Ser443Arg από ADP. Οι  $SC_{50}$  που υπολογίστηκαν ήταν: για τη hGDH1,  $27.0 \pm 3.9 \mu M$ ; για τη hGDH2,  $53.6 \pm 3.6 \mu M$ ; για τη hGDH2-Ser443Arg,  $63.7 \pm 9.6 \mu M$ .

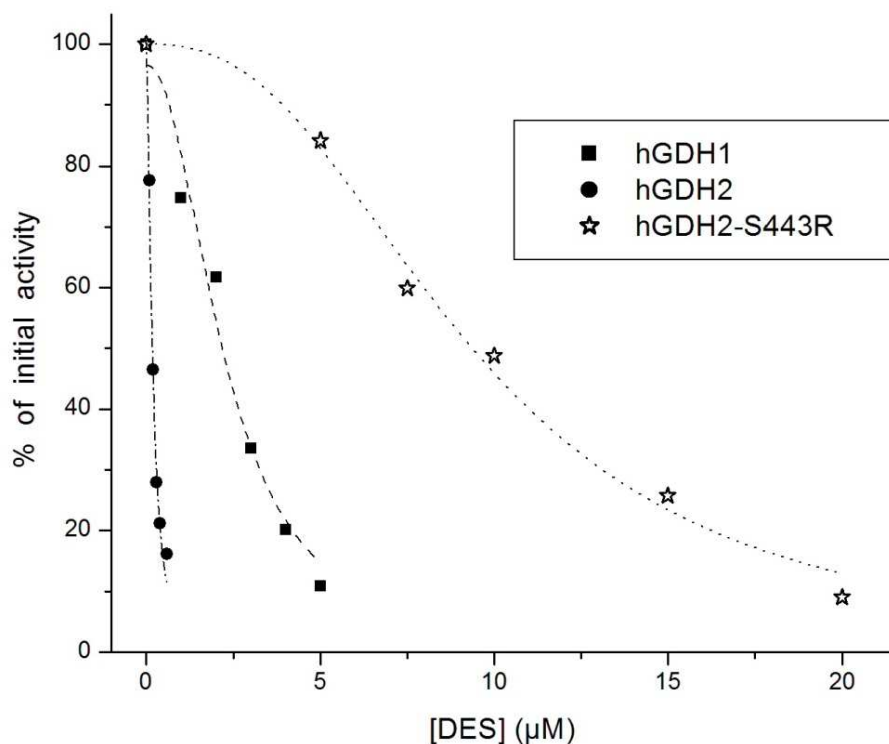
Και στην αναστολή από GTP, το μετάλλαγμα hGDH2-Ser443Arg δεν παρουσίαζε διαφορές από τη hGDH2 - πράγμα φυσικά αναμενόμενο, καθώς φέρει την αλλαγή

Gly456Ala, που δείχνει να ευθύνεται αποκλειστικά για την αντίσταση της hGDH2 στο GTP. Παραθέτουμε γράφημα από χαρακτηριστικό πείραμα αναστολής από GTP σε παρουσία 1 mM ADP (εικόνα 4.20)



**Εικ. 4.20:** Αναστολή αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και hGDH2-Ser443Arg από GTP παρουσία 1 mM ADP. Οι  $IC_{50}$  που υπολογίστηκαν ήταν: για τη hGDH1,  $19.08 \pm 1.28$   $\mu$ M· για τη hGDH2,  $266.9 \pm 58.2$   $\mu$ M· για τη hGDH2-Ser443Arg,  $245.6 \pm 31.1$   $\mu$ M. Οι συντελεστές Hill που υπολογίστηκαν ήταν: για τη hGDH1,  $2.772 \pm 0.420$ · για τη hGDH2,  $0.722 \pm 0.152$ · για τη hGDH2-Ser443Arg,  $0.764 \pm 0.0729$ .

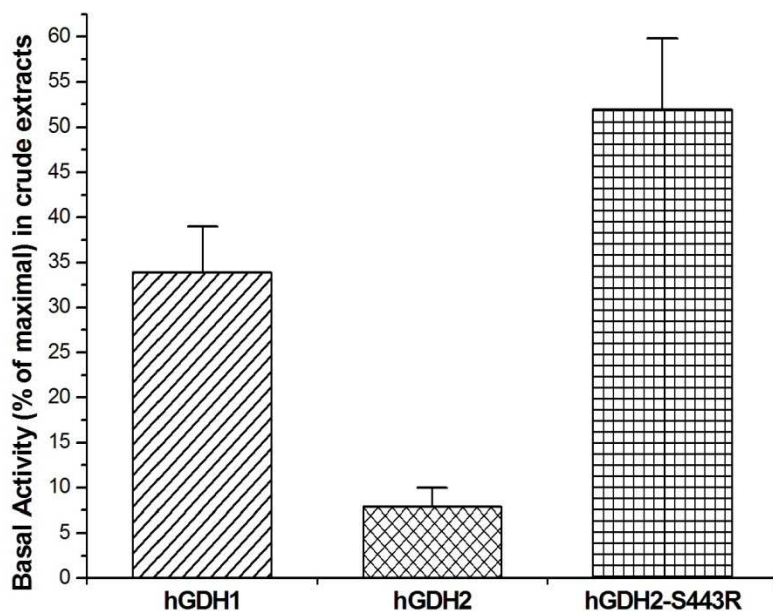
Αντίθετα, όσον αφορά την αναστολή από οιστρογόνα, η hGDH2-Ser443Arg απεδείχθη σημαντικά ανθεκτικότερη όχι μόνο από την hGDH2, αλλά ακόμη και από την hGDH1, εμφανίζοντας μεγαλύτερες  $IC_{50}$  για όλα τα οιστρογόνα και τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν παραθέτουμε εδώ (εικόνα 4.21) χαρακτηριστικό πείραμα αναστολής από διαθυλστιλβεστρόλη απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών που εκτέλεσε ο N. Μπορομπόκας – ο αναγνώστης παραπέμπεται για περαιτέρω στοιχεία στη διδακτορική διατριβή του, όπου ασχολείται διεξοδικά με το θέμα της αναστολής από οιστρογόνα (Μπορομπόκας, 2009).



**Εικόνα 4.21:** Αναστολή αδρών κυτταρικών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και hGDH2-Ser443Arg από διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) σε μή ενεργοποιημένο ένζυμο, δηλαδή απουσία ADP. Οι  $IC_{50}$  που υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναστολής ήταν οι παρακάτω: για την hGDH1,  $2.25 \pm 0.18 \mu\text{M}$ · για την hGDH2,  $0.18 \pm 0.02 \mu\text{M}$ · για την hGDH2-Ser443Arg,  $9.37 \pm 0.62 \mu\text{M}$ . Ελαφρά τροποποιημένο από Μπορομπόκας, 2009 (δίδακτ. διατριβή).

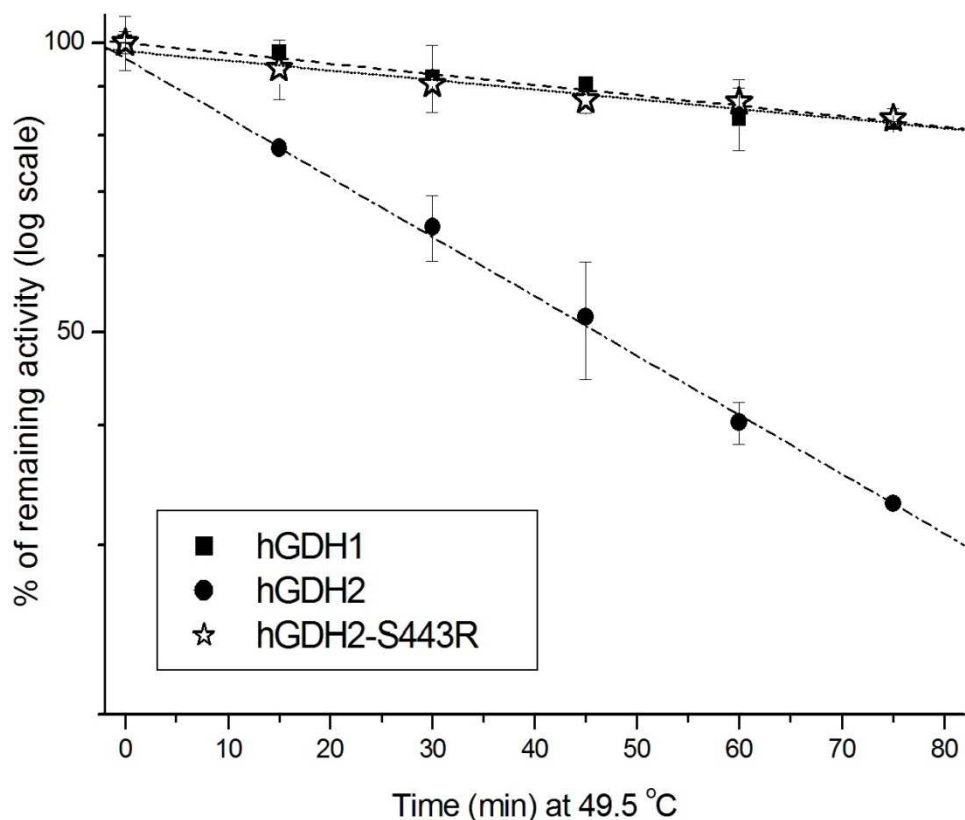
Και στη βασική δραστηριότητα, η hGDH2-Ser443Arg φάνηκε να υπερέχει όχι μόνο της hGDH2, αλλά και αυτής ακόμη της hGDH1 σε σημαντικό βαθμό. Ας σημειωθεί ότι, καθώς εργαστήκαμε πάνω σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της εξάρτησης της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση, καθώς το αδρό εκχύλισμα περιέχει αφ' ενός πολλές πρωτεΐνες καθώς και μη διαλυτά στοιχεία του ομογενοποιημάτος, που σε αυξημένες ποσότητες θολώνουν το διάλυμα της αντίδρασης στην κυβέττα, αφ' ετέρου δε και ουσίες που δυνητικά ενεργοποιούν ή αναστέλλουν το ένζυμο (π.χ. λευκίνη, νουκλεοτίδια κλπ.) σε άγνωστες ποσότητες, η επίδραση των οποίων θα μπορούσε ίσως να θεωρηθεί αμελητέα όταν η ποσότητα τους παραμένει σταθερή, όχι όμως όταν η ποσότητά τους αυξάνεται. Έτσι, η βασική δραστηριότητα ελέγχθηκε σε σταθερές ποσότητες εκχυλίσματος που έδιναν ταχύτητα της αντίδρασης  $dA_{340\text{nm}}/\text{min} \sim 0.15$  παρουσία 1 mM ADP στο φασματοφωτόμετρο και αντιστοιχούσαν σε περίπου 40-70  $\mu\text{g/ml}$  ολικής πρωτεΐνης, έχοντας μέγιστη

(παρουσία 1 mM ADP) ειδική ενζυμική δραστηριότητα περίπου  $2\text{-}3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Τα δεδομένα απο τον έλεγχο της βασικής δραστηριότητας στις συνθήκες αυτές παρουσιάζονται στην εικόνα 4.22.



**Εικόνα 4.22:** Βασική δραστηριότητα σταθερών ποσοτήτων (βλ. κείμενο) αδρών κυτταρικών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και hGDH2-Ser443Arg στους  $25^{\circ}\text{C}$ , εκπεφρασμένη ως ποσοστό επί της μέγιστης που μετράται παρουσία 1 mM ADP. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει  $\geq 14$  προσδιορισμούς της βασικής και μέγιστης δραστηριότητας για το εκάστοτε ένζυμο, που έλαβαν χώρα με κυτταρικά εκχυλίσματα από 3 ή 4 ξεχωριστές ομογενοποιήσεις σε διαφορετικές ημέρες. Ο μέσος όρος ( $\pm$  τυπική απόκλιση) του ποσοστού της βασικής δραστηριότητας ήταν: Για τη hGDH1,  $33.85 \pm 5.13\%$  · για τη hGDH2,  $7.89 \pm 2.10\%$  · για την hGDH2-Ser443Arg,  $51.87 \pm 7.92\%$ . Η διαφορά μεταξύ hGDH1 και hGDH2-Ser443Arg βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική με τη δοκιμασία t του Student ( $p=0.02$ ).

Τέλος, όσον αφορά τη θερμοαντοχή της hGDH2-Ser443Arg, και εκεί η «αποκατάσταση» της Αργινίνης στη θέση 443 αυξάνει δραματικά τη θερμοαντοχή του ενζύμου. Παρατίθεται γράφημα που αναπαριστά το πείραμα θερμικής απενεργοποίησης αδρών εκχυλισμάτων των ενζύμων (4.23). Επιστήνουμε την προσοχή στο γεγονός ότι η μέθοδος εδώ διέφερε ελαφρά από αυτή που χρησιμοποιήσαμε σε κεκαθαρμένες πρωτεΐνες (βλ. κεφάλαιο μεθοδολογίας, 3.3.7), ως εκ τούτου οι χρόνοι που δίδονται εδώ δεν είναι άμεσα συγκρίσιμοι με αυτούς που είδαμε στις εικόνες 4.4, 4.13 και 4.18.



**Εικόνα 4.23:** Θερμική απενεργοποίηση αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και hGDH2-Ser443Arg. Το πείραμα εκτελέστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Οι υπολογισθέντες χρόνοι ημίσειας ζωής ήταν: για την hGDH1, 273 min· για την hGDH2, 46 min· για hGDH2-Ser443Arg, 292 min. Η μικρή διαφορά υπέρ της hGDH2-Ser443Arg σε σχέση με την hGDH1 δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αλλαγή Ser443Arg αποκαθιστά το χρόνο ημίσειας ζωής στα επίπεδα της hGDH1 - ίσως μάλιστα οριακά να τον αυξάνει ακόμη περισσότερο, ωστόσο στο πείραμά μας σε αδρά εκχυλίσματα η διαφορά αυτή δεν απέβη στατιστικά σημαντική. Τα ευρήματά μας στο σημείο αυτό συμφωνούν με αυτά των Yang και συν. (2004), που πρώτοι τεκμηρίωσαν την κομβική σημασία της Σερίνης 443 για τη θερμοευαισθησία της hGDH2.

#### **4.5. Οι ιδιότητες του τριπλού μεταλλάγματος hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και του τετραπλού μεταλλάγματος hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His**

Όπως είδαμε, με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε στα δύο προηγούμενα υποκεφάλαια, οι ιδιότητες της hGDH2 δεν ερμηνεύονται πλήρως από τις δύο κομβικής σημασίας αμινοξικές αλλαγές στις θέσεις 443 και 456, ενώ τουλάχιστον κάποιες από τις λοιπές αμινοξικές διαφορές ενισχύουν τη βασική δραστηριότητα, την αντίσταση στα οιστρογόνα και ενδεχομένως τη θερμοαντοχή του ενζύμου. Οι διαφορές ωστόσο, αυτές, ενδέχεται να έχουν επίδραση που δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί αν εξεταστούν ως ξεχωριστές μεταλλάξεις της hGDH1, η οποία ούτως ή άλλως έχει μεγάλη βασική δραστηριότητα, αντίσταση στα οιστρογόνα και θερμοαντοχή. Λόγου χάριν, η αλλαγή Gly456Ala, «προστιθέμενη» στην hGDH1-Arg443Ser φαίνεται να αυξάνει –λίγο μεν, αλλά σαφώς- τη βασική δραστηριότητα (βλ. υποκεφάλαιο 4.3), ενώ το μονό μετάλλαγμα hGDH1-Gly456Ala δεν παρουσίαζε σημαντική αύξηση της βασικής δραστηριότητας σε σχέση με τη hGDH1 (Ζαγανάς 2006). Γι' αυτό, άλλωστε, και είχαμε σκεφτεί ότι είναι καλύτερη στρατηγική να δοκιμάσουμε την επίδραση κάποιων μεταλλάξεων όχι πάνω στη hGDH1, αλλά πάνω στο διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala.

Καθώς οι μέχρι τώρα μεταλλάξεις με αποδεδειγμένα σημαντική επίδραση στις ιδιότητες αυτές ήταν στην αλλοστερική περιοχή του ενζύμου (δηλ. την κεραία και την περιστρεφόμενη έλικα), θεωρήσαμε ότι πρώτο βήμα είναι να κατασκευάσουμε ένα χιμαϊρικό ένζυμο που θα έχει την αλλοστερική περιοχή της hGDH2 (που άρα θα περιελάμβανε και τις αλλαγές Arg443Ser και Gly456Ala) συνδυασμένη με το «σώμα» (περιοχές πρόσδεσης NADPH και Γλουταμικού) της hGDH1. Αν αυτό το χιμαϊρικό ένζυμο δεν είχε σημαντικές διαφορές από το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, τότε οι υπεύθυνες αλλαγές θα έπρεπε να αναζητηθούν αλλού.

Επίσης, αναζητώντας στοιχεία για τις εμπλεκόμενες στη ρύθμιση της βασικής δραστηριότητας αμινοξικές αλλαγές, ανατρέξαμε σε παλαιά δεδομένα του εργαστηρίου. Εκεί, φάνηκε ότι το μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn, που είχε κατασκευαστεί από τον Ι. Ζαγανά και είχε μελετηθεί λειτουργικά σε μορφή αδρών εκχυλισμάτων από την προπτυχιακή φοιτήτρια Ε. Γιουρούκη και τον Β. Μαστοροδήμο, παρουσίαζε βασική δραστηριότητα αυξημένη σε σχέση με τη hGDH1 (περίπου 55% της μέγιστης), χωρίς όμως να εμφανίζει διαφορές στις λοιπές ιδιότητές

της, των κινητικών και αλλοστερικών ιδιοτήτων συμπεριλαμβανομένων (Ε. Γιουρούκη, Β. Μαστοροδήμος και Ι. Ζαγανάς, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Είπαμε, λοιπόν, ότι η προσθήκη της αλλαγής Ser174Asn στο διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala θα μας βοηθήσει να αποσαφηνίσουμε το βαθμό στον οποίο συνεισφέρει στη βασική δραστηριότητα της hGDH2, αλλά και να δούμε αν αυτή η επίδραση επηρεάζει και τις λοιπές ιδιότητες.

Για τους λόγους που περιγράψαμε παραπάνω, κατασκευάσαμε το χιμαιρικό ένζυμο, δηλ. το τετραπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His (το οποίο για λόγους συντομίας θα αναφέρουμε στο εξής και ως «χιμαιρική hGDH»), καθώς και το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala.

Τα σε πολλαπλά σημεία μεταλλαχθέντα *GLUD1*-cDNA συνετέθησαν και εκφράστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Μετά από προκαταρκτικές μελέτες σε αδρά εκχυλίσματα, αποφασίσαμε να καθαρίσουμε τα ως άνω ανασυνδυασμένα ένζυμα, με τον τρόπο που περιγράφεται στη μεθοδολογία, και να τα μελετήσουμε σε σύγκριση τόσο με το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala (από το οποίο διαφέρουν κατά ένα και κατά δύο αμινοξέα αντίστοιχα) όσο και με τη hGDH2, με σκοπό να δούμε αν τα ως άνω πολλαπλά μεταλλάγματα τελικώς αναπαράγουν τις ιδιότητές της. Και τα δύο αυτά «ένζυμα αναφοράς» επίσης επανεκφράστηκαν και καθαρίστηκαν. Περιγράφουμε παρακάτω τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκριτική μελέτη στα καθαρισμένα ένζυμα.

#### **4.5.1. Κινητικές ιδιότητες της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και της hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.**

Όσον αφορά τις κινητικές ιδιότητες των ενζύμων που μελετήσαμε εδώ, αυτές δεν διέφεραν αισθητά σε σχέση με τη hGDH2 και τη hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala για τη «χιμαιρική hGDH». Αντιθέτως, το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala εμφάνιζε πολύ αυξημένη  $K_m$  για το γλουταμικό οξύ, σημαντικά αυξημένη  $K_m$  για την αμμωνία και, οριακά αυξημένη  $K_m$  για το α-κετογλουταρικό. Παρατίθεται πίνακας με τις κινητικές παραμέτρους (Πίνακας 4.9).

	$V_{\max}$	$K_m$		
		$\alpha$ -κετογλ.	αμμωνία	L-γλουταμικό
	$\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}$	mM	mM	mM
<b>hGDH2</b>	146.9	1.15 $\pm$ 0.12	13.02 $\pm$ 2.54	15.39 $\pm$ 2.26
<b>hGDH1- R443S/G456A</b>	136.1	1.36 $\pm$ 0.21	12.47 $\pm$ 1.29	12.32 $\pm$ 1.83
<b>hGDH1- M415L/R443S/G456A/R470H</b>	101.6	1.08 $\pm$ 0.20	10.64 $\pm$ 1.77	10.74 $\pm$ 1.37
<b>hGDH1- S174N/R443S/G456A</b>	188.5	<b>1.79 <math>\pm</math> 0.22</b>	<b>20.43 <math>\pm</math> 2.04</b>	<b>97.01 <math>\pm</math> 26.16</b>

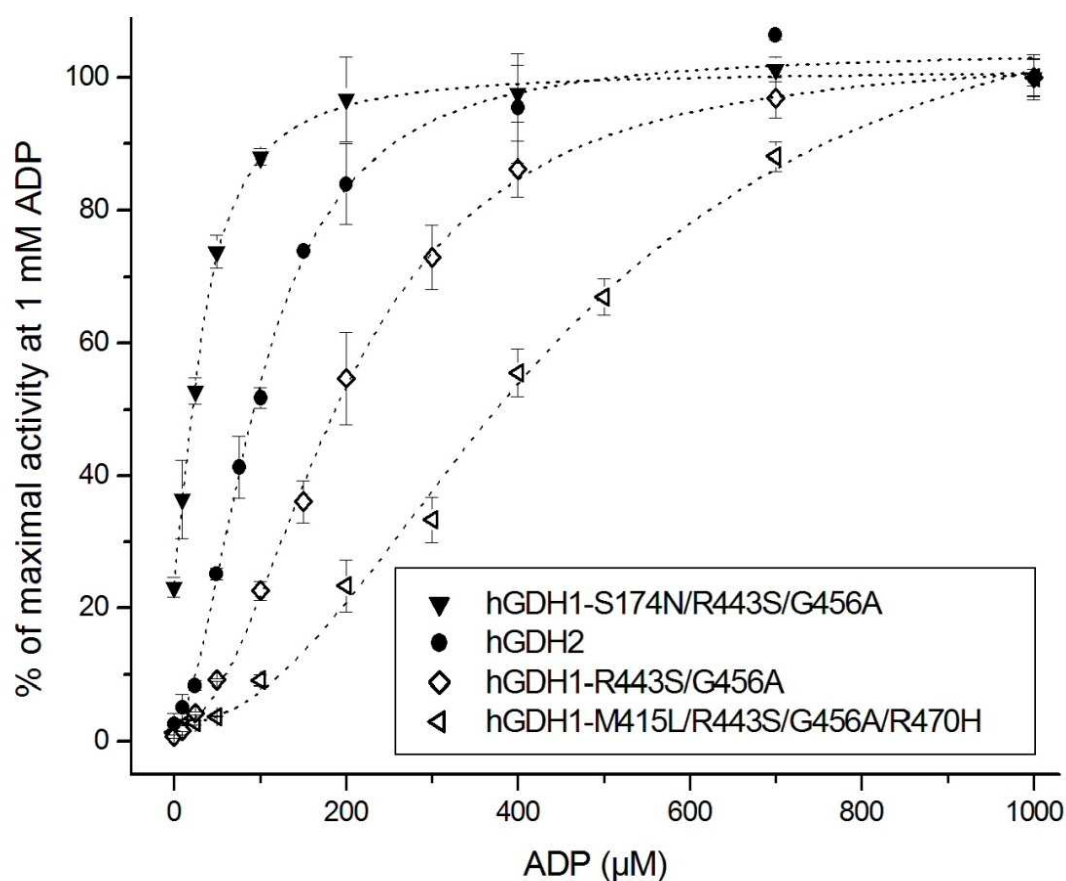
**Πιν. 4.9:** Η  $V_{\max}$  στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης καθώς και οι  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταμικό, την αμμωνία και το L-γλουταμικό σε καθαρισμένες hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala παρουσία 1 mM ADP. Οι  $K_m$  για την αμμωνία και το γλουταμικό της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala διέφεραν σημαντικά από αυτές των λοιπών ισοενζύμων ( $p < 0.05$ ). Η  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταμικό της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala διέφερε σημαντικά από αυτές των hGDH2 και , hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His ( $p \leq 0.05$ ), αλλά όχι από της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala.

Να σημειωθεί ότι η αυξημένη τιμή  $V_{\max}$  που βλέπουμε στον πίνακα 4.9 για την hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala δεν αντιπροσωπεύει απαραίτητα διαφορά στις κινητικές ιδιότητες, καθώς μπορεί να αντανάκλα μικρές διαφορές στους καθαρισμούς των ενζύμων (δηλ. αν το ίδιο ένζυμο σε δύο ξεχωριστούς καθαρισμούς της πρωτεΐνης προκύψει με διαφορετική καθαρότητα, η  $V_{\max}$  θα υπολογιστεί μεγαλύτερη για το «πιο καθαρό» ένζυμο). Αντίθετα, οι διαφορές στις  $K_m$  δύσκολα μπορούν να αποδοθούν σε συναφείς περιστάσεις. Δεν είναι πάντως εύρημα που πρέπει να μας εκπλήσσει, καθώς, σε αντίθεση με τις λοιπές αμινοξικές αλλαγές που έχουμε δει μέχρι τώρα, η αλλαγή Ser174Asn βρίσκεται στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, στην περιοχή της «εισόδου» της καταλυτικής σχισμής, επομένως θα μπορούσε να μεταβάλλει τη συγγένεια για το γλουταμικό και τα λοιπά υποστρώματα. Το γεγονός ότι η hGDH2, που φέρει την αλλαγή Ser174Asn, δεν έχει σημαντικές διαφορές από την hGDH1 στις κινητικές της ιδιότητες, ενδεχομένως σημαίνει ότι κάποια άλλη αμινοξική αλλαγή αντισταθμίζει αυτή την επίδραση της Ser174Asn.



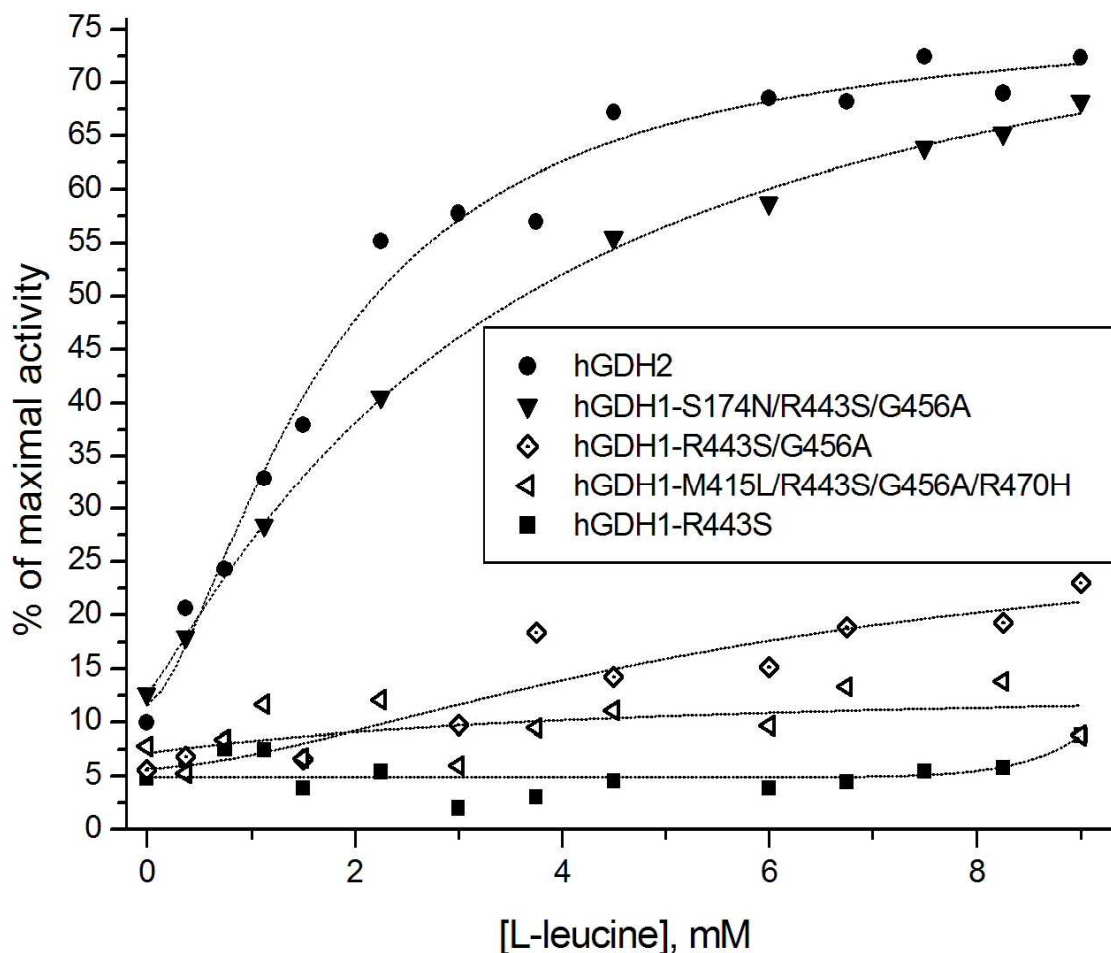
#### 4.5.2. Αλλοστερικές ιδιότητες της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και της hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.

Όσον αφορά την συμπεριφορά κατά την ενεργοποίηση από ADP, το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, που όπως βλέπουμε ξεκινά από μεγαλύτερη βασική δραστηριότητα σε απουσία ενεργοποιητή, φάνηκε να είναι πιο ευαίθητο στην ενεργοποίηση, όχι μόνο σε σχέση με την hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, αλλά και συγκρινόμενο με την hGDH2. Αντιθέτως, η hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His παρουσίαζε πολύ μεγαλύτερη  $SC_{50}$ , προσεγγίζοντας αυτήν που είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.3 για την hGDH1-Arg443Ser (εικόνα 4.24)



**Εικόνα 4.24:** Ενεργοποίηση από ADP των καθαρισμένων hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His καθώς και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala. Οι  $SC_{50}$  που υπολογίστηκαν ήταν: για την hGDH2,  $98.9 \pm 4.2 \mu\text{M}$ · για τη hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala,  $198.4 \pm 5.6 \mu\text{M}$ · για την hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His,  $453.1 \pm 35.1 \mu\text{M}$ · και για το τριπλούν μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala,  $33.6 \pm 3.6 \mu\text{M}$ .

Κατά την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, τα μεταλλάγματα αυτά έδωσαν κάποια πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα: Όπως έχουμε αναφέρει και στο υποκεφάλαιο 4.3, η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala είναι, όπως και η hGDH1-Arg443Ser, ανθεκτική στην επίδραση της λευκίνης. Αυτό φάνηκε να ισχύει ομοίως και για την «χιμαιρική» hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His. Αντιθέτως, η hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala φάνηκε να ενεργοποιείται ισχυρά και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις L-λευκίνης, πράγμα που σημαίνει ότι πιθανότατα η αμινοξική αλλαγή Ser174Asn ενέχεται σε αυτή τη λειτουργία. Δεν θα επεκταθούμε περαιτέρω στο θέμα αυτό, που απετέλεσε αντικείμενο μελέτης της Ι. Αριάνογλου, και θα αρκεστούμε στην παράθεση ενδεικτικού των όσων συνοπτικά περιγράψουμε γραφήματος από τη διπλωματική της εργασία (Αριάνογλου 2011).



**Εικόνα 4.25:** Ενεργοποίηση από L-λευκίνη hGDH2, hGDH1-Arg443Ser, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, απουσία ADP. Οι μελέτες ενεργοποίησης έγιναν παράλληλα, σε αδρά εκχυλίσματα των ενζύμων αυτών. (Ελαφρά τροποποιημένο από Αριάνογλου, 2011).

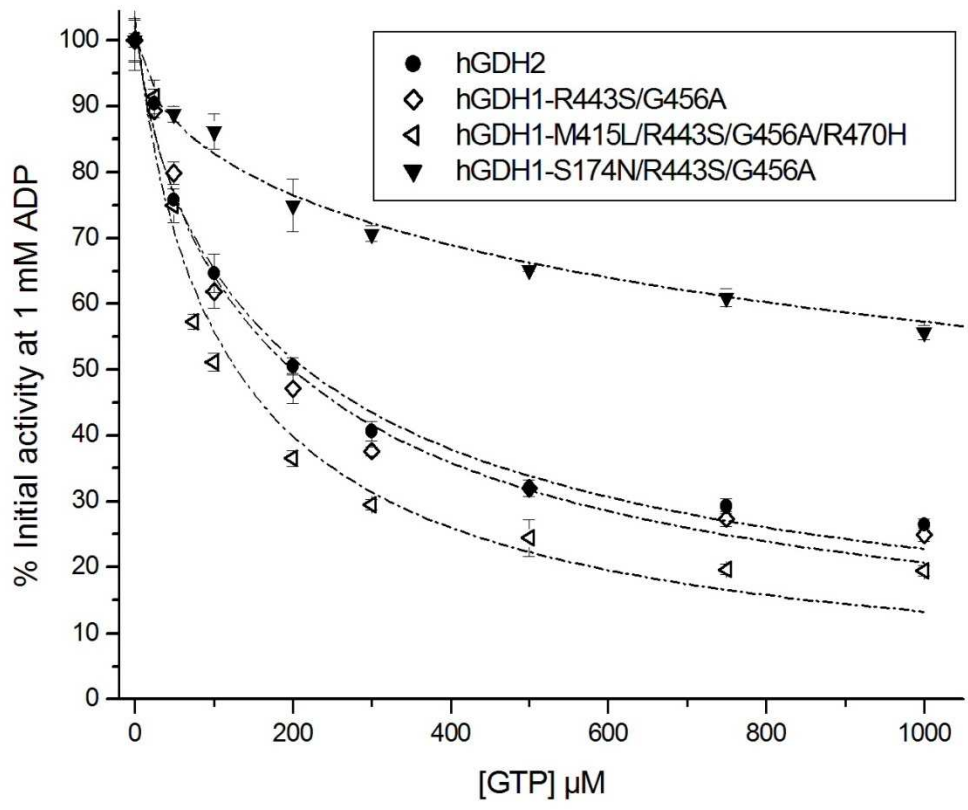
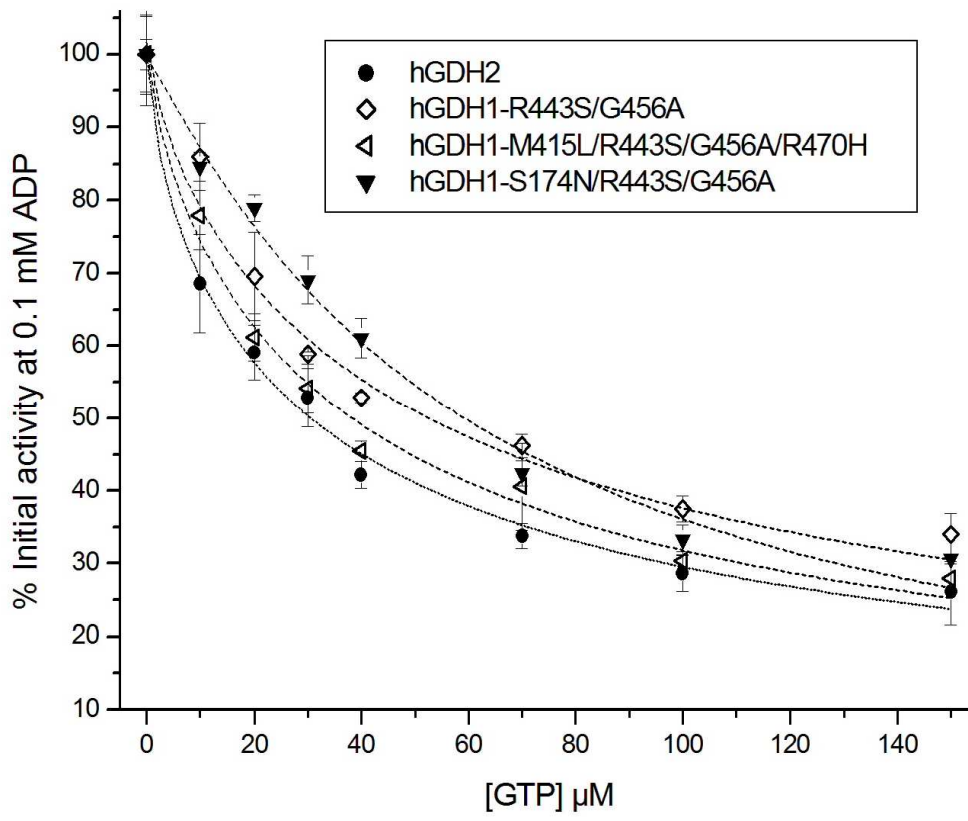
Γενικώς, και τα 4 ισοένζυμα που μελετήσαμε παράλληλα (hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala) ήταν ανθεκτικά στην αναστολή από GTP, πράγμα αναμενόμενο, καθώς όλα φέρουν την αλλαγή Gly456Ala. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 4.10, σε παρουσία 0.1 mM ADP όλα τα ένζυμα αυτά είχαν παραπλήσια IC<sub>50</sub> για το GTP (εικ. 4.26). Εντύπωση προκάλεσε το ότι το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala είναι πολύ πιο ανθεκτικό από τις λοιπές hGDH σε παρουσία 1 mM ADP (εικ 4.26), κάτι που μάλλον σχετίζεται κυρίως με την ευαισθησία του στην ευοδωτική επίδραση του ADP και λιγότερο με μειωμένη συνάφεια για το GTP. Επίσης, σε απουσία ADP, τα τρία ελεγχθέντα ισοένζυμα (η hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθεί στη συνθήκη αυτή λόγω πολύ χαμηλής βασικής δραστηριότητας απουσία ADP, όπως θα δούμε παρακάτω) παρουσιάζουν υψηλότερες IC<sub>50</sub> απ' ότι σε 0.1 mM ADP. Το φαινόμενο, που εν μέρει ίσως σχετίζεται και με τις αυξημένες ποσότητες ενζύμου που πρέπει να χρησιμοποιηθούν απουσία ADP, το είχαμε δει και προηγουμένως (πρβλ. και πίνακα 4.8)

<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>				
	<b>hGDH2</b>	<b>hGDH1-R443S/G456A</b>	<b>hGDH1-M415L/R443S/G456A/R470H</b>	<b>hGDH1-S174N/R443S/G456A</b>
No ADP	59.40 ±7.72	343.3 ±24.0	--	382.3 ±50.5
0.1 mM ADP	30.48 ±2.64	50.29 ±9.54	37.53 ±3.86	59.51 ±4.97
1 mM ADP	207.16 ±22.94	189.82 ±23.89	119.27 ±20.08	1657.3 ±164.9

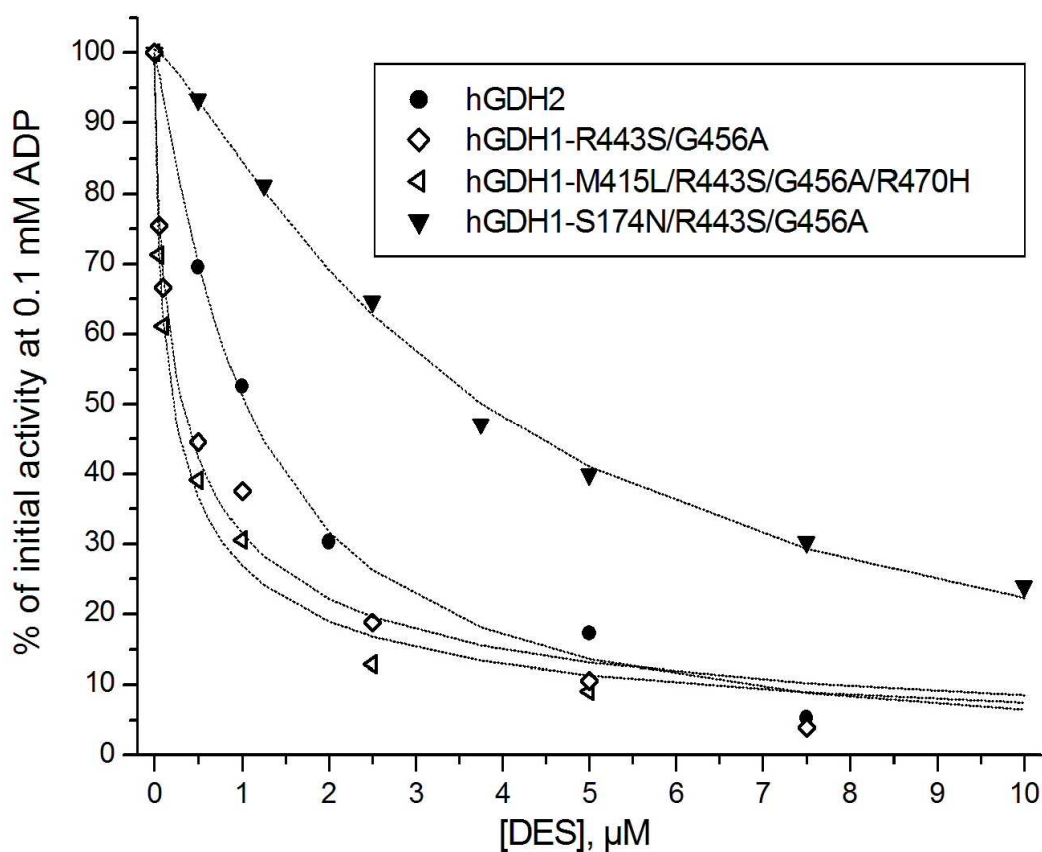
<b>Hill Coefficient</b>				
	<b>hGDH2</b>	<b>hGDH1-R443S/G456A</b>	<b>hGDH1-M415L/R443S/G456A/R470H</b>	<b>hGDH1-S174N/R443S/G456A</b>
No ADP	0.732 ±0.090	0.624 ±0.035	--	0.741 ±0.089
0.1 mM ADP	0.774 ±0.051	0.774 ±0.125	0.788 ±0.067	1.091 ±0.097
1 mM ADP	0.792 ±0.060	0.825 ±0.072	0.903 ±0.104	0.543 ±0.039

**Πιν. 4.10:** Αναστολή hGDH2, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala από GTP. Σε απουσία ADP δεν ήταν δυνατή, λόγω μηδαμινής βασικής δραστηριότητας, η εκτέλεση δοκιμασίας αναστολής της hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.



**Εικ. 4.26:** Αναστολή hGDH2, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala από GTP, παρουσία 0.1 mM ADP (άνω) και 1 mM ADP (κάτω). Οι τιμές της  $IC_{50}$  και του συντελεστή Hill για τις καμπύλες αναστολής δίδονται στον πίνακα 4.10.

Ως προς την αναστολή των ενζύμων αυτών από οιστρογόνα, φάνηκε και εδώ το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala να είναι σημαντικά ανθεκτικότερο από τη hGDH2, ενώ το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, καθώς και το χμιαϊκό ένζυμο hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His ήταν πιο ευαίσθητα από τη hGDH2 στην επίδραση των οιστρογόνων. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε συνεργασία με το Ν. Μπορομπόκα. Παρατίθεται (εικ. 4.27) ενδεικτικό γράφημα αναστολής των τεσσάρων ενζύμων από διαθυλστιλβεστρόλη (DES) παρουσία 0.1 mM ADP.



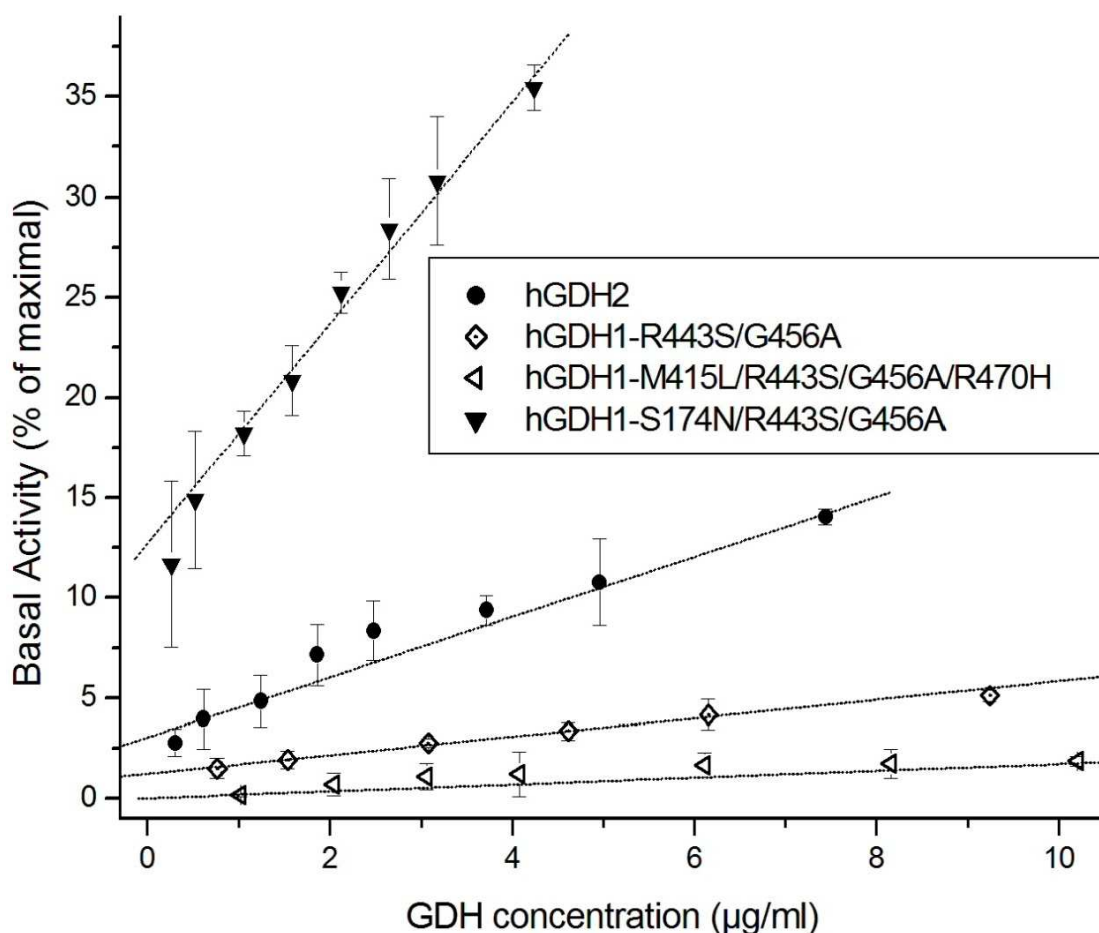
**Εικ. 4.27:** Αναστολή hGDH2, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala από διαθυλστιλβεστρόλη (DES), παρουσία 0.1  $\mu\text{M}$  ADP. Οι τιμές της  $IC_{50}$  για τις καμπύλες αναστολής ήταν: για την hGDH2,  $1.05 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ; για τη hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala,  $0.24 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ; για την hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His,  $0.22 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ; και για το τριπλούν μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala,  $3.73 \pm 0.16 \mu\text{M}$ .

#### **4.5.3. Βασική δραστηριότητα της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και της hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.**

Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα των μεταλλαγμάτων που μελετήσαμε εδώ, τα πειράματά μας έδειξαν ότι, εκτός από την hGDH2 και την διπλά μεταλλαγμένη hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala (που είχαμε ήδη μελετήσει στην παρ. 4.3, βλ. και εικ. 4.17), και τα δύο νέα πολλαπλά μεταλλάγματα, δηλ. η hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και το χμιαρικό ένζυμο hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, είχαν βασική δραστηριότητα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του ενζύμου, με την οποία διατηρούσε γραμμική σχέση σε συγκεντρώσεις κυμαινόμενες από ~0.5 έως και ~7-10  $\mu\text{g/ml}$  (εικ. 4.28). Η βασική δραστηριότητα του διπλού μεταλλάγματος hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala ήταν, όπως είχαμε δει άλλωστε και προηγουμένως, χαμηλότερη της hGDH2, ενώ αυτή του χμιαρικού hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His φάνηκε να είναι ακόμη χαμηλότερη και από αυτή της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala.

Συγκεκριμένα, με βάση τις μετρήσεις μας, σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$  καθαρισμένου ενζύμου και σε θερμοκρασία 25°C, η βασική δραστηριότητα της hGDH2 υπολογίστηκε στα 4.54% της μέγιστης δραστηριότητός της (δηλαδή της δραστηριότητας που θα είχε η ίδια ποσότητα του συγκεκριμένου ενζύμου σε παρουσία 1 mM ADP), της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala στο 1.69% της μέγιστης, ενώ της χμιαρικής hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His στο 0.19% της μέγιστης.

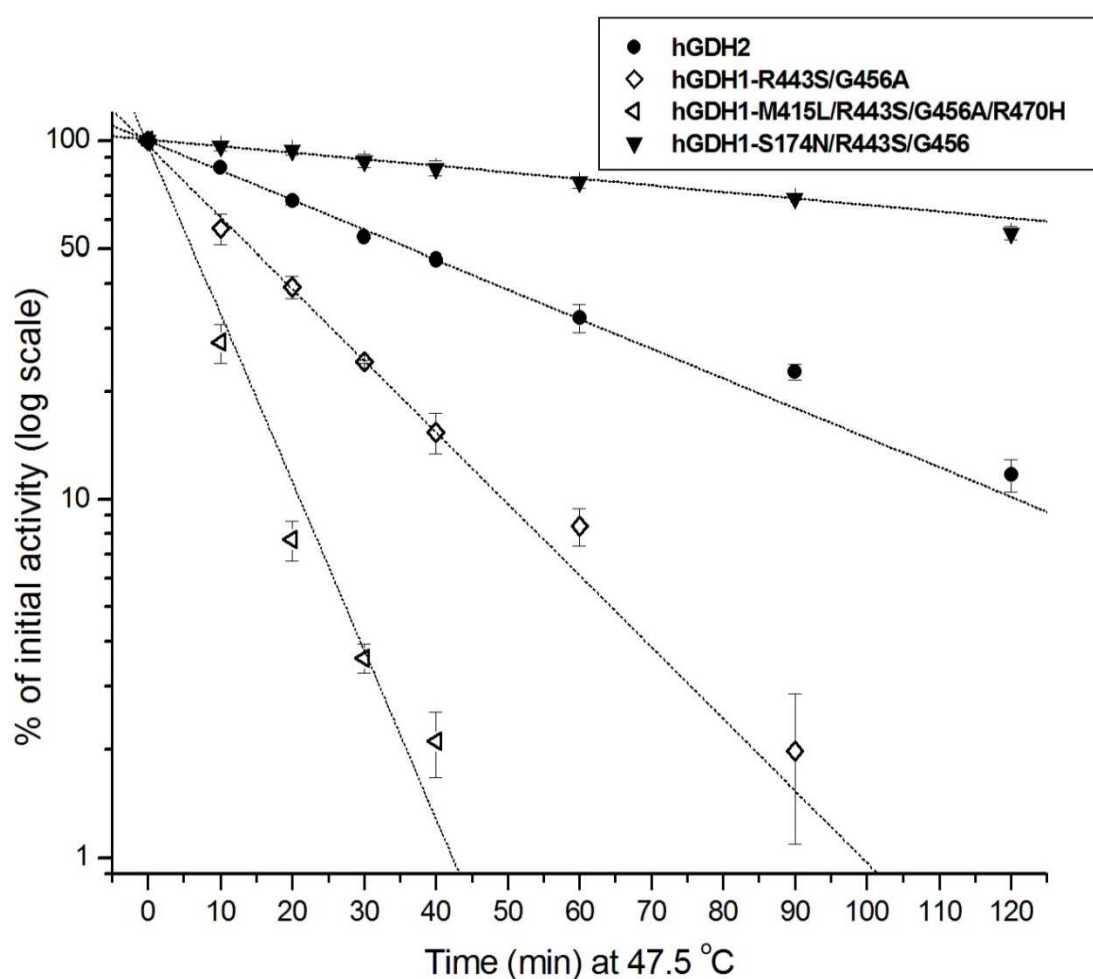
Εντυπωσιακά υψηλή μετρήθηκε η βασική δραστηριότητα του τριπλού μεταλλάγματος hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala σε σχέση με όλα τα άλλα ένζυμα που μελετήθηκαν εδώ, η οποία σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$  υπολογίστηκε σε 18.19% της μέγιστης. Καθώς, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.28, η μεταβολή της βασικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ενζύμου ακολουθούσε ταχύτερο ρυθμό στη hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, σε συγκεντρώσεις ~5  $\mu\text{g/ml}$  η βασική δραστηριότητα προσέγγιζε τα ~35% της μέγιστης, έφτανε δηλαδή αυτή της hGDH1 αγρίου τύπου. Αξίζει να τονίσουμε εδώ ξανά ότι η διαφορά αυτή φαίνεται να είναι αποτέλεσμα μίας και μόνο αμινοξικής αλλαγής, δηλ. της αλλαγής Ser174Asn, που, προστιθέμενη στο διπλό μετάλλαγμα Arg443Ser/Gly456Ala είναι ικανή να εικοσαπλασιάσει τη βασική δραστηριότητα.



**Εικόνα 4.28:** Η συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση. Στο γράφημα η βασική δραστηριότητα δίδεται ως ποσοστό επί της μέγιστης. Σε απόλυτες τιμές ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας, ο ρυθμός μεταβολής της βασικής ειδικής δραστηριότητας της διπλά μεταλλαγμένης hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, όπως υπολογίστηκε από τη γραμμική συσχέτιση, ήταν  $0.624 \pm 0.033 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  για κάθε  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσης του ενζύμου ( $R=0.9930$ ,  $p<0.0001$ ). Για την hGDH2 υπολογίστηκε  $2.202 \pm 0.115 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ανά  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου ( $R=0.9919$ ,  $p<0.0001$ ). Για τη χμαιρική hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, ο ρυθμός μεταβολής ήταν  $0.174 \pm 0.011 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ανά  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου ( $R=0.9879$ ,  $p<0.0001$ ), ενώ για την hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala ήταν ήταν  $10.370 \pm 0.047 \mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ανά  $\mu\text{g}$  αύξησης της συγκέντρωσής του ενζύμου ( $R=0.9938$ ,  $p<0.0001$ ). Το πείραμα έγινε σε θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$  σε διάλυμα TRA.

#### 4.5.4. Θερμοαντοχή της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και της hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.

Σχετικά με τη θερμοαντοχή των ενζύμων που μελετήσαμε στη φάση αυτή, θα αρκεστούμε να πούμε, έχοντας πλέον υπ' όψιν μας τα δεδομένα που παρουσιάσαμε στα υποκεφάλαια 4.1.2-4.1.5., 4.2.2.-4.2.3, 4.3. και 4.4, τα οποία δείχνουν ότι τα ένζυμα με υψηλή βασική δραστηριότητα παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοαντοχή, πως και τα τέσσερα ένζυμα που μελετήσαμε εδώ εν παραλλήλω συμπεριφέρθηκαν κατά το πρότυπο αυτό (εικ. 4.29).



**Εικόνα 4.29:** Θερμική απενεργοποίηση στους 47.5°C καθαρικών hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala. Το πείραμα έγινε όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία.

Έτσι, η hGDH2 παρουσίαζε χρόνο ημίσειας ζωής 36.4 λεπτά της ώρας, και η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala 14.4 λεπτά, τιμές που είναι παρόμοιες με αυτές που είδαμε σε προηγούμενα πειράματα με τα συγκεκριμένα ένζυμα (βλ. παρ. 4.3, εικόνα



4.18). Το χμιαϊκό hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His παρουσίασε χρόνο ημίσειας ζωής μόλις 6.2 λεπτών, ενώ η hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, αντιθέτως, είχε χρόνο ημίσειας ζωής 166.3 λεπτά, προσεγγίζοντας τη θερμοαντοχή της hGDH1 που είδαμε σε προηγούμενα πειράματα.

Κλείνουμε το υποκεφάλαιο αυτό, συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που περιέχει ως εξής: η αντικατάσταση ολόκληρης της αλλοστερικής περιοχής (δηλ. της αντένας και της περιστρεφόμενης έλικας) της hGDH1 από αυτήν της hGDH2 φαίνεται ότι δεν μας δίνει ουσιωδώς διαφορετικές ιδιότητες απ' ότι η διπλή μετάλλαξη Arg443Ser/Gly456Ala. Για την ακρίβεια, μας δίνει ένα ένζυμο που μάλλον υπολείπεται ελαφρά της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala σε βασική δραστηριότητα, θερμοαντοχή και αντοχή στην οιστρογονική αναστολή.

Αντιθέτως, η προσθήκη της αλλαγής Ser174Asn στο μόριο της διπλά μεταλλαγμένης hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala προσδίδει στο ένζυμο πολύ υψηλότερη βασική δραστηριότητα, θερμοαντοχή και αντοχή στα οιστρογόνα, κάνοντας το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala να υπερέχει ακόμη και της hGDH2 στις ιδιότητες αυτές, ενώ παράλληλα κάνει το ένζυμο ευαίσθητο στην ενεργοποιητική δράση της λευκίνης, προσδίδοντας στην hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala ευαισθησία στην λευκίνη ανάλογη με αυτή της hGDH2.

#### **4.6. Βασική δραστηριότητα, θερμοαντοχή και αλλοστερικές ιδιότητες των μεταλλαγμάτων Glu441Arg, Ser445Leu, Ser448Pro, Lys450Glu και His454Tyr της hGDH2**

Μια ακόμη προσπάθεια να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχεται η βασική δραστηριότητα και οι λοιπές ιδιότητες της hGDH2 και κατ' επέκτασιν τους πιθανούς μηχανισμούς για την –διαφαινόμενη από τα δεδομένα επί της παρουσίας του πολυμορφισμού Ser445Ala σε πληθυσμούς παρκινσονικών- εμπλοκή της στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, καταβάλλαμε με την παραγωγή και τη μελέτη των μεταλλαγμάτων hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser446Arg, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr. Από της μεταλλάξεις, οι Glu441Arg και Ser445Leu βρίσκονται στο κατιόν σκέλος της αντένας, η Ser448Pro βρίσκεται ακριβώς στη μετάβαση μεταξύ αντένας και περιστρεφόμενης έλικος, ενώ οι hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr βρίσκονται επί

Υπενθυμίζουμε ότι, όπως προαναφέραμε και στα κεφάλαια της εισαγωγής και της μεθοδολογίας, πρόκειται για αμινοξικές αλλαγές που έχουν βρεθεί στο μόριο της hGDH1 σε ασθενείς με σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας, οι οποίες προκαλούν αυξημένη δραστηριότητα της hGDH1, κυρίως λόγω μειωμένης ευαισθησίας στην αναστολή από GTP, αλλά σε κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις, και λόγω αυξημένης βασικής δραστηριότητας.

Οφείλουμε να αναφέρουμε στο σημείο αυτό ότι, ενώ ο σχεδιασμός, η κατασκευή και έκφραση των μεταλλαγμάτων αυτών έγινε εξ' ολοκλήρου από τον γράφοντα, καθώς άλλωστε και ένα μεγάλο μέρος των λειτουργικών μελετών, μερικά από τα πειράματα αλλοστερικής ενεργοποίησης και αναστολής εκτελέστηκαν από τον Ν. Μπορομπόκα, με τη βοήθεια του Ι. Ζαγανά και του τότε προπτυχιακού φοιτητή Α. Σταγκουράκη. Καθώς κάποια από τα δεδομένα αυτά άπτονται και του θέματος τη διατριβής του Ν. Μπορομπόκα και έχουν ήδη παρουσιαστεί εκεί, όπου τα παρουσιάζουμε εκ νέου, το κάνουμε υπό τη μορφή αναδημοσίευσης από τη σχετική δημοσιευμένη εργασία μας (Kapanouras et al. 2009).

Να σημειωθεί, τέλος, ότι τα μεταλλάγματα αυτά μελετήθηκαν παράλληλα, ομού μετα των hGDH1 και hGDH2 αγρίου τύπου, όχι όμως σε καθαρισμένη μορφή, αλλά σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Αυτό δημιουργεί μερικούς περιορισμούς, όπως αναλύσαμε και στο υποκεφάλαιο 4.4. για το μετάλλαγμα hGDH2-Ser445Arg.

#### 4.6.1. Βασική δραστηριότητα των μεταλλαγμάτων hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr

Υπενθυμίζουμε εδώ ότι, σε αδρά εκχυλίσματα, η εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση του ενζύμου, που μελετήσαμε σε καθαρισμένα ένζυμα, δεν είναι δυνατό να μελετηθεί, καθώς το αδρό εκχύλισμα περιέχει τόσο αδιάλυτα στοιχεία του ομογενοποιημένου, που σε αυξημένες ποσότητες θολώνουν το διάλυμα της αντίδρασης, όσο και ουσίες που τροποποιούν την ένζυμική δραστηριότητα (π.χ. λευκίνη, νουκλεοτίδια, κ.α.) σε άγνωστες ποσότητες, η επίδραση των οποίων, σε μή σταθερές συγκεντρώσεις, αλλοιώνει το αποτέλεσμα. Έτσι, η βασική δραστηριότητα ελέγχθηκε σε σταθερές ποσότητες εκχυλίσματος που έδιναν ρυθμό μεταβολής της απορρόφησης  $\sim 0.15 \text{ dA}_{340\text{nm}}/\text{min}$  στο φασματοφωτόμετρο παρουσία 1 mM ADP, και που περιείχαν  $\sim 40\text{-}70 \text{ }\mu\text{g/ml}$  ολικής πρωτεΐνης, με μέγιστη ειδική ένζυμική δραστηριότητα περίπου  $1\text{-}1.5 \text{ }\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

Η βασική δραστηριότητα των μεταλλαγμάτων που μελετήσαμε με τον τρόπο αυτό, δίδεται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 4.11).

	<b>Basal Activity (perc. of maximal, <math>\pm</math>S.D.)</b>
<b>wt-hGDH1</b>	36.76 $\pm$ 4.63 %
<b>wt-hGDH2</b>	7.90 $\pm$ 2.10 %
<b>hGDH2-Gln441Arg</b>	17.94 $\pm$ 5.19 %
<b>hGDH2-Ser445Leu</b>	18.97 $\pm$ 4.79 %
<b>hGDH2-Ser448Pro</b>	2.83 $\pm$ 1.33 %
<b>hGDH2- Lys450Glu</b>	1.69 $\pm$ 0.20 %
<b>hGDH2- His454Tyr</b>	2.62 $\pm$ 0.57 %

**Πίνακας 4.11:** Βασική δραστηριότητα σταθερών ποσοτήτων (βλ. κείμενο) αδρών κυτταρικών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2, hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr στους 25°C, εκπεφρασμένη ως ποσοστό επί της μέγιστης που μετράται παρουσία 1 mM ADP. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο επτά έως έντεκα προσδιορισμών της βασικής δραστηριότητας, ακολουθούμενη από την τυπική απόκλιση. Σημειώνεται ότι η βασική δραστηριότητα όλων των μεταλλαγμάτων της hGDH2, όπως φυσικά και αυτή της hGDH1, διέφερε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0.05$ ) από αυτή της αγρίου τύπου hGDH2.

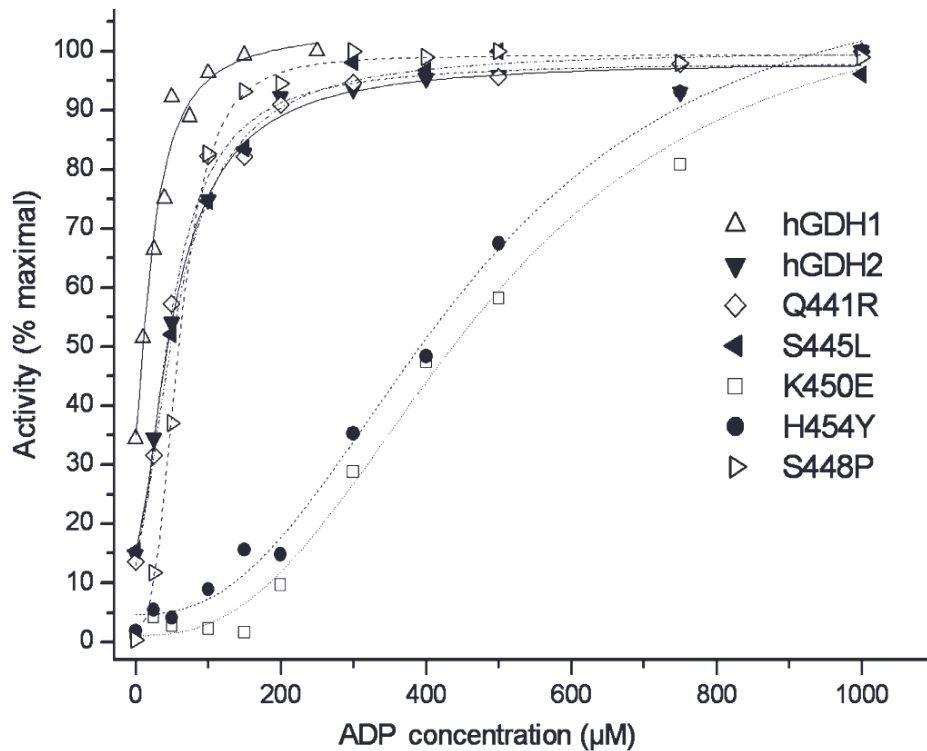
Μια σύντομη ματιά στα αποτελέσματα αυτά δείχνει ότι οι μεταλλάξεις στο κατιόν σκέλος της αντέννας φαίνεται να αυξάνουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, ενώ οι μεταλλάξεις στην περιστρεφόμενη έλικα, καθώς και η μετάλλαξη στο όριο μεταξύ των δύο περιοχών φαίνεται να τη μειώνουν αισθητά.

#### 4.6.2. Αλλοστερικές ιδιότητες των μεταλλαγμάτων hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr

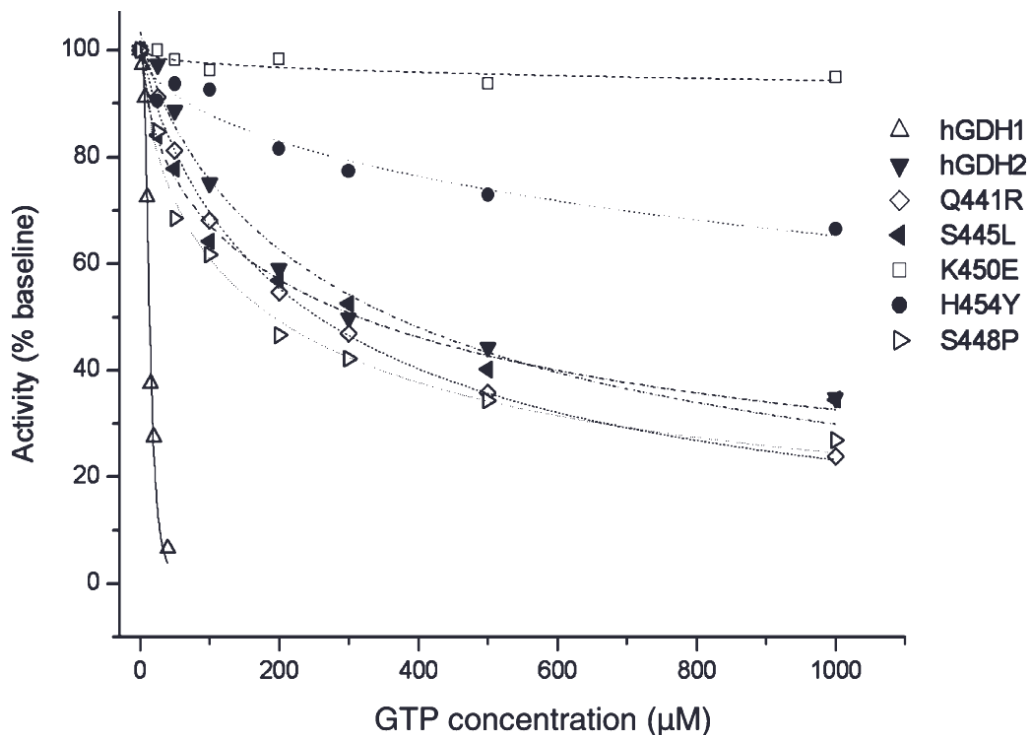
Θα αναφερθούμε συνοπτικά μόνο στο θέμα της αλλοστερικής ενεργοποίησης από ADP και αναστολής από GTP. Οι σχετικές καμπύλες ενεργοποίησης και αναστολής φαίνονται στα σχήματα 4.30 και 4.31 αντίστοιχα, ενώ οι τιμές  $SC_{50}$  για την ενεργοποίηση από ADP καθώς και οι τιμές της  $IC_{50}$  και του συντελεστή Hill για την αναστολή από GTP φαίνονται στον πίνακα 4.12. Εμφανές είναι ότι οι μεταλλάξεις στην περιοχή της αντέννας δεν προσδίδουν επιπλέον αντοχή στην αναστολή από GTP στη hGDH2 –κάτι που, όπως είδαμε στη εισαγωγή, επιφέρουν οι ίδιες μεταλλάξεις στο μόριο της hGDH1. Αντίθετα, οι δύο μεταλλάξεις στην περιστρεφόμενη έλικα κάνουν το μόριο πολύ πιο ανθεκτικό, ακόμη και σε πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Ταυτόχρονα, οι ίδιες μεταλλάξεις, που όπως είδαμε μειώνουν σημαντικά και τη βασική δραστηριότητα, κάνουν το ένζυμο ανθεκτικό και στην ευοδωτική επίδραση του ADP.

	GTP Inhibition		ADP activation
	GTP $IC_{50}$ ( $\mu$ M)	Hill coefficient	ADP $SC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>hGDH1</b>	12.23 $\pm$ 0.54	2.51 $\pm$ 0.14	24.29 $\pm$ 4.4
<b>hGDH2</b>	262.76 $\pm$ 77.02	0.716 $\pm$ 0.13	53.68 $\pm$ 5.4
<b>Gln441Arg</b>	227.39 $\pm$ 33.4	0.874 $\pm$ 0.08	72.06 $\pm$ 6.9
<b>Ser445Leu</b>	317.65 $\pm$ 39.71	0.603 $\pm$ 0.05	58.07 $\pm$ 4.9
<b>Ser448Pro</b>	186.81 $\pm$ 23.14	0.615 $\pm$ 0.04	62.02 $\pm$ 3.3
<b>Lys450Glu</b>	1.8x10 <sup>5</sup> $\pm$ 1.2x10 <sup>6</sup> *	0.432 $\pm$ 0.34	458.37 $\pm$ 47.0*
<b>His454Tyr</b>	2921.40 $\pm$ 965.3*	0.490 $\pm$ 0.02	468.59 $\pm$ 57.1*

**Πίνακας 4.12:** Αναστολή από GTP (σε παρουσία 1 mM ADP) και ενεργοποίηση από ADP των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και των μεταλλαγμάτων της hGDH2. Οι παράμετροι ακολουθούνται από το τυπικό σφάλμα. Τα δεδομένα για τη hGDH1 προέρχονται από παλαιότερα δεδομένα του εργαστηρίου (Zaganas και Plaitakis, 2002). Ο αστερίσκος (\*) αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.01$ ) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή της hGDH2. Ο πίνακας αναδημοσιεύεται αυτούσιος από το Kanavouras et al. (2009).

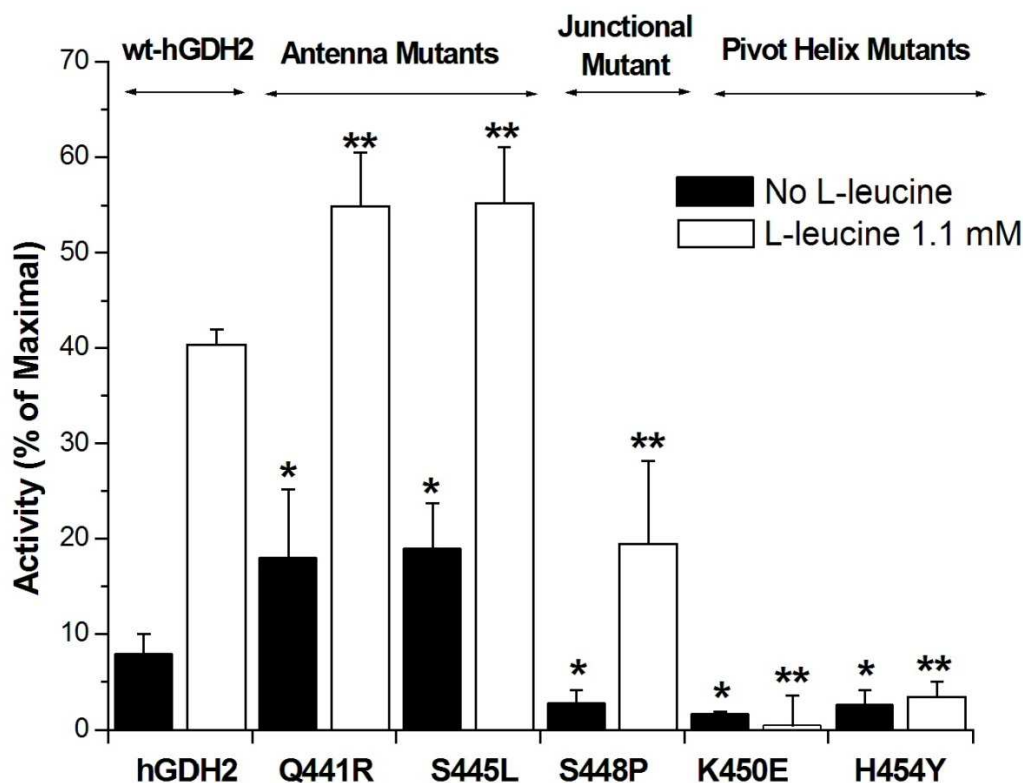


**Εικόνα 4.30.** Ενεργοποίηση από ADP αδρών εκχυλισμάτων αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 καθώς και των μεταλλαγμάτων της hGDH2. Τα σημεία στις καμπύλες αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον δύο πειραματικών προσδιορισμών. Το γράφημα αναδημοσιεύεται αυτούσιο από το Kanavouras et al. (2009).



**Εικόνα 4.31.** Αναστολή από GTP, σε παρουσία 1 mM ADP, αδρών εκχυλισμάτων αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 καθώς και των μεταλλαγμάτων της hGDH2. Τα σημεία στις καμπύλες αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον δύο πειραματικών προσδιορισμών. Το γράφημα αναδημοσιεύεται αυτούσιο από το Kanavouras et al. (2009).

Όσον αφορά την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, τα πειράματα έδειξαν ότι εκείνα τα μεταλλάγματα της hGDH2, τα οποία έχουν πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα, επιδεικνύουν και μικρή έως αμελητέα ενεργοποίηση με την επίδραση της λευκίνης. Αντίθετα, τα δύο μεταλλάγματα με αυξημένη βασική δραστηριότητα, ήταν πιο ευαίσθητα στην επίδραση της L-λευκίνης. Αναδημοσιεύουμε ενδεικτικό των πειραμάτων αυτών γράφημα (εικ. 4.32).



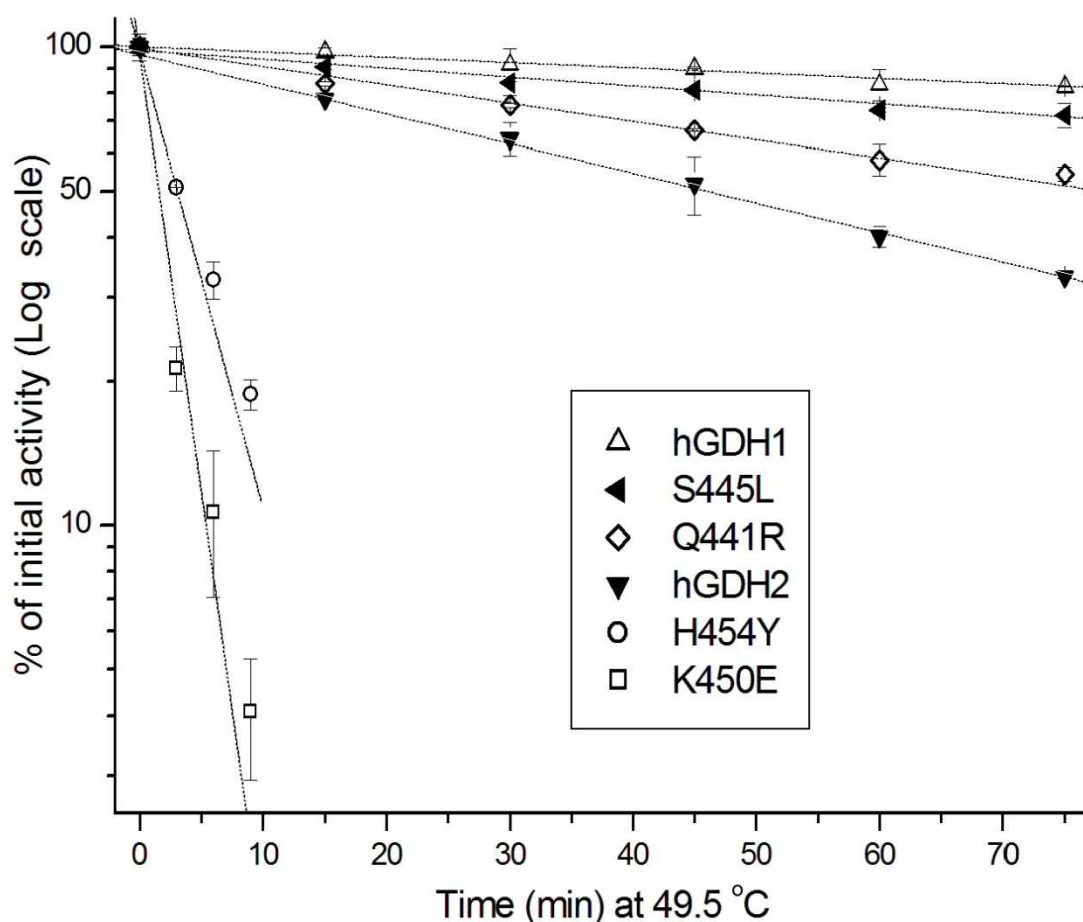
**Εικόνα 4.32.** Βασική δραστηριότητα της αγρίου τύπου hGDH2 και των μεταλλαγμάτων της και δραστηριότητα με την επίδραση της L-λευκίνης. Το γράφημα αναδημοσιεύεται από το Kapanouras et al. (2009). Η δραστηριότητα αδρών εκχυλισμάτων των ενζύμων μετρήθηκε σε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών και με παρουσία σταθερής συγκέντρωσης L-λευκίνης (1.1 mM), σε απουσία ADP. Τόσο η βασική δραστηριότητα των ενζύμων, όσο και η δραστηριότητά τους παρουσία L-λευκίνης δίνονται στο γράφημα ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας, η οποία μετρήθηκε για έκαστο ένζυμο παρουσία 1 mM ADP. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο τουλάχιστον πέντε διαφορετικών πειραματικών προσδιορισμών, ενώ οι λεπτές μπάρες αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα.

\* :  $p < 0.05$  για την σύγκριση της βασικής δραστηριότητας σε απουσία ενεργοποιητών των μεταλλαγμάτων με αυτήν της αγρίου τύπου hGDH2.

\*\* :  $p < 0.05$  για την σύγκριση της δραστηριότητας των μεταλλαγμάτων παρουσία 1.1 mM L-λευκίνης, με αυτήν της αγρίου τύπου hGDH2 στην ίδια συνθήκη.

#### 4.6.3. Θερμοαντοχή των μεταλλαγμάτων hGDH2-Gln441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr

Θα ολοκληρώσουμε την αναφορά στις λειτουργικές μελέτες των μεταλλαγμάτων αυτών της hGDH2 με τη μελέτη θερμοαντοχής τους. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα μας, τα δύο μεταλλάγματα στο κατίον σκέλος της αντένας, που, όπως έχουμε δει προηγουμένως, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη της hGDH2 βασική δραστηριότητα, επέδειξαν και αυξημένη αντοχή στη θερμική αποδιάταξη. Αντιθέτως, οι δύο αμινοξικές αλλαγές στην περιστρεφόμενη έλικα (Lys450Glu και His454Tyr), οι οποίες μειώνουν της βασική δραστηριότητα του ενζύμου, εκμηδενίζουν σχεδόν και τη θερμοαντοχή του. Τα σχετικά δεδομένα παρουσιάζονται στο στην εικόνα 4.33.



**Εικόνα 4.33:** Θερμική απενεργοποίηση αδρών εκχυλισμάτων hGDH1 και hGDH2 αγρίου τύπου, καθώς και των μεταλλαγμάτων της hGDH2. Το πείραμα έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε  $\geq 3$  πειραματικούς προσδιορισμούς. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής που υπολογίστηκαν ήταν: για την hGDH1, 274 min· για την hGDH2, 45 min· για την hGDH2-Ser445Leu, 158 min. · για την hGDH2- Gln441Arg, 78 min. · για την hGDH2-His454Tyr, 3.1 min. · για την hGDH2- Lys450Glu, 1.5min.

Ο προσεκτικός αναγνώστης θα παρατηρήσει ότι δεν απεικονίζονται δεδομένα για το μετάλλαγμα hGDH2-Ser448Pro. Αυτό συμβαίνει διότι ο επανειλημμένος έλεγχος έδωσε λίαν αντικρουόμενα αποτελέσματα, που πολύ αργότερα (όταν δυστυχώς δεν ήταν πλέον τεχνικά εφικτός ο ταυτόχρονος επανέλεγχος όλων των ενζύμων, που αποτελεί προϋπόθεση για την αξιόπιστη συγκριτική μελέτη τους) απεδείχθη ότι οφειλόταν σε συστηματικό σφάλμα ως προς την σύσταση κάποιων από τα δείγματα. Ο μετέπειτα έλεγχος, σε σύγκριση μόνο με τη hGDH2, μας έδωσε ημίσεια ζωή περίπου στο ήμισυ προς ένα τρίτο αυτού της hGDH2 (τιμή που με αναγωγή στο πλαίσιο της εικόνας 4.33 θα αντιστοιχούσε σε χρόνο ημιζωής ~15-20 min, με ευθεία πορευόμενη περίπου ενδιάμεσα σε αυτή της hGDH2 και της hGDH2-His454Tyr).

Τα δεδομένα αυτά, συμπεριλαμβανομένων των ελλειμματικών δεδομένων για την hGDH2-Ser448Pro, μπορούν να ενταχθούν στο πρότυπο που περιγράψαμε στα προηγούμενα υποκεφάλαια, σύμφωνα με το οποίο η θερμοαντοχή των αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένων μορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης φαίνεται να είναι ανάλογη του ύψους της βασικής δραστηριότητας σε απουσία αλλοστερικών εννεργοποιητών. Ας κρατήσουμε την υποσημείωση αυτή, καθ' ότι θα εξετάσουμε το θέμα αυτό στο κεφάλαιο της συζήτησης.



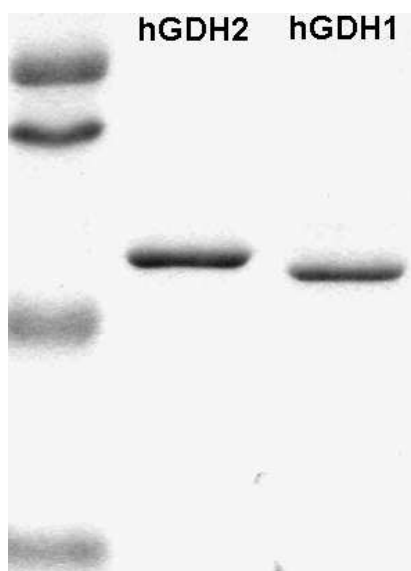
#### **4.7. Μελέτες ηλεκτροφόρησης επί των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs**

Θα κλείσουμε το κεφάλαιο των αποτελεσμάτων της διατριβής με μερικά στοιχεία που προέκυψαν από τα πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, τα οποία διενεργήθηκαν παράλληλα με τις ενζυμικές λειτουργικές μελέτες που περιγράψαμε.

##### **4.7.1. Πειράματα αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης**

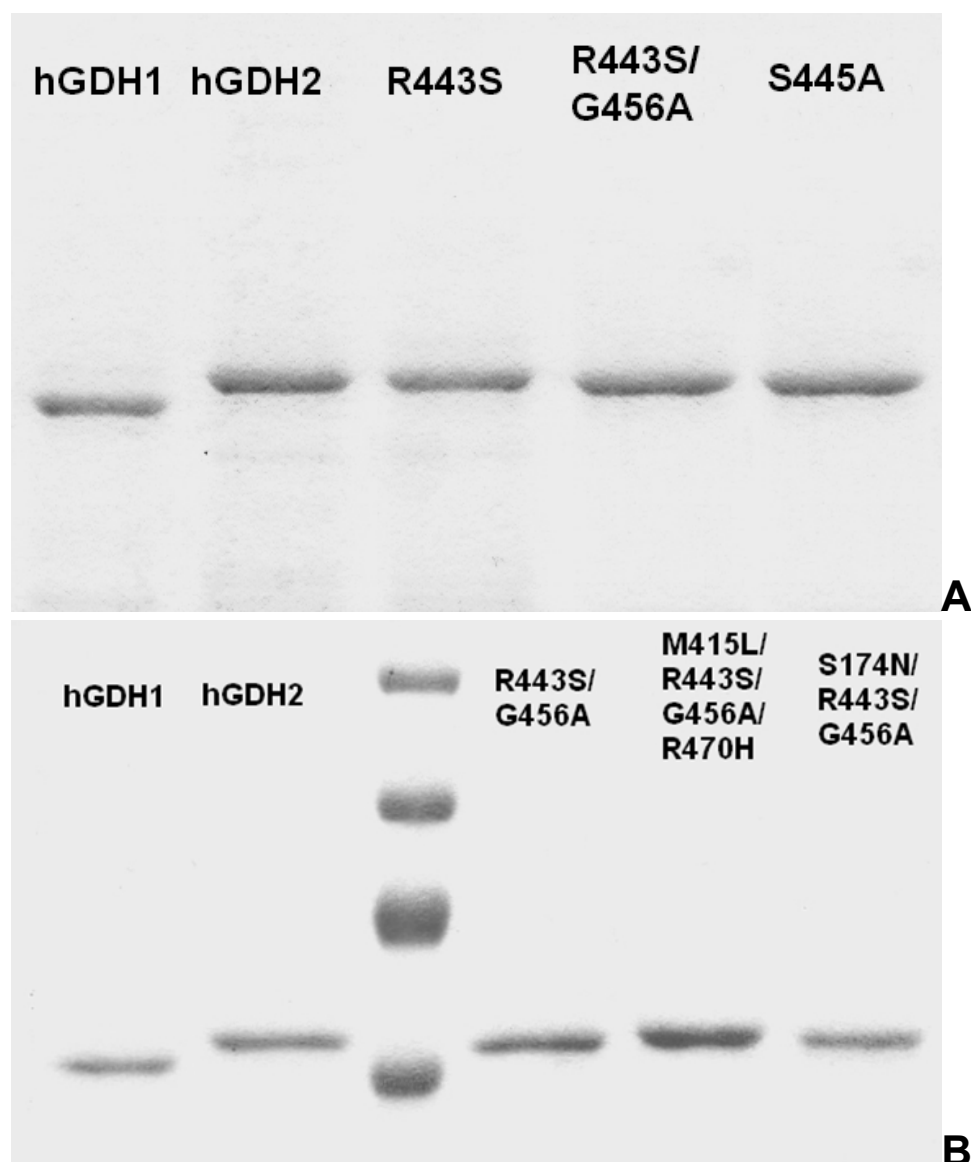
Οι ηλεκτροφορητικές αυτές μελέτες σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με SDS (SDS-PAGE), έγιναν καταρχήν με σκοπό τον προσδιορισμό της καθαρότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μετά τον καθαρισμό τους, καθώς και για την αξιόπιστη μέτρηση της ποσότητάς τους με πυκνομετρία, προκειμένου να προσδιορίσουμε με ακρίβεια την ειδική ενζυμική δραστικότητα των δειγμάτων (βλ. πίν. 4.1, 4.4 και 4.9).

Κατά τα πρώτα από αυτά τα πειράματα με SDS-PAGE, φάνηκε καταρχήν ότι οι υπομονάδες της hGDH1 και της hGDH2 διαφέρουν ως προς την ηλεκτροκινητικότητά τους, με την υπομονάδα της hGDH2 να εμφανίζεται ως έχουσα ελαφρώς μικρότερη ηλεκτροκινητικότητα, δηλ. μεγαλύτερο φαινομενικά μοριακό βάρος κατά περίπου 1-1.5 kD, κάτι που είχε αναφερθεί στο παρελθόν και είχε αποδοθεί στο ελαφρά διαφορετικό pI της hGDH2 (Yang και συν. 2004).



**Εικ. 4.34:** Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης 10% ανασυνδυασμένων και καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2. Οι υπομονάδες των ισοενζύμων βρίσκονται ανάμεσα στις μπάντες των 92kD (δεύτερη από πάνω) και 51 kD (τρίτη από πάνω) του δείκτη μοριακού βάρους.

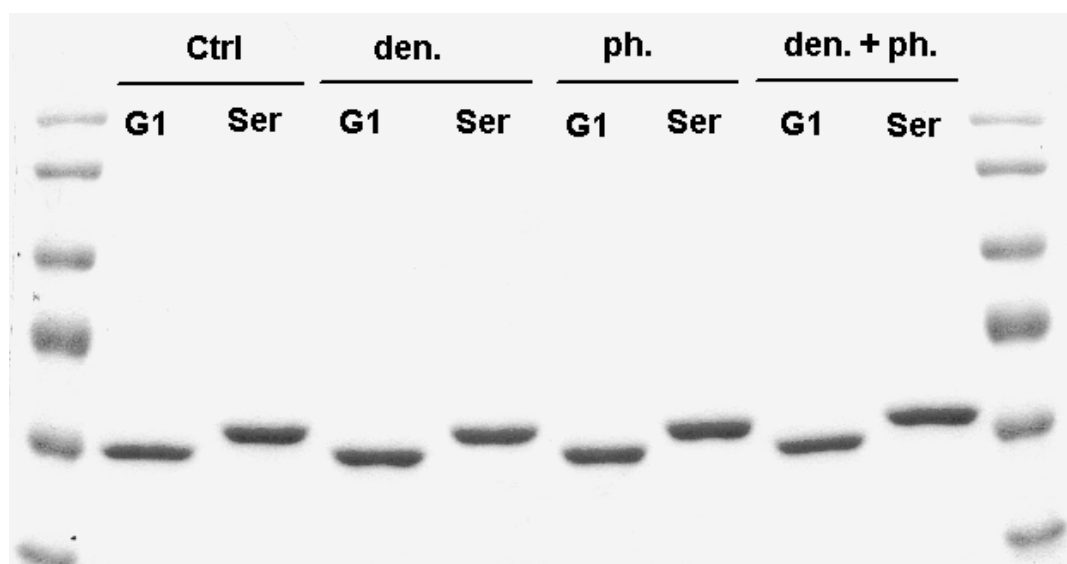
Όσο συνεχιζόταν η παραγωγή και ο καθαρισμός μεταλλαγμάτων, τα οποία υποβάλλονταν σε ηλεκτροφορητική μελέτη για τους λόγους που αναφέραμε, έγινε εμφανές ότι η διαφορά αυτή στην ηλεκτροκινητικότητα δείχνει να εξαρτάται μόνο από την παρουσία ή όχι της Σερίνης στη θέση 443. Συγκεκριμένα, η hGDH1-Arg443Ser συμπεριφέρεται ηλεκτροφορητικά ως hGDH2, όπως άλλωστε και η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και η hGDH2-Ser445Ala (εικ. 4.35A), αλλά και η τριπλά μεταλλαγμένη hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και το χιμαιρικό ένζυμο hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His (εικ. 4.35B).



**Εικ. 4.35:** Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε SDS-πολυακρυλαμίδη ανασυνδυασμένων και καθαρισμένων hGDH1 και hGDH2 αγρίου τύπου, καθώς και **A:** των μεταλλαγμάτων hGDH1-Arg443Ser, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH2-Ser445Ala, **B:** των μεταλλαγμάτων hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His.

Στα μεταλλάγματα της hGDH2 που εξετάσαμε στο υποκεφάλαιο 4.6 και που δεν υποβάλαμε σε καθαρισμό (δηλ. τα hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser446Arg, hGDH2-Ser448Pro, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr), καθώς δεν ήταν φυσικά δυνατός ο έλεγχος με απλή ηλεκτροφόρηση, λόγω της παρουσίας πληθώρας άλλων πρωτεϊνών, επιβεβαιώθηκε με ανοσοστύπωση (Western blotting) από τον I. Ζαγανά ότι η ηλεκτροκινητικότητά τους δεν διαφέρει από αυτήν της hGDH2, ενώ, αντιθέτως, η hGDH2-Ser443Arg, που εξετάσαμε στο υποκεφ. 4.4, επέδειξε μεγαλύτερη ηλεκτροκινητικότητα από την hGDH2, προσεγγίζοντας αυτήν της hGDH1 (I. Ζαγανάς, προσωπική κοινοποίηση αδημοσίευτων αποτελεσμάτων).

Καθ' ό τι φαίνεται ότι η διαφορά στην ηλεκτροκινητικότητα οφείλεται μόνο στην αμινοξική αλλαγή στη θέση 443, που από μόνη της δεν μεταβάλλει το pI της πρωτεΐνης τόσο σημαντικά (εξάλλου, το SDS προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους, ανεξαρτήτως pI), σκεφτήκαμε ότι ενδεχομένως η διαφορά να οφείλεται στη διατήρηση κάποιου δεσμού μεταξύ της Σερίνης 443 και άλλου αμινοξέος, ή, εναλλακτικά, σε φωσφορυλίωση της Σερίνης 443. Δοκιμάσαμε, λοιπόν, διάφορες αποδιατακτικές συνθήκες, ξεχωριστά ή σε συνδυασμό (επίδραση οξέων, βάσεων, ουρίας, μερκαπτοαιθανόλης), καθώς και την επίδραση ισχυρών φωσφατασών. Ενδεικτικό πείραμα δείχνουμε στην εικόνα 4.36.



**Εικ. 4.36:** Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-ακρυλαμίδης καθαρισμένων ανασυνδυασμένων hGDH1 αγρίου τύπου (**G1**) και hGDH1-Arg443Ser (**Ser**). Στις λωρίδες με την επισήμανση **den.**, το δείγμα έχει επιπρόσθετα κατεργαστεί με 0.1N HCl, 6M ουρία και θέρμανση στους 100°C για 30min. Στις λωρίδες με την επισήμανση **ph.** το δείγμα έχει επιπρόσθετα κατεργαστεί με Lambda Protein Phosphatase. Στις λωρίδες με την ένδειξη **den.+ph.** το δείγμα έχει κατεργασθεί αρχικά με φωσφατάση και εν συνεχεία με τις αποδιατακτικές συνθήκες που αναφέραμε. Όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων ελέγχου (**Ctrl**), έχουν φυσικά κατεργασθεί με SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη και 5 min. βρασμό πριν τη φόρτωση – βλ. σχετικά στη μεθοδολογία.

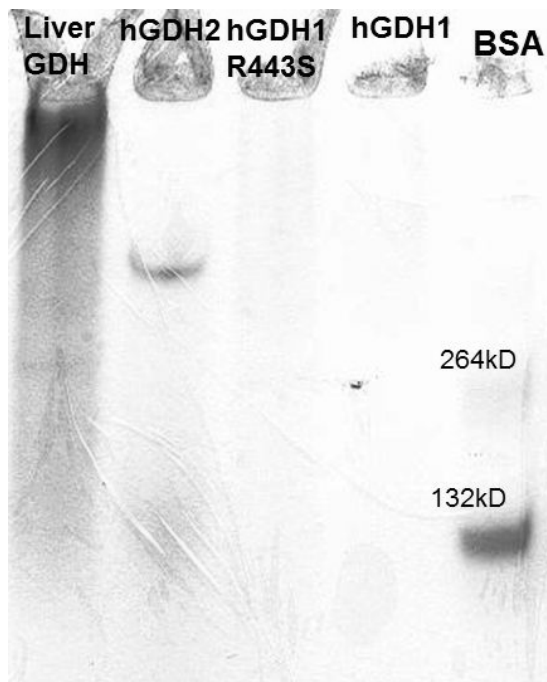
Καμία από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν αλλοίωσε την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά είτε της hGDH1, είτε της hGDH1-Arg443Ser (ή της hGDH2, που χρησιμοποιήθηκε επίσης σε προκαταρκτικά πειράματα). Έτσι, η ακριβής αιτία και η πιθανή σημασία της μειωμένης ηλεκτροκινητικότητας που προκαλεί η παρουσία της Σερίνης στη θέση 443, παραμένει ασαφής.

#### 4.7.2. Πειράματα μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης

Έχοντας υπόψιν τα δεδομένα που έχουμε δει σχετικά με την εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 και διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών των hGDH1 και hGDH2 από τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα, ανέκυψε το ερώτημα εάν αυτό οφείλεται σε σχηματισμό αλυσιδωτών συμπλόκων εξαμερών ή, εναλλακτικά, σε επαναδιάταξη του εξαμερούς (στην υποθετική περίπτωση που το εξαμερές αποδιατάσσεται αναστρέψιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις). Χωρίς να αναφερθούμε εδώ περαιτέρω στην υπόθεση αυτή (στοιχεία επί του ζητήματος δίνουμε στην εισαγωγή, ενώ θα αναφερθούμε εκτενέστερα στη συζήτηση), προχωρούμε στα πειράματα μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήσαμε αποπειρώμενοι να απαντήσουμε το ερώτημα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση στο σύνηθες σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH 6.8-8.8 του Laemmli (1970) χωρίς προσθήκη SDS, κανένα από τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε -ενδεικτικά χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένη hGDH1, hGDH από ανθρώπινο ήπαρ (που κατ' ουσίαν ταυτίζεται με την hGDH1), hGDH2 και hGDH1-Arg443Ser- δεν κινήθηκε προς την άνοδο.

Κατά τη δοκιμή να ανεβάσουμε το pH του συστήματος διαλυμάτων στο 9.5, η hGDH2 κινήθηκε προς άνοδο, σε περιοχή συμβατή με το μοριακό βάρος του εξαμερούς των hGDHs, που είναι περίπου 330kD (αν και, χωρίς SDS, η ηλεκτροκινητικότητα είναι συνάρτηση του μεγέθους **και** του φορτίου, οπότε η αξιολόγηση του μοριακού βάρους δεν είναι ευχερής). Η ανασυνδυασμένη hGDH1 και η hGDH1-Arg443Ser δεν εισήλθαν στο πήκτωμα, ενώ η hGDH από ανθρώπινο ήπαρ προχώρησε ελάχιστα και ακανόνιστα, σχηματίζοντας “smear” (εικ. 4.37).



**Εικ. 4.37:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης 6%, με ρυθμιστικά διαλύματα παρόμοιας σύστασης όπως κατά το κλασικό πρωτόκολλο του Laemmli (βλ. μεθοδολογία), αλλά χωρίς SDS και σε pH 9.5. Χρησιμοποιήθηκαν κεκαθαρμένες οι εξής πρωτεΐνες: hGDH ανθρώπινου ήπατος (Liver GDH), καθώς και ανασυνδυασμένες hGDH2, hGDH1 και hGDH1-Arg443Ser. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε η βόειος ορολευκωματίνη (BSA), που σε μή αποδιατακτικές συνθήκες σχηματίζει διμερή 132 kD και τετραμερή 264 kD.

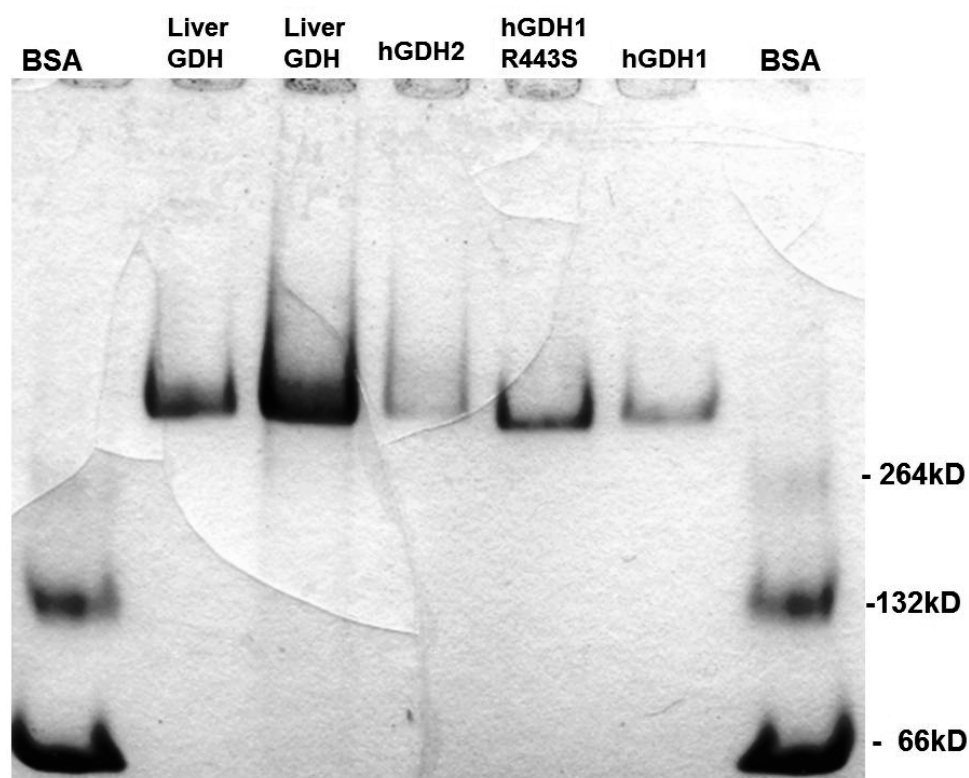
Το αποτέλεσμα προφανώς ακυρώνει τον ισχυρισμό περί μειωμένης ηλεκτροκινητικότητας της υπομονάδας της hGDH2 στο SDS-PAGE λόγω βασικότερου pI (στην περίπτωση αυτή θα περίμενε κανείς η hGDH2 να κινηθεί λιγότερο από τις άλλες hGDH), όμως δεν μας δίνει πολλές άλλες πληροφορίες.

Δοκιμάσαμε στη συνέχεια να μειώσουμε το pH των διαλυμάτων στο 6.0-6.3 με οξικό οξύ και να αντιστρέψουμε την τάση, δηλ. να αναγκάσουμε τα δείγματά μας να κινηθούν προς την κάθοδο (“reverse current electrophoresis”). Τα αποτελέσματα ήταν και πάλι πενιχρά, καθ’ ότι ναι μεν όλα τα δείγματα εισήλθαν στο πήκτωμα, κινήθηκαν όμως μόλις κατά 2-3 mm (μετά από >5 ώρες σε 400V τάσης, με συνοδό υπερθέρμανση της συσκευής και των πηκτωμάτων), με αποτέλεσμα να μην παρέχεται η επιθυμητή διακριτική ικανότητα όσον αφορά το μοριακό βάρος.

Έτσι, χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια την τεχνική της ηλεκτροφόρησης με κυανό του Coomassie (“Blue” Native PAGE), που περιγράφουμε λεπτομερώς στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας, η οποία στηρίζεται στο γεγονός ότι το κυανό του Coomassie, συνδεόμενο με τις πρωτεΐνες, τους δίνει αρνητικό φορτίο ανάλογα με το μέγεθός τους

(όπως δηλ. και το SDS, αλλά χωρίς να αποτελεί αξιόλογο αποδιατακτικό παράγοντα), επιτρέποντάς τους να κινηθούν στο πήκτωμα ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

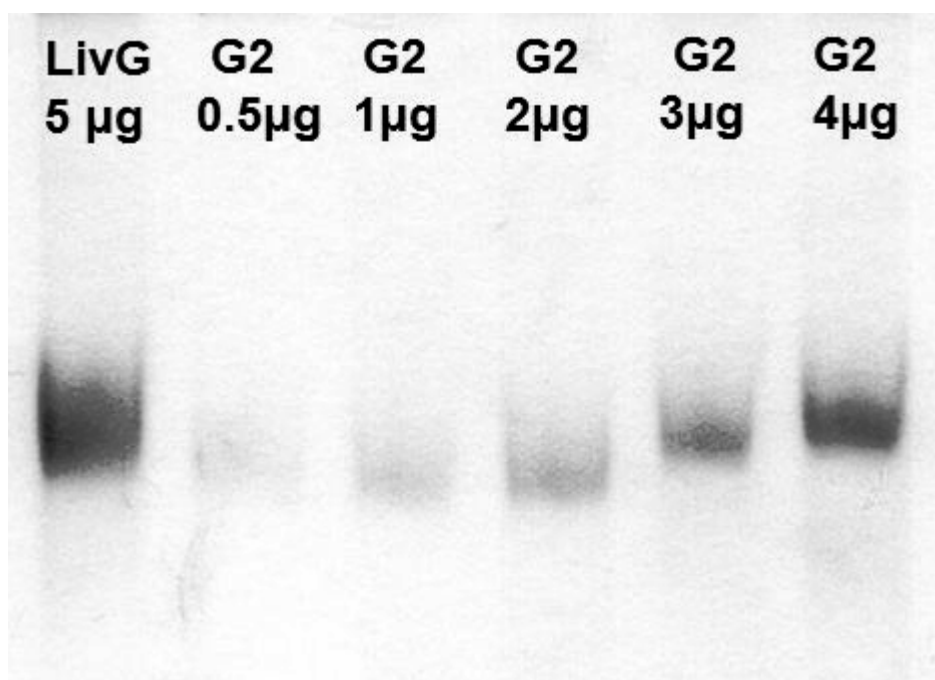
Τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε με τη μέθοδο αυτή, μας έδειξαν ότι οι καθαρισμένες μορφές του ενζύμου που ελέγξαμε (hGDH από ανθρώπινο ήπαρ, hGDH1, hGDH2 και hGDH1-Arg443Ser), από την έχουσα την πλέον υψηλή βασική δραστηριότητα (δηλ. την αγρίου τύπου hGDH1), έως και την έχουσα μηδαμινή βασική δραστηριότητα μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (δηλ. την hGDH1-Arg443Ser), ηλεκτροφορητικά εμφανίζονταν όλες να έχουν μοριακό βάρος αντίστοιχο με την εξαμερή μορφή του ενζύμου στα ~330kD, χωρίς παρουσία απλούστερων μορφών (π.χ. μεμονωμένων υπομονάδων ή τριμερών) ούτε και πολυμερισμένων συμπλόκων. Παρατίθεται ενδεικτικά η εικ. 4.38.



**Εικ. 4.38:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή κλιμακούμενης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης 3.5-15% σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Tricin, όπως ακριβώς περιγράφεται στη μεθοδολογία. Διακρίνονται λεπτές ρωγμές που δημιουργήθηκαν κατά την ξήρανση του gel. Χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένες οι εξής πρωτεΐνες (από αριστερά προς τα δεξιά): hGDH από ανθρώπινο ήπαρ (σε ποσότητες ~1 μg και ~4 μg αντίστοιχα), hGDH2, hGDH1-Arg443Ser και hGDH1 (σε ποσότητα ~0.5-1 μg έκαστη. Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε η βόειος ορολευκωματίνη (BSA), που σε μή αποδιατακτικές συνθήκες σχηματίζει διμερή 132 kD και τεταμερή 264 kD.

Ειδικά για να διερευνήσουμε την πιθανότητα σχηματισμού αλυσίδων από εξαμερή, έγιναν και πειράματα με τη χρήση κλιμακούμενων ποσοτήτων των ενζύμων μας. Και στις δοκιμασίες αυτές, δεν παρατηρήθηκαν μορφές ανώτερης οργάνωσης: ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης ποσότητας του ενζύμου (και άρα και της συγκέντρωσης του στο «πηγαδάκι»), κατά την ηλεκτροφόρηση συμπεριφέρονταν ως εξαμερές των ~330 kD. Παρατίθεται ενδεικτικό πείραμα στην εικόνα 4.39.

Πρέπει να σημειωθεί, εντούτοις, ότι αυτό δεν αρκεί επ' ουδενί για να αποδείξει την μή ύπαρξη των σύνθετων αυτών πολυμερών, καθώς μια τέτοια μακρά άλυσος, σχηματισμένη με αναστρέψιμη και «χαλαρή» σύνδεση των εξαμερών μεταξύ τους, θα μπορούσε να είναι ευαίσθητη στο ηλεκτρικό πεδίο, τις μηχανικές επιδράσεις της κίνησης εντός των πόρων του gel και την ηπιότατη απορρυπαντική δράση του κυανού του Coomassie. Έτσι, η διερεύνηση της υπόθεσης αυτής απαιτεί ειδικές τεχνικές μελέτης της συμπεριφοράς του ενζύμου σε διάλυμα, που ξεπερνούν τα πλαίσια της παρούσης διατριβής και τις δυνατότητες που είχαμε.



**Εικ. 4.39:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή σταθερής συγκέντρωσης ακρυλαμίδης 6% σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Tricin, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένη hGDH από ανθρώπινο ήπαρ (**LivG**) ως δείκτης, καθώς και hGDH2 (**G2**) σε κλιμακούμενες ποσότητες από 0.5 μg έως 4 μg.

## **5. Συζήτηση**

Προχωρώντας στη συζήτηση, θα ξεκινήσουμε αρχικά από μια ανασκόπηση των αποτελεσμάτων μας, επισημαίνοντας κάποιες ενδιαφέρουσες συσχετίσεις που τα αποτελέσματα αυτά μας επιτρέπουν να κάνουμε. Κατόπιν, θα συζητήσουμε τις πιθανές προεκτάσεις των αποτελεσμάτων μας όσον αφορά τη λειτουργία και τη δομή του ενζύμου, και, τέλος, θα κλείσουμε με μερικά συμπεράσματα που αφορούν την εξέλιξη της hGDH2, αλλά και την πιθανή εμπλοκή της σε νευρολογικά νοσήματα.

### **5.1. Νέα δεδομένα για τις ιδιότητες της hGDH2**

Όπως έχουμε αναφέρει, στα πλαίσια της παρούσης διατριβής για πρώτη φορά μελετήθηκε εκτενώς η hGDH2 σε καθαρισμένη μορφή.

Από τις μελέτες αυτές, όσον αφορά τις κινητικές της ιδιότητες την αλλοστερική ρύθμιση της hGDH2 από ADP, GTP και L-λευκίνη και τις διαφορές της με τη hGDH1 ως προς τις ιδιότητες αυτές, τα αποτελέσματά μας απλώς επιβεβαίωσαν όσα γνωρίζαμε από παλαιότερες μελέτες σε αδρά εκχυλίσματα ή μερικώς κεκαθαυμένο ένζυμο (Shashidharan και συν. 1997, Plaitakis και συν. 2000, Plaitakis και συν. 2003). Τα συμπεράσματα αυτών των μελετών, που πλέον έχουν ενισχυθεί και από τα δικά μας δεδομένα, μπορούν να συνοψιστούν αδρά στο ότι, αντίθετα απ' ότι ισχύει για τη hGDH1, το GTP δεν αποτελεί ικανό ρυθμιστή της δραστηριότητας της hGDH2, ενώ αντίθετα το ADP και η L-λευκίνη μπορούν να αυξήσουν τη δραστηριότητά της κατα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό απ' ότι της hGDH1.

Ένα νέο δεδομένο, που προέκυψε από τις αρχικές μελέτες μας, ήταν η σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία της hGDH2 στην αναστολή από στεροειδείς ορμόνες σε σύγκριση με τη hGDH1, με μηχανισμό που φαίνεται να διαφέρει από αυτόν της αναστολής από GTP. Το θέμα αυτό απαιτούσε διερεύνηση που ξεπερνούσε τα πλαίσια της παρούσης διατριβής, έτσι η διερεύνηση αυτή ανετέθη στη συνέχεια σε άλλους ερευνητές, και συγκεκριμένα στη Μ.Μ. Παπαχατζάκη και τον Ν. Μπορομπόκα, γι' αυτό και θα κάνουμε λόγο για την αναστολή από οιστρογόνα μόνο όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο για τις ανάγκες της συζήτησης



Γνωστή ήταν, από προηγούμενες μελέτες (Shashidharan και συν. 1997, Yang και συν. 2004), η μεγαλύτερη ευαισθησία της hGDH2 στη θερμική απενεργοποίηση. Μία από αυτές τις μελέτες (Yang και συν. 2004), είχε δείξει ότι το ADP και η L-λευκίνη μπορούν να προστατεύσουν και τα δύο ισοένζυμα από τη θερμική απενεργοποίηση, και μάλιστα τη hGDH2 αναλογικά πολύ περισσότερο από την hGDH1. Το καινούργιο στοιχείο που προέκυψε σε σχέση με τη θερμοαντοχή των δύο ισοενζύμων ήταν το ότι, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.1.2, συνθήκες στη σύσταση του διαλύματος που επιβραδύνουν την θερμική απενεργοποίηση, όπως το χαμηλό pH, η υψηλή ιοντική ισχύς του διαλύματος και η παρουσία φωσφορικών αλάτων, φαίνεται να ασκούν και αυτές την προστατευτική τους δράση ισχυρότερα στην hGDH2 απ' ό,τι στην hGDH1.

Το σημαντικότερο ίσως νέο στοιχείο που προέκυψε από τις αρχικές μας μελέτες ήταν το ότι, σε αντίθεση με τη βασική δραστηριότητα της hGDH1, η βασική δραστηριότητα της hGDH2 δείχνει να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διάφορους παράγοντες. Έτσι, ενώ μπορεί κάλλιστα να πει κανείς ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH1 σε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών *in vitro* είναι 30-40% της μέγιστης σε όλες τις συνήθεις πειραματικές συνθήκες, η τιμή (~5%) που κατά κανόνα αναφέρεται ως βασική δραστηριότητα της hGDH2 *in vitro* είναι μάλλον συμβατική, αναφερόμενη σε πολύ συγκεκριμένες συνθήκες μέτρησης. Όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.1.1, σε πυκνό διάλυμα φωσφορικού νατρίου η hGDH2 δεν υπολείπεται της hGDH1 σε βασική δραστηριότητα, ενώ ακόμη και μία πτώση του pH από 8.0 σε 7.8, που δυνητικά μπορεί να συμβεί στο μιτοχόνδριο σε συνθήκες έντονης μεταβολικής δραστηριότητας (Llopis και συν. 1998, Ramshesh και συν. 2012), μπορεί να διπλασιάσει τη βασική δραστηριότητα της hGDH2. Εξίσου σημαντικό, καθ' ό,τι μπορεί να επίσης να έχει σημασία σε φυσιολογικές συνθήκες, είναι το γεγονός ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH2 *in vitro* εξαρτάται έντονα από τη συγκέντρωσή της στο διάλυμα, ξεκινώντας, στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε, από <2% της μέγιστης σε συγκέντρωση ~0.5 μg/ml, αλλά ξεπερνώντας τα 10% της μέγιστης σε συγκεντρώσεις περί τα 10μg/ml, διατηρώντας μία γραμμική σχέση με αυτές. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, η βασική δραστηριότητα της hGDH2 φαίνεται να είναι μεγαλύτερη και η γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση εντονότερη.

## 5.2. Οι επίδραση κομβικών αμινοξικών διαφορών μεταξύ hGDH1 και hGDH2 στην αλλοστερική ρύθμιση, τη θερμοαντοχή και τη βασική δραστηριότητα.

Η διαφορά στις ιδιότητες της hGDH1 και της hGDH2 δεν μπορεί παρά να είναι αποτέλεσμα των αμινοξικών διαφορών μεταξύ τους. Εύλογα γεννάται το ερώτημα ποιά ή ποιές από τις δεκαπέντε αμινοξικές αλλαγές και με ποιό μηχανισμό ευθύνεται για τις ποιές από τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων.

Όσον αφορά την αναστολή από GTP, τα πράγματα είναι σαφή. Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας (Zaganas & Plaitakis, 2002) έχει δείξει ότι η αμινοξική αλλαγή Gly456Ala επαρκεί για να προσδώσει στο ένζυμο την αντοχή στο GTP που χαρακτηρίζει τη hGDH2. Οι μελέτες άλλων ερευνητών ουσιαστικά δεν είχαν να προσθέσουν κάτι καινούριο. Καταδεικνύοντας ότι το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser δεν διαφέρει από την αγρίου τύπου hGDH1 όσον αφορά την ευαισθησία από GTP (Choi και συν. 2007), ενώ το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala είναι ανθεκτικό στο GTP (Choi και συν. 2007), τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό μεταξύ τους απλώς ενισχύουν όσα ήδη γνωρίζαμε για τη σημασία της θέσης 456.

Οι δικές μας μελέτες επίσης ενισχύουν αυτήν την υπόθεση: όλα τα μελετηθέντα μεταλλάγματα που φέρουν την Αλανίνη στη θέση 456, δηλ. τα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His, δεν έχουν σημαντικές διαφορές από τη hGDH2 στην αναστολή από GTP (βλ. υποκεφ. 4.3 και 4.5). Φαίνεται δε ότι η μείωση της συγγένειας για το GTP που προκαλείται από την αλλαγή Gly456Ala είναι τέτοιου βαθμού, ώστε μερικές μεταλλάξεις, οι οποίες στη hGDH1 μειώνουν σημαντικά την ευαισθησία στο GTP, προκαλώντας, όπως είδαμε στην εισαγωγή, σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωνιαμίας, δεν έχουν αντίστοιχη επίδραση στη hGDH2. Έτσι, η αντικατάσταση στο μόριο της hGDH2 της Σερίνης 445 από λευκίνη, που στην hGDH1 εξαπλασιάζει την  $IC_{50}$  για το GTP (Stanley και συν. 2000), στην ήδη ανθεκτική hGDH2 δεν αυξάνει σημαντικά την  $IC_{50}$  (βλ. τα σχετικά αποτελέσματα για την hGDH2-Ser445Leu στο υποκεφ. 4.6.2), όπως δεν την αυξάνει ούτε η παρουσία ενός άλλου αλειφατικού αμινοξέος, της αλανίνης, στην ίδια θέση (βλ. τα σχετικά αποτελέσματα για την hGDH2-Ser445Ala στο υποκεφ. 4.2.1).

Οι μόνες από τις αμινοξικές αλλαγές που ελέγξαμε, οι οποίες μπορούν να αυξήσουν περαιτέρω την αντοχή της hGDH2 στο GTP, είναι οι Lys450Glu και His454Tyr. Όπως είδαμε στο υποκεφ. 4.6.2, οι IC<sub>50</sub> για το GTP της hGDH2-Lys450Glu και της hGDH2-His454Tyr αυξάνονται κατά αρκετές τάξεις μεγέθους σε σχέση με την αγρίου τύπου hGDH2. Αυτό δεν είναι παράδοξο, καθώς τα συγκεκριμένα αμινοξέα (Λυσίνη 450 και Ιστιδίνη 454) φαίνονται να αλληλεπιδρούν άμεσα με τη β' και τη γ' φωσφορική ρίζα του GTP.

Όσον αφορά την ενεργοποίηση από ADP, οι διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2 δεν είναι εντυπωσιακές, δεδομένου ότι το ADP σε συγκεντρώσεις άνω των 150 μM αποκαθιστά και στα δύο ισοένζυμα παρόμοια μέγιστη ειδική δραστηριότητα, με την SC<sub>50</sub> της hGDH2 να είναι μόλις 2 έως 2½ φορές υψηλότερη. Η διαφορά αυτή στην SC<sub>50</sub> ίσως να μην οφείλεται μόνο σε μειωμένη συγγένεια για το ADP. Μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στο ότι η hGDH1 έχει, ούτως ειπείν, καλύτερο «σημείο εκκίνησης», καθώς έχει σε απουσία ενεργοποιητών δραστηριότητα 35-40% της μέγιστης, η οποία αυξάνεται κατά 2.5 φορές με την επίδραση του ADP, ενώ η αρκετά χαμηλότερη βασική δραστηριότητα της hGDH2 μπορεί να ενισχυθεί κατά >20 φορές.

Ωστόσο, η αμινοξική αλλαγή Arg443Ser, παράλληλα με την ελαχιστοποίηση της βασικής δραστηριότητας, αυξάνει κατά περίπου 20 φορές την SC<sub>50</sub> για το ADP, όπως φαίνεται από παλαιότερες μελέτες (Zaganas και συν. 2002), αλλά και από τα δικά μας αποτελέσματα (βλ. υποκεφ. 4.3). Έτσι, προφανώς κάποιες άλλες αμινοξικές διαφορές μεταξύ hGDH1 και hGDH2, όπως π.χ. η Ser174Asn που είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.5.2, συμβάλλουν στην αποκατάσταση της ευαισθησίας της hGDH2 στο ADP. Καθώς ούτε η θέση 443, ούτε η θέση 174 βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με τη θέση πρόσδεσης του ADP στο μόριο του ενζύμου (Smith και συν. 2001, Banerjee και συν. 2003, Li και συν. 2011), πιθανότατα η επίδραση των αμινοξικών αλλαγών σε αυτές τις θέσεις στην SC<sub>50</sub> για το ADP σχετίζεται με μεταβολές στη διαμόρφωση του ενζύμου οι οποίες δυσχεραίνουν το άνοιγμα της καταλυτικής σχισμής που προκαλείται από την πρόσδεση του ADP.

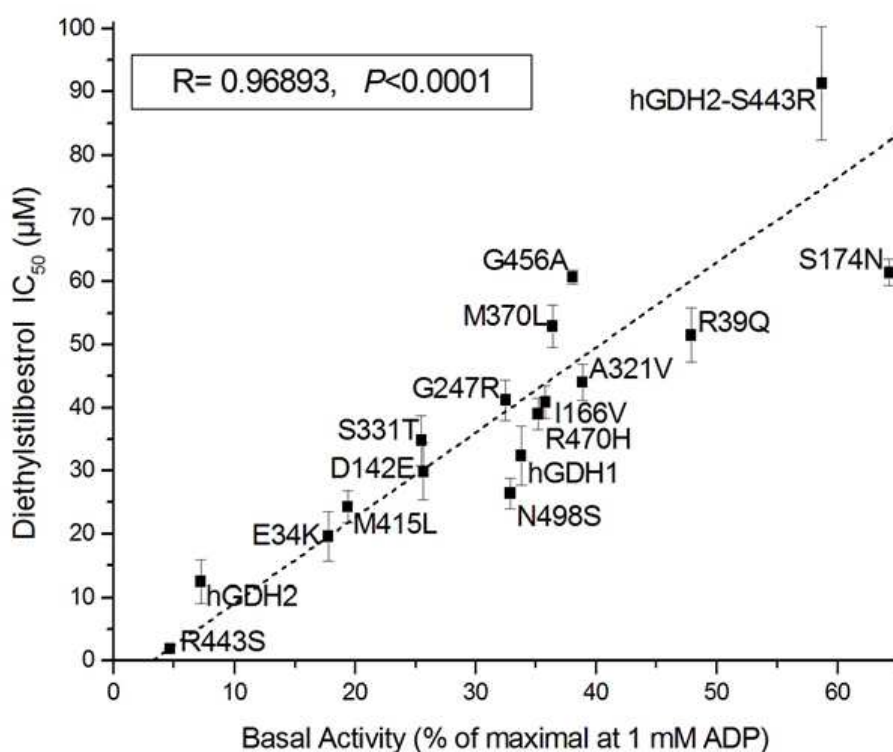
Παρομοίως, και στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη, όπως είδαμε στο υποκεφ. 4.1.4, οι hGDH1 και hGDH2 δεν εμφανίζουν πολύ σημαντικές διαφορές. Και εδώ διαφέρει, όπως και στην ενεργοποίηση από ADP, το συνολικό ποσοστό ενεργοποίησης λόγω διαφορετικού «σημείου εκκίνησης», ενώ οι SC<sub>50</sub> για τη λευκίνη δεν διαφέρουν

σημαντικά. Όμως, όπως συμβαίνει και με το ADP, αυτό δεν σημαίνει ότι οι 15 αμινοξικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων δεν επηρεάζουν τη δράση της λευκίνης. Και εδώ, ο ρόλος της αμινοξικής θέσης 443 φαίνεται να είναι κομβικός: Η αλλαγή Arg443Ser στη hGDH1, εκτός του ότι εκμηδενίζει τη βασική δραστηριότητα και αυξάνει την  $SC_{50}$  για το ADP, καταργεί και την ενεργοποίηση του ενζύμου από L-λευκίνη απουσία άλλου ενεργοποιητή· μόνο σε παρουσία μικρών συγκεντρώσεων ADP η λευκίνη μπορεί να δράσει ενεργοποιητικά στο ένζυμο (Zaganas και συν. 2002). Γνωρίζουμε, ωστόσο, ότι η θέση 443, όπως και ολόκληρη η αντέννα, δεν αποτελούν θέση πρόσδεσης της L-λευκίνης, καθώς η απαλειφή ολόκληρης της αντέννας της hGDH1 δεν καταργεί την ενεργοποίηση από λευκίνη (Allen και συν. 2004). Όπως περιγράφουμε στα αποτελέσματα (βλ. υποκεφ. 4.5.2), το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala παρέμεινε ανθεκτικό σχεδόν όσο και η hGDH1-Arg443Ser στην L-λευκίνη, ενώ, αντιθέτως, το τριπλό μετάλλαγμα hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala δείχνει να ενεργοποιείται όπως η hGDH2. Η ικανότητα της αμινοξικής αλλαγής Ser174Asn να αποκαταστήσει την ευαισθησία του ενζύμου στη λευκίνη πιθανότατα σχετίζεται με την μεγάλη αύξηση της βασικής δραστηριότητας που επιφέρει η αλλαγή αυτή. Άλλωστε, και τα αποτελέσματά μας από μεταλλάγματα της hGDH2 (υποκεφ. 4.6.2) δείχνουν ότι μεταλλάγματα με χαμηλή βασική δραστηριότητα ενεργοποιούνται ελάχιστα ή και καθόλου από L-λευκίνη, ενώ, αντίθετα, τα μεταλλάγματα με βασική δραστηριότητα υψηλότερη της hGDH2 είναι πιο ευαίσθητα στη δράση της λευκίνης, παρ' ότι φέρουν αμινοξικές αλλαγές στην αλλοστερική περιοχή, μακριά από τις πιθανές θέσεις πρόσδεσής της. Συμβατά με το μοντέλο αυτό είναι σε γενικές γραμμές και τα δεδομένα της I. Αριάνογλου (2011), που μελέτησε την ενεργοποίηση των hGDHs από L-λευκίνη σε μια πληθώρα μεταλλαγμάτων στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας.

Για το πώς μπορεί να συνδέεται η ενεργοποίηση από L-λευκίνη με τη βασική δραστηριότητα, μπορούμε να κάνουμε μόνο υποθέσεις, καθώς μόλις πρόσφατα προσδιορίστηκε η θέση πρόσδεσής της στο μόριο του ενζύμου. Τα δεδομένα που παρουσιάσαμε θα ήταν συμβατά και με μία θέση πρόσδεσης της λευκίνης εντός της καταλυτικής σχισμής, οπότε η ανοικτή διαμόρφωση θα αποτελούσε προϋπόθεση για την δράση της. Ωστόσο, λίαν πρόσφατα δεδομένα από τη μελέτη των Tomita και συν. (2011), προτείνουν ότι η θέση πρόσδεσης της λευκίνης βρίσκεται στην περιοχή επαφής των υπομονάδων μεταξύ τους (subunit interface), η οποία επίσης υπόκειται σε αλλαγές του σχήματός της κατά το άνοιγμα και κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής.

Σε κάθε περίπτωση πάντως, η ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου, που επάγεται από την σύνδεση του ADP, αλλά μάλλον σχετίζεται και με υψηλή βασική δραστηριότητα σε απουσία ενεργοποιητών, φαίνεται να αποτελεί προϋπόθεση για την εξάσκηση της ευοδωτικής δράσης της λευκίνης.

Όσον αφορά, τώρα, την αναστολή της GDH από οιστρογόνα, εδώ η διαφορετική συμπεριφορά των δύο ισοενζύμων, με την hGDH2 να είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη, μας υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων δεν έχει σχέση με αυτόν του GTP. Όπως έδειξε στη διατριβή του ο Ν. Μπορομπόκας (βλ. Μπορομπόκας 2009, καθώς και Βορομπόκας και συν. 2010), η ευαισθησία στα οιστρογόνα σχετίζεται με την «κατάσταση ενεργοποίησης» του ενζύμου. Δηλαδή, όταν κάποια hGDH έχει υψηλή δραστηριότητα, είτε λόγω της παρουσίας κάποιου αλλοστερικού ενεργοποιητή, είτε λόγω ενδογενώς υψηλής βασικής δραστηριότητας, τότε η hGDH αυτή παρουσιάζει και υψηλή IC<sub>50</sub> για τα οιστρογόνα. Αυτό γίνεται εμφανές και από τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε στα υποκεφ. 4.2.1, 4.3, 4.4 και 4.5.2.

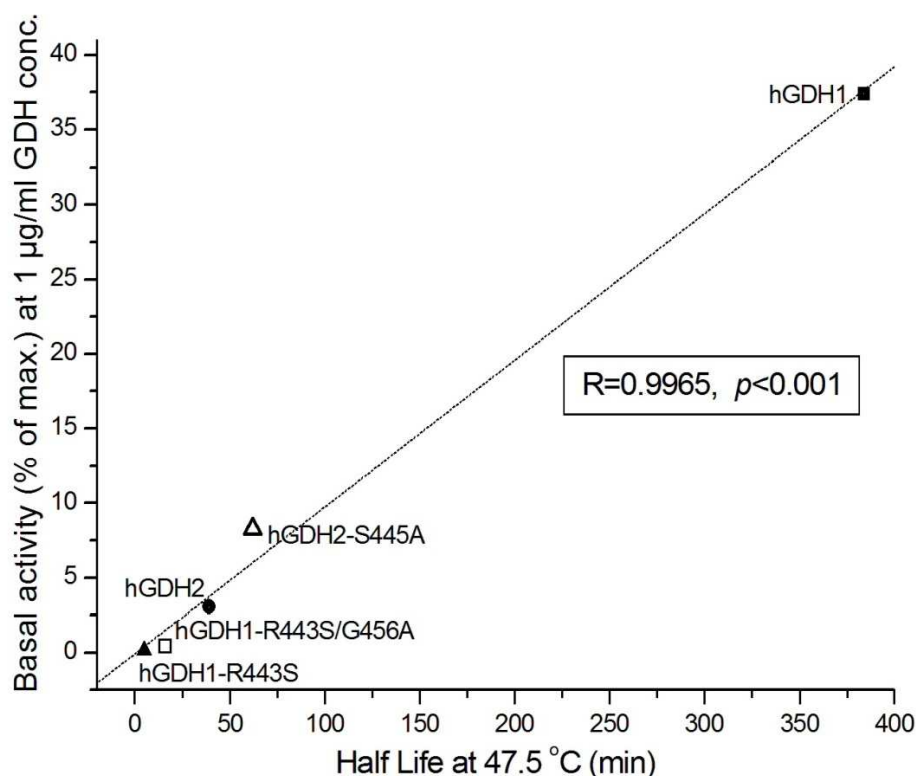


**Εικ. 5.1:** Σχέση βασικής δραστηριότητας και αντοχής στην αναστολή από οιστρογόνα. Η IC<sub>50</sub> για τη διαιθυλστυλβεστρόλη απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών και η βασική δραστηριότητα της hGDH1, της hGDH2, μεταλλαγμάτων της hGDH1 (υποσημαίνεται μόνο η αμινοξική αλλαγή) και της hGDH2-Ser443Arg προσδιορίστηκαν σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα. Η κατασκευή των μεταλλαγμάτων της hGDH1 είχε πραγματοποιηθεί από τον Ι. Ζαγανά στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του. Το γράφημα παρατίθεται ελαφρά τροποποιημένο από δημοσίευσή μας (Βορομπόκας και συν. 2010, suppl. materials)

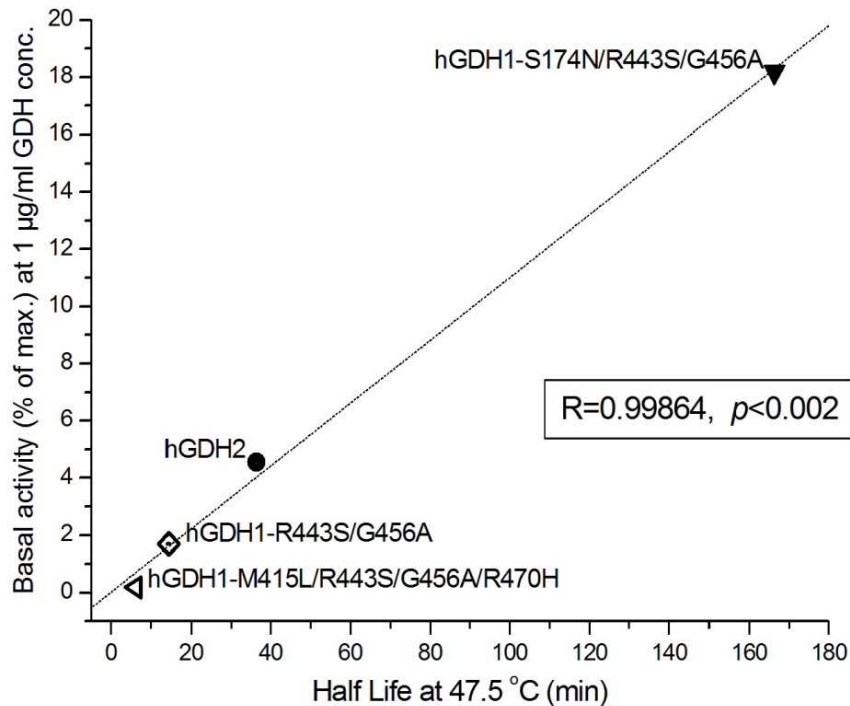
Ακόμη πιο εμφανής γίνεται η σχέση μεταξύ αντοχής στην αναστολή από οιστρογόνα και βασικής δραστηριότητας στο παραπάνω γράφημα (εικόνα 5.1), όπου απεικονίζεται γραφικά η σχέση ανάμεσα στην IC<sub>50</sub> για τη διαιθυλστυλβεστρόλη και την βασική δραστηριότητα των hGDH1 και hGDH2, μίας σειράς μεταλλαγμάτων της hGDH1 (μεταλλαγμένα στο αμινοξύ που διαφέρουν από τη hGDH2) και της hGDH2-Ser443Arg. Εδώ, φαίνεται να υπάρχει μια σχεδόν γραμμική σχέση μεταξύ της βασικής δραστηριότητας και της αντοχής στην οιστρογονική αναστολή. Η αμινοξική αλλαγή Arg443Ser μεταξύ hGDH1 και hGDH2 είναι και εδώ είναι πολύ σημαντική, όπως φαίνεται από την ακραία, αντιδιαμετρική θέση των μεταλλαγμάτων hGDH1-Arg443Ser και hGDH2-Ser443Arg στο γράφημα, όμως εντάσσεται αρμονικά το πρότυπο αυτό και η μεγάλη επίδρασή της δεν φαίνεται να υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου ξεχωριστού μηχανισμού όπως λ.χ. γειτνίαση του καταλοίπου 443 με την περιοχή πρόσδεσης των οιστρογόνων στο μόριο του ενζύμου. Είναι δε λίαν απίθανο η Αργινίνη 443 να βρίσκεται να έρχεται σε επαφή με τα οιστρογόνα. Μπορεί η θέση πρόσδεσης των οιστρογόνων να μην έχει δείχθει ακόμη κρυσταλλογραφικά, όμως πιθανότατα βρίσκεται στον «πυρήνα» του εξαμερούς, στην περιοχή επαφής των υπομονάδων μεταξύ τους (subunit interface), όπου βρίσκεται και η θέση πρόσδεσης άλλων αλλοστερικών αναστολέων με υδρόφοβο χαρακτήρα, όπως π.χ. του εξαχλωροφαίνιου (Li και συν. 2009).

Σχετικά με τη θερμοαντοχή, και εδώ η σημασία της αμινοξικής θέσης 443, όπως πρώτοι έδειξαν οι Yang και συν. (2004), αλλά φαίνεται και από τα αποτελέσματά μας (βλ. υποκεφ. 4.3, εικ. 4.18), είναι κομβική. Η παρουσία της σερίνης στη θέση αυτή κάνει το ένζυμο λίαν θερμοευαίσθητο. Όμως, φαίνεται ότι κάποιες άλλες αμινοξικές μεταξή hGDH1 και hGDH2 αποκαθιστούν σε κάποιο βαθμό τη σταθερότητα του ενζύμου. Στην ενίσχυση της θερμοαντοχής συνεισφέρει ελαφρά και η αμινοξική αλλαγή Gly456Ala (βλ. υποκεφ. 4.3), όμως η αλλαγή που είναι σημαντικότερη για τη διατήρηση της θερμοσταθερότητας στη hGDH2 –θεωρώντας δεδομένο ότι η hGDH2 περιέχει την Σερίνη443– φαίνεται να είναι η αντικατάσταση της Σερίνης 174 από ασπαραγίνη, όπως μας δείχνουν τα σχετικά αποτελέσματα επί του τριπλού μεταλλαγματος hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala στο υποκεφ. 4.5.4. Ωστόσο, και στην περίπτωση της θερμοαντοχής φαίνεται ότι υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στη βασική δραστηριότητα και τη θερμοαντοχή. Αυτό φαίνεται –και το επισημαίνουμε στα σχετικά σημεία του κεφαλαίου των αποτελεσμάτων- αν δεί κανείς

τα αποτελέσματα των υποκεφαλαίων 4.3, 4.4, 4.5 και 4.6. Για να το καταστήσουμε πιο σαφές, παραθέτουμε δύο γραφήματα, στα οποία η ως άνω σχέση γίνεται εμφανής (Εικ. 5.2 και 5.3, αλλά και εικ. 5.4 στο επόμενο υποκεφάλαιο). Να διευκρινίσουμε ότι, όσο καλή και αν είναι η εφαρμογή της ευθείας στις γραφικές αυτές παραστάσεις, δεν μπορεί να αποδειχθεί αν η σχέση μεταξύ των παραμέτρων αυτών είναι όντως γραμμική από τη φύση της, ή αν κάποια άλλη εξίσωση θα μπορούσε δυνητικά να την περιγράψει ακόμη ακριβέστερα· αυτό, όμως, που αποδεικνύεται χωρίς αμφιβολία είναι, ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση. Ας σημειωθεί επίσης, ότι, μέχρι στιγμής, όλα τα ανασυνδυασμένα ένζυμα που έχουμε ελέγξει στα πλαίσια της παρούσης διατριβής συμπεριφέρονται σύμφωνα με το πρότυπο αυτό. Οι μόνες μορφές του ενζύμου που φαίνονται να αποκλίνουν ως ένα βαθμό από το πρότυπο αυτό είναι τα μεταλλάγματα hGDH1-Ser409Arg και hGDH1-Ser409Asp (βλ. Μαστοροδήμος, 2007), τα οποία είχαν ελεγχθεί παράλληλα με τις αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2, όχι όμως και σε σύγκριση με άλλα μεταλλάγματα.



**Εικ. 5.2:** Σχέση μεταξύ της βασικής δραστηριότητας και θερμοαντοχής καθαρικών hGDH1, hGDH2, hGDH1-Arg443Ser, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala και hGDH2-Ser445Ala. Η τιμές της βασικής δραστηριότητας (εκπεφρασμένης ως ποσοστό επί της μέγιστης που μετράται σε παρουσία 1 mM ADP) σε συγκέντρωση ενζύμου 1 µg/ml στους 25°C, καθώς και του χρόνου ημίσειας ζωής κατά τη δοκιμασία θερμικής απενεργοποίησης στους 47.5°C, δίδονται στα υποκεφ. 4.2 και 4.3 των αποτελεσμάτων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας



**Εικ. 5.3:** Σχέση βασικής δραστηριότητας και θερμοαντοχής καθαρισμένων ενζύμων hGDH2, hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala. Οι τιμές της βασικής δραστηριότητας (ως ποσοστό επί της μέγιστης που μετράται σε παρουσία 1 mM ADP) σε συγκέντρωση ενζύμου 1 µg/ml στους 25°C, καθώς και του χρόνου ημίσειας ζωής κατά τη δοκιμασία θερμικής απενεργοποίησης στους 47.5°C, δίδονται στο υποκεφ. 4.5 των αποτελεσμάτων.

Αφήσαμε σκόπιμα για το τέλος αυτής της ενότητας τη βασική δραστηριότητα καθ' αυτή, επιλέγοντας να μιλήσουμε πρώτα για τη σχέση που τη συνδέει με την ενεργοποίηση από ADP και λευκίνη και, κυρίως, με την αντοχή στην αναστολή από οιστρογόνα και την αντοχή στην θερμική απενεργοποίηση. Όπως έχουμε αναφέρει ήδη, η hGDH2 έχει μια βασική δραστηριότητα σαφώς χαμηλότερη αυτής της hGDH1 μεν, αλλά σε καμιά περίπτωση αμελητέα, πράγμα που φαίνεται ιδίως σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η αμινοξική αλλαγή που κυρίως ευθύνεται για την «πτώση» της βασικής δραστηριότητας είναι, όπως είδαμε, η αλλαγή Arg443Ser (βλ. Zaganas και συν. 2002 και υποκεφ. 4.3 των αποτελεσμάτων)• το ένζυμο όμως που προκύπτει, δηλ. η hGDH1-Arg443Ser, έχει σχεδόν μηδενική βασική δραστηριότητα (και, είναι, όπως είδαμε προηγουμένως, ανθεκτικό στη δράση ενεργοποιητών και λίαν ευαίσθητο στη θερμότητα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις στεροειδών). Αυτό ελάχιστα διορθώνεται με την –«απαραίτητη» στην hGDH2 -καθώς της παρέχει την αντοχή στο GTP- αλλαγή Gly456Ala, όπως μας δείχνει το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala. Έτσι, λογικό συμπέρασμα είναι ότι κάποια ή κάποιες από τις



λοιπές αμινοξικές αλλαγές μεταξύ των δύο ισοενζύμων αποκαθιστούν ως ένα βαθμό τη βασική δραστηριότητα. Αυτό φαίνεται και από τα δεδομένα που εξετάσαμε στο υποκεφάλαιο 4.4 σχετικά με την hGDH2-Ser443Arg: εφόσον η hGDH2-Ser443Arg (που είναι, ούτως ειπείν, το «αρνητικό ανάτυπο» της hGDH1-Arg443Ser) έχει βασική δραστηριότητα όχι μόνο κατά πολύ υψηλότερη από αυτήν της αγρίου τύπου hGDH2, αλλά και σημαντικά υψηλότερη από αυτήν της της hGDH1, έπεται ότι η αθροιστική επίδραση των λοιπών (πλην της Arg443Ser) αμινοξικών διαφορών της hGDH2 από τη hGDH1 είναι ευοδωτική για τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.1, αρκετές από τις αμινοξικές αλλαγές μεταξύ hGDH1 και hGDH2 έχουν κάποια επίδραση στη βασική δραστηριότητα του ενζύμου, είτε

Enzyme	Basal Activity (% of max.)
hGDH1	33.8 ±5.1
hGDH1-E34K	17.8 ±3.3
hGDH1-R39Q	47.9 ±0.6
hGDH1-D142E	25.7 ±5.8
hGDH1-I166V	35.8 ±3.7
hGDH1-S174N	64.3 ±1.9
hGDH1-G247R	32.5 ±5.9
hGDH1-A321V	38.9 ±2.6
hGDH1-S331T	25.5 ±6.2
hGDH1-M370L	36.4 ±2.3
hGDH1-M415L	19.4 ±2.7
hGDH1-R443S	2.8 ±0.5
hGDH1-G456A	38.1 ±1.8
hGDH1-R470H	35.2 ±4.1
hGDH1-N498S	32.9 ±2.4
hGDH2	7.1 ±3.6

**Πιν. 5.1:** Βασική δραστηριότητα αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2 και μεταλλαγμάτων της hGDH1. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν την τετημημένη των σημείων του γραφήματος στην εικόνα 5.1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 έως και 7 προσδιορισμών της βασικής δραστηριότητας, ενώ μετά το διπλό πρόσημο δίνεται η τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

αυξάνοντας, είτε μειώνοντάς την. Εκτός από την Arg443Ser, ελάττωση της βασικής δραστηριότητας, αν και σε σαφώς μικρότερο βαθμό, φαίνεται να προκαλούν οι αμινοξικές αλλαγές Gly34Lys και Met415Leu. Η τελευταία αυτή αλλαγή ίσως ερμηνεύει την παρατήρηση ότι, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.5 των αποτελεσμάτων, η χιμαιρική hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His

δείχνει να υπολείπεται ελαφρά της hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala σε βασική δραστηριότητα (αλλά και σε θερμοσταθερότητα και σε αντοχή στα οιστρογόνα). Από την άλλη, ευοδωτική επίδραση στη βασική δραστηριότητα φαίνεται να έχει η αμινοξική αλλαγή Arg39Gln και, κυρίως, η Ser174Asn. Η τελευταία αυτή αλλαγή φαίνεται να παίζει τον πλέον σημαντικό ρόλο στο να διατηρηθεί η βασική δραστηριότητα της hGDH2 σε ικανά επίπεδα. Αυτό υποσημαίνεται ήδη από το ότι μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα της hGDH1 κατά 50%-90% (ας αναφερθεί εδώ ότι, σε άλλες μετρήσεις μας, η hGDH1-Ser174Asn εμφάνιζε βασική δραστηριότητα ~55% της μέγιστης έναντι ~38% της hGDH2). Όμως, η βασική δραστηριότητα (και οι άλλες λειτουργικές παράμετροι) της hGDH2 δεν είναι το «αλγεβρικό άθροισμα» των σχετικών τιμών των επιμέρους μεταλλάξεων της hGDH1, καθώς η περίπλοκη στερεοδομή του ενζύμου επιτρέπει σύνθετες αλληλεπιδράσεις απομακρυσμένων μεταξύ τους θέσεων. Έτσι, δεν ήταν δεδομένο ότι, παρουσία της Arg443Ser, η Ser174Asn θα μπορούσε να εξασκήσει την ευοδωτική επί της βασικής δραστηριότητας επίδρασή της. Ο ρόλος της Ser174Asn, λοιπόν, στην διαμορφωση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 φαίνεται ακόμη σαφέστερα στα δεδομένα που είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.5, όπου η προσθήκη της Ser174Asn στην hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala μπορεί να αυξήσει κατά >10 φορές τη βασική δραστηριότητα του ενζύμου, αλλά και να κάνει πιο ισχυρή τη σχέση συγκέντρωσης – βασικής δραστηριότητας. Το γεγονός ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH2 είναι τελικά χαμηλότερη από αυτήν της hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala, προφανώς οφείλεται στη συνέργεια και άλλων αμινοξικών αλλαγών, όπως λ.χ. αυτές που αναφέραμε παραπάνω. Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH2 είναι ρυθμισμένη με ακρίβεια χάρη στην συνδυασμένη επίδραση μιας σειράς αμινοξικών αλλαγών, και δεν είναι απλώς «χαμηλή».

### **5.3. Η επίδραση του πολυμορφισμού hGDH2-Ser445Ala και άλλων μεταλλάξεων της hGDH2 στην αλλοστερική ρύθμιση, τη θερμοαντοχή και τη βασική δραστηριότητά της .**

Όπως έχουμε δει και στην εισαγωγή, ένα από τα βασικά κίνητρα για τη διερεύνηση των μηχανισμών που επηρεάζουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2 ήταν διαπίστωση που προέκυψε αρχικά στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μας (Καναβούρας, 2004) και εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε, κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης διατριβής, σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ασθενών (Plaitakis και συν., 2010), ότι η παρουσία του πολυμορφισμού Ser445Ala σε ημίζυγους άνδρες μπορεί να επισπεύσει την εκδήλωση της Νόσου του Πάρκινσον· γι' αυτό και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης και καθαρισμένης hGDH2-Ser445Ala ήταν ένας από τους στόχους της διατριβής μας.

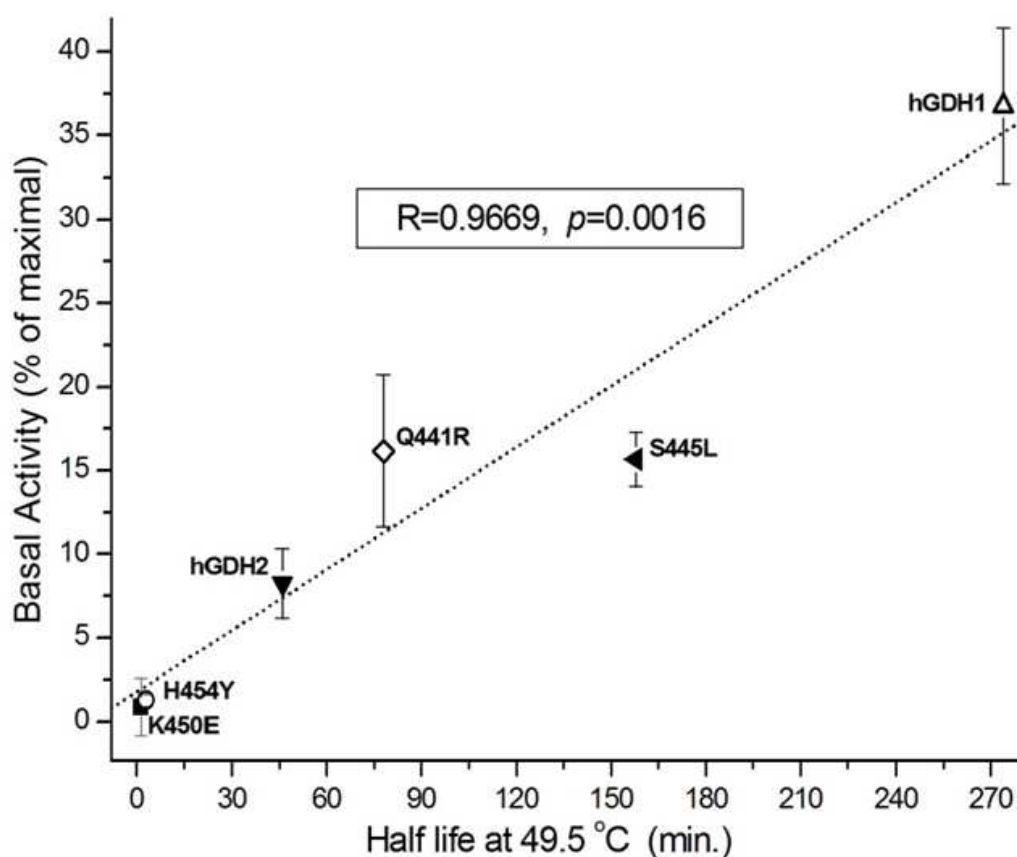
Από τη μελέτη αυτή, όπως φαίνεται στα δεδομένα του υποκεφαλαίου 4.2, δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις κινητικές παραμέτρους και την αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου. Τόσο στην ενεργοποίηση από ADP και λευκίνη, όσο και στην αναστολή από GTP και οιστρογόνα, οι όποιες διαφορές μεταξύ της αγρίου τύπου hGDH2 και της hGDH2-Ser445Ala ήταν μικρές έως και αμελητέες. Έτσι, αν στην hGDH1 η συναφής Ser445Leu προκαλεί, όπως είδαμε στην εισαγωγή, την υπερλειτουργία της hGDH1 λόγω μή καταστολής του από το GTP (Stanley και συν. 2000), που τελικά οδηγεί σε σύνδρομο υπερινσουλινισμού-υπεραμμωνιαμίας, στην περίπτωση της hGDH2 ο μηχανισμός δεν θα μπορούσε να είναι ο ίδιος, καθώς η ήδη αυξημένη αντοχή της hGDH2 στο GTP δεν μεταβάλλεται σημαντικά από την προσθήκη της αμινοξικής αλλαγής Ser445Ala ή της Ser445Leu (βλ.υποκεφ. 4.2.1 και 4.6.2, αντίστοιχα). Οι μόνες ιδιότητες όπου φαίνεται να διαφέρει σημαντικά in vitro η hGDH2-Ser445Ala (καθώς και η «τεχνητή» hGDH2-Ser445Leu) σε σύγκριση με την hGDH2 είναι η θερμοαντοχή -για τη σπουδαιότητα της οποίας στις συνθήκες του μιτοχονδρίου δεν έχουμε κανένα στοιχείο- και η βασική δραστηριότητα. Η βασική δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala φαίνεται να είναι τουλάχιστον διπλάσια της hGDH2 και με πιο έκδηλη τάση αύξησης όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση του ενζύμου (βλ. εικ. 4.14. και 4.15 στο υποκεφάλαιο 4.2.3). Και εδώ, βέβαια, δεν γνωρίζουμε τις ακριβείς συνθήκες που επικρατούν στο μιτοχόνδριο και την εν γένει συμπεριφορά και

λειτουργία της hGDH2 στις συνθήκες του κυττάρου: ενδέχεται η προσαύξηση της συνολικής δραστηριότητας γλουταμικής αφυδρογονάσης που προκαλείται *in vivo* από την αλλαγή hGDH2-Ser445Ala να είναι μικρή. Από την άλλη, εξ ίσου ήπια πρέπει να είναι και η βιοχημική διαταραχή που φαίνεται να σχετίζεται με αυτή την αυξημένη δραστηριότητα, αφού, όπως δείχνουν τα επιδημιολογικά μας στοιχεία, φαίνεται ότι απλώς επιταχύνει ελαφρά μια διαδικασία νευροεκφύλισης που διαρκεί αρκετές δεκαετίες. Σε κάθε περίπτωση, πάντως, το γεγονός ότι μία μάλλον ήπια απορρύθμιση της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου είναι ικανή να επιταχύνει παθολογικές διεργασίες, τονίζει τη σημασία της ακριβούς ρύθμισης της βασικής δραστηριότητας της hGDH2, όπως αυτή επιτυγχάνεται με τη συνεργασία πολλών αμινοξικών αλλαγών, όπως εξηγήσαμε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο.

Όσον αφορά, τώρα, τις «τεχνητές», καθώς δεν έχουν μέχρι τώρα ανευρεθεί σε ανθρώπους (ωστόσο, η αμινοξική αλλαγή Gln441Arg υπάρχει στη GDH2 του ουραγοκόταγκου) μεταλλάξεις της hGDH2 που είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.6, αυτές έχουν ως κοινό στοιχείο ότι, όπως προαναφέρθηκε, στη hGDH1 (όπου έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς) προκαλούν αύξημένη αντοχή στην αναστολή από GTP και, συνεπακόλουθα, σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωνιαϊμίας. Στη hGDH2, αντίθετα, μόνο οι αμινοξικές αλλαγές στην περιστρεφόμενη έλικα His454Tyr και Lys450Glu, που μετέχουν άμεσα στην σύνδεση του GTP, προκαλούν αξιοσημείωτη περαιτέρω αύξηση της IC<sub>50</sub> για το GTP. Παράλληλα, οι ίδιες μεταλλάξεις, σχεδόν εκμηδενίζουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, πράγμα που δεν φαίνεται να προκαλούν στην hGDH1 (Stanley και συν. 2000, Fang και συν. 2002, Lee και συν. 2003), καθώς και τη θερμοαντοχή. Από την άλλη, οι μεταλλάξεις στο κατιόν σκέλος της αντέννας, Gln441Arg και Ser445Leu, δεν μεταβάλλουν περαιτέρω την ευαισθησία στο GTP της hGDH2, αλλά αυξάνουν τη βασική της δραστηριότητα. Η αύξηση αυτή της βασικής δραστηριότητας δείχνει να ισχύει και για την hGDH1 στην περίπτωση της Ser445Leu, όχι όμως και της Gln441Arg (Stanley και συν. 2000). Τέλος, η αλλαγή Ser448Pro, ευρισκόμενη στη μετάβαση από το κατιόν σκέλος της αντένας, επίσης δε μεταβάλλει περαιτέρω την ευαισθησία της hGDH2 στο GTP, όμως μειώνει αισθητά τη βασική της δραστηριότητα, πράγμα που προκαλεί και στη hGDH1 (Stanley και συν. 2000, Fang και συν. 2002). Ενδιαφέρουσα είναι δε η αναφορά από τους Fang και συν. (2002), ότι, σε μελέτες τους με καθαρισμένο ένζυμο, η χαμηλή βασική δραστηριότητα της hGDH1-Ser448Pro φάνηκε να

αποκαθίσταται εν μέρει σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ενζύμου, καθώς και με την επίδραση φωσφορικών αλάτων - κάτι που, όπως είδαμε στα δικά μας αποτελέσματα, ισχύει και για τη hGDH2 και άλλες μορφές του ενζύμου με χαμηλή βασική δραστηριότητα.

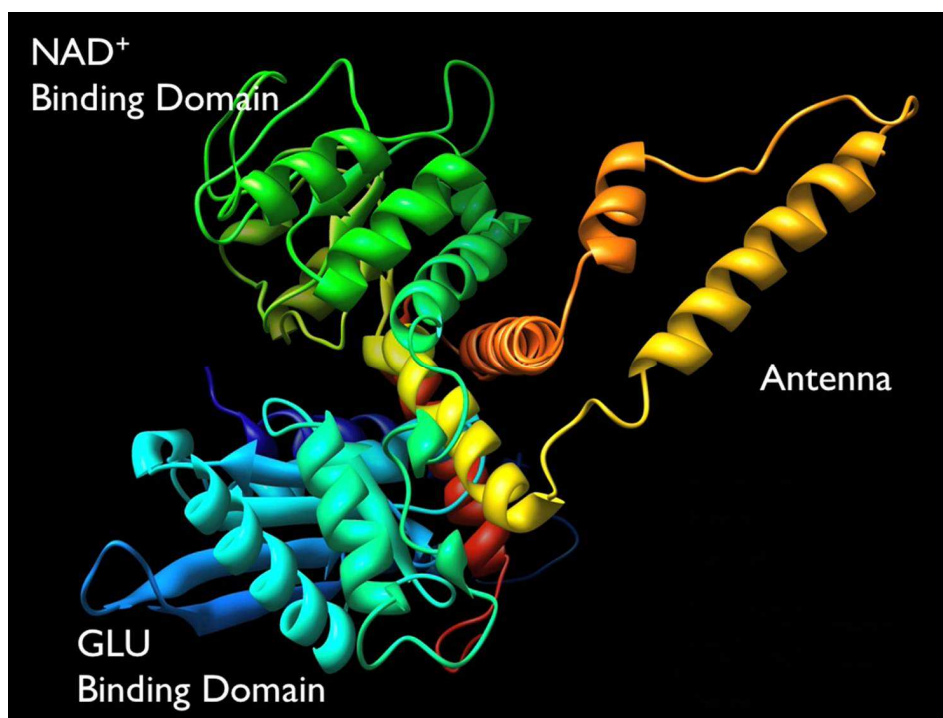
Τέλος, να επισημανθεί ότι και τα μεταλλάγματα αυτά συμπεριφέρονται σύμφωνα με το πρότυπο που περιγράψαμε στην προηγούμενη ενότητα, σύμφωνα με το οποίο η χαμηλή βασική δραστηριότητα συνεπάγεται και μεγάλη ευαισθησία στη θερμική απενεργοποίηση (βλ. εικόνα 5.4), αλλά επίσης και αδυναμία ενεργοποίησης από L-λευκίνη (βλ. εικόνα 4.32 στο υποκεφάλαιο 4.6.2 των αποτελεσμάτων).



**Εικ. 5.4:** Σχέση βασικής δραστηριότητας και θερμοαντοχής αδρών εκχυλισμάτων hGDH1, hGDH2, hGDH2-Glu441Arg, hGDH2-Ser445Leu, hGDH2-Ser446Arg, hGDH2-Lys450Glu και hGDH2-His454Tyr. Η τιμές της βασικής δραστηριότητας (εκπερασμένης ως ποσοστό επί της μέγιστης), καθώς και του χρόνου ημίσειας ζωής κατά τη δοκιμασία θερμικής απενεργοποίησης στους 49.5°C, δίδονται στο υποκεφ. 4.6 των αποτελεσμάτων.

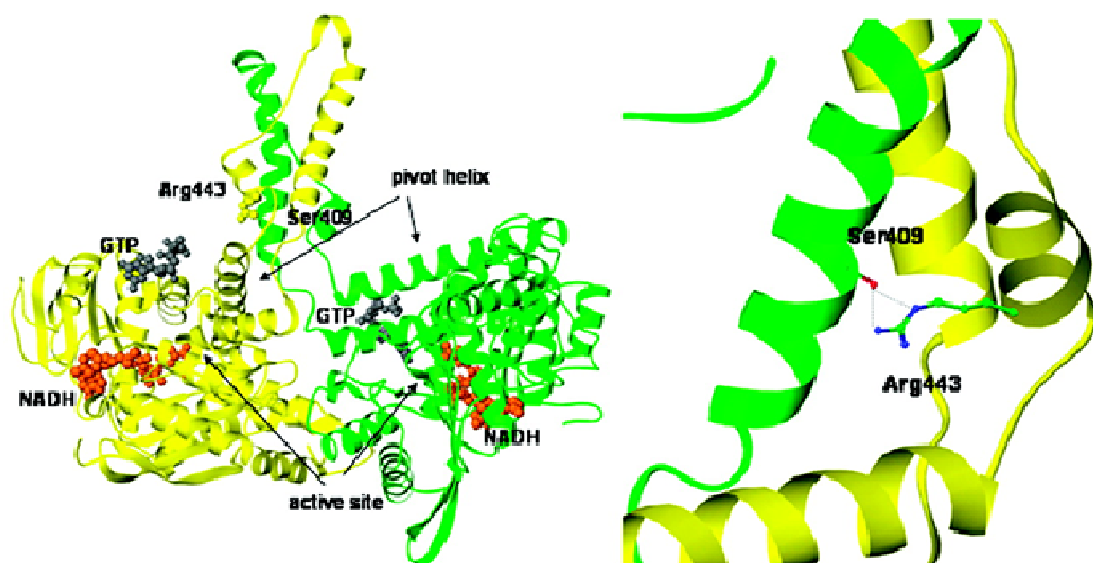
#### 5.4. Οι πιθανές επιδράσεις στη δομή του ενζύμου των κυριότερων αμινοξικών αλλαγών που μεταβάλλουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2

Ξεκινώντας την ενότητα αυτή, πρέπει να διευκρινίσουμε όσα θα αναφέρουμε στη συνέχεια έχουν λίγο ή πολύ το χαρακτήρα υποθέσεων, γι' αυτό και αναφερόμαστε στον τίτλο ρητά σε πιθανές επιδράσεις. Αυτό διότι, ενώ εδώ και αρκετά χρόνια γνωρίζουμε βάσει κρυσταλλογραφικών δεδομένων τη στερεοδομή της -ομόλογης και λειτουργικά όμοιας με τη hGDH1- βοείου GDH (Peterson και συν. 1999) και της hGDH1 (Smith και συν. 2002), μέχρι στιγμής δεν έχει επιτευχθεί η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής της hGDH2. Βέβαια, δεδομένης της κατά >97% ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας, με διατήρηση όλων των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής, οι δομικές διαφορές της hGDH2 από τη hGDH1 θα είναι λεπτές. Όμως, όπως έχουμε δει στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, λεπτές διαφορές μπορεί να επιφέρουν σημαντικές λειτουργικές αλλαγές. Υπενθυμίζουμε στην εικόνα 5.5 τις βασικές περιοχές της υπομονάδας της hGDH:



**Εικ. 5.5:** Διάγραμμα της δομής της απομορφής της hGDH1 (PDB entry: 1LIF) όπου απεικονίζεται για λόγους ευκρίνειας μία μόνο υπομονάδα, με σημασμένες τις βασικές περιοχές της.

Η σημαντικότερη, όπως είδαμε, αμινοξική αλλαγή στη hGDH2 που επηρεάζει τη βασική δραστηριότητα είναι η Arg443Ser. Η Αργινίνη 443 βρίσκεται στη μικρή α-έλικα στο κατιόν σκέλος της αντένας της hGDH1. Ήδη από δεκαετίας έχει προταθεί (Zaganas και συν. 2002) ότι σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Σερίνη 409 που βρίσκεται στο ανιόν σκέλος της γειτονικής αντένας της δεξιόθεν κείμενης υπομονάδας, στο σημείο όπου οι τρεις αντένες -από τις τρεις υπομονάδες που βρίσκονται στην ίδια πλευρά του «ισημερινού» του εξαμερούς- εμπλέκονται μεταξύ τους (βλ. εικόνα 5.6). Η αλληλεπίδραση αυτή μάλλον χάνεται με την αντικατάσταση της Αργινίνης 443 από σερίνη, με πιθανό αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του συμπλόκου των περιελιγμένων αντένων, τη μείωση της έλξης επί της περιοχής πρόσδεσης του NADH και το κλείσιμο του καταλυτικού κέντρου. Η άποψη αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα του Βασ. Μαστοροδήμου, που έδειξε ότι η αντικατάσταση της Σερίνης 409 από αργινίνη στη hGDH1 είχε ως αποτέλεσμα μεγάλη μείωση της βασικής δραστηριότητας (Μαστοροδήμος, 2007).



**Εικ. 5.6:** Διάγραμμα της δομής της βοείου GDH σε σύμπλοκο με NADH, γλουταμικό και GTP (PDB entry: 1HWZ). Η αρίθμηση των αμινοξέων αντιστοιχεί στα αμινοξέα της ανθρώπινης GDH. Αριστερά: Δομή της GDH, όπου απεικονίζονται για λόγους απλότητας μόνο δύο υπομονάδες, όπως και τα συνδεδεμένα GTP και NADH. Δεξιά: εγγύτερη άποψη που δείχνει τις πλευρικές αλυσίδες της Arg443 και της Ser409, καθώς και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από το Zaganas και συν. (2002)

Στη μικρή α-έλικα επί του κατιόντος σκέλους της αντένας βρίσκεται και η Σερίνη 445, της οποίας η αντικατάσταση από αλανίνη στην hGDH2 (βλ. αποτελέσματα) ή από λευκίνη στη hGDH1 (βλ. Stanley και συν. 2000) οδηγεί σε αύξηση της βασικής

δραστηριότητας. Η σερίνη αυτή δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με αμινοξέα από τις αντένες των γειτονικών υπομονάδων. Αντίθετα, πιθανότατα αλληλεπιδρά διά υδρογονικών δεσμών με αμινοξέα στο παρακείμενο βήμα της α-έλικας, όπως με το Ασπαρτικό 442 (βλ. εικόνα 5.7). Η βραχεία αυτή α-έλικα υφίσταται μεταβολές του μήκους και του προσανατολισμού της κατά το άνοιγμα και κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής· συγκεκριμένα, κατά το «κλείσιμο» του ενζύμου, η έλικα αυτή συμπιέζεται και ταυτόχρονα ωθείται προς τον κεντρικό οβελιαίο άξονα που σχηματίζουν οι διαπλεκόμενες αντένες (Smith και συν. 2002). Η αντικατάσταση της σερίνης αυτής από αλειφατικό αμινοξύ (αλανίνη στην περίπτωση της hGDH2 ή λευκίνη στην περίπτωση της hGDH1), που αποτελεί «καλύτερο» σταθεροποιητή της α-έλικας, πιθανώς εντείνει την ακαμψία της, σταθεροποιώντας την ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου (Smith και συν. 2002). Με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή σταθεροποιώντας την βραχεία α-έλικα, δρά πιθανώς και η αντικατάσταση Gln441Arg, που, όπως εξετάσαμε στο υποκεφάλαιο 4.6, έχει παρόμοιες με την αντικατάσταση Ser445Leu επιδράσεις στη βασική δραστηριότητα της hGDH2 (Smith και συν. 2002).



**Εικόνα 5.7.** Απεικόνιση της αντένας μίας υπομονάδας στην απομορφή της hGDH1 (PDB entry: 1LIF). Σημειώνεται η θέση της Σερίνης 445 στην μικρή α-έλικα του κατιόντος σκέλους της αντένας. Σημειώνονται και οι θέσεις της Γλουταμίνης 441 και του Ασπαρτικού 442, των οποίων επίσης απεικονίζονται οι πλευρικές άλυσοι.



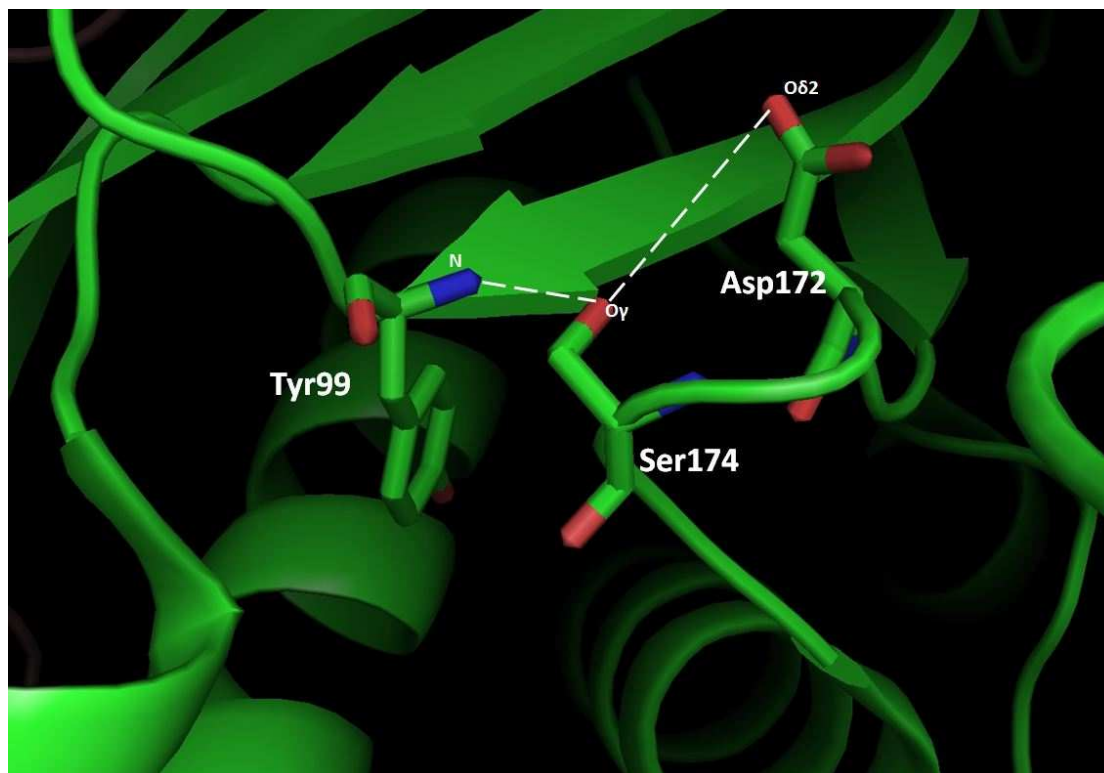
Όσον αφορά, τώρα, την Σερίνη 174, η μεταλλαγή της οποίας σε αργινίνη, όπως είδαμε, αυξάνει τη βασική δραστηριότητα, αλλά και την αντοχή στη θερμική απενεργοποίηση και την οιστρογονική αναστολή, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να είναι κομβικής σημασίας και για την ενεργοποίηση της hGDH2 από L-λευκίνη, αυτή δεν βρίσκεται στη λεγόμενη «αλλοστερική περιοχή»· εντοπίζεται σε έναν μικρό βρόχο (loop) στην ευρύτερη περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, όχι στο ενεργό κέντρο, αλλά κοντά στην «είσοδο» της καταλυτικής σχισμής (βλ. εικ. 5.8). Αυτό ίσως ερμηνεύει και τη σημαντική μεταβολή στις  $K_m$  των υποστρωμάτων, ιδιαίτερα του γλουταμικού, που είδαμε στον πίν. 4.9



**Εικόνα 5.8.** Η θέση της Σερίνης 174 στην υπομονάδα της hGDH1 (PDB entry: 1LIF) στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού.

Στη θέση που βρίσκεται η Σερίνη 174, το άζωτο της κεντρικής της αλυσίδας φαίνεται να σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το οξυγόνο της κεντρικής αλυσίδας του Ασπαρτικού 172, που βρίσκεται στο ίδιο loop. Το δε πλευρικό υδροξύλιο της Σερίνης 174 πιθανώς σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το καρβοξυλικό οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας του Ασπαρτικού 172. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές σταθεροποιούν –μεταξύ πολλών ακόμη αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα γειτονικά αμινοξέα- το βρόχο. Επίσης, το πλευρικό υδροξύλιο της Σερίνης 174 γειτνιάζει άμεσα και πιθανότατα

σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το με το άζωτο της αμινομάδας της Τυροσίνης 99, που βρίσκεται σε παρακείμενη β-πτυχωτή επιφάνεια (β-sheet), όπως φαίνεται στην εικόνα 5.9



**Εικόνα 5.9.** Πιθανές αλληλεπιδράσεις της Σερίνης 174. Κοντινή άποψη της δομής της απομορφής της hGDH1 hGDH1 (PDB entry: 1LIF). Απεικονίζονται μόνο οι πιθανές αλληλεπιδράσεις που αφορούν την πλευρική αλυσίδα της Σερίνης 174, ήτοι με την αμινομάδα της Τυροσίνης 99 και με το καρβοξυλικό οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας του Ασπαρτικού 172 (βλ. κείμενο).

Σε αντικατάσταση της Σερίνης 174 από ασπαραγίνη, η πρώτη από τις αλληλεπιδράσεις που περιγράψαμε, που δεν αφορά καμία πλευρική αλυσίδα, δεν αναμένεται να υποστεί μεταβολή, ενώ και οι άλλες δύο αλληλεπιδράσεις που αναφέραμε κατά πάσα πιθανότητα ενισχύονται. Παράλληλα, ανάλογα με τη στροφική διαμόρφωση -για την οποία μπορούμε να κάνουμε μόνο υποθέσεις- που θα λάβει η πλευρική αλυσίδα της Ασπαραγίνης 174, θα μπορούσε δυνητικά να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου και με άλλα αμινοξέα, όπως λ.χ. την Αργινίνη 98 ή τη Θρεονίνη 175. Σε κάθε περίπτωση όμως, η ασπαραγίνη, διαθέτοντας στην πλευρική της αλυσίδα δύο ομάδες (αμινομάδα και καρβοξύλιο) που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου, αναμένεται να ενισχύσει σημαντικά το τοπικό πλέγμα υδρογονικών δεσμών, σταθεροποιώντας δομικά την περιοχή.

### 5.5. Πιθανές ερμηνείες για την εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 από τη συγκέντρωση.

Όπως έχουμε δει στα αποτελέσματα, η βασική δραστηριότητα της hGDH2 in vitro, σε αντίθεση με αυτήν της hGDH1, ενισχύεται σημαντικά όταν αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο διάλυμα. Αυτό δείχνει να ισχύει όχι μόνο για τη hGDH2, αλλά και για κάθε μετάλλαγμα της hGDH1 ή της hGDH2 που φέρει τη σερίνη στη θέση 443 και έχει, ως εκ τούτου, χαμηλότερη της hGDH1 βασική δραστηριότητα, θερμοαντοχή και αντοχή στην οιστρογονική αναστολή, όπως είδαμε στα αποτελέσματα για την hGDH2-Ser445Ala, την hGDH1-Arg443Ser, την hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala, την hGDH1-Met415Leu/Arg443Ser/Gly456Ala/Arg470His και την hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala. Μάλιστα, όσο πιο υψηλή είναι η βασική δραστηριότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (~0.5-1 μg/ml), τόσο πιο έντονη φαίνεται να είναι η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και βασικής δραστηριότητας, αντιστοιχώντας σε μεγαλύτερη κλίση της ευθείας στις σχετικές γραφικές παραστάσεις.

Η πλέον λογική ερμηνεία θα ήταν ότι τα μόρια του ενζύμου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Πράγματι, όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή (υποκεφ. 1.2.3), ήδη από πολύ παλιά είχεδειχθεί με πειράματα υπερφυγοκέντρωσης ότι η βόειος GDH, σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο διάλυμα, μπορεί να έχει μεγαλύτερο φαινομενικό μοριακό βάρος, μέχρι και πάνω από 1300 kD (Olsen και Anfinsen 1952), ενώ αργότερα αποδείχθηκε με μελέτες crosslinking ότι τα πολυμερή αυτά είχαν μορφή αλυσίδων (Josephs και συν. 1973). Αυτός ο αναστρέψιμος πολυμερισμός, που δείχθηκε ότι συμβαίνει και στην ανθρώπινη ηπατική GDH (Kubo και συν. 1959), θεωρήθηκε αρχικά ότι αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητα, (Frieden 1959a, Yielding και Tomkins 1960, Frieden 1962), αλλά στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι, τουλάχιστον στην περίπτωση της βοείου GDH, ο πολυμερισμός καθ' αυτός δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα (Fisher και συν. 1962, Josephs και συν. 1973). Θα μπορούσε όμως αυτός ο πολυμερισμός να επηρεάζει τη δραστηριότητα της hGDH2, π.χ. βοηθώντας το ένζυμο να λάβει μια «ανοικτή» διαμόρφωση η οποία, ενώ στη hGDH1 (ομόλογη και αντίστοιχη λειτουργικά στην βόειο GDH) διατηρείται σε επαρκή βαθμό και χωρίς τον πολυμερισμό, στην hGDH2 δεν διατηρείται, οπότε η ενίσχυσή της διά του πολυμερισμού είναι σημαντική για τη της βασικής δραστηριότητας;

Υπάρχουν στοιχεία που συνηγορούν υπέρ μιας τέτοιας ερμηνείας των παρατηρήσεών μας. Πολλοί από τους παράγοντες που έχουμε δει στο υποκεφάλαιο 4.1 ότι ενισχύουν τη βασική δραστηριότητα της hGDH2, έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι ευοδώνουν το σχηματισμό αυτών των αλυσιδωτών πολυμερών της βοείου GDH. Έτσι, όχι μόνο η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου (όλες οι σχετικές μελέτες – ενδεικτικά μόνο αναφέρουμε αυτές των Olsen και Anfinsen 1952, Kubo και συν. 1959, Fisher και συν. 1962, Frieden 1963, Fisher και συν. 1965), αλλά, όπως είδαμε στην εισαγωγή (υποκεφ. 1.2.3) και η χαμηλότερη θερμοκρασία του διαλύματος, το χαμηλό pH, η υψηλή ιοντική ισχύς και η παρουσία φωσφορικών αλάτων βοηθούν αυτόν τον αναστρέψιμο πολυμερισμό. Επιπλέον, οι αλλοστερικοί ανστολείς του ενζύμου, όπως το GTP (Frieden 1959b) και τα οιστρογόνα (Yielding και Tomkins 1960) φαίνεται ότι επάγουν τον αποπολυμερισμό, ενώ αυτή η αποπολυμεριστική δράση τους αναστέλλεται από το ADP (Frieden 1959b, Fisher και συν. 1972) και τη λευκίνη (Yielding και Tomkins 1961).

Εντούτοις, υπάρχουν και στοιχεία που δεν συνάδουν με μια τέτοια εξήγηση. Έτσι, σε όλες τις μελέτες που προαναφέραμε, η βόειος GDH αναφέρθηκε ότι πολυμερίζεται σε συγκεντρώσεις άνω των 50-100  $\mu\text{g/ml}$ , δηλαδή περίπου δεκαπλάσιες από αυτές στις οποίες έγιναν οι παρατηρήσεις μας, αν και στη μελέτη των Cassman και Schachman (1971) το φαινόμενο παρατηρήθηκε ήδη σε συγκεντρώσεις 10-20  $\mu\text{g/ml}$ . Το ότι στα πειράματα μή αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήσαμε δεν παρατηρήθηκαν πολυμερή των πρωτεϊνών μας, δεν απομακρύνει την πιθανότητα ύπαρξής τους, για λόγους που εξηγήσαμε στο σχετικό υποκεφάλαιο 4.7.2. Όμως, η μελέτη της hGDH2 και της hGDH2-Ser445Ala, διαλυμένων σε συγκέντρωση ~100  $\mu\text{g/ml}$ , με την τεχνική της σκέδασης ακτίνων X κλειστής γωνίας (Small-angle X-ray scattering, SAXS), ανέδειξε ότι το ένζυμο βρισκόταν γενικά στη μορφή του εξαμερούς των 330kD (Αν. Γαζή και Μιχ. Κοκκινίδης, προσωπική κοινοποίηση αδημοσίευτων αποτελεσμάτων). Έτσι, το θέμα του αν ο σχηματισμός πολυμερών ευθύνεται για την εξάρτηση της βασικής δραστηριότητας από τη συγκέντρωση, παραμένει ανοικτό για περαιτέρω διερεύνηση.

Μία άλλη, πολύ πιο απομακρυσμένη πιθανότητα, θα ήταν τα «ασταθή» αυτά ένζυμα με τη χαμηλή βασική δραστηριότητα και θερμοαντοχή, δηλ. η hGDH2 και τα μεταλλάγματα που φέρουν τη σερίνη στη θέση 443, να μην βρίσκονται στη μορφή του εξαμερούς, αλλά σε χαμηλότερο «επιπεδο οργάνωσης», λ.χ. σε μορφή τριμερών,

κατά την διάλυσή τους σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, και η επανασύνδεση του εξαμερούς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Έχει επιτευχθεί στο παρελθόν με αποδιατακτικούς παράγοντες η δημιουργία τριμερών μορφών GDH που διατηρούσαν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή τους, εμφανίζοντας μειωμένη, αλλά όχι ολοσχερώς καταργημένη δραστηριότητα, και μάλιστα με δυνατότητα να ανακτήσουν μερικώς τη δομή και τη δραστηριότητά τους μετά την απομάκρυνση των αποδιατακτικών παραγόντων (Tashiro και συν. 1982, Strambini και συν. 1989). Ωστόσο, μέχρι στιγμής η μόνη αναφορά για GDH σε τριμερή μορφή χωρίς τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων είναι αυτή των Lee και συν. (2003), που παρατήρησαν ότι το μετάλλαγμα hGDH1-His454Tyr, που έχει συσχετιστεί με το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας και εμφανίζει αυξημένη αντοχή στο GTP, αλλά όχι μειωμένη βασική δραστηριότητα (Stanley και συν. 2000, Fang και συν. 2002), κατά τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, είχε ηλεκτροφορητική κινητικότητα αντίστοιχη με το μέγεθος του τριμερούς. Δεν έχουμε ελέγξει το «τεχνητό» μετάλλαγμα hGDH2-His454Tyr με την πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα -που, όπως είπαμε, δεν μελετήθηκε σε καθαρή μορφή και συνεπώς δεν έχουμε στοιχεία για το αν η βασική δραστηριότητά του είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης- με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση· όμως η hGDH2 και η έχουσα ακόμη χαμηλότερη βασική δραστηριότητα hGDH1-Arg443Ser, που μελετήθηκαν με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε διάφορες συνθήκες, όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 4.7.2, σε όλα τα σχετικά πειράματα φάνηκαν να έχουν το μέγεθος του εξαμερούς. Συμβατά με τη διατήρηση της εξαμερούς δομής της hGDH2 ήταν άλλωστε και τα αποτελέσματα της μελέτης με SAXS που αναφέραμε στην προηγούμενη παράγραφο. Επομένως, η υπόθεση αυτή θα πρέπει μάλλον να απορριφθεί.

## 5.6. Σημασία των ρυθμιστικών της βασικής δραστηριότητας αμινοξικών αλλαγών στην εξέλιξη της hGDH2.

Όπως είδαμε και στην εισαγωγή, μετά τη δημιουργία του του *GLUD2* γονιδίου με ρετρομετάθεση πριν από ~18-23 εκατομμύρια χρόνια, έλαβαν χώρα οι αμινοξικές αλλαγές που διαφοροποιούν την GDH2 των ανώτερων πρωτευόντων από την GDH1, και δη με τρόπο ωθούμενο από την εξέλιξη (Burki και Kaessmann 2004), πράγμα που σημαίνει ότι οι τυχαία προκύπτουσες μεταλλάξεις τέθηκαν υπό την κρίση της φυσικής επιλογής κάτω από εξελικτική πίεση. Η εξέλιξη του γονιδίου *GLUD2* ήταν χρονικά παράλληλη με την εξέλιξη και άλλων γονιδίων που συμμετείχαν σε αυτό που ονομάζουμε ανθρωπογένεση, όπως επί παραδείγματι γονίδια πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μέγεθος και την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Evans και συν. 2004 a,b, Dorus και συν. 2004, Zhang και συν. 2011). Επίσης, έχει δειχθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός από γονίδια που παρήχθησαν με ρετρομετάθεση και, αναλαμβάνοντας λειτουργικό ρόλο, τροποποιήθηκαν με τρόπο ωθούμενο από την εξέλιξη στα πρωτεύοντα, έχουν πλούσια έκφραση -δυσανάλογη εν σχέσει με άλλους ιστούς- στους όρχεις (όπως είδαμε ότι ισχύει και για το *GLUD2*), πιθανώς έχοντας ρόλο και στη σπερματογένεση (Marques και συν. 2005). Κατά συνέπεια, φαίνεται πως η δημιουργία και η εξέλιξη του *GLUD2* συμπίπτει χρονικά με μία περίοδο επιτάχυνσης της εξελικτικής διαδικασίας των ανώτερων πρωτευόντων και ενδεχομένως έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή της ανθρωπογένεσης.

Σ' αυτή τη σταδιακή διαφοροποίηση των γονιδίων (βλ. εισαγωγή, υποκεφάλαιο 1.3.1 και εικόνα 1.8), όπως υπολόγισαν οι Burki και Kaessmann βάσει του αριθμού συνωνύμων και μή συνωνύμων μεταλλάξεων, οι αμινοξικές αλλαγές Ala3Val, Glu34Lys, Asp142Glu, Ser174Asn, Arg443Ser, Gly456Ala και Asn498Ser που έγιναν στο πρώτο στάδιο (αμέσως μετά τη ρετρομετάθεση του *GLUD2* και πριν την απόσχιση των επί μέρους κλάδων του φυλογενετικού του δέντρου) και οι αμινοξικές αλλαγές Val3Leu, Arg39Gln, Lys299Arg, Ser331Thr, Met370Leu και Arg470His, που έλαβαν χώρα στο αμέσως επόμενο στάδιο (μετά την απόσχιση του κλάδου του *GLUD2* του γίββωνα), φαίνεται να έλαβαν χώρα κάτω πίεση της φυσικής επιλογής. Από αυτές τις αλλαγές, οι μόνες για τις οποίες γνωρίζαμε πριν την έναρξη της παρούσης διατριβής τον λειτουργικό τους ρόλο ήταν οι Arg443Ser και Gly456Ala στην αλλοστερική περιοχή του ενζύμου. Είναι σαφές όμως ότι, όπως είδαμε και στα

αποτελέσματα, η hGDH1-Arg443Ser/Gly456Ala τελικά δεν αποτελεί επαρκή «προσομοίωση» της hGDH2, κυρίως όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα αλλά και όσον αφορά τη σταθερότητα και τη ρύθμιση από λευκίνη και οιστρογόνα. Με την παρούσα μελέτη δείξαμε ότι όχι μόνο αυτές οι δύο μεταλλάξεις, αλλά ότι και όλες μαζί οι μεταλλάξεις στην αλλοστερική περιοχή του ενζύμου, δεν επαρκούν για να αναπαράγουν τις ιδιότητες της hGDH2, καθώς μεταλλάξεις εκτός αυτής της περιοχής, όπως η Ser174Asn, είναι απαραίτητα συστατικά της. Αρκετές ακόμη από τις μεταλλάξεις που έγιναν πιθανότατα υπό «εξελικτική πίεση» στα πρώτα στάδια της εξέλιξης του γονιδίου, όπως οι Glu34Lys και Arg39Gln, αλλά ενδεχομένως και οι Asp142Glu και Ser331Thr (βλ. πίνακα 5.1), φαίνεται ότι επίσης εξυπηρετούν τη ρύθμιση της βασικής δραστηριότητας και της σταθερότητας του ενζύμου, πράγμα που τονίζει τη σημασία αυτών των ιδιοτήτων. Επιπλέον, φαίνεται ότι ακόμη και μεταλλάξεις που έγιναν στα τελευταία στάδια της εξέλιξης, όπως η Met415Leu, για τις οποίες από τα αποτελέσματα των Burki και Kaessmann δεν μπορεί να συναχθεί η ύπαρξη «εξελικτικής πίεσης» κατά τη δημιουργία τους, πιθανώς εξυπηρετούν και αυτές τη λεπτή ρύθμιση αυτών των ιδιοτήτων, δηλ. της βασικής δραστηριότητας και της σταθερότητας. Ας σημειωθεί, πάντως, ότι και στους παράλληλους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου του *GLUD2* υπάρχουν μεταλλάξεις που, όπως είδαμε στη διατριβή μας, τροποποιούν τη βασική δραστηριότητα, όπως επί παραδείγματι η αλλαγή Gln441Arg στη GDH2 του ουραγκοτάγκου (βλ. εικ. 1.8).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας έρχονται προς επίρρωση των γενετικών μελετών για να δείξουν ότι, μετά τη δημιουργία του *GLUD2* από ένα τυχαίο γεγονός, η περαιτέρω εξέλιξή του (χωρίς να παραβλέπουμε το ρόλο των τυχαίων μεταλλάξεων ως υπόστρωμα της φυσικής επιλογής) ήταν μια διαδικασία κάθε άλλο παρά τυχαία, και ότι, μεταξύ άλλων, η λεπτομερής ρύθμιση της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 ήταν ένα από τα «ζητούμενα» της φυσικής επιλογής προς τους μακρινούς μας προγόνους.

## 5.7. Ο πιθανός ρόλος της αμινοξικής αλλαγής Ser445Ala στη νευροεκφύλιση

Μετά τα όσα προαναφέραμε για τη σημασία της βασικής δραστηριότητας της hGDH2 στην εξέλιξη, έπεται ότι η απορρύθμιση της δραστηριότητας της hGDH2 θα μπορούσε να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Δεν έχει γίνει μέχρι τώρα διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της hGDH2 σε παθολογίες σχετιζόμενες με τα λοιπά όργανα στα οποία γνωρίζουμε ότι εκφράζεται, όπως λ.χ. των όρχεων, των νεφρών ή των επινεφριδίων. Γνωρίζουμε, όμως, από μελέτες του εργαστηρίου μας, ότι η αυξημένη δραστηριότητα της hGDH2-Ser445Ala, που προκύπτει από τον πολυμορφισμό T1492G του *GLUD2*, επισπεύδει την εκδήλωση της νόσου του Πάρκινσον σε ημίζυγους άρρενες (Καναβούρας 2004, Plaitakis και συν. 2010).

Με ποιό μηχανισμό όμως μπορεί να διαμεσολαβείται αυτή η, έστω και ήπια, επιταχυντική της νευροεκφύλισης δράση; Στην περίπτωση της μειωμένης δραστηριότητας της γλουταμικής αφυδρογονάσης, που είχε συσχετισθεί στο παρελθόν με ελαιογεφυροπαρεγκεφαλιδικές ατροφίες (Plaitakis και Nicklas 1980, Duvoisin και συν. 1983), αν και δεν έχει διευκρινιστεί το ακριβές γενετικό και μεταβολικό υπόστρωμα των συγκεκριμένων σχετιζόμενων με τη GDH παθολογιών, η νευροεκφύλιση θα μπορούσε να αποδοθεί σε κλασικούς μηχανισμούς διεγερτοτοξικότητας (Plaitakis και συν. 1984): επί ανεπάρκειας της γλουταμικής αφυδρογονάσης, η περίσσεια του (μή καταβολιζόμενου μέσω του κύκλου του Krebs) γλουταμικού υπερτροφοδοτεί μέσω της συνθάσης της γλουταμίνης τον κύκλο γλουταμίνης-γλουταμικού μεταξύ αστροκυττάρου και νευρώνα, με αποτέλεσμα την αύξηση των διαθέσιμων ποσοτήτων γλουταμικού στη σύναψη, την αυξημένη ενεργοποίηση των γλουταματεργικών μετασυναπτικών υποδοχέων με συνακόλουθη αύξηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων ασβεστίου και κινητοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου (βλ. ενδεικτικά Beal 1992, Ancarcrona και συν. 1995).

Αλλά με ποιό μηχανισμό θα μπορούσε να ερμηνευτεί η δυσμενής επίδραση της αυξημένης δραστηριότητας της GDH; Εδώ, αν και δεν έχουμε ένα ολοκληρωμένο μοντέλο, ούτε πειραματικές αποδείξεις, το κλειδί μπορεί να βρίσκεται στην απορρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η σποραδική μορφή της Νόσου του Πάρκινσον είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, και έχει προταθεί ότι μία πληθώρα παραγόντων παίζουν ρόλο στην παθογένεια· πολλοί από τους παράγοντες αυτούς,



τόσο τους γενετικούς όσο και τους περιβαλλοντικούς, αφορούν τη δυσλειτουργία των οξειδοαναγωγικών λειτουργιών των μιτοχονδρίων, που έχει ποικιλοτρόπως συσχετισθεί με τους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου (Jenner 2003, Litvan συν. 2007, Sterky και συν. 2011). Έτσι, επί παραδείγματι, παρ' ότι, επί φυσιολογικής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας, ο καταβολισμός γλουταμικού για την παραγωγή NADPH (διά εμμέσων οδών) με τελικό στόχο τη σύνθεση γλουταθειόνης, θεωρείται ότι προστατεύει τις νευρικές απολήξεις από το οξειδωτικό stress (Tretter και συν. 2003), επί προϋπάρχουσας μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας ο αυξημένος αστροκυτταρικός καταβολισμός γλουταμικού μέσω της GDH θα μπορούσε, αντίθετα, να οδηγήσει στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως έχει προταθεί στο παρελθόν για το πειραματικό μοντέλο Νόσου Πάρκινσον από χορήγηση ροτενόνης (Panon και συν. 2005, Xiong και συν. 2012). Μια εντελώς διαφορετική, φαινομενικά παράδοξη πιθανότητα, είναι η κινητοποίηση μηχανισμών διεγερτοτοξικότητας στα πλαίσια της αυξημένης σύνθεσης και απελευθέρωσης γλουταμικού στη σύναψη, όχι παρά την, αλλά ακριβώς λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Αυτό ακριβώς, δηλαδή αυξημένη συναπτική έκκριση γλουταμικού και συγκέντρωσή του στον εγκεφαλικό ιστό, παρατηρήθηκε *in vivo* κατά την υπερέκφραση του *GLUD1* στους νευρώνες διαγονιδιακών ποντικών (Bao και συν. 2009, Michaelis και συν. 2011), με συνοδές μορφολογικές συναπτικές αλλοιώσεις. Πέραν του ότι δεν έχει δοθεί μια σαφής ερμηνεία του φαινομένου, δεν είναι διόλου σίγουρο κατά πόσο ο μηχανισμός αυτός θα λειτουργούσε επί υπερέκφρασης της GDH στα αστροκύτταρα, όπου και η κυριότερη εντόπιση της hGDH2 σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής δεδομένα (Plaitakis και συν. 2011). Έτσι, όλοι αυτοί οι μηχανισμοί είναι υποθετικοί και επί του παρόντος οφείλουμε να ομολογήσουμε ότι δεν γνωρίζουμε τον τρόπο με τον οποίο η γλουταμική αφυδρογονάση εμπλέκεται στην παθογένεια της νευρολογικής νόσου. Η περαιτέρω έρευνα πάνω στον ακριβή ρόλο της hGDH1 και της hGDH2 στον εγκέφαλο θα βοηθήσει να απαντηθεί το ερώτημα αυτό στο μέλλον.

## **6. Βιβλιογραφία**

### **A. Ξενόγλωσση**

Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 2007; 282(46):33583-92.

Allen A, Kwagh J, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry.* 2004; 43(45):14431-43.

Anagnou N, Seuanez H, Modi W, O'Brien S, Papamatheakis J, Moschonas N. Chromosomal mapping of two members of the human glutamate dehydrogenase (GLUD) gene family to chromosomes 10q22.3-q23 and Xq22-q23. *Hum Hered.* 1993; 43:351-6.

Andersen SS. Expression and purification of recombinant vesicular glutamate transporter VGLUT1 using PC12 cells and High-5 insect cells. *Biol Proced Online.* 2004; 6:105-12.

Andersson JO, Roger AJ. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evol Biol.* 2003; 3:14.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995; 15(4):961-73.

Aoki C, Milner T, Berger S, Sheu K, Blass J, Pickel V. Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J Neurosci Res* 1987; 18:305-18.

Aso K, Okano Y, Takeda T, Sakamoto O, Ban K, Iida K, Yamano T, Shintaku H. Spectrum of glutamate dehydrogenase mutations in Japanese patients with congenital hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome. *Osaka City Med J.* 2011; 57(1):1-9.

Bahi-Buisson N, Roze E, Dionisi C, Escande F, Valayannopoulos V, Feillet F, Heinrichs C, Chadefaux-Vekemans B, Dan B, de Lonlay P. Neurological aspects of hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2008; 50:945-9.

Bahi-Buisson N, El Sabbagh S, Soufflet C, Escande F, Boddaert N, Valayannopoulos V, Bellané-Chantelot C, Lascelles K, Dulac O, Plouin P, de Lonlay P. Myoclonic absence epilepsy with photosensitivity and a gain of function mutation in glutamate dehydrogenase. *Seizure.* 2008; 17(7):658-64.

Bailey J, Bell ET, Bell JE. Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. The effects of pH and ADP. *J Biol Chem.* 1982; 257(10):5579-83.

- Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry*. 2003; 42(12):3446-3456.
- 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. 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*. 2009; 29(44):13929-13944.
- Bardereri P, Campetella O, Frasch A, et al. The NADP<sup>+</sup>-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J* 1998; 330:351-358.
- Beal MF. Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin Neurobiol*. 1992; 2(5):657-62.
- Bitensky MW, Yielding KL, Tomkins GM. The Effect of Allosteric Modifiers on the Rate of Denaturation of Glutamate Dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1965; 240(3):1077-82.
- Blumenthal KM, Moon K, Smith EL. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J Biol Chem*. 1975; 250(10):3644-54.
- Boots SG, Franklin MA, Dunlavey B, Costello J, Lipsitz C, Boots MR, Rogers KS. Synthesis of 5-substituted isophthalic acids and competitive inhibition studies with bovine liver glutamate dehydrogenase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1976; 151(2):316-20.
- Borompokas N, Papachatzaki MM, Kanavouras K, Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Plaitakis A. Estrogen modification of human glutamate dehydrogenases is linked to enzyme activation state. *J Biol Chem*. 2010; 285(41):31380-7.
- Britton KL, Baker PJ, Rice DW, Stillman TJ. Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *Eur J Biochem*. 1992; 209(3):851-9.
- Burki F, Kaessmann H. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet*. 2004; 36:1061-1063.
- Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis*. 2002; 17(4):221-7.
- Carneiro V, Caldas R. Regulatory studies of L-glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B* 1983; 75:61-4.
- Cassman M, Schachman HK. Sedimentation equilibrium studies on glutamic dehydrogenase. *Biochemistry*. 1971; 10(6):1015-1024.
- Caughey WS, Smiley JD, Hellerman L. L-glutamic acid dehydrogenase: Structural requirements for substrate competition: Effects of Thyroxine *J Biol Chem*. 1957; 224:591-607
- Chee P, Dahl J, Fahien L. The purification and properties of rat brain glutamate dehydrogenase. *J Neurochem* 1979; 33:53-60.

- Choi MM, Kim EA, Yang SJ, Choi SY, Cho SW, Huh JW. Amino acid changes within antenna helix are responsible for different regulatory preferences of human glutamate dehydrogenase isozymes. *J Biol Chem.* 2007; 282(27):19510-19517.
- Choi MM, Hwang EY, Kim EA, Huh JW, Cho SW. Identification of amino acid residues responsible for different GTP preferences of human glutamate dehydrogenase isozymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 368(3):742-747.
- Chokroverty S, Nicklas W, Miller D, et al. Multiple system degeneration with glutamate dehydrogenase deficiency: pathology and biochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53:1099-101.
- Colon AD, Plaitakis A, Perakis A, Berl S, Clarke DD. Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem.* 1986; 46(6):1811-1819.
- Cooper AJ, McDonald JM, Gelbard AS, Gledhill RF, Duffy TE. The metabolic fate of <sup>13</sup>N-labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:4982-4992.
- Cooper AJ. <sup>13</sup>N as a tracer for studying glutamate metabolism. *Neurochem Int.* 2011; 59(4):456-64.
- Couee I, Tipton KF. The inhibition of glutamate dehydrogenase by some antipsychotic drugs. *Biochemical Pharmacology* 1990; 39:827-832.
- Couee I, Tipton KF. Inhibition of ox brain glutamate dehydrogenase by perphenazine. *Biochemical Pharmacology* 1990; 39:1167-1173.
- Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.* 2000; 130(4S Suppl):1026S-31S.
- Dalziel K, Engel PC. Antagonistic homotropic interactions as a possible explanation of coenzyme activation of glutamate dehydrogenase. *FEBS Letters* 1968; 1:349-352.
- De las Heras J, Garin I, de Nanclares GP, Aguayo A, Rica I, Castaño L, Vela A. Familial hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome in a family with seizures: case report. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010; 23(8):827-30.
- De Lonlay P, Benelli C, Fouque F, Ganguly A, Aral B, Dionisi-Vici C, Touati G, Heinrichs C, Rabier D, Kamoun P, Robert JJ, Stanley C, Saudubray JM. Hyperinsulinism and hyperammonemia syndrome: report of twelve unrelated patients. *Pediatr Res.* 2001; 50(3):353-7.
- Deloukas P, Dauwerse JG, Moschonas NK, van Ommen GJB, van Loon APGM. Three Human Glutamate Dehydrogenase Genes (GLUD1, GLUDP2, and GLUDP3) Are Located on Chromosome 10q, but Are Not Closely Physically Linked. *Genomics* 1993; 17:676-681.
- Desclin J, Escubi J. Effects of 3-acetylpyridine on the central nervous system of the rat, as demonstrated by silver methods. *Brain Res* 1974; 77:349-64.
- Dessen P, Pantaloni D. Glutamate dehydrogenase. Modification of polyhexamers due to coenzymes and specific effective substances. *Eur J Biochem.* 1973; 39(1):157-69.

- Dieter H, Koberstein R, Sund H. Studies of glutamate dehydrogenase. The interaction of ADP, GTP, and NADPH in complexes with glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1981; 115(1):217-26.
- Di Prisco G, Arfin SM, Strecker HJ. Studies on the nature of the inhibition of Glutamic Dehydrogenase by N-2-Fluorenylacetamide and other compounds. *J Biol Chem.* 1965; 240(4):1611-5.
- Di Prisco G, Strecker HJ. Effects of phosphate and other ionic compounds on the activity of crystalline beef liver glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1969; 9(4):507-11.
- Di Prisco G. Effect of pH and ionic strength on the catalytic and allosteric properties of native and chemically modified ox liver mitochondrial glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1975; 171(2):604-12.
- Dorus S, Vallender EJ, Evans PD, Anderson JR, Gilbert SL, Mahowald M, Wyckoff GJ, Malcom CM, Lahn BT. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell.* 2004; 119(7):1027-40.
- Dutuit M, Didier-Bazès M, Vergnes M, Mutin M, Conjard A, Akaoka H, Belin MF, Touret M. Specific alteration in the expression of glial fibrillary acidic protein, glutamate dehydrogenase, and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy. *Glia.* 2000; 32(1):15-24.
- Duvoisin RC, Chokroverty S, Lepore F, Nicklas W. Glutamate dehydrogenase deficiency in patients with olivopontocerebellar atrophy. *Neurology.* 1983; 33(10):1322-1326.
- Engel PC, Dalziel K. Kinetic studies of glutamate dehydrogenase with glutamate and norvaline as substrates. Coenzyme activation and negative homotropic interactions in allosteric enzymes. *Biochem J.* 1969; 115(4):621-31.
- Evans PD, Anderson JR, Vallender EJ, Gilbert SL, Malcom CM, Dorus S, Lahn BT. Adaptive evolution of ASPM, a major determinant of cerebral cortical size in humans. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(5):489-494.
- Evans PD, Anderson JR, Vallender EJ, Choi SS, Lahn BT. Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(11):1139-1145.
- Fahien LA, Kmietek E. Regulation of glutamate dehydrogenase by palmitoyl-coenzyme A. *Arch Biochem Biophys.* 1981; 212(1):247-53.
- Fahien LA, Kmietek EH, Woldegiorgis G, Evenson M, Shrago E, Marshall M. Regulation of aminotransferase-glutamate dehydrogenase interactions by carbamyl phosphate synthase-I, Mg<sup>2+</sup> plus leucine versus citrate and malate. *J Biol Chem.* 1985; 260(10):6069-79.
- Fahien LA, MacDonald MJ, Kmietek EH, Mertz RJ, Fahien CM. Regulation of insulin release by factors that also modify glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1988; 263(27):13610-4.
- Fahien LA, Teller J, Macdonald M, Fahien C. Regulation of glutamate dehydrogenase by Mg<sup>2+</sup> and magnification of leucine activation by Mg<sup>2+</sup>. *Mol Pharmacol* 1990; 37:943-9.

- Fang J, Hsu BY, MacMullen CM, Poncz M, Smith TJ, Stanley CA. Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem J.* 2002; 363(Pt1):81-87.
- Fisher HF, Cross DG, McGregor LL. Catalytic activity of sub-units of glutamic dehydrogenase. *Nature.* 1962; 196:895-896.
- Fisher HF, Cross DG, McGregor LL. The independence of the substrate specificity of glutamate dehydrogenase on its state of aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 1965; 99:165-167.
- Fisher HF, Culver JM, Prough RA. The independence of adenosine-5'-diphosphate binding and the state of association of L-glutamate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 46(3):1462-1468
- Frieden C. Glutamic dehydrogenase. I. The effect of coenzyme on the sedimentation velocity and kinetic behavior. *J Biol Chem.* 1959; 234(4):809-814.
- Frieden C. Glutamic dehydrogenase. II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. *J Biol Chem.* 1959; 234(4):815-820.
- Frieden C. The unusual inhibition of glutamate dehydrogenase by guanosine di- and triphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1962; 59:484-486.
- Frieden C. The effect of pH and other variables on the dissociation of beef liver glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1962; 237(4):2396-2400.
- Frieden C. Glutamate dehydrogenase. V. The relation of enzyme structure to the catalytic function. *J Biol Chem.* 1963; 238(10):3286-3299.
- Frieden C. Glutamate Dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. *J. Biol. Chem.* 1965; 240:2028-2035.
- Fujioka H, Okano Y, Inada H, et al. Molecular characterisation of glutamate dehydrogenase gene defects in Japanese patients with congenital hyperinsulinism-hyperammonaemia. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:931-7.
- Gauper FP, Markau K, Sund H. Studies of glutamate dehydrogenase. The influence of salts and organic solvents on the thermodynamic parameters of the association-dissociation equilibrium of beef-liver glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1974; 49(3):555-63.
- Ghous T, Townshend A. Flow injection determination of chlorpromazine by inhibition of glutamate dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta* 1999; 387:47-51.
- Ghous T, Townshend A. Flow injection method for the determination of thyroxine by inhibition of glutamate dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta* 2000; 411:45-49.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006; 126(5):941-54.

- Hammer J, Alvestad S, Osen KK, Skare Ø, Sonnewald U, Ottersen OP. Expression of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the latent phase and chronic phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Glia*. 2008; 56(8):856-68.
- Hamza TH, Chen H, Hill-Burns EM, Rhodes SL, Montimurro J, Kay DM, Tenesa A, Kusel VI, Sheehan P, Eaaswarkhanth M, Yearout D, Samii A, Roberts JW, Agarwal P, Bordelon Y, Park Y, Wang L, Gao J, Vance JM, Kendler KS, Bacanu SA, Scott WK, Ritz B, Nutt J, Factor SA, Zabetian CP, Payami H. Genome-wide gene-environment study identifies glutamate receptor gene GRIN2A as a Parkinson's disease modifier gene via interaction with coffee. *PLoS Genet*. 2011; 7(8):e1002237.
- Hellerman L, Schellenberg KA, Reiss OK. L-glutamic acid dehydrogenase. II. Role of enzyme sulfhydryl groups. *J Biol Chem*. 1958; 233(6):1468-78.
- Herrero-Yraola A, Bakhit SM, Franke P, Weise C, Schweiger M, Jorcke D, Ziegler M. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J*. 2001 May; 20(10):2404-12.
- Hornby D, Aitchison M, Engel P. The kinetic mechanism of ox liver glutamate dehydrogenase in the presence of the allosteric effector ADP. The oxidative deamination of L-glutamate. *Biochem J* 1984; 223:161-8.
- Huang CY, Frieden C. Rates of GDP-induced and GTP-induced depolymerization of glutamate dehydrogenase: a possible factor in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969; 64(1):338-44.
- Huang CY, Frieden C. The mechanism of ligand-induced structural changes in glutamate dehydrogenase. Studies of the rate of depolymerization and isomerization effected by coenzymes and guanine nucleotides. *J Biol Chem*. 1972; 247(11):3638-46.
- Hudson R, Daniel R. L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp Biochem Physiol B*. 1993; 106:767-92.
- Hussain M, Zannis V, Plaitakis A. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J. Biol. Chem*. 1989; 264(34):20730-20735.
- Hutson SM, Islam MM, Zaganas I. Interaction between glutamate dehydrogenase (GDH) and L-leucine catabolic enzymes: intersecting metabolic pathways. *Neurochem Int*. 2011; 59(4):518-24.
- Islam MM, Nautiyal M, Wynn RM, Mobley JA, Chuang DT, Hutson SM. Branched-chain amino acid metabolon: interaction of glutamate dehydrogenase with the mitochondrial branched-chain aminotransferase (BCATm). *J Biol Chem*. 2010; 285(1):265-76.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003; 53 Suppl 3:S26-36
- Josephs R, Eisenberg H, Reisler E.. Some properties of crosslinked polymers of glutamic dehydrogenase. *Biochemistry*. 1973; 12:4060-4067.

Julliard JH, Smith EL. Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:3427-3438.

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(15):3398-3406.

Kanavouras K, Spanaki C, Zaganas I, Papachatzaki MM, Plaitakis A. Substitution of Serine 445 by Alanine in the GLUD-2 gene encoding neural tissue-specific glutamate dehydrogenase associated with early onset Parkinson's Disease in male hemizygotic carriers. Presented in: Second Aegean Meeting on Neurological Therapeutics, 23-25 May 2006, Heraklion, Greece

Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kim DW, Choi SY, Kwon OS. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia.* 2006; 54(4):258-71.

Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principles of Neural Science.* New York: McGraw-Hill, 2000:1-1414.

Kapoor RR, Flanagan SE, Fulton P, Chakrapani A, Chadeaux B, Ben-Omran T, Banerjee I, Shield JP, Ellard S, Hussain K. Hyperinsulinism-hyperammonaemia syndrome: novel mutations in the GLUD1 gene and genotype-phenotype correlations. *Eur J Endocrinol.* 2009; 161(5):731-5.

Kawaguchi A, Bloch K. Inhibition of glutamate dehydrogenase and malate dehydrogenases by palmitoyl coenzyme A. *J Biol Chem.* 1976; 251(5):1406-12.

Kelly A, Stanley C. Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7:287-95.

Kempfle M, Mosebach K-O, Winkler H. The concentration dependence of the activity of beef liver glutamate dehydrogenase as measured by rapid mixing and ultracentrifugation techniques. *FEBS Letters* 1972; 19:301-304.

Konagaya Y, Konagaya M, Takayanagi T. Glutamate dehydrogenase and its isozyme activity in olivopontocerebellar atrophy. *J Neurol Sci* 1986; 74:231-6.

Kovár J. Interaction of bovine glutamate dehydrogenase with isoquinoline alkaloids. *Arch Biochem Biophys.* 1983; 221(1):271-80.

Kubo H, Iwatsubo M, Watari H, Soyama T. Sur la polymerization et la forme moleculaire de la Glutamico-deshydrogenase. *J Biochem (Tokyo).* 1959; 46(9):1171-1185.

Kuo N, Michalik M, Erecinska M. Inhibition of Glutamate Dehydrogenase in Brain Mitochondria and Synaptosomes by Mg<sup>2+</sup> and Polyamines: A Possible Cause for Its Low In Vivo Activity. *J Neurochem* 1994; 63:751-757.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.



- Lee EY, Huh JW, Yang SJ, Choi SY, Cho SW, Choi HJ. Histidine 454 plays an important role in polymerization of human glutamate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 2003; 540:163-66.
- Li C, Allen A, Kwagh J, Doliba NM, Qin W, Najafi H, Collins HW, Matschinsky FM, Stanley CA, Smith TJ. Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2006; 281(15):10214-21.
- Li M, Allen A, Smith TJ. High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors. *Biochemistry.* 2007; 46(51):15089-102.
- Li M, Smith CJ, Walker MT, Smith TJ. Novel inhibitors complexed with glutamate dehydrogenase: allosteric regulation by control of protein dynamics. *J Biol Chem.* 2009; 284(34):22988-23000.
- Li C, Li M, Chen P, Narayan S, Matschinsky FM, Bennett MJ, Stanley CA, Smith TJ. Green tea polyphenols control dysregulated glutamate dehydrogenase in transgenic mice by hijacking the ADP activation site. *J Biol Chem.* 2011; 286(39):34164-74.
- Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. The structure and allosteric regulation of glutamate dehydrogenase. *Neurochem Int.* 2011; 59(4):445-455
- Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 2012; 519(2):69-80.
- Lilley KS, Baker PJ, Britton KL, Stillman TJ, Brown PE, Moir AJ, Engel PC, Rice DW, Bell JE, Bell E. The partial amino acid sequence of the NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*: implications for the evolution and structural basis of coenzyme specificity. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1080(3):191-7.
- Litvan I, Chesselet MF, Gasser T, Di Monte DA, Parker D Jr, Hagg T, Hardy J, Jenner P, Myers RH, Price D, Hallett M, Langston WJ, Lang AE, Halliday G, Rocca W, Duyckaerts C, Dickson DW, Ben-Shlomo Y, Goetz CG, Melamed E. The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research. Part II. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007; 66(5):329-36.
- Liu C, Grandes P, Matute C, Cuenod M, Streit P. Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry* 1989; 90:427-45.
- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(12):6803-6808.
- Lowry O, Rosebrough N, Far A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- Lu CD, Abdelal AT. The *gdhB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an arginine-inducible NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase which is subject to allosteric regulation. *J Bacteriol.* 2001; 183(2):490-9.
- MacMullen C, Fang J, Hsu BY, Kelly A, de Lonlay-Debeney P, Saudubray JM, Ganguly A, Smith TJ, Stanley CA. Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with

- regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate-binding domain of glutamate dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(4):1782-7.
- Malthankar-Phatak GH, de Lanerolle N, Eid T, Spencer DD, Behar KL, Spencer SS, Kim JH, Lai JC. Differential glutamate dehydrogenase (GDH) activity profile in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2006;47(8):1292-9.
- Markau K, Schneider J, Sund H. Studies of glutamate dehydrogenase. The mechanism of the association-dissociation equilibrium of beef-liver glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1971; 24(2):393-400.
- Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res.* 2005; 79(1-2):65-73.
- Mastorodemos V, Kotzamani D, Zaganas I, Arianoglou G, Latsoudis H, Plaitakis A. Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol.* 2009; 87(3):505-16.
- Marques AC, Dupanloup I, Vinckenbosch N, Reymond A, Kaessmann H. Emergence of young human genes after a burst of retroposition in primates. *PLoS Biol.* 2005; 3(11):e357.
- Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N. 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.
- McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.* 2007 Nov 15;85(15):3347-58.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem.* 1996; 66(1):386-93.
- Michaelidis TM, Tzimagiorgis G, Moschonas NK, Papamatheakis J. The Human Glutamate Dehydrogenase Gene Family: Gene Organization and Structural Characterization. *Genomics* 1993; 16:150-160.
- Michaelis EK, Wang X, Pal R, Bao X, Hascup KN, Wang Y, Wang WT, Hui D, Agbas A, Choi IY, Belousov A, Gerhardt GA. Neuronal Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) over-expressing mice: increased glutamate formation and synaptic release, loss of synaptic activity, and adaptive changes in genomic expression. *Neurochem Int.* 2011; 59(4):473-81.
- Miki Y, Taki T, Ohura T, Kato H, Yanagisawa M, Hayashi Y. Novel missense mutations in the glutamate dehydrogenase gene in the congenital hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. *J Pediatr* 2000; 136:69-72.
- Olson JA, Anfinsen CB. The crystallization and characterization of L-glutamic acid dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1953; 202(2):841-856.
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem.* 2005; 280(51):42026-35.

- Pantaloni D, Dessen P. Glutamate dehydrogenase. Attachment of NAD and NADP coenzymes and other nucleotides derived from adenosine-5'-phosphate. *Eur J Biochem.* 1969; 11(3):510-519.
- Peterson PE, Smith TJ. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure.* 1999; 7(7):769-782.
- Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann Neurol.* 1984; 15(2):144-53.
- Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem Int.* 2003; 43(4-5):401-10.
- 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. Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(3):336-41.
- Plaitakis A, Latsoudis H, Spanaki C. The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease. *Neurochem Int.* 2011; 59(4):495-509.
- Plaitakis A, Metaxari M, Shashidharan P. Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J Neurochem.* 2000; 75(5):1862-1869.
- Plaitakis A, Nicklas W, Desnick R. Glutamate dehydrogenase deficiency in three patients with spinocerebellar syndrome. *Ann Neurol* 1980; 7(4):297-303.
- Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247:II25-35.
- Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem Int.* 2003; 43(4-5):401-410.
- Raizen DM, Brooks-Kayal A, Steinkrauss L, Tennekoon GI, Stanley CA, Kelly A. Central nervous system hyperexcitability associated with glutamate dehydrogenase gain of function mutations. *J Pediatr.* 2005;146(3):388-94.
- Ramshesh VK, Lemasters JJ. Imaging of mitochondrial pH using SNARF-1. *Methods Mol Biol.* 2012; 810:243-248.
- Reisler E, Eisenberg H. Bovine liver glutamate dehydrogenase association and dependence of association on temperature. *Biochemistry.* 1971; 10(14):2659-2663.
- Rosso L, Marques AC, Reichert AS, Kaessmann H. Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS Genet.* 2008; 4(8):e1000150.

- Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 1994; 62:1133-1146.
- Santer R, Kinner M, Passarge M, et al. Novel missense mutations outside the allosteric domain of glutamate dehydrogenase are prevalent in European patients with the congenital hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome. *Hum Genet* 2001; 108:66-71.
- Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochem* 1994; 217: 220-230.
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(9):5460-4.
- Shashidharan P, Michaelidis T, Robakis N, 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(24):16971-16976.
- 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(5):1804-1811.
- Shemisa OA, Fahien LA. Modifications of glutamate dehydrogenase by various drugs which affect behavior. *Mol Pharmacol.* 1971; 7(1):8-25.
- Smith EL, Piszkiwicz D. Bovine Glutamate Dehydrogenase. The pH dependence of native and nitrated enzyme in the presence of allosteric modifiers. *J. Biol. Chem.* 1973; 248:3089-3092.
- Shen J. In vivo carbon-13 magnetization transfer effect. Detection of aspartate aminotransferase reaction. *Magn Reson Med.* 2005; 54(6):1321-6.
- Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate Dehydrogenase. In: *The Enzymes* (Boyer PD editor). 1975. Vol. 11: 293-367. New York, Academic Press Inc.
- Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J Mol Biol.* 2001 307(2):707-720.
- Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley CA. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J Mol Biol.* 2002; 318(3):765-777.
- Smits RA, Pieper FR, Van der Drift C. Purification of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and immunochemical characterization of its in vivo inactivation. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 801(1):32-39.
- Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 1997; 21(1):56-63.

- Sorbi S, Tonini S, Giannini E, Piacentini S, Marini P, Amaducci L. Abnormal platelet glutamate dehydrogenase activity and activation in dominant and nondominant olivopontocerebellar atrophy. *Ann Neurol* 1986; 19:239-45.
- Spanaki C, Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox Res.* 2012; 21(1):117-27.
- Spanaki C, Zaganas I, Kleopa KA, Plaitakis A. Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(22):16748-56.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med.* 1998; 338(19):1352-7.
- Stanley CA, Fang J, Kutyna K, Hsu BY, Ming JE, Glaser B, Poncz M. Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: predominance of mutations in exons 11 and 12 of the glutamate dehydrogenase gene. *HI/HA Contributing Investigators. Diabetes* 2000; 49: 667-673.
- Stanley CA. Two genetic forms of hyperinsulinemic hypoglycemia caused by dysregulation of glutamate dehydrogenase. *Neurochem Int.* 2011; 59(4):465-72.
- Sterky FH, Lee S, Wibom R, Olson L, Larsson NG. Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(31):12937-42.
- Stillman TJ, Baker PJ, Britton KL, Rice DW. Conformational Flexibility in Glutamate Dehydrogenase : Role of Water in Substrate Recognition and Catalysis. *Journal of Molecular Biology* 1993; 234:1131-1139.
- Stillman TJ, Migueis AMB, Wang X-G, et al. Insights into the mechanism of domain closure and substrate specificity of glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*1. *Journal of Molecular Biology* 1999; 285:875-885.
- Strambini GB, Cioni P, Puntoni A. Relationship between the conformation of glutamate dehydrogenase, the state of association of its subunit, and catalytic function. *Biochemistry.* 1989; 28(9):3808-3814.
- Subbalakshmi GY, Murthy CR. Isolation of astrocytes, neurons, and synaptosomes of rat brain cortex: distribution of enzymes of glutamate metabolism. *Neurochem Res.* 1985; 10(2):239-50.
- Tamir A, Rigbi M, Levitzki A. The interaction of chlorpromazine and butyrophenones with glutamate dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology* 1981; 30:1469-1473.
- Tanizawa Y, Nakai K, Sasaki T, et al. Unregulated Elevation of Glutamate Dehydrogenase Activity Induces Glutamine-Stimulated Insulin Secretion: Identification and Characterization of a GLUD1 Gene Mutation and Insulin Secretion Studies With MIN6 Cells Overexpressing the Mutant Glutamate Dehydrogenase *Diabetes* 2002; 51:712-717.

Tashiro R, Inoue T, Shimozawa R. Subunit dissociation and unfolding of bovine liver glutamate dehydrogenase induced by guanidine hydrochloride. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 706(1):129-135.

Tatsumi C, Yorifuji S, Kajiyama K, Ueno S, Takahashi M, Tarui S. Glutamate metabolism of leukocytes and skin fibroblasts in spinocerebellar degeneration with lowered glutamate dehydrogenase activity. *Acta Neurol Scand* 1989; 79:468-75.

Tomita T, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2011; 286(43):37406-37413.

Tretter L, Répássy R, Adam-Vizi V. Endogenous glutamate contributes to the maintenance of glutathione level under oxidative stress in isolated nerve terminals. *Neurochem Int*. 2003; 42(5):393-400.

Veronese FM, Nyc JF, Degani Y, Brown DM, Smith EL. Nicotinamide Adenine Dinucleotide-specific Glutamate Dehydrogenase of *Neurospora*. I. Purification and molecular properties. *J. Biol. Chem*. 1974; 249:7922-7928.

Xiong N, Long X, Xiong J, Jia M, Chen C, Huang J, Ghoorah D, Kong X, Lin Z, Wang T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol*. 2012; doi:10.3109/10408444.2012.680431

Westergaard N, Drejer J, Schousboe A, Sonnewald U. Evaluation of the importance of transamination versus deamination in astrocytic metabolism of [U-13C]glutamate. *Glia* 1996; 17:160-8.

Yang S, Huh J, Lee J, Choi S, Kim T, Cho S. Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2538-46.

Yang SJ, Huh JW, Hong HN, Kim TU, Cho SW. Important role of Ser443 in different thermal stability of human glutamate dehydrogenase isozymes. *FEBS Lett*. 2004; 562(1-3):59-64.

Yasuda K, Koda N, Kadowaki H, et al. A Japanese case of congenital hyperinsulinism with hyperammonemia due to a mutation in glutamate dehydrogenase (GLUD1) gene. *Intern Med* 2001; 40:32-7.

Yielding KL, Tomkins GM. Structural Alterations in crystalline Glutamic Dehydrogenase induced by Steroid Hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960; 46(11):1483-1488.

Yielding KL, Tomkins GM. An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1961; 47(10):983-989.

Yorifuji T, Muroi J, Uematsu A, Hiramatsu H, Momoi T. Hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome caused by mutant glutamate dehydrogenase accompanied by novel enzyme kinetics. *Hum Genet* 1999; 104:476-9.

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(29):26422-264228

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(48):46552-46558.

Zatta P, Lain E, Cagnolini C. Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur J Biochem.* 2000; 267(10):3049-55.

Zhang YE, Landback P, Vibranovski MD, Long M. Accelerated recruitment of new brain development genes into the human genome. *PLoS Biol.* 2011; 9(10):e1001179.

## **B. Ελληνική**

Αριάνογλου Ιωάννα, Διπλωματική εργασία για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2011.

Ζαγανάς Ιωάννης, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2005.

Καναβούρας Κωνσταντίνος, Διπλωματική εργασία για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2004.

Κοτζαμάνη Δήμητρα, Διπλωματική εργασία για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2006.

Μαστοροδήμος Βασίλειος, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2007.

Μπορομπόκας Νικόλαος, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2009.

Παπαχατζάκη Μαρία-Μάρθα, Διπλωματική εργασία για το ΜΠΣ Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο, 2006.

## **Γ. Δημοσιεύσεις (σε διεθνή περιοδικά με κριτές) όπου παρουσιάζονται αποτελέσματα της παρούσης διατριβής**

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(5):1101-9

Kanavouras K, Borompokas N, Latsoudis H, Stagourakis A, Zaganas I, Plaitakis A. Mutations in human GLUD2 glutamate dehydrogenase affecting basal activity and regulation. *J Neurochem.* 2009; 109 Suppl 1:167-173.

Zaganas I, Kanavouras K, Mastorodemos V, Latsoudis H, Spanaki C, Plaitakis A. The human GLUD2 glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects. *Neurochem Int.* 2009; 55(1-3):52-63.

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. Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(3):336-41.

Borompokas N, Papachatzaki MM, Kanavouras K, Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Plaitakis A. Estrogen modification of human glutamate dehydrogenases is linked to enzyme activation state. *J Biol Chem.* 2010;285(41):31380-7.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), ένζυμο σημαντικό για το μεταβολισμό του γλουταμικού και με σύνθετη αλλοστερική ρύθμιση, υπάρχει στον άνθρωπο σε δύο ισομορφές: την πανταχού εκφραζόμενη hGDH1 εκ του γονιδίου *GLUD1* και την hGDH2, εκφραζόμενη κυρίως στον εγκέφαλο και τους όρχεις, κωδικοποιούμενη από το γονίδιο *GLUD2*, που προέκυψε από ρετρομετάθεση πριν ~20 εκ. έτη. Παρά την κατά 97% ομολογία και τις μόλις 15 αμινοξικές διαφορές, τα δύο ισοένζυμα διαφέρουν στις ιδιότητές τους: η hGDH2 έχει αρκετά χαμηλότερη βασική δραστηριότητα απουσία ενεργοποιητών, μεγαλύτερη αντοχή στην αναστολή από GTP και μειωμένη θερμοαντοχή.

Στην παρούσα μελέτη διερευνούμε σχέσεις δομής-λειτουργίας των δύο ισοενζύμων μέσω μεταλλαξιογένεσης και λειτουργικής μελέτης μεταλλαγμένων και μη hGDHs. Δείχνουμε ότι η βασική δραστηριότητα της hGDH2 *in vitro* εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου, τη θερμοκρασία και τη σύσταση του διαλύματος. Επίσης, αποδεικνύουμε ότι οι αμινοξικές αλλαγές R443S και G456A στην αλλοστερική περιοχή του ενζύμου, που έχουν συσχετισθεί σε προηγούμενη μελέτη με μηδενισμό της βασικής δραστηριότητας και αυξημένη αντοχή στην αναστολή από GTP αντίστοιχα, δεν αρκούν για να εξηγήσουν τις ιδιότητες της hGDH2: Το διπλό μετάλλαγμα hGDH1-R443S/G456A έχει βασική δραστηριότητα και θερμοαντοχή πολύ χαμηλότερες της hGDH2, ενώ δεν ενεργοποιείται από λευκίνη. Ένα χιμαιρικό ένζυμο που φέρει και τις 4 αλλαγές στην αλλοστερική περιοχή (hGDH1-M415L/R443S/G456A/R470H), επίσης δεν αναπαράγει τις ιδιότητες της hGDH2. Η αμινοξική αλλαγή S174N, όμως, προστιθέμενη στο διπλό μετάλλαγμα R443S/G456A, κάνει το ένζυμο δεκτικό στην ενεργοποίηση από λευκίνη, ενώ αυξάνει τη βασική δραστηριότητα και τη θερμοαντοχή του. Άρα, αμινοξικές διαφορές εκτός της αλλοστερικής περιοχής είναι κομβικές για τις ιδιότητες της hGDH2. Επίσης, δείχνουμε ότι η βασική δραστηριότητα, η θερμοαντοχή και η αντίσταση στην αναστολή από οιστρογόνα συνδέονται με αναλογική σχέση μεταξύ τους.

Τέλος, ο πολυμορφισμός S445A της hGDH2, που συνδέεται με ταχύτερη έναρξη Νόσου του Πάρκινσον, πιθανότατα δρά μέσω αύξησης της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ η αναστολή από GTP δεν επηρεάζεται. Μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή (Q441R, S445L, S448P, K450E, H454Y) που προκαλούν σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας όταν επισυμβούν στη hGDH1, αυξάνοντας την αντοχή της στο GTP, δεν έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα στη ρύθμιση της hGDH2. Μπορούν, όμως, να μεταβάλλουν τη βασική της δραστηριότητα, ανάλογα με την ακριβή τους εντόπιση.

## ABSTRACT

Glutamate dehydrogenase (GDH), an enzyme central to glutamate metabolism and subject to complex allosteric regulation, exists in humans in two isoforms: the housekeeping hGDH1, encoded by the *GLUD1* gene, and hGDH2, which is expressed mainly in brain and testis and encoded by *GLUD2*, a gene that emerged through retroposition ~20 million years ago. Despite 97% sequence homology, with only 15 aminoacid differences between hGDH1 and hGDH2, the two isoenzymes differ markedly in their properties: hGDH2 displays a substantially lower basal activity in absence of activators, increased resistance to GTP inhibition, and decreased thermostability.

In this work we explore structure-function relationships of the two isoenzymes through mutagenesis and functional studies on wild-type and mutant hGDHs. We show that basal activity of hGDH2 in vitro is dependent on enzyme concentration, temperature and buffer composition. Furthermore, we show that the aminoacid differences R443S and G456A in the allosteric region of the enzyme, shown previously to diminish basal activity and to increase GTP-resistance, respectively, cannot reproduce the unique properties of hGDH2: the hGDH1-R443S/G456A double mutant has much lower basal activity and heat resistance than hGDH2, and is not activated by leucine. A chimeric enzyme, featuring all 4 aminoacid differences in the allosteric region (hGDH1-M415L/R443S/G456A/R470H), can also not reproduce the properties of hGDH2. The S174N aminoacid change, however, introduced into the R443S/G456A double mutant, makes the resulting enzyme sensitive to leucine activation and increases its basal activity and heat stability. Thus, aminoacid changes outside the allosteric region are crucial for the unique properties of hGDH2. In addition, we show that basal activity, heat stability and resistance to inhibition by estrogens are directly related, interlinked to each other properties of hGDHs.

Finally, we show that a polymorphism in hGDH2 (S445A), that has been associated to accelerated onset of Parkinson's disease, probably exerts its effect by increasing hGDH2's basal activity and does not affect GTP inhibition. Mutations in the same region of hGDH1 (Q441R, S445L, S448P, K450E, H454Y), which cause the hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome through increasing hGDH1's resistance to GTP, do not have a similar effect in GTP-regulation when introduced to hGDH2, but can instead cause alterations in basal activity, depending on their exact location.