



**Ανάλυση δομής-λειτουργίας γλουταμικής αφυδρογονάσης ειδικής για  
το νευρικό σύστημα και γενετική προδιάθεση Νόσου Πάρκινσον**

**Διδακτορική διατριβή**  
**Νικόλαου Θ. Μπορομπόκα**

Δεκέμβριος 2009

Then as it was, then again it will be  
an' though the course may change sometimes  
Rivers always reach the sea

Blind stars of fortune, each have several rays  
On the wings of maybe, down in birds of prey  
Kind of makes me feel sometimes, didn't have to grow  
But as the eagle leaves the nest, it's got so far to go

Through the eyes an' I sparkle, senses growing keen  
Taste your love along the way, see your feathers preen  
Kind of makes makes me feel sometimes, didn't have to grow  
We are eagles of one nest, the nest is in our soul

Ten years gone, holdin' on, ten years gone

R.P

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι το αποτέλεσμα της ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Κρήτης. Σε όλους όσους συνέβαλαν στην προσπάθεια αυτήν, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, για την καθοδήγηση, την στήριξη και την βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Ανδρέα Πλαϊτάκη, Καθηγητή Νευρολογίας, για την ερευνητική και επιστημονική καθοδήγησή του, για την συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια των ερευνητικών μου δραστηριοτήτων, και πάνω από όλα για την ευκαιρία που μου έδωσε, ώστε να βρεθώ σε ένα άκρως ενδιαφέρον ακαδημαϊκό περιβάλλον.

Καθοριστική ήταν επίσης και η επιστημονική βοήθεια που μου παρείχαν τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, Καραγωγέως Δόμνα (Καθηγήτρια Παν. Κρήτης) και Κοκκινίδης Μιχαήλ (Καθηγητής Παν. Κρήτης) τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συνεργάτες και φίλους μου από το εργαστήριο Νευρολογίας για την ποιοτική συνεργασία μας, η οποία συνέβαλε με τρόπο καθοριστικό στην ερευνητική μου εργασία.

Πάνω απ' όλα όμως ευχαριστώ όλους εκείνους που βρέθηκαν δίπλα μου αυτά τα χρόνια για την αμέριστη και ουσιαστική συμπαράστασή τους:

Τις οικογένειες Ζαχαράκη και Μηλιαρά για την ανιδιοτελή παρουσία τους στην διάρκεια των σπουδών μου.

Τους φίλους μου που μου στάθηκαν, με ενθάρρυναν, και με έκαναν να νιώσω ότι οι προσπάθειες μου θα έχουν ένα ειλικρινές αντίκρισμα σε αυτό που επέλεξα να υπηρετήσω.

Τους γονείς μου Θεμιστοκλή και Μαρία, και την αδελφή μου Ελένη για την αγάπη τους, την ηθική και πρακτική υποστήριξή τους, αλλά και για τον δρόμο που χάραξαν προκειμένου να βαδίζω ασφαλής

Και ιδιαιτέρως την σύντροφό μου, Σοφία, για την αγάπη της, την ικανότητα της να με 'σπρώχνει' πάντα μπροστά, και για την υπομονή και κατανόηση που έδειξε αυτά τα χρόνια μέχρι την περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Σε αυτούς τους ανθρώπους αφιερώνω την διατριβή μου

N.M., Δεκέμβριος 2009

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>7</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>11</b>
<b>Η ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ</b>	<b>15</b>
<b>Εντοπισμός στους οργανισμούς</b>	<b>15</b>
<b>Κυτταρικός εντοπισμός</b>	<b>16</b>
<b>Ενδοκυτταρικός εντοπισμός</b>	<b>17</b>
<b>ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ</b>	<b>18</b>
<b>ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ</b>	<b>20</b>
<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ</b>	<b>26</b>
<b>ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ</b>	<b>28</b>
<b>GTP</b>	<b>29</b>
<b>ADP/ATP</b>	<b>29</b>
<b>L-λευκίνη</b>	<b>30</b>
<b>Μέταλλα και χημικοί παράγοντες</b>	<b>30</b>
<b>Ορμόνες και φάρμακα</b>	<b>31</b>
<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ hGDH1 ΚΑΙ hGDH2</b>	<b>32</b>
<b>Η ΝΟΣΟΣ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ</b>	<b>36</b>
<b>ΤΟ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟ ΟΞΥ, Η ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ</b>	
<b>ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ</b>	<b>43</b>
<b>ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b>	<b>50</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>54</b>
<b>ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗΣ</b>	<b>54</b>
<b>ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ</b>	<b>56</b>
<b>ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Sf21</b>	<b>57</b>
<b>ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ</b>	<b>58</b>
<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ</b>	<b>60</b>
<b>Ενεργοποίηση από ADP</b>	<b>60</b>
<b>Αναστολή από GTP</b>	<b>61</b>
<b>Ενεργοποίηση από L-λευκίνη</b>	<b>62</b>
<b>Θερμική απενεργοποίηση</b>	<b>62</b>

Αναστολή από οιστρογόνα	62
Αναστολή από αντιψυχωσικά	62
<b>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (πειράματα ενζυμολογίας)</b>	<b>63</b>
<b>ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ</b>	<b>63</b>
Ανάλυση με πέψη με νουκλεάση περιορισμού	64
Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)	64
Στατιστική ανάλυση (πειράματα γενετικής)	66
Κριτήρια επιλογής ασθενών και υγιών δεικτών	66
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>67</b>
<b>ΕΠΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ hGDH2</b>	<b>67</b>
Λειτουργική ανάλυση των μεταλλάξεων της αντένας	68
Λειτουργική ανάλυση της Ser448Pro	70
Λειτουργική ανάλυση των μεταλλάξεων της pivot helix	71
Μελέτες θερμικής αναστολής των μεταλλάξεων της hGDH2	74
<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ</b>	<b>76</b>
Επίδραση στεροειδών ορμονών στις αγρίου τύπου hGDHs	79
Επίδραση στεροειδών ορμονών στις κινητικές ιδιότητες των hGDHs	85
Ρόλος της Arg443Ser στην ευαισθησία από τα οιστρογόνα	86
Σχέση της αναστολής των hGDHs με την βασική τους δραστηριότητα	89
<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΨΥΧΩΣΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ</b>	<b>94</b>
Επίδραση αντιψυχωσικών στις αγρίου τύπου hGDHs	94
Ρόλος της Arg443Ser στην ευαισθησία από τα αντιψυχωσικά	95
<b>ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ</b>	<b>99</b>
Ρόλος των G103A και T1492G πολυμορφισμών	101
επίδραση των οιστρογόνων στην Ser445-hGDH2	103
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>106</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>116</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b>	<b>127</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) καταλύει την ανατρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού οξέως, που αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή. Ο ρόλος της είναι ιδιαίτερα σημαντικός όταν στο κύτταρο υπάρχουν αυξημένη απελευθέρωση γλουταμικού οξέως ως αποτέλεσμα έντονης γλουταματεργικής δραστηριότητας και/ή ελαττωμένα επίπεδα κυτταρικής ενέργειας, καθώς περά από την απομάκρυνση του γλουταμικού οξέως, συμβάλει και στην αποκατάσταση της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου και την διατήρηση της ομοιόστασης της αμμωνίας του κυττάρου. Έρευνες έχουν δείξει ότι στον άνθρωπο υπάρχουν δυο ισομορφές, που διαφέρουν σε 15 μόνο αμινοξέα, που κωδικοποιούνται από δυο αντίστοιχα γονίδια, το *GLUD1* που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και το φυλοσύνδετο *GLUD2* που εκφράζεται ειδικά στο νευρικό σύστημα και στους όρχεις, και φαίνεται να προέκυψε από ρετρομετάθεση πριν από 23 εκατομμύρια χρόνια. Ανάλυση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών, αποκάλυψε πως τα δυο ισοενζυμα παρουσιάζουν μεγάλες λειτουργικές διαφορές, ως προς την βασική τους δραστηριότητα και την ρύθμιση τους από αλλοστερικούς τροποποιητές, όπως το ADP και το GTP. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως το αμινοξύ Gly456 σχετίζεται με την αντίσταση της hGDH2 στο GTP και πως το αμινοξύ Arg443 είναι υπεύθυνο για την εξάρτηση της δραστηριότητας της από το ADP. Παράλληλα, νέες ενδείξεις αποδεικνύουν ότι μία σειρά από ιδιότητες της hGDH2, όπως η μειωμένη θερμοαντοχή και η αυξημένη ευαισθησία στην αναστολή από τα οιστρογόνα, σχετίζονται με εκείνα ακριβώς τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, στα οποία οφείλει και την μειωμένη σε σχέση με τη hGDH1 βασική δραστηριότητα. Μελέτες

για πιθανή δυσλειτουργία της GDH σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα από το εργαστήριο μας έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός T1492G στο γονίδιο *GLUD2*, ο οποίος ευθύνεται για την σημειακή αλλαγή (Ala445Ser) στην ανθρώπινη γλουταμική αφυδρογονάση (hGDH2), σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου Πάρκινσον. Παράλληλα, φάνηκε πως η αλλαγή αυτή οδηγεί στην διαφοροποίηση της συμπεριφοράς του ενζύμου (αύξηση της βασικής δραστηριότητας εν σχέση με την φυσιολογική hGDH2) προσδίδοντας σε αυτό ιδιότητες επί πλέον λειτουργικότητας (gain of function).

Στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μεταλλαξιγένεση επιλεγμένων αμινοξέων της ρυθμιστικής περιοχής της *GLUD2* πρωτεΐνης και η μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ώστε να κατανοηθεί η μοριακή βάση ρύθμισης της βασικής δραστηριότητας του ειδικού για το νευρικό σύστημα ενζύμου. Παράλληλα με την λειτουργική ανάλυση των μεταλλαγμένων και φυσιολογικών πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ευαισθησίας τους σε αλλοστερικούς τροποποιητές, όπως τα οιστρογόνα (DES, estradiol, oestriol, progesterone) και τα αντιψυχωσικά (haloperidol, perphenazine). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη επιπλέον ασθενών με νόσο του Πάρκινσον και ισάριθμο δείγμα υγιών δεικτών της ίδιας ηλικίας για να καθοριστεί εάν η Ala445Ser μετάλλαξη είναι ειδική για την νόσο ή αποτελεί απλό πολυμορφισμό, ενώ αναζητηθήκαν πιθανοί άλλοι πολυμορφισμοί – μεταλλάξεις στο γονίδιο *GLUD2* που να σχετίζονται με την νόσο του Parkinson.

Καθώς η hGDH1 έχει μελετηθεί εκτενώς (εν αντιθέσει με την hGDH2), για να μελετήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την λειτουργία της hGDH2, παρήγαμε με την μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης hGDH2 μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που φέρουν αλλαγές αμινοξέων στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου (antenna, pivot helix). Τα πέντε hGDH2 μεταλλάγματα που πρόεκυαν ήταν: τα



Glu441Arg, Ser445Leu στην αντένα, τα Lys450Glu, His454Tyr στην pivot helix και το Ser448Pro στην περιοχή σύνδεσης των παραπάνω δομών. Η επιλογή των παραπάνω μεταλλάξεων έγινε με κριτήριο τις ιδιότητες που προσδίδουν αντίστοιχες μεταλλάξεις της ρυθμιστικής περιοχής της hGDH1 στο ενζύμο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ενώ οι μεταλλάξεις στην ρυθμιστική περιοχή της hGDH1 επηρέασαν μόνο την αναστολή από GTP, χωρίς να έχουν καμία επίδραση στη βασική δραστηριότητα του ενζύμου, οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στο μόριο της hGDH2 επέδρασαν κυρίως στην βασική δραστηριότητα. Επομένως, παρόλο που οι hGDH1 και hGDH2 επιδεικνύουν μια μικρή μόνο δομική διαφοροποίηση, μετέχουν διαφορετικών μηχανισμών δράσης για την ρύθμιση της λειτουργίας τους.

Δεδομένου πως η hGDH2 είναι ανθεκτική στην αναστολή από GTP, μελετήθηκε η περίπτωση της αντικατάστασης της δράσης του GTP, από άλλους αλλοστερικούς τροποποιητές. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος σε μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου μέσω της πρόσδεσης τους σε ειδικούς υποδοχείς (ER). Εφόσον αρχικές μελέτες μας στις αγρίου τύπου GDHs, έδειξαν πως η ειδική για το νευρικό σύστημα hGDH2 ήταν πολύ πιο ευαίσθητη στην αναστολή από οιστρογόνα από την hGDH1, εξετάστηκαν επιλεγμένα μεταλλαγμένα της *GLUD1* προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα στεροειδή επιδρούν στην hGDH2. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο τα στεροειδή αναστέλλουν τις ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες είναι διαφορετικός από αυτόν του GTP. Έτσι, ενώ η αγρίου τύπου hGDH2 είναι ανθεκτική στην αναστολή από GTP, είναι πολύ ευαίσθητη στην αναστολή από οιστρογόνα, κατά πάσα πιθανότητα, εξαιτίας της εξελικτικής Ser443Arg αλλαγής στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου. Αντίθετα, η αγρίου τύπου hGDH1, που είναι ευαίσθητη στο GTP, αποδείχθηκε αρκετά ανθεκτική στη δράση των στεροειδών.

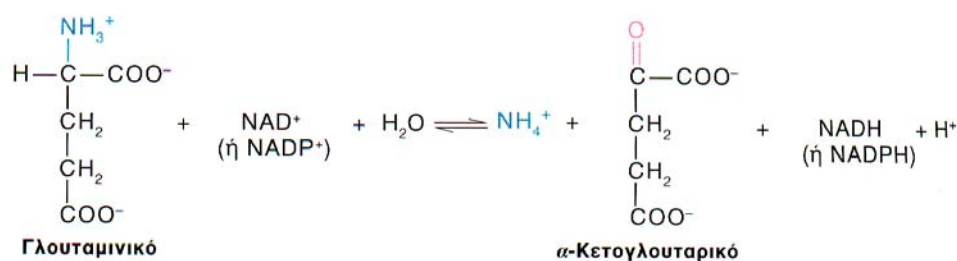
Συνεπώς, ενώ το GTP λειτουργεί ως ειδικός αναστολέας για την hGDH1, τον ρόλο αυτό στην περίπτωση της hGDH2 έχουν οι στεροειδείς ορμόνες.

Με βάση προηγούμενα δεδομένα που υπήρχαν στο εργαστήριο μας, μελετήθηκε μεγαλύτερο δείγμα Παρκινσονικών ασθενών (281 ασθενείς από την Κρήτη) και υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας με ταυτοποίηση αλληλουχίας (sequencing) όλου το γονιδίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της Ser445Ala αλλαγής στο μόριο της GLUD2, καθώς και να βρεθούν άλλες πιθανές αλλαγές που να σχετίζονται με την νόσο του Πάρκινσον. Η μελέτη επιβεβαίωσε ότι η αλλαγή Ser445Ala όταν βρίσκεται σε ημίζυγη μορφή στους άνδρες σχετίζεται με την πρόωμη έναρξη της νόσου κατά 8 με 13 χρόνια σε σχέση με άνδρες και γυναίκες ασθενείς με διαφορετικό γονότυπο. Εφόσον σύμφωνα με μια θεωρία, η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται με την αυξημένη δράση του γλουταμικού οξέως στους μετασυναπτικούς διεγερτικούς υποδοχείς, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν πως η παρουσία της αλλαγής αυτής, που οδηγεί στην αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, επιταχύνει την νευροεκφύλιση με αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου νωρίτερα.

Όταν μελετήθηκε η δράση των οιστρογόνων, αποκαλύφθηκε ότι το Ser445Ala μετάλλαγμα (που σχετίζεται με το X χρωμόσωμα) ήταν πολύ πιο ευαίσθητο στα οιστρογόνα από την hGDH1. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να σημαίνει πως τα οιστρογόνα στις γυναίκες, δυνητικά εκμηδενίζουν την αύξηση της λειτουργικότητας της Ser445Ala-hGDH2 που παρατηρείται στους άνδρες, εμποδίζοντας το υπέρ-ενεργό ένζυμο να μεταβολίσει μεγάλες ποσότητες γλουταμικού οξέως, βλάπτοντας με τον τρόπο αυτό τα νευρικά κύτταρα. Έτσι, τα οιστρογόνα, με βάση την ιδιότητα που έχουν να δρουν ως ειδικοί αναστολείς της hGDH2, μπορεί να αποτελέσουν στο μέλλον το μέσο για την δημιουργία νέων θεραπευτικών αγωγών για ασθένειες που σχετίζονται με πρόωμη γήρανση και υπερέκφραση της hGDH2.

## Εισαγωγή

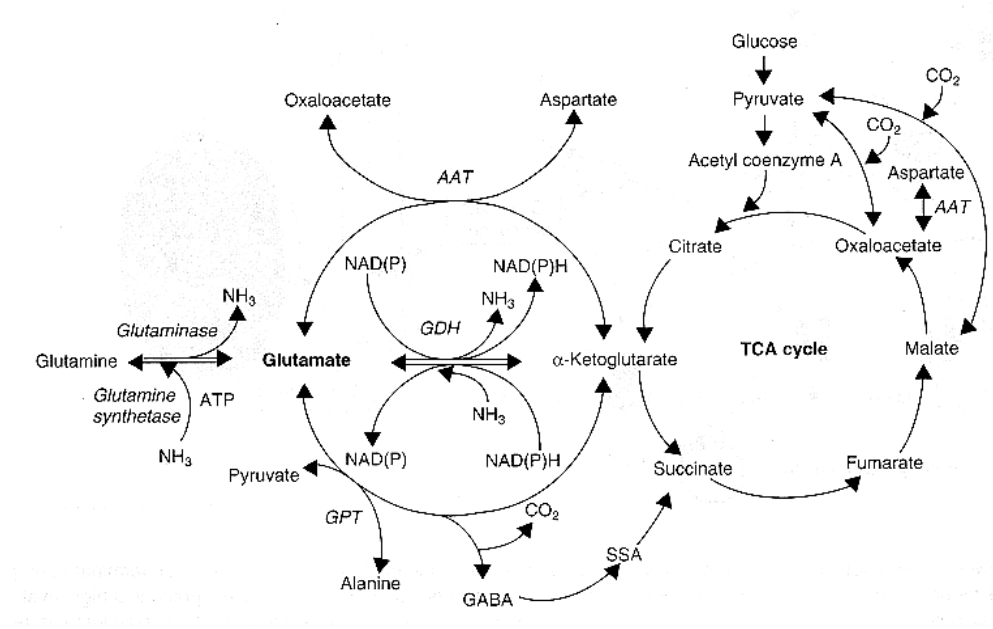
Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα κύριο ένζυμο στο μεταβολισμό του γλουταμινικού οξέος και καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο είτε NAD είτε NADP (Smith et al. 1975).



Η ισορροπία της αντίδρασης που καταλύεται από την γλουταμική αφυδρογονάση ευνοεί την σύνθεση του γλουταμικού (Smith et al. 1979). Αυτή όμως η κατεύθυνση απαιτεί υψηλά επίπεδα αμμωνίας που δεν είναι εύκολο να υπάρξουν στα κύτταρα των θηλαστικών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, έτσι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το γλουταμικό στο νευρικό ιστό συντίθεται κυρίως από τον μεταβολισμό της γλυκόζης ή από την αποδόμηση άλλων αμινοξέων μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης και απαμίνωσης (Yudkoff et al. 1991, McKenna et al. 1996). Σε ειδικές περιπτώσεις που η συγκέντρωση της αμμωνίας υπερβαίνει τα φυσιολογικά επίπεδα, η σύνθεση του γλουταμινικού μέσω της GDH παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αποδόμησης της αμμωνίας (Cooper & Plum 1987). Έτσι, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες η φορά

της αντίδρασης είναι προς τα δεξιά, αυτή μπορεί να αντιστραφεί ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου.

Η σημασία της γλουταμικής αφυδρογονάσης για το κύτταρο φαίνεται από το ότι συνδέει τον μεταβολισμό του γλουταμικού με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και παρέχει ένα σημαντικό μονοπάτι για την μετατροπή των α-αμινοξέων σε α-κετοξέα και το αντίστροφο, συνδέοντας έτσι τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτό των υδατανθράκων και ενισχύοντας την παραγωγή ενέργειας μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του γλουταμικού στο κύτταρο (εικόνα 1)



Εικόνα 1: Λειτουργικός ρόλος της GDH στο μεταβολισμό των θηλαστικών

Οι περισσότερες GDH είναι ομοπολυμερή αποτελούμενα από 6 συνήθως υπομονάδες μοριακού βάρους 40-60 kDa. Η GDH του ανθρώπου αποτελείται από 2 διμερή τριμερών όμοιων υπομονάδων αποτελούμενες από 505 αμινοξέα και μοριακού βάρους 56 kDa. Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο ευρέως διαδεδομένο σε όλα τα έμβια όντα από τα θηλαστικά έως και τους βακτηριακούς οργανισμούς τόσο παλιά όσο τα αρχαιοβακτήρια.

Τα επίπεδα της GDH παρουσιάζουν αρκετές διάφορες στους ιστούς των θηλαστικών κάτι που σχετίζεται με τις μεταβολικές ανάγκες του κάθε ιστού. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν μετρηθεί σε όργανα όπως το ήπαρ, νεφροί, πάγκρεας, καρδιά, έντερο, σπλήνα, πνεύμονες, ωθήκες, όρχεις και ο εγκέφαλος (Smith et al 1975, Plaitakis et al. 1980). Από αυτά, το ήπαρ και ο εγκέφαλος είναι τα όργανα με την υψηλότερη δραστηριότητα GDH στον οργανισμό και την μεγαλύτερη έκφραση των GLUD γονιδίων. Στο ΚΝΣ των θηλαστικών η GDH, εκτός από τον σπουδαίο ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων συμμετέχει και σε μηχανισμούς νευροδιαβίβασης.

Διαταραχές της λειτουργίας της ανθρώπινης GDH έχουν σημαντικές κλινικές επιπτώσεις, αποτελώντας την αιτία του συνδρόμου υπερινσουλινισμού / υπεραμμωναιμίας, ενώ πιστεύεται ότι διαταραχές στην λειτουργία του συγκεκριμένου ενζύμου στο ΚΝΣ σχετίζονται με την παθογένεση ανθρώπινων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων ( Plaitakis et al. 1982 & 1991, Duvoisin et al. 1983 & 1988).

Αρχικά, μελέτες μοριακής βιολογίας για την υποκυτταρική εντόπιση της GDH και πρωτεϊνικές λειτουργικές μελέτες για την δραστηριότητα της GDH οδήγησαν στον εντοπισμό δυο ισομορφών του ενζύμου στον εγκέφαλο αρουραίου με διαφορετική σταθερότητα στην θερμοκρασία ( Plaitakis et al. 1984, Konagaya et al. 1986, Abe et al. 1992) ενώ παρατηρήθηκε πως χαρακτηριστικό των δυο ισομορφών ήταν η διαφορετική διαλυτότητα τους (η μια ήταν διαλυτοποιούμενη προερχόμενη από το στρώμα των μιτοχονδρίων, ενώ η άλλη ήταν πιθανόν συνδεδεμένη σε μεμβράνες και αδιάλυτη) (Colon et al. 1986 ).

Επιπλέον έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως οι δυο ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης διέφεραν στην αλλοστερική τους ρύθμιση και δραστηριότητα, όπως επίσης στο ότι η μιτοχονδριακή (διαλυτή) GDH έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το NAD<sup>+</sup>, ενώ η σωματιδιακή μεγαλύτερη συγγένεια για το NADP<sup>+</sup>. Τα ευρήματα αυτά έδωσαν έναν βιοσυνθετικό ρόλο στην σωματιδιακή GDH (παραγωγή γλουταμικού για χρήση στην πρωτεινόςύνθεση) και έναν καταβολικό ρόλο στην διαλυτή GDH (παραγωγή ενέργειας μέσω κύκλου του Krebs) (Lee et al. 1999), κατά πάσα πιθανότητα με σκοπό να εξυπηρετήσουν διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου σχετιζόμενες με τον ενεργειακό μεταβολισμό όσο και με την σύνθεση και αποδόμηση του γλουταμικού οξέος.

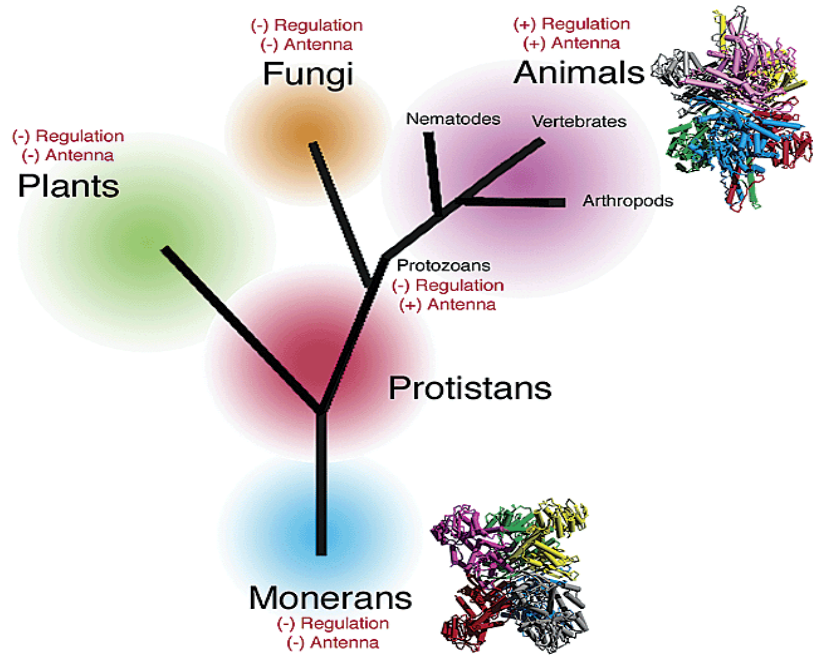
Τελικά, όλες οι έρευνες αυτές απέδειξαν την ύπαρξη δυο ισοενζύμων της GDH με διαφορετική αλλοστερική ρύθμιση, σταθερότητα στην θερμοκρασία, αλληλουχία αμινοξέων καθώς και κωδικοποίηση τους από διαφορετικά γονίδια. Έτσι, η σωματιδιακή GDH κωδικοποιείται από το γονίδιο GLUD1 (Michaelides et al. 1993) το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ενώ το γονίδιο που ευθύνεται για την σύνθεση της διαλυτής μορφής είναι το GLUD2, η έκφραση του οποίου περιορίζεται στον νευρικό ιστό και στους όρχεις.

Η ανάγκη για την ύπαρξη δυο ισομορφών στον εγκέφαλο μπορεί να συνδέεται με τις σύνθετες λειτουργίες που κατέχει το γλουταμικό οξύ στον νευρικό ιστό της νευροδιαβίβασης, τον μεταβολισμού της γλυκόζης, την παραγωγή ενέργειας και την διεγερτοτοξικότητα. Επομένως, ο ρόλος της GDH στον εγκέφαλο πέραν του σημαντικού ρόλου της στον μεταβολισμό του γλουταμικού, στην αποδόμηση και

αποβολή της αμμωνίας και στην πρωτεϊνοσύνθεση και αποδόμηση αμινοξέων μπορεί να σχετίζεται και με την παραγωγή ενέργειας και την νευροπροστασία (Shashidharan et al. 1997)

#### Εντοπισμός της γλουταμικής αφυδρογονάσης στους οργανισμούς

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλους οργανισμούς, καταδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό τον κεντρικό μεταβολικό ρολό αυτού του σημαντικού ενζύμου σε όλα τα έμβια όντα. Οι GDH των σπονδυλωτών είναι διπλής ειδικότητας ως προς το συνένζυμο. Η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών ρυθμίζεται με σύνθετο τρόπο από φωσφορικά πουρινικά νουκλεοτίδια και μια ποικιλία άλλων μεταβολιτών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι γλουταμικές αφυδρογονάσες είναι εξαμερικές και με μερικές εξαιρέσεις έχουν παρόμοια μοριακά βάρη (330.000 – 360.000). Παρόλο που οι περισσότερες εξ αυτών αναστέλλονται από το GTP και ενεργοποιούνται από το ADP, υπάρχουν και διαφορές στον τρόπο που αυτά τα ενζυμα συμπεριφέρονται απέναντι στα πουρινικά φωσφορικά νουκλεοτίδια (Fahien και συν, 1965) (εικόνα 2).



Εικόνα 2. εξέλιξη της γλουταμικής αφυδρογονάσης

### Κυτταρικός εντοπισμός

Η GDH στα θηλαστικά είναι παρούσα σε όλους τους ιστούς και κύτταρα (Mavrothalassitis et al. 1988) και έχει σημαντικό ρόλο που αποδεικνύεται από το γεγονός ότι υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα κύτταρα (σε κάποια είδη κυττάρων αποτελεί το 10% της συνολικής πρωτεΐνης μέσα στο στρώμα των μιτοχονδρίων – κυρίως αστροκυτταρικών μιτοχονδρίων) (Rothe et al. 1994 ).

Από έρευνες σε καλλιέργειες κύτταρων έχει επιβεβαιωθεί ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα και ειδικότερα τα αστροκύτταρα περιέχουν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα νευρικά κύτταρα, (2 με 4 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη των νευρικών κυττάρων). Σε μελέτες που έγιναν για την ειδική ενεργότητα του ενζύμου σε πληθυσμούς νευρογλοιακών κυττάρων (αστροκυττάρων) διάφορων περιοχών του εγκεφάλου, φλοιού και παρεγκεφαλίδας, βρέθηκε ότι ενώ



υπάρχει διαφορά μεταξύ των δυο αυτών πληθυσμών, αυτή, είναι πολύ μικρή για να παρουσιάσει βιολογικό ενδιαφέρον.

Αντίθετα, μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς νευρικών κυττάρων, παρόλο που αυτά έχουν 2-4 φορές μικρότερη ειδική ενεργότητα στην GDH από τα νευρογλοιακά κύτταρα, παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους. Ειδικότερα η ειδική ενεργότητα των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας είναι κατά 60% υψηλότερη από την αντίστοιχη των νευρώνων του φλοιού, εύρημα όμως που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα γιατί δεν συμπίπτει με ευρήματα προηγούμενων μελετών. Τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας του ενζύμου στα αστροκύτταρα σχετίζεται πιθανότητα με την πρόσληψη και μεταβολισμό του γλουταμικού μέσα σε αυτά (Danbolt 2001).

#### Ενδοκυτταρικός εντοπισμός

Η γλουταμική αφυδρογονάση όπως προείπαμε είναι κύριο ένζυμο του μεταβολισμού του γλουταμικού και εδράζεται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που έχει αποδειχθεί από έρευνες σε ιστούς θηλαστικών όπου η GDH εντοπίστηκε κυρίως στα μιτοχόνδρια και μάλιστα στο στρώμα των μιτοχονδρίων (Salganicoff & De Robertis 1965). Η επιβεβαίωση της μιτοχονδριακής εντόπισης της GDH έγινε με υπερδομικές μελέτες χρησιμοποιώντας ανοσοιστοχημεία (Aoki et al. 1987, Rothe et al. 1994).

Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις και εξωμιτοχονδριακής εντόπισης του ενζύμου. Σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις έχει εντοπιστεί στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (Lee et al. 1999) όπως και στον πυρήνα (Di Prisco & Gasolia 1975, Di Matteo et al. 1976, 1980) εντόπιση όμως που

μπορεί να είναι λανθασμένη, καθώς η πυρηνική GDH θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μιτοχονδριακή επιμόλυνση του πυρηνικού κλάσματος.

#### Γενετική της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Η απομόνωση και κλωνοποίηση αρκετών αλληλουχιών cDNAs από βιβλιοθήκες προερχόμενες από ανθρώπινο συκώτι που κωδικοποιούν την ανθρώπινη GDH, οδήγησαν στην αναγνώριση των γονιδίων που ευθύνονται για την έκφραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Το open reading frame όλων αυτών των cDNAs προβλέπει ένα πολυπεπτιδίο μήκους 558 αμινοξέων, η αμινοξική αλληλουχία του οποίου συμφωνεί με τα δεδομένα της αμινοξικής αλληλουχίας του καθαρισμένου ενζύμου που είχε δημοσιευθεί σε παλιότερες έρευνες (Julliard & Smith 1979). Οι μελέτες αυτές έδειξαν πως η ώριμη GDH που εντοπίζεται στο ανθρώπινο ήπαρ είναι κατά 53 αμινοξέα μικρότερη λόγω της έλλειψης του οδηγού πεπτιδίου, μήκους 53 αμινοξέων, το οποίο αποκόπτεται από το πρόδρομο ένζυμο κατά την διάρκεια της μεταφοράς της πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα, όπου συντίθεται, στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων (Mavrothalassitis et al. 1988)

Ύστερες έρευνες με in situ υβριδοποίηση και Southern blot οδήγησαν στον εντοπισμό και προσδιορισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτό την γλουταμική αφυδρογονάση όπως και των μεταγραφικών χαρακτηριστικών τους. Αποδείχτηκε λοιπόν, πως στον άνθρωπο υπάρχουν δυο λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν την γλουταμική αφυδρογονάση, το *GLUD1* και το *GLUD2* ( Mavrothalassitis et al. 1988, Anagnou et al. 1989&1993, Deloukas et al.1993, Shashidharan et al. 1994). Το *GLUD1* είναι γονίδιο εκφραζόμενο σε όλους τους ιστούς (housekeeping), περιέχει 13

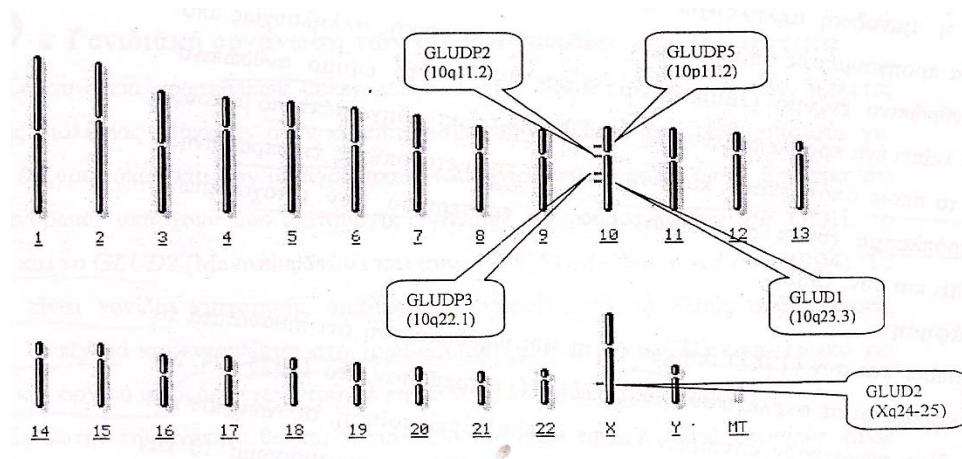
εξόνια, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10. Τα 13 αυτά εξόνια είναι ταυτόσημα με τα αντίστοιχα μέρη του *GLUD1* cDNA. Το πρώτο εξόνιο (540b), το οποίο είναι και το μεγαλύτερο, περιέχει την 5'-αμετάφραστη αλληλουχία, την κωδικοποιούσα αλληλουχία για το μιτοχονδριακό οδηγό πεπτίδιο και τα πρώτα 91 κωδικόνια που αντιστοιχούν στην ώριμη *GLUD1* πρωτεΐνη (Mavrothalassitis et al. 1988). Το συνολικού μέγεθος του γονιδίου είναι περίπου 45 kb, ενώ το μέγεθος των ιντρονίων ποικίλλει σε μήκος από 89bp (ιντρόνιο 6) έως 18000bp (ιντρόνιο 1).

Το γονίδιο της *GLUD2* φαίνεται να εκφράζεται μόνο στον νευρικό ιστό και στους όρχεις. Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία ακόμα για την δομή του γονιδίου *GLUD2* πέραν του κύριου χαρακτηριστικού του ότι δεν διαθέτει καθόλου ιντρόνια, γεγονός που εξηγείται από τον τρόπο δημιουργίας του. Θεωρείται όμως ότι έχει προκύψει εξέλιξης από το γονίδιο *GLUD1* μέσω του μηχανισμού της ρετρομετάθεσης (Burki και Kaessman, 2004).

Το πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος επιβεβαίωσε την θέση των δυο γονιδίων *GLUD1* και *GLUD2* στα χρωμοσώματα 10 και X αντίστοιχα και συγκεκριμένα το *GLUD1* γονίδιο στην θέση 10q23.3 και *GLUD2* γονίδιο στην θέση Xq24-25q.

Εκτός από τα δυο λειτουργικά γονίδια της GDH έχουν εντοπισθεί αλλά 6 ψευδογονίδια. Οι Michaelidis et al. (1993) αναγνώρισαν 4 υποτιθέμενα κολοβωμένα ψευδογονίδια, 2 από τα οποία μπορεί να προέκυψαν από ρετρομετάθεση. Τα *GLUDP2* & *GLUDP3* εντοπίστηκαν στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q11.2 & 10q22.1 αντίστοιχα. Το *GLUDP5*, τα χαρακτηρίστηκα του οποίου δείχνουν ότι πρόκειται για ένα κολοβωμένο ψευδογονίδιο, εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 10p11.2. Τέλος, 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 *GLUD*. Όμως, η ανάλυση των χαρακτηριστικών τους δείχνει ότι πρόκειται για επιπλέον ψευδογονίδια. Συγκεκριμένα υπάρχουν 3 ψευδογονίδια στην θέση 10q11.22 με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, τα οποία αντιστοιχούν *GLUDP2* και τα ονομάζουμε *GLUDP2A*, *GLUDP2B*, *GLUDP2C* αντιστοίχως. Η πλειοψηφία των ψευδογονιδίων αυτών φαίνεται να έχουν προκύψει με μηχανισμούς γονιδιακού διπλασιασμού.

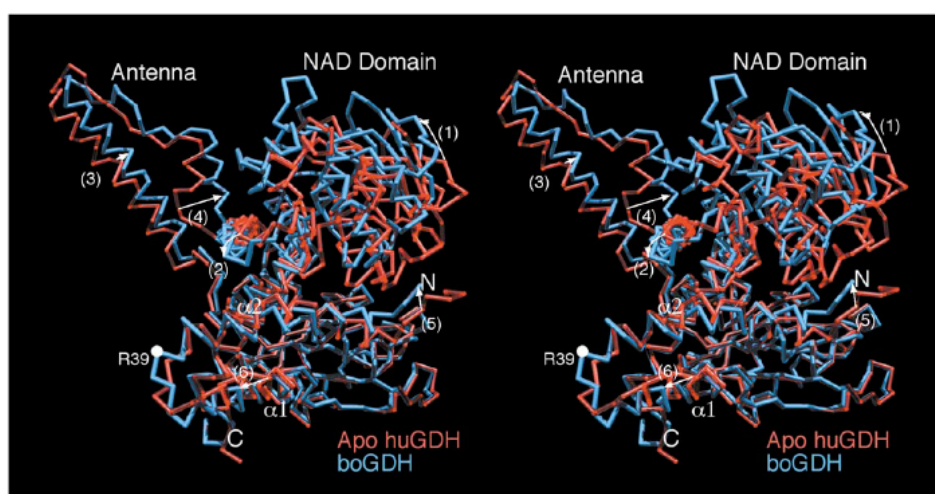


**Εικόνα 3: γενετικοί τόποι της *GLUD*.** Τα δυο λειτουργικά γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* και τα 6 ψευδογονίδια: 4 ακρωτηριασμένα ψευδογονίδια *GLUDP2A*, *GLUDP2B*, *GLUDP2C* και *GLUDP3* και 2 ρετροποζόνια *GLUDP4* & *GLUDP5*

### Δομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Η δομή της GDH των θηλαστικών έχει μελετηθεί εκτεταμένα με τεχνικές χημικής τροποποίησης του μορίου της, κρυσταλλογραφικές τεχνικές και τεχνικές ειδικής ως προς την θέση μεταλλαξιογένεσης.

Οι δομές αρκετών συμπλεγμάτων της βοείας GDH όπως και της ανθρώπινης GDH έχουν καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Peterson et al. 1997, Peterson&Smith 1999, Smith et al. 2001&2002). Μέχρι το 2002 (Smith et al.), όποτε και επιλύθηκε η δομή της ανθρώπινης GDH, η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλογραφική δομή θηλαστικών ήταν αυτή της βοείας GDH, η οποία όμως δεν έχει σημαντικές δομικές διαφορές, όπως αποδείχτηκε, από την ανθρώπινη GDH (εικόνα 2)



**Figure 4.** Comparison between the open and closed conformations of mammalian GDH. Shown in this Figure are single subunits of the boGDH:NADH-Glu-GTP complex in the closed mouth conformation (translucent red) and the apo huGDH structure in the open mouth conformation (blue). The orientation in this Figure is with the 3-fold axis lying approximately vertically along the left side of the Figure, and the nearest 2-fold axis lying horizontally along the bottom of the Figure. The major site of trypsin cleavage is highlighted by the white ball at R39. The general domain motions are highlighted by the white arrows.

Εικόνα 2. Σύγκριση βοείας και ανθρώπινης GDH (Smith et al 2002)

Η ώριμη ανθρώπινη γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα ομοεξαμερές, για την ακρίβεια είναι ένα διμερές από τριμερή, στο οποίο κάθε υπομονάδα της έχει μοριακό βάρος περίπου 56 kDa και αποτελείται από 505 αμινοξέα.

Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές (εικόνα 3):

- 1) περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού στο αμινοτελικό άκρο
- 2) περιοχή πρόσδεσης του συνεχόμενου NAD<sup>+</sup>

### 3) της αλλοστερική περιοχή (αντένα + pivot helix)

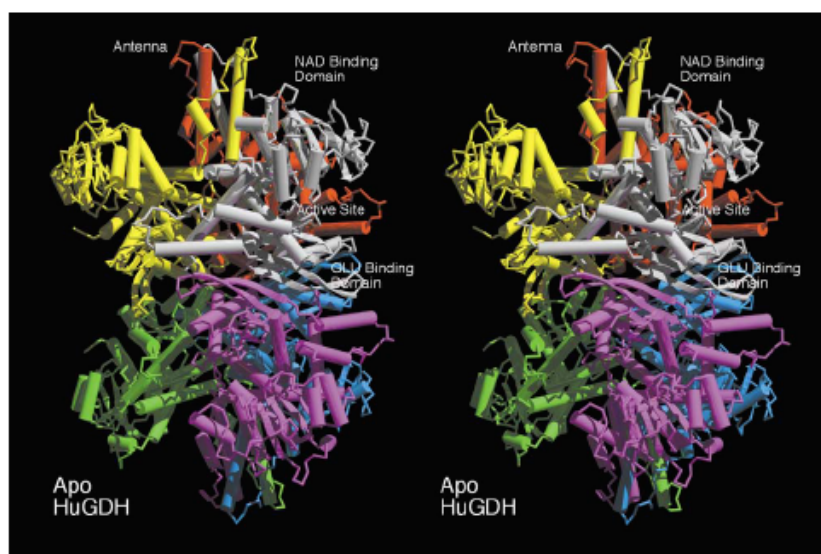
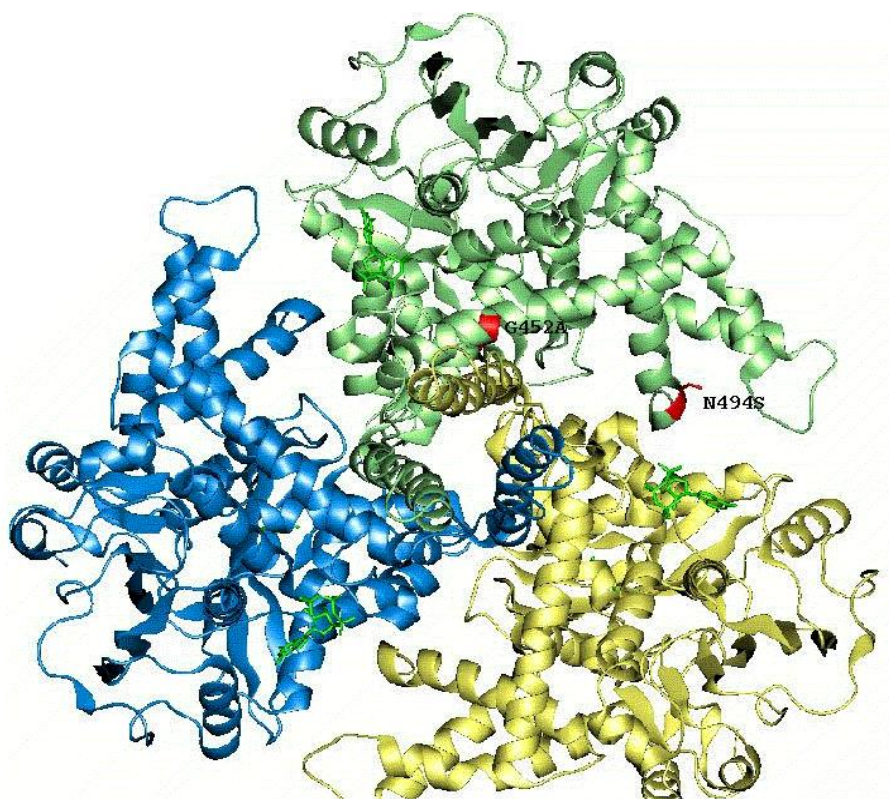


Figure 1. Ribbon diagram of the apo-huGDH structure. In this stereo image, the individual subunits are represented in different colors. The 3-fold axis runs vertically through the middle of the model. The antenna region is not found in bacterial or fungal GDH.

Εικόνα3. Δομή της ανθρώπινης GDH (Smith et al 2002)

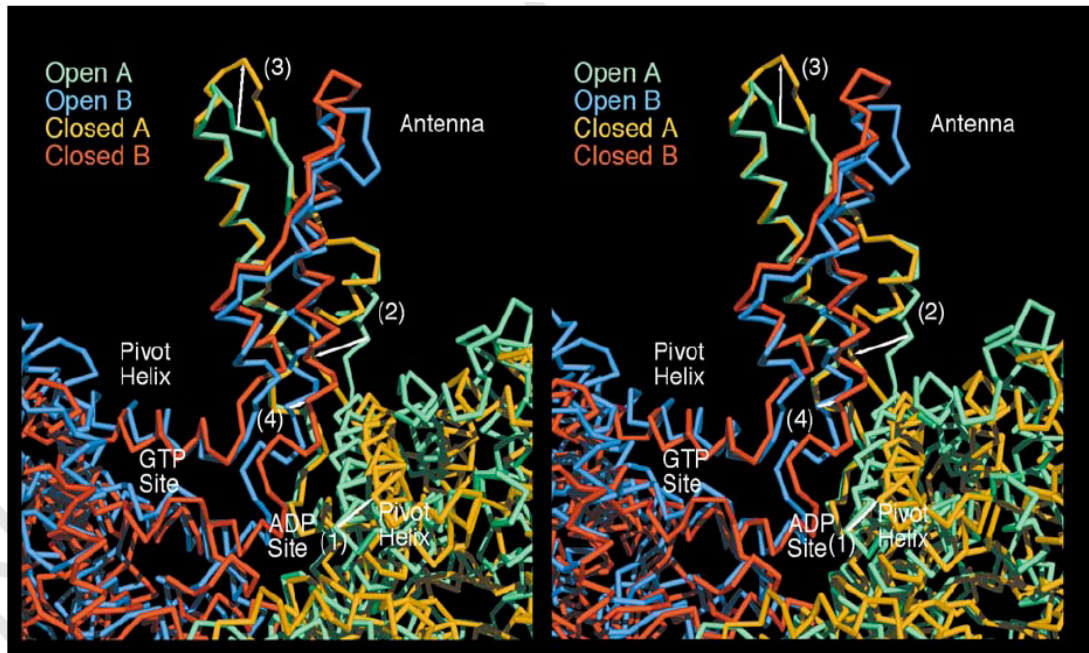
Η αντένα αποτελείται από 48 αμινοξέα και υπάρχει σε όλες της ζωικές μορφές GDH, εκτός από τις βακτηριακές και τις μυκητιασικές GDH, και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου, αλλά περισσότερο στην συνεργικότητα μεταξύ των υπομονάδων και την βελτίωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου (Banerjee et al. 2003). Τα αλλά δυο κύρια μέρη της GDH των θηλαστικών, περιοχή πρόσδεσης NAD<sup>+</sup> και περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, υπάρχουν και σε απλούστερους οργανισμούς και σχηματίζουν ανάμεσα τους την σχισμή του ενεργού κέντρου. Η αντένα αποτελείται από μια μεγάλη ανιούσα έλικα και μια μικρή κατιούσα έλικα. Οι ανιούσες έλικες, μέσα στο τρίμερες, περιελίσσονται μεταξύ τους δεξιόστροφα για να σχηματίσουν τον πυρήνα της προεκβολής της κεραίας. Αυτό τοποθετεί την κεραία μίας υπομονάδας πίσω από αυτήν της ανθρωπολογικά γειτονικής της υπομονάδας μέσα στο τρίμερες της GDH,

διευκολύνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντενών γειτονικών υπομονάδων (Εικόνα 4).



Εικόνα4: τρόπος αλληλεπίδρασης των ρυθμιστικών περιοχών ενός τριμερούς της GDH

Ένα άλλο σημαντικό δομικό στοιχείο της GDH των θηλαστικών είναι η περιστρεφόμενη έλικα (αμινοξύ 445-470) στην βάση της αντένας, η οποία περιστρέφεται κατά την πρόσδεση του γλουταμικού στο ενεργό κέντρο, μετακινώντας την περιοχή πρόσδεσης  $\text{NAD}^+$  προς την περιοχή πρόσδεσης γλουταμικού με αποτέλεσμα να κλείνει η σχισμή του ενεργού κέντρου και να δημιουργείται κατάλληλο περιβάλλον για την αντίδραση (Peterson&Smith1999). Η κίνηση αυτή πραγματοποιείται χάρη στην μικρή κατιούσα έλικα της αντένας (η οποία αποτελεί συνέχεια της περιστρεφόμενης έλικας) η οποία λειτουργεί σαν μοριακό ελατήριο αλλάζοντας μήκος κατά το άνοιγμα και κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου (εικόνα 5).



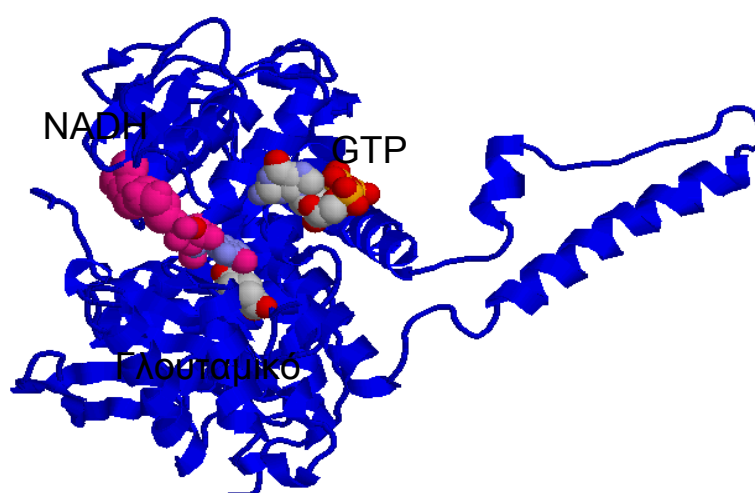
Εικόνα 5: κίνηση της αντένας κατά την διάρκεια του ανοίγματος και κλεισίματος της σχισμής του ενεργού κέντρου

Το γλουταμικό συνδέεται στο βαθύτερο μέρος του ενεργού κέντρου του ένζυμου ενώ το NADH συνδέεται εσωτερικά και προς το στόμιο του ενεργού κέντρου (Stillman et al. 1993, Peterson&Smith 1999) (εικόνα 5). Η γ-καρβοξυλομάδα του συνδεδεμένου γλουταμικού αλληλεπιδρά με την Lys90 και η α-καρβοξυλομάδα συνδέεται με την Lys114. Η περιοχή πρόσδεσης NAD<sup>+</sup> κλείνει πάνω από τα προσδέματα φέρνοντας την Lys126 και τον δακτύλιο νικοτιναμιδίου σε άμεση σύνδεση με το γλουταμικό.

Μελετώντας την εντόπιση των αλλοστερικών θέσεων και τον δομικό μηχανισμό της αλλοστερικής ρύθμισης οι Peterson&Smith (1999) πρότειναν ότι το μεγαλύτερο μέρος της αλλοστερικής ρύθμισης εξαρτάται από τον έλεγχο της κινητικότητας της περιοχής πρόσδεσης NAD<sup>+</sup>. Η ταχύτητα της κατάλυσης στην GDH ρυθμίζεται από την απελευθέρωση του προϊόντος (Colen et al 1972). Το GTP αναστέλλει την αντίδραση ενισχύοντας την πρόσδεση του υποστρώματος και κλείνοντας την σχισμή του ενεργού κέντρου, ενώ το ADP ενεργοποιεί διευκολύνοντας την απελευθέρωση



του προϊόντος διευκολύνοντας το άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου (George & Bell 1980). Στο μόριο του ένζυμου υπάρχει μια μόνο περιοχή πρόσδεσης GTP (εικόνα 6), στην βάση της αντένας, η οποία αλληλεπιδρά με αρκετά αμινοξέα (Tyr262, Arg217, Arg265, Arg261, His209, His450), κάνοντας την θέση αυτή έναν αισθητήρα ενέργειας που προσδένει κατά προτίμηση τριφωσφορικά νουκλεοτίδια αφού προσδένει και το ATP. Συνεπώς όταν στα μιτοχόνδρια υπάρχουν υψηλά επίπεδα φωσφορικών νουκλεοτιδίων, άρα υψηλή ενεργειακή κατάσταση, τότε η δραστηριότητα της GDH αναστέλλεται.



Εικόνα 5: περιοχές σύνδεσης των υποστρωμάτων της GDH

Ενώ το NADH (έχει και δεύτερη θέση πρόσδεσης πίσω από την περιοχή πρόσδεσης του NAD<sup>+</sup>) προσδένεται στην ίδια θέση κάτω από την περιστρεφόμενη έλικα. Το NADPH όχι μόνο συνδέεται με δυο πιθανές διαμορφώσεις στο ενεργό κέντρο, αλλά καμία από τις δυο δεν συμπίπτει με αυτή του συνενζύμου NADH στο ενεργό κέντρο. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να εξηγήσει την προτίμηση που δείχνει το ένζυμο για το δεύτερο σε σχέση με το πρώτο.

### Μηχανισμός δράσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η GDH από ήπαρ αγελάδας υπάρχει σε ανοικτή και κλειστή διαμόρφωση ως προς την κατάσταση σχισμής στην οποία στην οποία βρίσκεται το ενεργό κέντρο, με την παρουσία υποστρωμάτων στο μείγμα της κρυστάλλωσης να ευνοεί την κλειστή διαμόρφωση. Το άνοιγμα και κλείσιμο της σχισμής αυτής ανάμεσα στην περιοχή πρόσδεσης γλουταμικού και στην περιοχή πρόσδεσης συνενζύμου είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού της δράσης της GDH (Saha & Fisher 1999). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η ανοικτή μορφή του ενζύμου συνδέει τα αντιδρώντα και στην συνέχεια η σχισμή στην οποία βρίσκεται το ενεργό κέντρο κλείνει για να προχωρήσει η αντίδραση προς τη δημιουργία των προϊόντων (Singh et al. 1993). Μάλιστα θεωρείται ότι το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου παρέχει ένα υδροφοβικό περιβάλλον κατάλληλο για υδριδική μεταφορά (Cho et al.2001).

Έχουν γίνει πολλές μελέτες ως προς το ποιο βήμα της αντίδρασης καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού. Οι μελέτες δείχνουν πως η απελευθέρωση του ανηγμένου συνενζύμου (NADH/NADPH) από το σύμπλεγμα ένζυμο -  $NAD(P)H$  -  $\alpha$ -κετογλουταρικό είναι αυτή που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης από την γλουταμική αφυδρογονάση. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική γιατί σχετίζεται με το γεγονός ότι το ADP ενεργοποιεί την αντίδραση της GDH προς την κατεύθυνση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού από  $NADP^+$  μειώνοντας της σύνδεση του NADPH με το ένζυμο, αυξάνοντας έτσι την απελευθέρωση του από το σύμπλεγμα ένζυμο -  $NADPH$  -  $\alpha$ -κετογλουταρικό.

Αντίστροφα, το GTP αναστέλλει την αντίδραση αυτή επειδή μειώνει τον ρυθμό απελευθέρωσης NADPH από το σύμπλεγμα ένζυμο – NADPH – α-κετογλουταρικό. Στην περίπτωση του NAD(H) τα πράγματα είναι πιο σύνθετα επειδή το οξειδωμένο (και ίσως ανηγμένο) μη φωσφορυλιωμένο συνένζυμο μπορούν να συνδέονται εκτός από το ενεργό κέντρο και στη θέση σύνθεσης από ADP., παρόλο που έχει προταθεί ότι το ADP και το GTP ασκούν την δράση τους αποσταθεροποιώντας και σταθεροποιώντας, αντιστοίχως, ατελέσφορα αδρανή σύμπλοκα (Peterson & Smith 1999)

Με βάση λειτουργικές μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν, έχουν προταθεί τουλάχιστον 4 θέσεις συνδέσεις υποστρωμάτων και αλλοστερικών τροποποιητών ανά υπομονάδα GDH: το ενεργό κέντρο (θέση I), η ρυθμιστική θέση αδενικού νουκλεοτιδίου (θέση II), η ρυθμιστική θέση γουανινικού νουκλεοτιδίου (θέση III) και η ρυθμιστική θέση ανηγμένου συνενζύμου (θέση IV) (Frieden 1961, Hudson&Daniel 1993).

Το NAD<sup>+</sup> συνδέεται τόσο στην θέση I όσο και στην θέση II, το NADP μόνο στην θέση I, το NADP(H) στις θέσεις I και IV, το GTP στη θέση III και το ADP στις θέσεις II και IV. Το υπόστρωμα γλουταμικό, α-κετογλουταρικό και αμμωνία φαίνονται να συνδέονται μόνο στο ενεργό κέντρο (θέση I) (Πίνακας 1).

	Γλουταμικό	α-κετο-γλουταρικό	Αμμωνία	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NAD(P)H	ADP	GTP
Θέση I (ενεργό κέντρο)	+	+	+	+	+	+	-	-
Θέση II (ρυθμιστική θέση αδενικού νουκλεοτιδίου)	-	-	-	-	+	-	+	-
Θέση III (ρυθμιστική θέση γουανινικού νουκλεοτιδίου)	-	-	-	-	-	-	-	+
Θέση IV (ρυθμιστική θέση ανηγμένου συνενζύμου)	-	-	-	-	-	+	+	-

Τα δεδομένα προέρχονται από τους Frieden, 1963, Koberstein και Sund, 1973, Dieter και συν, 1981, Hornby και συν, 1984, Hudson και Daniel, 1993. +: σύνδεση, -: αδυναμία σύνδεσης.

Πίνακας 1. Θέσεις σύνδεσης υποστρωμάτων και αλλοστερικών τροποποιητών ανά υπομονάδα GDH

Η σταθερότητα και η καταλυτική δραστηριότητα της GDH επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Ιδιότητες της GDH που φαίνονται να επηρεάζονται περισσότερο από τις μεταβολές τις θερμοκρασίες είναι η  $K_m$  για γλουταμικό,  $\alpha$ -κεοτογλουταρικό, η ειδική δραστηριότητα του ένζυμου και η  $V_{max}$  (Di Matteo et al. 1980). Επιπροσθέτως, η παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών, οι τιμές pH και η θερμοκρασία πιστεύεται ότι επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τον μηχανισμό της αντίδρασης της GDH (Silverstein 1974, Di Matteo et al. 1980, Hornby et al. 1984)

#### Αλλοστερικοί τροποποιητές

##### *GTP*

Απο παλιά είναι γνωστό ότι το GTP αναστέλλει την GDH των θηλαστικών (Talal & Tomkins 1964, Frieden 1962&1965, Godinot & Gautheron 1971, Koberstein&Stund 1973). Αυτή η ιδιότητα της GDH των θηλαστικών να αναστέλλεται από GTP την διαχωρίζει από αυτήν των μη ζωικών ειδών, όπως τα ευβακτήρια και τους μύκητες (Frieden 1965). Το νουκλεοτίδιο αυτό συνδέεται σε θέση διαφορετική από την θέση σύνδεσης του συνενζύμου και φαίνεται να ενισχύουν το ένα την σύνδεση του αλλού στην GDH (Koberstein & Sund 1973).

Μελέτες με ανασυνδυασμένα ανθρώπινα ισοένζυμα έδειξαν ότι στην ανθρώπινη hGDH1 το GTP έχει μια ισχυρή ανασταλτική δράση ( $IC_{50}$ -0.20 $\mu$ M) όταν δεν υπάρχουν στην αντίδραση αλλοστερικοί τροποποιητές (Plaitakis et al. 2000). Αντίθετα, η μη ενεργοποιημένη hGDH2 δεν επηρεάζεται καθόλου από αυτό το νουκλεοτίδιο ( $IC_{50}$ >5000 $\mu$ M). Η προσθήκη ADP στην αντίδραση κάνει την hGDH1

πιο ανθεκτική στην αναστολή από GTP, ενώ η hGDH2 παρουσία ADP υπόκειται σε μια ήπια αναστολή από GTP. Παράλληλα, η L-λευκίνη, ένας άλλος ενεργοποιητής της γλουταμικής αφυδρογονάσης, δεν είναι ικανή από μόνη της να αναστρέψει την αναστολή από το GTP, και μόνο παρουσία ADP είναι ικανή να μειώσει την αναστολή από GTP σε σημαντικό βαθμό (Plaitakis et al.2000)., μάλιστα, αυτή η συνεργατική δράση της L-λευκίνης και του ADP είναι σε συγκεντρώσεις φυσιολογικές για το ανθρώπινο κύτταρο (125μM και 50μM αντίστοιχα).

Ανάλυση κατά Hill των γραφικών παραστάσεων της αναστολής των δυο ανθρώπινων ισοενζύμων από GTP έδειξε ότι αυτά διαφέρουν σημαντικά στην συνεργατικότητα της αναστολής τους από αυτό νουκλεοτίδιο. Η hGDH1 δείχνει θετική συνεργατικότητα στην αναστολή της από GTP (Hill>1.0, δείκτης συνεργατικότητας <81 ) και η καμπύλη της αναστολής είναι σιγμοειδική (Plaitakis et al.2000), ενώ η hGDH2 δείχνει αρνητική συνεργατικότητα (Hill<1.0 και δείκτης συνεργατικότητας >81) και η καμπύλη της αναστολής είναι υπερβολή (Plaitakis et al.2000).

#### *ADP και ATP*

Το ADP αποτελεί τον κυριότερο ενεργοποιητή της GDH, καθώς καταργεί την αρνητική συνεργατικότητα και μειώνει την ισχύ πρόσδεσης του NAD(P)H στο ενεργό κέντρο (Koberstein 1973, Bailey et al. 1982, Hornby et al. 1984). Σε μελέτες των δυο ανασυνδυασμένων ανθρώπινων ισοενζύμων GDH από κύτταρα Sf 9 οι Shashidharan et al. (1997) έδειξαν ότι οι δυο ισομορφές είχαν την ίδια ειδική δραστηριότητα σε παρουσία 1 mM ADP. Σε απουσία όμως ADP το ειδικό για τον

νευρικό ιστό ισοένζυμο ήταν σχεδόν ανενεργό, ενώ το housekeeping ισοένζυμο είχε περίπου το 40% της μέγιστης δραστηριότητας του.

Το ATP δρά στο μόριο της γλουταμικής αφυδρογονάσης, ανάλογα με την συγκέντρωση του στο σύστημα της αντίδρασης. Έτσι, προκαλεί αναστολή σε συγκεντρώσεις μέχρι 0.2 mM, η οποία φαίνεται να οφείλεται σε σύνδεση στη θέση σύνδεσης του GTP, προκαλεί ενεργοποίηση του ενζύμου σε συγκεντρώσεις 0.2-1mM λόγω σύνδεσης του στην ενεργοποιητική θέση της σύνδεσης του ADP, και τέλος προκαλεί αναστολή σε συγκεντρώσεις >1mM λόγω σύνδεσης του στο ενεργό κέντρο του ένζυμου, όπως συμβαίνει και με το ADP (Smith et al. 2001).

#### *L-λευκίνη*

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, η βασική ειδική δραστηριότητα του hGDH2 ισοενζύμου ήταν <5% αυτής του hGDH1 ένζυμου σε κύτταρα Sf9 με ίδια επίπεδα έκφρασης του ιού. Μετά από προσθήκη όμως 1mM L-λευκίνης η δραστηριότητα του ειδικού για τον νευρικό ιστό ένζυμου αυξάνει κατά 1600% της βασικής, ενώ η δραστηριότητα του ένζυμου κυτταρικής οικονομίας αυξάνει μόνο κατά 75%. Παράλληλα, η προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων ADP στο μείγμα επέτρεψε σε συγκεντρώσεις L-λευκίνης, που σε απουσία ADP δεν είχαν καμία επίδραση στο ένζυμο, να ενεργοποιήσουν σημαντικά το ειδικό για το νευρικό ιστό ένζυμο. Συνεπώς, όταν το ADP και η L-λευκίνη προστίθενται μαζί στην αντίδραση, δρούν συνεργατικά για να προκαλέσουν μεγαλύτερου βαθμού ενεργοποίηση της hGDH2 από ότι θα αναμενόταν από ένα απλό αθροιστικό αποτέλεσμα (Plaitakis et al. 2000).

#### *Μέταλλα και χημικοί παράγοντες*

Το μαγνήσιο είναι γνωστό ότι αναστέλλει την GDH θηλαστικών επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών (Fahien et al. 1990, Kuo et al.1994). μάλιστα, βρέθηκε ότι ενώ απουσία ADP η hGDH1 αναστέλλεται από χλωριούχο μαγνήσιο η hGDH2 δεν επηρεάζεται παρά μόνο μετά την προσθήκη ADP στην αντίδραση. Αντίθετα, το ασβέστιο ( $Ca^{+2}$ ) αναστέλλει κατά 20 % την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε συγκέντρωση 10mM μόνο απουσία ADP (Bailey et al 1982). Ο ψευδάργυρος ( $Zn^{+2}$ ) βρέθηκε να αναστέλλει ισχυρά την GDH, επί απουσία EDTA, μόνο στην περίπτωση των θηλαστικών (Freiden 1965). Ίδια δράση με τον ψευδάργυρο βρέθηκε να έχει και το αλουμίνιο, η οποία όμως αναιρείται με την προσθήκη χημικών παραγόντων (Yang et al. 2003). Τέλος, το EDTA, έχει μια ενεργοποιητική επίδραση στην γλουταμική αφυδρογονάση από ήπαρ αγελάδας (Freiden 1965) για αυτό και προστίθεται συνήθως μια μικρή συγκέντρωση EDTA στην αντίδραση.

#### *Ορμόνες και φάρμακα*

Ορισμένα αντιψυχωτικά είναι ισχυροί και ειδικοί αναστολείς της GDH (Tamir et al 1981, Couee & Tipton 1990, Ghous & Townshend 1999), ένα εκ των οποίων είναι και η αλοπεριδόλη (Chee et al 1979). Επί παρουσίας NADH η hGDH απομονωμένη από ιστούς εγκεφάλου και ήπατος αναστέλλονται το ίδιο από την αλοπεριδόλη, ενώ παρουσία NADPH ως συνενζύμου η απομονωμένη από εγκέφαλο hGDH αναστέλλεται περισσότερο από το ηπατικό. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν μια συσχέτιση ανάμεσα στον βαθμό αναστολής της GDH και την αντιψυχωτική δράση φάρμακων όπως η περφεναζίνη και η χλωροπρομαζίνη (Shemisa & Fahien 1971, Yoon et al. 2001). Η ανασταλτική δράση όμως αυτών των φάρμακων γίνεται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που χρησιμοποιούνται στις θεραπευτικές αγωγές ασθενών (Tamir et al. 1981, Couee & Tipton 1990).

Αντίθετα με τα αντιψυχωτικά κάποια αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η γκαμπαπεντίνη, έχουν ισχυρή ενεργοποιητική δράση στην δραστηριότητα της hGDH. Η κλινική σημασία όμως αυτής της δράσης δεν μπορεί να διατυπωθεί πριν να γίνουν περαιτέρω έρευνες στο επίπεδο συγκεντρώσεων του φαρμάκου που χρειάζονται να υπάρχουν προκειμένου να έχουμε αυτήν την δράση.

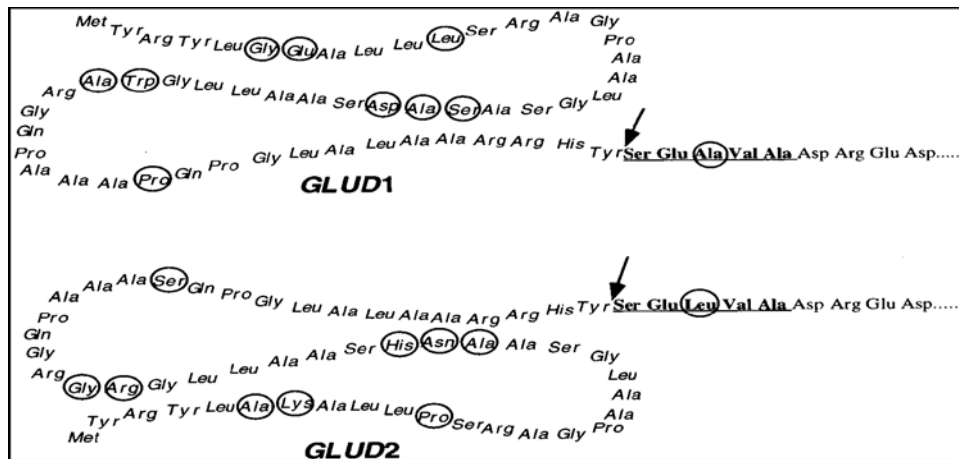
Παράλληλα ήδη από την δεκαετία του 1960 έχει μελετηθεί η δράση των στεροειδών ορμονών ως αναστολείς της δραστηριότητας της GDH όπως η διαιθυλσυλβεστρόλη, μια συνθετική εστραδιόλη, η οποία έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την αντίδραση της GDH των θηλαστικών (από ήπαρ αγελάδας) (Talal & Tomkins 1964, Colon et al.1986). Το ίδιο αποτέλεσμα έχει βρεθεί για την προγεστερόνη, εστραδιόλη και τεστοστερόνη σε GDH από ήπαρ αγελάδας (Hudson & Daniel 1993). Όμως, οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για να ανασταλεί το ενζυμο σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις των οιστρογόνων στον οργανισμό.

Η θυρεοειδική ορμόνη θυροξίνη αναστέλλει επίσης την γλουταμική αφυδρογονάση με μη αναστρέψιμο τρόπο (Ghous & Townshend 2000), αλλά σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από τα εφικτά παθολογικά επίπεδα οποιασδήποτε θυρεοειδικής νόσου.

#### Λειτουργικές διαφορές ανάμεσα στις αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2

Τα δυο λειτουργικά γονίδια, *GLUD1* & *GLUD2*, που αναφέραμε παραπάνω έχουν βρεθεί ότι διαφέρουν στην αλληλουχία τους μόνο σε 15 από τα 505 αμινοξέα τους (Εικόνα 6)



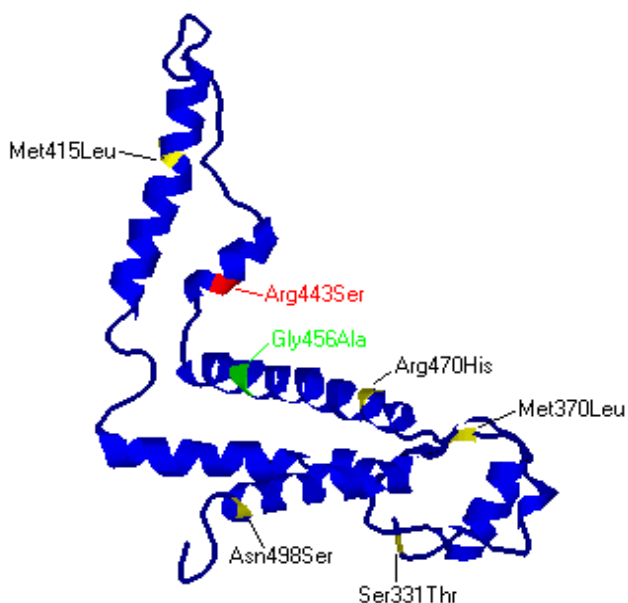


Εικόνα 6. Αμινοξική αλληλουχία των δυο ισοενζύμων. Τα 15 αμινοξέα στα οποία διαφέρει η αμινοξική αλληλουχία των δυο ισοενζύμων έχουν κυκλωθεί

Τα ισοένζυμα όμως, hGDH1 και hGDH2, που προκύπτουν από τα δυο αυτά γονίδια, διαφέρουν σημαντικά ως προς τις λειτουργικές τους ιδιότητες, την βασική τους δραστηριότητα, την αλλοστερική τους ρύθμιση από τους ίδιους τροποποιητές, την σταθερότητα τους στην αύξηση της θερμοκρασίας. Η διαφοροποίηση αυτή στις ιδιότητες των δυο ένζυμων φαίνεται να εξυπηρετεί εξελικτικά την προσαρμογή της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης στις ιδιαίτερες συνθήκες του νευρικού συστήματος. Η λειτουργική διαφοροποίηση των δυο ισοενζύμων σύμφωνα με έρευνες που έγιναν στο εργαστήριο μας οφείλεται σε κάποιες από τις αμινοξικές διαφορές τους (εικόνα 7) σύμφωνα με μελέτες μεταλλαξογένεσης που έλαβαν χώρα από μέλη της ομάδας μας (Zaganas & Plaitakis et al. 2001,2002).

- Έτσι, η αλλαγή στο γονίδιο της GLUD1 από το αντίστοιχο αμινοξύ του GLUD2 στην θέση Arg443Ser ευθύνεται για τη χαμηλή βασική δραστηριότητα και την ισχυρή ενεργοποίηση από το ADP της hGDH2 (Zaganas et al. 2002).

- Η ανάλογη αλλαγή στην θέση Glu456Ala ευθύνεται για την μειωμένη αναστολή από το GTP της hGDH2 (Zaganas & Plaitakis 2002).



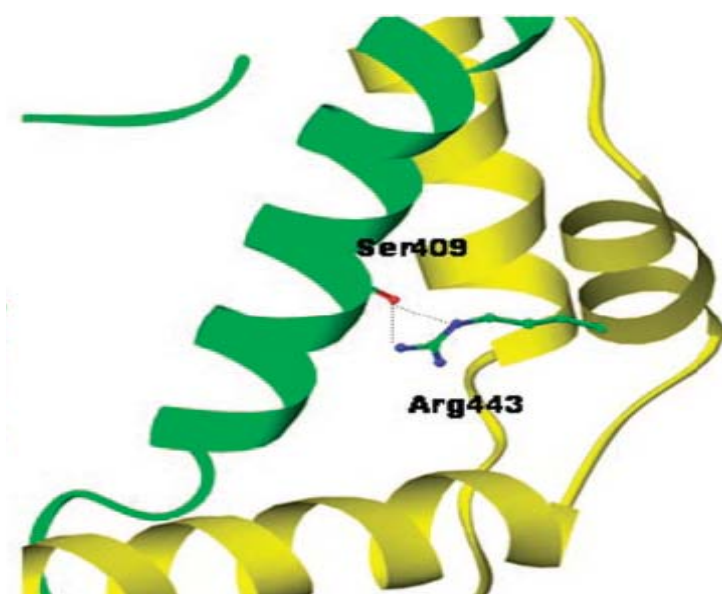
Εικόνα 7. Δομή μέρους μιας υπομονάδας του ομοιομερούς της GDH με αμινοξικές αλλαγές στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου

Μελέτη της δομής της hGDH1 δείχνει ότι η Arg443 βρίσκεται στην μικρή κατιούσα έλικα της αντένας, σημαντική για την μετάβαση από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση του ένζυμου επηρεάζοντας την κίνηση της περιστρεφόμενης έλικας στην βάση της αντένας.

Η αλλαγή Arg443Ser φαίνεται να καταστρέφει δυνητικούς υδρογονικούς δεσμούς που υπάρχουν μεταξύ της Arg443 μιας υπομονάδος με αμινοξέα γειτονικής υπομονάδος όπως η Ser409 και η Tyr405 στην φυσιολογική GLUD1 (εικόνα 8).

Η Ser409 βρίσκεται στην μεγάλη ανιούσα έλικα της αντένας γειτονικής υπομονάδος και η αλληλεπίδραση της με Arg443 έχει μεγάλη λειτουργική σημασία για το ένζυμο.

Η μετάλλαξη Arg443Ser καταργεί ουσιαστικά την βασική δραστηριότητα του ενζύμου hGDH1 παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την λειτουργία της κατιούσας έλικας και ευνοώντας την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου. Η ικανότητα του ADP να αποκαθιστά την δραστηριότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου υποδηλώνει ότι το ADP, είτε προκαλεί το άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου, είτε παρεμποδίζει την σύγκλιση των τμημάτων του ενζύμου.

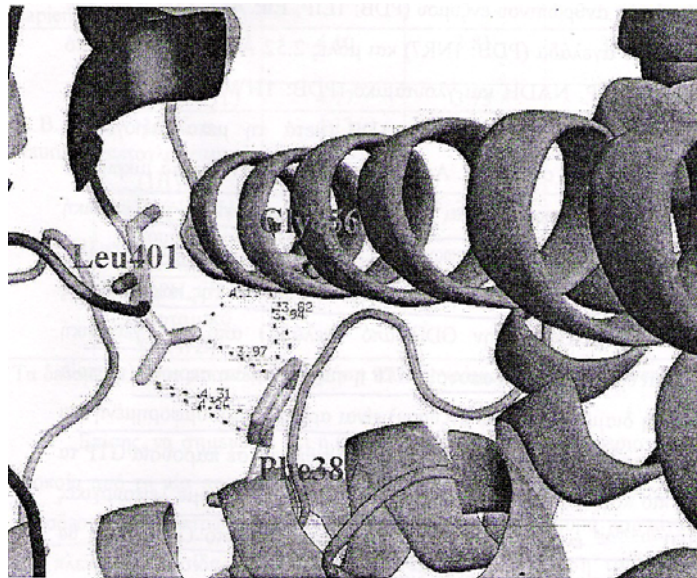


Εικόνα 8: Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των αντενών δυο υπομονάδων μέσω των αμινοξέων Arg 443 & Ser 409.

Η Glu456 της φυσιολογικής hGLUD1 βρίσκεται σε μια πολύ πυκνά δομημένη περιοχή του εξαμερούς πάνω στην περιστρεφόμενη έλικα και απέναντι από την πλευρά στην οποία γίνεται η πρόσδεση του GTP. Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η Glu456 έρχεται σε στενή επαφή με δυο αμινοξέα, την Phe387 που βρίσκεται στην ίδια υπομονάδα και την Leu401 από μια γειτονική υπομονάδα (εικόνα 9). Η υπολογιζόμενη ελάχιστη απόσταση ανάμεσα στην Ala 456 και την Phe387 ή την

Leu401 είναι 2.8 Å, απόσταση πολύ μικρή για το σύμπλοκο του ενζύμου με υποστρώματα και GTP

Απουσία GTP, η περιοχή αυτή είναι αρκετά αποσυμφορημένη για να δεχτεί την επιπλέον μεθυλομάδα της Ala. Όμως, η παρουσία GTP στην περιοχή ενδεχομένως προκαλεί συμφόρηση, με αποτέλεσμα τις λειτουργικές διαφορές στη μεταλλαγμένη hGLUD1 (εμποδίζοντας την επικοινωνία μεταξύ υπομονάδων, σημαντική για την αλλοστερική ρύθμιση από GTP και την συνεργατικότητα του ενζύμου) μόνο ως προς την ρύθμιση από GTP.



Εικόνα 9. Υδρογονικοί δεσμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ των αμινοξέων Gly 456, Phe 387 & Leu 401

## Η νόσος Parkinson

Η νόσος του Parkinson περιγράφηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον James Parkinson, από τον οποίο πήρε και το όνομα της. Αποτελεί ένα από τα πιο

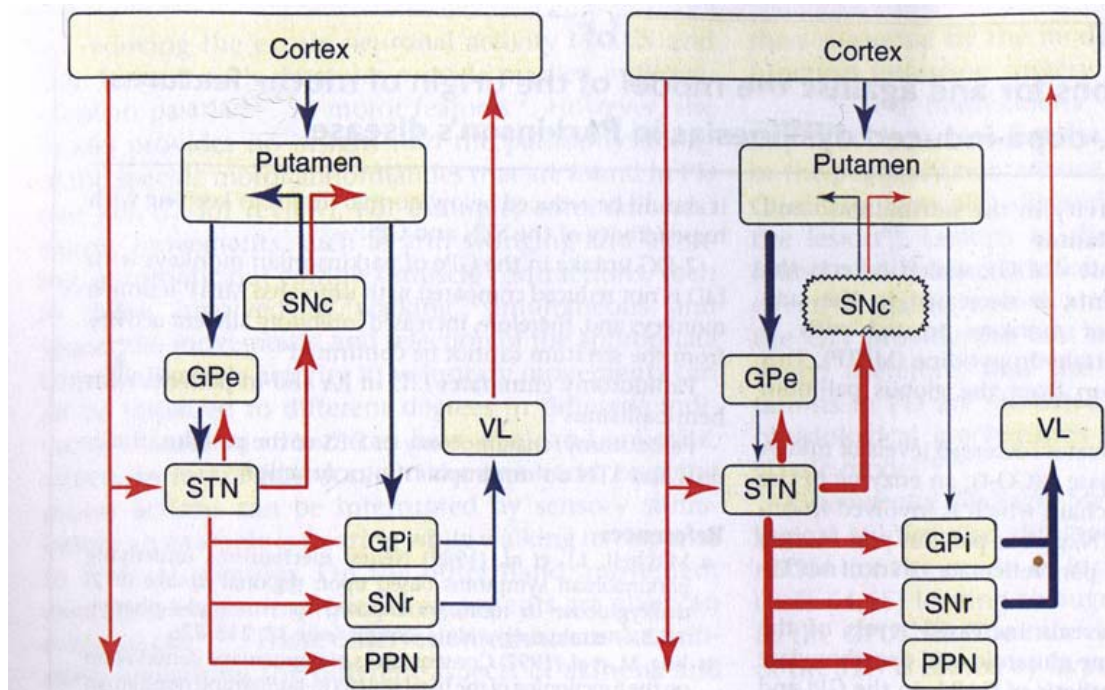
κοινά νευρολογικά νοσήματα στον άνθρωπο και είναι δεύτερη σε συχνότητα νευροεκφυλιστική νόσος μετά την νόσο Alzheimer, προσβάλλοντας το 1,8% του πληθυσμού άνω των 65 ετών και το 0,4% του πληθυσμού κάτω των 40 ετών. Σποραδικά, παρατηρείται επίσης και έναρξη κατά την παιδική και εφηβική ηλικία. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από μια βραδέως εξελισσόμενη εκφύλιση της ντοπαμινεργικής μελαινοραβδωτής οδού του κεντρικού νευρικού συστήματος, και αποτελεί την πρώτη νευρολογική νόσο, στην οποία με την εφαρμογή θεραπείας υποκατάστασης με μια πρόδρομη ουσία της ντοπαμίνης (L-DOPA) επετεύχθη η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών. Η πλειονότητα των ασθενών (>80%) δεν έχει κληρονομικό ιστορικό και θεωρείται ότι πάσχει από πρωτοπαθή σποραδική μορφή. Περίπου 10-20% των ασθενών παρουσιάζουν μια μορφή κληρονομικότητας και θεωρείται ότι πάσχουν από μια οικογενή μορφή της νόσου του Parkinson.

Στο 50 έως 80% των ασθενών με Parkinson, η νόσος ξεκινά με τρόμο 4 ως 8 Hz σε ένα από τα δυο χέρια. ο τρόμος μεγιστοποιείται κατά την ηρεμία του ατόμου, περιορίζεται κατά την διάρκεια της κίνησης και απουσιάζει κατά τον ύπνο. Η εκδήλωση του σε κατάσταση έντονης συναισθηματικής και ψυχικής φόρτισης καθώς και σε κάματο. Ο τρόμος αυτός παρατηρείται κυρίως στα χέρια, στους βραχίονες και στις κνήμες, ενώ μπορούν να εμπλακούν και η γνάθος, η γλώσσα, το μέτωπο και τα βλέφαρα. Συχνά ξεκινά ασύμμετρα, αλλά τελικά προσβάλλει και τις δυο πλευρές. Τον τρόμο ακόλουθεί η προοδευτική ακαμψία, η βραδύτητα και η πτώχεια των κινήσεων (βραδυκίνησια) καθώς και η δυσκολία για έναρξη κίνησης (ακίνησια). Ο ασθενείς εμφανίζει κύρτωση στην ράχη, και ο βηματισμός χαρακτηρίζεται από μικρά συρόμενα βήματα, ενώ τα άνω άκρα παραμένουν σε θέση κάμψης στον κορμό, χωρίς την φυσιολογική τους κίνηση. Η τάση για πρόωση ή οπισθοχώρηση, όταν

μετακινείται ο ασθενής, οφείλεται στην απώλεια των αντανακλαστικών στάσης του σώματος. Ανάλογα με το αν το κυρίαρχο σύμπτωμα στην κλινική εικόνα είναι ο τρόμος ή η βραδυκινησία ή και τα δυο, η νόσος ταξινομείται αντίστοιχα ως τρομώδους, ακινητικού ή μεικτού τύπου. Η νόσος επηρεάζει και την ομιλία με κύριο χαρακτηριστικό την βατταριστική δυσαρθρία του ασθενούς. Η άνοια είναι μια αρκετά συχνή εκδήλωση του προχωρημένου σταδίου της νόσου, προσβάλλοντας περί το ένα τρίτο των ασθενών, αν και στην περίπτωση αυτή έχει ενοχοποιηθεί η χορηγούμενη αντιπαρκινσονική αγωγή. Τέλος, ένα σύνηθες σύμπτωμα των ασθενών που πάσχουν από την νόσο του Parkinson είναι και η κατάθλιψη.

Η κινητική δυσλειτουργία που χαρακτηρίζει τη νόσο οφείλεται σε βλάβη του κυκλώματος ελέγχου της κίνησης, κινητικός φλοιός- βασικά γάγγλια- θάλαμος- κινητικός φλοιός (Albin et al. 1989). Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, οδηγεί σε εξασθένηση της μελανοραβδωτής ντοπαμινεργικής οδού, που έχει ως συνέπεια την αυξημένη ανασταλτική έξοδο από το έσω τμήμα της ωχράς σφαίρας των βασικών γαγγλίων προς τον θάλαμο με τελικό αποτέλεσμα την μείωσης της ενεργοποίησης του κινητικού φλοιού από τον θάλαμο (Εικόνα 10). Παρόμοια δυσλειτουργία στο αντίστοιχο κύκλωμα που αφορά τις περιοχές του φλοιού και των βασικών γαγγλίων που σχετίζονται με τις γνωστικές και τις συναισθηματικές λειτουργίες φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τις νοητικές και συναισθηματικές διαταραχές που παρουσιάζονται στη νόσο (Herrero et al. 2002). Παρόλα αυτά, στην παθολογία της νόσου φαίνεται να συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, όπως η απώλεια νευρώνων και σε άλλους εγκεφαλικούς πυρήνες εκτός της μέλαινας ουσίας, όπως ο locus coeruleus και ο nucleus basalis του Meynert. Επίσης, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και αλλαγές στα επίπεδα νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμικό

οξύ, η νορεπινεφρίνη, η ακετυλοχολίνη και το γ- αμινοβουτυρικό οξύ (Burke 1999; Drucker & Verdugo 2004).



Εικόνα 10: κινητικό κύκλωμα φλοιός-βασικά γάγγλια-θάλαμος-φλοιός στον φυσιολογικό (A) και τον παρκινσονικό (B) εγκέφαλο. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις διεγερτικές και τα μαύρα τις ανασταλτικές εξόδους. Το αυξημένο ή μειωμένο πάχος των βελών στον παρκινσονικό σε σχέση με τον φυσιολογικό εγκέφαλο υποδηλώνει αύξηση ή μείωση στην ισχύ της αντίστοιχης εξόδου. Cortex: φλοιός, putamen: κέλυφος, GPe: έξω μοίρα της ωχράς σφαίρας, STN: υποθαλάμιος πυρήνας, GPi: έσω μοίρα της ωχράς σφαίρας, SNr: δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας, VL: έξω κοιλιακός πυρήνας του θαλάμου, SNc: συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου του Parkinson δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως, όμως η μέχρι τώρα έρευνα, ως προς αυτόν τον εκλεκτικό εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων έχει οδηγήσει σε τέσσερις υποθέσεις.

1. περιβαλλοντικοί παράγοντες και εξωγενείς τοξίνες.

2. οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία
3. διαταραχές του μεταβολισμού του γλουταμικού οξέος.
4. γενετικοί παράγοντες

Υπέρ της πρώτης υπόθεσης συνηγορούν οι παρατηρήσεις διαφορετικής επίπτωσης της νόσου μεταξύ ατόμων ίδιας προέλευσης που κατοικούν σε διαφορετικές περιοχές, καθώς επίσης και το γεγονός πως η νόσος έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε αγροτικές περιοχές από ότι σε αστικές. Τα πειραματικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της νόσου στηρίζονται στη χορήγηση νευροτοξινών, που προκαλούν κοινή παθολογία στη μελαινοραβδωτή οδό με τη νόσο. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέχρι σήμερα νευροτοξίνες για το σκοπό αυτό είναι η 6-OHDA (6-υδροξυνοτοπαμίνη) και το MPTP (ένα παράγωγο της μεπεριδίνης που ελάμβαναν ηρωινομανείς), οι οποίες βρέθηκε ότι προκαλούν συμπτώματα που ομοιάζουν με αυτά του Παρκινσονισμού. (Moratalla et. al., 1992; Fornai et. al., 2005).

Το οξειδωτικό στρες, ως αποτέλεσμα της παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την οξειδωτική φωσφορύλιση, αλλά και του μεταβολισμού και της αυτοοξειδωσης της ντοπαμίνης, έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου (Pezzella et. al., 1997). Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση του μεταβολισμού της ντοπαμίνης, αλλά και η ανεπάρκεια γλουταθειόνης και δεσμουτάσης του υπεροξειδίου που προστατεύουν από την δράση των ελευθέρων ριζών μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες και κατ' επέκταση σε κυτταρικό θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η εμπλοκή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της νόσου στηρίχτηκε στη ντοπαμινεργική εκφύλιση που παρατηρείται σαν αποτέλεσμα της διαταραχής του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, η οποία οδηγεί στην διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και τη διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορύλισης, οδηγώντας στη μείωση παραγωγής ATP και



επακόλουθα σε ενεργειακό έλλειμμα για το κύτταρο (Atlante et al., 2001). Παρόλο που δεν είναι γνωστό αν η δυσλειτουργία αυτή έχει γενετική βάση, παρόλο που πρόσφατα βρέθηκαν μονογονιδιακές μορφές της νόσου ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (Lin & Beal, 2006), ή είναι επίκτητη, η διαταραχή αυτή καθιστά τους νευρώνες της μέλαινας ουσίας, σε συνδυασμό με ενδογενείς παράγοντες, ευαίσθητους σε περιβαλλοντικές τοξίνες.

Η διεγερτικοτοξική νευροδιαβίβαση έχει επίσης ενοχοποιηθεί για την νευροεκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων που παρατηρείται στην νόσο. Στην περίπτωση αυτή, αυξημένη σύνθεση γλουταμικού οξέος, μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα, μέσω της υπερφόρτωσης των μιτοχονδρίων με  $Ca^{2+}$  και κατά συνέπεια υπερπαραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Διαταραχές του μεταβολισμού του γλουταμικού έχουν βρεθεί σε αρκετούς ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (Plaitakis et al., 1982), μεταξύ αυτών και νόσου του Πάρκινσον (Iwasaki et al., 1992), κάτι που υποδηλώνει πως η μεταβολική δυσλειτουργία του αμινοξέος αυτού αποτελεί κομμάτι της παθολογίας της νόσου. Μάλιστα, υπάρχουν και περιπτώσεις ασθενών των οποίων η γλουταμική αφυδρογονάση παρουσιάζει διαφοροποιημένη βασική δραστηριότητα και θερμική σταθερότητα (Plaitakis et al., 1984).

Η γενετική βάση της νόσου βασίζεται στην παρατήρηση πως το 10% του συνόλου των ατόμων που εμφανίζουν τη νόσο, περιλαμβάνει περιπτώσεις για τις οποίες υπάρχει οικογενειακό ιστορικό εκδήλωσής της. Μέχρι σήμερα, 10 γενετικοί τόποι έχουν συσχετιστεί με την κληρονομικότητα της νόσου (PARK1-PARK11), εκ των οποίων 6 γονίδια έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και οι μεταλλάξεις τους θεωρούνται άμεσα υπεύθυνες για την παθογένεια της κληρονομικής νόσου του Πάρκινσον (α-συνουκλείνη (PARK1), το parkin (PARK2), το UCH-L1 (PARK5), το PINK1 (PARK6), το DJ1 (PARK7) και το LRRK2 (PARK8)).

Μεταξύ των διαφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων, η νόσος Πάρκινσον αποτελεί μοντέλο για την ανάπτυξη συμπτωματικών θεραπειών που έχουν σαν βάση την γνώση πάνω στην μορφολογική και βιοχημική παθολογία των ασθενειών αυτών. Η πρώτη επιτυχής θεραπεία της νόσου με λεβοντόπα έγινε το 1967 και βασιζόταν στην ήδη αποκτημένη ως τότε γνώση, ότι τα κινητικά συμπτώματα της νόσου οφείλονται στην μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα των βασικών γαγγλίων του εγκεφάλου, λόγω της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών κυττάρων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του μεσεγκεφάλου. Η κύρια θεραπεία η οποία εφαρμόζεται σήμερα, συνεχίζει να συνίσταται στην χορήγηση της L-DOPA, ενός πρόδρομου μορίου της ντοπαμίνης, η οποία προσλαμβάνομενη από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες που δεν έχουν εκφυλιστεί μετατρέπεται μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της DOPA σε ντοπαμίνη. Η θεραπεία με L-DOPA, παρά όλα θετικά αποτελέσματα της παραμένει συμπτωματική και δεν εμποδίζει την περαιτέρω εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μετά από ένα χρονικό διάστημα απουσία ανταπόκρισης των ασθενών στο φάρμακο. Το ολοένα και αυξανόμενο ποσοστό των ασθενών που εμφανίζουν παρενέργειες μετά την χορήγηση L-DOPA, σε συνδυασμό με την πρόοδο των τεχνικών απεικόνισης του εγκεφάλου και των υπολογιστικών νευροεπιστημών τα τελευταία χρόνια, οδήγησε στην προώθηση της εφαρμογής χειρουργικών μεθόδων θεραπείας της νόσου. Αυτές περιλαμβάνουν, είτε τεχνικές αφαίρεσης των υποθαλάμιου πυρήνα ή της έσω μοίρας της ωχράς σφαίρας, είτε τεχνικές υπερδιέγερσης του υποθαλάμιου πυρήνα, με σκοπό την επανόρθωση της ομαλής λειτουργίας του κυκλώματος των βασικών γαγγλίων. Οι εφαρμογές αυτές έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικές όσον αφορά στην βελτίωση των κινητικών

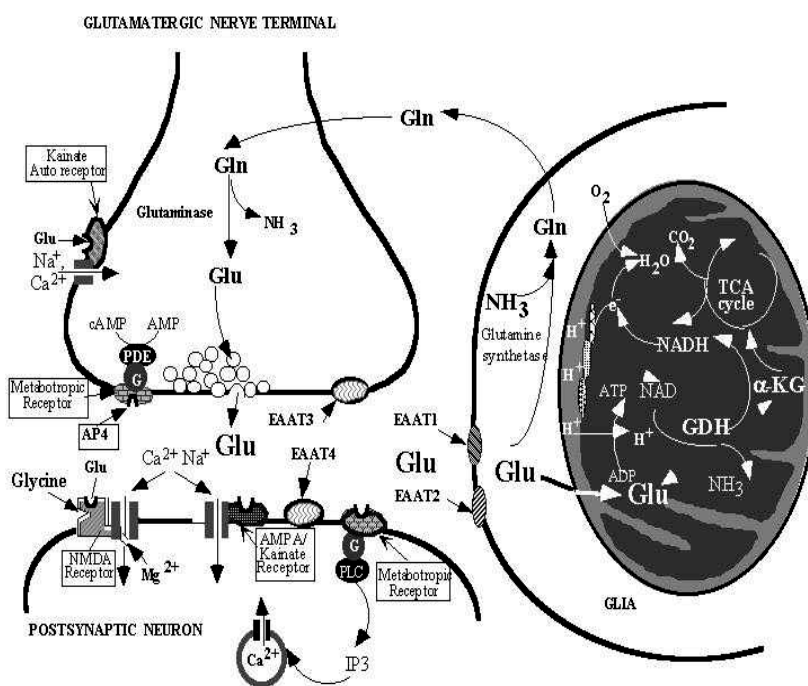
διαταραχών, αλλά και στον περιορισμό των κινητικών δυσλειτουργιών (δυσκινησία) που παρουσιάζονται κατά την διάρκεια της θεραπείας με L-DOPA. (Limousin et al. 1998, Bjarkam and Sorensen 2004). Η θεραπεία επίσης, μέσω αποκατάστασης των ντοπαμινεργικών κυττάρων που εκφυλίζονται, με τη χρήση μοσχευμάτων που παράγουν ντοπαμίνη είναι πολλά υποσχόμενη, καθ' ότι στοχεύει στην εξάλειψη της αιτίας και όχι των συμπτωμάτων της νόσου. Η χρήση μοσχευμάτων έχει αποδειχθεί πολλή αποτελεσματική στην βελτίωση της κινητικής λειτουργίας ζωικών πειραματικών μοντέλων της νόσου, παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της εφαρμογής της σε ασθενείς δεν είναι το ίδιο ενθαρρυντικά. Τέλος, η γονιδιακή θεραπεία, η οποία στοχεύει στην εισαγωγή στην μέλαινα ουσία ή το ραβδωτό σώμα, μέσω ιικών φορέων, γονιδίων που κωδικοποιούν είτε για ένζυμα που συμμετέχουν στην διαδικασία παραγωγής ντοπαμίνης, είτε για διάφορους αντι-αποπτωτικούς παράγοντες, είτε για νευροτροφικούς παράγοντες (π.χ. GDNF) βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο.

*Το γλουταμικό οξύ, η γλουταμική αφυδρογονάση και ο ρόλος τους στη νόσο του*

*Πάρκινσον*

Το γλουταμικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός διαβιβαστής στο ΚΝΣ των θηλαστικών (Fonnum 1984), καθώς υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός νευρώνων ο οποίοι διαθέτουν

γλουταμικό σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως στις συνάψεις. Οι περιοχές με υψηλότερη περιεκτικότητα υποδοχέων γλουταμικού είναι τα βασικά γάγγλια, οι θαλαμικές περιοχές της μέσης γραμμής και ο φλοιός του εγκεφάλου και της παρεγκεφαλίδας (Aoki et al. 1987 Grandes et al 1994). Πέρα από την παραπάνω λειτουργία, το γλουταμικό οξύ εμπλέκεται σε μια σειρά από άλλες διαδικασίες, όπως η μάθησης και μνήμης, και φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ συμμετέχοντας σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, μετανάστευση, διαφοροποίηση, επαγωγή ή εξάλειψη συνάψεων καθώς και στον κυτταρικό θάνατο, ενώ ταυτόχρονα διατελεί σημαντικό ρόλο στις ενεργειακές και μεταβολικές λειτουργίες των εγκεφαλικών κύτταρων.



Εικόνα 10: Νευρωνική διαβίβαση γλουταμικού και μεταβολισμός του στα αστροκύτταρα (Plaitakis, A. και Shashidharan, P., 2000)

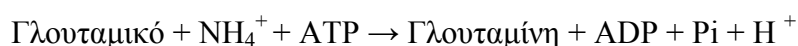
Το γλουταμικό οξύ αποθηκεύεται σε ειδικές νευρικές (γλουταματεργικές) απολήξεις και απελευθερώνεται στις μετασυναπτικές σχισμές. Η εκκαθάριση του από την μετασυναπτική σχισμή ξεκινάει με την απομάκρυνση της απελευθερούμενης ποσότητας γλουταμικού μέσω ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων που βρίσκονται στον προσυναπτικό νευρώνα και στα αστροκύτταρα που περιβάλλουν την συναπτική σχισμή.

Η είσοδος του γλουταμινικού στα νευρογλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα) που περιβάλλουν την συναπτική σχισμή πραγματοποιείται με την ταυτόχρονη μεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+$  και ενεργοποιεί μια σειρά από μεταβολικά μονοπάτια που έχουν ως σκοπό :

- 1) την μετατροπή του γλουταμινικού σε γλουταμίνη μέσω του ενζύμου της συνθετάσης της γλουταμίνης,
- 2) την χρησιμοποίηση του γλουταμινικού ως υπόστρωμα για τον κύκλο του κιτρικού οξέος μέσω του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης-GDH για την αύξηση των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου (Dennis et al. 1976),
- 3) σύνθεση και αποδόμηση αμινοξέων μέσω της αλανινικής και της ασπαρτικής αμινοτρασφεράσης,
- 4) την είσοδο της αμμωνίας στον κύκλο της ουρίας μέσω του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης-GDH και την αποβολή της αμμωνίας από τον οργανισμό αντίστοιχα (Weil-Malherbe & Gordon 1971 ),
- 5) την σύνθεση του GABA νευροδιαβιβαστή μέσω της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος, ενός από τους κύριους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές του ΚΝΣ,

6) ενώ τέλος συμβάλει στην παραγωγή γλουταθειόνης, ενός τριπεπτιδίου που προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη από ελεύθερες ρίζες ROS και συμμετέχει στην μεταφορά αμινοξέων από τον εξωκυττάριο χώρο μέσα στα κύτταρα ( Meister & Aderson 1983, Griffith & Meister 1985).

Μετά την επαναπρόσληψη του από τα κύτταρα της γλοίας, το γλουταμικό οξύ ανακυκλώνεται και μετέχει μιας σειράς μεταβολικών δρόμων. Το πρώτο μεταβολικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει είναι η παραγωγή γλουταμίνης στα αστροκύτταρα, προκειμένου να μεταφερθεί άμεσα στους προσυναπτικούς νευρώνες για την εκ νέου σύνθεση του γλουταμικού, μέσω της αντίδρασης:



Με τον τρόπο αυτό διατηρείται ο κύκλος γλουταμικού - γλουταμίνης μεταξύ νευρικών κυττάρων και αστροκυττάρων ( Van den berg & Garfinkel 1971, Norenberg et al. 1979, Schousboe et al. 1979, Martin & Rinvall 1993).

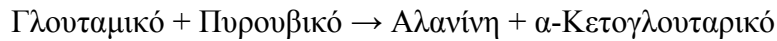
Επιπροσθέτως, το γλουταμικό οξύ χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τον κύκλο του KREBS, όπου είναι δυνατόν να ακολουθήσει δυο ξεχωριστές οδούς ανάλογα με την συγκέντρωση του στη συναπτική σχισμή. Όταν η συγκέντρωση του γλουταμικού στη συναπτική σχισμή δεν υπερβαίνει τα 0.2mM τότε μεταβολίζεται με σκοπό να παίζει σημαντικό ρολό στην πρωτεϊνοσύνθεση. Όταν η συγκέντρωση του υπερβαίνει τα 0.2mM, παράλληλα με την διαδικασία σύνθεσης της γλουταμίνης λαμβάνει χώρα και μια άλλη αντίδραση που μετατρέπει το γλουταμινικό σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία και η οποία καταλύεται από την γλουταμική αφυδρογονάση (GDH).

Έτσι, ο μεταβολισμός του γλουταμινικού οξέος συνδέεται άμεσα με την παραγωγή αμμωνίας μέσω της GDH πέρα από την χρησιμοποίησή του από την συνθετάση της

γλουταμίνης. Με αυτόν τον τρόπο, η συνθετάση της γλουταμίνης διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανακύκλωση του γλουταμινικού, σε χαμηλές συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή, παράλληλα με την γλουταμική αφυδρογονάση που βοηθά στην απομάκρυνση ποσοτήτων γλουταμικού μέσω του κύκλου του Krebs.

Επιπλέον, η παραγωγή ATP και αμμωνίας κατά την διοχέτευση του γλουταμικού στο μονοπάτι του τρικαρβοξυλικού οξέος ευνοούν την λειτουργία της συνθετάσης της γλουταμίνης γεγονός που ενισχύει την άποψη της παράλληλης λειτουργίας των δυο μονοπατιών. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το ποσοστό του γλουταμινικού που μεταβολίζεται μέσω της GDH και του κύκλου του Krebs αυξάνει σημαντικά όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμινικού αυξηθεί από 0,1mM σε 0,5mM (McKenna et al 1996) και ότι το 50% αυτού που προσλαμβάνεται από αστροκύτταρα στις παραπάνω συνθήκες σε καλλιέργεια κύτταρων υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση μέσω του κύκλου του Krebs οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η οξειδωτική απαμίνωση μέσω της GDH είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου το γλουταμικό οξύ εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Το γλουταμικό οξύ λαμβάνει μέρος επίσης και στην σύνθεση και αποδόμηση άλλων μη απαραίτητων αμινοξέων σαν πρόδρομη ουσία για την παραγωγή της προλίνης και αργινίνης και αποτελεί κύριο δοτή της α-αμινομάδας μέσω τρανσαμίνωσης (δηλαδή την μεταφορά μιας α-αμινομάδας από ένα αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ), μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τις αμινοτρασφεράσες. Έτσι, η αλανίνη και το ασπαρτικό συντίθεται με ένα μόνο βήμα από τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων πυρουβικό και οξαλοοξικό αντίστοιχα από τα ένζυμα της αλανινικής και ασπαρτικής αμινοτρασφεράσης αντίστοιχως μέσω των αντιδράσεων:

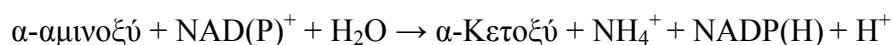


Οι αντίθετες πορείες στις παραπάνω αντιδράσεις αντιπροσωπεύουν την αποδόμηση των αμινοξέων η οποία βασίζεται στην μεταφορά του αζώτου διαμέσω των αμινοτρασφερασών προς το γλουταμικό.

Ενώ τα αμινικά άζωτα διοχετεύονται προς το γλουταμικό πριν απελευθερωθούν ως ελεύθερη αμμωνία ή χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση άλλων αμινοξέων, οι ανθρακικοί σκελετοί που παραμένουν μετά την απομάκρυνση του αμινικού αζώτου μπορούν πλέον να οξειδωθούν για να ολοκληρωθεί ο αμινοξικός καταβολισμός.

Ο ρόλος της GDH είναι σημαντικός στην ολοκλήρωση της αποδόμησης των αμινοξέων καθώς καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία. Έτσι φαίνεται η GDH να ρυθμίζει τα επίπεδα του γλουταμινικού στο κύτταρο ενώ ταυτόχρονα συνδέει τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτών των υδατανθράκων ενισχύοντας την παραγωγή ενέργειας. Υπό μία ευρεία έννοια λοιπόν, η GDH μπορεί να ρυθμίζει ποικιλοτρόπως την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου λειτουργώντας ως ενεργειακός αισθητήρας ενεργοποιούμενη από μόρια που υποδηλώνουν χαμηλή ενεργειακή κατάσταση στο κύτταρο (GDP & ADP) και αναστέλλονται από μόρια που δηλώνουν περίσσεια ενεργειακών αποθεμάτων (GTP & ATP) (Smith 1979).

Παράλληλα, κατά την αποδόμηση των αμινοξέων, η α-αμινομάδα μεταφέρεται μέσω αμινοτρασφερασών στο α-κετογλουταρικό για να σχηματιστεί γλουταμικό το οποίο μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης από την GDH παράγει  $\text{NH}_4^+$  η οποία μετατρέπεται σε ουρία, μέσω του κύκλου της ουρίας, και απεκκρίνεται (Stryer 1988)





Ο κύκλος της ουρίας είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς είναι ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης της αμμωνίας από τον οργανισμό, υψηλά επίπεδα της οποίας είναι τοξικά, ενώ μερική έλλειψη των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στον κύκλο της ουρίας οδηγεί σε υπεραμμωναιμία και σοβαρά νευροψυχιατρικά συμπτώματα, αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων της αμμωνίας στο ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, το σύνδρομο υπεραμμωναιμίας (λόγω της αδυναμίας μεταβολισμού της αμμωνίας και αποβολής της μέσω του κύκλου της ούριας) έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στην μερική έλλειψη N-ακετυλογλουταμικού, που συντίθεται από το γλουταμικό οξύ και εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα του στο κύτταρο. Επίσης, στην περίπτωση της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, η αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας αναστέλλει την 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση, ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος (Cooper & Plum 1987).

Η γλουταμική αφυδρογονάση, λοιπόν, φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλουταμικού, που λόγω των διεγερτοτοξικών του ιδιοτήτων έχει εμπλακεί στους μηχανισμούς της νευροεκφύλισης. Εκτός όμως από τα αστροκύτταρα και οι ώριμοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες, εκφύλιση των οποίων οδηγεί στην νόσο του Πάρκινσον, εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα αυτήν την πρωτεΐνη, οι οποίοι με την σειρά τους εκφράζουν όλους τους μετασυναπτικούς υποδοχείς του γλουταμικού, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μετάδοση της διεγερτικής ώσης, αλλά και τον ειδικό νευρωνικό μεταφορέα του EAAT3 (excitatory aminoacid transporter), γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη πρόσληψη του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή και ταυτόχρονα του υποστρώματος της GDH του γλουταμικού, από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Η GDH είναι μειωμένη σε όψιμης εγκατάστασης πολυσυστηματικές νευρολογικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από

παρεγκεφαλιδική αταξία και παρκινσονισμό, ως αποτέλεσμα της εκφύλισης περιοχών του ΚΝΣ, που λαμβάνουν πυκνή γλουταματεργική νεύρωση (π.χ. μέλαινα ουσία, παρεγκεφαλίδα) και οι οποίες φυσιολογικά έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου, και επομένως η ορθή λειτουργία της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι σημαντική για την προστασία του νευρικού ιστού από την τοξική δράση του γλουταμικού οξέως, που είναι ικανό να προκαλέσει υπερδιέγερση και εκφυλισή των συναπτικών νευρώνων στην νόσο του Πάρκινσον (νευροδιεγερτικοτοξική υπόθεση).

### **Στόχοι της παρούσας διατριβής**

1) Η μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών της *GLUD2* πρωτεΐνης για να κατανοηθεί η μοριακή βάση ρύθμισης της βασικής δραστηριότητας του ειδικού για το νευρικό σύστημα ενζύμου

Δεδομένου πως οι δυο αλλαγές (Gly456, Arg443) που σχετίζονται με τις διαφορές που παρατηρούμε ανάμεσα στις δυο ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης βρίσκονται στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου, και καθώς η hGDH1 έχουν μελετηθεί εκτενώς (εν αντιθέσει με την hGDH2), για να μελετήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την λειτουργία της hGDH2, παρήγαμε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που φέρουν αλλαγές αμινοξέων στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου (αντένα, pivot helix). Τα πέντε hGDH2 μεταλλάγματα που μελετήθηκαν ήταν: τα Glu441Arg, Ser445Leu στην αντένα, τα Lys450Glu, His454Tyr στην pivot helix και το Ser448Pro στην περιοχή σύνδεσης των παραπάνω δομών. Η επιλογή των παραπάνω μεταλλάξεων έγινε με κριτήριο τις ιδιότητες που προσδίδουν αντίστοιχες

μεταλλάξεις της ρυθμιστικής περιοχής της hGDH1 στο ενζυμο, όπου φαίνεται να οδηγούν στην άρση της αναστολής του GTP, χωρίς να επηρεάζεται η βασική τους δραστηριότητα (Kelly and Stanley 2001; Fang *et al.* 2002). Εξαιτίας αυτής της άρσης, ασθενείς με το σύνδρομο HI/HA, που φέρουν μεταλλάξεις στην pivot helix της hGDH1 παρουσιάζουν σπασμούς από υπερσουλινισμό λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του ενζύμου (Stanley *et al.* 1998). Αντίθετα, η αντίσταση της hGDH2 από το GTP, μια ιδιότητα για την οποία είναι υπεύθυνη η Gly456Ala αλλαγή (Zaganas and Plaitakis 2002) καθιστά το ενζυμο ανεξάρτητο από την δράση του GTP. Αντ' αυτού, η hGDH2 έχει αναπτύξει έναν τελείως διαφορετικό μοριακό μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητας του, η φύση του οποίου μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

2) Η λειτουργική ανάλυση των μεταλλαγμένων και φυσιολογικών πρωτεϊνών, και η μελέτη της ευαισθησίας τους σε αλλοστερικούς τροποποιητές, όπως τα οιστρογόνα (DES, estradiol, oestriol, progesterone) και τα αντιψυχωσικά (haloperidol, perphenazine).

Εφόσον το πρώτο σκέλος αυτής της μελέτης έδειξε πως η hGDH2 είναι ανθεκτική στην αναστολή από GTP, μελετήθηκε η περίπτωση της αντικατάστασης της δράσης του GTP, από άλλους αλλοστερικούς τροποποιητές. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος σε μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου μέσω της πρόσδεσης τους σε ειδικούς υποδοχείς (ER) που βρίσκονται στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων (Green and Simpkins, 2000). Πέρα από την ιδιότητα των στεροειδών να ενεργοποιούν downstream σηματοδοτικά μονοπάτια όπως η μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των κυττάρων,

μπορούν να δράσουν και μέσω μη-γενομικών μηχανισμών επηρεάζοντας διαδικασίες όπως το οξειδωτικό στρες και ο μεταβολισμός (Amantea et al., 2005, Ba et al., 2004; Goodman et al., 1996, McEnery and Pederson, 1986; McEnery et al., 1989). Η γλουταμική αφυδρογονάση ήταν το πρώτο μεταβολικό ένζυμο που μελετήθηκε σε σχέση με την αναστολή που προκαλεί η δράση των οιστρογόνων (Yielding and Tomkins, 1960), παρόλο που οι συγκεντρώσεις που απαιτούνταν για την αναστολή αυτή ήταν πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα τους στον οργανισμό. Εφόσον αρχικές έρευνες σε αδρά εκχυλίσματα των αγρίου τύπου GDHs, έδειξε πως η ειδική για το νευρικό σύστημα hGDH2 ήταν πολύ πιο ευαίσθητη στην αναστολή από οιστρογόνα από την hGDH1, μελετήθηκαν περαιτέρω καθαρισμένες μεταλλαγμένες και αγρίου τύπου γλουταμικές αφυδρογονάσες, προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο οι στεροειδείς ορμόνες επιδρούν στην hGDH2.

Τα ευρήματα της έρευνας αυτής, αποφασίστηκε να συγκριθούν με τα αποτελέσματα της μελέτης της δράσης των αντιψυχωσικών παραγόντων στην δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης, δεδομένου πως υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως στην σχιζοφρένεια υπάρχει δυσλειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος (κάτι που σχετίζεται με τα αρνητικά συμπτώματα και την νευροεκφύλιση που παρατηρείται σε αυτήν την διαταραχή) (Couee et al., 1990, Kallos & Shaw, 1971), ενώ παράλληλα έχει βρεθεί πως στον προμετωπιαίο φλοιό σχιζοφρενικών ασθενών υπάρχουν αυξημένα επίπεδα γλουταμικής αφυδρογονάσης (Burbaeva et al., 2003).

3) Η μελέτη επιπλέον ασθενών με νόσο του Πάρκινσον και ισάριθμο δείγμα υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας για να καθοριστεί εάν η Ala445Ser μετάλλαξη είναι ειδική για την νόσο ή αποτελεί απλό πολυμορφισμό, και η αναζήτηση πιθανών άλλων

πολυμορφισμών – μεταλλάξεων στο γονίδιο *GLUD2* που να σχετίζονται με νόσο του Parkinson.

Η νόσος του Πάρκινσον, ως γνωστόν προσβάλλει περίπου το 1.8% του πληθυσμού άνω των 65 (de Rijk et al., 2000) και χαρακτηρίζεται από υπο-κινησία, σφίξιμο και δυσκαμψία των μυών και τρόμο (τρέμουλο) των άκρων, συνοδευόμενη και από άλλα συμπτώματα δευτέρου βαθμού όπως υπόταση, διαταραχές της ισορροπίας (Hoehn et al., 1967). Περίπου το 80% των περιπτώσεων είναι σποραδικές, με τους άνδρες να προσβάλλονται πιο συχνά από τις γυναίκες (ratio=1.5:1). Μια από τις θεωρίες σχετικά με την φυσιοπαθολογία της νόσου υποστηρίζει πως διαταραχές του μεταβολισμού του γλουταμικού ευθύνονται για την νευροεκφύλιση που παρατηρείται στην νόσο (Atlante et al., 2001; Plaitakis et al., 1992; Iwasaki et al., 1992). Μάλιστα υπάρχουν περιπτώσεις, όπου η γλουταμική αφυδρογονάση ασθενών με Πάρκινσον παρουσιάζει αλλαγές στην βασική της δραστηριότητα και την θερμική της ευαισθησία (Plaitakis et al., 1992). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν όταν μελέτες από το εργαστήριο μας έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός T1492G στο γονίδιο *GLUD2*, ο οποίος ευθύνεται για την σημειακή αλλαγή (Ala445Ser) στην ανθρώπινη γλουταμική αφυδρογονάση (hGDH2), σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου Πάρκινσον στους άρρενες φορείς της. Επίσης υπήρχαν δεδομένα ότι η αλλαγή αυτή δείχνει να οδηγεί στην διαφοροποίηση της συμπεριφοράς του ενζύμου (αύξηση της βασικής δραστηριότητας εν σχέση με την φυσιολογική *GLUD2*) συμβατή με επί πλέον λειτουργικότητα (gain of function) μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό έγινε μελέτη επιπλέον ασθενών με νόσο του Πάρκινσον, οι όποιοι συγκρίθηκαν με ισάριθμο δείγμα υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας για να καθοριστεί εάν η Ala445Ser μετάλλαξη είναι ειδική για την νόσο ή αποτελεί απλό πολυμορφισμό, και ερευνήθηκε

το γονίδιο της *GLUD2* σε όλο το μήκος του, προκειμένου να βρεθούν πιθανοί άλλοι πολυμορφισμοί, που να σχετίζονται με κάποια από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου του Πάρκινσον.

## **Μεθοδολογία**

### Σχεδιασμός μεταλλαξογένεσης

Για να μελετηθούν οι λειτουργικές ιδιότητες της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης, καθώς και η επίδραση διαφόρων αλλοστερικών τροποποιητών στην δραστηριότητα του ενζύμου σχεδιαστηκε και εκτελέστηκε από τον διδακτορικό φοιτητή Κωνσταντίνο Καναβούρα, η μεταλλαξογένεση του hGDH2 ενζύμου σε θέσεις, στην ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου, που διαφέρουν από το hGDH1. Ο σχεδιασμός περιελάμβανε την έκφραση των μεταλλαγμένων cDNAs σε κύτταρα Sf21 (*Spondoptera fugiperda*) με χρήση του συστήματος baculovirus. Απώτερος σκοπός αυτών των καλλιιεργειών ήταν η απομόνωση των ισοενζύμων της GDH από τα διαμολυσμένα Sf21 κύτταρα, ο καθαρισμός των πρωτεϊνών αυτών με στήλες χρωματογραφίας και τελικά η ενζυμική μελέτη τους.

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 10 hGDH1 ισοενζύμα, και τα οποία έφεραν το αντίστοιχο αμινοξύ του GLUD2 της επιλεγμένης θέσης (Arg443Ser, Ser409Arg, Gly456Ala, Gly300Arg, Ala321Val, Ser174Asp, Ile166Val, Asp142Glu, Arg39Glu, Glu34Lys), η μεταλλαξογένεση των όποιων είχε ήδη γίνει στο εργαστήριο μας, 2 μεταλλαγμένα ισοενζύμα τα οποία διάφεραν από την φυσιολογική πρωτεΐνη του GLUD1 σε δυο και τρεις θέσεις αντίστοιχα (Arg443Ser/ Gly456Ala, Arg443Ser/ Gly456Ala/ Ser174Asp), 6 μεταλλαγμένα ισοενζύμα το καθένα από τα οποία είχε μια και μονό μια αμινοξική διαφορά από το αρχικό GLUD2 ισοένζυμο, και τα οποία έφεραν το αντίστοιχο αμινοξύ του GLUD1 της επιλεγμένης θέσης (Glu441Arg, Ser448Pro, Ser445Leu, Lys450Glu, His454Tyr, Ser446Arg). Η ίδια διαδικασία αναπαράχθηκε για την παραγωγή και τον καθαρισμό του πολυμορφισμού του GLUD2 (Ser445Ala), που έχει συσχετισθεί με παρκινσονικούς πληθυσμούς.

Η μεταλλαξογενεση αποφασίστηκε να γίνει στο κλωνοποιημένο σε πλασμίδιο pBSKII+GLUD2 cDNA λόγω του ότι το μικρό μέγεθος του πλασμιδίου αυτού (2.9Kb) σε σχέση με το pVL1393 (9.6Kb) διευκόλυνε σε σημαντικό βαθμό την συγκεκριμένη τεχνική. Η μεταφορά των μεταλλαγμένων hGDH2 μορίων στο πλασμίδιο pVL1393, που αποτέλεσε τον πλασμωδιακό φορέα για τον ανασυνδυασμό του εκθέματος με το DNA του baculovirus, έγινε σε δεύτερο στάδιο. Για την μεταλλαξογένεση των κλωνοποιημένων στο φορέα pBSKII+GLUD2 cDNAs σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές (primers) μεγέθους 25-30 νουκλεοτιδίων, με

την βοήθεια του προγράμματος PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000) ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer_www.cgi))

### Μεταλλαξογένεση

Το cDNA της γλουταμικής αφυδρογονάσης μεταλλάχτηκε σε συγκεκριμένες θέσεις με χρήση του συστήματος μεταλλαξογένεσης Gene Editor (Promega, Madison WI) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα μεταλλαξογόνα ολιγονουκλεοτίδια φωσφορυλιώθηκαν και προσκολλήθηκαν στο cDNA μόριο της GLUD1 και GLUD2 θερμαίνοντας το μείγμα της αντίδρασης στους 75°C και έπειτα κρυστώνοντας το αργά ως τους 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 άρα το έκθεμα της γλουταμικής αφυδρογονάσης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία ενός κατάλληλου μείγματος αντιβιοτικών. Από τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν, απομονώθηκε πλασμοδιακό DNA το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους JM109 της *Escherichia coli*. Οι κλώνοι με τα πλασμίδια που έφεραν τις προαναφερόμενες μεταλλάξεις επιλέχτηκαν με ανάλυση με περιοριστικά ενζύμα και ταυτοποίηση αλληλουχίας (sequencing).



### Έκφραση σε κύτταρα Sf21

Τα κύτταρα Sf21 προέρχονται από τις ωοθήκες του εντόμου *Spodoptera Fugiperda* και επιλέχθηκαν για την έκφραση της ανθρώπινης GDH για το λόγο ότι παρόλο διαθέτουν ενδογενή GDH αυτή έχει απόλυτη ειδικότητα για το συνένζυμο NAD(H). Συνεπώς τα μη διαμολυσμένα με ανασυνδυασμένο ιό *Baculovirus Sf21* κύτταρα δείχνουν μηδενική GDH δραστηριότητα όταν χρησιμοποιείται το NADP(H) ως συμπαραγοντας. Γι' αυτό τον λόγο και όλες οι ενζυμικές μελέτες των εκχυλισμάτων των μολυσμένων με ανασυνδυασμένο ιό *Baculovirus Sf21* κυττάρων έγιναν με χρησιμοποίηση του NADP(H) ως συνενζύμου. Αυτό επέτρεψε την μελέτη των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων ενζύμων ακόμη και σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα χωρίς την παρεμβολή της ενδογενούς GDH των κυττάρων του εντόμου, η οποία έχει μηδενική δραστηριότητα υπό αυτές τις συνθήκες. Τα κύτταρα Sf21 μπορούν να αναπτυχθούν είτε προσκολλημένα σε επιφάνεια είτε σε εναιώρημα, έχουν χρόνο διπλασιασμού 18-24 ώρες και δεν απαιτούν CO<sub>2</sub> για την καλλιέργεια τους. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείτε είναι το TNM-FH και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και μόλυνσης είναι οι 27±0.5° C

Τα μεταλλαγμένα *GLUD1* και *GLUD2* cDNAs, μαζί με τα φυσιολογικού τύπου *GLUD1* και *GLUD2* cDNAs (τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ενζυμική ανάλυση των μεταλλαγμένων ισοενζύμων) εκφράστηκαν σε κύτταρα Sf21 με χρήση του συστήματος έκφρασης πρωτεϊνών *Baculovirus*. Κύτταρα Sf21

συνδιαμολύνθηκαν με καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA (φορέας pVL 1393 περιέχοντα κατάλληλα *GLUD1* και *GLUD2* ενθέματα) και τροποποιημένο DNA baculovirus (Baculo Gold, BD Pharmingen) και επωάστηκαν στους 27° C για 4-5 ημέρες. Ο ιός πολλαπλασιάστηκε με 2-3 κύκλους μόλυνσης. Έγινε συγκομιδή των κυττάρων στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση με ιό και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανασυνδυασμένων όπως και φυσιολογικών GDH πρωτεϊνών. Για να γίνει η εξαγωγή των παραπάνω πρωτεϊνών τα καλλιεργημένα 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. Το προκύπτον 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. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο του Lowry (Lowry και συν, 1951). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι υπήρχε η επιθυμητή μετάλλαξη στον ανασυνδυασμένο ιό, έγινε αλληλούχιση του DNA, κατόπιν πολλαπλασιασμού του αντιστοίχου εκθέματος με PCR, αφού απομονώθηκε ιικό DNA από τα θρεπτικά υλικά που περιείχαν τους ανασυνδυασμένους Baculoviruses.

#### Καθαρισμός γλουταμικής αφυδρογονάσης

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών έγινε από αδρά εκχυλίσματα μολυσμένων Sf21 κυττάρων (περίπου  $200 \times 10^6$  cells) 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 30% θειικού αμμωνίου. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και κρατήθηκε το υπερκείμενο (το οποίο περιέχει την GDH) και στο οποίο προστέθηκε επιπλέον θειικό αμμώνιο μέχρι τελικής συγκέντρωσης 55%. Το προκύπτον ίζημα μετά από φυγοκέντρηση του παραπάνω διαλύματος επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCL, pH 6.0 και 15% θειικό αμμώνιο. Το παραπάνω διάλυμα φορτώθηκε σε στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης με υψηλής επίδοσης φαινυλσεφαρόζη (Amersham Biosciences) και εξισορροπημένη με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Έκλυση της αναμενόμενης πρωτεΐνης έγινε με διπλή βαθμίδωση μειούμενης συγκέντρωσης θειικού αμμωνίου (15-0%) και αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλενογλυκόλης (0-90%). Στον καθαρισμό των πρωτεϊνών έγινε άθροιση των κλασμάτων που περιείχαν GDH και καθίζηση της GDH με 60% θειικό αμμώνιο, επαναδιάλυση της πελλέτας σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCL, pH 6.0 και 15% θειικό αμμώνιο και επαναφορά αυτού στην ίδια στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης.

Για τον περαιτέρω καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τα κλάσματα που περιείχαν GDH από την στήλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης υπεβλήθησαν σε διαπίδυση διαμέσου ημιδιαπερατής μεμβράνης στους 4° C έναντι αρκετών αλλαγών περισσειας ρυθμιστικού διαλύματος 100mM Tris HCL, 200 mM KCl, pH 7.15 και στην συνέχεια φορτώθηκαν σε στήλη υδροξυάπατιτη. Η παρατήρηση πως η μεταλλαγμένη Gly456Ala hGDH1 έχει μειωμένη συγγένεια για το GTP, οδήγησε στην χρήση της στήλης υδροξυαπατίτη, που δεν έχει συγγένεια με το GTP (Hussain και συν, 1989). Η στήλη εκλούσθη με μια κλίση συγκέντρωσης 10 mM->400mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου με pH 7.4. Η καθαρή πλέον GDH χρησιμοποιήθηκε για λειτουργικές ενζυμικές μελέτες.

### 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 ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $IC_{50}$ ,  $HC$  και  $SC_{50}$  καθώς και η 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.

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο (340nm) στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού (Colon et al., 1986). Το μίγμα αντίδρασης ήταν 1 ml και περιείχε 50 mM triethanolamine HCl buffer, pH 8.0, 100 mM οξεϊκο Αμμώνιο, 150 mM NADPH and 2.6 mM. Έναρξη της αντίδρασης επιτυχαινόταν με την προσθήκη  $\alpha$ -ketoglutarate 8 mM. Το pH του buffer της αντίδρασης ήταν 8.0.

### *Ενεργοποίηση από ADP*

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από ADP έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση, με προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες

συγκεντρώσεις ADP και ποσότητα ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $da_{340nm}/min$ ) σε παρουσία 1mM ADP να είναι περίπου 0.1-0.2.

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

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

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.

#### *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 0.1.

Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί η ενεργοποίηση από ADP ήταν

$$\eta: V = V_{max} / (1 + x^H / IC_{50}^H)$$

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 συγκέντρωση ADP όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι  $V_{max}/2$ . Ο υπολογισμός του  $IC_{50}$  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:  $\text{Log}[(dA_{340\text{nm}}/\text{min}) / (1 - dA_{340\text{nm}}/\text{min})] = h\text{log}[GTP] - \text{log}K$ .

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

#### *Ενεργοποίηση από L-λευκίνη*

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από L-λευκίνη έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση, με προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης και ποσότητα ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης ( $da_{340\text{nm}}/\text{min}$ ) παρουσία L-λευκίνης 6mM, να είναι περίπου 0.1. Πιο συγκεκριμένα, για την μελέτη της συνεργατικότητας του ADP με την L-λευκίνη προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης (0-6mM) προστίθενται σε μείγμα της αντίδρασης που περιείχε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις ADP (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 1mM).

#### *Θερμική απενεργοποίηση*

Εκχυλίσματα των ενζύμων με όμοιες συγκεντρώσεις και GDH δραστηριότητα (παρουσία 1.0 mM ADP) αναμείχτηκαν σε αναλογία 1:1 με 4mg/ml Bovine Serum Albumin σε διάλυμα 100mM Phosphate Buffer, pH 7.4 και θερμάνθηκαν μέχρι τους 49.5 °C. Τα δείγματα απομακρύνονταν από την θερμοκρασία σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, όπου και μετρήθηκε η δραστηριότητα τους παρουσία 1mM ADP.

#### *Αναστολή από οιστρογόνα*

Η ανασταλτική δράση των ορμονών έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση με προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις στεροειδών (DES 0-50μM, estradiol 0-750μM, oestriol 0-1,75mM, progesterone 0-2mM) σε διαλύτη αιθυλενογλυκόλης, κρατώντας τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών της αντίδρασης σταθερές.

#### *Αναστολή από αντιψυχωσικά*

Η ανασταλτική δράση των αντιψυχωσικών παραγόντων έγινε σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση με προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις αλοπεριδόλης και περφенаζίνης (haloperidol 0-400μM, perphenazine 0-350μM,) σε διαλύτη αιθυλενογλυκόλης/οξικού οξέος, κρατώντας τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών της αντίδρασης σταθερές.

#### Στατιστική ανάλυση (πειράματα ενζυμολογίας)

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πάνω στα πειραματικά δεδομένα και οι γραφικές παραστάσεις δημιουργήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Origin (MicroCal Software, Northampton, MA).

Οι τιμές IC50 υπολογίστηκαν από τα γραφήματα με το λογισμικό Origin.

#### Μελέτες μοριακής γενετικής

Σε όσους ασθενείς και υγιή άτομα συγκατέθεσαν, εξήφθησαν 20ml φλεβικού αίματος με περιφερική φλεβοτομή και απομονώθηκε DNA από τα λευκοκύτταρα τους.

Οι γενετικές αναλύσεις που έλαβαν χώρα στην παρούσα διατριβή ήταν:

- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- πέψη με νουκλεάση περιορισμού
- ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)
- ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Η αρχική μελέτη της αναγνώρισης πιθανών πολυμορφισμών στο γονίδιο της γλουταμικής αφυδρογονάσης σε ασθενείς με οικογενή και σποραδική νόσο του Πάρκινσον έγινε με την μέθοδο της ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP, single stranded conformation polymorphism), η οποία βασίζεται στον διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων μονής έλικας που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους, ακόμα και κατά μια βάση.

#### *Ανάλυση με πέψη με νουκλεάση περιορισμού*

Η σημειακή αλλαγή που διαπιστώθηκε σε κάποιους ασθενείς με Πάρκινσον βρέθηκε ότι δημιουργεί μια αλληλουχία, η οποία αναγνωρίζεται από την νουκλεάση περιορισμού AclI. Έτσι πραγματοποιήθηκε μελέτη επιπλέον ασθενών, φυσιολογικών συγγενών και φυσιολογικών μαρτύρων.

Για τον σκοπό αυτό πολλαπλασιάστηκε το τμήμα αυτό του γονιδίου της GLUD2 με τους ίδιους εκκινητές και τις ίδιες συνθήκες, και τα προϊόντα του PCR επώαστηκαν με το ενζυμο AclI (3 μονάδες ενζύμου για κάθε αντίδραση) στους 37°C για 3 ώρες. Στην συνέχεια τα αποτελεσματα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% και απεικονίστηκαν με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.



### *Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)*

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην χρήση τριφωσφορικών δι-δεοξυριβονουκλεοτιδίων από τα οποία απουσιάζει η 3'-υδροξυλομάδα. Κατά την διαδικασία αυτή, το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται και ένας από τους δυο κλώνους λειτουργεί σαν εκμαγείο για τις αντιδράσεις. Και τα τέσσερα τριφωσφορικά δι-δεοξυριβονουκλεοτιδια χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με περίσσεια δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Ο εκκινητής δεσμεύεται σε έναν κλώνο του DNA και η πολυμεράση ενσωματώνει νουκλεοσίδια καθώς αντιγράφει τον κλώνο. Η ενσωμάτωση ενός δι-δεοξυριβονουκλεοτιδίου, εμποδίζει την επέκταση του συγκεκριμένου κλώνου καθώς λείπει η 3'-υδροξυλομάδα. Σαν αποτέλεσμα, παράγονται μόρια DNA τα οποία σταματούν σε διαφορετικό σημείο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Στην συνέχεια τα κλάσματα αυτά διαχωρίζονται και ανιχνεύονται από ένα δείκτη (ραδιενεργό, φθορίζοντα ή με χρωστική).

Για την αναγνώριση επιπλέον πολυμορφισμών στο μόριο της *GLUD2*, αυτό χωρίστηκε σε 3 τμήματα (λόγω του μεγάλου μήκους του) για την μελέτη των οποίων χρησιμοποιήθηκαν κατ' αντιστοιχεία 3 ζευγάρια εκκινητών.

### 1<sup>o</sup> ΤΜΗΜΑ

#### Forward:

CTGAGAAAGCGCACCTGTTC

Len: 20 MW: 6101.88 T<sub>m</sub>: 65° C GC: 55% Sec. Str.: Very weak Primer Dimer: No

#### Reverse:

TTTCGGTATAGTTCTTGGGATTGAT

Len: 25 MW: 7595.93 T<sub>m</sub>: 64.25° C GC: 36% Sec. Str.: None Primer Dimer: No

### 2<sup>o</sup> ΤΜΗΜΑ

#### Forward:

CAAGGGAGGTATCCGTTACAGCAC

Len: 24 MW: 7386.7 T<sub>m</sub>: 68.29° C GC: 54.17% Sec. Str.: Weak Primer Dimer: No

#### Reverse:

CTGGGTGCGTTGGATTTGGT

Len: 20 MW: 6225.84 T<sub>m</sub>: 69.11° C GC: 55% Sec. Str.: None Primer Dimer: No

### 3<sup>ο</sup> ΤΜΗΜΑ

#### Forward:

TCTTGGAGGTCGACTGTGAC

Len: 20 MW: 6163.86 T<sub>m</sub>: 63° C GC: 55% Sec. Str.: Weak Primer Dimer: No

#### Reverse:

TCTCCTTAACGGGCTGATTT

Len: 20 MW: 6073.8 T<sub>m</sub>: 62.41° C GC: 45% Sec. Str.: None Primer Dimer: No

Τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίστηκαν με κολώνες, προκειμένου να αφαιρεθούν τα dNTPs και οι primers που δεν χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τυχόν διμερή ή ολιγομερή που δημιουργήθηκαν. Οι αντιδράσεις sequencing έγιναν χρησιμοποιώντας έναν από τους δυο ειδικούς εκκινητές (forward ή reverse), και στην συνέχεια τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας τον γενετικό αναλυτή ABI Prisms 3100

#### *Στατιστική ανάλυση (πειράματα γενετικής)*

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι διαφορές στο φύλο και την ηλικία των πληθυσμών που μελετήσαμε (ασθενείς και υγιείς δείκτες), εφαρμόσαμε τα *t-test* και *chi-square* τεστ θεωρώντας στατιστικά σημαντική την τιμή  $P=0.05$ . Τα *Pearson's  $\chi^2$*  και *Fisher's exact* τεστ (SPSS, v. 15.0) χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθούν οι διαφορές ανάμεσα στην συχνότητα των αλληλομόρφων ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς δείκτες. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το *t-test* για να αξιολογηθεί η επίδραση του γονοτύπου της *GLUD-2 Ser445Ala* στην ηλικία έναρξης της νόσου.

#### *Κριτήρια επιλογής ασθενών και υγιών δεικτών*

Οι ασθενείς με νόσο Πάρκινσον που μελετήθηκαν στην έρευνα αυτή είχαν εισήχθη στο παρελθόν στην Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου του

Ηρακλείου της Κρήτης. Η διάγνωση των ασθενών βασίστηκε σε δημοσιευμένα κριτήρια (Gelb et al., 1999). Στην περίπτωση που υπήρχαν περισσότερα από ένα ασθενή μελή σε μια οικογένεια, μόνο ένα μέλος λάμβανε μέρος στην έρευνα προκειμένου να αποφύγει η περίπτωση να φέρουν κάποιο κοινό γενετικό πολυμορφισμό.

Οι υγιείς δείκτες επιλέχθηκαν από τον ντόπιο πληθυσμό της Κρήτης. Η κατανομή της ηλικίας και του φύλου ήταν ανάλογη αυτής της ομάδας των παρκινσονικών ασθενών. Όπως και στην περίπτωση των παρκινσονικών ασθενών, η ομάδα των υγιών δεικτών πέρασε από συνέντευξη στην οποία η διάγνωση πιθανών γνωστικών δυσλειτουργιών καθορίστηκε σύμφωνα με το MMSE (Mini-Mental State evaluation) τεστ (Folstein et al., 1975). Άτομα με σκορ μικρότερο του 25 δεν μπορούσαν να συμμετάσχουν στην μελέτη.

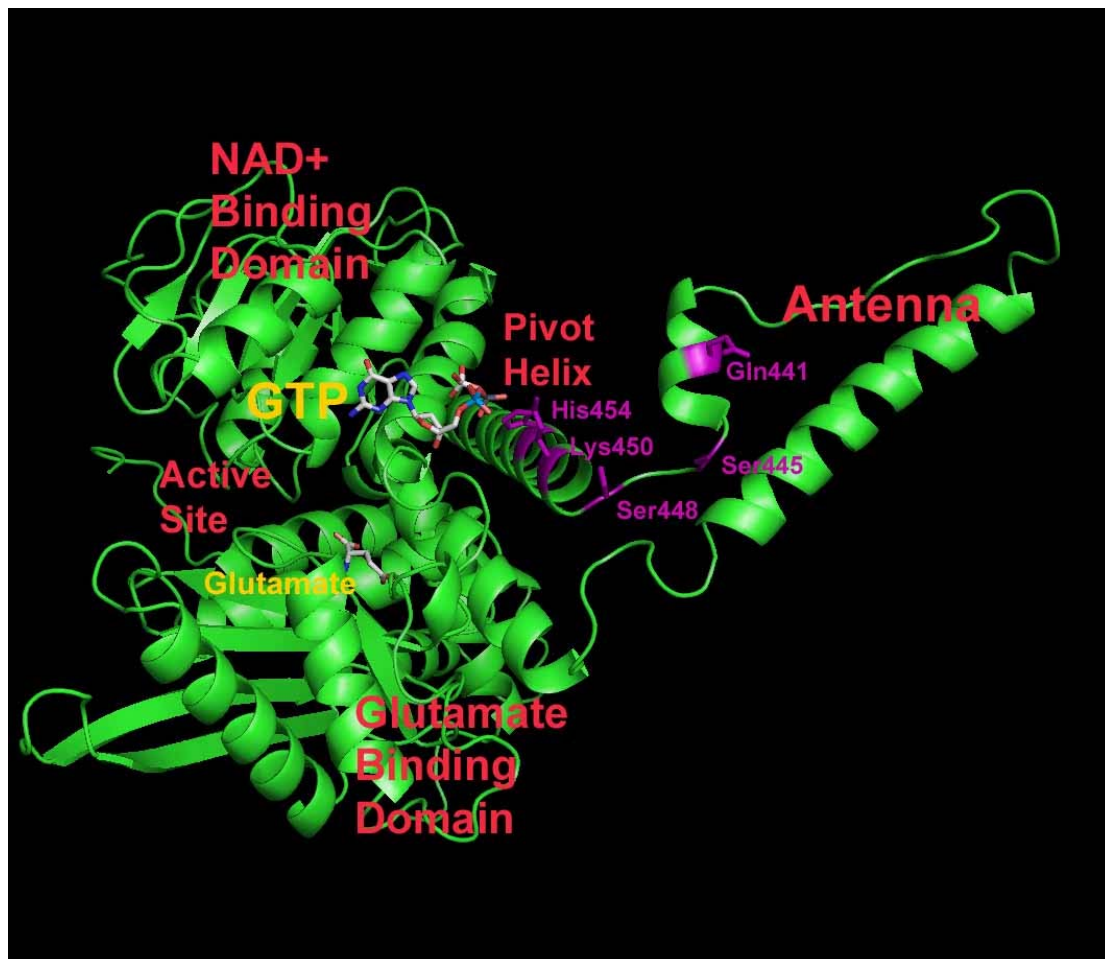
Όλοι οι συμμετέχοντες στην έρευνα έδωσαν γραπτή συγκατάθεση σύμφωνα με το πρωτόκολλο της *Institutional Review Board*.

## **Αποτελέσματα**

### **Επί των μεταλλάξεων της hGDH2**

Η μεταλλαξογένεση της hGDH2 χρησιμοποιώντας το cDNA του γονιδίου της GLUD2 σαν βάση έδωσε πέντε (5) μεταλλάγματα: δυο με αμινοξικές αλλαγές στην κατιούσα έλικα της αντένας (Gln441Arg, Ser445Leu), ένα στην περιοχή σύνδεσης της αντένας με την pivot helix (Ser448Pro), και δυο στην ίδια την pivot helix (Lys450Glu, His454Tyr). Παράλληλα με τα μεταλλάγματα αυτά, και οι αγρίου τύπου

γλουταμικές αφυδρογονασεις, προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν, εκφραστήκαν σε sf21 κύτταρα, ώστε να παραχθούν λειτουργικά. Επειδή η ενδογενής GDH των Sf21 κυττάρων επιδρά αποκλειστικά παρουσία NADH, η χρησιμοποίηση του NADPH μας επέτρεψε να μελετήσουμε την δραστηριότητα και την λειτουργία των εκχυλισμάτων των ενζύμων από τα sf21 κύτταρα χωρίς την παρεμβολή της δραστηριότητάς τους. Τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου γλουταμικών αφυδρογονασών συγκρίθηκαν με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western και βρέθηκαν να είναι όμοια.



Εικόνα 1: τοποθεσία των εισαγμένων μεταλλάξεων της hGDH2 – (PDB entry 1-LIF) (Smith et al., 2002).

### Λειτουργική ανάλυση των μεταλλάξεων της αντένας

Η αντικατάσταση της Gln441 από Arg αύξησε την βασική δραστηριότητα του ενζύμου σχεδόν 2 φορές σε σχέση με αυτήν της αγρίου τύπου γλουταμικής αφυδρογονάσης (πίνακας 2) και φάνηκε να ενεργοποιείται από την επίδραση 1.1mM L-λευκίνης (εικόνα 2). Παρόλα αυτά, το μετάλλαγμα Gln441Arg είχε μικρή διαφοροποίηση από την hGDH2 σε σχέση με την αλλοστερική του ρύθμιση από το GTP και το ADP. (Πίνακας 1; Εικόνα 3,4). Ομοίως, η αντικατάσταση της Ser445 από Leu έκανε το ενζυμο δυο φορές πιο ενεργό από την αγρίου τύπου hGDH2 σε συνθήκες απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών, και αυξησε την ενεργοποίηση του από L-λευκίνη (εικόνα 2). Παράλληλα, το μετάλλαγμα Ser445Leu διατήρησε τις λειτουργικές του ιδιότητες όσον αφορά την ενεργοποίηση του από ADP και την αναστολή του από GTP (Πίνακας 1; εικόνα 3,4).

Η μελέτη των καμπυλών αναστολής από το GTP για τα παραπάνω ενζυμα και τις αγρίου τύπου hGDHs έδειξε πως οι Gln441Arg και Ser445Leu μεταλλάξεις είχαν μια μη-συνεργατική συμπεριφορά (Hill co-efficient=0.60-0.87) (Πίνακας 1), διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο όλα τα χαρακτηριστικά της hGDH2 (Hill co-efficient=0.72) (πίνακας 1) ως προς την αναστολή τους από το GTP.

	<b>GTP Inhibition</b>		<b>ADP activation</b>
	<b>GTP IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>Hill coefficient (HC)</b>	<b>ADP SC<sub>50</sub> (μM)</b>
<b>GLUD1</b>	12.23 ± 0.54 *	2.51 ± 0.14 *	24.29 ± 4.4
<b>GLUD2</b>	262.76 ± 77.02	0.716 ± 0.13	53.68 ± 5.4
<b>Q441R</b>	227.39 ± 33.4	0.874 ± 0.08	72.06 ± 6.9
<b>S445L</b>	317.65 ± 39.71	0.603 ± 0.05	58.07 ± 4.9

<b>S448P</b>	186.81 ± 23.14	0.615 ± 0.04	62.02 ± 3.3
<b>K450E</b>	1.8x10 <sup>5</sup> ± 1.2 x10 <sup>6</sup>	0.432 ± 0.34	458.37 ± 47.0
<b>H454Y</b>	2921.40 ± 965.3	0.490 ± 0.02	468.59 ± 57.1

**Πίνακας 1.** αναστολή από GTP και ενεργοποίηση από ADP των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και των μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2.

Η αναστολή από GTP μελετήθηκε παρουσία 1mM ADP. Οι τιμές του GTP IC<sub>50</sub> (±SE) και ADP SC<sub>50</sub> (±SE) καθορίστηκαν από τις αντίστοιχες καμπύλες ενεργοποίησης και αναστολής, οι οποίες καθορίστηκαν από τουλάχιστον τρία σετ πειραμάτων. Οι τιμές των Hill Coefficients (±SE) αντιστοιχούν στην κλίση της γραφικής παράστασης κατά Hill που προέκυψε από τις καμπύλες των αντιδράσεων αναστολής από GTP. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στην κατεύθυνση την αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία 50mM TRA, pH 8.0 buffer. \*Δεδομένα από Zaganas και Plaitakis (2002)

#### Λειτουργική ανάλυση της Ser448Pro

αντίθετα με τα χαρακτηριστικά που προσδίδουν οι αμινοξικές αλλαγές στις μεταλλάξεις της αντένας, η αντικατάσταση της Ser448 από προλίνη (Pro), που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης της αντένας με την Pivot helix, ελάττωσε την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζει την αλλοστερική ρύθμιση του από το GTP και το ADP (Πίνακας 1; εικόνα 3,4). Συγκριμένα, το μετάλλαγμα Ser48Pro επέδειξε μια βασική δραστηριότητα 2.9 % της μέγιστης, όπως αυτή λαμβάνεται παρουσία 1.0mM ADP (πίνακας 2, εικόνα 2). Επίσης η προσθήκη L-λευκίνης στην αντίδραση (1.1 mM) προκάλεσε μικρότερο ποσοστό ενεργοποίησης του ενζύμου αυτού (20% επί της μέγιστης δραστηριότητας) από ότι της αγρίου τύπου hGDH2 (40% επί της μέγιστης δραστηριότητας).

	% of maximal
Q441R	12.15%
S448P	<b>2.9%</b>
H454Y	<b>1.9%</b>
K450E	<b>1.8%</b>
S445L	11.5%
GLUD2	5-10%
GLUD1	40%

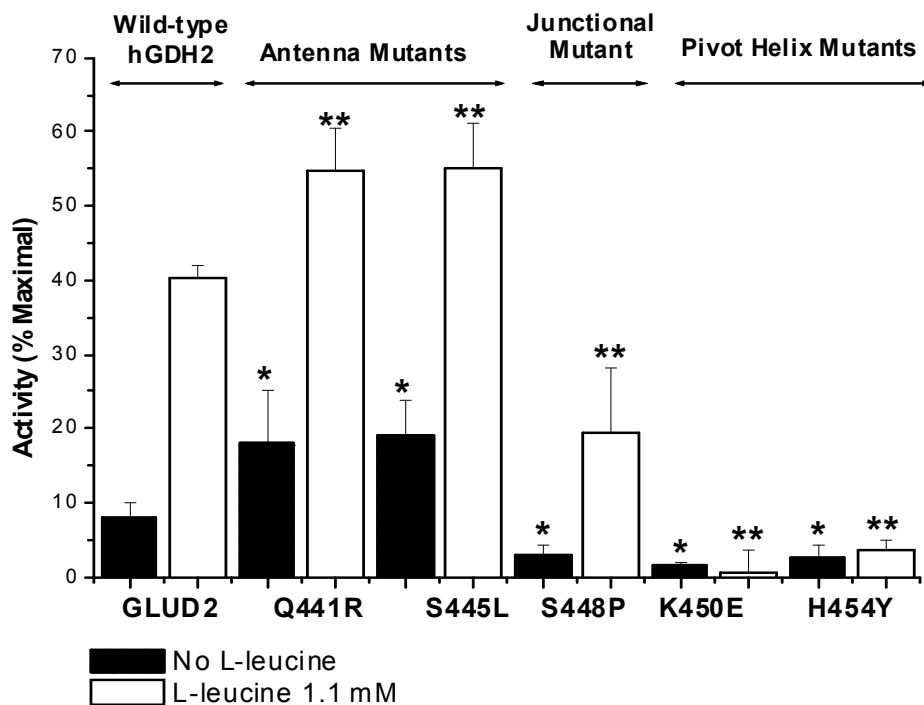
**Πίνακας 2.** βασική δραστηριότητα των αγρίου τύπου hGDH και των μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2

Η βασική δραστηριότητα των ενζύμων μελετήθηκε απουσία αλλοστερικών τροποποιητών, και οι τιμές δίνονται στον πίνακα

σαν ποσοστό επί της μέγιστης δραστηριότητας τους παρουσία 1mM ADP. Κάθε μέτρηση αποτελεί μέσο όρο τουλάχιστον πέντε διαφορετικών πειραματικών δεδομένων. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στην κατεύθυνση την αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα 50mM TRA, pH 8.0.

### Λειτουργική ανάλυση των μεταλλάξεων της pivot helix

Η αντικατάσταση της Lys450Glu και της His454Tyr ελαχιστοποίησε την βασική δραστηριότητα του ενζύμου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2 το μετάλλαγμα Lys450Glu επέδειξε μια βασική δραστηριότητα μικρότερη του 2% της μέγιστης του απουσία οποιουδήποτε αλλοστερικού τροποποιητή. Ενώ η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται να αποκαθιστάται με την προσθήκη ADP, η συγκέντρωση που απαιτείται για αυτό είναι αρκετά μεγαλύτερη ( $SC_{50}=458.37 \mu\text{M ADP}$ ) από αυτήν απαιτείται για την ενεργοποίηση της hGDH2 από το ADP ( $SC_{50}=53.68 \mu\text{M ADP}$ ) (πίνακας 1; Εικόνα 3). Επιπροσθέτως, η μετάλλαξη Lys450Glu κατέστησε το ενζυμο ανθεκτικό στην ενεργοποίηση από 1.1 mM L-leucine (εικόνα 2) και αύξησε την αντίσταση του στην αναστολή από το GTP (παρουσία 1.0 mM ADP) (πίνακας 1; Εικόνα 4).



**Εικόνα 2.** Βασική δραστηριότητα της αγρίου τύπου hGDH2 και των μεταλλαγμένων μορφών της και επίδραση της L-λευκίνης.

Η δραστηριότητα όλων των ενζύμων μελετήθηκε τόσο απουσία αλλοστερικών τροποποιητών (απουσία L-λευκίνης) όσο και παρουσία L-λευκίνης (1.1 mM). Η βασική δραστηριότητα και η δραστηριότητα των ενζύμων παρουσία 1.1 mM L-λευκίνης δίνονται στο γράφημα σαν ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας που λαμβάνεται παρουσία 1 mM ADP. Κάθε μέτρηση αποτελεί μέσο όρο τουλάχιστον πέντε διαφορετικών πειραματικών δεδομένων και οι μπάρες αντιστοιχούν στο SEM (standard error of mean).

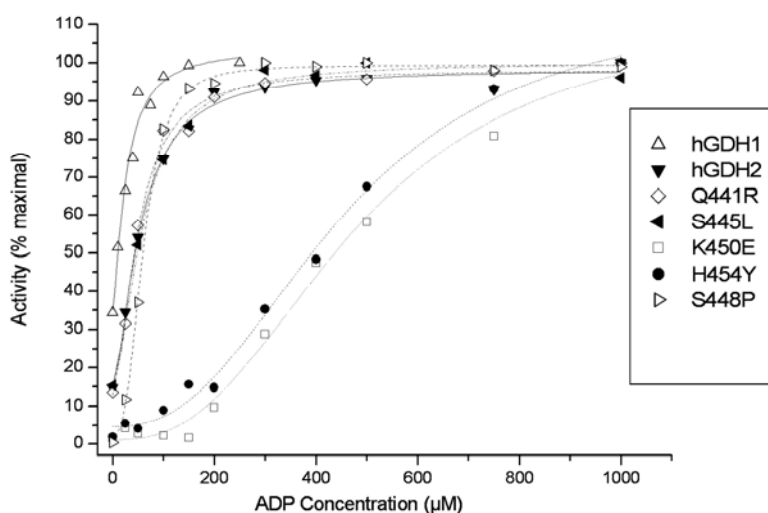
\*  $p < 0.05$  για την σύγκριση της βασικής δραστηριότητας των μεταλλαγμάτων, απουσία L-λευκίνης, με αυτήν της hGDH2 (GLUD2).

\*\*  $p < 0.05$  για την σύγκριση της δραστηριότητας των μεταλλαγμάτων, παρουσία 1.1 mM L-λευκίνη, με αυτήν της hGDH2 (GLUD2).

Ομοίως, η αντικατάσταση της His454Tyr ελαχιστοποίησε την βασική δραστηριότητα του ενζύμου (περίπου 2.5 % της μέγιστης παρουσία 1.0 mM ADP), το οποίο κατέστη

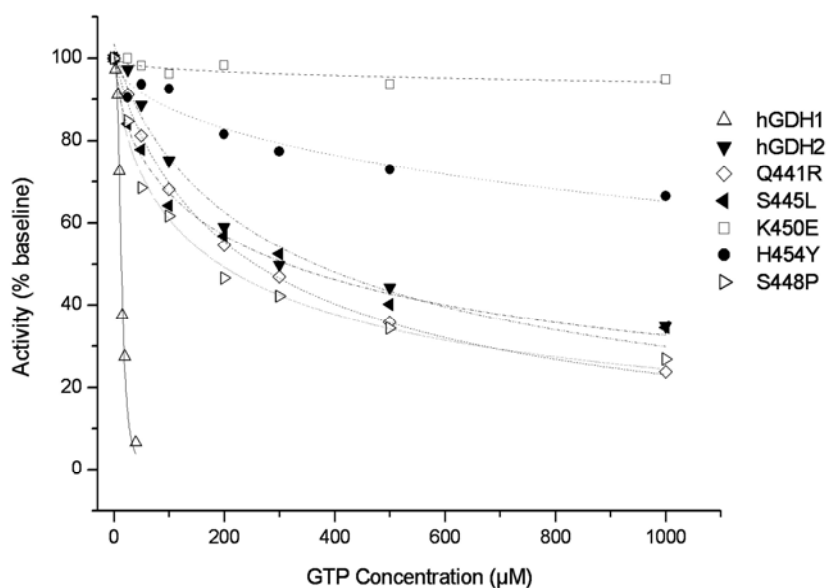


ανενεργό στην ενεργοποίηση του από 1.1 mM L-leucine (εικόνα 2). Όπως και στην περίπτωση της Lys450Glu, η His454Tyr χρειάστηκε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ADP ( $SC_{50}=468.59 \mu\text{M ADP}$ ), σε σχέση με την αγρίου τύπου hGDH2, προκειμένου να ενεργοποιηθεί (πίνακας 1; εικόνα 3). Επίσης, απεδείχθη πιο ανθεκτική από την hGDH2 στην αναστολή από GTP (πίνακας 1; Εικόνα 4). Η μέτρηση του συντελεστή Hill, όπως αυτός προκύπτει από τις καμπύλες αναστολής από GTP, έδειξε πως και τα δυο ενζυμα της pivot helix (Lys450Glu και His445Tyr) επιδεικνύουν αρνητική συνεργατικότητα (πίνακας 1).



**Εικόνα 3.** Σύγκριση των καμπύλων ενεργοποίησης από ADP των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs.

Τα σημεία των καμπυλών αντιστοιχούν σε μέσες τιμές τουλάχιστον δυο πειραματικών δεδομένων. Η μεγίστη δραστηριότητα του ενζύμου επετεύχθη παρουσία 1.0 mM ADP. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0. Οι μετρήσεις της δραστηριότητας των ενζύμων έγινε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ADP.



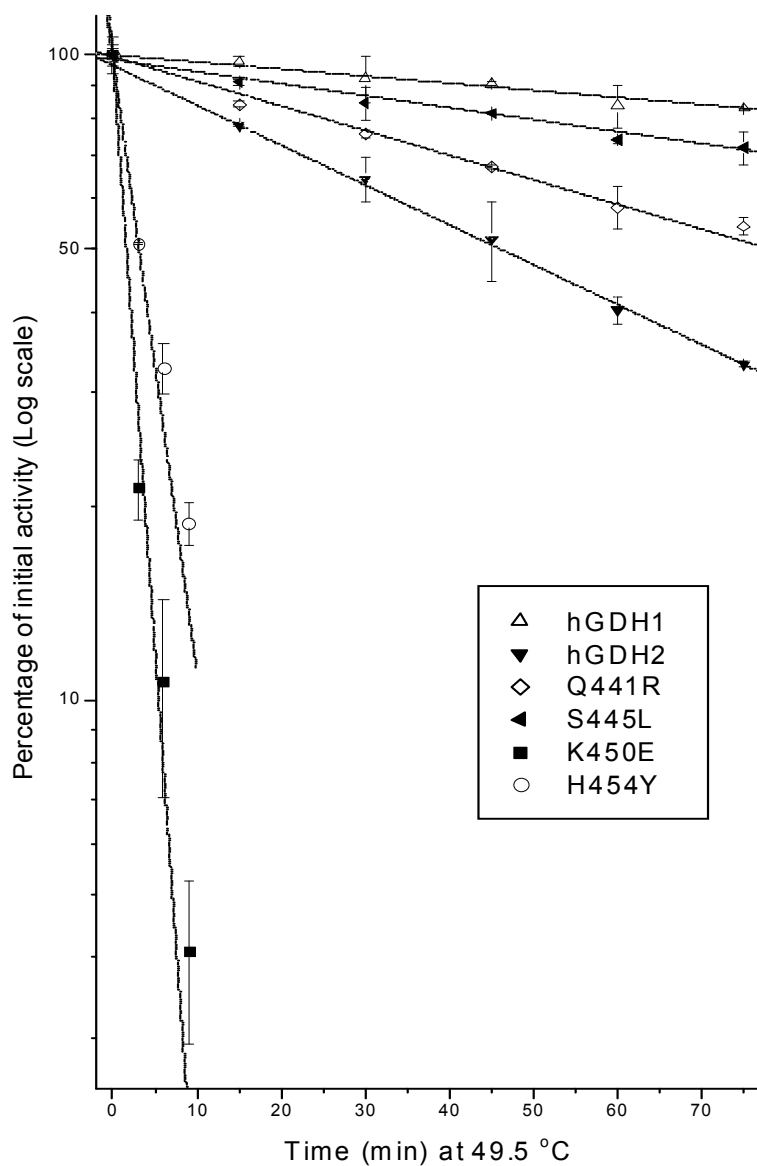
**Εικόνα 4.** Σύγκριση των καμπυλών αναστολής από GTP των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs.

Τα σημεία των καμπυλών αντιστοιχούν σε μέσες τιμές τουλάχιστον δυο πειραματικών δεδομένων. Η δραστηριότητα του ενζύμου επετεύχθηκε παρουσία 1.0 mM ADP. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0. Οι μετρήσεις της δραστηριότητας των ενζύμων έγινε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις GTP διατηρώντας την συγκέντρωση του ADP σταθερή στο 1mM.

#### Μελέτες θερμικής αναστολής των μεταλλάξεων της hGDH2

Μελέτες του συνεργάτη Κωνσταντίνου Καναβούρα έδειξαν πως οι μεταλλάξεις Gln441Arg και Ser445Leu που βρίσκονται στην κατιούσα μικρή έλικα της αντένας έκαναν το ενζυμο πιο ανθεκτικό στην θερμική απενεργοποίηση (χρόνοι ημίσειας ζωής 78 λεπτά και 158 λεπτά αντίστοιχα) σε σχέση με την αντίστοιχη απενεργοποίηση της αγρίου τύπου hGDH2 (46 λεπτά). Αντίθετα, οι μεταλλάξεις της pinot helix (Lys450Glu, His454Tyr) έκαναν το ενζυμο εξαιρετικά ευαίσθητο στην

θερμοκρασία (χρόνοι ημίσειας ζωής 1.5 λεπτά and 3.1 λεπτά αντίστοιχα) (εικόνα 5). Μελέτες συσχέτισης της βασικής δραστηριότητας των ενζύμων και της θερμικής τους απενεργοποίησης έδειξαν πως συνδέονται μεταξύ τους γραμμικά ( $R=0.96$ ) (εικόνα 5).



Εικόνα 5: θερμική απενεργοποίηση των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs

Η ημίσεια ζωή των ενζύμων (σε λεπτά) στους 49.5°C μετρήθηκε σε συνάρτηση με την βασική δραστηριότητα των ενζύμων, όπως αυτή προέκυψε από τις καμπύλες αναστολής για κάθε ένα από αυτά. (Kanavouras et al, 2009)

### Επίδραση των στεροειδών ορμονών

Οι αρχικές μελέτες, σε αδρά εκχυλίσματα, της επίδρασης των στεροειδών ορμονών στην γλουταμική αφυδρογονάση, έδειξαν να αναστέλλουν την ειδική για το νευρικό σύστημα hGDH2 πιο ειδικά από ότι την αγρίου τυπου hGDH1. Για να προσδιορίσουμε ποια αμινοξική αλλαγή ευθύνεται για την ευαισθησία της hGDH2 στις στεροειδείς ορμόνες, μελετήσαμε τις υπάρχουσες μεταλλάξεις του hGDH1 ενζύμου στις θέσεις που διαφέρει από την ειδική για το νευρικό ιστό hGDH2. Η μελέτη αυτή έδειξε πως η Arg443Ser hGDH1 μετάλλαξη ήταν εξαιρετικά ευαίσθητη στην αναστολή από τα οιστρογόνα (πινάκες 3). Για τον σκοπό αυτό, η αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και το R443S - hGDH1 καθαρίστηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι ιδιότητες τους, ως προς την αναστολή από τα οιστρογόνα.

	IC <sub>50</sub> (μM)
GLUD 1	8.29±0.29
GLUD 2	3.75±0.92
R443S /G456A	0.44±0.03
R443S	0.74±0.05*
S409R	1.70±0.23
G456A	29.15±0.82
G300R	11.71±0.60
A321V	11.54±0.55
S124N	16.48±0.97
I166V	11.49±0.47
D142E	12.83±1.27
R39Q	23.91±1.92
E34K	12.46±0.49

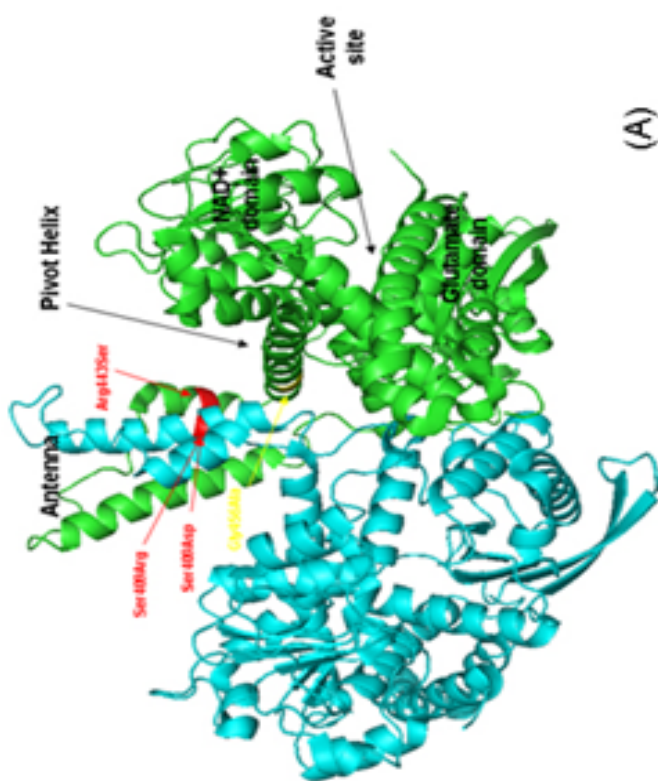
**Πινάκας 3.** αναστολή των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου hGDH1 and hGDH2 από την διεθυστυλβεστρολης (DES) παρουσία 0.1 mM ADP σε αδρά εκχυλίσματα.

Οι τιμές  $IC_{50}$  ( $\pm$  SEM) υπολογιστήκαν από τις καμπύλες αναστολής για κάθε ενζυμο ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0 όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν αδρά εκχυλίσματα από Sf21 κύτταρα που υπερεκφράζουν τα παραπάνω ενζυμα. Οι συγκεντρώσεις DES concentration κυμάνθηκαν μεταξύ 0-50  $\mu$ M, διατηρώντας την συγκέντρωση του ADP σταθερή (0.1 mM). Επειδή η μετάλλαξη Arg443Ser δεν έδωσε μετρήσιμη δραστηριότητα παρουσία 0.1 mM ADP (απουσία DES), η καμπύλη αναστολής της έγινε παρουσία 1.0 mM ADP.

Παράλληλα, μελετήθηκαν και οι Arg443Ser/Gly456Ala, Ser409Arg/Asp μεταλλάξεις της hGDH1 καθώς και οι Gln441Arg, Ser445Leu, Ser448Pro, Tys450Glu, His454Tyr και Ser445Ala μεταλλάξεις της hGDH2, αφού πρώτα καθαρίστηκαν από εκχυλίσματα Sf21 κυττάρων που υπέρ-έκφραζαν τις παραπάνω πρωτεΐνες.



(B)



(A)

Εικόνα 6: απεικόνιση των εισαγμένων μεταλλάξεων στην hGDH1 (A) και στην hGDH2 (B). – για ευκολία απεικονίζονται 2 από τις 6 υπομονάδες του ανθρώπινου GDH εξαμερούς (πράσινο και μπλε) όπου φαίνονται οι περιοχές σύνδεσης του NAD<sup>+</sup>, του γλουταμικού, το ενεργό κέντρο, η pivot helix, και η αντένα. Τα αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα σε hGDH1 και hGDH2 φαίνονται με κίτρινο. Μεταλλάξεις στην hGDH1 (Arg443Ser, 409Arg/Asp) ή στην hGDH2 (Lys450Glu, His454Tyr, Ser448Pro) που μειώνουν την βασική δραστηριότητα φαίνονται με κόκκινο. Η αντίστροφη μετάλλαξη της hGDH2 (Ser443Arg) που αυξάνει την βασική δραστηριότητα φαίνεται με μωβ (PDB entry 1-LIF) (Smith et al., 2002).

### Επίδραση στεροειδών ορμονών στις αγρίου τύπου hGDHs

Λειτουργικές μελέτες των καθαρισμένων αγρίου τύπου γλουταμικών αφυδρογονασών επιβεβαίωσαν πως τα οιστρογόνα αλληλεπιδρούν πιο ενεργά με την ειδική για το νευρικό σύστημα γλουταμική αφυδρογονάση από ότι με την housekeeping hGDH1. Απουσία οποιουδήποτε αλλοστερικού ενεργοποιητή η GDH2 ήταν περίπου 18 φορές πιο ευαίσθητη στην διεθυλστιλεστρολη (DES) ( $IC_{50}=0.094 \mu M$ ) από ότι η hGDH1 ( $IC_{50}=1.7 \mu M$ ). Ομοίως, η εστραδιόλη (17 $\beta$ -estradiol) έδειξε να επηρεάζει την hGDH2 18 φορές περισσότερο ( $IC_{50}=1.5 \mu M$ ) από ότι η hGDH1 ( $IC_{50}=26.9 \mu M$ ). Ομοίως, και η οεστριολη και η προγεστερόνη ανέστειλαν την hGDH2 περισσότερο από ότι την hGDH1, αλλά σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτές που απαιτούνταν για την DES και την εστραδιόλη (πίνακας 4).

**(A) No ADP**

	Basal Specific Activity ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
		DES	17 b-Estradiol	Oestriol	Progesterone
hGDH2	7.6 $\pm$ 0.1	0.09 $\pm$ 0.01	1.54 $\pm$ 0.23	11.34 $\pm$ 0.74	12.32 $\pm$ 2.63
hGDH1	58.1 $\pm$ 4.1	1.67 $\pm$ 0.02	26.94 $\pm$ 1.07	144.77 $\pm$ 18.80	218.88 $\pm$ 7.99

**(B) 0.1mM ADP**

	V <sub>max</sub> ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )	Specific Activity at 0.1mM ADP ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
			DES	17 b-Estradiol	Oestriol	Progesterone
hGDH2	159.2 $\pm$ 0.4	111.4 $\pm$ 1.4	1.05 $\pm$ 0.09	15.10 $\pm$ 1.21	188.72 $\pm$ 17.90	392.21 $\pm$ 8.91
hGDH1	161.3 $\pm$ 0.5	148.4 $\pm$ 2.1	7.07 $\pm$ 0.40	69.22 $\pm$ 1.30	315.53 $\pm$ 26.10	596.39 $\pm$ 50.1
Ser443-hGDH1	140.3 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.4	0.51 $\pm$ 0.05	2.22 $\pm$ 0.76	2.43 $\pm$ 0.05	8.62 $\pm$ 1.23



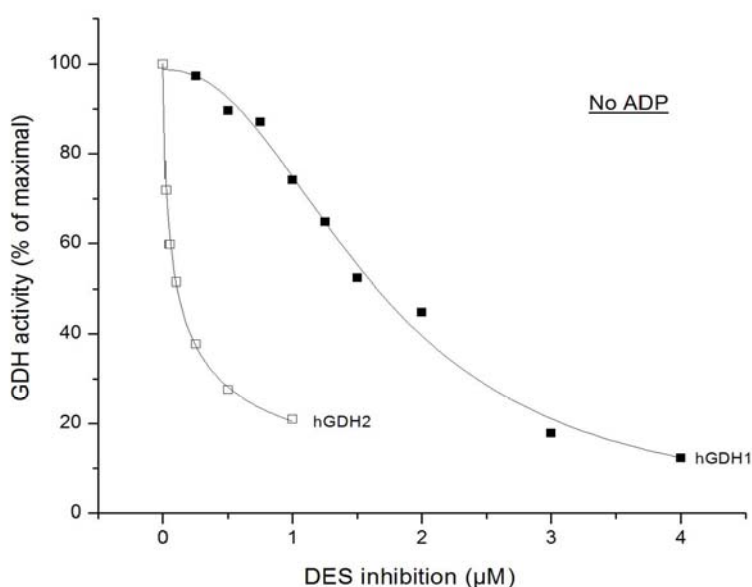
**Πίνακας 4.** αναστολή των καθαρισμένων αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και της μεταλλαγμένης hGDH1 - R443S από τις στεροειδείς ορμόνες

Οι τιμές IC<sub>50</sub> ( $\pm$  SEM) υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναστολής για κάθε καθαρισμένο ενζύμο ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων στεροειδών ορμονών. Η συγκέντρωση της διεθυλσιλβεστρόλης (Diethylstilbestrol, DES) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεταξύ 0-50  $\mu$ M, της εστραδιόλης (17 $\beta$ -estradiol) και της οεστριόλης (oestriol) μεταξύ 0-500  $\mu$ M, και της προγεστερόνης (progesterone) μεταξύ 0-2000  $\mu$ M.

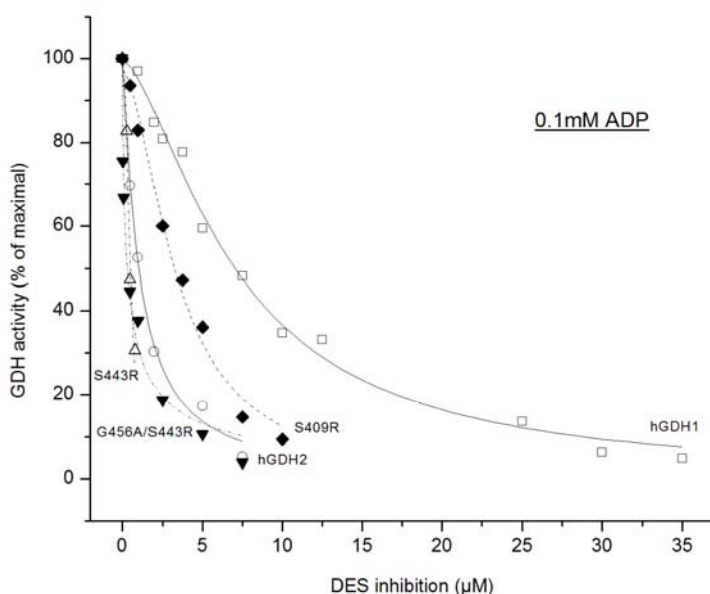
(A) αναστολή των καθαρισμένων πρωτεϊνών απουσία ADP.

(B) αναστολή των καθαρισμένων πρωτεϊνών παρουσία 0.1mM ADP.

Όταν ενεργοποιήσαμε τα ενζύμα με ADP, η hGDH2 ήταν και πάλι πιο ευαίσθητη στην αναστολή από οιστρογόνα, από ότι η hGDH1 (εικόνα 7β; Πίνακας4β).



(α)



(β)

**Εικόνα 7:** αναστολή των καθαρσιμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs από την διεθυστιλβεστρόλη

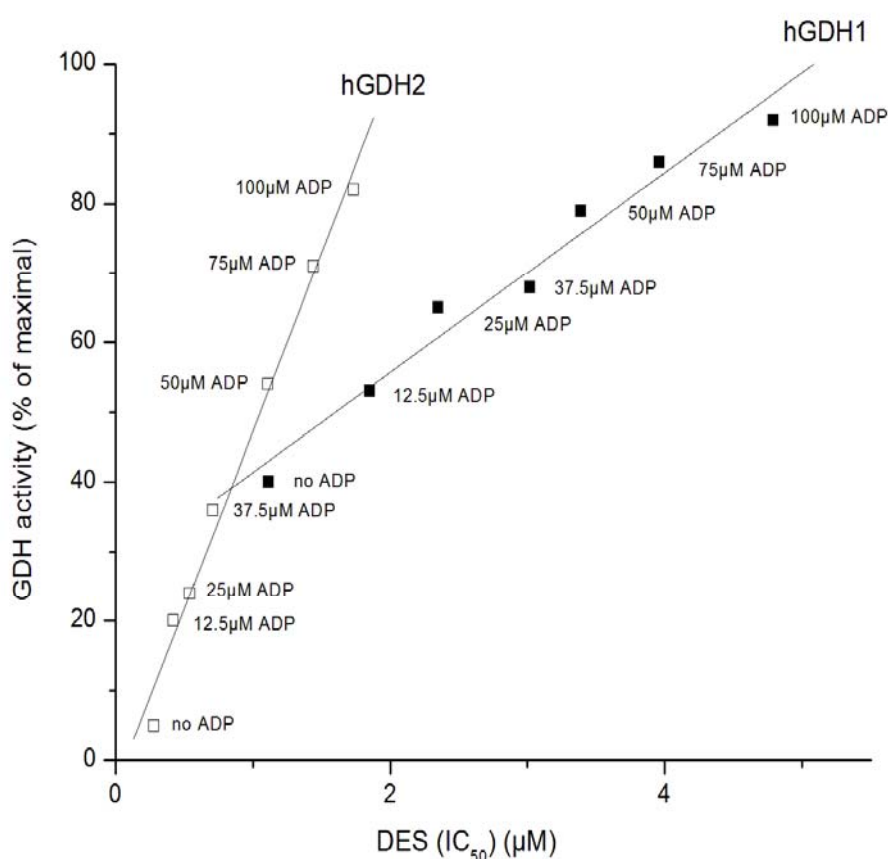
Η δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης μελετήθηκε στην αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διεθυστιλβεστρόλης (0-50 mM). Κάθε σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών πειραματικών μετρήσεων και διατυπώνεται σαν επί της εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου

(Α) αναστολή των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 από την DES απουσία αλλοστερικών τροποποιητών

(Β) αναστολή των αγρίου τυπου και μεταλλαγμενων hGDHs από την DES παρουσία 0.1mM ADP.

Η μελέτη των καμπυλών αναστολής των δυο αγρίου τύπου ισοενζύμων, όπως αυτές πρόεκυψαν από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ADP, έδειξε πως η επίδραση των στεροειδών τόσο στην hGDH1 όσο και στην hGDH2 είναι αντιστρόφως ανάλογη του επιπέδου της καταλυτικής τους δραστηριότητας και η

σχέση αυτή είναι γραμμική ( $R=0.9845$  για την hGDH1,  $R=0.9935$  για την hGDH2). Μαλιστα, η σχέση αυτή είναι πιο έντονη στην περίπτωση της hGDH2 από ότι στην hGDH1 (εικόνα 8). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η επίδραση των οιστρογόνων σχετίζεται περισσότερο με το επίπεδο ενεργοποίησης της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης, από ότι με αυτό της hGDH1.

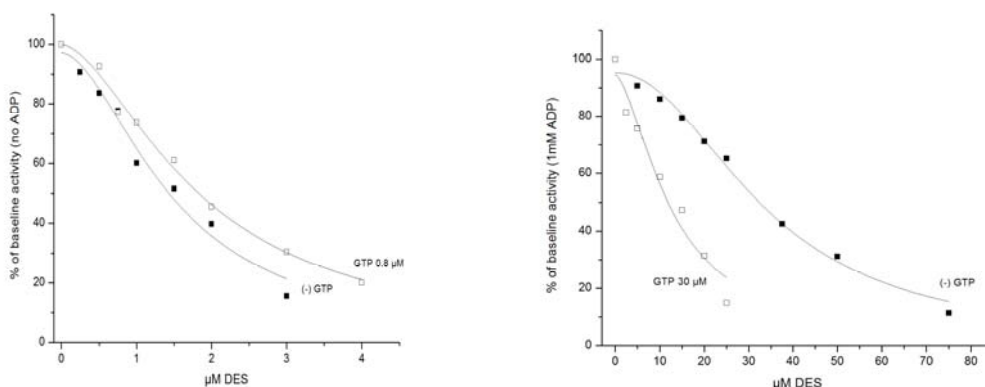


**Εικόνα 8:** αναστολή από οιστρογόνα των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 σε διαφορετικά επίπεδα ενεργοποίησης των ενζύμων από ADP

Ο άξονας ψ δείχνει την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου (που εκφράζεται σαν ποσοστό επί της μεγίστης) όπως μετράτε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ADP πριν την προσθήκη DES. Ο άξονας χ δείχνει την τιμή DES IC<sub>50</sub> (± SE) για κάθε ένα από τα ενζυμα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ADP. Οι συγκεντρώσεις ADP κυμάνθηκαν από 0 μM μέχρι 100 μM (η ακριβής συγκέντρωση αναγράφεται δίπλα σε κάθε μέτρηση). Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0. η σταθερές R (correlation

coefficient) και P (πιθανότητα το R να είναι μηδέν) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin. Η κλίση της γραφικής παράστασης ( $\pm$ SE) δίνεται σαν ρυθμός διαφοροποίησης της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου ανά αύξηση της συγκέντρωσης DES: slope για την hGDH1  $14.35 \pm 1.14$  ( $R= 0.9845, P<0.0001$ ); slope για την hGDH2  $51.16 \pm 2.60$  ( $R= 0.9935, P<0.0001$ ).

Εφόσον η hGDH1 αναστέλλεται πρωτίστως από το GTP, μελετήσαμε πώς μπορεί να επηρεάζεται η αναστολή του ενζύμου από τα οιστρογόνα από την παρουσία GTP (ικανής συγκέντρωσης να προκαλέσει αναστολή της αντίδρασης κατά 50%) στην αντίδραση. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών οι ανασταλτικές ιδιότητες του GTP δεν είχαν καμία επίδραση στην λειτουργία του ενζύμου υπο την επήρεια στεροειδών ορμονών. Τα αποτελέσματα όμως ήταν διαφορετικά όταν ενεργοποιήσαμε το ενζυμο με ADP, καθώς η παρουσία GTP φάνηκε να αυξάνει το ποσοστό αναστολής της γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα οιστρογόνα (εικόνα 9α,9β).



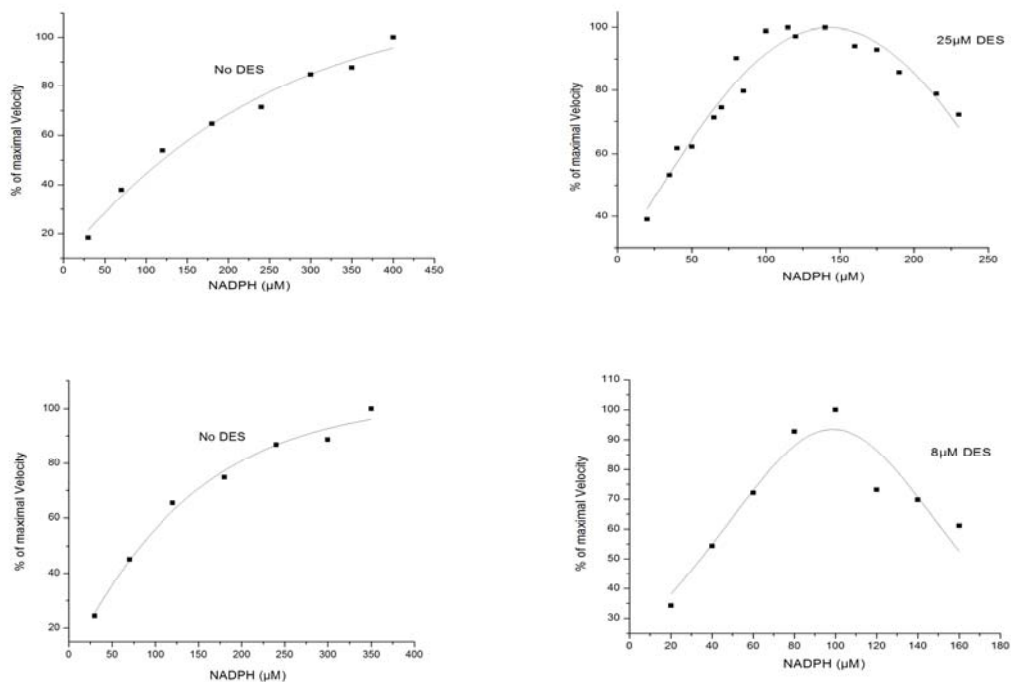
**Εικόνα 9:** επίδραση του GTP στην αναστολή της αγρίου τύπου hGDH1 από την DES

(A) μελέτη της επίδρασης του GTP απουσία ADP. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0. παρουσία

αυξανόμενων συγκεντρώσεων DES (0-4.0  $\mu\text{M}$ ). Η συγκέντρωση του GTP ήταν κατά την διάρκεια των πειραμάτων σταθερή είτε 0  $\mu\text{M}$  είτε 0.8  $\mu\text{M}$ . Τα σημεία της καμπύλης αντιστοιχούν σε μέσες τιμές 3 πειραματικών μετρήσεων και εκφράζονται σαν επί τοις εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας (χωρίς DES). Η DES  $\text{IC}_{50}$  ήταν  $1.47 \pm 0.09 \mu\text{M}$  απουσία GTP και  $1.83 \pm 0.13 \mu\text{M}$  παρουσία 0.8  $\mu\text{M}$  GTP. **(B)** μελέτη της επίδρασης του GTP παρουσία 0.1mM ADP. Η συγκέντρωση του GTP ήταν κατά την διάρκεια των πειραμάτων σταθερή είτε 0  $\mu\text{M}$  είτε 30  $\mu\text{M}$ , και η συγκέντρωση της DES ήταν μεταξύ 0  $\mu\text{M}$  και 80  $\mu\text{M}$ . Τα σημεία της καμπύλης αντιστοιχούν σε μέσες τιμές 3 πειραματικών μετρήσεων και εκφράζονται σαν επί τοις εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας. Η DES  $\text{IC}_{50}$  ήταν  $33.94 \pm 2.49 \mu\text{M}$  απουσία GTP και  $12.68 \pm 1.35 \mu\text{M}$  παρουσία 30  $\mu\text{M}$  GTP

### Επίδραση στεροειδών ορμονών στις κινητικές ιδιότητες των hGDHs

Αναλύσεις των κινητικών των γλουταμικών αφυδρογονασών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος παρουσία συγκέντρωσης DES ικανής να προκαλέσει αναστολή έδειξαν πως οι  $K_m$  για το  $\alpha$ -κετογλουταρικό, την αμμωνία και το γλουταμικό οξύ δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του αναστολέα. Αντίθετα, η κινητική ανάλυση της δέσμευσης του NADPH παρουσία DES έδειξε μια μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου (τόσο της hGDH1 όσο και της hGDH2) κατά 50%, όπου τα οιστρογόνα μπορούν να συμβάλλουν στην αναστολή της δράσης του ενζύμου από μειωμένη συγκέντρωση συνενζύμου (NADPH >100  $\mu\text{M}$ ), εν αντιθέσει με την παρατήρηση πως απουσία DES συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις του NADPH δεν μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης (μέχρι και 400  $\mu\text{M}$ ) (εικόνα 10).



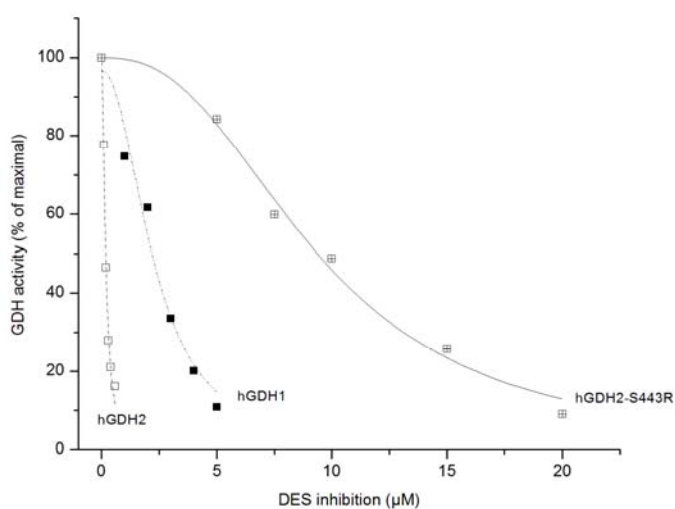
**Εικόνα 10. επίδραση της DES στην κινητική του υποστρώματος NADPH**

Οι μελέτες κινητικής έγιναν αλλάζοντας την συγκέντρωση του υποστρώματος NADPH από 20  $\mu\text{M}$  μέχρι 400  $\mu\text{M}$ , διατηρώντας τις συγκεντρώσεις των άλλων συστατικών της αντίδρασης σταθερές, παρουσία (25  $\mu\text{M}$  DES για την hGDH1 και 8 $\mu\text{M}$  DES για την hGDH2) και απουσία (No DES) οιστρογόνων. Οι συγκεντρώσεις DES που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετές για να μειωθεί η δραστηριότητα του ενζύμου κατά 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία 1.0 mM ADP.

**Ρόλος της Arg443Ser στην ευαισθησία από τα οιστρογόνα**

Λειτουργικές μελέτες της καθαρισμένης Arg443Ser - hGDH1 έδειξαν πως το μετάλλαγμα αυτό ήταν 14-32 φορές πιο ευαίσθητο από την αγρίου τύπου hGDH1. (Πίνακας 4; εικόνα 7β). Εφόσον η αντικατάσταση της αργινίνης από την σερίνη στην hGDH1 χαμηλώνει πολύ την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζει

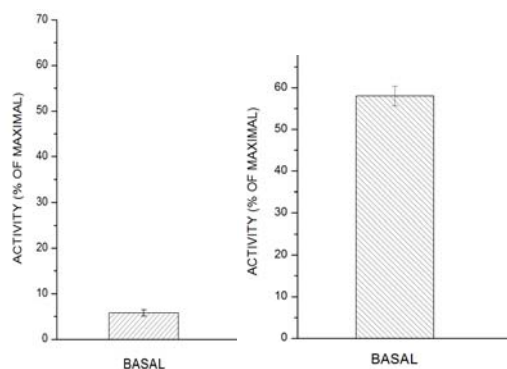
την αναστολή του ενζύμου από το GTP (Zaganas et al., 2002), τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως η ευαισθησία της Arg443Ser μετάλλαξης στα οιστρογόνα φαίνεται να σχετίζεται με την κλειστή διαμόρφωση που προκαλεί στην πρωτεΐνη η αλλαγή αυτή, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη λειτουργικών θέσεων πρόσδεσης του GTP. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε όταν μελετήσαμε το διπλό μετάλλαγμα της hGDH1 που φέρει την Gly456Ala αλλαγή, που είναι υπεύθυνη για την αντίσταση του μορίου στο GTP. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το Arg443Ser/Gly456Ala διπλό μετάλλαγμα είναι σχεδόν το ίδιο ευαίσθητο με το Arg443Ser στην αναστολή από τις στεροειδείς ορμόνες (εικόνα 7β). Ο σημαντικός ρόλος της θέσης 443 στην ευαισθησία της αγρίου τύπου hGDH2 από τα οιστρογόνα φάνηκε επιπροσθέτως όταν με ανάστροφη μεταλλαξογένεση αντικαταστήσαμε την Ser443 της hGDH2 με αργινίνη (Arg). Λειτουργικές μελέτες του Arg443-hGDH2 μεταλλάγματος έδειξαν πως η αλλαγή αυτή έκανε το ένζυμο ανθεκτικό στην αναστολή από οιστρογόνα, ενώ παράλληλα αύξησε την βασική δραστηριότητα σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά της hGDH1. (εικόνα 10, εικόνα 11).



**Εικόνα 10.** αναστολή της Arg443-hGDH2 μετάλλαξης και των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 από την DES

Τα σημεία των καμπυλών αποτελούν μέσες τιμές 3 πειραματικών μετρήσεων και δίδονται σαν επί τοις εκατό ποσοστό της βασικής τους δραστηριότητας. Η δραστηριότητα του ενζύμου μετρήθηκε προσθέτοντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις DES απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν αδρά εκχυλίσματα από sf21 κύτταρα που υπέρ-έκφραζαν τις πρωτεΐνες. Οι DES IC<sub>50</sub> τιμές υπολογιστήκαν από τις καμπύλες αναστολής, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin και για κάθε ενζύμο ξεχωριστά ήταν οι παρακάτω: DES IC<sub>50</sub> για το Arg443-hGDH2 = 9.37 ± 0.62 μM; DES IC<sub>50</sub> για το hGDH2 = 0.18 ± 0.02 μM; DES IC<sub>50</sub> για το hGDH1 = 2.25 ± 0.18 μM.

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως η αλλαγή της Arg443 από σερίνη (Ser) αποτελεί βασικό παράγοντα του εξελικτικού μηχανισμού που προσδίδει στην ειδική για το νευρικό σύστημα hGDH2 νέους μοριακούς μηχανισμούς για να ρυθμίζει την δραστηριότητα της.



**Εικόνα 11:** σύγκριση βασικής δραστηριότητας της αγρίου τύπου hGDH2 και της μεταλλαγμένης hGDH2 – S443R

Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, απουσία αλλοστερικών τροποποιητών



### Σχέση της αναστολής των hGDHs με την βασική τους δραστηριότητα

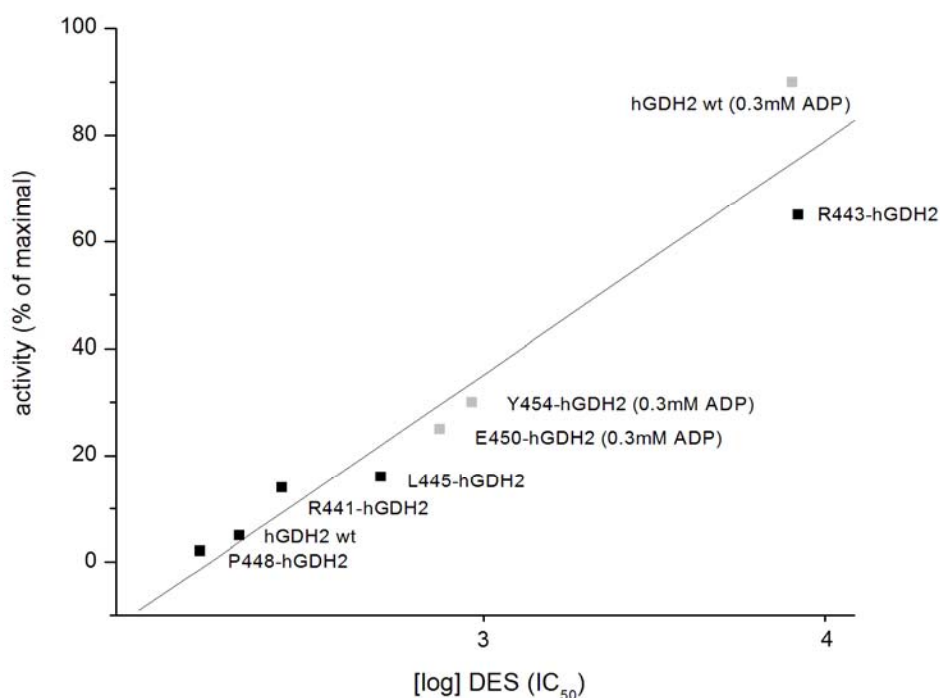
Εφόσον είδαμε πως επηρεάζεται το Arg443Ser μετάλλαγμα από την δράση των οιστρογόνων, μελετήσαμε την επίδραση που μπορεί να έχουν οι στεροειδείς ορμόνες και σε άλλες αμινοξικές αλλαγές που επηρεάζουν την βασική δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Για τον σκοπό αυτό, μελετήσαμε τα μεταλλάγματα που προέκυψαν από την αλλαγή της Ser409 από ασπαρτικό οξύ (Asp) ή αργινίνη (Arg), τα οποία όπως και στην περίπτωση της Arg443Ser - hGDH1 φαίνεται να μειώνουν την βασική δραστηριότητα του ενζύμου εξαιτίας της διαταραχής του δεσμού στην αντένα του μορίου μεταξύ της Arg443 της μιας υπομονάδας και της Ser409 της διπλανής υπομονάδας (εικόνα 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι καθαρισμένες Ser409Arg και Ser409Asp - hGDH1 ήταν εξίσου ευαίσθητες στην αναστολή από τα οιστρογόνα (εικόνα 7β, πίνακας 5), κάτι που φαίνεται να στηρίζει την θεωρία πως η αναστολή της γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα οιστρογόνα σχετίζεται με την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου.

IC50	Estradiol (μM)	Des (μM)
	0.1mM ADP 1mM ADP	0.1mM ADP 1mM ADP
<b>hGDH1</b>	69.225 +/- 1.305 300+	7.057 +/- 0.06 24.337 +/- 1.578
<b>hGDH2</b>	15.104 +/- 1.218 160.678 +/- 30.011	1.047 +/- 0.096 8.380 +/- 0.58
<b>hGDH2-S445A</b>	25.88 +/- 3.621 175.65 +/- 51.505	1.370 +/- 0.251 10.198 +/- 1.002
<b>hGDH1-R443S</b>	2.223 +/- 0.783 14.806 +/- 1.654	0.497 +/- 0.0352 2.185 +/- 0.141
<b>hGDH1-R443S/G456A</b>	4.30 +/- 0.36 68.74 +/- 7.39	0.676 +/- 0.155 6.349 +/- 0.68
<b>hGDH1-S409R</b>	22.899 +/- 2.07 93.725 +/- 2.35	3.154 +/- 0.574 12.86 +/- 0.523
<b>hGDH1-S409D</b>	31.861 +/- 1.86 110.739 +/- 5.701	3.729 +/- 0.159 13.783 +/- 1.406

**Πίνακας 5. αναστολή των καθαρισμένων αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και των μεταλλαγμένων μορφών τους από τις στεροειδείς ορμόνες**

Οι τιμές IC<sub>50</sub> ( $\pm$  SEM) υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναστολής για κάθε καθαρισμένο ενζυμο ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του  $\alpha$ -κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων στεροειδών ορμονών. Η συγκέντρωση της δι-εθυλσιλβεστρολης (Diethylstilbestrol, DES) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεταξύ 0-50  $\mu$ M, ενώ της εστραδιολης (17 $\beta$ -estradiol) μεταξύ 0-250 $\mu$ M.

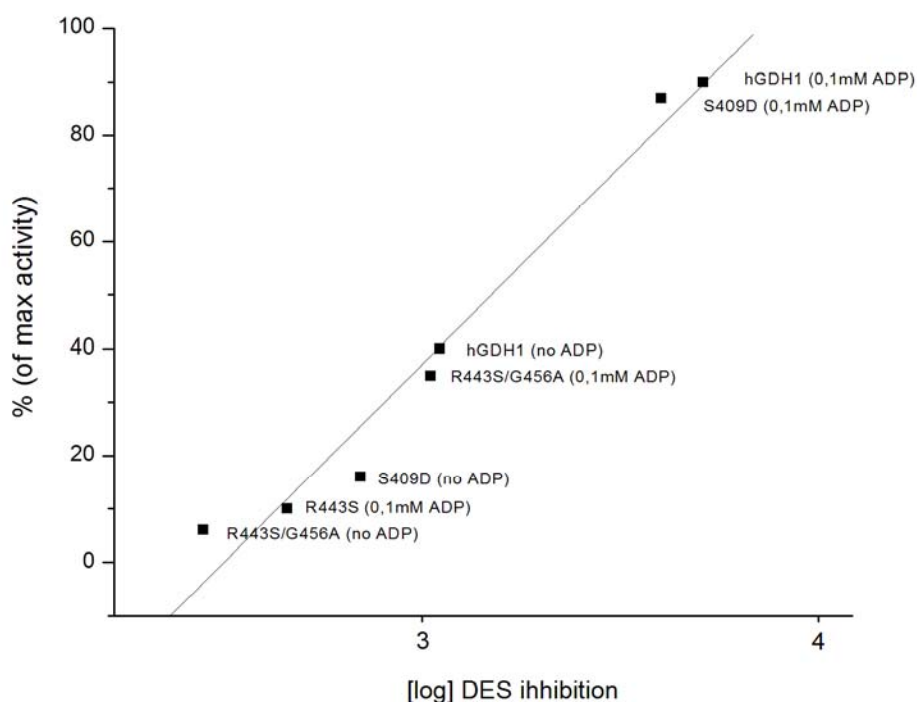
Η υπόθεση αυτή μελετήθηκε περαιτέρω εξετάζοντας την επίδραση των οιστρογόνων στα πέντε μεταλλάγματα που προέκυψαν από μεταλλαξογένεση στην αντένα και την rivot helix του μορίου της ειδικής για το νευρικό σύστημα hGDH2, που όπως δείξαμε επηρεάζουν αποκλειστικά την βασική δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελεσματα έδειξαν πως όλες οι μεταλλάξεις που μειώνουν την βασική δραστηριότητα του ενζύμου (Lys 450Glu, His454Tyr and Ser448Pro) έκαναν το ενζυμο πολύ πιο ευαίσθητο στην αναστολή από τα οιστρογόνα από ότι η αγρίου τύπου hGDH2. Αντίθετα, τα ενζυμα που είχαν μεγαλύτερη βασική δραστηριότητα (Gln441Arg and Ser445Leu) φάνηκε να είναι πιο ανθεκτικά στην αναστολή από τις στεροειδείς ορμόνες (εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** συσχέτιση της DES IC<sub>50</sub> με την βασική δραστηριότητα της αγρίου τύπου hGDH2 και των μεταλλαγμένων μορφών της

Ο άξονας ψ δείχνει την βασική καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων (σαν ποσοστό επί της μεγίστης) πριν την προσθήκη DES. Ο άξονας χ δείχνει τις τιμές DES IC<sub>50</sub> (± SE) για κάθε ενζυμο. Επειδή οι μεταλλάξεις K450E and H454Y είχαν μηδενική δραστηριότητα απουσία ADP, τα πειράματα αναστολής από DES έγιναν παρουσία 0.3 mM ADP (γκρι σημεία). Για λόγους σύγκρισης, μετρήθηκε και η DES IC<sub>50</sub> για την αγρίου τύπου hGDH2 παρουσία 0.3 mM ADP (γκρι σημεία). Η σταθερά R (correlation coefficient) και η τιμή P για την γραμμική συσχέτιση υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα Origin (R= 0.96602, P<0.0001).

Επιπροσθέτως, η μελέτη έδειξε πως η αναστολή της αγρίου τύπου hGDH2 και των μεταλλαγμένων μορφών της από την DES είναι ανάλογη της καταλυτικής βασικής τους δραστηριότητας (R=0.9660) (εικόνα 12). Το αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση της αγρίου τύπου hGDH1 και των μεταλλαγμάτων της (R= 0.9864) (εικόνα 13).

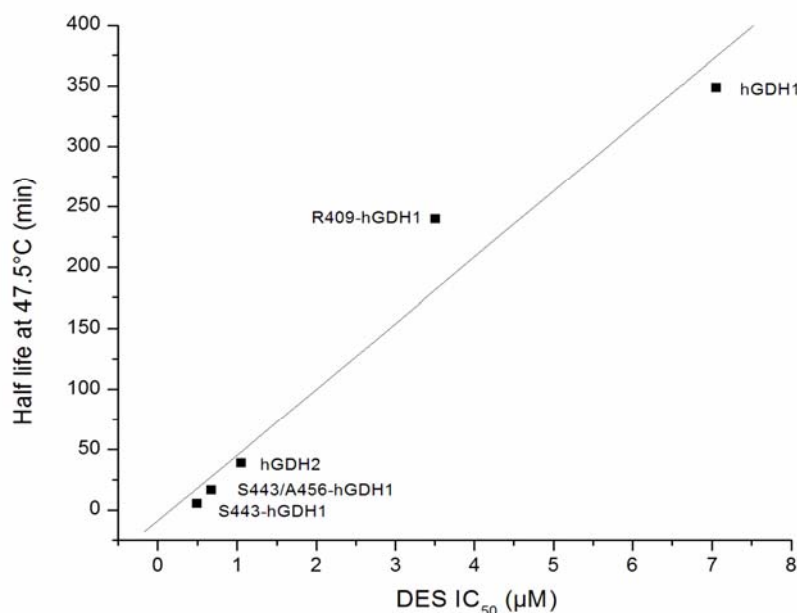


**Εικόνα 13.** συσχέτιση της DES IC<sub>50</sub> με την βασική δραστηριότητα της αγρίου τύπου hGDH1 και των μεταλλαγμένων μορφών της

Ο άξονας ψ δείχνει την βασική καταλυτική δραστηριότητα των ένζυμων (σαν ποσοστό επί της μεγίστης) πριν την προσθήκη DES. Ο άξονας χ δείχνει τις τιμές DES IC<sub>50</sub> (± SE) για κάθε ένζυμο. Οι βασικές δραστηριότητες των ένζυμων καθορίστηκαν απουσία ADP. Επειδή κάποια από τα μεταλλαγμένα σε συνθήκες έλλειψης ADP εμφάνισαν πολύ μικρή βασική δραστηριότητα, η μελέτη τους έγινε παρουσία 0.1 mM ADP. Για λόγους σύγκρισης, υπολογίστηκε και η DES IC<sub>50</sub> για την αγρίου τύπου hGDH1 παρουσία 0.1 mM ADP. Η σταθερά R (correlation coefficient) και η τιμή P για την γραμμική συσχέτιση υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα Origin (R=0.9864, P<0.0001).

Τέλος, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην βασική δραστηριότητα του ενζύμου κατά την αναστολή του από τις στεροειδείς ορμόνες και την θερμική τους

σταθερότητα, με τρόπο ώστε όσο πιο θερμοευαίσθητο είναι το ένζυμο, τόσο περισσότερο αναστέλλεται από τα οιστρογόνα ( $r=0.97719$ ) (εικόνα 14).



**Εικόνα 14.** συσχέτιση της θερμικής σταθερότητας των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου hGDHs με την DES IC<sub>50</sub>.

Η ημίσεια ζωή των ενζύμων (σε λεπτά) στους 47.5°C μετρήθηκε σε συνάρτηση με την DES IC<sub>50</sub> των ενζύμων, όπως αυτή προέκυψε από τις καμπύλες αναστολής για κάθε ένα από αυτά. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, παρουσία 0.1mM ADP. Για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων, δείγματα που περιείχαν 40-60 µg/ml καθαρισμένου ενζύμου και 4 mg/ml BSA θερμάνθηκαν σε διάλυμα 100mM sodium phosphate pH 6.8 στους 47.5°C. τα φιαλίδια που περιείχαν το μείγμα απομακρύνονταν από την θερμοκρασία σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και η δραστηριότητα των ενζύμων μετρήονταν συμφωνά με την παραπάνω αντίδραση.

### Επίδραση των αντιψυχωσικών παραγόντων

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων της επίδρασης των στεροειδών ορμονών στις γλουταμικές αφυδρογονάσες, μελετήσαμε και την επίδραση που μπορεί να έχουν δυο αντιψυχωσικοί παράγοντες, η περφεναζίνη και η αλοπεριδόλη, στην δραστηριότητα των αγρίου τύπου hGDHs. Παράλληλα, μελετήθηκαν και οι Arg443Ser, Arg443Ser/Gly456Ala μεταλλάξεις της hGDH1 καθώς και η Ser445Ala μετάλλαξη της hGDH2, αφού πρώτα καθαρίστηκαν από εκχυλίσματα Sf21 κυττάρων που υπέρ-έκφραζαν τις παραπάνω πρωτεΐνες.

### Επίδραση των αντιψυχωσικών στις αγρίου τύπου hGDHs

Λειτουργικές μελέτες των καθαρισμένων αγρίου τύπου γλουταμικών αφυδρογονασών επιβεβαίωσαν πως όπως και στη περίπτωση των οιστρογόνων, οι αντιψυχωσικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν πιο ενεργά με την ειδική για το νευρικό σύστημα γλουταμική αφυδρογονάση από ότι με την housekeeping hGDH1. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η hGDH2 ήταν 5-6 φορές πιο ευαίσθητη στην αναστολή από την αλοπεριδόλη και την περφεναζίνη, από την hGDH1 παρουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών (παρουσία 0.1mM ADP, η IC<sub>50</sub> για την αλοπεριδόλη ήταν 121μM για την hGDH1 και 25μM για την hGDH2, ενώ η IC<sub>50</sub> για την περφεναζίνη ήταν 193μM για την hGDH1 και 31μM για την hGDH2 στην ίδια συγκέντρωση ADP) (πίνακας 6).

A)

	Basal Specific Activity (μmoles/min/mg)	IC50 (μM)
		Haloperidol
hGDH2	7.6±0.1	14.76±2.87
hGDH1	58.1±4.1	21.69 ±4.77

B)

	Vmax (μmoles/min/mg)	Specific Activity at 0.1mM ADP (μmoles/min/mg)	IC50 (μM)	
			Haloperidol	Perphenazine
hGDH2	159.2±0.4	111.4±1.4	25.62±5.97	31.12±3.09
hGDH1	161.3±0.5	148.4±2.1	121.59±3.33	193.90±14.74
Ser443-hGDH1	140.3±0.3	14.0±0.4	12.32±4.88	20.52±4.88

**Πίνακας 6.** αναστολή των καθαρισμένων αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και της μεταλλαγμένης hGDH1 - R443S από τους αντιψυχωσικούς παράγοντες

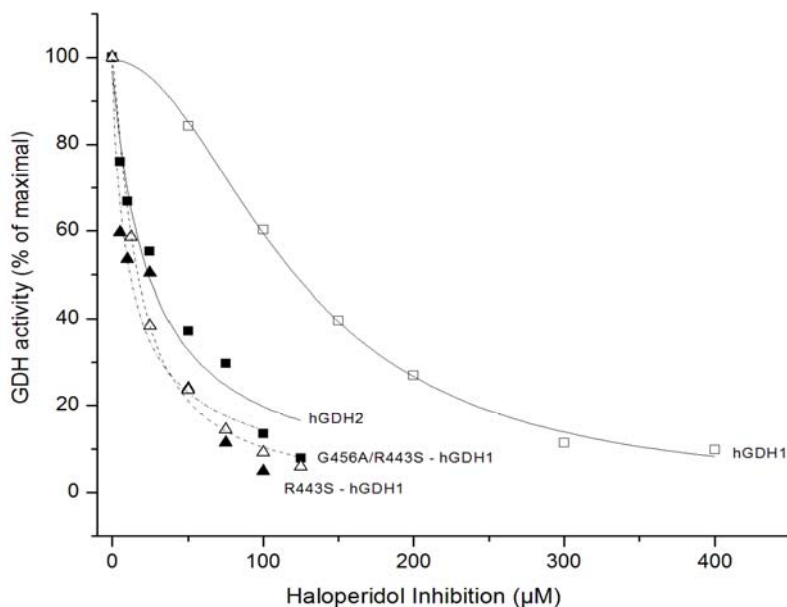
Οι τιμές IC<sub>50</sub> (± SEM) υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναστολής για κάθε καθαρισμένο ενζυμο ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων στεροειδών ορμονών. Η συγκέντρωση της αλοπεριδόλης (haloperidol) που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεταξύ 0-400 μM, και της περφεναζίνης (perphenazine) μεταξύ 0-350 μM.

(A) αναστολή των καθαρισμένων πρωτεϊνών απουσία ADP.

(B) αναστολή των καθαρισμένων πρωτεϊνών παρουσία 0.1mM ADP.

Ρόλος της Arg443Ser στην ευαισθησία από τους αντιψυχωσικούς παράγοντες

Μελέτες αναστολής της καθαρισμένης Arg443Ser - hGDH1 από τα αντιψυχωσικά έδειξαν πως το μέταλλαγμα αυτό ήταν 10 φορές πιο ευαίσθητο από την αγρίου τύπου hGDH1. (Πίνακας 6; εικόνα 15-16) τόσο στην περίπτωση της αλοπεριδόλης, όσο και στην περίπτωση της περφεναζίνης.



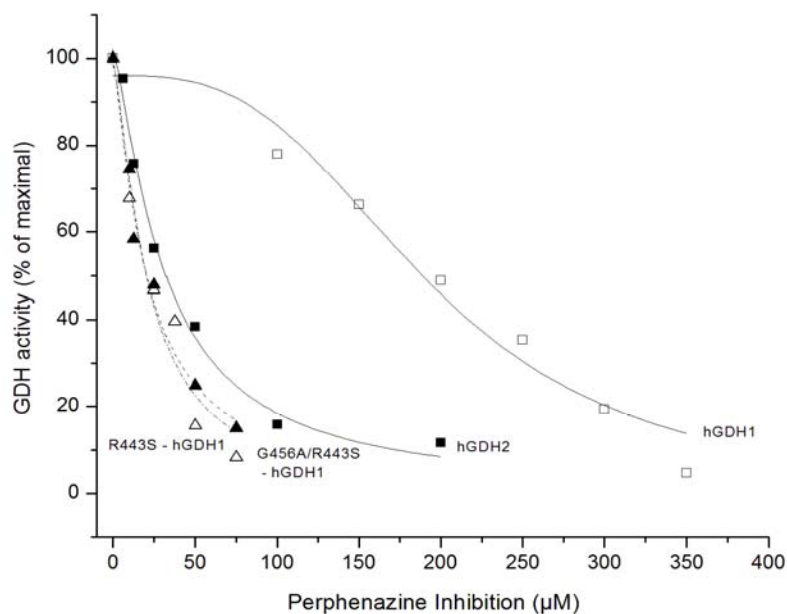
**Εικόνα 15:** αναστολή των καθαρismένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs από την haloperidol

Η δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης υπολογίστηκε από την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων αλοπεριδόλης (0-400 mM). Κάθε σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών πειραματικών μετρήσεων και διατυπώνονται σαν επί της εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου

Όλες οι αντιδράσεις αναστολής των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs από την αλοπεριδόλη έγιναν παρουσία 0.1mM ADP.

Η σημασία της αλλαγής αυτής, επιβεβαιώθηκε για μια ακόμα φορά όταν μελετήσαμε το διπλό μετάλλαγμα της hGDH1 που φέρει την Gly456Ala αλλαγή. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το Arg443Ser/Gly456Ala είναι σχεδόν το ίδιο ευαίσθητο με το Arg443Ser στην αναστολή από τους αντιψυχωσικούς παράγοντες (εικόνα 15-16)



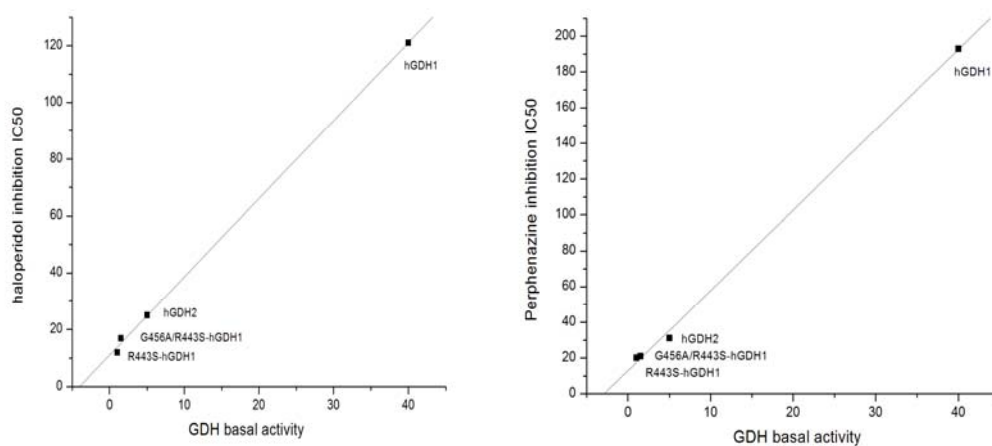


**Εικόνα 16:** αναστολή των καθαρσιμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs από την perphenazine

Η δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης μελετήθηκε στην αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων περφенаζίνης (0-350 mM). Κάθε σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών πειραματικών μετρήσεων και διατυπώνονται σαν πει της εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου

Όλες οι αντιδράσεις αναστολής των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων hGDHs από την περφенаζίνη έγιναν παρουσία 0.1mM ADP.

Επιπροσθέτως, φάνηκε πως η αναστολή των γλουταμικών αφυδρογονασών από την περφенаζίνη και την αλλοπεριδόλη είναι ανάλογη της καταλυτικής βασικής τους δραστηριότητας (όσο μικρότερη βασική δραστηριότητα έχει το ένζυμο, τόσο πιο ευαίσθητο είναι στην αναστολή από τα αντιψυχωσικά) (εικόνα 17).



**Εικόνα 17.** συσχέτιση της βασικής δραστηριότητας των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου hGDHs με τις  $IC_{50}$  των αντιψυχωσικών παραγόντων

Η βασική δραστηριότητα των ένζυμων μετρήθηκε σε συνάρτηση με την haloperidol και perphenazine  $IC_{50}$  των ένζυμων, όπως αυτή πρόεκυψε από τις καμπύλες αναστολής για κάθε ένα από αυτά. Η δραστηριότητα της GDH υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε διάλυμα TRA, pH 8.0, παρουσία 0.1mM ADP)

## Προδιάθεση για την νόσο του Πάρκινσον

Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριο μας είχαν δείξει ότι ο πολυμορφισμός T1492G στο γονίδιο *GLUD2*, ο οποίος ευθύνεται για την σημειακή αλλαγή (Ala445Ser) στην ειδική για το νευρικό σύστημα γλουταμική αφυδρογονάση (hGDH2), σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου Πάρκινσον στους άρρενες φορείς της σε δείγμα 241 ασθενών από την Κρήτη. Παράλληλα, ενζυμικές μελετες του Κ. Καναβούρα στο Ala445Ser-Glud2 μετάλλαγμα έδειξαν ότι η αλλαγή αυτή δείχνει να οδηγεί στην διαφοροποίηση της συμπεριφοράς του ενζύμου (αύξηση της βασικής δραστηριότητας εν σχέση με την φυσιολογική *GLUD2*) συμβατή με επί πλέον λειτουργικότητα (gain of function) μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, μελετήθηκε μεγαλύτερο δείγμα Παρκινσονικών ασθενών (281 ασθενείς από την Κρήτη) και υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας με ενδημική πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Aci-I και με ταυτοποίηση αλληλουχίας (sequencing) όλου το γονιδίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της Ser445Ala αλλαγής στο μόριο της *GLUD2*, καθώς και να βρεθούν άλλες πιθανές αλλαγές που να σχετίζονται με την νόσο του Πάρκινσον.

Συγκεκριμένα, μελετήσαμε 281 PD ασθενείς από την Κρήτη και για λόγους σύγκρισης 205 υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7, από τους παρκινσονικοί ασθενείς το 57.4% ήταν άνδρες και το 42.6% γυναίκες. Στο πληθυσμό αυτό, η μέση ηλικία έναρξης της νόσου ( $\pm$ S.D) ήταν  $64.4\pm 10.4$  χρόνια, ηλικία στην οποία ο ασθενείς είχε τα πρώτα συμπτώματα της νόσου.

	Σύνολο	I	G/T	G	P
Σύνολο	281 (64.41±10.41, 63.2-65.6)	272 (96.8%) (64.57±10.36, 63.3-65.8)	5 (1.8%) (67.20±7.69, 57.6-76.7)*	4 (1.4%) (50.00±6.98, 38.9-61.1)**	
Άνδρες	161 (64.25±10.46, 62.6-65.9)	157 (97.5%) (64.61±10.29, 62.9-66.2)		4 (2.5%) (50.00±6.98, 38.9-61.1)	<b>0.005</b>
Γυναίκες	120 (64.63±10.39, 62.7-66.5)	115 (95.8%) (64.51±10.50, 62.6-66.5)	5 (4.2%) (67.20±7.69, 57.6-76.7)		0.573
P	0.765	0.938	<b>0.01</b>	<b>G</b>	
Συχνότητα αλληλομόρφου		<b>I</b> 97.8%		<b>G</b> 2.2%	

\*p=0.573

\*\*p=0.005

	Σύνολο	I	T	G/T	G
Crete	205	194 (94.6%)	7 (3.4%)		4 (2.0%)
Άνδρες	74 (36.1%)	70 (94.6%)			4 (5.4%)
Γυναίκες	131 (63.9%)	124 (94.7%)	7 (5.3%)		
Συχνότητα αλληλομόρφου	<b>I</b> 96.7%	<b>G</b> 3.3%			

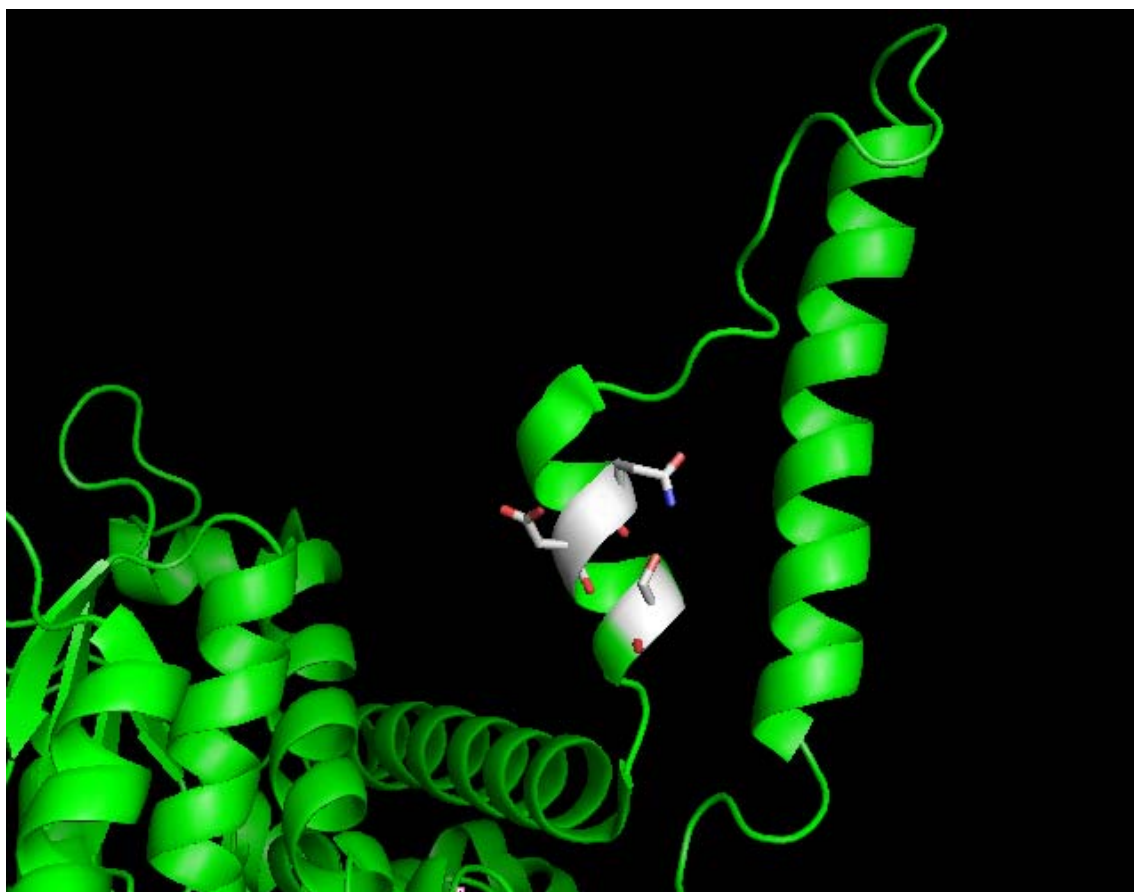
**Πίνακας 5.** Αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού T1492G με την ηλικία έναρξης της νόσου του παρκινσον. Συχνότητα του G αλληλομόρφου στους κρητικούς PD ασθενείς vs. κρητικούς controls: p=0.529, x<sup>2</sup>=0.40, OR: 0.68 (0.26-1.79)

## Ρόλος των G103A και T1492G πολυμορφισμών

Η μελέτη ταυτοποίησης της αλληλουχίας (sequencing) όλου το γονιδίου της *GLUD2* αποκάλυψε δυο πολυμορφισμούς (SNPs) στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου.

Η πρώτη ήταν μια μη-συνώνυμη αλλαγή (G103A), που έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση Gly35 από μια αργινίνη (Arg) στο πεπτίδιο-οδηγό (leader peptide) της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί η *GLUD2*. Η συχνότητα του πολυμορφισμού αυτού ήταν ίδια τόσο στο πληθυσμό των παρκινσονικών ασθενών (16.7% του συνόλου), όσο και στον πληθυσμό των υγιών δεικτών που μελετήσαμε (18.3% του συνόλου). Παράλληλα, ο πολυμορφισμός G103A δεν φάνηκε να σχετίζεται με κάποια από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με νόσο Πάρκινσον.

Η δεύτερη μη-συνώνυμη αλλαγή (T1492G) βρέθηκε στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου της *GLUD2* και είναι υπεύθυνη για την αντικατάσταση της Ser445 από την Ala στην ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της (εικόνα 18). Η μελέτη μας έδειξε πως οι άνδρες που φέρουν το G ελληνόμορφο εμφάνισαν την νόσο στην ηλικία των  $50.0 \pm 6.98$  χρονών, εν αντιθέσει με τους ασθενείς που έφεραν άλλους T1492G γονοτύπους, οι οποίοι εμφάνιζαν την νόσο στην ηλικία των  $64.62 \pm 10.2$  χρόνων ( $N=281$ ;  $P<0.01$ ). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν πως στους ημίζυγους, για το G αλληλόμορφο, ασθενείς με νόσο Πάρκινσον, η νόσος εκδηλώνεται νωρίτερα κατά 8 με 13 χρόνια, από ότι σε ασθενείς με άλλους γονοτύπους.



**Εικόνα 18.** Θέση της Ser445 στην μικρή έλικα της κατιούσας αλυσίδας της αντένας της γλουταμικής αφυδρογονάσης hGDH2. (PDB entry 1LIF).

Η σύγκριση των G ημίζυγων ασθενών (έναρξη της νόσου:  $54.6 \pm 11.1$ ) με τους ετερόζυγους G/T (έναρξη της νόσου:  $67.7 \pm 8.1$ ,  $P=0.001$ ), τους T ημίζυγους (έναρξη της νόσου:  $64.0 \pm 10.7$ ,  $P=0.003$ ) και τους T/T ομόζυγους (έναρξη της νόσου:  $62.9 \pm 11.0$ ,  $P=0.011$ ) έδειξε πως τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά. Επίσης, φάνηκε πως οι G/T ετερόζυγοι ασθενείς εμφανίζουν την νόσο σε σχετικά μεγαλύτερη ηλικία από ότι ασθενείς με άλλους γονοτύπους.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν, αφού αναπαραχθήκαν και σε δυο ακόμα πληθυσμούς Παρκινσονικών ασθενών (από την Κεντρική Ελλάδα, και την Καλιφόρνια) που μελετήθηκαν από συνεργάτες του εργαστηρίου μας.

## Επίδραση των οιστρογόνων στην Ser445Ala-hGDH2

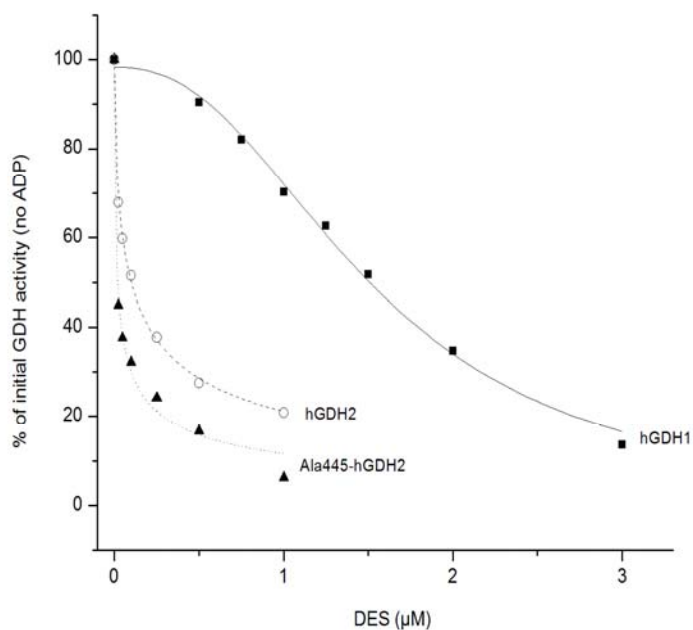
Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το Ser445Ala μετάλλαγμα και η αγρίου τύπου hGDH2 ήταν πολύ πιο ευαίσθητες στην αναστολή από την διεθυλστιλβεστρολη (DES) ( $IC_{50} = 19 \pm 3$  nmoles/l για την Ser445Ala,  $IC_{50} = 94 \pm 3$  nmoles/l για την αγρίου τύπου hGDH2) από ότι η αγρίου τύπου hGDH1 που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς ( $IC_{50}=1,530 \pm 46$  nmoles/l) όταν μελετήθηκαν απουσία αλλοστερικών τροποποιητών.

	<b>hGDH1</b>	<b>Ala445-hGDH2</b>	<b>hGDH2</b>
IC50 (nmoles/l)	1,53 ±46	19 ± 3	94 ± 3
Hill coefficient	1.89 ± 0.01	0.40 ± 0.02	0.52 ± 0.02

**Πίνακας 7:** DES IC50 για τις αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 και την μεταλλαγμένη Ala445-hGDH2 απουσία ADP

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένες πρωτεΐνες και όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε διάλυμα 50mM TRA (pH 8.0), απουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Οι τιμές  $IC_{50}$  και οι συντελεστές Hill ( $\pm$ S.E.) υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναστολής των ενζύμων.

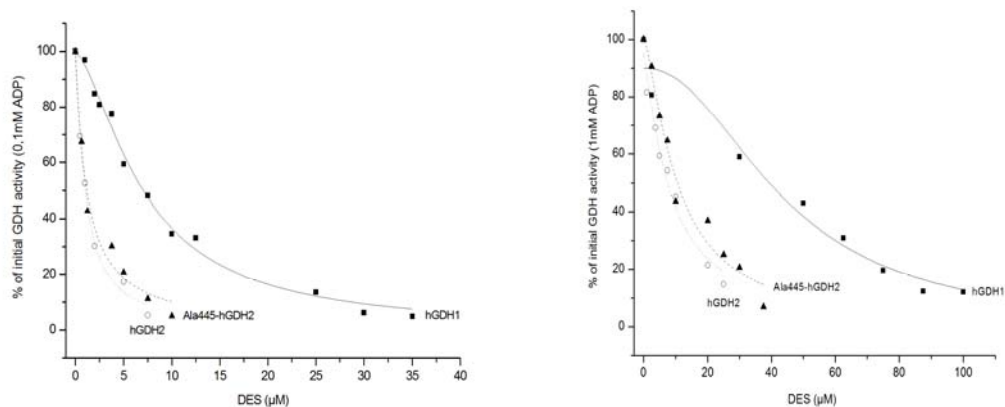
Η ευαισθησία του μεταλλάγματος Ser445Ala στις στεροειδείς ορμόνες παρατηρήθηκε ακόμα και όταν ενεργοποιήσαμε με ενζυμο με 0.1mM ADP και 1.0 mM ADP (εικόνες 18-19)



**Εικόνα 18:** καμπύλες αναστολής από DES της Ala445-hGDH2 και των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 απουσία ADP

Τα σημεία κάθε καμπύλης αντιστοιχούν σε μέσες τιμές τριών πειραματικών δεδομένων της ταχύτητας του ενζύμου (σαν επί τοις εκατό ποσοστό της βασικής δραστηριότητας) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις DES. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένες μορφές πρωτεϊνών, και οι αντιδράσεις έγιναν χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις DES. Η βασική δραστηριότητα των ενζύμων υπολογίστηκε απουσία DES. Η τιμή  $IC_{50}$  για την Ala445-hGDH2 είχε στατιστικά σημαντική διάφορα ( $P < 0.001$ ) από αυτήν της αγρίου τύπου hGDH1.





**Εικόνα 19** καμπύλες αναστολής από DES της Ala445-hGDH2 και των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 παρουσία ADP (0.1mM ADP αριστερά και 1.0 mM ADP δεξιά)

## Συζήτηση

Το πρώτο σκέλος της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε τις συνέπειες 5 αμινοξικών αλλαγών στην ρυθμιστική περιοχή της hGDH2. Από αυτές τις μεταλλάξεις, δυο βρίσκονταν στην *pinot helix*, δυο στην αντένα, και μια στην περιοχή σύνδεσης των παραπάνω δόμων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι μεταλλάξεις της *pinot helix* (Lys450Glu, His454Tyr) εκμηδένισαν την βασική δραστηριότητα του ενζύμου και ανέστειλαν την ρύθμιση των ένζυμων αυτών από τους αλλοστερικούς τροποποιητές (μεταξύ αυτών και την δυνατότητα ενεργοποίησης τους από την λευκίνη). Οι μεταλλάξεις της αντένας (Gln441Arg, Ser445Leu) αύξησαν την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζουν την αλλοστερική ρύθμιση των ένζυμων από το ADP και το GTP, καθώς και την ενεργοποίηση τους από την λευκίνη. Αντίθετα, η μετάλλαξη Ser48Pro μείωσε την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, αλλά ενώ όπως οι μεταλλάξεις της αντένας δεν επηρέασε την ρύθμιση του ενζύμου από το ADP και το GTP, κατέστειλε την ενεργοποίηση του από την λευκίνη. Παράλληλα, πειράματα θερμικής απενεργοποίησης των ένζυμων έδειξαν πως ενώ οι μεταλλάξεις της *pinot helix* έκαναν το ενζυμο εξαιρετικά θερμοευαίσθητο, οι μεταλλάξεις της αντένας έκαναν την γλουταμική αφυδρογονάση σχετικά ανθεκτική στην θερμική απενεργοποίηση.

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως οι μεταλλάξεις στην ρυθμιστική περιοχή της hGDH2 επηρεάζουν κυρίως την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, εν αντιθέσει με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις στο μόριο της hGDH1 που δεν φάνηκε να επηρεάζουν την βασική δραστηριότητα του ενζύμου, παρά μονό την αναστολή του από το GTP. (Kelly and Stanley 2001; Lee *et al.* 2001). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως ενώ οι δυο ισόμορφες της γλουταμικής αφυδρογονάσης έχουν ελάχιστες δομικές

διαφορές, διαθέτουν διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζουν την βασική τους δραστηριότητα, αρχικά, και την συνολική λειτουργία τους κατ επέκταση. Έτσι, ενώ η ρύθμιση της hGDH2 καθορίζεται από τις αλλαγές των συγκεντρώσεων ADP/L-leucine (δεδομένου ότι έχει πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα, και δεν επηρεάζεται από το GTP), η δραστηριότητα της hGDH1 καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των συγκεντρώσεων GTP και ADP/L-leucine (εφόσον επηρεάζεται από το GTP, η δράση του όποιου αναστέλλεται από την παρουσία ADP).

Πως μπορούν όμως να εξηγηθούν αυτά τα αποτελέσματα σε δομικό επίπεδο?

Δεδομένου, πως προηγούμενες έρευνες (Banerjee *et al.* 2003) έχουν δείξει πως το ADP προσδέεται στην pivot helix, δεν είναι τυχαίο πως τα δυο μεταλλαγμένα της περιοχής αυτής που μελετήσαμε (Lys450Glu and His454Tyr) ανέστειλαν την ενεργοποίηση του ενζύμου από το ADP. Λόγω της θέσης τους, οι παραπάνω αμινοξικές αλλαγές μπορεί να μην επιτρέπουν στην περιοχή πρόσδεσης του  $\text{NAD}^+$  να κάνει περιστροφική κίνηση γύρω από την pivot helix κατά την διάρκεια του ανοίγματος της καταλυτικής σχισμής. Αυτό έχει σαν συνέπεια το κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής, με αποτέλεσμα όχι μόνο την μείωση της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου, αλλά και την εμπόδιση του ADP να προσδεθεί στο μόριο και να ενεργοποιήσει την γλουταμική αφυδρογονάση. Το ότι οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στο μόριο της hGDH1 δεν έχουν το ίδιο αποτέλεσμα στην βασική δραστηριότητα του ενζύμου, μπορεί να ευθύνεται στην ιδιότητα της εξελικτικής αλλαγής Arg443Ser (που ευθύνεται για την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου) στην hGDH2 να δρα συνεργατικά με τις δυο μεταλλάξεις Lys450Glu και His454Tyr στο

κλείσιμο της καταλυτικής σχισμής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη αυτών των δυο μεταλλάξεων (Lys450Glu και His454Tyr), έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με το μοντέλο που προτάθηκε για την Arg443Ser hGDH1 μετάλλαξη (χαμηλή βασική δραστηριότητα και αναστολή της επίδρασης της λευκίνης), συμφωνά με το όποιο αυτές της αλλαγές ευνοούν την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου, και άρα δεν είναι δυνατή η είσοδος της L-λευκίνης στην καταλυτική σχισμή (Zaganas *et al.* 2002).

Δεδομένου πως η εισαχθείσα αλλαγή της λευκίνη στο Ser445Leu μετάλλαγμα αποτελεί καλύτερο σταθεροποιητή της μικρής  $\alpha$ -έλικας της αντένας από την σερίνη, κάτι που μπορεί να ισχύει και στην περίπτωση της αντικατάστασης της Gln441 από την αργινίνη, οι ιδιότητες των μεταλλάξεων της αντένας μπορούν να εξηγηθούν, καθώς με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ευνοείται η ανοιχτή διαμόρφωση του ενζύμου, και άρα να αντισταθμίζεται η επίδραση της Arg443Ser στην βασική δραστηριότητα της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης. Αντίθετα, η αντικατάσταση της Ser448 από την προλίνη μπορεί να επηρεάζει την κίνηση της μικρής  $\alpha$ -έλικας της κατιούσας αλύσου της αντένας και της pivot helix, με αποτέλεσμα την χαμηλή βασική δραστηριότητα που παρουσιάζει. Παράλληλα, το γεγονός πως η Ser448Pro αλλαγή στο μόριο της hGDH2 δεν επηρέασε την ρύθμιση του ενζύμου από το GTP και το ADP, μπορεί να σημαίνει πως οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν το επίπεδο της βασικής δραστηριότητας και την ρύθμιση από τους αλλοστερικούς τροποποιητές είναι διαφορετικοί και ίσως δεν συνδέονται μεταξύ τους.

Όπως είπαμε στην εισαγωγή, με την χρήση βιοχημικών μεθόδων ανιχνεύτηκε η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων γλουταμικής αφυδρογονάσης τόσο στα αστροκύτταρα, όσο και σε νευρώνες του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας. (Zaganas *et al.* 2001). Επιπλέον πρωτεϊνικές και mRNA αναλύσεις έδειξαν πως στον εγκέφαλο του ανθρώπου εκφράζονται 4 διαφορετικές ισομορφές, που διαφέρουν ελάχιστα στο ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος τους (Hussain *et al.* 1989, Mavrothalassitis *et al.* 1988). Η εμφάνιση του γονιδίου της *GLUD2* από ρετρομετάθεση συμπίπτει με την περίοδο που ο εγκέφαλος του κοινού προγόνου των ανθρώπων και των πιθήκων αρχίζει να μεγαλώνει. Παρόλο που οι βιολογικές και εξελικτικές συνέπειες της εμφάνισης του γονιδίου της *GLUD2* δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως, οι ιδιότητες του hGDH2 ισοενζύμου φαίνεται να συμβάλλουν στην προσαρμογή του ενζύμου στις ειδικές συνθήκες που επικρατούν στον νευρικό ιστό (Plaitakis and Zaganas 2001), και αυτές αφορούν στην αντίσταση του ενζύμου στην αναστολή από το GTP, την εξάρτηση του από το ADP προκειμένου να ενεργοποιηθεί, και την ικανότητα του να είναι λειτουργικό σε σχετικά χαμηλές τιμές pH.

Αφού τα επίπεδα GTP στο εγκέφαλο είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του σε άλλους ιστούς, η ανθεκτικότητα της hGDH2 στην αναστολή που προκαλεί το GTP μπορεί να ευνοεί τον μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος που εκκρίνεται στην συναπτική σχισμή, ακόμα και όταν ο κύκλος του κιτρικού οξέος μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες GTP ικανές να αναστείλουν τελείως την housekeeping γλουταμική αφυδρογονάση. Ταυτόχρονα, η εξάρτηση της hGDH2 εξ ολόκληρου από τα επίπεδα του ADP ίσως είναι σημαντική για την ρύθμιση της εισόδου του γλουταμικού οξέος στο μονοπάτι της γλουταμικής αφυδρογονάσης, εφόσον είναι γνωστό πως κατά την διάρκεια της μετάδοσης των νευρικών ώσεων συντελείται και υδρόλυση του ATP σε ADP. Τέλος, η συνεργατική δράση της L-λευκίνης στην ενεργοποίηση της hGDH2

από το ADP, μπορεί να επιτρέψει στο ενζύμο να λειτουργεί ακόμα και σε περιπτώσεις έντονων ενεργειακών αναγκών (Plaitakis *et al.* 2003). Ομοίως, το γεγονός πως η hGDH2 λειτουργεί καλύτερα σε χαμηλότερες τιμές pH από ότι η hGDH1, επιτρέπει στο ενζύμο να λειτουργεί επιτυχώς στο οξειδωτικό περιβάλλον των συναπτικών αστροκυττάρων.

Δεδομένου πως η hGDH2 είναι ανθεκτική στην αναστολή από GTP, μελετήθηκε η περίπτωση της αντικατάστασης της δράσης του GTP, από άλλους αλλοστερικούς τροποποιητές. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως οι στεροειδείς ορμόνες λειτουργούν σαν ειδικοί αναστολείς της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης. Παράλληλα βρέθηκε πως η αλλαγή Arg443Ser, που ως γνωστόν ευθύνεται για την χαμηλή βασική δραστηριότητα της hGDH2, είναι εξ ολοκλήρου υπεύθυνη για την ευαισθησία της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης στην δράση των οιστρογόνων, εύρημα που επαληθεύτηκε όταν μελετήσαμε την δράση των αντιψυχωσικών παραγόντων στην γλουταμική αφυδρογονάση. Δεδομένου πως η Arg443Ser αλλαγή προκαλεί διαταραχή των δεσμών μεταξύ των υπομονάδων που συγκλείουν στην αντένα, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό στην κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου, μελετήσαμε την περίπτωση άλλες μεταλλάξεις είτε στο μόριο της hGDH1 είτε στο μόριο της hGDH2, που αλλάζουν τη βασική δραστηριότητα των ενζύμων, να επηρεάζουν την ευαισθησία της hGDH στα στεροειδή. Παράλληλα, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των στεροειδών ορμονών με τις αγρίου τύπου hGDH1/hGDH2 και τα μεταλλάγματα τους, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ADP (που συμβάλει στην διατήρηση της ανοιχτής διαμόρφωσης του ενζύμου) (Smith and Stanley, 2008).

Τα αποτελεσματα μας έδειξαν πως η αναστολή που προκαλείται από τα οιστρογόνα είναι ανάλογη των επιπέδων της βασικής δραστηριότητας (όπως αυτά μετρήθηκαν απουσία ADP) των αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2. Η ίδια σχέση μεταξύ αναστολής από τα οιστρογόνα και το επίπεδο ενεργοποίησης των ενζύμων βρέθηκε να ισχύει και όταν οι αντιδράσεις ενεργοποιούνταν από ADP. Παράλληλα, βρέθηκε πως όπως η θερμοευαισθησία των γλουταμικών αφυδρογονασών σχετίζεται γραμμικά με τα επίπεδα της βασικής τους δραστηριότητας (Zaganas et al., 2009), έτσι και η αναστολή των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων GDHs από τα οιστρογόνα σχετίζεται παρομοίως με την ευαισθησία που επιδεικνύουν τα ένζυμα αυτά στην θερμοκρασία.

Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν πως ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο τα οιστρογόνα αναστέλλουν τις γλουταμικές αφυδρογονάσες είναι διαφορετικός από τον μηχανισμό αναστολής από το GTP (Smith and Stanley, 2008). Έτσι, ενώ η αγρίου τύπου hGDH2 είναι αρκετά ανθεκτική στην αναστολή από GTP, είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην αναστολή από τα οιστρογόνα. Αντίθετα, η αγρίου τύπου hGDH1, που ως γνωστόν αναστέλλεται από την παρουσία μικρών συγκεντρώσεων GTP, αποδείχθηκε αρκετά ανθεκτική στην δράση των στεροειδών ορμονών. Συνεπώς, το GTP λειτουργεί σαν ειδικός αναστολέας της hGDH1, εν αντιθέσει με την αγρίου τύπου hGDH2 που αναστέλλεται ειδικά από τα οιστρογόνα. Τα αποτελεσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν όταν μελετήσαμε το μετάλλαγμα Gly456Ala - hGDH1, που είναι ανθεκτικό στην αναστολή από GTP, όπως και το διπλό μετάλλαγμα Arg443Ser/Gly456Ala - hGDH1, που όχι μόνο είναι ανθεκτικό στην αναστολή από GTP, αλλά έχει και χαμηλή βασική δραστηριότητα (Mastorodemos et al., 2005), όπου διαπιστώθηκε ευαισθησία στην αναστολή από τα οιστρογόνα. Παράλληλα, μερική αναστολή της hGDH1 από το GTP δεν ευαισθητοποίησε περαιτέρω το ένζυμο στην

δράση των στεροειδών απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών, παρά μόνο όταν η δράση του GTP αντισταθμίστηκε με την προσθήκη ADP, κάτι που δείχνει πως η αναστολή της γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα οιστρογόνα είναι ανεξάρτητη από την δέσμευση ή μη των θέσεων πρόσδεσης του GTP.

Η ανάλυση των μεταλλαγμένων hGDHs που παράγαμε, έδειξε πως τα οιστρογόνα επιδρούν πιο ενεργά στα μεταλλάγματα, που φέρουν μια αμινοξική αλλαγή και παρουσιάζουν χαμηλή βασική δραστηριότητα. Όλες αυτές οι μεταλλάξεις, παρόλο που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στο μόριο της γλουταμικής αφυδρογονάσης, έχουν σαν κοινή συνιστάμενη χαμηλή βασική δραστηριότητα, ως αποτέλεσμα της κλειστής διαμόρφωσης που επιφέρουν στο μόριο. Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σε συνδυασμό με πρότερες μελέτες μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι λειτουργικές ιδιότητες της hGDH2, που την διαφοροποιούν από την housekeeping hGDH1, οφείλονται εξ ολόκληρου σε δυο αμινοξικές αλλαγές, που απέκτησε εξελικτικά η ειδική για το νευρικό σύστημα γλουταμική αφυδρογονάση. Η Ala456Gly, που καθίστα το ενζύμο ανεξάρτητο από την δράση του GTP, και η Arg443Ser, που χαμηλώνει την βασική δραστηριότητα του ενζύμου και το καθίστα ευαίσθητο στην αναστολή από τις στεροειδείς ορμόνες.

Εξίσου σημαντική είναι η παρατήρηση πως η δράση των οιστρογόνων στις αγρίου τύπου hGDH1 και hGDH2 σχετίζεται με το επίπεδο ενεργοποίησης των ενζύμων. Εν μέρει, η ευαισθησία της hGDH2 στις ορμόνες αυτές μπορεί να εξηγηθεί με την ιδιότητα του ενζύμου να βρίσκεται σε κατάσταση κλειστής διαμόρφωσης όντας ανενεργό. Εφόσον το ADP δρα σαν ενεργοποιητής της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης, μπορεί η λειτουργία της hGDH2 να επιτυγχάνεται με την αντίθετη



δράση στεροειδών και ADP, δεδομένου πως το ADP ανταγωνίζεται την δράση των οιστρογόνων, με τον ίδιο τρόπο που δρουν στην περίπτωση της hGDH1 το GTP και το ADP. Αφού όπως είπαμε, η hGDH2 έχει εξελίχθη με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορεί να λειτουργεί στο περιβάλλον της σύναψης (μεγάλη συγκέντρωση GTP) χωρίς να επηρεάζεται από το GTP, η ειδική αναστολή της ειδικής για το νευρικό σύστημα γλουταμικής αφυδρογονάσης μπορεί να επιτρέπει σε αυτές τις ορμόνες να ρυθμίζουν, μαζί με το ADP, τον μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος σε συνθήκες έντονης ενεργειακής μεταβολής.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα οιστρογόνα στον εγκέφαλο παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του γλουταμικού οξέος, και έχουν συσχετιστεί τόσο με νευροδιεγερτοτοξικότητα που προκαλείται από το γλουταμικό οξύ, αλλά και με το οξειδωτικό στρες (Amantea et al., 2005). Παράλληλα, υπάρχουν άλλες έρευνες που δείχνουν πως τα οιστρογόνα επηρεάζουν την γλουταματεργική διαβίβαση με το να αυξάνουν την έκφραση της συνθετάσης της γλουταμίνης, που δρα ως πρόδρομο μόριο του γλουταμικού στα γλοιϊκά κύτταρα. Εφόσον η αναστολή της εισόδου του γλουταμικού οξέος στο μονοπάτι της γλουταμικής αφυδρογονάσης μπορεί να οδηγήσει στην είσοδο της στο μονοπάτι της συνθετάσης της γλουταμίνης, με αποτέλεσμα την μεταφορά της παραχθείσας γλουταμίνης στους νευρώνες, και άρα την ανανέωση των αποθηκών του γλουταμικού (Waniefski and Martin, 1986; Sonnewald et al., 1997), η ρύθμιση της hGDH2 από τα οιστρογόνα μπορεί να αποτελεί έναν διαφορετικό μηχανισμό με τον οποίο οι στεροειδείς ορμόνες αυξάνουν την παράγωγη γλουταμικού οξέος στο σύστημα.

Η μελέτη της προδιάθεσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης για την νόσο του Πάρκινσον επιβεβαίωσε πως ένας σπάνιος πολυμορφισμός (T1492G) στο γονίδιο της *GLUD2* επηρεάζει σημαντικά την ηλικία έναρξης της νόσου του Πάρκινσον. Συγκεκριμένα η μελέτη έδειξε πως οι άνδρες που φέρουν το G αλληλόμορφο εμφάνισαν την νόσο στην ηλικία των  $50.0 \pm 6.98$  χρονών, εν αντιθέσει με τους ασθενείς που έφεραν άλλους T1492G γονοτύπους, οι οποίοι εμφάνιζαν την νόσο στην ηλικία των  $64.62 \pm 10.2$  (N=281;  $P < 0.01$ ). Συνεπώς, στους ομόζυγους, για το G αλληλόμορφο, ασθενείς με Πάρκινσον η νόσος εκδηλώνεται νωρίτερα, κατά 8 με 13 χρόνια, από ότι σε ασθενείς με άλλους γονοτύπους. Τα γονοτυπικά αποτελέσματα της ερευνάς μας δείχνουν ότι η μη-συνώνυμη αλλαγή T1492G στο γονίδιο της *GLUD2* επιταχύνει την εμφάνιση της νόσου, εξαιτίας της νευροεκφύλισης που προκαλεί η παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Ala445-hGDH2, η οποία, σύμφωνα με παράλληλες έρευνες από άλλους ερευνητές στο εργαστήριο μας, παρουσιάζει αυξημένη βασική δραστηριότητα καθώς και θερμική σταθερότητα, υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό πως η αλλαγή αυτή αυξάνει την λειτουργικότητα του ενζύμου (gain of function ιδιότητες).

Εφόσον η αλλαγή της Ser445Ala στην hGDH2 έχει την ικανότητα να σταθεροποιεί της μικρή  $\alpha$ -έλικα της αντένας, όπως ακριβώς και η αλλαγή Ser445Leu στην hGDH1 (Smith et al., 2002), η σταθεροποίηση αυτή θα μπορούσε να ευνοεί την ανοιχτή διαμόρφωση του ενζύμου, και με αυτόν το τρόπο να εξισορροπεί την ιδιότητα της εξελικτικής αλλαγής Arg443Ser να εκμηδενίζει την βασική δραστηριότητα του ενζύμου. Με τον τρόπο αυτό, η μετάλλαξη Ser445Ala δείχνει να οδηγεί στην αλλαγή της συμπεριφοράς του ενζύμου (αύξηση της βασικής δραστηριότητας εν σχέση με την φυσιολογική *GLUD2*) συμβατή με τις gain of function ιδιότητες της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο μια υπέρ-ενεργή ισομορφή της γλουταμικής αφυδρογονάσης μπορεί να επηρεάσει την ηλικία έναρξης της νόσου του Πάρκινσον είναι άγνωστος, παρόλα αυτά η μεταβολικές συνέπειες μιας μετάλλαξης στο μόριο της hGDH2 μπορεί να είναι ανάλογες του HI/HA συνδρόμου, στο οποίο οι μεταλλάξεις της hGDH1 προκαλούν αύξηση της παράγωγης ATP, με ταυτόχρονη μείωση των ποσοτήτων γλουταμικού οξέος που εισέρχονται στον κύκλο της ουρίας, και αυξημένη οξειδωση του γλουταμικού οξέος. Είναι γνωστό πως η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι πάρα πολύ σημαντική σε περιπτώσεις έντονης διεγερτικότητας των συνάψεων (και άρα απελευθέρωσης γλουταμικού οξέος), καθώς επιτρέπει τον μεταβολισμό μεγαλύτερων ποσοτήτων αυτού του αμινοξέος. Δεδομένου πως, υπο παθολογικές συνθήκες (πχ μοντέλο τοξικότητας της ροτονίνης στην Πάρκινσον), η αυξημένη οξειδωση του γλουταμικού οξέος προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών ROS, είναι πιθανό η επιπλέον ενεργοποίηση της οξειδωσης του γλουταμικού από την Ala445-hGDH2, να επιταχύνει την νευροεκφυλιση που παρατηρείται στην νόσο, με το να επηρεάζει τον μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος.

Παρόλο που η υπόθεση της αυξημένης λειτουργικότητας του ενζύμου δεν μπορεί να εξηγήσει επαρκώς πως οι ετερόζυγες G/T γυναίκες ασθενείς δεν εμφανίζουν την νόσο στην ίδια, μικρότερη, ηλικία με τους ομόζυγους G άνδρες ασθενείς, απάντηση μπορεί να δοθεί από την επίδραση των στεροειδών ορμονών στο υπέρ-ενεργό Ser445Ala, όπου μελέτες μας έδειξαν πως τα οιστρογόνα κατεστειλαν την λειτουργία του υπερ-ενεργου Ser445Ala (σχετιζομενου με το χρωμοσωμα X) μεταλλάγματος πολύ περισσότερο από την αγρίου τύπου hGDH1. Επομένως, μπορεί να προταθεί πως τα οιστρογόνα στις γυναίκες δρουν προστατευτικά (γι αυτό και δεν μειώνεται η ηλικία

έναρξης της νόσου στις γυναίκες με T1492G γονότυπο), εφόσον έχουν την δυνατότητα να αναστέλλουν τις ιδιότητες της Ser445Ala πρωτεΐνης, με το να εμποδίζουν το ενζυμο να μεταβολίζει μεγάλες ποσότητες γλουταμικού οξέος και κατ' επέκταση να προκαλεί καταστροφή των νευρικών κυττάρων. Η άποψη αυτή ενισχύεται από άλλες μελέτες που δείχνουν πως οι γυναικείες ορμόνες προστατεύουν από την νόσο του Πάρκινσον (Morissette et al., 2008). Παρόλα αυτά, η πιθανότητα αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες των στεροειδών ορμονών στην νευροεκφύλιση, ως προς την ικανότητα τους να αποτρέπουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών, (κατά την διάρκεια της οξειδωσης του γλουταμικού οξέος) χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Εν κατακλείδι, η αποσαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν την δραστηριότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης, μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση του ρόλου των ορμονών στην κυτταρική βιολογία και συνεπώς να οδηγήσει στην δημιουργία νέων θεραπευτικών μεθόδων για τις νευροεκφυλιστικές νόσους.

## Βιβλιογραφία

Abe T, Ishiguro S, Saito H, Kiyosawa M, Tamai M. (1992) Partially deficient glutamate dehydrogenase activity and attenuated oscillatory potentials in patients with spinocerebellar degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33(2):447-52.

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

Albin R.L. et al. (1989), The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12, 366-375

Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G., Corasaniti, M.T. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol. Res.* 52(2), 119-132.

Aoki C., Milner T.A., Berger S.B., Sheu K.F., Blass J.P. and Pickel V.M. (1987) Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *Neurosci. Res.* 18, 305-318.

Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passarella, S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 497(1):1-5  
Lin, M.T. and Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795

Ba, F., Pang. P.K., Benishin, C.G. (2004). The role of Ca<sup>2+</sup> channel modulation in the neuroprotective actions of estrogen in beta-amyloid protein and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) cytotoxic models. *Neurochem. Int.* 45(1), 31-38.

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

Banerjee S., Schmidt T., Fang J., Stanley C. and Smith T. (2003) Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* 42, 3446-3456.

Bjarkam C.R. and Sorensen J.C. (2004), Therapeutic strategies for neurodegenerative disorders: emerging clues for Parkinson's disease. *Biol. Psychiatry* 56, 213-216

Burke R.E. (1999), Parkinson's disease. In *Cell death and diseases of the nervous system*. Ed. By Kolliatsos V.E. and Ratan R.R., Humana Press, pp. 459

Burki, F. and Kaessmann, H. (2004) Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet* 36:1061-1063

Chee P.Y, Dahl J.L, Fahien L.A. (1979) The purification and properties of rat brain glutamate dehydrogenase *J Neurochem.* 33(1):53-60.

Cho S.W, Yoon H.Y, Ahn J.Y, Lee E.Y, Lee J. (2001) Cassette mutagenesis of lysine 130 of human glutamate dehydrogenase. An essential residue in catalysis. *Eur J Biochem.* 268(11):3205-13

Ghous T., Townshend A. (1999) Flow injection determination of chlorpromazine by inhibition of glutamate dehydrogenase *Analytica chimica acta.* 387(1):47-51

Colen A.H, Prough R.A, Fisher H.F. (1972) The mechanism of glutamate dehydrogenase reaction. IV. Evidence for random and rapid binding of substrate and coenzyme in the burst phase. *J Biol Chem.* 247(24):7905-9.

Cooper A.J, Plum F. (1987). *Biochemistry and physiology of brain ammonia.* *Physiol Rev.* 67(2):440-519.

Cornish-Bowden, A. (1979) *Fundamentals of enzyme kinetics.* London: Butterworth. pp 147–176.

Couee I, Tipton K.F. (1990) The inhibition of glutamate dehydrogenase by some antipsychotic drugs. *Biochem Pharmacol.* 39(5) :827-32.

Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.* 130:1026S-1031S

Danbolt N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65(1):1-105. Review.

de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A. (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54: S21-S23

Deloukas P, Dauwerse J.G, Moschonas N.K, van Ommen G.J, van Loon A.P. (1993) Three human glutamate dehydrogenase genes (GLUD1, GLUDP2, and GLUDP3) are located on chromosome 10q, but are not closely physically linked. *Genomics*17(3):676-81.

Di Matteo G, Di Prisco G, Romeo G. (1976) Mitochondrial and nuclear glutamate dehydrogenases in Chinese hamster ovary cells in culture. *Biochim Biophys Acta.* 429(3):694-704.

Di Matteo G, Romeo G, di Prisco G. (1980). Effect of temperature on the stability and activity of crystalline ox liver nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys.* 200(1):55-60.

Di Prisco G, Casola L. (1975) Detection of structural differences between nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases by the use of immunoadsorbents. *Biochemistry.* 14(21):4679-83

Drucker-Colin R. and Verdugo-Diaz L. (2004), Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell and Mol. Neurobiol.* 24 (3), 301-316

Duvoisin R.C, Chokroverty S, Lepore F, Nicklas W. (1983) Glutamate dehydrogenase deficiency in patients with olivopontocerebellar atrophy. *Neurology.* 33(10):1322-6.

Duvoisin R.C, Nicklas W.J, Ritchie V, Sage J, Chokroverty S. (1988) Low leukocyte glutamate dehydrogenase activity does not correlate with a particular type of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 51(12):1508-11.

Elbaz, A., Grigoletto, F., Baldereschi, M., Breteler, M.M., Manubens-Bertran, J.M., Lopez-Pousa, S., Dartigues, J.F., Alperovitch, A., Tzourio, C., Rocca, W.A. (1999) Familial aggregation of Parkinson's disease: A population-based case-control study in Europe. EURO-PARKINSON Study Group. *Neurology* 52:1876

Fang J., Hsu B., MacMullen C., Poncz M., Smith T. and Stanley C. (2002) Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem. J.* 363, 81-87.

Fonnum F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.* 42(1):1-11

Fahien L.A, Wiggert B.O, Cohen P.P. (1965) effect of nucleotides and coenzymes on frog liver glutamate dehydrogenase *J Biol Chem.* 240:1091-5

Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R. (1975) Mini-Mental State: A practical method for grading the state of patients for the clinician, *J Psychiatr Res.*12(3):189-98

Fornai F, Schlüter O.M, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti C.L, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Südhof T.C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(9):3413-8

Frieden C. (1962) The unusual inhibition of glutamate dehydrogenase by guanosine di- and triphosphate. *Biochim Biophys Acta.* 59:484-6.

Frieden C. (1963) Glutamate dehydrogenase. IV. Studies on enzyme inactivation and coenzyme binding *J Biol Chem.* 238:146-54.

Frieden C. (1965) Glutamate Dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. *J Biol Chem.* 240:2028-35.

Gelb, D.J., Oliver, E. and Gilman, S. (1999) Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Arch Neurol* 56:33-39

George A, Bell J.E. (1980) Effects of adenosine 5'-diphosphate on bovine glutamate dehydrogenase: diethyl pyrocarbonate modification. *Biochemistry.* 19(26):6057-61.

- Godinot C, Gautheron D. (1971) Regulation of pig heart mitochondrial glutamate dehydrogenase by nucleotides and phosphate: Comparison with pig heart and beef liver purified enzymes. *FEBS Lett.* 13(4):235-240
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66(5), 1836-1844.
- Grandes P, Mateos J.M, Rüegg D, Kuhn R, Knöpfel T. (1994). Differential cellular localization of three splice variants of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor in rat cerebellum. *Neuroreport.* 5(17):2249-52.
- Green, P.S., Simpkins, J.W. (2000). Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18(4-5), 347-358.
- Griffith O.W, Meister A. (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(14):4668-72.
- Herrero M.T. et al. (2002), Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs. Nerv. Syst.* 18, 386-404
- Hoehn, M.M. and Yahr, M.D. (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427-424
- Hornby D.P, Aitchison M.J, Engel P.C. (1984) The kinetic mechanism of ox liver glutamate dehydrogenase in the presence of the allosteric effector ADP. The oxidative deamination of L-glutamate. *Biochem J.* 223(1):161-8.
- Hudson, R.C. and Daniel, R.M. (1993) L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp Biochem Physiol B.* 106(4):767-792.
- Hussain M.M., Zannis V.I. and Plaitakis A. (1989) Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J. Biol. Chem.* 264, 20730-20735.
- Ichise, M., Kim, Y.J., Ballinger, J.R., Vines, D., Erami, S.S., Tanaka, F., Lang, A.E. (1999) SPECT imaging of pre- and postsynaptic dopaminergic alterations in L-dopa-untreated PD. *Neurology* 52:1206-1214
- Julliard JH, Smith EL. (1979) Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme *J Biol Chem.* 254(9):3427-38.
- Iwasaki, Y., Ikeda, K., Shiojima, T. and Kinoshita, M. (1992) Increased plasma concentrations of aspartate, glutamate and glycine in Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 145:175-177



- Kallos J, Shaw K.P, (1971) Covalent attachment of diethylstilbestrol to glutamate dehydrogenase: implications for allosteric regulation. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 68:916-919
- Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Borompokas, N., Spanaki, C. and Plaitakis, A. (2007) Properties and molecular evolution of GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. *J Neurosc Res*. 85:1101-1109
- Kelly A. and Stanley C. (2001) Disorders of glutamate metabolism. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7, 287-295.
- Koberstein R, Sund H. (1973) Studies of glutamate dehydrogenase. The influence of ADP, GTP, and L-glutamate on the binding of the reduced coenzyme to beef-liver glutamate dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 36(2):545-52.
- Konagaya Y, Konagaya M, Takayanagi T. (1986) Glutamate dehydrogenase and its isozyme activity in olivopontocerebellar atrophy *J Neurol Sci* 74(2-3):231-6.
- Kordower J.H. (2003), In vivo gene delivery of glial cell line-neurotrophic factor for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 (suppl. 3), S120-S134
- Kuo N, Michalik M, Erecińska 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. (1994) *J Neurochem*. 63(2):751-7.
- Lee E.Y., Yoon H.Y., Ahn J.Y., Choi S.Y. Cho S.W. (2001) Identification of the GTP binding site of human glutamate dehydrogenase by cassette mutagenesis and photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 276, 47930-47936.
- Lee E.Y., Huh J.W., Yang S.J., Choi S.Y., Cho S.W. Choi H.J. (2003) Histidine 454 plays an important role in polymerization of human glutamate dehydrogenase. *FEBS Letters* 540, 163-166.
- Lee J, Lee JE, Cho E.H, Choi S.Y, Cho S.W. (2001) An essential histidine residue in GTP binding domain of bovine brain glutamate dehydrogenase isoproteins. *Mol Cells*. 12(1):121-6.
- Lee W.K, Shin S, Cho S.S, Park J.S. (1999) Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biochem*. 76(2):244-53
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL. (1998), Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N.E. J. Med.* 339 (16), 1105-1111
- Lin M.T, Beal M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443(7113):787-95
- Mavrothalassitis, G., Tzimagiorgis, G., Mitsialis, A., Zannis, V., Plaitakis, A., Papamatheakis, J., Moschonas, N. (1988) Isolation and characterization of cDNA

- clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 85:3494–3498.
- Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Bessa, M., Plaitakis, A. (2005). Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J. Neurosci. Res.* 79(1-2), 65-73.
- Martin D.L, Rinvall K. (1993) Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 60(2):395-407
- McEnery, M.W., Pedersen, P.L. (1986). Diethylstilbestrol. A novel F<sub>0</sub>-directed probe of the mitochondrial proton ATPase. *J. Biol. Chem.* 261(4), 1745-1752.
- McEnery, M.W., Hullihen, J., Pedersen, P.L. (1989). F<sub>0</sub> "proton channel" of rat liver mitochondria. Rapid purification of a functional complex and a study of its interaction with the unique probe diethylstilbestrol. *J. Biol. Chem.* 264(20), 12029-12036.
- McKenna, M.C. (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *J Neurosc Res.* 85:3347-3358
- Meister A, Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52:711-60
- Michaelidis T.M, Tzimagiorgis G, Moschonas N.K, Papamatheakis J. (1993) The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization. *Genomics.* 16(1):150-60.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney L.E, Irwin I, Langston J.W, Graybiel A.M. (1992). Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(9):3859-63.
- Morissette, M., Al Sweidi, S., Callier, S., Di Paolo, T. (2008). Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol. Cell Endocrinol.* 290(1-2), 60-69
- Norenberg M.D. (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 27(3):756-62
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., Greenamyre, J.T. (2005) Rotenone model for Parkinson disease. Multiple brain mitochondrial dysfunction after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem.* 280:42026-42035
- Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., Poncz, M. (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med.* 338(19):1352-1357

- Peterson P. E. and Smith T. J. (1999) The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure with Folding & Design* 7, 769-782.
- Pezzella A, d'Ischia M, Napolitano A, Misuraca G, Prota G. (1997). Iron-mediated generation of the neurotoxin 6-hydroxydopamine quinone by reaction of fatty acid hydroperoxides with dopamine: a possible contributory mechanism for neuronal degeneration in Parkinson's disease. *J Med Chem.* (14):2211-6.
- Plaitakis, A., Berl, S. and Yahr, M.D. (1982) Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216:193-196
- Plaitakis, A., Berl, S. and Yahr, M.D. (1984) Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann Neurol.* 15:144-153
- Plaitakis, A. and Shashidharan, P. (2000) Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol.* 247: II/25-II/35
- Plaitakis, A., Metaxari, M., Shashidharan, P. (2000) Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J Neurochem* 75:1862–1869.
- Plaitakis, A., Spanaki, C., Mastorodemos, V. and Zaganas, I. (2003) Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem Int.* 43:401-410
- Ropero, A.B., Alonso-Magdalena P., Ripoll C., Fuentes E., Nadal A. (2006). Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102(1-5), 163-169.
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2004) The predict protein server. *Nucleic Ac Res* (web server issue): W321-W326.
- Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. (1994) Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience.* 62(4):1133-46.
- Saha S.K, Fisher H.F. (1999) The location of active site opening and closing events in the prehydride transfer phase of the oxidative deamination reaction catalyzed by bovine liver glutamate dehydrogenase using a novel pH jump approach. *Biophys Acta.* 1431(1):261-5.
- Salganicoff L, DeRobertis E. (1965) subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and gamma-aminobutyric acid cycles in rat brain. *J neurochem.* 287-309.

Schmitt A. and Kugler P. (1999) Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 92, 293-308.

Shashidharan P., Michaelidis T. M., Robakis N. K., Kresovali A., Papamatheakis J. and Plaitakis A. (1994) Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J. Biol. Chem.* 269, 16971-16976.

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

Shastry B.S. (2001), Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci. Res.* 41, 5-12

Shemisa OA, Fahien LA. (1971) Modifications of glutamate dehydrogenase by various drugs which affect behaviour *Mol Pharmacol.* 7(1):8-25.

Silverstein E. (1974). Equilibrium kinetic study of bovine liver glutamate dehydrogenase at high pH. *Biochemistry.* 13(18):3750-4

Singh N, Maniscalco SJ, Fisher HF. (1993) The real-time resolution of proton-related transient-state steps in an enzymatic reaction. The early steps in the oxidative deamination reaction of bovine liver glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 268(1):21-8

Smith T. J., Peterson P. E., Schmidt T., Fang J. and Stanley C. A. (2001) Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J. Mol. Biol.* 307, 707-720.

Smith T. J., Schmidt T., Fang J., Wu J., Siuzdak G. and Stanley C. A. (2002) The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J. Mol. Biol.* 318, 765-777.

Smith, T.J., and Stanley, C.A. (2008). Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends Biochem. Sci.* 33(11), 557-564.

Sonnwald, U., Westergaard, N., Schousboe, A. (1997). Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 21(1), 56-63.

Spanaki, C. and Plaitakis, A. (2004) Bilineal transmission of Parkinson disease on Crete suggests a complex inheritance. *Neurology* 62:815-817

Stanley C. A., Lieu Y. K., Hsu B. Y. L., Burlina A. B., Greenberg C. R., Hopwood N. J., Perlman K., Rich B. H., Zammarchi E. and Poncz M. (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* 338, 1352-1357

- Stanley, C.A., Fang, J., Kutyna, K., Hsu, B.Y., Ming, J.E., Glaser, B., Poncz, M. (2000) Molecular basis and characterization of the Hyperinsulinism/Hyperammonemia syndrome: Predominance of mutations in exons 11 and 12 of the glutamate dehydrogenase gene. *Diabetes* 49:667-673
- Stanley, C.A. (2004) Hyperinsulinism/Hyperammonemias syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism. *Mol Gen Metab.* 81:S45-S51
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., Hu, Z., Zhu, Z., Ma, H., Pan, Q., Xia, J.H., Xia, K., Zhang, Z. (2006). Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 15:1816-1825
- Stillman TJ, Baker PJ, Britton KL, Rice DW. (1993) Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis. *J Mol Biol.* 234(4):1131-9.
- Talal N, Tomkins GM. (1964). allosteric properties of glutamate dehydrogenases from different sources. *Science.* 146:1309-11.
- Tamir A, Rigbi M, Levitzki A. (1981) The interaction of chlorpromazine and butyrophenones with glutamate dehydrogenase. *Biochem Pharmacol.* 30(12):1469-73
- van den Berg CJ, Garfinkel D. (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J.* 123(2):211-8.
- Waniewski, R. and Martin, D., (1986). Exogenous glutamate is metabolised to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 47, 304–313
- Warren, J. C., Carr, D. O. and Grisolia S. (1964) Effect of cofactors, oestrogens and magnesium ions on the activity and stability of human glutamate dehydrogenase. *Biochem J.* 93(2): 409–419.
- Weil-Malherbe H, Gordon J. (1971). Amino acid metabolism and ammonia formation in brain slices. *J Neurochem.* 18(9):1659-72
- Yang SJ, Huh JW, Lee JE, Choi SY, Kim TU, Cho SW. (2003). Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. *Cell Mol Life Sci.* 60(11):2538-46.
- Yielding, K.L., Tomkins, G.M., (1960). Structural alterations in crystalline glutamic dehydrogenase induced by steroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46(11), 1483-1488.
- Yoon HY, Hwang SH, Lee EY, Kim TU, Cho EH, Cho SW. (2001) Effects of ADP on different inhibitory properties of brain glutamate dehydrogenase isoproteins by perphenazine. *Biochimie.* 83(9):907-13

Yudkoff M, Nissim I, Nelson D, Lin ZP, Erecińska M. (1991) Glutamate dehydrogenase reaction as a source of glutamic acid in synaptosomes. *J Neurochem.* 57(1):153-60.

Zaganas I., Waagepetersen H., Georgopoulos P., Sonnewald U., Plaitakis A. and Schousboe A. (2001) Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* 66, 909-913.

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

Zaganas, I., Plaitakis, A. (2002). Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behavior of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 277(29), 26422-26428.

Zaganas, I., Spanaki, C., Karpusas, M., Plaitakis, A. (2002). Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. *J. Biol. Chem.* 277(48), 46552-46558.

Zheng, J., Ramirez, V.D. (1999). Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase activity by estrogens: comparison with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of porcine cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 368(1), 95-102

Zheng, J., Ramirez, V.D. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* 130(5), 1115-1123.

**Δημοσιεύσεις που σχετίζονται με την παρούσα διδακτορική διατριβή:**

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) 109:167-73

\*equal contributors

**Borompokas N**, Papachatzaki MM, Kanavouras K, Mastorodemos V, Plaitakis A. *Estrogen Modification of Human Glutamate Dehydrogenases is Linked to Enzyme Activation State (under Review)*

Kanavouras K, Mastorodemos V, **Borompokas N**, Spanaki C, Plaitakis A. *Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase*. J Neurosci Res. (2007) 85:3398-406.

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*