

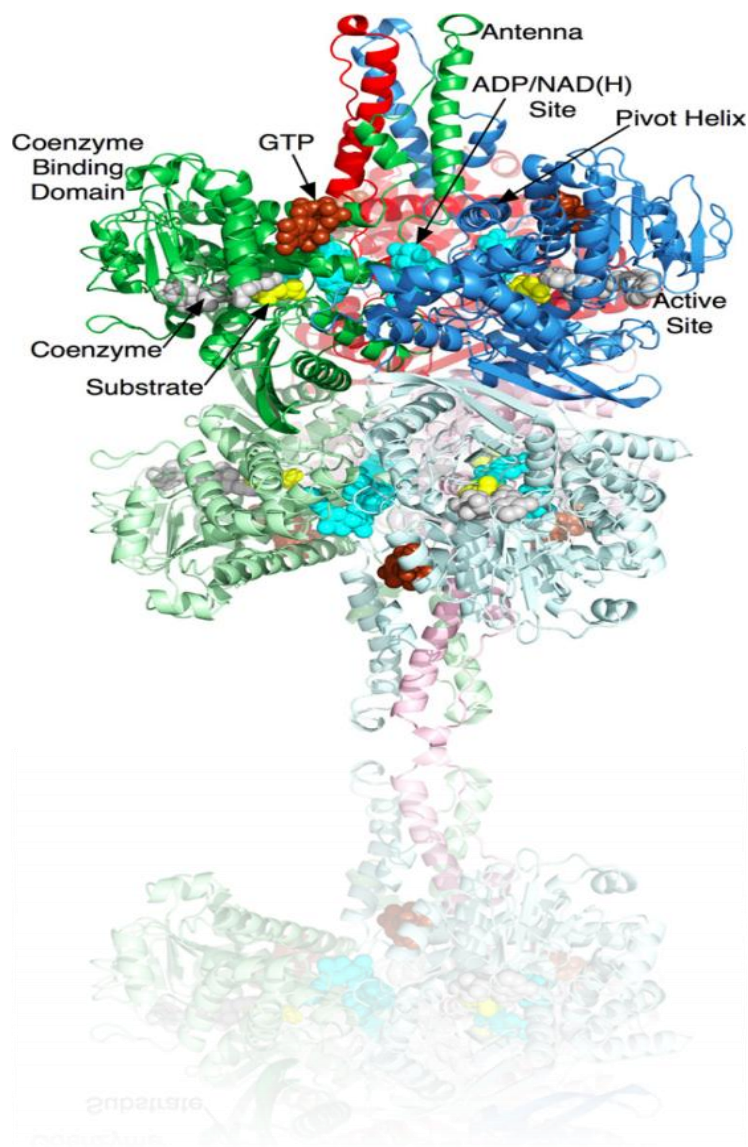


«Μελέτη για την ανίχνευση των θέσεων πρόσδεσης της L-λευκίνης στην ανθρώπινη Γλουταμική Αφυδρογονάση (hGDH)»

Μεταπτυχιακή Εργασία

Αριάνογλου Ιωάννα

Υπεύθυνος καθηγητής: Πλαϊτακης Ανδρέας



Ηράκλειο, Μάρτιος 2011

Η εκπόνηση της μεταπτυχιακής εργασίας έγινε στο:
Εργαστήριο Νευρομεταβολικών Νοσημάτων,
Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Υπεύθυνος καθηγητής:
Πλαϊτάκης Ανδρέας Καθ. Νευρολογίας

Τριμελής επιτροπή:
Πλαϊτάκης Ανδρέας Καθ. Νευρολογίας
Καρδάσης Δημήτριος, Αναπλ. Καθηγητής Βιοχημείας
Σπανάκη Κλεάνθη, Λέκτορας Νευρολογίας

**We play a game of cards with the nature of the paradox.
In a battle to determine what is possible and what is not.**

One solution, for our delusions.

It is so hard to see beyond the small things that we believe.

**The well of thoughts is never dry.
Just use a bucket and ideas will come out.**

**Bookshelves are full with works that have been proven wrong
Things that once were heresies have turned to be the rules.**

One solution, for our delusions

It is so hard to see beyond the small things that we believe.

The well of thoughts is never dry, and we are so thirsty.

Science, everlasting science.

**A magical alliance of reason and
result.**

Septic Flesh

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Αντί ευχαριστιών	5
Περίληψη	8
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης	11
2. Οι δύο ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης	13
3. Η GDH στον κυτταρικό μεταβολισμό	14
4. Η GDH στο ΚΝΣ	14
5. Δομή και αλλοστερική ρύθμιση της GDH των θηλαστικών	17
II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	25
1. Έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα Sf21	25
2. Ενζυμικές δοκιμασίες και κινητικές μελέτες	26
(α) Ενεργοποίηση από ADP	26
(β) Ενεργοποίηση από L-λευκίνη	27
(γ) Δομικές μελέτες πρωτεϊνών και στατιστική ανάλυση	27
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
1. Οι φυσιολογικές hGDH ₁ και hGDH ₂ έχουν διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης από την L-λευκίνη	29
2. Οι μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη	30
3. Η L-λευκίνη ενεργοποιεί το hGDH ₁ -Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala (TM) παρόμοια με το hGDH ₂	32
4. Το ADP αναστρέφει το φαινότυπο των μεταλλάξεων που ελαττώνουν την ενεργοποίηση από L-λευκίνη (Glu34Lys και Asp142Glu), ενώ μειώνει την ποσότητα L-λευκίνης που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου	33
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
V. Βιβλιογραφία	43

Αντί ευχαριστιών

Περίπου πριν από 23 εκατομμύρια χρόνια, ένα ωραίο και δροσερό πρωινό, ζύπνησε το ένζυμο GDH1.1 λίγο περίεργα. Άνοιξε και τα 6 ζευγάρια μάτια του και κούνησε τις πολλές του αλυσίδες και ανακάθισε μέσα στην πτυχή της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Δεν είχε κοιμηθεί καλά όπως και τις περισσότερες από τις τελευταίες μέρες. Βαριαναστέναζε και δυσανασχετούσε. Κουνούσε πέρα δώθε την κεραία του και ανοιγόκλεινε το μεγάλο του στόμα μα κάτι δεν πήγαινε καλά. Ένιωθε μια περίεργη πίεση πάνω του, σαν κάτι να το ενοχλούσε, μα δεν ήξερε τι. Δεν είχε πολύ καιρό που είχε φτάσει εκεί μετά από το ταξίδι που είχε κάνει στο κεντρικό εργοστάσιο με τον πυρηνικό φάκελο για την αναβάθμισή του. Είχε γυρίσει καινούριο και αναζωογονημένο καθώς η νέα έκδοσή του ήταν σαφώς πιο light αφού η μαμά του είχε ξεφορτωθεί τόνους άχρηστου γενετικού υλικού και είχε κρατήσει μόνο το 'εκλεκτό'. Παρόλα αυτά, ένιωθε πως δεν μπορούσε να λειτουργήσει σωστά.

-Μάλλον θα πρέπει να ξαναεπισκεφτώ το εργοστάσιο σύντομα, σκέφτηκε μεγαλόφωνα. Αυτή η πίεση με έχει πεθάνει και νιώθω πως μερικά αμινοξέα πάνω μου δε δουλεύουν σωστά. Και επιτέλους θέλω ένα βράδυ να κοιμηθώ σωστά!!!

Λίγο πιο δίπλα κοιμόταν ανέμελο ένα άλλο ένζυμο που ο μονόλογος του GDH1.1 το ζύπνησε.

-Μα τι έπαθες πρωί πρωί;

Η βαριά, σοφή φωνή του GDH1.0 διέκοψε την ονειροπόληση του GDH1.1. Αναρωτήθηκε πως γίνεται αυτό να βιώνει όλη αυτή την πίεση ενώ μόλις τώρα αναβαθμίστηκε και αυτό το γέρικο ένζυμο με τη σοφή φωνή να είναι τόσο πράο και γαλήνιο ενώ είναι για εκατομμύρια χρόνια τώρα το ίδιο και κάνει την ίδια ακριβώς δουλειά. Η τελευταία φορά που αναβαθμίστηκε αυτό το μοντέλο πρέπει να ήταν στα αρχαία χρόνια, λίγο αφού είχε γίνει η μεγάλη κάθοδος στα μιτοχόνδρια. Κι όμως αυτό συνέχιζε να δουλεύει μια χαρά. Και κοιμάται ήρεμο τα βράδια!! Το GDH1.1 ζήτησε συγγνώμη από το γέρικο ένζυμο και συνέχισε να επεξεργάζεται τις σκέψεις του από μέσα του αυτή τη φορά. Έπρεπε να ενημερώσει το εργοστάσιο πως κάτι δεν πήγαινε καλά εκεί κάτω και πως έπρεπε να κλείσουν ένα ραντεβού για επίσκεψη. Θα έστελνε ένα μήνυμα αργότερα με τους καταρράκτες καθοδικής ροής. Προς το παρόν έπρεπε να δουλέψει. Σήμερα μαζί με το ADP ερχόταν και η λευκίνη όπως διέκρινε από μακριά. Θα είχαν αρκετή παραγωγή σήμερα...

Κράταγε στα χέρια του την απάντηση από το εργοστάσιο. «Η έκδοσή σας πρέπει να διορθωθεί ΑΜΕΣΑ. Απειλείστε με εξαφάνιση.» Δεν του άφηναν περιθώρια, έπρεπε να ταξιδέψει ξανά και γρήγορα. Το GDH1.1 σήκωσε τα μάτια του που με το ζόρι συγκρατούσαν τα δάκρυα θυμού και αντίκρισε το γέρικο GDH1.0 απέναντί του. Ήθελε να του φωνάξει, να το κατηγορήσει πως αυτό και η ηλίθια ευασθησία του στη θερμότητα φταίνε που χρειαζόταν επιδιόρθωση, μα δεν μπορούσε να σχηματίσει ούτε μία λέξη. Το γέρικο GDH1.0 το κοίταζε τόσο αθώα και συμπονετικά.

-Περνάς δύσκολα, μα δεν πρέπει να απογοητεύεσαι. Πρέπει πάντα να θυμάσαι πως όλα γίνονται για καλό μας. Το εργοστάσιο πάντα φροντίζει για εμάς και δε μας αφήνει ούτε να κάνουμε παραπάνω από όσα μπορούμε, ούτε να εξαφανιστούμε. Πριν από πολλά χρόνια μας ανάγκασε να φοράμε τις κεραίες μας. Στην αρχή ήταν δύσκολα για εμάς, μα θα ήταν ακόμα πιο δύσκολο αν δεν τις είχαμε. Αργότερα, όταν κουραστήκαμε και οι καινούριες συνθήκες μας δυσκόλεψαν, το εργοστάσιο έστειλε εσάς. Είστε νέοι, αναβαθμισμένοι και light έκδοση. Μπορείτε να φτάσετε πολύ πιο πάνω από μας. Αρκεί να μάθετε να ελίσσετε...

Το GDH1.0 σταμάτησε να μιλάει γιατί μία λευκίνη του άνοιγε το στόμα για να βλέπει καλύτερα το γλουταμικό που καθόταν εκεί μέσα. Το GDH1.1 έβλεπε το γέρικο ένζυμο και ήξερε πως είχε δίκιο. Θα ήταν μακρύ το ταξίδι αλλά στο τέλος θα γινόταν κι αυτό σοφό...

Από εκείνο το πρωινό πέρασε πολύς καιρός. Έγιναν πόλεμοι, καινούριες μετακινήσεις, το GDH1.1 κόντεψε αρκετές φορές να εξαφανιστεί μέσα στις καινούριες συνθήκες και εξαιτίας κακών δοκιμών του εργαστηρίου. Αναβαθμίστηκε πολλές φορές, ίσαμε 15 θαρρώ. Και μια μέρα γύρισε από το εργοστάσιο εντελώς καινούριο.

Γυαλίζουν οι αλυσίδες του και τα 6 ζευγάρια μάτια του. Περπατά καμαρωτό και οι κεραίες του τρεμοπαίζουν. Τα 6 στόματά του δε σταματούν να δουλεύουν. Η λευκίνη μαζί με το ADP δε σταματούν να βγάζουν προϊόντα. Το GTP κοιτάζει θλιμμένο, ανήμπορο να σταματήσει αυτόν τον καταγισμό δουλειάς που βλέπει να συμβαίνει ασταμάτητα. Αυτή η έκδοση είναι ασυγκράτητη. Παρόλο που φάνηκε πως δε θα επιζήσει εύκολα, αυτό το ένζυμο έχει μπει δυναμικά σε αυτό το νέο είδος που αρχίζει να αναπτύσσεται σιγά σιγά, τους ανθρώπους. Μα τι έκδοση είναι αυτή.... Λες και εξελίχθηκε να είναι έξυπνο...

-Σταμάτησαν οι αναβαθμίσεις!!! Τέλος πια στις νέες εκδόσεις! Το εργοστάσιο αποφάσισε πως ήρθε πια η ώρα να αναλάβουμε δράση σαν ώριμα και φερέγγυα ένζυμα! Είμαστε πια τα GDH2.0!!! Και θα κατακτήσουμε τον κόσμο! Θα τους κάνουμε όλους να μιλάνε για εμάς!

Αυτή η εργασία δεν ήταν τίποτα άλλο παρά μια προσπάθεια να κατανοήσουμε έναν από τους λόγους που έκανε το hGDH2 τόσο διαφορετικό λειτουργικά από το hGDH1. Άπειρες ώρες ορθοστασίας μπροστά από το φωτόμετρο μετρώντας ενεργοποίηση, άλλες τόσες μπροστά από μια οθόνη υπολογιστή να γράφεις τα νουμεράκια και να προσπαθείς να τα κάνεις ωραίες καμπύλες, η εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας δεν ήταν εύκολη υπόθεση. Ευχαριστώ όλους τους υπεύθυνους του μεταπτυχιακού για τα 2 χρόνια γνώσεων, ευχαριστώ την κ.Θερμού η οποία πίστεψε σε μένα και μου έδωσε μια καταπληκτική ευκαιρία, ευχαριστώ όλους στο εργαστήριο στη Στοκχόλμη, ευχαριστώ τον κ.Πλαϊτάκη που σαν καθηγητής και καθοδηγητής μου τόσα χρόνια μου έδειξε όλα αυτά που έπρεπε να ξέρω για τη γλουταμική αφυδρογονάση. Τα μεγάλα ευχαριστώ τα αξίζουν όλοι αυτοί που ήταν δίπλα μου όταν τα πόδια μου δεν άντεχαν άλλο φωτόμετρο, όταν τα μάτια μου δεν άντεχαν άλλο Excel, όταν το μυαλό μου αδυνατούσε να συλλάβει ακόμα μια καμπύλη στο Origin, όταν τα κυτταράκια που με τόση αγάπη φρόντιζα, γέμιζαν μούχλες και αυτοκτονούσαν μέσα σε καταρράκτες χλωρίνης. Η Παυλίνα, η Λένα, η Ράνια, ο Κωστής, η Ρένα, ο Γιάννης, η Ελένη, ο Βαγγέλης. Ο Γιάννης που από μακριά άκουγε καρτερικά κάθε μου παράπονο και μου έδινε κουράγιο και που χωρίς αυτόν το ταξίδι θα ήταν δύσκολο. Η μαμά μου και ο μπαμπάς μου που εκτός από υποστηρικτές μου ήταν και οι μεγάλοι χορηγοί.

Μαμά, μπαμπά, τελείωσα!!!

Περίληψη

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία, χρησιμοποιώντας ως συνένζυμα NAD^+ ή/και NADP^+ (Smith *et al.*, 1975). Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο ισομορφές, η hGDH1 και η hGDH2 που κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *GLUD1* και *GLUD2*. Η GDH των θηλαστικών είναι ένα ομοεξαμερές με κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος ~56kDa και να αποτελείται από 505 αμινοξέα. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις βασικές περιοχές α) την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος στο αμινοτελικό άκρο, β) την περιοχή πρόσδεσης του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD^+) ή του φωσφορικού-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADP^+) και γ) τη ρυθμιστική περιοχή η οποία περιλαμβάνει την antenna και την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix). Στα θηλαστικά, η ενζυμική δραστηριότητα της GDH υπόκειται σε στενή ρύθμιση και αυτό είναι σημαντικό χαρακτηριστικό που τη διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες γλουταμικές αφυδρογονάσες των κατώτερων εξελικτικά οργανισμών. Η ρύθμιση αυτή γίνεται μέσω αλλοστερικών τροποποιητών. Συγκεκριμένα, το ADP ενεργοποιεί το ένζυμο, διευκολύνοντας την απελευθέρωση των προϊόντων της αντίδρασης. Η L-λευκίνη είναι επίσης γνωστός ενεργοποιητής της GDH των θηλαστικών. Προσδεδεμένη σε διαφορετικό σημείο από το ADP ενεργοποιεί το ένζυμο ανεξάρτητα αυτού (Fang *et al.*, 2002) αλλά με τρόπο συνεργιστικό (Plaitakis *et al.*, 2000). Το GTP αντίθετα, που ενισχύει την πρόσδεση του υποστρώματος, δρα σαν αλλοστερικός αναστολέας (George and Bell, 1980). Τα δύο ανθρώπινα ισοένζυμα, hGDH1 και hGDH2, στην ώριμη μορφή τους διαφέρουν μόνο σε 15 από τα 505 αμινοξέα τους. Παρόλα αυτά διαφέρουν σημαντικά ως προς την θερμοσταθερότητά τους, τη βασική τους δραστηριότητα (σε απουσία ενεργοποιητών) και την αλλοστερική ρύθμισή τους από ενεργοποιητές (ADP, L-λευκίνη) και αναστολείς (GTP, οιστρογόνα). Η hGDH1 έχει βασική δραστηριότητα 35- 40% της μέγιστης, ενώ η hGDH2 έχει ~5-8% βασική δραστηριότητα, παραμένοντας όμως ευαίσθητη στην ενεργοποίηση από ADP και/ή L-λευκίνη (Shashidharan *et al.*, 1997).

Στο εργαστήριό μας έχουν εντοπιστεί με στοχευμένη μεταλλαξιογένεση τα αμινοξέα που ευθύνονται για τις κυριότερες από τις λειτουργικές διαφορές των δύο ισοενζύμων (Zaganas and Plaitakis, 2002, Zaganas *et al.*, 2002). Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η αλλαγή Gly456Ala καθιστά τη hGDH1 ανθεκτική στην αναστολή από GTP (Zaganas and Plaitakis, 2002), ενώ καταργεί τη συνεργατικότητα αυτής της αναστολής. Η αμινοξική αντικατάσταση Arg443Ser μειώνει σημαντικά την βασική δραστηριότητα της hGDH1, επιτρέποντας ωστόσο την ενεργοποίηση από ADP και L-λευκίνη (Zaganas *et al.*, 2002). Ο συνδυασμός των μεταλλάξεων Arg443Ser και Gly456Ala στη hGDH1 αναπαράγει σε μεγάλο βαθμό τις κυριότερες ιδιότητες (βασική δραστηριότητα, αλλοστερική ενεργοποίηση από ADP και αναστολή από GTP) της hGDH2 (Kanavouras *et al.*, 2007). Η αντικατάσταση της Arg443 από Ser

στη hGDH1 σχεδόν καταργεί την ευαισθησία του ενζύμου στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη (1-10mM) σε απουσία άλλων ενεργοποιητών, πιθανότατα επειδή διατηρεί το ένζυμο σε κλειστή διαμόρφωση και έτσι εμποδίζει την L-λευκίνη να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο. Όταν προστίθεται ADP (0.025-0.1mM), η L-λευκίνη ενεργοποιεί το Arg443Ser hGDH1 ένζυμο >2000% (Zaganas *et al.*, 2002). Ομοίως, οι μεταλλάξεις Lys450Glu και His454Tyr της pinot helix της hGDH2 μειώνουν την βασική δραστηριότητα (κλείνοντας το ενεργό κέντρο) και την δυνατότητα ενεργοποίησης από L-λευκίνη (Kanavouras *et al.*, 2009). Φαίνεται πως όταν το ανθρώπινο ένζυμο ευρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση, η L-λευκίνη δεν ασκεί την ενεργοποιητική της δράση επειδή δεν μπορεί να εισέλθει στην καταλυτική σχισμή (Kanavouras *et al.*, 2009). Επίσης, το εύρημα ότι η απαλοιφή της αντένας της hGDH1 ή η αντικατάστασή της με εκείνη των βακτηρίων (που δεν ρυθμίζεται αλλοστερικά όπως η GDH των θηλαστικών) διατηρεί την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, αλλά όχι την ρύθμιση από ADP και GTP (Allen *et al.*, 2004), συμφωνεί με αυτό το μοντέλο.

Το αντικείμενο της ερευνητικής αυτής μελέτης ήταν η διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης των δύο ανθρώπινων ισοενζύμων από τη L-λευκίνη. Αναζητήθηκαν οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης αυτής μέσω λειτουργικών μελετών. Μελετήθηκε μία σειρά από μεταλλάξεις στα cDNA *GLUD1* στα σημεία που διαφέρουν οι δύο ισομορφές, καθώς επίσης και τα δύο ισοένζυμα hGDH1 και hGDH2. Με αυτό τον τρόπο χαρτογραφήσαμε την επίδραση διάφορων μεταλλάξεων των δύο ισοενζύμων πάνω στη ενεργοποίηση από L-λευκίνη. Ευελπιστώντας να αποσαφηνίσουμε καλύτερα τόσο την περιοχή πρόσδεσης στο ένζυμο όσο και τον μηχανισμό δράσης της, τα αποτελέσματα που πήραμε δείχνουν πως το πρότυπο ενεργοποίησης από τη L-λευκίνη διαφέρει σημαντικά στις δύο ισομορφές. Η hGDH1 έχει υψηλότερη βασική δραστηριότητα και σε απουσία ADP ενεργοποιείται από τη L-λευκίνη σε ποσοστό ~20%, σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το ποσοστό ενεργοποίησης της hGDH2 η οποία από μια βασική δραστηριότητα ~10% έχει ένα ποσοστό ενεργοποίησης ~60%. Η περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού φαίνεται να περιέχει τις μεταλλαγές εκείνες που επηρεάζουν το πρότυπο αυτό. Η Ser174Asn (μεταλλαγή ακριβώς στην είσοδο του ενεργού κέντρου, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη βασική δραστηριότητα) σε συνδυασμό με τη Arg443Ser, φαίνεται να είναι οι δύο κυριότερες μεταλλαγές που ευθύνονται για το πρότυπο ενεργοποίησης της hGDH2.

Με τα υπάρχοντα δεδομένα δεν είμαστε σε θέση να πούμε με βεβαιότητα την ακριβή θέση πρόσδεσης του αλλοστερικού αυτού τροποποιητή. Κινητικές μελέτες με την προσθήκη ADP, επιβεβαιώνουν τη συνεργατικότητα των δύο τροποποιητών και άρα την ύπαρξη ενός δεύτερου σημείου πρόσδεσης της L-λευκίνης, το οποίο πιθανώς να βρίσκεται στην ευρύτερη περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο. Για την εύρεση όμως της ακριβούς θέσης πρόσδεσης αυτής, απαιτούνται περισσότερες μελέτες, τόσο με μεταλλαξιγένεση στη συγκεκριμένη περιοχή, όσο και με κρυσταλλογραφικές αναλύσεις.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες καταλύουν την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία, χρησιμοποιώντας ως συνένζυμα είτε NAD^+ , είτε NADP^+ ενώ υπάρχουν περιπτώσεις όπου έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν και τα δύο (Smith et al. 1975).



Πρόκειται για μία πολύ σημαντική αντίδραση καθώς συνδέει το μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτόν των υδατανθράκων, μέσω το α-κετογλουταρικού, το οποίο είναι σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλος του Crebs), ενώ οι γλουταμικές αφυδρογονάσες γενικότερα έχουν καίριες θέσεις στο μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου συμμετέχοντας άμεσα στον κυτταρικό μεταβολισμό, την ομοιόσταση της ενέργειας αλλά και τον κύκλο της ουρίας (Hudson and Daniel, 1993). Η σπουδαιότητα του ενζύμου άλλωστε αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι γλουταμικές αφυδρογονάσες απαντώνται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς με ελάχιστες εξαιρέσεις (Hudson and Daniel, 1993).

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη χρήση NAD^+ και NADP^+ ως συνένζυμα. Έτσι, διακρίνουμε 3 τύπους GDH:

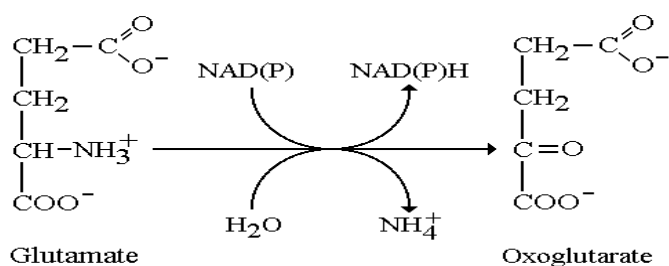
- Ειδικές για το NADH
- Ειδικές για το NADPH
- Διπλής ειδικότητας

Σε μικροοργανισμούς απαντώνται συνήθως GDH των δύο πρώτων τύπων, ειδικά για το NADH ένζυμα καταλύουν την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού (καταβολική οδός) ενώ ειδικά για το NADPH ένζυμα καταλύουν την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού προς σχηματισμό του L-γλουταμικού

(βιοσυνθετικός ρόλος). Σε ανώτερους οργανισμούς και κυρίως σε ζωικά κύτταρα, απαντώνται GDH της τρίτης κατηγορίας, διπλής ειδικότητας ενζυμα δηλαδή, τα οποία έχουν την τάση να χρησιμοποιούν NADH για την οξειδωτική αμίνωση και NADPH για την αναγωγική αμίνωση, με ορισμένες πιθανές εξαιρέσεις από αυτόν τον γενικό κανόνα κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας των ζωικών κυττάρων αλλά και των ίδιων των ενζύμων.

Στα θηλαστικά, η ενζυμική δραστηριότητα της GDH υπόκειται σε στενή ρύθμιση και αυτό είναι σημαντικό χαρακτηριστικό που τη διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες γλουταμικές αφυδρογονάσες των κατώτερων εξελικτικά οργανισμών. Θερμοδυναμικά, στην αντίδραση της GDH ευνοείται η αναγωγική αμίνωση δηλαδή η κατεύθυνση τη σύνθεσης του γλουταμικού. Όμως στα θηλαστικά, η κατεύθυνση της αντίδρασης *in vivo* πιστεύεται ότι είναι στενά ρυθμιζόμενη και εξαρτάται από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, την ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση των συνενζύμων αλλά και την τοπική συγκέντρωση των υποστρωμάτων όπως η αμμωνία και το γλουταμικό ιδιαίτερα σε σχέση με την παρουσία ή όχι αλλοστερικών τροποποιητών (π.χ. πουρινικών νουκλεοτιδίων). Ποσοτικά καταλαμβάνει ένα πολύ μεγάλο μέρος της συνολικής πρωτεΐνης των κυττάρων με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί, το πάγκρεας και ο εγκέφαλος. Τέλος, εξαιτίας της σημαντικής ιδιότητας του γλουταμικού ως ένας από τους κύριους νευροδιαβιβαστές, η GDH φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο και στο ΚΝΣ των θηλαστικών.

Διαταραχές στη λειτουργία αλλά και στη δομή του ενζύμου αυτού σχετίζονται με την παθογένεση ανθρώπινων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Διαταραχές στην αλλοστερική ρύθμιση της ανθρώπινης GDH έχουν σοβαρές κλινικές επιπτώσεις, οι οποίες αποτελούν την αιτία του συνδρόμου υπερινσουλιτισμού/υπεραμμωναιμίας.



Εικ.1: Η αντίδραση της γλουταμικής αφυδρογονάσης

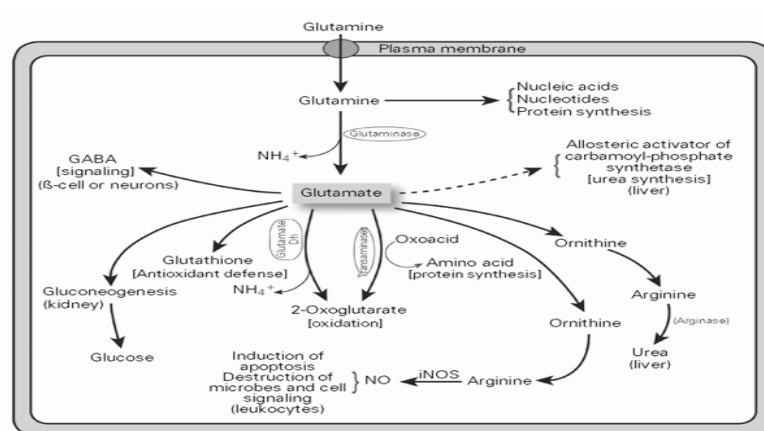
2. Οι δύο ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης

Η γλουταμική αφυδρογονάση εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών, με υψηλότερα επίπεδα στο ήπαρ. Οι Smith et al. το 1975 έδειξαν εντοπισμό του ενζύμου αυτού σε υψηλά επίπεδα και στον εγκέφαλο, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στο έντερο, στον σπλήνα, στους λεμφαδένες και στην καρδιά. Το 1979 οι Chee et al. έδειξαν πολύ υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της GDH στον εγκέφαλο αρουραίου η οποία όμως διέφερε σημαντικά ως προς τις κινητικές ιδιότητες από την ηπατική GDH. Αυτό ήταν και το έναυσμα για την έναρξη διαφόρων πειραματικών διαδικασιών (Colon et al., 1986, Mavrothalassitis et al., 1988, Tzimagiorgis and Moschonas, 1991, Hussain et al., 1989, Michaelidis et al., 1993) που είχαν σα σκοπό τη διερεύνηση του παραπάνω γεγονότος. Οι τελευταίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα πως υπάρχει μια οικογένεια GDH πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από περισσότερα του ενός γονίδια. Με βάση αυτά, οι Shashidharan et al. το 1994 ανίχνευσαν σε βιβλιοθήκη φάγων από ανθρώπινο αμφιβληστροειδή και όρχεις, ένα c-DNA που κωδικοποιούνταν από ένα χωρίς ιντρόνια γονίδιο του X χρωμοσώματος. Ονόμασαν το γονίδιο αυτό *GLUD2* και μετά από πειραματική διαδικασία απέδειξαν ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται μόνο σε ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, όρχεις και σε μικρότερο βαθμό στον εγκέφαλο και εμφάνιζε διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ιδιότητες από τη *GLUD1*. Αυτή η δεύτερη ισομορφή της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι χαρακτηριστική των ανώτερων πρωτεύοντων (Burki and Kaessmann, 2004). Η δύο πρωτεΐνες διαφέρουν στην ώριμη μορφή τους μόνο σε 15 από τα 505 αμινοξέα τους, οι οποίες όμως είναι αρκετές για να προσδώσουν στα δύο αυτά ισοένζυμα σημαντικές διαφορές στις βασικές τους λειτουργίες, στην αλλοστερική τους ρύθμιση, στις κινητικές τους ιδιότητες και στην ανθεκτικότητα στη θερμότητα (Shashidharan et al., 1997, Plaitakis et al., 2000, Plaitakis and Zaganas, 2001).



3. Η GDH στον κυτταρικό μεταβολισμό

Το γλουταμικό είναι ένα αμινοξύ με πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αζώτου και συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις (Kelly and Stanley, 2001), για αυτό και ο ρόλος της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον κυτταρικό μεταβολισμό είναι πάρα πολύ σημαντικός καθώς είναι ένα από τα κυριότερα ένζυμα που μεταβολίζουν αυτό. Ο μεταβολισμός αυτός συνδέεται με αντιδράσεις αμινοτρανσφερασών, τη σύνθεση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, την ομοιόσταση της ουρίας και τον κύκλο της ουρίας, την ομοιόσταση της ινσουλίνης, τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος του Crebs), τη σύνθεση του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό (GABA) και της γλουταθειόνης αλλά και την ενεργειακή ομοιόσταση. Τη μεγίστης σημασίας σπουδαιότητα του ενζύμου αυτού καταδεικνύει άλλωστε και η έκφρασή του σε όλους τους ιστούς (hGDH1) αλλά και το γεγονός ότι σε ορισμένα κύτταρα αποτελεί μέχρι και το 10% της συνολικής πρωτεΐνης του στρώματος των μιτοχονδρίων.



Εικ.2: Ο ρόλος του γλουταμικού στον κυτταρικό μεταβολισμό. Όπως φαίνεται από το σχήμα, το γλουταμικό συμμετέχει σε πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια μέσα στα κύτταρα.

4. Η GDH στο ΚΝΣ

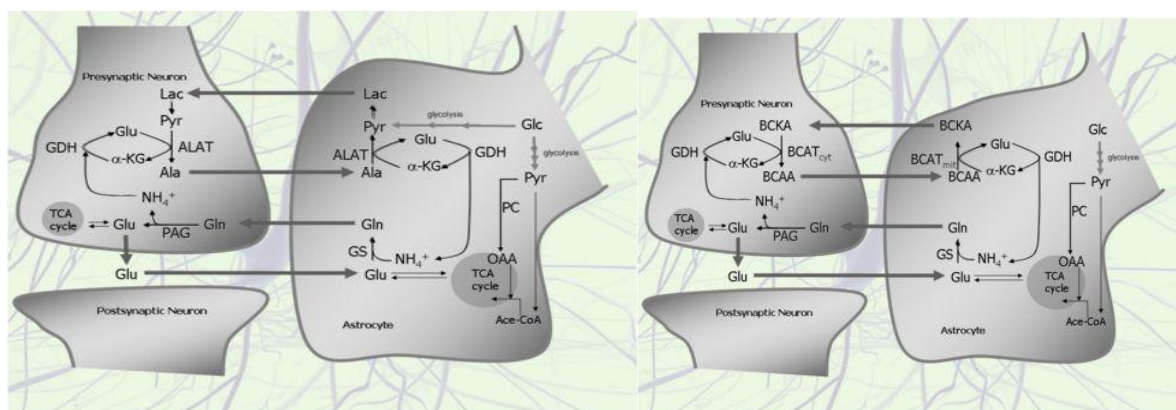
Το γλουταμικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, χρησιμοποιούμενο σε περισσότερες από το 40-60% των συνάψεων, και εμπλέκεται

σε εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, η κινητικότητα, η αισθητικότητα. Το ΚΝΣ περιέχει ένα τεράστιο αριθμό γλουταματεργικών νευρώνων, οι οποίοι είναι ευρέως κατανεμημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Τα βασικά γάγγλια, ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας, ο ιππόκαμπος και οι θαλαμικές περιοχές της μέσης γραμμής είναι οι περιοχές με τη μεγαλύτερη πυκνότητα γλουταματεργικών συνάψεων (Aoki et al., 1987).

Η γλουταμική αφυδρογονάση έχει πολύ σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο και αυτό φαίνεται άλλωστε και από τις μεγάλες συγκεντρώσεις της σε αυτόν. Ο κυριότερος κυτταρικός εντοπισμός του ενζύμου είναι σε αστροκύτταρα, όπως έχει δειχθεί με ανοσοιστοχημικές μελέτες (Aoki et al, 1987, Rothe et al, 1994) αλλά έχει βρεθεί και σε νευρώνες και πρόσφατα και σε ολιγοδενδροκύτταρα από εγκέφαλο αρουραίου (Schmitt et al, 1999) αλλά και ανθρώπου (Werner et al, 2001). Ο εντοπισμός του ενζύμου σε αστροκύτταρα που περιβάλλουν γλουταματεργικές νευρικές απολήξεις ευνοεί την υπόθεση πως το ένζυμο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του νευροδιαβιβαστικού γλουταμικού (Plaitakis et al, 1982), αλλά φαίνεται πως παρά τη θερμοδυναμική εύνοια της κατεύθυνσης της αντίδρασης της GDH προς παραγωγή γλουταμικού, το ένζυμο αυτό δε φαίνεται να συμμετέχει άμεσα στη σύνθεση γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή στον ΚΝΣ (Cooper et al., 1979). Αντίθετα, η σύνθεση στους νευρώνες του νευροδιαβιβαστή πιστεύεται ότι γίνεται από α-κετογλουταρικό, μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, ή από γλουταμίνη με τη δράση του ενζύμου γλουταμινάση.

Στη συναπτική σχισμή, το γλουταμικό που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύναψης, είτε θα επαναπροσληφθεί από τους ίδιους τους νευρώνες είτε θα προσληφθεί από τα περιβάλλοντα αστροκύτταρα μέσω μεταφορέων. Στα αστροκύτταρα, το γλουταμικό μπορεί να μετατραπεί σε γλουταμίνη μέσω της συνθάσης της γλουταμίνης ή σε α-κετογλουταρικό. Η τελευταία μετατροπή θα μπορεί να γίνει μέσω μιας από τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης αλλά και μέσω της αντίδρασης της GDH. Συνεπώς η GDH παίζει ρόλο στο καταβολισμό και την ανακύκλωση του γλουταμικού στις συνάψεις. Αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία σε περιπτώσεις υπερβολικής προσυναπτικής απελευθέρωσης γλουταμικού, αφού είναι γνωστό ότι η περίσσεια γλουταμικού, και κατά συνέπεια η υπερενεργοποίηση των μετασυναπτικών NMDA και AMPA υποδοχέων, μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Ωστόσο, σε καλλιέργειες αστροκυττάρων, κάποιοι ερευνητές έδειξαν ότι η ροή του

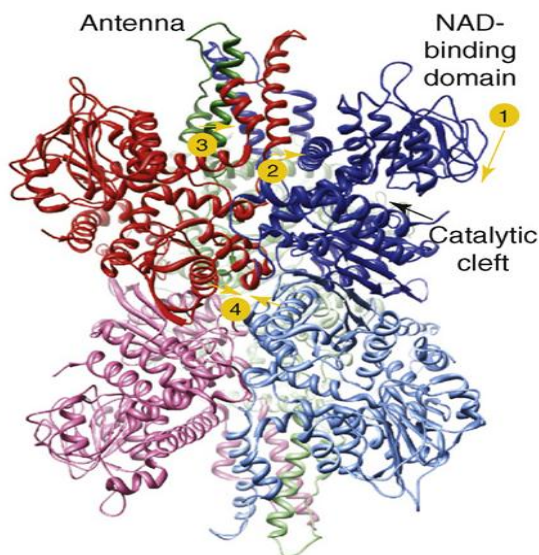
γλουταμικού διαμέσου της GDH είναι δυσανάλογα χαμηλή της συγκέντρωσης της (Waniewski and Martin, 1986, Farinelli and Nicklas, 1992). Από την άλλη μεριά, οι Kuo et al. (1994) πρότειναν ότι η δραστηριότητα της GDH στο ΚΝΣ μπορεί να είναι στενά ρυθμιζόμενη, αφού τα επίπεδα της στον εγκέφαλο είναι υψηλά, ενώ η ροή γλουταμικού διαμέσου της αντίδρασης της είναι χαμηλή. Συμπερασματικά, ο μεταβολισμός του γλουταμικού στα αστροκύτταρα εξαρτάται από τα εξωκυττάρια επίπεδά του, με τα υψηλότερα επίπεδα να ευνοούν την οξείδωση του γλουταμικού διαμέσου της GDH (Sonnwald et al., 1997).



Εικ.3: Ο ρόλος του γλουταμικού στο μεταβολισμό των νευρικών κυττάρων.

Η σημασία της GDH στη βιολογία του ΚΝΣ αποκαλύπτεται και από το γεγονός ότι δυσλειτουργία της GDH ενέχεται στη παθοφυσιολογία νευρολογικών νοσημάτων. Το γλουταμικό, ο κυριότερος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ, του οποίου το μεταβολισμό ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό η GDH, έχει νευροτοξικές ιδιότητες. Η απελευθέρωση του γλουταμικού σε μεγάλες συγκεντρώσεις στη συναπτική σχισμή είναι δυνατόν να προκαλέσει διεγερτικοτοξική βλάβη (excitotoxic injury) στα νευρικά κύτταρα. Η διεγερτικοτοξικότητα έχει ενοχοποιηθεί σε μηχανισμούς οξείας βλάβης του ΚΝΣ επί υποξίας, ισχαιμίας και υπογλυκαιμίας, καθώς και σε μηχανισμούς χρόνιας νευροεκφύλισης. Η νόσος Parkinson, η νόσος Alzheimer και η Πλάγια Μυατροφική Σκλήρυνση (ALS) έχουν συσχετιστεί με τις ιδιότητες αυτές του γλουταμικού οξέος. Ειδικά όσον αφορά τη νόσο του Parkinson, όπου εκφυλίζονται οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας, οι Plaitakis και Shashidharan (2000), έδειξαν ότι αναστολή της έκφρασης της GDH με anti-sense ολιγονουκλεοτίδια οδηγεί σε εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων σε καλλιέργεια, παρέχοντας ενδείξεις για μία νευροπροστατευτική λειτουργία της GDH στα κύτταρα αυτά.

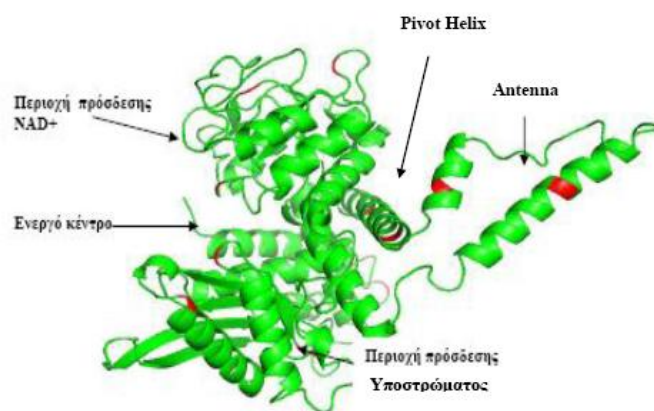
5. Δομή και αλλοστερική ρύθμιση της GDH των θηλαστικών



Εικ. 4: Δομή και ρύθμιση της GDH, το ομοεξαμερές με κάθε υπομονάδα με διαφορετικό χρώμα. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές που μετακινούνται κατά τη διάρκεια της κατάλυσης (από Smith and Stanley, 2008)

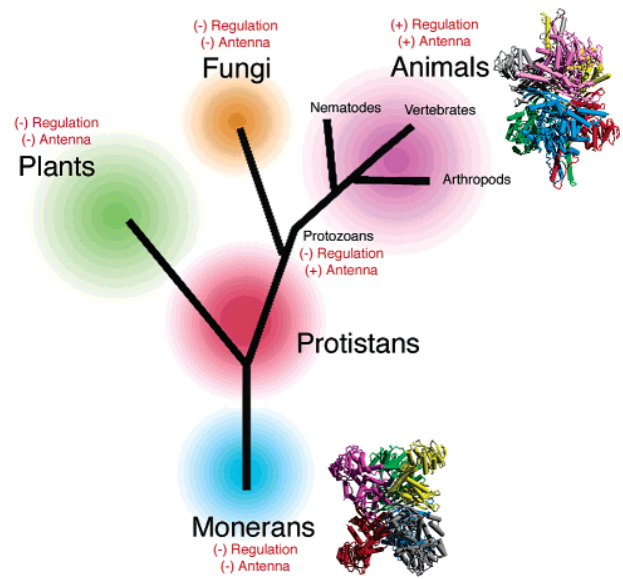
Η γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών (Εικ.4) είναι ένα ομοεξαμερές με κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος ~56kDa και να αποτελείται από 505 αμινοξέα. Μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Peterson et al., 1997, Peterson and Smith, 1999, Smith et al., 2001, Smith et al., 2002, Banerjee et al., 2003) έδειξαν ότι η εξαμερική αυτή δομή αποτελείται στην πραγματικότητα από ένα διμερές από τριμερή με κάθε υπομονάδα να αποτελείται από τρεις βασικές περιοχές (Εικ.5):

α) την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος στο αμινοτελικό άκρο, β) την περιοχή πρόσδεσης του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD^+) ή του φωσφορικού-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADP^+) και γ) τη ρυθμιστική περιοχή η οποία περιλαμβάνει την antenna και την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix).



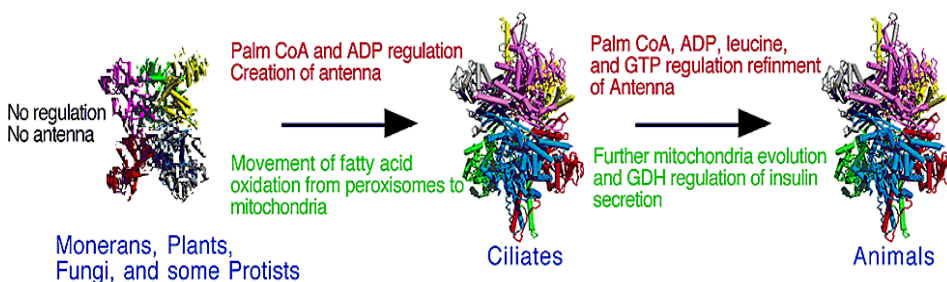
Εικ.5: Τριτοταγής δομή μιας υπομονάδας της hGDH1 (PDB: 1LIF) όπου απεικονίζονται τα μέρη από τα οποία αποτελείται. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα 15 αμινοξέα στα οποία διαφέρει η hGDH1 από την hGDH2.

Η antenna (αμινοξέα 402-448 στην ανθρώπινη πρωτεΐνη) αποτελείται από 48 αμινοξέα και φαίνεται να εμπλέκεται στην αλλοστερική ρύθμιση, τη συνεργατικότητα αλλά και την καταλυτικότητα του ενζύμου. Περιέχει δύο α-έλικες και μία ενδιάμεσο άλυσσο μεταξύ τους. Η antenna είναι μια δομή η οποία δεν εμφανίζεται στις βακτηριακές GDH (Εικ.6,7), γεγονός το οποίο συνιστά μία από τις δύο βασικές διαφορές των GDH των θηλαστικών και των βακτηρίων. Η άλλη είναι ότι τα βακτηριακά ένζυμα δεν υπόκεινται σε αλλοστερική ρύθμιση (Banerjee at al., 2003) (Εικ.6,7).

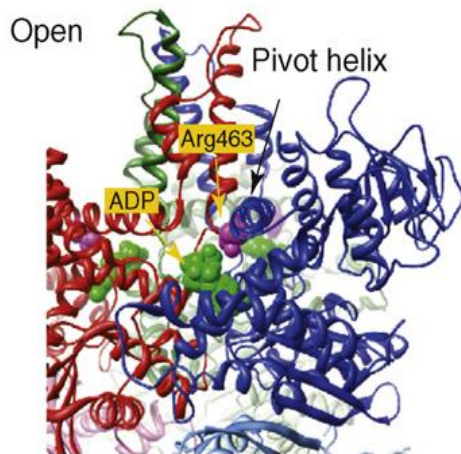


Εικ.6: Σχηματική απεικόνιση της εξελικτικής πορείας της antenna και της αλλοστερικής ρύθμισης της GDH. Η antenna εμφανίστηκε στα πρωτόζωα πριν την αλλοστερική ρύθμιση (από Banerjee at al., 2003)

Το ένζυμο οργανώνεται σε δύο περιοχές οι οποίες χωρίζονται από μία βαθιά σχισμή, δίνοντας έτσι στο ένζυμο μια εμφάνιση σα μύδι (cleam-like appearance) (Εικ.5). Μια διαμόρφωση στο στόμιο της σχισμής αυτής δίνει τη θέση πρόσδεσης του $NAD(P)^+$, ενώ το υπόστρωμα (γλουταμικό ή α-κετογλουταρικό) προσδένεται στη βάση της σχισμής αυτής μεταξύ των δύο περιοχών. Η περιοχή I αποτελείται από τα 4-204 και 428-453 αμινοξικά κατάλοιπα και κατευθύνει την αυτοσυναρμολόγηση του μορίου σε εξαμερές, ενώ η περιοχή II αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 205-427 και δομικά είναι παρόμοια με μια κλασσική περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (μία β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελούμενη από 6 αλύσους το οποίο έχει α-έλικες και στις δυο πλευρές του), με τη διαφορά ότι η κατεύθυνση μιας β-αλύσου είναι ανεστραμμένη.



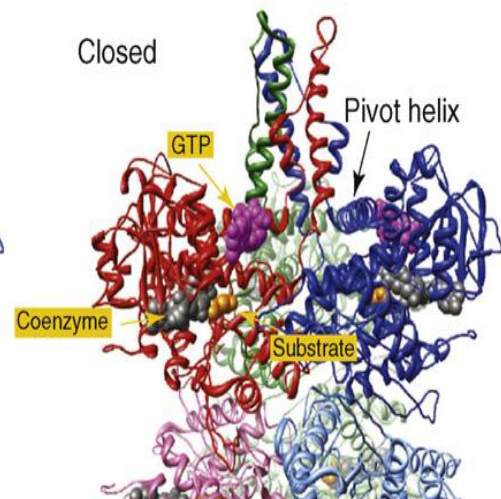
Εικ.7: Η εξέλιξη της αλλοστερικής ρύθμισης και η δημιουργία της αντένας στη γλουταμική αφυδρογονάση κατά τους Stanley&Smith, 2008, σχετίζεται με τη μεταφορά του ενζύμου στα μιτοχόνδρια και τη σύνδεσή του με τον κύκλο του Krebs και τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων.



Εικ.8(α): Η ανοιχτή διαμόρφωση του ενζύμου με τη θέση πρόσδεσης του ADP (από Smith and Stanley, 2008)

περιοχής πρόσδεσης του NAD(P)^+ γύρω από την περιστρεφόμενη έλικα φέρνοντας κοντά τις δύο περιοχές, κλείνοντας έτσι τη σχισμή του ενεργού κέντρου, χωρίς όμως την καταστροφή του παραπάνω δεσμού υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, νικοτιναμίδιο και υπόστρωμα έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό για υδρική μεταφορά που ευνοείται από το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργείται.

Οι δύο περιοχές στην ανοιγμένη μορφή του ενζύμου συνδέονται μ' ένα δεσμό υδρογόνου ανάμεσα σε δύο αμινοξικά κατάλοιπα των περιοχών αυτών. Η κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες φαίνεται ότι προωθείται από την πρόσδεση του υποστρώματος σε αυτό. Η πρόσδεση του υποστρώματος προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης που σαν αποτέλεσμα έχει την περιστροφή της

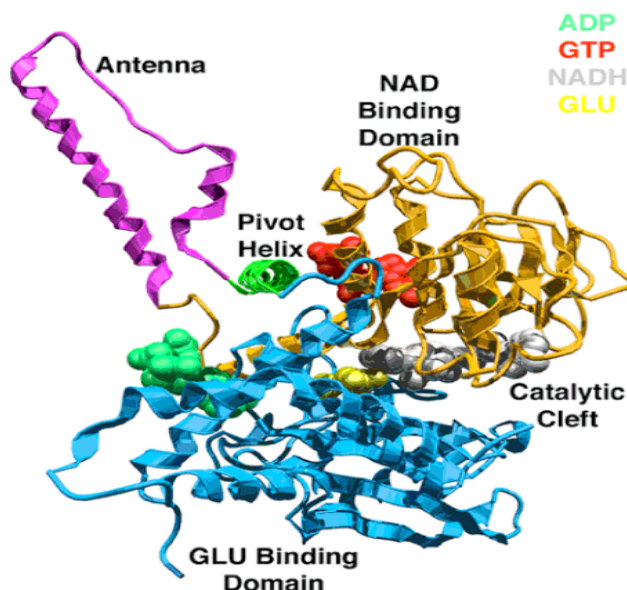


Εικ.8(β): Η κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου με τη θέση πρόσδεσης του GTP (από Smith and Stanley, 2008)



Στα θηλαστικά, η ενζυμική δραστηριότητα της GDH υπόκειται σε στενή ρύθμιση και αυτό είναι σημαντικό χαρακτηριστικό που τη διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες γλουταμικές αφυδρογονάσες των κατώτερων εξελικτικά οργανισμών. Η ρύθμιση αυτή γίνεται μέσω αλλοστερικών τροποποιητών. Κύριοι αλλοστερικοί ενεργοποιητές

του ενζύμου είναι το ADP, η L-λευκίνη και το NAD(P)^+ , ενώ κύριοι αλλοστερικοί αναστολείς το GTP και το NAD(P)H (Εικ. 9).



Εικ.9: Κρυσταλλογραφική δομή μία μονομερούς υπομονάδας GDH με τους κύριους αλλοστερικούς τροποποιητές της.

Η GDH1 έχει σημαντική βασική δραστηριότητα (40-45% της μέγιστης), δηλαδή δραστηριότητα χωρίς την παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών. Αναστέλλεται ισχυρά από το GTP ($\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$), το οποίο ρυθμίζει την λειτουργία του στους περιφερικούς ιστούς. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο ρυθμιστικό τμήμα του ενζύμου, οι οποίες οδηγούν σε άρση της αναστολής του GTP, παρουσιάζουν το σύνδρομο υπερινσουλιτισμού-υπεραμμωναιμίας λόγω αυξημένης βασικής δραστηριότητας του ενζύμου στα β κύτταρα του παγκρέατος το οποίο οδηγεί σε αυξημένη έκκρισης ινσουλίνης μέσω της παραγωγής ATP (Gylfe, 1976, Sener and Malaisse, 1980, Sener et al., 1981, Stanley et al, 1998). Εμφανίζει ανθεκτικότητα στην απενεργοποίηση από θερμότητα (θερμοανθεκτικό ένζυμο).

Η GDH2 είναι ένζυμο ανθεκτικό στην ανασταλτική δράση του GTP, καθώς η αναστολή από αυτό επιτυγχάνεται με πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GTP από τις απαιτούμενες για την αναστολή του GDH1. Παρουσιάζει χαμηλή βασική δραστηριότητα (5-10% της μέγιστης), η οποία αποκαθίσταται πλήρως από το ADP και την L-λευκίνη (Plaitakis, Metaxari and Shashidharan, 2000). Αυτό είναι μία σημαντική μοριακή προσαρμογή του ενζύμου που του επιτρέπει να λειτουργεί στο νευρικό σύστημα κυρίως κατά την διάρκεια της διεγερτικής διαβίβασης. Επειδή η

μεταφορά του γλουταμικού οξέος εντός των κυττάρων συνοδεύεται από κατανάλωση ενέργειας (υδρόλυση ATP→ADP), το παραγόμενο ADP προκαλεί τον επιταχυνόμενο μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος μέσω δραστηριοποίησης της GDH. Επίσης, η μη ανασταλτική δράση του GTP στη GDH2, επιτρέπει στο ένζυμο να λειτουργεί στον νευρικό ιστό, στον οποίο τα επίπεδα GTP είναι υψηλότερα από άλλους ιστούς (Mastorodemos et al., 2005). Με αυτό τον τρόπο η GDH2 μπορεί να μεταβολίζει το νευροδιαβιαστικό γλουταμικό στο νευρικό ιστό ακόμα και όταν από τον κύκλο του κιτρικού παράγεται τόση ποσότητα GTP ικανή να αναστείλει τη GDH1. Επίσης η ικανότητα της L-λευκίνης να ευαισθητοποιεί τη GDH2 σε μικρές συγκεντρώσεις ADP βοηθά αυτή να ανταποκρίνεται στις μικρής κλίμακας αλλαγές του ADP στις περιπτώσεις ενεργειακού ελλείμματος (Mastorodemos et al., 2005). Αυτές φαίνεται να είναι οι συνθήκες που επικρατούν στα αστροκύτταρα κατά τη διάρκεια της διεγερτικής σύναψης, καθώς η πρόσληψη του γλουταμικού από αυτά τα κύτταρα σχετίζεται με αυξημένη υδρόλυση του ATP σε ADP για τη λειτουργία των διαμεμβρανικών διαύλων (Naito and Ueda, 1985). Τέλος σε αντίθεση με το GDH1, είναι θερμοευαίσθητο ένζυμο και επομένως επηρεάζεται αρνητικά από τη θερμότητα.

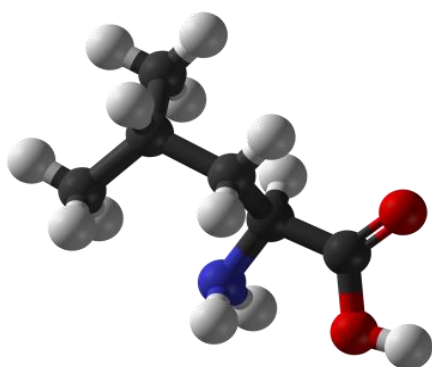
Property	hGDH1	hGDH2
V_{max}	161.9 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	159.1 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
K_m		
α -Ketoglutarate	2.0 mM	2.1 mM
Ammonia	13.4 mM	17.1 mM
Glutamate	12.4 mM	10.7 mM
Basal activity:	30–40% of maximal	5–10% of maximal
Dependence on concentration	No	Yes
Stabilized on phosphate	No	Yes
GTP inhibition	Sensitive ($IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$); cooperative ($HC = 1.51$)	Resistant ($IC_{50} = 78 \mu\text{M}$); non-cooperative ($HC = 0.85$)
ADP activation	$SC_{50} = 17.0 \mu\text{M}$	$SC_{50} = 58.7 \mu\text{M}$
L-Leucine activation	$SC_{50} = 0.98 \text{ mM}$, synergistic with ADP	$SC_{50} = 1.09 \text{ mM}$, synergistic with ADP
Effect of pH	Maximal SA pH 7.75–8.0	Maximal SA at pH 7.5
Heat stability	Heat stable (half life 348 min)	Heat labile (half life 38 min)

Εικ.10: Πίνακας με τις βασικές διαφορές των δύο ισοενζύμων (Zaganas et al.,2009)

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

προσδίδει ανθεκτικότητα στην αναστολή από GTP και καταργεί τη θετική συνεργατικότητα αυτής της αναστολής.

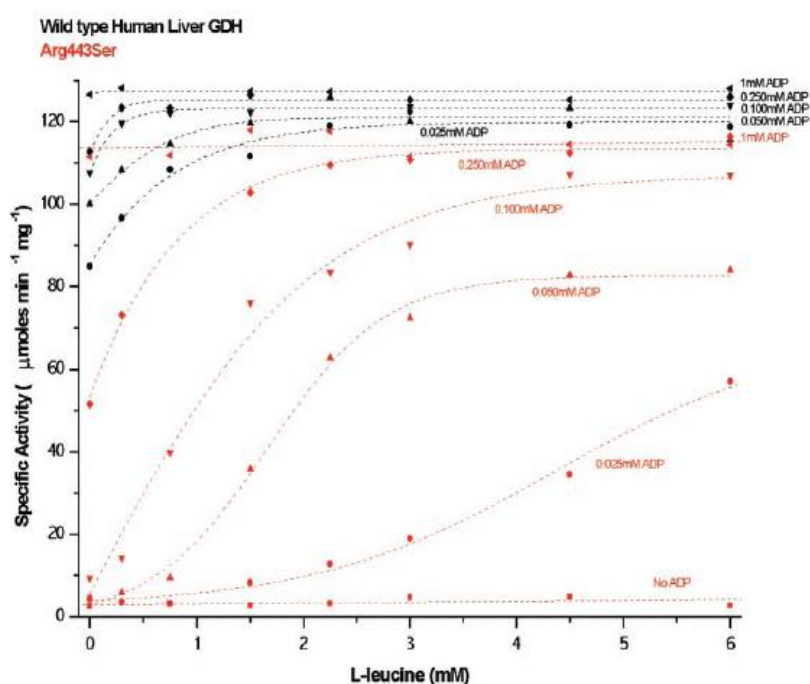
Ο έλεγχος της κινητικότητας της περιοχής πρόσδεσης του NAD(P)^+ είναι το κεντρικό σημείο της αλλοστερικής ρύθμισης της GDH (Peterson and Smith, 1999). Η ταχύτητα κατάλυσης ρυθμίζεται από την ταχύτητα απελευθέρωσης του προϊόντος (Colon et al., 1972) και με αυτόν τον τρόπο το ADP ενεργοποιεί το ένζυμο αφού διευκολύνει την απελευθέρωση του προϊόντος. Το GTP αντίθετα, που ενισχύει την πρόσδεση του υποστρώματος, δρα σαν αλλοστερικός αναστολλέας (George and Bell, 1980). Η θέση πρόσδεσης του GTP βρίσκεται μεταξύ της antenna και της περιοχής πρόσδεσης του NAD(P)^+ και η σύνδεση ευνοεί την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου (Smith et al., 2001). Η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι στη θέση αυτή μπορεί να προσδεθεί και ATP σε μικρότερες όμως συγκεντρώσεις. Η ικανότητα πρόσδεσης λοιπόν των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων ATP και GTP στη θέση αυτή αλλά και οι αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με αυτά, την καθιστούν μια θέση “αισθητήρα ενέργειας” η οποία ανιχνεύει τα ενεργειακά επίπεδα του περιβάλλοντος του ενζύμου και το απενεργοποιεί σε συνθήκες υψηλού ενεργειακού φορτίου. Συμπερασματικά, η αναστολή του ενζύμου επιτυγχάνεται από υψηλές συγκεντρώσεις GTP (ή ATP). Αντίθετα, η θέση του αλλοστερικού ενεργοποιητή ADP βρίσκεται κάτω από τη *pinot helix* και ακριβώς πίσω από τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (Banerjee et al., 2003) και είναι η ίδια με τη θέση πρόσδεσης των NAD^+ και NADH . Η σύνδεση ευνοεί την ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου και η δράση του επιτυγχάνεται με ελάττωση της ενέργειας που απαιτείται για το άνοιγμα της καταλυτικής σχισμής άρα και την απελευθέρωση του προϊόντος.



Εικ.10: Τρισδιάστατη αναπαράσταση ενός μορίου L-λευκίνης

Η L-λευκίνη (Εικ.10) ωστόσο, προσδενόμενη σε διαφορετικό σημείο ενεργοποιεί το ένζυμο ανεξάρτητα του ADP (Fang et.al, 2002) αλλά με τρόπο συνεργιστικό (Plaitakis et al., 2000). Επειδή η ενεργοποίηση από το ADP σχετίζεται με την ανοικτή διαμόρφωση του ενζύμου, τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα πως η θέση πρόσδεσης του αμινοξέος αυτού είναι εντός της

καταλυτικής σχισμής του ενεργού κέντρου του ενζύμου, παρόλα αυτά δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία που να αποδεικνύουν κάτι τέτοιο. Η πιθανότητα πρόσδεσης της L-λευκίνης εντός του ενεργού κέντρου δεν είναι ένα ενδεχόμενο απροσδόκητο καθώς η L-λευκίνη παρομοίως με άλλα μονοκαρβοξυλικά αμινοξέα, είναι ένα ασθενές υπόστρωμα για τη GDH άρα μπορεί να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο. Επίσης, το εύρημα ότι η απαλοιφή της αντέννας της hGDH1 ή αντικατάστασή της με εκείνη των βακτηρίων (που δεν ρυθμίζεται αλλοστερικά όπως η GDH των θηλαστικών) διατηρεί την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, αλλά όχι την ρύθμιση από ADP και GTP (Allen et al., 2004), συμφωνεί με αυτό το μοντέλο.



Εικ.11: Η αλλαγή Arg443Ser μειώνει σημαντικά τη βασική δραστηριότητα της hGDH1, επιτρέποντας ωστόσο την ενεργοποίηση από ADP και L-λευκίνη (Zaganas et al., 2002)

Επιπλέον, αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως μεταλλαγμένη hGDH1 (Arg443Ser-hGDH1) η οποία έχει πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα (ενζυμική δραστηριότητα χωρίς την προσθήκη ADP) και άρα σχετίζεται με την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου, δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη L-λευκίνη σε απουσία ADP (Zaganas et al., 2002). Προσθήκη ελάχιστων συγκεντρώσεων ADP, ικανών να ανοίξουν το ενεργό κέντρο, καθιστούν το αμινοξύ αυτό ικανό να ενεργοποιήσει το ένζυμο (Zaganas et al., 2002) (Εικ. 11). Παρ' όλα αυτά, η hGDH2 η οποία έχει στη θέση 443 τη σερίνη, ενεργοποιείται από τη L-λευκίνη σε απουσία ADP σε παρόμοια

επίπεδα με αυτά της hGDH1 (Kanavouras et al, 2007). Επιπλέον, η ευαισθησία των 2 ισοενζύμων στο αμινοξύ όπως φαίνεται από τις τιμές SC_{50} , είναι παρόμοια (Kanavouras et al, 2007). Συνεπώς, άλλες αμινοξικές αλλαγές στη hGDH1 στα σημεία εκείνα που διαφέρει από τη hGDH2 δρουν με τρόπο τέτοιο ώστε να αντισταθμίσουν την επίδραση της Arg443Ser στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη.

Στη μελέτη αυτή, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε ποιες από τις αμινοξικές αλλαγές οδηγούν στην ικανότητα της hGDH2 να ενεργοποιείται από τη L-λευκίνη της σε απουσία ADP αποσκοπώντας σε μια περαιτέρω κατανόηση της δράσης του αμινοξέος αυτού στο ένζυμο και της εύρεσης της ακριβούς θέσεως πρόσδεσης αυτού.

II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα Sf21

GLUD1
Glu34Lys Arg39Gln Asp142Glu Ile166Val Ser174Asn Gly247Arg Ala321Val Ser331Thr Met370Leu Met415Leu Arg443Ser Gly456Ala Arg470His Asn498Ser
Arg443Ser/Gly456Ala (<i>double mutant, LDM</i>)
Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala (<i>triple mutant, TM</i>)
Met415Leu /Arg443Ser/Gly456Ala/ Arg470His (<i>Hybrid</i>)

Τα μεταλλαγμένα GLUD1 cDNAs στα σημεία που διαφέρει από το hGDH2, μαζί με το φυσιολογικού τύπου GLUD1 και GLUD2 cDNA, εκφράστηκαν σε κύτταρα Sf₂₁ με χρήση του συστήματος έκφρασης πρωτεϊνών Baculovirus. Κύτταρα του εντόμου *Spodoptera fugiperda* (Sf₂₁) συνδιαμολύνθηκαν με καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA (φορέας pVL1393 περιέχον το ένθεμα) και τροποποιημένο DNA Baculovirus (BaculoGold, BD Pharmingen) και επωάστηκαν στους 27°C για 4-5 ημέρες. Ο ιός πολλαπλασιάστηκε με 2-3 κύκλους μόλυνσης. Έγινε συγκομιδή των κυττάρων στις 5 ημέρες μετά την μόλυνση με ιό με φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10min στους 4°C και

συλλογή του υπερκειμένου το οποίο περιέχει τον ανασυνδυασμένο ιό. Αποθήκευση αυτού στους 4°C και χρησιμοποίηση για νέους κύκλους διαμόλυνσης Sf₂₁ κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο ιό. Η πελλέτα των ανασυνδυασμένων κυττάρων ομογενοποιήθηκε (γυαλί με γυαλί) με χαμηλή ταχύτητα για 5min, σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.05 M Tris HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF και 0.5 M NaCl. Το προκύπτον πλήρες ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για

10min στους 4⁰C και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για ενζυμικές μελέτες με ακατέργαστα αδρά εκχυλίσματα.

2. Ενζυμικές δοκιμασίες και κινητικές μελέτες

Για τον καθορισμό των κινητικών και αλλοστερικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων ενζύμων έγιναν μία σειρά από ενζυμικές δοκιμασίες, σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα από Sf₂₁ κύτταρα. Οι μελέτες έγιναν φωτομετρικά (στα 340nm) στην κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης του α-κετογλουταρικού (Plaitakis et al., 2000). Επειδή οι δύο ανθρώπινες ισομορφές της GDH μπορούν αν χρησιμοποιήσουν ως συνένζυμο είτε NAD⁺, είτε NADP⁺ ενώ η ενδογενής GDH των Sf₂₁ κυττάρων χρησιμοποιεί μόνο NAD⁺, για τις ενζυμικές μελέτες χρησιμοποιήσαμε μόνο NADP(H) για να αποφύγουμε το ενδεχόμενο να μετρήσουμε ενζυμική δραστηριότητα από την ενδογενή GDH των σφοντόπτερων (Shashidharan et al. 1994).

Για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών των παραπάνω ενζύμων (τιμές Km, Vmax, HC και SC₅₀ και γραφικές παραστάσεις αλλοστερικής ρύθμισης από ADP και L-λευκίνη), οι ενζυμικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με μεταβολή της συγκέντρωσης του μελετούμενου αλλοστερικού ρυθμιστή, ενώ οι συγκεντρώσεις των άλλων παραγόντων της αντίδρασης διατηρούνταν σταθερές.

Βασικά διαλύματα ενζυμικής ανάλυσης
Ρυθμιστικό Διάλυμα Τριαιθανολαμίνης: Triethanolamine HCl 50 mM, pH 8.0 με 2.6 mM EDTA
Οξικό Αμμώνιο 10 M
NADPH 10 mM
ADP 100 mM
α-Κετογλουταρικό 0.4 M
L-Λευκίνη 0.15 M

2.(α) Ενεργοποίηση από ADP

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από ADP έγινε σε 1 ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Τριαιθανολαμίνης (pH 8.0) στο οποίο εμπεριέχονταν 100 mM Οξικού Αμμωνίου, 100μM NADPH, προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες

συγκεντρώσεις ADP και ποσότητα του υπό μελέτη ενζύμου τέτοια ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης (dA_{340nm}/min) σε παρουσία 1mM ADP να είναι $\sim 0,1$. Η έναρξη της αντίδρασης γινόταν με προσθήκη α-κετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8 mM. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί καλύτερα η ενεργοποίηση από ADP ήταν η $V = V_0 + \frac{(V_{max} * x^H)}{(x^H + SC_{50})}$, όπου V η ταχύτητα της αντίδρασης και x η συγκέντρωση του ADP, ενώ οι V_0 , V_{max} , H και SC_{50} είναι θεωρητικές σταθερές που αφορούν την αρχική ταχύτητα (σε απουσία ADP), τη μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης σε παρουσία ADP, το βαθμό συνεργατικότητας των υπομονάδων και τη συγκέντρωση ADP όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι $\frac{V_{max}}{2}$. Ειδικότερα, ο υπολογισμός της θεωρητικής τιμής SC_{50} (\pm τυπικό σφάλμα, SE) έγινε από τις γραφικές παραστάσεις ενεργοποίησης από ADP με χρήση του προγράμματος Origin (Microcal Software).

2.(β) Ενεργοποίηση από L-λευκίνη

Η μελέτη της ενεργοποίησης των ανασυνδυασμένων ενζύμων από L-λευκίνη έγινε σε 1 ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Τριαιθανολαμίνης στο οποίο εμπεριέχονταν 100 mM Οξικού Αμμωνίου, 100μM NADPH, προγραμματισμένα μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις L-λευκίνης (0-9 mM) και ποσότητα του υπό μελέτη ενζύμου τέτοια ώστε η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (dA_{340nm}/min) σε παρουσία 1mM ADP να είναι $\sim 0,1$, ενώ το μείγμα της αντίδρασης δεν περιείχε ADP εκτός αν απαιτείτο το αντίθετο. Η έναρξη όλων των παραπάνω αντιδράσεων γινόταν με προσθήκη α-κετογλουταρικού σε τελική συγκέντρωση 8 mM. Η περιγραφή της ενεργοποίησης έγινε με τη χρήση της ίδιας εξίσωσης όπως στο ADP στο πρόγραμμα Origin (Microcal Software).

2.(γ) Δομικές μελέτες πρωτεϊνών και στατιστική ανάλυση

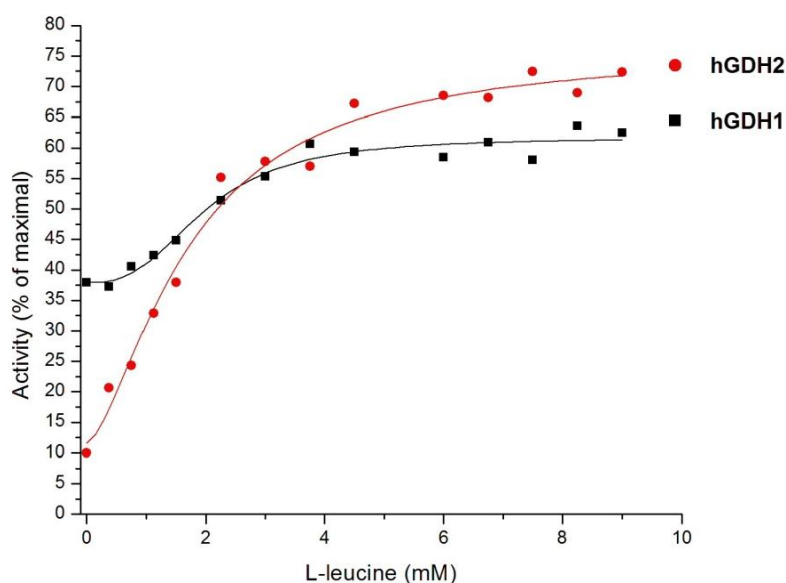
Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πάνω στα πειραματικά δεδομένα και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με χρήση του λογισμικού Origin (Microcal Software, Northampton, MA). Οι τιμές K_m και V_{max} υπολογίστηκαν με εφαρμογή της μεθόδου weighted hyperbolic fit στο λογισμικό Hyper (JS. Easterby, Dept. of

Biochemistry, University of Liverpool, Liverpool, UK). Οι διαφορές στην κινητική και αλλοστερική συμπεριφορά των ενζύμων αξιολογήθηκαν με χρήση της δοκιμασίας t του Student. Οι τιμές του SC_{50} υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις με το λογισμικό Origin.

Οι μελέτες των δομικών μοντέλων της GDH από αγελάδα και άνθρωπο έγιναν με χρήση των προγραμμάτων Rasmol (version 2.7.1.1, R. Sayle, H. Bernstein, <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/>), Swiss-PDBViewer (version 3.7.b2, N. Guex, <http://au.expasy.org/spdbv/>), Quanta (Accelrys, Inc.), RIBBONS (M. Carlson, 1977, <http://sgce.cbse.uab.edu/ribbons/>) και Pymol (DeLano Scientific, 2003, <http://pymol.sourceforge.net/>).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Οι φυσιολογικές hGDH1 και hGDH2 έχουν διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης από την L-λευκίνη



Εικ.1: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη των hGDH1 και hGDH2 σε απουσία ADP. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο ≥ 3 διπλών μετρήσεων

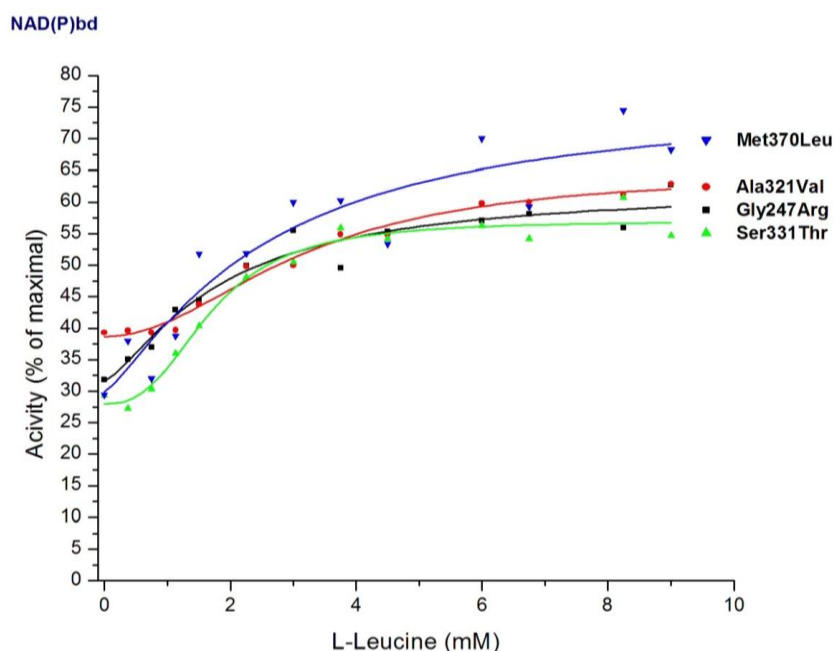
Σε απουσία των αλλοστερικών ενεργοποιητών ADP και L-λευκίνης, η hGDH1 έχει βασική δραστηριότητα ~40% της μέγιστης (παρουσία 1mM ADP) όπως είναι ήδη γνωστό (Plaitakis et al., 2000). Σε απουσία ADP και με τη μέγιστη συγκέντρωση L-λευκίνης που χρησιμοποιήσαμε (9mM), η δραστηριότητα του ενζύμου έφτασε περίπου το 60% της μέγιστης έχοντας μια αύξηση ~20% (Εικ. 1). Η hGDH2 ως γνωστόν, έχει μία βασική δραστηριότητα της τάξεως του 10% επί της μέγιστης. Όμως, η L-λευκίνη φαίνεται να έχει μια αξιοσημείωτη επίδραση στο ένζυμο καθώς με προσθήκη 9mM λευκίνης η ενζυμική δραστηριότητα έφτασε περίπου στο 70% της μέγιστης (Εικ. 1). Τα δύο ισοένζυμα έχουν παρόμοια SC_{50} (τη συγκέντρωση εκείνη της L-λευκίνης δηλαδή η οποία απαιτείται για να φτάσει το ένζυμο στο μισό της

ενεργοποίησής του) όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1, παρόλα αυτά, από τις καμπύλες ενεργοποίησης βλέπουμε πως τα 2 ένζυμα ενεργοποιούνται διαφορετικά και αναλογικά, η hGDH2 έχει μεγαλύτερη ενεργοποίηση από τη λευκίνη.

	Basal activity (% of maximal)	% dActivation	SC ₅₀
hGDH1	37,96%	24,52%	1,99 ±0,17
hGDH2	9,9%	62,1%	1,72 ±0,19

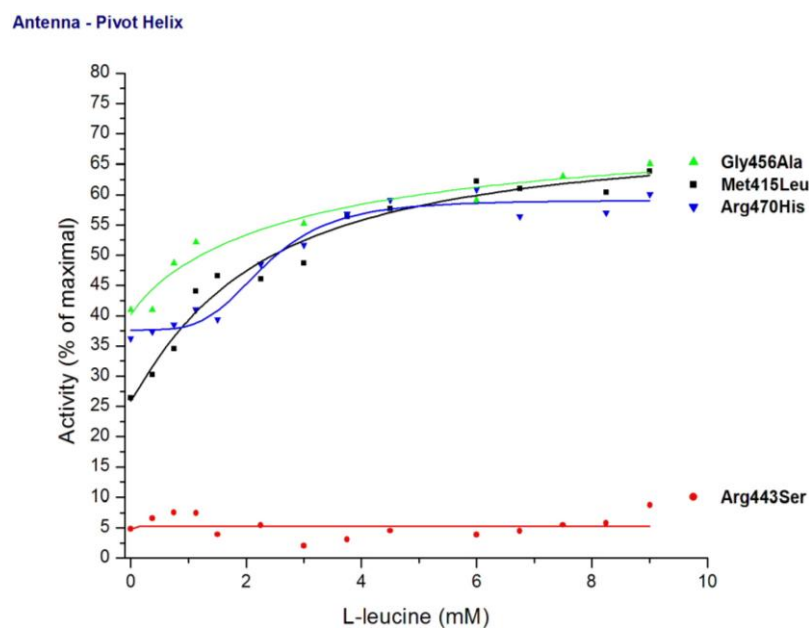
Πιν. 1: Βασική δραστηριότητα επί της μέγιστης, ποσοστά ενεργοποίησης και SC₅₀ των δύο φυσιολογικών ενζύμων. Τα SC₅₀ υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος Origin, , όπως περιγράφεται στην παράγραφο Υλικά & Μέθοδοι

2. Οι μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ενεργοποίηση από L-λευκίνη



Εικ.2: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη των μεταλλάξεων στην περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)H σε απουσία ADP. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο ≥ 3 διπλών μετρήσεων

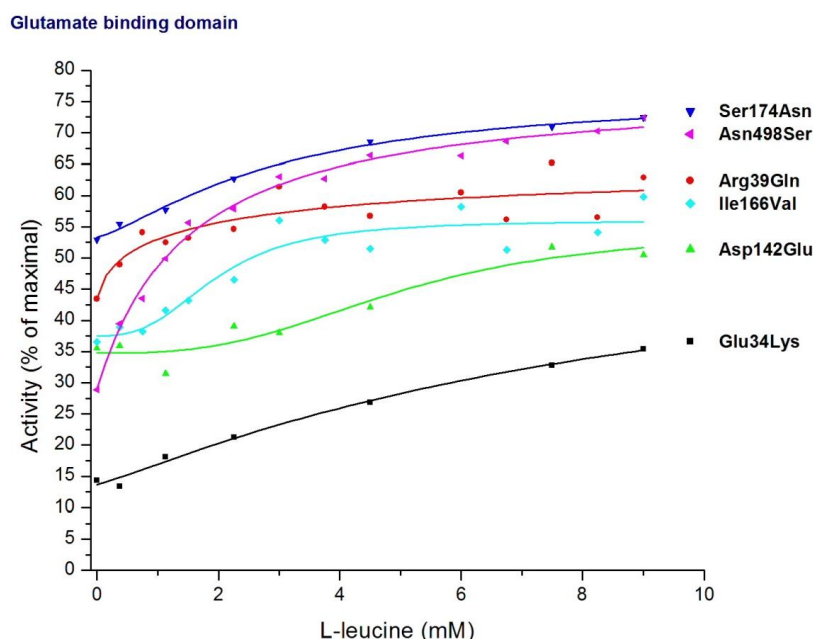
Όπως φαίνεται από τις εικόνες 2 και 3, οι μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)H (Εικ. 2) αλλά και στη ρυθμιστική περιοχή (antenna/pivot helix) (Εικ. 3), δεν έχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ενεργοποίηση από την L-λευκίνη σε απουσία ADP σε σχέση με τη φυσιολογική hGDH1. Τα ένζυμα αυτά δε φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά ούτε στη βασική δραστηριότητα αλλά ούτε και στο ποσοστό ενεργοποίησης. . Εξαιρέση αποτελεί η hGDH1-Arg443Ser, η οποία σε απουσία ADP δεν ενεργοποιείται από την L-λευκίνη (Εικ. 3).



Εικ.3: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη σε απουσία ADP των μεταλλάξεων στη ρυθμιστική περιοχή σε απουσία ADP. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο ≥ 3 διπλών μετρήσεων

Όμως, στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, ορισμένες από τις μεταλλάξεις εκεί φαίνεται να επηρεάζουν σε αρκετό βαθμό τόσο τη βασική δραστηριότητα όσο και τη ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών (Εικ.4). Συγκεκριμένα, τα ένζυμα hGDH1-Arg39Gln και hGDH1-Ile166Val δε διαφέρουν σημαντικά στη βασική δραστηριότητα και στο ποσοστό ενεργοποίησης σε σχέση με τη hGDH1, ενώ το hGDH1-Asn498Ser διαφέρει ελάχιστα στη βασική δραστηριότητα (~30% επί της μέγιστης) και έχει ποσοστό ενεργοποίησής του φτάνει κοντά σε εκείνο της hGDH2. Σημαντικές διαφορές φαίνεται να έχουν τα hGDH1-Glu34Lys, hGDH1-Asp142Glu και hGDH1-Ser174Asn. Το πρώτο είναι ένα ένζυμο με χαμηλή βασική δραστηριότητα (~15% επί της μέγιστης), αρκετά χαμηλότερη από το hGDH1 ενώ η μέγιστη ενεργοποίησή του με 9mM L-λευκίνης δεν ξεπερνάει το 30% επί της

μέγιστης.. Το δεύτερο είναι ένα ένζυμο του οποίου η βασική δραστηριότητα είναι παραπλήσια του φυσιολογικού hGDH1 αλλά φαίνεται πως η λευκίνη δεν επιδρά πάνω του το ίδιο και έτσι από βασική δραστηριότητα ~35% επί της μέγιστης, φτάνει ~45% επί της μέγιστης. Το τρίτο είναι ένα ένζυμο με αυξημένη βασική δραστηριότητα (~50% επί της μέγιστης) ενώ η μέγιστη ενεργοποίησή του με 9mM L-λευκίνης πλησιάζει τα αντίστοιχα επίπεδα της hGDH2 (~70% επί της μέγιστης).

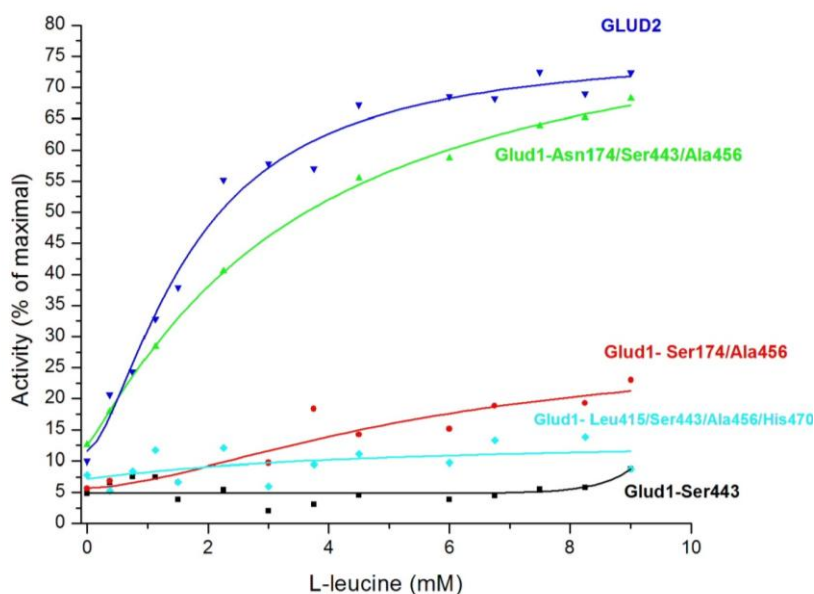


Εικ.4: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη σε απουσία ADP των μεταλλάξεων στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού. σε απουσία ADP. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο ≥ 3 διπλών μετρήσεων

3. Η L-λευκίνη ενεργοποιεί το hGDH1-Ser174Asn/Arg443Ser/Gly456Ala (TM) παρόμοια με το hGDH2

Η προσθήκη επιπλέον μεταλλάξεων στο hGDH1-Arg443Ser αυξάνει τη βασική δραστηριότητα αλλά η επίδραση που έχει η λευκίνη σε αυτά τα ένζυμα ποικίλει ανάλογα τις μεταλλάξεις που προσθέτουμε. Έτσι, όπως βλέπουμε στην Εικόνα 5, η προσθήκη της Gly456Ala στην hGDH1-Arg443Ser προκάλεσε μια ελάχιστη αύξηση στη βασική δραστηριότητα (η οποία όμως παραμένει στα χαμηλά επίπεδα της hGDH1-Arg443Ser) αλλά δεν είχε μεγάλη επίδραση στην ενεργοποίηση από την L-λευκίνη, ενώ η προσθήκη δύο άλλων μεταλλαγών (Met415Leu & Arg470His) σε

αυτό το διπλό μετάλλαγμα (hGDH1- Ser443/Ala456) παρόλο που ανεβάζει ελάχιστα τη βασική δραστηριότητα δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ενεργοποίηση από L-λευκίνη. Αντίθετα, η προσθήκη της Ser174Asn σε αυτό το ένζυμο (hGDH1- Ser443/Ala456) φαίνεται να επηρεάζει αρκετά τόσο τη βασική δραστηριότητα (~12% επί της μέγιστης) όσο και την ενεργοποίηση αυτού (~55% ποσοστό ενεργοποίησης), με τη μέγιστη ενεργοποίηση αυτού να πλησιάζει τα επίπεδα της hGDH2 όπως δείχνει η Εικόνα 5.

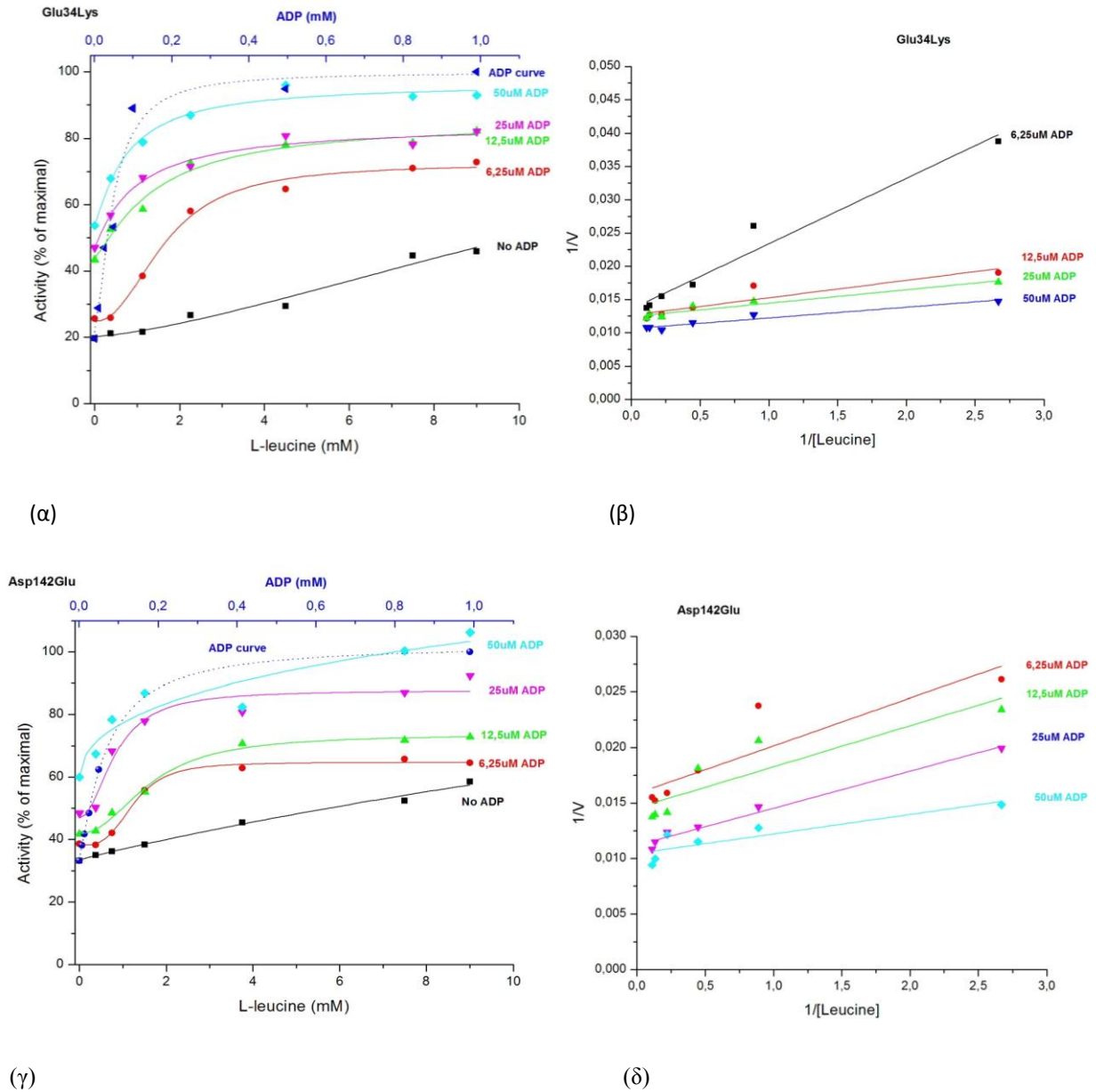


Εικ.5: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη σε απουσία ADP των hGDH2 και των μεταλλαγμένων hGDH1 (hGDH1-Arg443Ser, hGDH1- Ser443/Ala456, hGDH1- Met415Leu/ Ser443/Ala456/Arg470His, , hGDH1- Asn174/Ser443/Ala456). Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο ≥ 3 διπλών μετρήσεων

4. Το ADP αναστρέφει το φαινόμενο των μεταλλάξεων που ελαττώνουν την ενεργοποίηση από L-λευκίνη (Glu34Lys και Asp142Glu), ενώ μειώνει την ποσότητα L-λευκίνης που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου

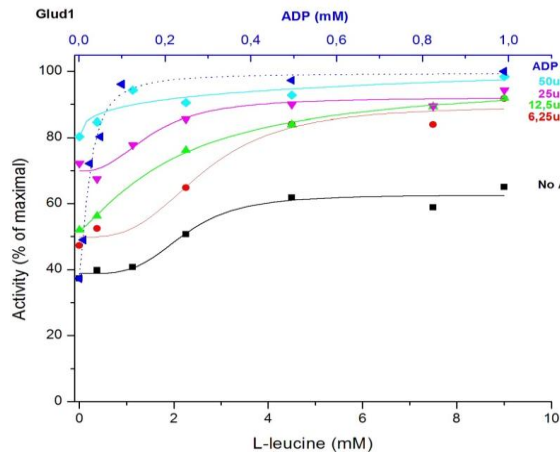
Η προσθήκη ακόμα και μικρών ποσοτήτων ADP μπορεί να αναστρέψει το φαινόμενο που παρατηρήθηκε σε δύο μεταλλάξεις τις περιοχής πρόσδεσης του γλουταμικού οι οποίες ελαττώνουν την ενεργοποίηση από L-λευκίνη όπως φαίνεται

και στις παρακάτω εικόνες. Ενώ απουσία ADP τα ένζυμα αυτά είχαν πολύ μικρή ενεργοποίηση, σταδιακή προσθήκη ADP αυξάνει τη μέγιστη ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών και από την πρώτη ανάλυση φαίνεται πως το τελικό αποτέλεσμα είναι συνεργατικό μεταξύ του ADP και της L-λευκίνης (Εικ.6 (α), (γ)).

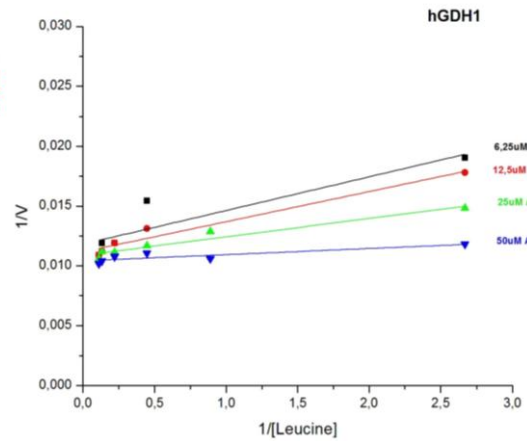


Εικ.6: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP των hGDH1-Gly34Lys (α) και hGDH1-Asp142Glu (γ) καθώς επίσης και οι αντίστοιχες ευθείες Lineweaver-Burk για την κάθε συγκέντρωση ADP (β) και (δ). Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο 1 διπλής μέτρησης και όλες οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση ADP έγιναν την ίδια μέρα.

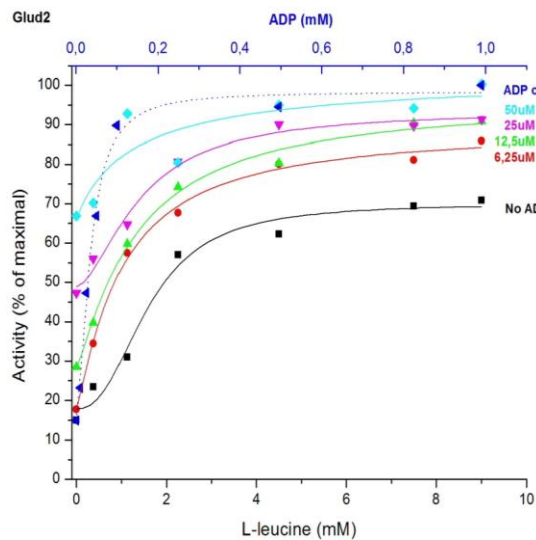
Επιπλέον, όπως φαίνεται από τις καμπύλες ενεργοποίησης αλλά και από τα γραφήματα Lineweaver-Burk, η προσθήκη ακόμα και μικρών ποσοτήτων ADP μειώνει την ποσότητα της λευκίνης που χρειάζεται για να ενεργοποιηθούν είτε τα φυσιολογικά (Εικ.7), είτε τα μεταλλαγμένα ένζυμα που μελετήσαμε (Εικ. 6 (β), (γ), Εικ.8, Εικ.9).



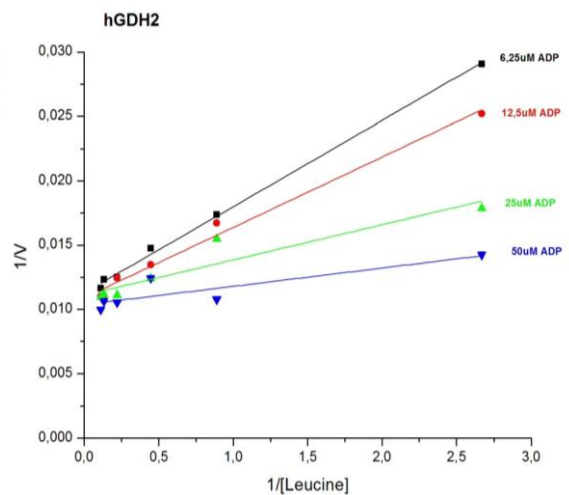
(α)



(β)

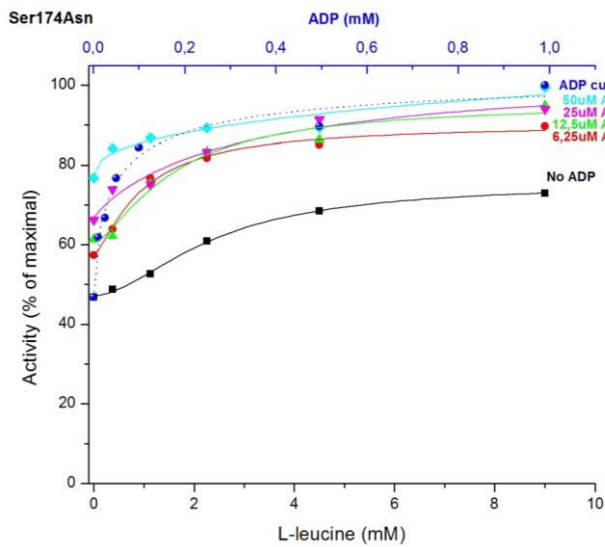


(γ)

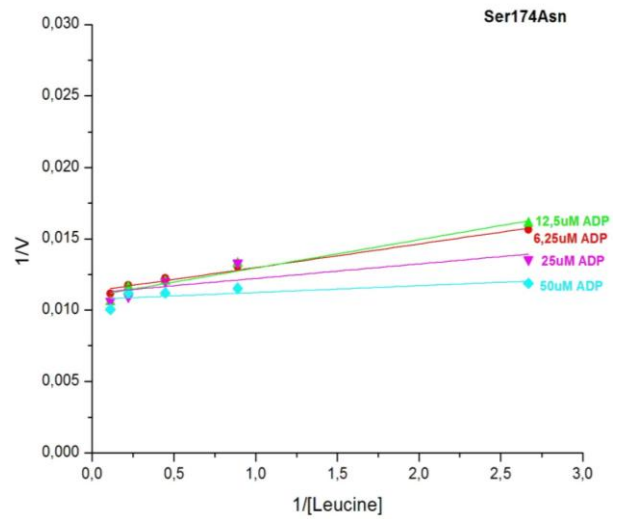


(δ)

Εικ.7: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP των hGDH1 (α) και hGDH2 (γ) καθώς επίσης και οι αντίστοιχες ευθείες Lineweaver-Burk για την κάθε συγκέντρωση ADP (β) και (δ). Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο 1 διπλής μέτρησης και όλες οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση ADP έγιναν την ίδια μέρα.

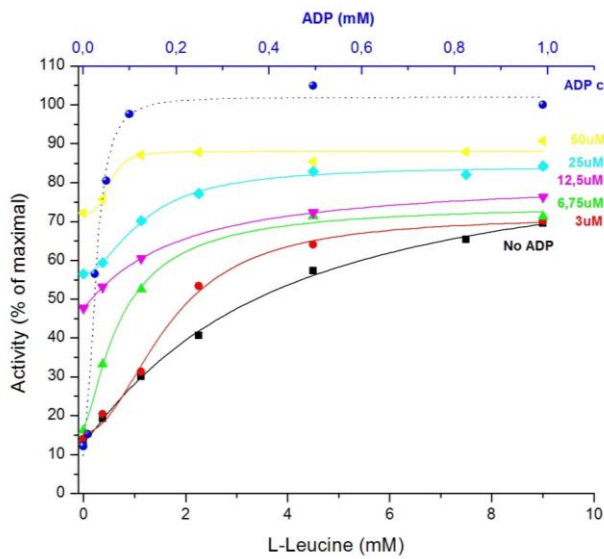


(α)

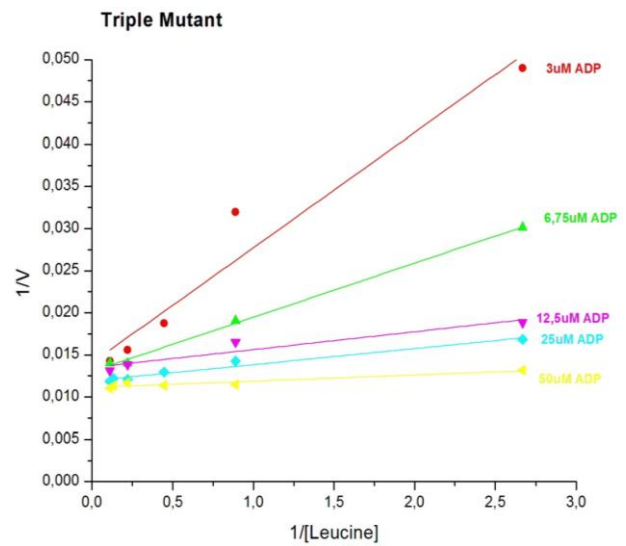


(β)

Εικ.8: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP του hGDH1-Ser174Asn (α) και η αντίστοιχη ευθεία Lineweaver-Burk για την κάθε συγκέντρωση ADP (β) Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο 1 διπλής μέτρησης και όλες οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση ADP έγιναν την ίδια μέρα.



(α)

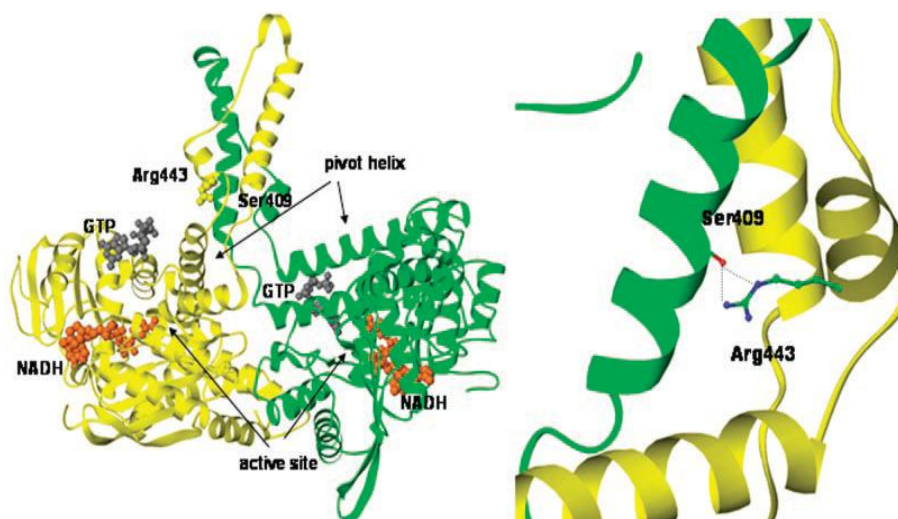


(β)

Εικ.9: Καμπύλες ενεργοποίησης από την L-λευκίνη με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ADP του hGDH1-Asn174/Ser443/Ala456 (α) και η αντίστοιχη ευθεία Lineweaver-Burk για την κάθε συγκέντρωση ADP (β) Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο 1 διπλής μέτρησης και όλες οι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση ADP έγιναν την ίδια μέρα.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης αν και διαφέρουν σε ελάχιστα αμινοξέα, έχουν καταλήξει στην πορεία της εξέλιξής τους να είναι δύο διαφορετικά ένζυμα όσον αφορά τη λειτουργία τους και την αλλοστερική τους ρύθμιση. Για τις κύριες λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο ισοενζύμων ευθύνονται δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις (Zaganas και Plaitakis, 2002). Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση της Arg443 της GDH1 από Ser στη GDH2 ελαχιστοποιεί την βασική δραστηριότητα αλλά επιτρέπει την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου με ADP. Η δεύτερη αντικατάσταση (Gly 456 από Ala) προσδίδει ανθεκτικότητα στην αναστολή από GTP και καταργεί τη θετική συνεργατικότητα αυτής της αναστολής. Συγκεκριμένα η αλλαγή Arg443Ser είναι αρκετά ενδιαφέρουσα καθότι αλλάζει τη διαμόρφωση του ενζύμου “κλειδώνοντάς” το στην κλειστή διαμόρφωση όπου δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί παρά μόνο με επαρκείς συγκεντρώσεις ADP (Zaganas et al.,2002).



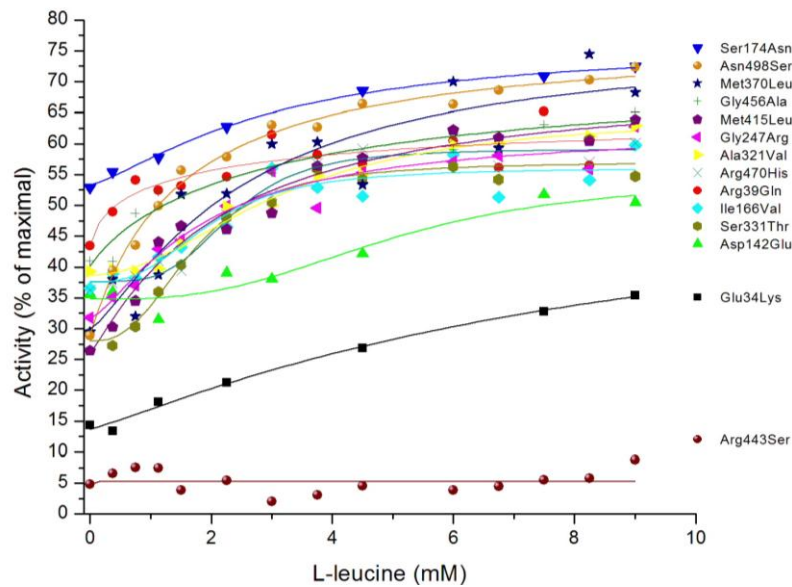
Εικ.1.: Δύο υπομονάδες GDH και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους μέσω της antenna με τη δημιουργία του δεσμού υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων 443 και 409 των δύο διαφορετικών υπομονάδων(Zaganas et al.,2002).

Η Arg στη θέση 443 στην κατιούσα έλικα της αντέννας της μιας υπομονάδας σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με τη Ser στη θέση 409 της ανιούσας έλικας της αντέννας της άλλης υπομονάδας, δεσμός ο οποίος διατηρείται καθ'όλη τη διάρκεια της δομικής περιστροφής κατά την κατάλυση, αλλά δεν είναι δυνατόν να δημιουργηθεί όταν η Arg αντικαθιστάται από Ser στη GDH2. Η προσθήκη όμως επαρκών ποσοτήτων ADP μπορούν να ενεργοποιήσουν το ένζυμο ξεπερνώντας αυτόν το σκόπελο. Παρομοίως και η ενεργοποίηση από τη λευκίνη είναι αδύνατη απουσία ADP, αλλά με προσθήκη ακόμα και μικρών συγκεντρώσεων αυτού, η δράση των δύο τροποποιητών φαίνεται να είναι συνεργατική. Επειδή η ενεργοποίηση από το ADP σχετίζεται με την ανοιχτή διαμόρφωση του ενζύμου, τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα πως πιθανώς η θέση πρόσδεσης του αμινοξέος αυτού είναι εντός της ευρύτερης περιοχής της καταλυτικής σχισμής του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η κλειστή διαμόρφωση της hGDH1-Arg443Ser πιθανώς εμποδίζει την L-λευκίνη να εισέλθει στο ενεργό κέντρο (Zaganas et al., 2002; Mastorodemos et al., 2005; Kanavouras et al., 2007, 2009) ενώ τα δεδομένα των Fang et al., 2002 πως μεταλλαγές στα σημεία πρόσδεσης των GTP και ADP δεν επηρεάζουν την ενεργοποίηση από L-λευκίνη αλλά και το ότι η απαλοιφή της antenna της hGDH1 ή αντικατάστασή της με εκείνη των βακτηρίων διατηρεί την ενεργοποίηση από L-λευκίνη, αλλά όχι την ρύθμιση από ADP και GTP (Allen et al., 2004), επιβεβαιώνουν αυτή την υπόθεση. Επιπλέον η hGDH2 η οποία έχει στη θέση 443 τη σερίνη, ενεργοποιείται από τη L-λευκίνη σε απουσία ADP σε παρόμοια επίπεδα με αυτά της hGDH1 (Kanavouras et al, 2007). Επιπλέον, η ευαισθησία των 2 ισοενζύμων στο αμινοξύ όπως φαίνεται από τις τιμές SC₅₀, είναι παρόμοια (Kanavouras et al, 2007).

Για να ελέγξουμε πως από τη χαμηλή βασική δραστηριότητα και την αδυναμία ενεργοποίησης από την L-λευκίνη της hGDH1- Arg443Ser φτάνουμε στο πρότυπο ενεργοποίησης της hGDH2 μελετήσαμε ένα ένα όλα τα ένζυμα με τις μονές μεταλλαγές στα σημεία που διαφέρουν οι δύο ισομορφές αλλά και διάφορα ένζυμα με περισσότερες της μίας μεταλλαγές που όμως όλα περιείχαν τη μεταλλαγή Arg443Ser.

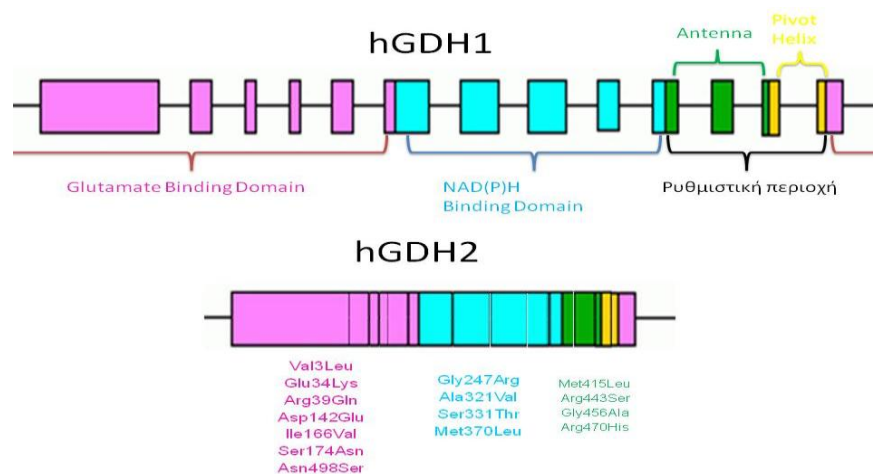
Η μελέτη των φυσιολογικών ενζύμων έδειξε όπως είναι ήδη γνωστό πως τα δύο ισοένζυμα έχουν σημαντικές διαφορές στην ενεργοποίηση από τη λευκίνη. Φαίνεται πως αναλογικά η λευκίνη έχει μεγαλύτερη επίδραση στη hGDH2 καθώς πρόκειται για ένα ένζυμο που έχει σημαντικά χαμηλότερη βασική δραστηριότητα σε σχέση με το hGDH1 και η μέγιστη ενεργοποίησή του είναι μεγαλύτερη από το hGDH1. Τα

μεταλλαγμένα ένζυμα παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα όσων αφορά την επίδραση της λευκίνης, Αρχικά προσπαθήσαμε να παρουσιάσουμε όλες τις μεταλλάξεις σε ένα γράφημα (Εικ.2), αλλά το αποτέλεσμα ήταν αρκετά δυσανάγνωστο και ενώ μπορείς να ξεχωρίσεις με μια πρώτη ματιά κάποιες διαφορές μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών ενζύμων, δεν μπορείς να ξεχωρίσεις τις ουσιαστικές διαφορές μεταξύ τους.



Εικ.2: Γραφική απεικόνιση των καμπύλων ενεργοποίησης όλων των μεταλλαγμένων ενζύμων

Χωρίσαμε λοιπόν τις μεταλλαγές ανάλογα με την περιοχή στην οποία βρίσκονται (Εικ.3).



Εικ.3: Σχηματική απεικόνιση των δύο γονιδίων *GLUD1* και *GLUD2*, χωρισμένα ανάλογα τη λειτουργική περιοχή. Με ροζ είναι η περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού, με γαλάζιο η περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)H, με πράσινο η περιοχή της antenna και με κίτρινο η πινोट helix. Το *GLUD1* είναι χωρισμένο στα 13 εξόνια, ενώ το *GLUD2* δεν περιέχει ιντρόνια

Όπως φαίνεται και στις εικόνες 2,3,4 στην παράγραφο “Αποτελέσματα”, η περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού περιέχει τις αλλαγές εκείνες που επηρεάζονται περισσότερο όσον αφορά την ενεργοποίηση από λευκίνη. Οι μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του NAD(P)H και στη ρυθμιστική περιοχή δεν έχουν σημαντικές επιδράσεις στην ενεργοποίηση όπως ήταν αναμενόμενο, με μοναδική εξαίρεση την Arg443Ser. Οι μεταλλαγές Glu34Lys και Asp142Glu στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού ελαττώνουν την ενεργοποίηση από L-λευκίνη ενώ η Arg443Ser την καταργεί εντελώς.

Από αυτά τα αρχικά δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ευρύτερη περιοχή του ενεργού κέντρου παίζει ρόλο στη δράση της λευκίνης. Το σημαντικότερο όμως σε αυτό το σημείο είναι να δούμε κατά πόσο αυτό το φαινόμενο μπορεί να διορθωθεί. Πράγματι, με προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων ADP αποκαταστάθηκε η δυνατότητα των δύο μεταλλαγμένων ενζύμων (hGDH1-Glu34Lys και hGDH1-Asp142Glu) να ενεργοποιούνται από τη λευκίνη. Άρα, το ADP αλλάζοντας τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου, επιτρέπει την πρόσδεση της L-λευκίνης, αναστρέφοντας την επίδραση των μεταλλάξεων.

Μελετώντας τα ένζυμα με τις πολλαπλές μεταλλαγές, τα αποτελέσματα είναι πολύ ενδιαφέροντα. Ξεκινώντας από το hGDH1-Arg443Ser το οποίο έχει πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα και δεν ενεργοποιείται από τη λευκίνη απουσία ADP, η προσθήκη μεταλλαγών φαίνεται να ανεβάζει τα επίπεδα τόσο της βασικής δραστηριότητας, όσο και την ενεργοποίηση του ενζύμου, αλλά η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από την αλλαγή που προστίθεται κάθε φορά. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της Gly456Ala στην hGDH1-Arg443Ser προκάλεσε μια ελάχιστη αύξηση στη βασική δραστηριότητα όπως είναι ήδη γνωστό (Kanavouras et al, 2007), αλλά φαίνεται πως δεν επηρεάζεται κατά πολύ η δράση της λευκίνης. Όταν μελετήσαμε το hGDH1 ένζυμο στο οποίο είχαμε αφαιρέσει την antenna και προσθέσει εκείνη της hGDH2 (hybrid), η λευκίνη δεν κατάφερε να ενεργοποιήσει το ένζυμο σε ικανοποιητικά επίπεδα και η βασική του δραστηριότητα ήταν σε αρκετά χαμηλά επίπεδα. Βλέπουμε λοιπόν πως αφενός οι αλλαγές που κάναμε δεν ήταν σε θέση να αναστρέψουν το φαινότυπο της hGDH1-Arg443Ser που δημιουργείται εξαιτίας της διαμόρφωσης που παίρνει το ένζυμο και αφετέρου, βλέπουμε πως σε αντίθεση με τους Allen et al., 2004, οι οποίοι αφαίρεσαν εντελώς ή αντικατέστησαν την antenna με την αντίστοιχη βακτηριακή και δεν επηρεάστηκε η δράση της λευκίνης, η αντικατάσταση της antennas της hGDH1 με αυτή της hGDH2 ελαττώνει κατά πολύ

την ικανότητα του ενζύμου να ενεργοποιηθεί από τη λευκίνη. Το γεγονός αυτό φαίνεται πως οφείλεται εξολοκλήρου στη διαμόρφωση που παίρνει το ένζυμο εξαιτίας της Arg443Ser.

Η ενεργοποίηση του hGDH1- Asn174/Ser443/Ala456 σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του hGDH2 μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η Ser174Asn προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης από L-λευκίνη προσδίδοντας στην hGDH2 τις τελικές της ιδιότητες. Φαίνεται πως η αλλαγή της Ser στη θέση 174 από Asn, φέρνει το ένζυμο σε τέτοια διαμόρφωση ώστε να διευκολύνεται η κατάλυση καθώς το ένζυμο με τη μονή μεταλλαγή έχει αρκετά αυξημένη βασική δραστηριότητα, την υψηλότερη ανάμεσα στα μεταλλαγμένα hGDH1 ένζυμα. Η προσθήκη αυτής της αλλαγής στο διπλό μετάλλαγμα, αυξάνει τη βασική του δραστηριότητα και επαναφέρει την ικανότητα ενεργοποίησης από τη λευκίνη.



Εικ.4: Κρυσταλλογραφική ανάλυση μιας υπομονάδας hGDH1 (από PDB: 1L1F). Με κόκκινο φαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία διαφέρουν μεταξύ των δύο ισομορφών.

Οι αλλαγές που σχετίζονται με την επίδραση της λευκίνης όπως φαίνονται στην Εικόνα 4, είναι αρκετά κοντά στο ενεργό κέντρο, ή φαίνεται πως ίσως να αλληλεπιδρούν με αυτό (αλληλεπίδραση υπομονάδων). Είναι σαφές πως από την παρούσα μελέτη δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα ως προς την ακριβή θέση πρόσδεσης του αμινοξέος αυτού αν δε γίνουν περαιτέρω δομικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες. Είναι όμως αρκετά σαφές, πως η L-λευκίνη ενεργοποιεί

αναλογικά περισσότερο το hGDH2. Οι μεταλλαγές Arg443Ser, Glu34Lys και Asp142Glu προκαλούν ελάττωση της ενεργοποίησης από L-λευκίνη με το ADP να διορθώνει αυτό το πρόβλημα αλλάζοντας τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Η Ser174Asn προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης από L-λευκίνη προσδίδοντας έτσι στη hGDH2 τις τελικές της ιδιότητες. Η προσθήκη ADP ελαττώνει τη συγκέντρωση της L-λευκίνης η οποία απαιτείται για να ενεργοποιηθεί το ένζυμο, αλλά η μοναδική ικανότητα της hGDH2 να μπορεί να ενεργοποιηθεί ικανοποιητικά από τη λευκίνη ακόμα και σε απουσία ADP, αναδεικνύει τις μοναδικές ιδιότητες του ενζύμου αυτού που το έκαναν να ξεχωρίζει από το hGDH1 και να μπορεί να είναι πλήρως λειτουργικό στις ιδιαίτερες συνθήκες τις οποίες βρίσκεται μέσα στα κύτταρα. Πιθανώς, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της δεύτερης αυτής ισομορφής, χρειάστηκε κάποια ιδιαίτερη ρύθμιση για να μπορεί να διατηρείται η ικανότητα ενεργοποίησης από κάποιο άλλο μόριο τροποποιητή πέραν του βασικού ADP.

Περαιτέρω μελέτες, τόσο ενζυμικές όσο και δομικές, και στις δύο φυσιολογικές ισομορφές αλλά και σε μεταλλαγμένα ένζυμα θα ρίξουν φως σε αυτό το μυστήριο.



V. Βιβλιογραφία

1. Allen A, Kwagh J, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry*. 2004 Nov 16;43(45):14431-43.
2. Aoki C, Milner TA, Berger SB, Sheu KF, Blass JP, Pickel VM (1987). Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J Neurosci Res* 2, 305-318
3. Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley C, Smith T. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* 2003; 42:3446-56.
4. Burki F, Kaessmann H. Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat Genet*. 2004 Oct;36(10):1061-3.
5. Chee P, Dahl J, Fahien L. The purification and properties of rat brain glutamate dehydrogenase. *J Neurochem* 1979; 33:53-60.
6. Cho S, Lee J, Choi S. Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. *Eur J Biochem* 1995; 233:340-6.
7. Colen AH, Prough RA, Fisher HF. The Mechanism of Glutamate Dehydrogenase Reaction. IV. Evidence for random and rapid binding of substrate and coenzyme in the burst phase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247:7905-7909.
8. Colon A, Plaitakis A, Perakis A, Clarke DD. (1986). Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem* 46:1811–1819.
9. Cooper AJ, McDonald JM, Gelbard AS, Gledhill RF, Duffy TE. The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:4982-4992.
10. Fang, B.Y. Hsu, C.M. MacMullen, M. Poncz, T.J. Smith and C.A. Stanley, Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations, *Biochem. J.* 363 (2002), pp. 81–87
11. Farinelli SE, Nicklas WJ. Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J Neurochem*. 1992 May;58(5):1905-15.
12. George A, Bell J. Effects of adenosine 5'-diphosphate on bovine glutamate dehydrogenase: diethyl pyrocarbonate modification. *Biochemistry* 1980; 19:6057-61.
13. Gylfe E., 1976 Comparison of the effects of leukines, non-metabolizable leukines analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat.* 13:20-4
14. Hudson RC, Daniel RM. L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp Biochem Physiol B.* 1993 Dec;106(4):767-92
15. Hussain M, Zannis V, Plaitakis A. Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins

- purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:20730-20735.
16. Kanavouras K, Borompokas N, Latsoudis H, Stagourakis A, Zaganas I, Plaitakis A. Mutations in human glutamate Dehydrogenase affecting basal activity and regulation *J Neurochem* 2009
 17. Kanavouras K., Mastorodemos V., Borompokas N., Spanaki C., Plaitakis A. 2007 Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue- specific) glutamate dehydrogenase. *J. Neurosci. Res.* 85:1101-1109
 18. Kelly A, Stanley C. Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7:287-95.
 19. Kuo N, Michalik M, Erecinska M. Inhibition of Glutamate Dehydrogenase in Brain Mitochondria and Synaptosomes by Mg^{2+} and Polyamines: A Possible Cause for Its Low In Vivo Activity. *J Neurochem* 1994; 63:751-757.
 20. Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res* 2005; 79:65-73.
 21. Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis VI, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas NK. 1988. Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3494–3498.
 22. Michaelides TM, Tzimagiorgis G, Moschonas NK and Papamatheakis J (1993) The human glutamate dehydrogenase gene family. Gene organization and structural characterization. *Genomics* 16, 150-160
 23. Naito S., Ueda T., 1985, Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44(1): 99-109
 24. Peterson PE, Pierce J, Smith TJ. Crystallization and Characterization of Bovine Liver Glutamate Dehydrogenase. *Journal of Structural Biology* 1997; 120:73-77.
 25. Peterson PE, Smith TJ. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure with Folding & Design* 1999; 7:769-782.
 26. Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. (1982). Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216:193–196.
 27. Plaitakis A, Metaxari M and Shashidharan P (2000), Nerve-tissue specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function. *J Neurochem.* 75, 1862-1869
 28. Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247: 1125-35.
 29. Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochemistry*

International 2003; 43:401-410.

30. Plaitakis A, Zaganas I. Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J Neurosci Res* 2001; 66:899-908.
31. Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. (1994). Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 62:1134–1146.
32. Schmitt A, Kugler P. Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1999;92(1):293-308.
33. Sener A, Malaisse W. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 1980; 288:187-9.
34. Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse W. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:5460-4.
35. Shashidharan P, Michaelides TM, Robakis NK, Kretsovali A, Papamatheakis J and Plaitakis A (1994a). Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem* 269 16971-16976
36. Shashidharan P, Clarke DD, 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
37. Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate Dehydrogenase. *The Enzymes* (Boyer PD editor). 1975 Vol 11: 293-367. New York, Academic Press
38. Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanisms of purine regulation. *Journal of Molecular Biology* 2001; 307:707-720.
39. Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G and Stanley CA (2002). The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery *J Mol Biol* 318, 765-777
40. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21:56–63.
41. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E and Poncz M (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *New Engl. J.Med.* 338, 1352-1357
42. Tzimigiorgis G, Adamson M, Kozak C, Moschonas N. Chromosomal mapping of glutamate dehydrogenase gene sequences to mouse chromosomes 7 and 14. *Genomics* 1991; 10:83-8.
43. Waniewski RA, Martin DL. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem*. 1986 Jul;47(1):304-13.

44. Werner P, Pitt D, Raine CS. 2001. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50:169–180
45. Zaganas I, Kanavouras K, Mastorodemos V, Latsoudis H, Spanaki C, Plaitakis A. The human *GLUD2* glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects. *Neurochem Int* 55: 52-63, 2009.
46. Zaganas I and Plaitakis A (2002). Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behaviour of the enzyme, *J Biol Chem* 277, 26422-26428
47. Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M and Plaitakis A (2002). Substitution of Ser for Arg 443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine *J Biol Chem* 277,46552-58