



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



---

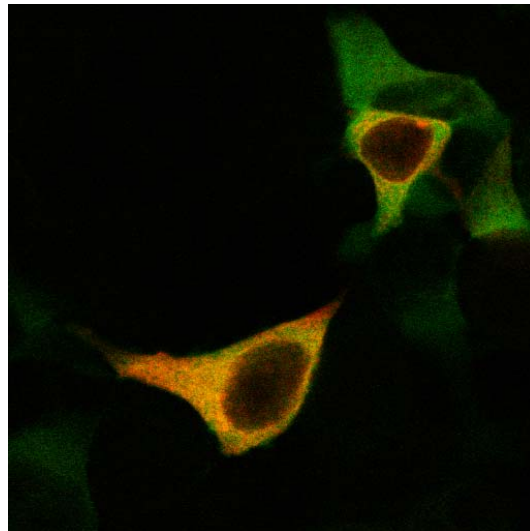
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ**  
**ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Κοτζαμάνη Δήμητρα

**ΤΙΤΛΟΣ**

**‘Μελέτη του ρόλου του οδηγού πεπτιδίου των GLUD1 και GLUD2**  
**ισομορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης’**



**Υπεύθυνος καθηγητής: ΠΛΑΪΤΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**  
**Καθηγ. Νευρολογίας**

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2006

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:**

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **ΕΝΟΤΗΤΑ Α**

- 1.A.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ
- 1.A.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ
- 1.A.3. ΜΟΡΦΕΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ
- 1.A.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ
  - I. Ενεργειακή ομοιόσταση
  - II. Σύνθεση αμινοξέων- πρωτεϊνών
  - III. Ομοιόσταση αμμωνίας –Κύκλος ουρίας
- 1.A.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ GDH ΣΤΟ ΚΝΣ
  - GDH και νευρολογικά νοσήματα
- 1.A.6. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ GDH ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

#### **ΕΝΟΤΗΤΑ Β. ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ**

- 1.B.1. ΓΕΝΙΚΑ
- 1.B.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΘΟΔΗΓΗΤΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ
- 1.B.3. ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ
- 1.B.4. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΣΤΡΩΜΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.
- 1.B.5. ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΣΩ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

### **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

### **3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

- 3.1. ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ
- 3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ GFP ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ hGDH1 ΚΑΙ hGDH2
- 3.2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
  - 3.2.1 Επιλογή κυτταρικής σειράς
  - 3.2.2 Κυτταροκαλλιέργεια
  - 3.2.3 Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο κατακρήμνισης του χλωριούχου ασβεστίου

3.1. Μονιμοποίηση κυττάρων και παρατήρηση σε πολυεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού

3.3 ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΔΗΓΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ GLUD1 ΚΑΙ GLUD2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

3.4.1 Δομή του πλασμιδιακού φορέα υποκλωνοποίησης pEGFP-N3

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

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΟΔΗΓΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΩΝ GLUD1 ΚΑΙ GLUD2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.1.1. Τα αμινοτελικά πεπτίδια των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg και σε υδρόφοβα κατάλοιπα Leu και Ala.

4.1.2 Τα αμινοτελικά πεπτίδια των GLUD1 και GLUD2 παρουσιάζουν ισχυρή πιθανότητα διαμόρφωσης σε α-έλικες σε περισσότερα του ενός σημεία στο μόριο τους.

4.1.3 Ανάλυση προβολής α-έλικας και προσδιορισμός βαθμού αμφιφιλικότητας

4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

4.2.1 Οι φυσιολογικές πλήρους μήκους GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP χιμαιρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια.

4.2.2 Το αμινοτελικό οδηγό πεπτίδιο είναι απαραίτητο για την είσοδο των GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.

4.2.3 Αρχικά αποτελέσματα από την έκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που εκφράζουν τις ελλειμματικές μορφές του GLUD2 οδηγού πεπτιδίου

4.2.4. Υποκυτταρική κατανομή της EGFP πρωτεΐνης (control)

## **5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

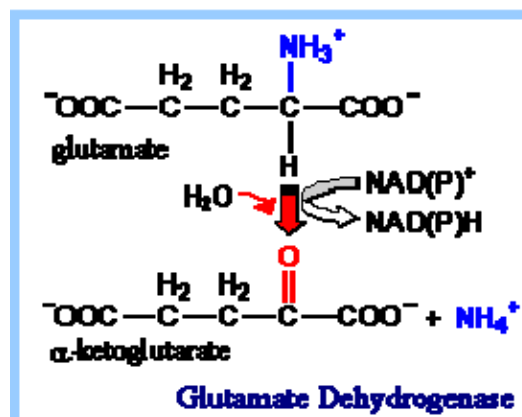
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κεφάλαιο αυτό διαιρείται νοηματικά σε δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τη λειτουργία, τις μορφές και την εντόπιση της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών. Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται οι μηχανισμοί καθοδήγησης των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, όπως επίσης και οι ιδιότητες και τα δομικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών ‘οδηγών’ αλληλουχιών (mitochondrial leader sequences).

### ΕΝΟΤΗΤΑ Α

#### 1.Α.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (glutamate dehydrogenase, GDH) καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό, χρησιμοποιώντας NAD ή/και NADP ως συνένζυμα (Smith και συν, 1975). Η αντίδραση αυτή συνδέει τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτόν των υδατανθράκων, καθώς το α-κετογλουταρικό είναι σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλου Crebs). Πράγματι, το ένζυμο έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, την ομοιόσταση ενέργειας, ενώ συμμετέχει και στον κύκλο της ουρίας (Hudson and Daniel, 1993).



**Εικόνα 1.1:** Η αντίδραση οξείδωσης του γλουταμικού προς α-κετογλουταρικό και αμμωνία που καταλύεται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (GDH).

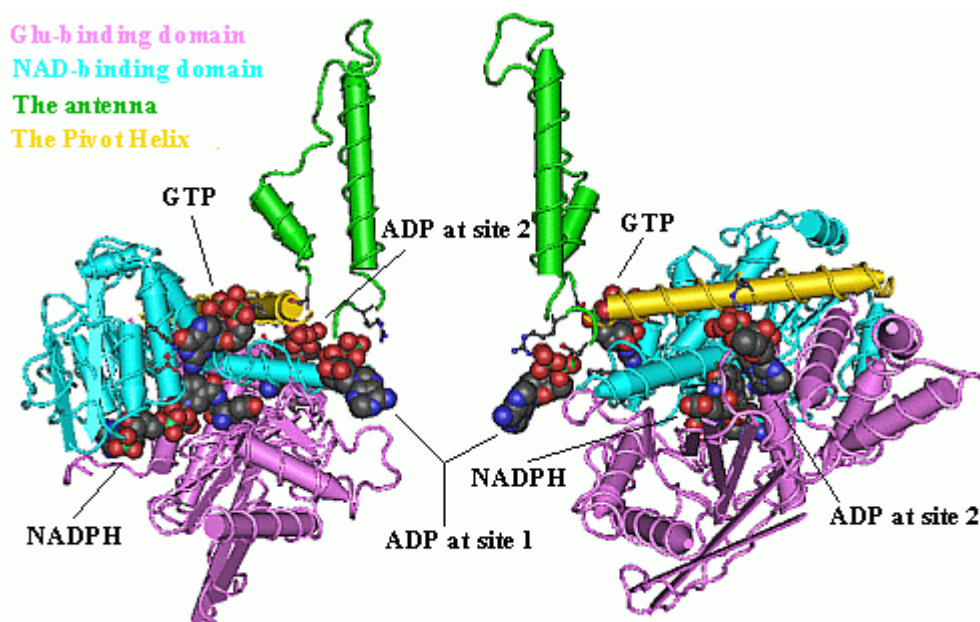
Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς, γεγονός που αναδεικνύει και τη σπουδαιότητά

τους. Διακρίνονται 3 κύριοι τύποι GDH ανάλογα με τη χρήση NAD(H) ή NADP(H) ως συνενζύμου: αυτές που είναι ειδικές για NAD, αυτές που χρησιμοποιούν εκλεκτικά το NADP, και τέλος οι GDH διπλής ειδικότητας που δύνανται να χρησιμοποιήσουν και τα δύο συνένζυμα. Οι πρώτοι δύο τύποι (μονής ειδικότητας ένζυμα) απαντώνται κυρίως στους μικροοργανισμούς, στους οποίους η αντίδραση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού (καταβολική οδός) καταλύεται συνηθέστερα από ειδικές για NAD GDH, ενώ η αναβολική αντίδραση της σύνθεσης του γλουταμικού από α-κετογλουταρικό και αμμωνία καταλύεται από ειδικές για NADP GDH. Η δυνατότητα χρησιμοποίησης είτε NAD είτε NADP για την κατάλυση της αντίδρασης προς τη πλευρά της οξείδωσης ή της σύνθεσης γλουταμικού αντίστοιχα, αποτελεί χαρακτηριστικό των GDH κυρίως των ζωικών κυττάρων. Παρά το γεγονός ότι θερμοδυναμικά η αντίδραση της GDH ευνοείται προς την κατεύθυνση της σύνθεσης γλουταμικού, στα θηλαστικά η κατεύθυνση της αντίδρασης *in vivo* πιστεύεται ότι είναι στενά ρυθμιζόμενη και εξαρτάται από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, την τοπική συγκέντρωση των υποστρωμάτων (π.χ γλουταμικό, αμμωνία), και την παρουσία ή όχι αλλοστερικών τροποποιητών. Εξάλλου, αυτή η δυνατότητα στενής ρύθμισης της ενζυμικής της δραστηριότητας αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών, που την διαφοροποιεί από τις GDH των απλούστερων οργανισμών.

### **1.A.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ**

Η GDH των θηλαστικών είναι ένα ομοπολυμερές, αποτελούμενο από έξι υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες έχει μοριακό βάρος περίπου 56 kDa και αποτελείται από 505 αμινοξέα. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των GDH του ανθρώπου, του βοός, του μύος και επίμυος έχουν χαρακτηριστεί και επιδεικνύουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ένζυμο έχει διατηρηθεί στην εξελικτική πορεία των ειδών. (Mavrothalassitis και συν, 1988). Η τριτοταγής δομή κάθε υπομονάδας της GDH έχει καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Smith και συν, 2001, 2002) αποκαλύπτοντας την ύπαρξη τριών βασικών περιοχών: 1) την περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού στο αμινοτελικό άκρο, 2) την περιοχή σύνδεσης του NAD(P), και 3) την περιοχή της κεραίας (antenna), η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου.[Εικόνα 2]. Εξάλλου, η δυνατότητα αλλοστερικής ρύθμισης διαφοροποιεί τις γλουταμικές αφυδρογονάσεις των

θηλαστικών από αυτές των προκαρυωτικών οργανισμών, οι οποίες στερούνται της περιοχής της antenna. Οι κύριοι αλλοστερικοί ενεργοποιητές του ενζύμου είναι το ADP, η L-Leucine και το  $\text{NAD(P)}^+$ , ενώ οι κύριοι αλλοστερικοί αναστολείς είναι το GTP και το  $\text{NAD(P)H}$ .



**Εικόνα 1.2. Κρυσταλλογραφική δομή μία μονομερούς υπομονάδας GDH.**

Η GDH των θηλαστικών είναι ένα ομοεξαμερές αποτελούμενο από έξι όμοιες υπομονάδες GDH. Κάθε υπομονάδα περιλαμβάνει: α) μία αμινοτελική περιοχή δέσμευσης γλουταμικού (απεικονίζεται με μοβ χρώμα), β) μία περιοχή που δεσμεύει  $\text{NAD(P)}^+$  πάνω από την περιοχή δέσμευσης γλουταμικού (γαλάζιο χρώμα), γ) μία προβολή 48 αμινοξέων *-antenna-* (πράσινο χρώμα), η οποία εκτείνεται στην κορυφή της περιοχής δέσμευσης  $\text{NAD(P)}^+$ , δ) μία  $\alpha$ -έλικα, η οποία ονομάζεται 'pivot helix' (κίτρινο χρώμα), γύρω από την οποία περιστρέφεται η περιοχή δέσμευσης  $\text{NAD(P)}$  κατά την έναρξη της κατάλυσης. Επίσης οι *αντένες* από τρεις υπομονάδες περιελίσσονται η μία γύρω από την άλλη και υφίστανται δομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται και οι σχετικές θέσεις πρόσδεσης των αλλοστερικών τροποποιητών ADP και GTP, οι οποίοι απεικονίζονται ως σφαίρες.

### 1.A.3. ΜΟΡΦΕΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η ανθρώπινη GDH υπάρχει σε δύο ισομορφές, hGDH1 και hGDH2, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* αντίστοιχα, και οι οποίες διαφέρουν, στην ώριμη μορφή τους, σε 15 από τα 505 αμινοξέα τους. Το γονίδιο

*GLUD1* περιέχει 13 εξόνια, είναι αυτοσωματικό (χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10) (Michaelides και συν, 1993) και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (γονίδιο κυτταρικής οικονομίας, house-keeping gene). Αντιθέτως, το γονίδιο *GLUD2* βρίσκεται στο X χρωμόσωμα, δεν περιέχει ιντρόνια και εκφράζεται ειδικώς στο νευρικό ιστό και στους όρχεις (Shashidharan και συν, 1994). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το χωρίς ιντρόνια *GLUD2* γονίδιο έχει προκύψει από το *GLUD1* γονίδιο με μηχανισμό ρετρομετάθεσης σε κάποιο κοινό πρόγονο του ανθρώπου και των πιθήκων (Burki και Kaessmann, 2004). Στη συνέχεια, ο συνδυασμός τυχαίων μεταλλάξεων και θετικής εξελικτικής πίεσης προσέδωσαν στο γονίδιο *GLUD2* τις σημερινές του ιδιότητες και επέτρεψαν στο δεύτερο ισοένζυμο (hGDH2) να προσαρμοστεί στις ιδιαίτερες μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου.

Παρά τις μικρές τους διαφορές σε αμινοξική αλληλουχία, τα δύο ένζυμα ανθρώπινης GDH διαφέρουν σημαντικά ως προς τις κινητικές τους ιδιότητες και την αλλοστερική ρύθμιση. Ειδικότερα:

1. Η *GLUD1* έχει σημαντική βασική δραστηριότητα (40-45% της μέγιστης) επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών. Επιπλέον, αναστέλλεται ισχυρά από το GTP ( $I_{c50} = 0,2 \mu M$ ), 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  $\beta$  κύτταρα του παγκρέατος (Stanley και συν, 1998).
2. Το *GLUD2* είναι ανθεκτικό στην ανασταλτική δράση του GTP. Παρουσιάζει χαμηλή βασική δραστηριότητα (5-10% της μέγιστης), η οποία αποκαθίσταται πλήρως από το ADP και την L-λευκίνη (Plaitakis, Metaxari και Shashidharan, 2000). 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  $ATP \rightarrow ADP$ ), το παραγόμενο ADP προκαλεί τον επιταχυνόμενο μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος μέσω δραστηριοποίησης της GDH. Επίσης, η μη δράση του GTP στο *GLUD2* επιτρέπει στο ένζυμο να λειτουργεί στον νευρικό ιστό, ο οποίος έχει υψηλότερα επίπεδα GTP από άλλους ιστούς. Τέλος εμφανίζει απουσία ανθεκτικότητας στην απενεργοποίηση από θερμότητα (θερμο-ευαίσθητο).

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 μέγιστης) 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.

#### **1.A.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ**

Η έκφραση της GLUD1 γλουταμικής αφυδρογονάσης σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών (housekeeping) αντανάκλα τη μεγάλη σημασία του ενζύμου αυτού στη λειτουργία των κυττάρων. Έχει υπολογιστεί ότι σε ορισμένα κύτταρα αποτελεί μέχρι και το 10% της ολικής πρωτεΐνης του μιτοχονδριακού στρώματος (matrix). Στα όργανα με τα υψηλότερα επίπεδα GDH περιλαμβάνονται ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι νεφροί, το πάγκρεας, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, με τα υψηλότερα επίπεδα να ανευρίσκονται στο ήπαρ (Smith και συν, 1975). Παρακάτω παρουσιάζονται οι γενικές, για όλους τους ιστούς, λειτουργίες της GDH, που αφορούν την ομοιόσταση και το μεταβολισμό, ενώ η ειδική για το νευρικό σύστημα λειτουργία της GDH θα παρουσιαστεί σε χωριστή παράγραφο.

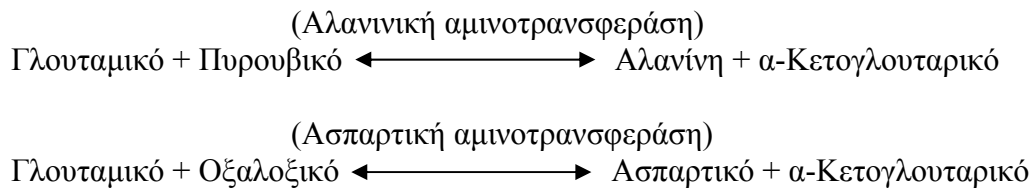
##### **I. Ενεργειακή ομοιόσταση**

Όπως έχει αναφερθεί, η GDH καταλύει τη μετατροπή του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό. Η σύνθεση του α-κετογλουταρικού οδηγεί μέσω του κύκλου του Crebs στη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP ή GTP. Καθώς τα τελευταία τριφωσφορικά νουκλεοτίδια αποτελούν αλλοστερικούς αναστολείς της GDH, ενώ το ADP δρα ως αλλοστερικός ενεργοποιητής, πιστεύεται ότι το ένζυμο μπορεί να λειτουργεί ως ‘ενεργειακός αισθητήρας’, ανταποκρινόμενο στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Έτσι, λοιπόν, η GDH μπορεί να χρησιμοποιήσει την οξειδωση αμινοξέων (μέσω γλουταμικού) για τη παραγωγή ενέργειας, σε περιπτώσεις που μειώνεται το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου (όπως αυτό καθορίζεται από το λόγο ATP/ADP).



## II. Σύνθεση αμινοξέων- πρωτεϊνών

Το αμινοξύ γλουταμικό αποτελεί την απαραίτητη πρόδρομη ουσία για τη παραγωγή των αμινοξέων γλουταμίνη, προλίνη, αργινίνη. Επίσης, το γλουταμικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των περισσότερων μη απαραίτητων αμινοξέων μέσω μιας εκ των αντιδράσεων τρανσαμίνωσης. Στις αντιδράσεις αυτές, που καταλύονται από τα ένζυμα αμινο-τρανσφεράσες, μία α-αμινομάδα μεταφέρεται από ένα αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ για να παραχθεί ένα άλλο αμινοξύ. Έτσι, για παράδειγμα, τα αμινοξέα αλανίνη και ασπαρτικό συντίθενται από τα καρβοξυλικά οξέα πυρουβικό και οξαλοξικό με τη δράση των ενζύμων αλανινική και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση αντίστοιχα:



Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι πλήρως αναστρέψιμες. Η σημασία της αντίστροφης αντίδρασης είναι μεγάλη, καθώς επιτρέπει τη μεταφορά του αζώτου από την αλανίνη και το ασπαρτικό προς το γλουταμικό. Αυτό είναι το πρώτο βήμα στην αποδόμηση των αμινοξέων. Ο ρόλος της GDH είναι σημαντικός στην ολοκλήρωση της αποδόμησης αμινοξέων, καθώς καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία. Έτσι, το αμινικό άζωτο διοχετεύεται προς το γλουταμικό και μέσω της GDH απελευθερώνεται ως ελεύθερη αμμωνία, ενώ οι ανθρακικοί σκελετοί που απομένουν μετά την απομάκρυνση του αμινικού αζώτου μπορούν να εισέλθουν στον κύκλο του Crebs και να οξειδωθούν.

Καθώς η GDH ρυθμίζει τα επίπεδα γλουταμικού μέσα στο κύτταρο, είναι πιθανόν, μέσω των οδών που αναφέρθηκαν παραπάνω, να επηρεάζει έμμεσα και τη σύνθεση και αποδόμηση άλλων αμινοξέων.

## III. Ομοιόσταση αμμωνίας –Κύκλος ουρίας

Η GDH έχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της αμμωνίας μέσα στα κύτταρα καθώς συμβάλλει μέσω απαμίνωσης του γλουταμικού στο μεταβολισμό της α-αμινομάδας των περισσότερων αμινοξέων. Κι αυτό γιατί κατά την αποδόμηση των αμινοξέων η α-αμινομάδα τους μεταφέρεται μέσω αμινοτρανσφερασών στο α-κετογλουταρικό για να σχηματιστεί γλουταμικό, το οποίο στη συνέχεια απαμινώνεται

οξειδωτικά από τη GDH για να παραχθεί  $\text{NH}_4^+$ . Στη συνέχεια, στα περισσότερα χερσαία σπονδυλωτά, το ιόν  $\text{NH}_4^+$  μετατρέπεται σε ουρία, η οποία απεκκρίνεται. Ο κύκλος της ουρίας είναι εξαιρετικά σημαντικός γιατί είναι ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης της αμμωνίας, τα υψηλά επίπεδα της οποίας είναι τοξικά για τον άνθρωπο.

#### 1.A.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ 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. Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός γλουταματεργικών νευρώνων στο ΚΝΣ, οι οποίοι είναι ευρέως κατανεμημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη πυκνότητα γλουταματεργικών συνάψεων είναι τα βασικά γάγγλια, ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας, ο ιππόκαμπος, οι θαλαμικές περιοχές της μέσης γραμμής (Aoki και συν 1987).

Η γλουταμική αφυδρογονάση φαίνεται ότι έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο και αυτό αντανακλάται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της σε αυτό το όργανο είναι ιδιαίτερα ψηλές. Οι περισσότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Aoki και συν, 1987, Rothe και συν, 1994) δείχνουν ότι το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως σε αστροκύτταρα, ενώ μικρότερη ανοσοδραστικότητα ανευρίσκεται σε νευρωνικούς πληθυσμούς. Πιο πρόσφατες μελέτες στη λευκή ουσία εγκεφάλου αρουραίου (Schmitt και συν, 1999) αλλά και ανθρώπου (Werner και συν, 2001) αποκάλυψαν ότι η GDH είναι παρούσα σε σημαντικά ποσά και σε ολιγοδενδροκύτταρα.

Σημαντική ετερογένεια παρατηρείται στην κατανομή της GDH στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Οι Aoki και συν (1987) έδειξαν ότι υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση GDH σε περιοχές που δέχονται πυκνή γλουταματεργική νευρώση. Σε αυτές τις περιοχές, η GDH ανευρίσκεται κυρίως σε αστροκυτταρικές αποφύσεις που περιβάλλουν γλουταματεργικές νευρικές απολήξεις, παρέχοντας έμμεσες ενδείξεις ότι το ένζυμο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού στις συνάψεις. Κάτι τέτοιο άλλωστε έχει προταθεί από παλιά από τους Plaitakis και συν (1982). Πάντως, οι Cooper και συν (1979) έδειξαν ότι η GDH δε φαίνεται να συμμετέχει άμεσα στη σύνθεση του γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ, παρότι θερμοδυναμικά ευνοείται η κατεύθυνση της αντίδρασης προς τη παραγωγή

γλουταμικού. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι ραδιοσημασμένη αμμωνία χορηγούμενη σε αρουραίους δεν ενσωματώνεται στο γλουταμικό στον εγκέφαλό τους. Αντίθετα, η σύνθεση στους νευρώνες του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού πιστεύεται ότι γίνεται από α-κετογλουταρικό, μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, ή από γλουταμίνη με τη δράση του ενζύμου γλουταμινάση.

Αν και η GDH δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του γλουταμικού στο ΚΝΣ, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό (οξειδωση) του γλουταμικού τόσο σε αστροκύτταρα που περιβάλλουν τις συνάψεις (Yu και συν, 1982), όσο και σε συναπτοσώματα (Egencia και συν, 1990). Το γλουταμικό που απελευθερώνεται στις συνάψεις προσλαμβάνεται γρήγορα μέσω μεταφορέων (EAAT) κυρίως από τα περιβάλλοντα αστροκύτταρα, αλλά και από τους ίδιους τους νευρώνες. Στο εσωτερικό των αστροκυττάρων το γλουταμικό μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: 1) να μετατραπεί σε γλουταμίνη μέσω της δράσης του ενζύμου συνθάση της γλουταμίνης, 2) να μετατραπεί σε α-κετογλουταρικό, είτε μέσω κάποιας εκ των αντιδράσεων τρανσαμίνωσης, είτε μέσω της αντίδρασης της GDH (προς τη κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης). Συνεπώς η GDH μπορεί να συμβάλει 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 (της συγκέντρωσης της) χαμηλή (Waniewski και Martin, 1986, Farinelli και Nicklas, 1992). Από την άλλη μεριά, οι Kuo και συν (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. Σε συμφωνία με τους παραπάνω οι Sonnwald και συν (1997) προτείνουν ότι ο μεταβολισμός του γλουταμικού στα αστροκύτταρα εξαρτάται από τα εξωκυττάρια επίπεδά του, με τα υψηλότερα επίπεδα να ευνοούν την οξειδωση του γλουταμικού διαμέσου της GDH.

## **GDH και νευρολογικά νοσήματα**

Η σημασία της GDH στη βιολογία του ΚΝΣ αποκαλύπτεται και από το γεγονός ότι δυσλειτουργία της GDH ενέχεται στη παθοφυσιολογία νευρολογικών νοσημάτων. Η δραστηριότητα της GDH έχει βρεθεί μειωμένη σε λευκοκύτταρα και ινοβλάστες ασθενών με πολυσυστηματικές νευρολογικές διαταραχές, μία οικογένεια νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από κλινική και παθολογοανατομική ετερογένεια (Plaitakis και συν, 1980, 1982). Οι μελέτες που έγιναν στους ασθενείς αυτούς έδειξαν ότι η μείωση στη δραστηριότητα της GDH αφορούσε κατά κύριο λόγο τη 'θερμοασταθή' μορφή της GDH (Plaitakis και συν, 1984). Από την άλλη μεριά, όπως έχει ήδη αναφερθεί η GDH παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλουταμικού, του κυριότερου διεγερτικού νευροδιαβιβαστή, με δυνητικά νευροτοξικές ιδιότητες. Η απελευθέρωση του γλουταμικού σε μεγάλες συγκεντρώσεις στη συναπτική σχισμή είναι δυνατόν να προκαλέσει διεγερτικοτοξική βλάβη (excitotoxic injury) στα νευρικά κύτταρα. Η διεγερτικο-τοξικότητα έχει ενοχοποιηθεί σε μηχανισμούς οξείας βλάβης του ΚΝΣ επί υποξίας, ισχαιμίας και υπογλυκαιμίας, καθώς και σε μηχανισμούς χρόνιας νευροεκφύλισης. Σημαντικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Parkinson, η νόσος Alzheimer, η Πλάγια Μυατροφική Σκλήρυνση (ALS) έχουν συσχετιστεί με τις διεγερτικοτοξικές ιδιότητες 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. Επίσης, πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας (αδημοσίευτα δεδομένα) έχουν δείξει ότι η παρουσία της σημειακής αλλαγής Ala445Ser στο γονίδιο *GLUD2* σε άντρες (ημίζυγους για την αλλαγή) με νόσο Parkinson σχετίζεται με πρόωμη έναρξη της νόσου. Η αλλαγή αυτή αυξάνει κατά 100% τη βασική δραστηριότητα του κωδικοποιούμενου από το *GLUD2* ενζύμου (gain of function mutation), επομένως, ενδέχεται να επηρεάζει το μεταβολισμό του γλουταμικού και κατ' επέκταση το μηχανισμό νευροεκφύλισης της νόσου.

#### 1.A.6. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ GDH ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η GDH, λόγω του σημαντικού της ρόλου στην ενεργειακή ομοιόσταση και στο μεταβολισμό του γλουταμικού οξέος, έχει αποτελέσει πολλάκις το αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών όσον αφορά την υποκυτταρική κατανομή της.

Η πιο ισχυρά αποδεδειγμένη εντόπιση της GDH στους ιστούς των θηλαστικών είναι εντός του μιτοχονδρίου. Η μιτοχονδριακή εντόπιση της GDH έχει από παλιά δειχθεί με μελέτες ομογενοποίησης και κλασματοποίησης ήπατος (Hogeboom και συν, 1953) ή εγκεφάλου αρουραίου (Salganicoff και συν, 1965). Μάλιστα οι τελευταίοι ερευνητές υπέθεσαν ότι η GDH εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό στρώμα (matrix), καθώς διαλυτοποιείται με Triton X-100. Αργότερα, η εντόπιση της GDH στο μιτοχόνδριο επιβεβαιώθηκε με υπερδομικές μελέτες ανοσοϊστοχημείας ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα να διατηρηθεί η δομή των κυττάρων και των υποκυτταρικών σχηματισμών. Συγκεκριμένα, οι Aoki και συν (1987), χρησιμοποιώντας πρωτοταγή αντισώματα έναντι της GDH και δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με σωματίδια χρυσού, εντόπισαν τη GDH κυρίως στα μιτοχόνδρια γλοιϊκών κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό νευρώνων εγκεφάλου αρουραίου. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση GDH αντιστοιχούσε σε περιοχές με αυξημένη γλουταματεργική διαβίβαση, και ειδικότερα σε γλοιϊκές αποφύσεις που περιέβαλαν δενδριτικές άκανθες και συναπτικές απολήξεις. Αντίθετα, δεν υπήρχε συσχέτιση της κατανομής της GDH με τις απαιτήσεις σε ενέργεια των αντίστοιχων περιοχών. Εκτός από την αμιγή μιτοχονδριακή εντόπιση, οι Aoki και συν παρατήρησαν ανοσοδραστικότητα για GDH – σε μικρότερη συγκέντρωση- και σε κάποιες εξωμιτοχονδριακές θέσεις. Ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα χρυσού και ηλεκτρονική μικροσκοπία χρησιμοποίησαν και οι Rothe και συν (1994) για να εξετάσουν και να ποσοτικοποιήσουν την υποκυτταρική εντόπιση της GDH σε τομές παρεγκεφαλιδικού φλοιού αρουραίου. Οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ανοσοσήμανση GDH κατά κύριο λόγο στα μιτοχόνδρια αστροκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό σε μιτοχόνδρια ολιγοδενδροκυττάρων και νευρωνικών στοιχείων. Δε βρέθηκε εντόπιση GDH σε εξωμιτοχονδριακές θέσεις.

Εκτός από την εύκολα διαλυτοποιούμενη μορφή GDH του μιτοχονδριακού στρώματος (matrix), υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει και μία άλλη μορφή GDH,

συνδεδεμένη με μεμβράνες. Έτσι οι Colon και συν (1986) έδειξαν ότι προκύπτουν δύο δραστηριότητες GDH μετά από υπερφυγοκέντρηση (100000g) ολικού ομογενοποιημένου εγκεφάλου αρουραίου: α) μια διαλυτή GDH δραστηριότητα, η οποία λαμβάνεται στο υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρησης και πιθανώς αντιπροσωπεύει το κλάσμα του μιτοχονδριακού στρώματος, β) μια σωματιδιακή (particulate-bound) GDH δραστηριότητα, η οποία λαμβάνεται στο ίζημα και η οποία αντιστέκεται στη διαλυτοποίηση με Triton X-100 και απελευθερώνεται μόνο με το κατιονικό απορρυπαντικό CTAB και με υψηλή συγκέντρωση άλατος (0,5 M NaCl). Οι δύο αυτές μορφές GDH διαφέρουν ως προς τη θερμοσταθερότητα και την αλλοστερική ρύθμιση και πιθανώς ανταποκρίνονται λειτουργικά σε διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες του εγκεφάλου [ενεργειακός μεταβολισμός – μεταβολισμός γλουταμικού οξέος]. Εκτός από τους Colon και συν, οι Lee και συν, και οι Rajas και συν μπόρεσαν να ανιχνεύσουν συνδεδεμένη με μεμβράνες GDH. Συγκεκριμένα, οι Lee και συν (1999) απομονώσανε GDH από μεμβράνες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (RER), η οποία (παρομοίως με τα ευρήματα των Colon και συν) ήταν περισσότερο ανθεκτική στη θερμότητα, όπως και στη πρωτεόλυση, από τη μιτοχονδριακή GDH. Επίσης οι Rajas και συν (1993), χρησιμοποιώντας ήπαρ και εγκέφαλο χοίρου, αναγνώρισαν μία συνδεδεμένη με μεμβράνες λυσοσωμάτων ισομορφή GDH, η οποία εμφάνιζε εξαρτώμενη από το ATP ικανότητα πρόσδεσης μικροσωληνίσκων. Από την άλλη μεριά, οι Werner και συν παρατήρησαν με ανοσοϊστοχημεία GDH ανοσοδραστικότητα κοντά στη κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα ολιγοδενδροκυττάρων (Werner και συν, 2001).

Τέλος, η εντόπιση της GDH στον πυρήνα του κυττάρου έχει προταθεί από κάποιες ερευνητικές ομάδες ( Di Prisco , 1975, Lai και συν, 1986), αν και άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η πυρηνική GDH αποτελεί μιτοχονδριακή επιμόλυνση του πυρηνικού κλάσματος.

Όπως θα αναφερθεί και στο επόμενο κεφάλαιο, οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γενωμικό DNA και συντίθενται ως πρόδρομα μόρια στο κυτταρόπλασμα. Οι πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μετατοπίζονται στη συνέχεια στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, καθοδηγούμενες από οδηγές αλληλουχίες, οι οποίες συνήθως αποκόπτονται μετά την είσοδο της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Οι Mavrothalassitis και συν (1988), χρησιμοποιώντας κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες, καταφέρνανε να απομονώσουνε, από ανθρώπινες

cDNA βιβλιοθήκες, κλώνους κωδικοποιούντες για ανθρώπινη GDH. Οι κλώνοι αυτοί κωδικοποιούν για ένα πολυπεπτίδιο 558 αμινοξέων, τα καρβοξυτελικά 505 αμινοξέα του οποίου είναι όμοια με την αμινοξική αλληλουχία της GDH πρωτεΐνης που έχει απομονωθεί από ανθρώπινους ιστούς (Smith και συν, 1979). Τα πρόσθετα 53 αμινοξέα που παρατηρούνται στο αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου που κωδικοποιείται από τους cDNA κλώνους της GDH και απουσιάζουν στην πρωτεΐνη που απομονώνεται από ανθρώπινο ιστό, πιστεύεται ότι ανταποκρίνονται στην οδηγό μιτοχondριακή αλληλουχία της GDH, η οποία πιθανότατα αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη (Mihara και συν, 1982, Mavrothalassitis και συν, 1988). Η οδηγός αυτή αλληλουχία αποτελεί το κεντρικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

## ΕΝΟΤΗΤΑ Β. ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

### 1.B.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαιρούνται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (τα οργανίδια του κυττάρου), με διαφορετική σύσταση πρωτεϊνών στο καθένα από αυτά. Με την εξαίρεση ενός πολύ μικρού αριθμού πρωτεϊνών που συντίθενται μέσα στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, όλες οι πρωτεΐνες συντίθενται στα ριβοσωμάτια του κυτταροπλάσματος. Οι μισές όμως από τις πρωτεΐνες αυτές, μετά τη σύνθεσή τους, δε μένουν στο κυτταρόπλασμα, αλλά εισάγονται στα επιμέρους διαμερίσματα του κυττάρου, όπως ο πυρήνας, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, τα περοξισωμάτια. Συνεπώς, πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που θα κατευθύνει τη σωστή καθοδήγηση των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα στον κατάλληλο υποκυτταρικό προορισμό τους. Η καθοδήγηση αυτή των πρωτεϊνών πολλές φορές διαμεσολαβείται από ειδικά 'τοπογενή' σήματα στο αμινοτελικό άκρο ή στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.

Τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο μέσα στο κύτταρο στην παραγωγή ενέργειας, στον μεταβολισμό αμινοξέων, λιπιδίων και σιδήρου, καθώς επίσης και στο μηχανισμό της απόπτωσης. Η πρωτεωμική ανάλυση έδειξε ότι τα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν περίπου 800 (στο μύκητα) έως 1500 (στον άνθρωπο) διαφορετικές πρωτεΐνες. Παρ' όλο που τα μιτοχόνδρια διαθέτουν πλήρες γενετικό σύστημα στο στρώμα (matrix) τους, μόνο το 1% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό γένωμα. Η μεγάλη πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, και συντίθενται ως πρόδρομα μόρια στα ριβοσωμάτια του κυτταροπλάσματος, από όπου εισάγονται μέσα στα μιτοχόνδρια με μετα-μεταφραστικό μηχανισμό (Wiedemann και συν, 2004)

Η είσοδος των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια είναι εξαιρετικά περίπλοκη, καθώς αυτά διαιρούνται σε τέσσερα υπο-διαμερίσματα: 1) την έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη, 2) τον διαμεμβρανικό χώρο, 3) την έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, και 4) το στρώμα (matrix) του μιτοχονδρίου. Έτσι, οι πρόδρομοι των υδρόφιλων πρωτεϊνών που προορίζονται για το στρώμα του μιτοχονδρίου πρέπει να διέλθουν διαμέσου δύο μεμβρανών (έξω και έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη) και του διαμεμβρανικού χώρου



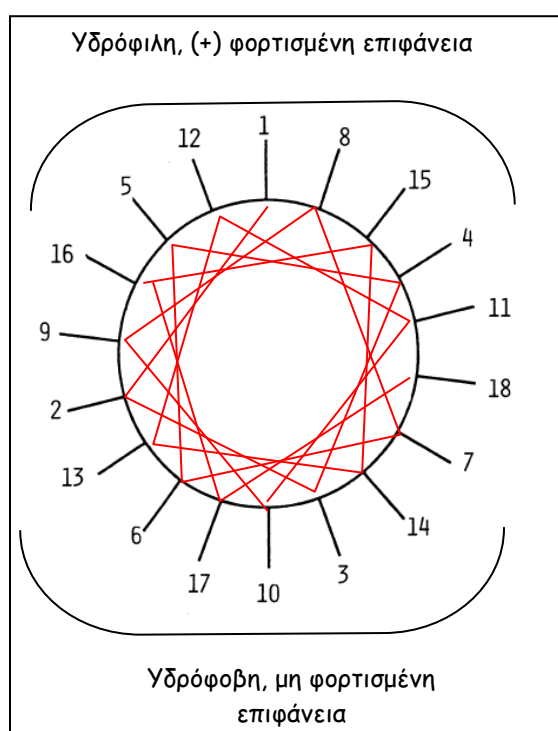
πριν φτάσουν στον τελικό τους προορισμό. Αντίθετα, οι πρόδρομοι των υδρόφοβων πρωτεϊνών που ενσωματώνονται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, πρέπει να καταφέρουν να διαπεράσουν την έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη χωρίς να προσκολληθούν σε αυτήν, και, επιπλέον, να διανύσουν το υδάτινο διαμέρισμα του διαμεμβρανικού χώρου. Συνεπώς, πρέπει να υπάρχει ένας ευφυής μηχανισμός που να διασφαλίζει την ακριβή καθοδήγηση και τοποθέτηση κάθε μιτοχονδριακής πρωτεΐνης στο περιβάλλον της. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την αναγνώριση ειδικών καθοδηγητικών σημάτων που βρίσκονται πάνω στο μόριο της πρόδρομης πρωτεΐνης, είτε ως αμινοτελικές προεκτάσεις, οι οποίες στη συνέχεια αποκόπτονται, είτε ως αλληλουχίες στο εσωτερικό της πρωτεΐνης (Pfanner και Geissler, 2001).

Οι περισσότερες διαλυτές πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού στρώματος, καθώς και ένας αριθμός πρωτεϊνών της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης και του διαμεμβρανικού χώρου, συντίθενται ως πρόδρομα μόρια με αμινο-τελικά εκτεινόμενα οδηγία πεπτιδία, τα οποία αποκόπτονται πρωτεολυτικά μετά την είσοδο στο μιτοχόνδριο. Αντίθετα, όλες οι πρόδρομες πρωτεΐνες της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι περισσότερες πρωτεΐνες της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης και κάποιες πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου συντίθενται με καθοδηγητικά σήματα, τα οποία δεν αποκόπτονται, αλλά παραμένουν στο μόριο της ώριμης πρωτεΐνης. Οι τελευταίες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από διαφορετική στερεοδιαμόρφωση στην πρόδρομη σε σχέση με την ώριμη μορφή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κατά το πλείστον υδρόφοβες, προστατεύονται όμως στο υδάτινο περιβάλλον του κυτταροπλάσματος, όπου συντίθενται, καθώς βρίσκονται σε διαφορετική κατάσταση αναδίπλωσης από στην ώριμη μορφή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ειδικών τσαπερονών (chaperones) του κυτταροπλάσματος, οι οποίες δεσμεύουν τις νέο-συντεθειμένες πρωτεΐνες και τις προστατεύουν από συσσωμάτωση μέχρι την είσοδο τους στα μιτοχόνδρια (Komiya T και συν, 1997).

### **1.B.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΘΟΔΗΓΗΤΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ**

Όπως προαναφέρθηκε, το καθοδηγητικό σήμα των περισσότερων πρωτεϊνών που κατευθύνονται στο *μιτοχονδριακό στρώμα* αποτελείται από μία αλληλουχία τυπικά 17-35 (εύρος 10-80) αμινοξέων που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρόδρομης πρωτεΐνης. Οι οδηγοί αυτές αλληλουχίες, παρόλο που ποικίλουν ευρέως όσον αφορά

την πρωτοταγή δομή, διαθέτουν ορισμένα κοινά γνωρίσματα: Περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό θετικά φορτισμένων, υδροξυλιωμένων, αλλά και υδρόφοβων αμινοξέων. Η ανάλυση της αμινοξικής σύνθεσης ενός μεγάλου αριθμού οδηγών αλληλουχιών (von Heijne, 1986) έδειξε ότι αυτές είναι πλούσιες σε Arg, Leu και Ser, ενώ διαθέτουν πολύ λίγα κατάλοιπα Asp, Glu, Val και Ile. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα των αμινοτελικών αλληλουχιών είναι η τάση τους να σχηματίζουν αμφιπαθείς α-έλικες, που προβάλλουν μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια και μία αντιδιαμετρική υδρόφοβη επιφάνεια (von Heijne, 1986) [Εικόνα 1.3]. Πιστεύεται ότι οι διαφορετικές επιφάνειες της οδηγού αλληλουχίας αναγνωρίζονται διαδοχικά από διαφορετικούς υποδοχείς (Tom20 & Tom22) της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ το συνολικό θετικό φορτίο είναι απαραίτητο για τη διόδο της πρωτεΐνης διαμέσου της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης, από τον ηλεκτροθετικότερο διαμεμβρανικό χώρο προς τον ηλεκτροαρνητικότερο χώρο του στρώματος του μιτοχονδρίου (Pfanner και Geissler, 2001).



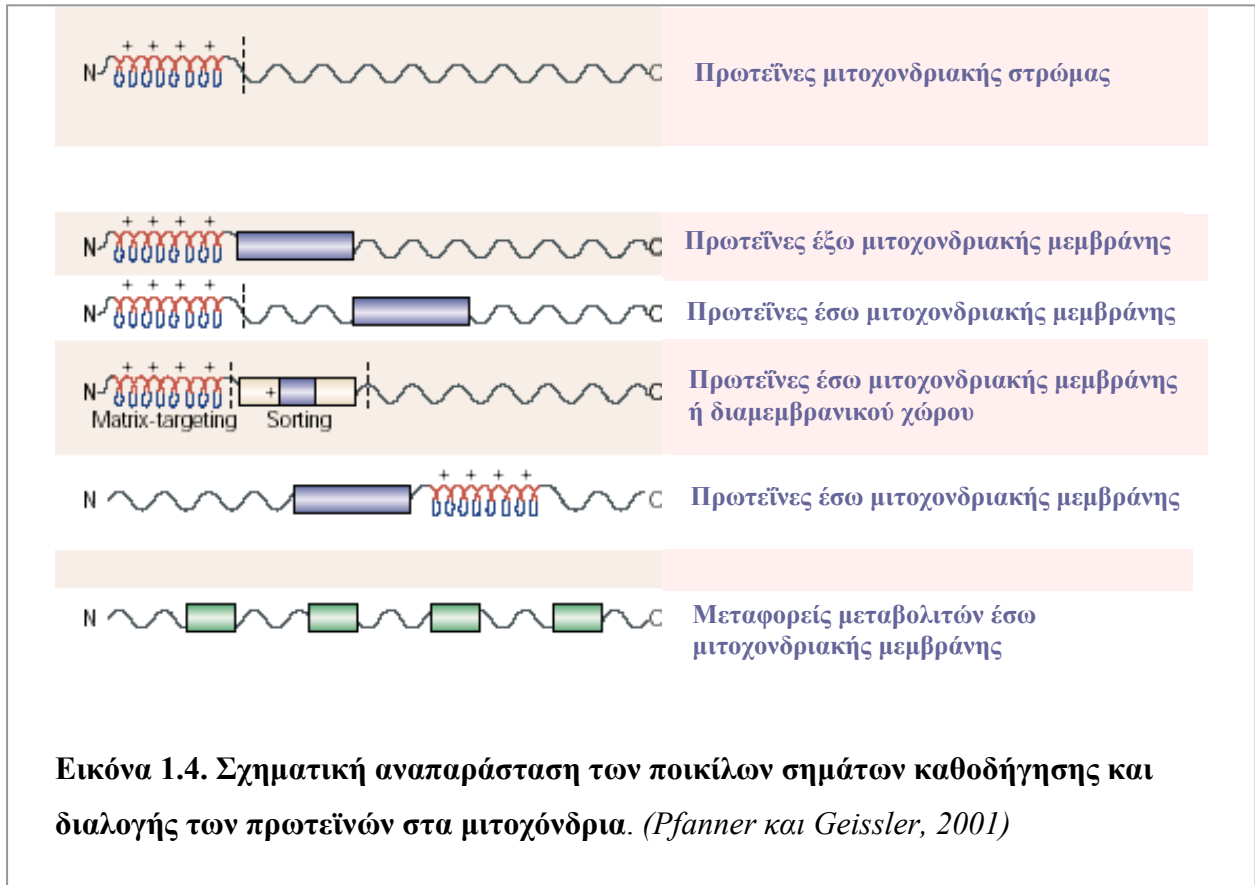
**Εικόνα 1.3. Δισδιάστατη προβολή σε μορφή ελικοειδούς τροχιάς μίας τυπικής α-έλικας 18 καταλοίπων.** Το χαρακτηριστικό των οδηγών αλληλουχιών των πρωτεϊνών του μιτοχονδριακού στρώματος είναι η δημιουργία αμφιφιλικών α-ελικοειδών δομών, όπου τα περισσότερα υδρόφιλα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα συγκεντρώνονται στην μία επιφάνεια, ενώ η πλειονότητα των υδρόφοβων αμινοξέων συγκεντρώνεται στην αντιδιαμετρική επιφάνεια. (Σχήμα τροποποιημένο από von Heijne, 1986)

Αμινοτελικές οδηγούς αλληλουχίες, παρόμοιες με αυτές των πρωτεϊνών του μιτοχονδριακού στρώματος, διαθέτουν και οι πρόδρομες πρωτεΐνες της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στην περίπτωση αυτή όμως, η θετικά φορτισμένη

αμινοτελική αλληλουχία αφενός δεν αποκόπτεται, αφετέρου ακολουθείται αμέσως από μία περισσότερο υδρόφοβη αλληλουχία η οποία λειτουργεί ως σήμα διακοπής της μεταφοράς της πρωτεΐνης διάμεσου της μεμβράνης (stop transfer signal).

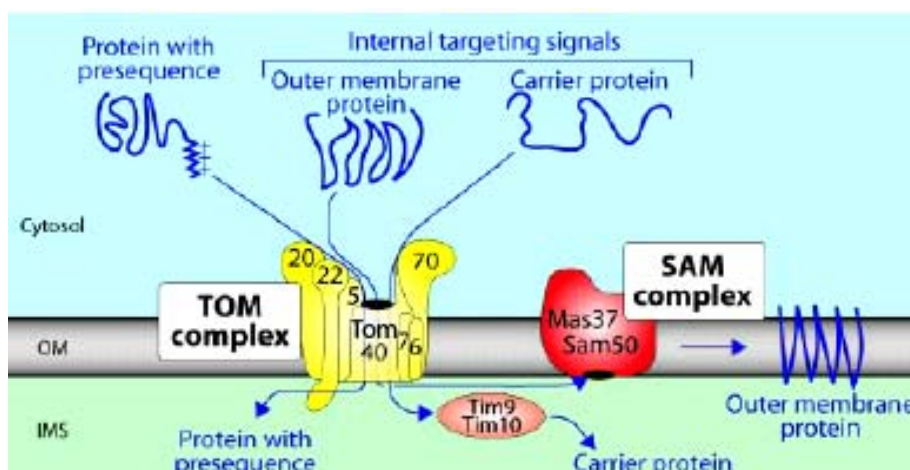
Αποκοπτόμενες θετικά φορτισμένες αμινοτελικές αλληλουχίες συνοδευόμενες από επιπρόσθετα σήματα, είτε αμέσως μετά, είτε στο εσωτερικό της ώριμης πρωτεΐνης, παρατηρούνται επίσης σε κάποιες πρωτεΐνες της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης η του διαμεμβρανικού χώρου. Η ποικιλία και οι παραλλαγές των καθοδηγητικών μιτοχονδριακών σημάτων που έχουν περιγραφεί απεικονίζονται στην εικόνα 1.4.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων μεταβολιτών της αναπνευστικής αλύσου, δε διαθέτουν αποκοπτόμενες καθοδηγητικές αλληλουχίες στην αρχή του μορίου τους, αλλά περιέχουν 3-6 εσωτερικά υδρόφοβα καθοδηγητικά σήματα, διάσπαρτα καθ' όλο το μήκος της πρωτεΐνης. Τα σήματα αυτά αναγνωρίζονται από διαφορετικούς υποδοχείς και χρησιμοποιούν διαφορετικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα για την είσοδο και τη διανομή τους εντός του μιτοχονδρίου, όπως θα δούμε παρακάτω.



### 1.B.3. ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Όλες οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που συντίθενται από πυρηνικά γονίδια στο κυτταρόπλασμα, ανεξάρτητα από το καθοδηγητικό σήμα που περιέχουν, χρησιμοποιούν πρακτικά το ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (TOM) για την διέλευση τους διαμέσου της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα TOM (translocase of outer membrane) περιλαμβάνει α) υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (Tom20, Tom22, και Tom70) β) ένα γενικό πόρο εισόδου που σχηματίζεται από την Tom40, γ) τις μικρές βοηθητικές πρωτεΐνες Tom5, Tom6, Tom7. [Εικόνα 1.5 ]. Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν θετικά φορτισμένες αμινοτελικές αλληλουχίες οι οποίες σχηματίζουν αμφιπαθείς  $\alpha$ -έλικες (π.χ πρωτεΐνες μιτοχονδριακού στρώματος), αναγνωρίζονται αρχικά από τους υποδοχείς Tom20 και Tom22, και στη συνέχεια μέσω της πρωτεΐνης Tom5 καθοδηγούνται στο κανάλι εισόδου που σχηματίζεται από την Tom40. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης που περιέχουν εσωτερικά υδρόφοβα καθοδηγητικά σήματα, αναγνωρίζονται αρχικά από τον υποδοχέα Tom70, πριν οδηγηθούν και πάλι στην Tom40. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης εξαρτώνται και αυτές από τα μόρια Tom20 και Tom22 για την αρχική αναγνώριση τους. Μετά τη διέλευση τους διαμέσου του πόρου Tom40, ένα άλλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, SAM (sorting & assembly machinery), αναλαμβάνει την ενσωμάτωση τους στην έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη και τη διαμόρφωση τους σε  $\beta$ -αλυσίδες. [Εικόνα 1.5]



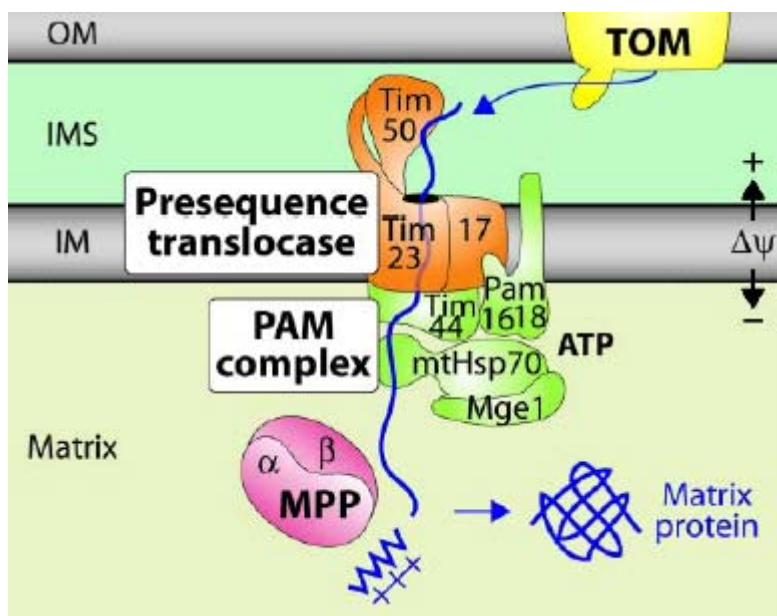
Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση της εισόδου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών διαμέσου και στο εσωτερικό της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης (Wiedemann και συν, 2004)

#### 1.B.4. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΣΤΡΩΜΑ (MATRIX) ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.

Όπως έχει προαναφερθεί, οι πρόδρομες πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού στρώματος διαθέτουν θετικά φορτισμένα καθοδηγητικά σήματα στο αμινοτελικό τους άκρο. Οι πρωτεΐνες αυτές, μετά τη διέλευση τους διαμέσου του συμπλέγματος TOM της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγούνται στο σύμπλεγμα Tim23 (Tim = translocase of the inner membrane) για τη δίοδο τους μέσω της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης προς το στρώμα. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από τρεις κύριες μεμβρανικές πρωτεΐνες: τις Tim50, Tim23 και Tim17 [Εικόνα 1.6]. Η διέλευση των πρωτεϊνών διαμέσου του πόρου της Tim23 προς το μιτοχονδριακό στρώμα εξαρτάται απαραίτητως από 2 παράγοντες: 1) από την ύπαρξη διαφοράς δυναμικού  $\Delta\psi$  κατά μήκος της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης (το μιτοχονδριακό στρώμα έχει χαμηλότερο δυναμικό συγκριτικά με το διαμεμβρανικό χώρο), 2) από την παροχή κινητήριας δύναμης με τη μορφή ATP. Η περίσσεια αρνητικού φορτίου στο μιτοχονδριακό στρώμα ασκεί ηλεκτρική έλξη στις θετικά φορτισμένες αμινοτελικές αλληλουχίες των πρόδρομων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οδηγώντας τις προς την πλευρά του μιτοχονδριακού στρώματος. Η διέλευση των πρόδρομων πρωτεϊνών διαμέσου του καναλιού Tim23 ολοκληρώνεται με την παροχή ενεργειακής δύναμης ATP από το κινητήριο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα PAM (presequence associated motor complex). Κεντρική πρωτεΐνη του συμπλέγματος αυτού είναι η μιτοχονδριακή τσαπερόνη (chaperone) mtHsp70, η οποία, σε εναλλασσόμενους κύκλους δέσμωσης και υδρόλυσης ATP, προσδένεται στις διερχόμενες πρωτεΐνες και τις απελευθερώνει στο μιτοχονδριακό στρώμα [Εικόνα 1.6]. Κατόπιν, η μιτοχονδριακή πεπτιδάση (MPP= mitochondrial processing peptidase) αφαιρεί πρωτεολυτικά τις οδηγούς αλληλουχίες από την πρόδρομη πρωτεΐνη. Η αμινοξική αλληλουχία στη θέση αποκοπής ποικίλει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες πρωτεΐνες, αλλά είναι συνήθης η παρουσία καταλοίπων Arg στη θέση -2 ή -3 [Gavel Y, von Heijne G.,1990]. Τέλος, μοριακές τσαπερόνες (κυρίως η Hsp60 σε συνεργασία με τη Hsp10) επάγουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στην ώριμη, τελική τους διαμόρφωση.

Ορισμένες πρόδρομες πρωτεΐνες διαθέτουν υδρόφοβα σήματα διακοπής μεταφοράς (stop transfer signals), τα οποία ακολουθούν τις θετικά φορτισμένες αμινοτελικές αλληλουχίες [Εικόνα 1.4]. Οι πρωτεΐνες αυτές συγκρατούνται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη καθώς διέρχονται μέσω του πόρου Tim23, και στη συνέχεια

διαχέονται στο λιπιδικό περιβάλλον της μεμβράνης. Η ενσωμάτωση αυτή των πρωτεϊνών στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη χρησιμοποιεί μόνο την ηλεκτροφορητική δύναμη της διαφοράς δυναμικού  $\Delta\psi$ , και δεν απαιτεί την παροχή ενέργειας ATP (Wiedemann και συν, 2004)

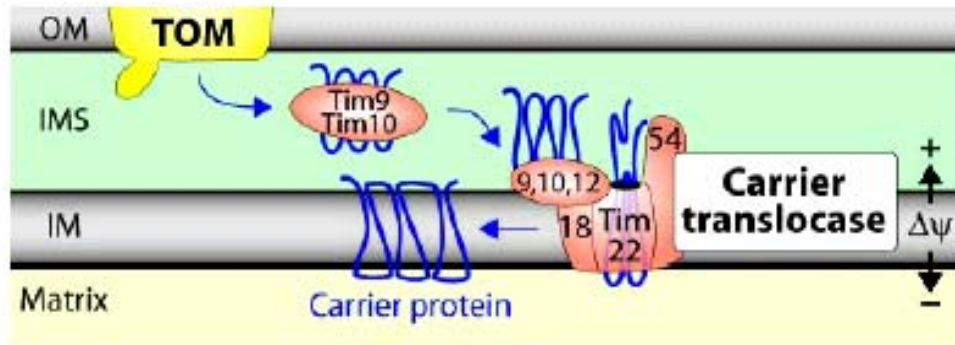


**Εικόνα 1.6.** Είσοδος των πρωτεϊνών που φέρουν αποκοπτόμενες πρόδρομες αλληλουχίες στο στρώμα του μιτοχονδρίου. (Από Wiedemann και συν, 2004)

### 1.B.5. ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΣΩ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Οι περισσότερες πρωτεΐνες της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης ανήκουν στην κατηγορία των μεταφορέων μεταβολιτών (metabolite carriers), και αποτελούνται από πολλαπλές διαμεμβρανικές περιοχές. Οι πρωτεΐνες αυτές συντίθεται χωρίς πρόδρομες αμινοτελικές αλληλουχίες, αλλά, περιέχουν εσωτερικά καθοδηγητικά σήματα [Εικόνα 1.4]. Μετά την αναγνώρισή τους από τον υποδοχέα Tom70 και τη διέλευση τους διαμέσου του πόρου TOM της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης, δεσμεύονται από τις μικρές πρωτεΐνες Tim9 και Tim10, οι οποίες παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωση τους στον υδάτινο διαμεμβρανικό χώρο και τις καθοδηγούν προς το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα Tim22 (carrier translocase). Η μεμβρανική πρωτεΐνη Tim12 χρησιμεύει ως θέση πρόσδεσης του συμπλόκου Tim9-Tim10 [Εικόνα 1.7]. Υπό την επίδραση της διαφοράς δυναμικού  $\Delta\psi$ , οι πρωτεΐνες εισέρχονται στον πόρο που σχηματίζει η Tim22 και

ενσωματώνονται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες του στρώματος του μιτοχονδρίου, η παροχή ενέργειας με τη μορφή ATP, στην περίπτωση αυτή, δεν είναι απαραίτητη.



**Εικόνα 1.7.** Ενσωμάτωση των πρωτεϊνών- μεταφορέων στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη (Από Wiedemann και συν, 2004)

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως είδαμε στο κεφάλαιο της εισαγωγής, η γλουταμική αφυδρογονάση υπάρχει στον άνθρωπο σε δύο ισομορφές που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια: 1) τη μορφή hGDH1 που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLUD1* και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, 2) τη μορφή hGDH2 που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLUD2* και παρουσιάζει ένα ειδικό για νευρικό ιστό πρότυπο έκφρασης. Τα δύο GDH ισοένζυμα διαφέρουν στην ώριμη μορφή τους μόνο σε 5 στα 505 αμινοξέα τους. Υπάρχει ένα πλήθος μελετών που υποστηρίζουν ότι η γλουταμική αφυδρογονάση εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (στο στρώμα του μιτοχονδρίου), ενώ κάποιες άλλες μελέτες παρέχουν ενδείξεις για εξωμιτοχονδριακές θέσεις εντόπισης της GDH (κυρίως σε μεμβράνες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, λυσοσωμάτων, αλλά και στον πυρήνα του κυττάρου). Ωστόσο δεν υπάρχει καμία μελέτη που να περιγράφει την υποκυτταρική εντόπιση της ειδικής για το νευρικό ιστό *GLUD2* γλουταμικής αφυδρογονάσης. Πρόσφατες πειραματικές εργασίες στο εργαστήριο μας (βασισμένες σε τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης των hGDH1 και hGDH2 σε φθορίζοντα GFP φορέα έκφρασης) έχουν δείξει ότι και τα δύο ανθρώπινα ισοένζυμα εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, με ένα μικρό κλάσμα αυτών να εντοπίζεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Όπως έχει προαναφερθεί, οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως πρόδρομες μορφές και οδηγούνται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια οδηγών αλληλουχιών (leader sequences) οι οποίες συνηθέστερα αποκόπτονται μετά την ολοκλήρωση της εισόδου της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα cDNA των κλωνοποιημένων *GLUD1* και *GLUD2* με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των ώριμων πρωτεϊνών, αποκαλύπτει την παρουσία μίας πρόσθετης αμινοτελικής ακολουθίας 53 αμινοξέων και στα δύο ισοένζυμα, η οποία απουσιάζει στην ώριμη μορφή τους. Η αλληλουχία αυτή πιστεύεται, χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχθεί, ότι αποτελεί αποκοπτόμενη οδηγό μιτοχονδριακή αλληλουχία. Οι 'υποθετικές' αυτές οδηγοί αλληλουχίες των hGDH1 και hGDH2 παρουσιάζουν εκ πρώτης όψης ορισμένα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά: 1) το μέγεθός τους (53aa) είναι αρκετά μεγαλύτερο από το σύνηθες μέγεθος των περισσότερων γνωστών οδηγών μιτοχονδριακών αλληλουχιών (20-30aa), γεγονός που δημιουργεί ερωτήματα για την ύπαρξη κάποιας άλλης λειτουργίας πέραν της



καθοδηγητικής, 2) διαφέρουν μεταξύ τους σε 9 στα 53 αμινοξέα τους (ποσοστό 17%), σε αντίθεση με τις ώριμες μορφές τους που παρουσιάζουν λιγότερο από 1% διαφορά στην αλληλουχία τους.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη σημασία των GLUD1 και GLUD2 οδηγών αλληλουχιών για τη μιτοχονδριακή εντόπιση των πρωτεϊνών κάναμε την ακόλουθη υπόθεση: Αν οι οδηγοί αλληλουχίες είναι απαραίτητες για την καθοδήγηση των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, τότε η δημιουργία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στις οποίες θα έχουμε εξαλείψει τις οδηγούς αλληλουχίες θα οδηγεί σε κατάργηση της μιτοχονδριακής εντόπισης των πρωτεϊνών αυτών.

Ένα δεύτερο ερώτημα που επιχειρήσαμε να απαντήσουμε αφορούσε την ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών των GLUD1 και GLUD2 οδηγών αλληλουχιών και την αναγνώριση των στοιχείων εκείνων που είναι καθοριστικής σημασίας στο μηχανισμό της καθοδήγησης. Είναι γνωστό ότι τα κύρια χαρακτηριστικά των οδηγών αλληλουχιών των πρωτεϊνών του μιτοχονδριακού στρώματος περιλαμβάνουν α) την παρουσία αρκετών θετικά φορτισμένων αμινοξέων και β) τη δημιουργία αμφιπαθών α-ελικοειδών δομών. Έτσι επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή των GLUD1 και GLUD2 οδηγών αλληλουχιών για να αναγνωρίσουμε τα αμινοξέα και τα δομικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της μιτοχονδριακής καθοδήγησης.

Συνοψίζοντας, ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να απαντήσουμε στο ερώτημα αν τα GLUD1 και GLUD2 οδηγά πεπτίδια είναι απαραίτητα για την μιτοχονδριακή εντόπιση των δύο ισοενζύμων της γλουταμικής αφυδρογονάσης στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, προσπαθήσαμε να αναλύσουμε τα παραπάνω πεπτίδια σε επίπεδο πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και να αναδείξουμε τα δομικά στοιχεία που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη μιτοχονδριακή καθοδήγηση και μετατόπιση (translocation).

Η σημασία της μελέτης έγκειται, πέρα από την διερεύνηση του ρόλου των GLUD1 και GLUD2 οδηγών αλληλουχιών, στην ευρύτερη διαλεύκανση των μηχανισμών εισόδου και καθοδήγησης των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 3.1. ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Για να διερευνηθεί η σημασία της αμινοτελικής αλληλουχίας των *GLUD1* και *GLUD2* πρωτεϊνών ως προς την εντόπιση αυτών στα μιτοχόνδρια, κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένες μορφές των δύο ισοενζύμων. Οι μεταλλάξεις στις *GLUD1* και *GLUD2* κωδικοποιητικές αλληλουχίες σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να απουσιάζει από το μόριο της τελικής πρωτεΐνης ολόκληρο ή κάποιο τμήμα του ‘προβλεπόμενου’ οδηγού πεπτιδίου, και στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο GFP φορέα έκφρασης, στο 5’ άκρο του GFP γονιδίου. Τα ανασυνδυασμένα GFP πλασμίδια εκφράστηκαν σε ανθρώπινα κύτταρα με τη μέθοδο της παροδικής διαμόλυνσης, σε συνδυασμό με ποικίλους υποκυτταρικούς δείκτες (markers). Τέλος, η εντόπιση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών εντός του κυττάρου έγινε με παρακολούθηση του πρότυπου κατανομής φθορισμού σε πολυεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

#### 3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ GFP ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ hGDH1 ΚΑΙ hGDH2

Προκειμένου να κατασκευαστεί ένας πλασμιδιακός φορέας έκφρασης, ο οποίος να κωδικοποιεί για τη μεταλλαγμένη, άνευ οδηγού πεπτιδίου, *GLUD1* (ή *GLUD2*) πρωτεΐνη, έπρεπε κατ’ αρχήν να απομονωθεί η κατάλληλη *GLUD1* (ή *GLUD2*) cDNA κωδική αλληλουχία, από την οποία να λείπουν τα αρχικά 159 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν για το οδηγό πεπτίδιο των 53 αμινοξέων. Η απομόνωση επιτεύχθηκε με πολλαπλασιασμό του επιθυμητού cDNA τμήματος, με τη βοήθεια κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη παραθέτονται στον πίνακα 1. Οι εμπρόσθιοι (forward) εκκινητές σχεδιάστηκαν με τρόπο ώστε 1) να είναι συμπληρωματικοί με την αρχή της αλληλουχίας της ώριμης πρωτεΐνης (ή με επιθυμητή αλληλουχία εντός του οδηγού πεπτιδίου), 2) να εισάγουν το κωδικόνιο έναρξης ATG, και 3) να δημιουργούν τη θέση περιορισμού EcoRI. Ο

αντίστροφος (reverse) εκκινητής σχεδιάστηκε (από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου) ώστε να είναι συμπληρωματικός με το τέλος της *GLUD1* (ή *GLUD2*) κωδικής αλληλουχίας, να μετατρέπει το κωδικόνιο λήξης TAG σε AAG (Lys), και να δημιουργεί τη θέση περιορισμού BamHI. Οι συγκεκριμένες θέσεις περιορισμού επιλέχθηκαν ώστε το πολλαπλασιασμένο κομμάτι DNA, μετά από πέψη με τις αντίστοιχες ενδονουκλεάσες περιορισμού, να μπορεί να ενσωματωθεί στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3 διατηρώντας το πλαίσιο ανάγνωσης της EGFP κωδικοποιητικής αλληλουχίας. Ως εκμαγείο (template) για τη PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBSKII, εντός του οποίου υπάρχει κλωνοποιημένη ολόκληρη η κωδικοποιητική αλληλουχία του ανθρώπινου *GLUD1* (ή *GLUD2*) cDNA.

**Πίνακας 1. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των μεταλλαγμένων (ως προς το οδηγό πεπτίδιο) *GLUD1* και *GLUD2***

<b>Εκκινητής</b>	<b>Αλληλουχία</b>	<b>Κατηγορία</b>
<b>Glud1_del</b>	TACAGAATTCATGAGCGAGGCGGTGGCC	<b>Forward</b>
<b>Glud2_del</b>	TACAGAATTCATGAGCGAGTTGGTGGCCGAC	<b>Forward</b>
<b>Δ9_glud2</b>	TACAGAATTCATGCTCGCATTGGCCGCC	<b>Forward</b>
<b>Δ21_glud2</b>	TACAGAATTCATGGGCCGCGGACAGCC	<b>Forward</b>
<b>Δ38_glud2</b>	TACAGAATTCATGCCCGCTGCCCTGGG	<b>Forward</b>
<b>GLUD_END</b>	ACCGGTGGATCCTCCTCCGCCTCCCATCTTTGTGAA	<b>Reverse</b>

Από εκεί και πέρα, η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- i) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και απομόνωση του μεταλλαγμένου τμήματος *GLUD1* (ή *GLUD2*) DNA που πολλαπλασιάστηκε με PCR (μπάντα μεγέθους 1,5Kb περίπου) με τη χρήση του Qiaex II Gel Extraxtion Kit (Qiagen).

- ii) Πέψη 10μg του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N3 (Clontech) ταυτόχρονα με τα ένζυμα BamHI και EcoRI, προσθέτοντας διαδοχικά στην αντίδραση της πέψης (οι όγκοι σε μl) :

H <sub>2</sub> O	25.0
BSA (bovine serum albumin)	5.0
NEB2 (reaction buffer)	5.0
pEGFP-N3 (1μg/μl)	10.0
BamHI (1U/μl)	2.5
EcoRI (1U/μl)	2.5
<hr/>	
ΣΥΝΟΛΟ	50.0

- iii) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και απομόνωση της επιθυμητής μπάντας (περίπου 4,7Kb) του κομμένου πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N3 με τη χρήση του Qiaex II Gel Extraxtion Kit (Qiagen).
- iv) Πέψη του απομονωμένου από το πήκτωμα αγαρόζης *GLUD1* (ή *GLUD2*) DNA ταυτόχρονα με τα ένζυμα BamHI και EcoRI (αντίστοιχα με προηγούμενα)
- v) Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA (πλασμιδιακού φορέα και μεταλλαγμένου DNA ενθέματος) σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκρίνοντας με γνωστές ποσότητες DNA.
- vi) Συγκόλληση πλασμιδιακού φορέα και μεταλλαγμένου ενθέματος.

1. Προσθήκη διαδοχικά για κάθε αντίδραση συγκόλλησης (T4 DNA Ligase, Promega) (οι όγκοι σε μl):

pEGFP-N3 πλασμιδιακός φορέας	x
μεταλλαγμένο DNA ένθεμα (insert)	y
H <sub>2</sub> O	z

Επώαση για 5 λεπτά στους 42°C και ακολούθως προσθήκη:

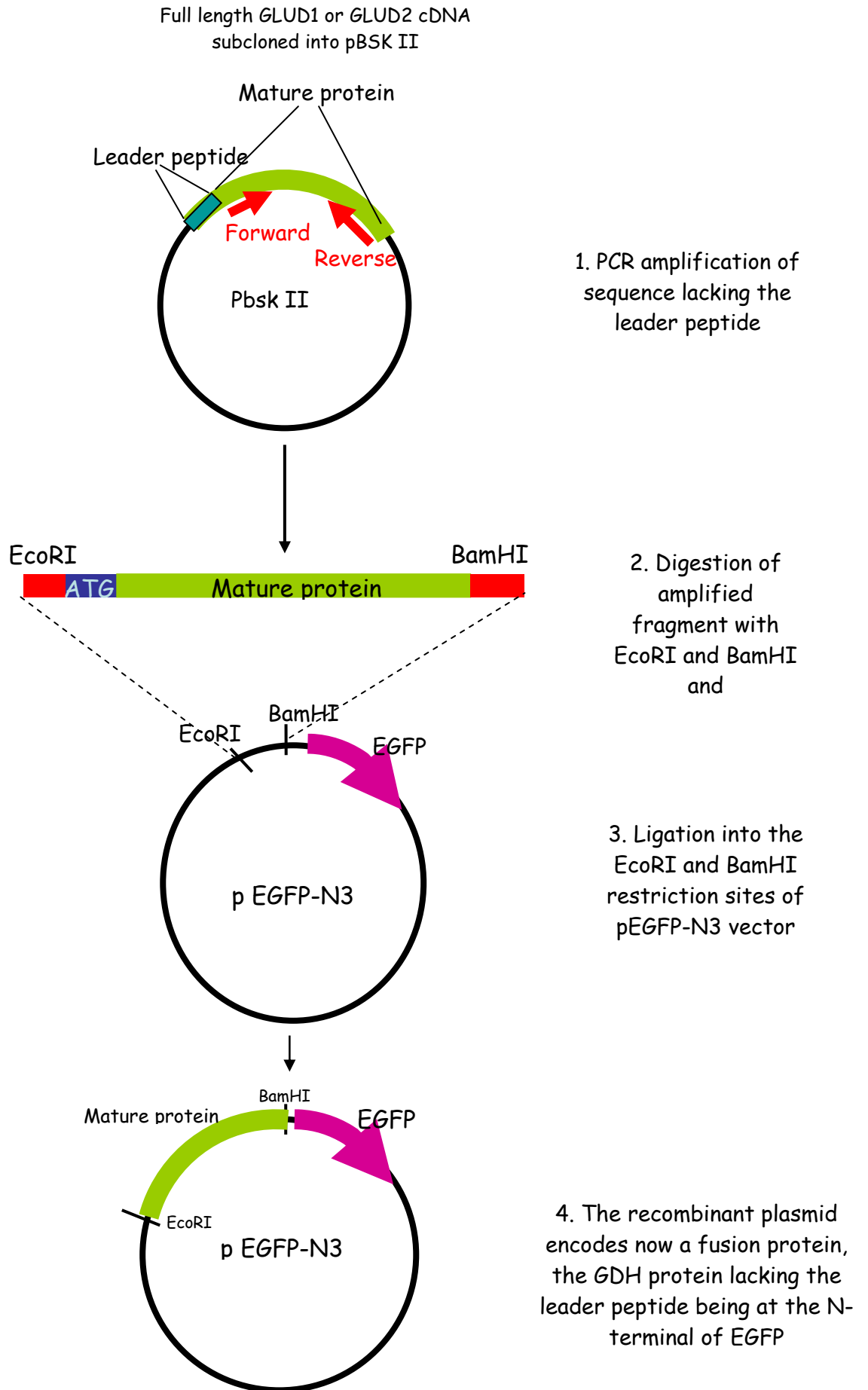
Ligation buffer	1.5
Ligase	1.0
<hr/>	
ΣΥΝΟΛΟ	15.0

Οι ποσότητες φορέα (x) και ενθέματος (z) που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση επιλέχθηκαν ώστε η μάζα του φορέα να είναι περίπου 100 ng, και η μεταξύ τους μοριακή αναλογία να είναι moles φορέα: moles ενθέματος = 1: 3 ή 1:2. Με βάση την αναλογία αυτή, η απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος ισοδυναμεί με:

100ng X 1,5/ 4,7 (μέγεθος ενθέματος/ μέγεθος φορέα) X 3(ή X 2) = 95 (ή 64)ng ενθέματος.

2. Επώαση περίπου 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
  3. Επώαση στους 70°C για 10 λεπτά προς απενεργοποίηση της λιγάσης.
- vii) Μετασηματισμός 5 μl της αντίδρασης συγκόλλησης σε 100μl Supercompetent JM109 E. Coli βακτήρια (Promega), με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock transformation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα:
1. Επώαση σε πάγο για 30 λεπτά
  2. Επώαση στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα.
  3. Προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου SOC και επώαση στους 37°C με ανάδευση για 50 λεπτά- 1 ώρα.
  4. Στρώσιμο της καλλιέργειας σε τρυβλία με LB-agar και καναμυκίνη 30μg/ml (για την οποία περιέχει γονίδιο αντίστασης ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-N3). Επώαση για 16-18 ώρες στους 37°C.
- viii) Συλλογή αποικιών από τα παραπάνω τρυβλία και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-preparation of plasmid DNA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook και Maniatis (1989).
- ix) Επιλογή των κατάλληλων κλώνων (που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) με πέψη με περιοριστικά ένζυμα (EcoRI, BamHI).
- x) Επιβεβαίωση της ορθής ένθεσης του μεταλλαγμένου DNA στον πλασμιδιακό φορέα και αποκλεισμός άλλων τυχαίων μεταλλάξεων με αμφίδρομη αλληλούχιση (bidirectional sequencing).
- xi) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον επιλεγμένο βακτηριακό κλώνο σε μεσαία κλίμακα (midi-preparation of plasmid DNA) με τη χρήση του (Macherey-Nagel). Φωτομέτρηση του DNA για ποσοτικοποίηση και πιστοποίηση της καθαρότητας.

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάται ο πειραματικός σχεδιασμός για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου GFP πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της μεταλλαγμένης (άνευ του οδηγού πεπτιδίου) GLUD1 ή GLUD2 πρωτεΐνης.



### 3.2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως, το μεταλλαγμένο *GLUDI* (ή *GLUD2*) cDNA, από το οποίο έχει εξαλειφθεί ολόκληρο ή μέρος του οδηγού πεπτιδίου, υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3, στο 5' άκρο του EGFP γονιδίου. Το προκύπτον ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κωδικοποιεί για μία χμιαϊκή (fusion) πρωτεΐνη, στο αμινοτελικό άκρο της οποίας βρίσκεται η μεταλλαγμένη μας πρωτεΐνη, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο η πρωτεΐνη EGFP. Η χμιαϊκή πρωτεΐνη διατηρεί τα βιολογικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης που έχουμε ενθέσει, και παράλληλα, τις φθορίζουσες ιδιότητες της πρωτεΐνης EGFP. Έτσι, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης των μεταλλαγμένων μας πρωτεϊνών.

Τα ανασυνδυασμένα EGFP πλασμίδια εκφράστηκαν σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (HEK293, SHSY-5Y), με τη μέθοδο της παροδικής διαμόλυνσης (transient transfection), ώστε να εξεταστεί το πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Παράλληλα, έγινε συν-διαμόλυνση (co-transfection) με επιλεγμένους πλασμιδιακούς φορείς γνωστής υποκυτταρικής εντόπισης (pDsRed2-Mito, pDsRed2-ER, pDsRed2-Nuc), οι οποίοι περιγράφονται στην παράγραφο 3.4. Ως μάρτυρες (controls) στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν: α) EGFP πλασμιδιακός φορέας στον οποίο είχε υποκλωνοποιηθεί (από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου) το φυσιολογικό, πλήρους μήκους *GLUDI* (ή *GLUD2*) cDNA, β) μη τροποποιημένος EGFP πλασμιδιακός φορέας, ο οποίος κωδικοποιεί για την EGFP πρωτεΐνη, μόνη της.

#### 3.2.1 Επιλογή κυτταρικής σειράς

Επιλέχθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, γιατί, όπως έχει σημειωθεί, το *GLUD2* ισοένζυμο (hGDH2) απαντάται μόνο σε ανθρώπους και σε ανώτερα πρωτεύοντα.

Η σειρά των ανθρωπίνων εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού, **HEK 293** (Human Embryonic Kidney cells), είναι βιβλιογραφικά μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες σειρές για έκφραση εξωγενών πρωτεϊνών. Παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ενσωμάτωσης και έκφρασης του cDNA και δίνει επιτυχή αποτελέσματα διαμολύνσεων.

Η σειρά **SH-SY5Y** προέρχεται από ανθρώπινο νευροβλάστωμα, και τα κύτταρά της διαθέτουν νευρικό φαινότυπο ανώριμων συμπαθητικών νευροβλαστών. Τα κύτταρα αυτά μπορούν, μετά από κατάλληλη έκθεση σε ρετινοϊκό οξύ, να διαφοροποιηθούν σε ντοπαμινεργικούς συμπαθητικούς νευρώνες. Η σειρά αυτή είναι λιγότερο επιδεκτική σε διαμόλυνση με cDNA και περισσότερο δυσχερής στην έκφραση εξωγενών πρωτεϊνών. Όμως, προτιμήθηκε επειδή, λόγω του νευρικού χαρακτήρα των κυττάρων της, είναι πιο αξιόπιστη για την έκφραση των διάφορων μορφών της *GLUD2* πρωτεΐνης, η οποία φυσιολογικά εκφράζεται σε νευρικό ιστό.

### 3.2.2 Κυτταροκαλλιέργεια

Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας:

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

Υλικά κυτταροκαλλιέργειας:

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

Συνθήκες καλλιέργειας:

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

### 3.2.3 Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο κατακρήμνισης του χλωριούχου ασβεστίου.

Η διαμόλυνση με την τεχνική του χλωριούχου ασβεστίου βασίζεται στη δημιουργία ενός ιζήματος άλατος-DNA, το οποίο όταν επικάθεται στην επιφάνεια των κυττάρων, έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί μικρές 'οπές', διαμέσου των οποίων μπορεί να εισέλθει το cDNA στο εσωτερικό του κυττάρου, και, χρησιμοποιώντας τη μεταφραστική μηχανή του, να οδηγήσει στη σύνθεση πρωτεΐνης (Sambrook, Maniatis



και συν, 1989). Συνοπτικά, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα;

1. Προετοιμασία των διαλυμάτων Α και Β

ΔΙΑΛΥΜΑ Α. Ανάμιξη κατά σειρά, για τρυβλία διαμέτρου 35mm:

3-10μg DNA

X μl H<sub>2</sub>O

16 μl CaCl<sub>2</sub>

ώστε ο τελικός όγκος να είναι 125μl

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

2. Ανάμιξη του διαλύματος Α με το διάλυμα Β αργά, με πιπετάρισμα, σταγόνα-σταγόνα. Επώαση για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστεί το ίζημα.
3. Εναπόθεση σπειροειδώς σταγόνα-σταγόνα του μίγματος CaCl<sub>2</sub>- DNA, στα τρυβλία (επιθυμητή πυκνότητα κυττάρων 60-70% της επιφάνειας), όπου έχουμε προηγουμένως προσθέσει φρέσκο θρεπτικό μέσο.
4. Επώαση στους 37°C για 4-16 ώρες.
5. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα των κυττάρων από το ίζημα 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1X (phosphate buffered saline). Προσθήκη φρέσκου θρεπτικού μέσου.
6. Επώαση στους 37°C για 48-72 ώρες, ώστε να εκφραστούν οι πρωτεΐνες.

### **3.1. Μονιμοποίηση κυττάρων και παρατήρηση σε πολυεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού**

1. 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση αφαίρεση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων 2 φορές με PBS
2. Προσθήκη 1ml παραφορμαλδεΰδης (PFA 4%) και επώαση για 10-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αφαίρεση PFA και πλύση δις με PBS.
4. Αφαίρεση της καλυπτρίδας από τον πυθμένα του τρυβλίου και εναπόθεση αργά (με την πλευρά που είναι προσκολλημένα τα κύτταρα προς τα κάτω) στην επιφάνεια ενός slide, στο οποίο έχει προστεθεί προηγουμένως μικρή ποσότητα (60μl) Mowiol 4-88 (mounting solution). Φύλαξη στους 4°C σε σκοτεινό μέρος.

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

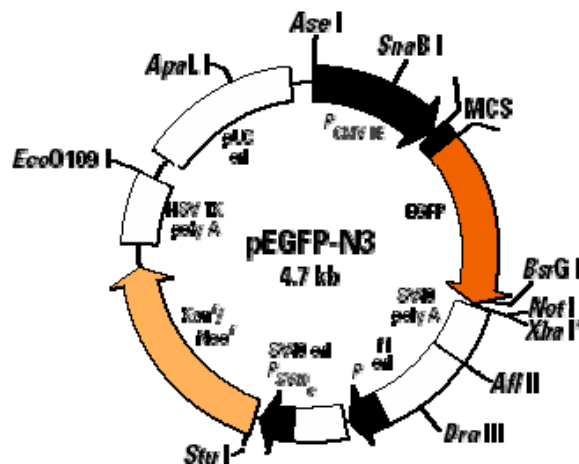
### 3.3 ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΟΔΗΓΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ GLUD1 ΚΑΙ GLUD2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Η ανάλυση της προβλεπόμενης οδηγού αλληλουχίας των 53aa των GLUD1 και GLUD2 σε επίπεδο αμινοξικής σύνθεσης και δευτεροταγούς δομής έγινε με τη χρήση του προγράμματος **PredictProtein**, που είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.predictprotein.org/>. Το PredictProtein είναι ένα πρόγραμμα που προσφέρεται για την ανάλυση της αλληλουχίας, της δομής και την πρόβλεψη της πιθανής λειτουργίας μίας πρωτεΐνης μέσω σύγκρισης αυτής με παρόμοιες αλληλουχίες πρωτεϊνών σε μία βάση δεδομένων.
- Η ανάλυση προβολής α-έλικας (a-helix wheel projection) σε επιλεγμένες αλληλουχίες εντός του GLUD1 ή GLUD2 οδηγού πεπτιδίου έγινε μέσω της ιστοσελίδας <http://www.webgenetics.com>, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Alpha Helix Wheel της κατηγορίας Protein.

### 3.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

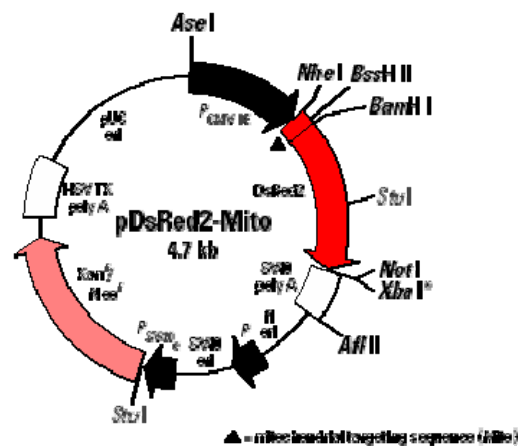
#### 3.4.1 Δομή του πλασμιδιακού φορέα υποκλωνοποίησης pEGFP-N3

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

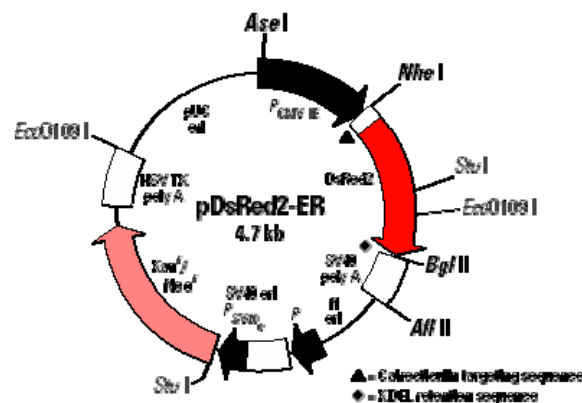


### 3.4.2. Δομή των πλασμιδιακών φορέων- δεικτών υποκυτταρικής εντόπισης pDsRed2-Mito, pDsRed2-ER και pDsRed2-Nuc.

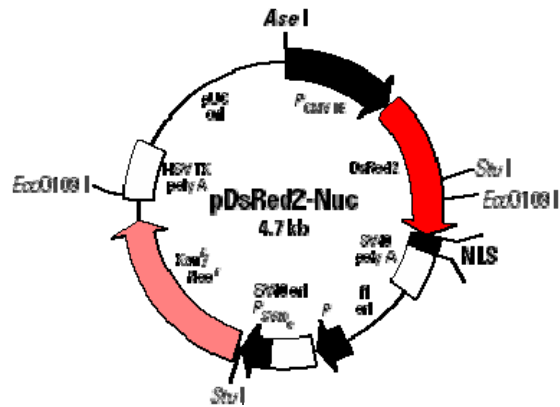
Ο **pDsRed2-Mito** (CLONTECH) είναι ένας φορέας έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών, ο οποίος εκφράζει μια χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία έχει προέλθει από τη συγχώνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *Discosoma sp.* Red fluorescent protein (DsRed2) και της μιτοχondριακής οδηγού αλληλουχίας της υπομονάδας VIII της ανθρώπινης μιτοχondριακής πρωτεΐνης cytochrome c oxidase. Η αλληλουχία αυτή είναι συγχωνευμένη στο 5' άκρο της πρωτεΐνης DsRed2 και καθοδηγεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη Mito-DsRed2 μέσα στα μιτοχόνδρια του ξενιστή.



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



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



## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΟΔΗΓΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΤΩΝ GLUD1 ΚΑΙ GLUD2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όπως είδαμε στο κεφάλαιο της εισαγωγής, οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης αποτελούνται στην ώριμη μορφή τους από 505 αμινοξέα και διαφέρουν σε 5 από αυτά. Η κλωνοποίηση των GLUD1 και GLUD2 γονιδίων έδειξε ότι στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών αυτών κωδικοποιείται φυσιολογικά ένα πρόσθετο πεπτίδιο 53 αμινοξέων, το οποίο απουσιάζει στις ώριμες πρωτεΐνες. Η αλληλουχία του πεπτιδίου αυτού για τα δύο ισόενζυμα παρουσιάζεται παρακάτω:

**GLUD1**-MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPGLALAARRHY 1-53

**GLUD2**-MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHY 1-53

Τα πεπτίδια αυτά διαφέρουν μεταξύ τους σε 9 αμινοξέα που υποδεικνύονται με κόκκινο χρώμα. Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός τους ρόλος στην καθοδήγηση των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, έγινε ανάλυση της αμινοξικής τους σύνθεσης και της δευτεροταγούς δομής.

**4.1.1. Τα αμινοτελικά πεπτίδια των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg και σε υδρόφοβα κατάλοιπα Leu και Ala.**

Με τη χρήση του προγράμματος <http://www.predictprotein.org/> έγινε ποσοστιαία ανάλυση της σύνθεσης σε αμινοξέα των υπό μελέτη πεπτιδίων. Η ανάλυση φαίνεται στους παρακάτω πίνακες για τις δύο πρωτεΐνες.

**GLUD1**

**GLUD2**

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

%A: 28.3	%C: 0.0	%D: 0.0	%E: 0.0	%F: 0.0
%G: 11.3	%H: 3.8	%I: 0.0	%K: 1.9	%L: 15.1
%M: 1.9	%N: 1.9	%P: 7.5	%Q: 3.8	%R: 11.3
%S: 7.5	%T: 0.0	%V: 0.0	%W: 0.0	%Y: 5.7

Χαρακτηριστική είναι η συχνή εμφάνιση του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Arg (R) και στα δύο πεπτίδια, που είναι άλλωστε κοινό εύρημα σε όλα τα μιτοχονδριακά οδηγά πεπτίδια, καθώς και του υδρόφοβου αμινοξέος Leu (L). Μία άλλη παρατήρηση είναι η πλήρης απουσία αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στο GLUD2 πεπτίδιο. Στο GLUD1 πεπτίδιο υπάρχουν ένα κατάλοιπο Asp (D) και ένα κατάλοιπο Glu (E). Η παρατήρηση αυτή έχει σημασία καθώς τα περισσότερα οδηγά πεπτίδια έχουν συνολικό θετικό φορτίο, αν και κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η δυνατότητα διαμόρφωσης σε αμφιφιλικές α-έλικες είναι πιο καθοριστική για τη μιτοχονδριακή καθοδήγηση (Hammen και Weiner, 1998). Αξίζει επίσης να σημειωθεί η παρουσία καταλοίπου Arg στη θέση -3 (από το τέλος), η οποία μπορεί να σηματοδοτεί την αποκοπή του πεπτιδίου (cleavage site) δυο αμινοξέα καταρροϊκά (Gavel Y, von Heijne G.,1990).

**4.1.2 Τα αμινοτελικά πεπτίδια των GLUD1 και GLUD2 παρουσιάζουν ισχυρή πιθανότητα διαμόρφωσης σε α-έλικες σε περισσότερα του ενός σημεία στο μόριο τους.**

Το πρόγραμμα <http://www.predictprotein.org/> χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς διαμόρφωσης των αμινοτελικών πεπτιδίων των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί μία βάση δεδομένων αποτελούμενη από ένα μεγάλο αριθμό αμινοξικών ακολουθιών γνωστής δευτεροταγούς δομής για να προβλέψει τη πιθανή διαμόρφωση ενός άγνωστου πεπτιδίου σε α-έλικες, β- πτυχωτές επιφάνειες (sheets) ή σπείρες (coils).

Η προβλεπόμενη δευτεροταγής διαμόρφωση για τα δύο πεπτίδια φαίνεται παρακάτω. Οι αριθμοί (0-9) ανταποκρίνονται στο βαθμό της πιθανότητας να εμφανιστεί η προτεινόμενη δευτεροταγής δομή. (H= α-έλικα, E= πτυχωτή επιφάνεια, L= αγκύλη).

**GLUD1 :**

sec str type	H	E	L
% in protein	62.26	0	37.74

MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPGLALAARRHY

PROF sec        **HHHHHHHHHH**        **HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH**        **HHHHH**

Rel sec        935888887421568802320488888877542148834477655451554038

SUB sec        L.HHHHHH... **LLLL**.....HHHHHHHHH... **LL...LLLLL**.L.HH...L

## GLUD2:

sec str type	H	E	L
% in protein	64.15	0	35.85

H=helix, E=extended (sheet), L= loop

```
AA MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHY
PROF sec HHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHH
Rel sec 84788887300678825553488777877531068844577730368876228
SUB sec L.HHHHHH...LLL.HHH.HHHHHHHHH...LLL.LLLL.HHHHH.L
```

Όταν χρησιμοποιήθηκε ένα παρεμφερές πρόγραμμα (GORV prediction) για την ανάλυση του GLUD2 πεπτιδίου τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια:

```
This is the GOR V prediction:
MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHY
CCCC HHHHHHHH CCCCCCCCC HHHHHHHHHHH CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
```

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω προβλέψεις υπάρχει ισχυρή πιθανότητα διαμόρφωσης του πεπτιδίου σε α-ελικοειδή δομή στα πρώτα 10-12 κατάλοιπα καθώς και στα κατάλοιπα 17-32. Μικρότερη είναι η πιθανότητα σχηματισμού α-έλικας στα τελευταία αμινοξέα 45-51.

### 4.1.3 Ανάλυση προβολής α-έλικας και προσδιορισμός βαθμού αμφιφιλικότητας

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός αμφιφιλικότητας (ύπαρξη αντιδιαμετρικών επιφανειών με διαφορετικό βαθμό πολικότητας-υδροφοβικής προδιάθεσης), χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα WebGenetics για την δημιουργία κατοπτρικών προβολών των προβλεπόμενων α-ελίκων. Κατόπιν, υπολογίστηκε η υδροφοβική κλίση (hydrophobic moment), προσθέτοντας τις τιμές 'υδροφοβικότητας' γειτονικών αμινοξέων, ακολουθώντας την παρακάτω κλίμακα (von Heijne, 1986):

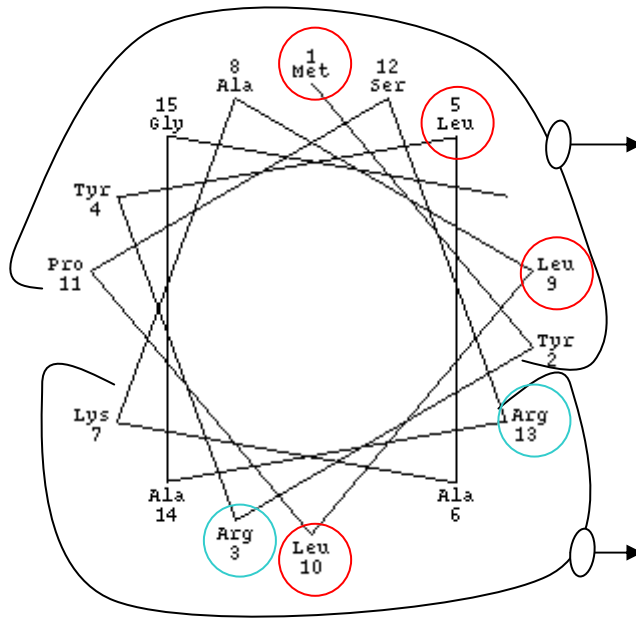
Arg, Lys, Asp, Glu: -1

Leu, Ile, Val, Phe, Met : +1

Όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα: 0



**1<sup>η</sup> Έλκα:**  
**1-15 αμινοξέα**

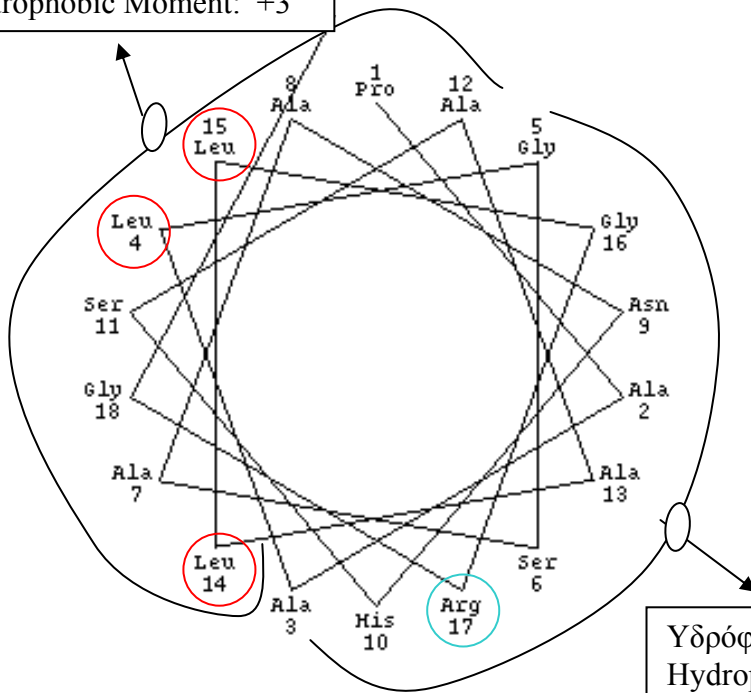


Υδρόφοβη επιφάνεια  
Hydrophobic moment: +3

Υδρόφιλη Επιφάνεια  
Hydrophobic moment : -2

Υδρόφοβη Επιφάνεια  
Hydrophobic Moment: +3

**2<sup>η</sup> Έλκα:**  
**16-33 αμινοξέα**



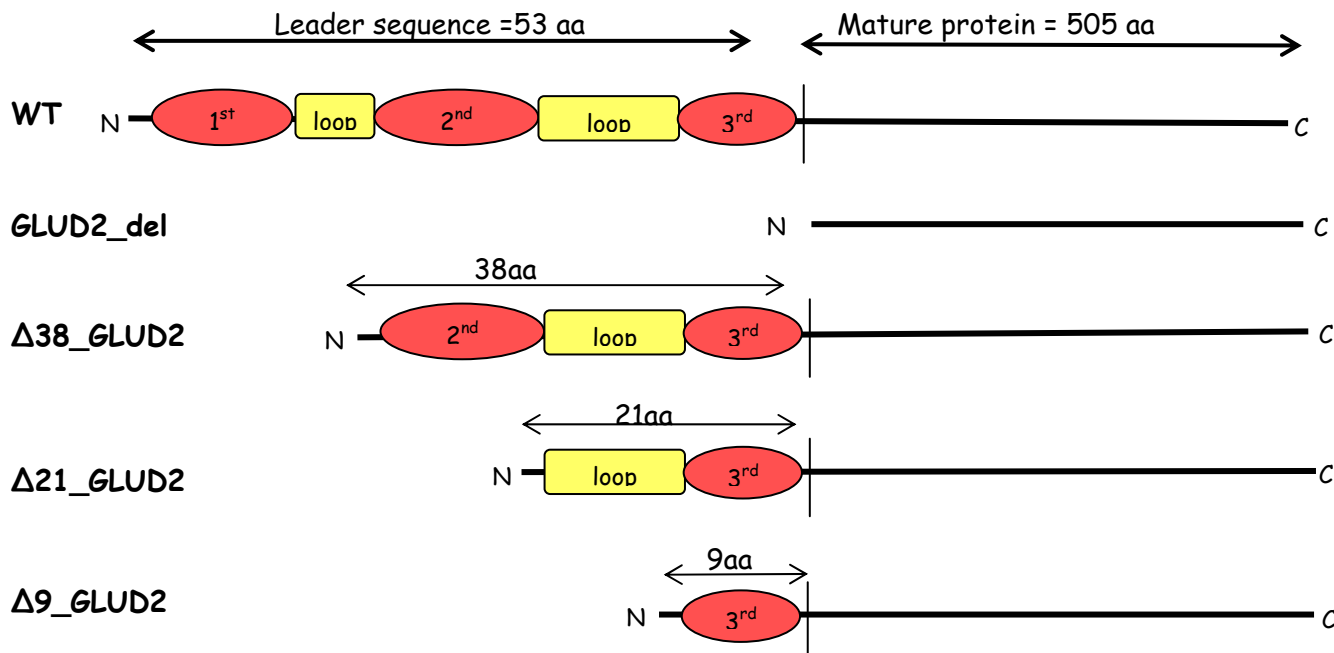
Υδρόφιλη επιφάνεια  
Hydrophobic moment: -1

Όσον αφορά την τελευταία έλκα (κατάλοιπα 45-51), ο αριθμός των αμινοξέων δεν ήταν ικανός για τη δημιουργία κατοπτρικής προβολής. Όπως βλέπουμε παραπάνω, και οι δύο πρώτες έλικες που προβλέπονται από τα διαδικτυακά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν αντιδιαμετρικές υδρόφιλες και υδρόφοβες

επιφάνειες. Με βάση την κλίμακα υδροφοβικότητας αμινοξέων που εφαρμόστηκε (η οποία όμως είναι αδρή και δεν υπολογίζει με ακρίβεια την υδροφοβική κλίση κάθε αμινοξέος), φαίνεται ότι η 1η έλικα παρουσιάζει ίσως μεγαλύτερη αμφιφιλική προδιάθεση από την 2η έλικα.

Παρακάτω, αναπαρίσταται σχηματικά ο σχεδιασμός των τεσσάρων μεταλλάξεων-εξαλείψεων (deletions) του οδηγού πεπτιδίου για τη GLUD2 πρωτεΐνη. Ο σχεδιασμός στηρίχθηκε σε μεγάλο βαθμό στην παραπάνω ανάλυση.

**GLUD2 LEADER SEQUENCE:**  
 MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHS AALLGRGRGQPAAASQPGLALAARRHY  
 HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHH  
 L.HHHHHHH... LLLL.HHH.HHHHHHHHHH... LLL.LLLL... HHHHH...L



**GLUD2\_del:** Κωδικοποιεί την ώριμη πρωτεΐνη από την οποία έχει εξαλειφθεί τελείως το οδηγό πεπτίδιο.

**Δ38\_GLUD2:** Κωδικοποιεί τα καρβοξυτελικά 38aa του οδηγού πεπτιδίου (που περιλαμβάνουν την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> έλικα) και την ώριμη πρωτεΐνη.

**Δ21\_GLUD2:** Κωδικοποιεί τα καρβοξυτελικά 21aa του οδηγού πεπτιδίου (που περιλαμβάνουν την 3η έλικα και την προηγούμενη αγκύλη) και την ώριμη πρωτεΐνη.

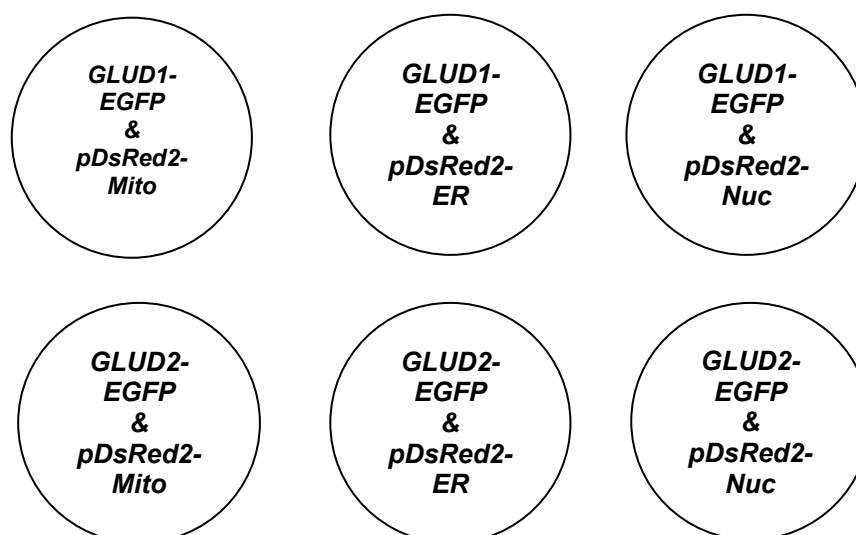
**Δ9\_GLUD2:** Κωδικοποιεί τα καρβοξυτελικά 9aa του οδηγού πεπτιδίου (που περιλαμβάνουν την 3<sup>η</sup> έλικα) και την ώριμη πρωτεΐνη.

## 4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

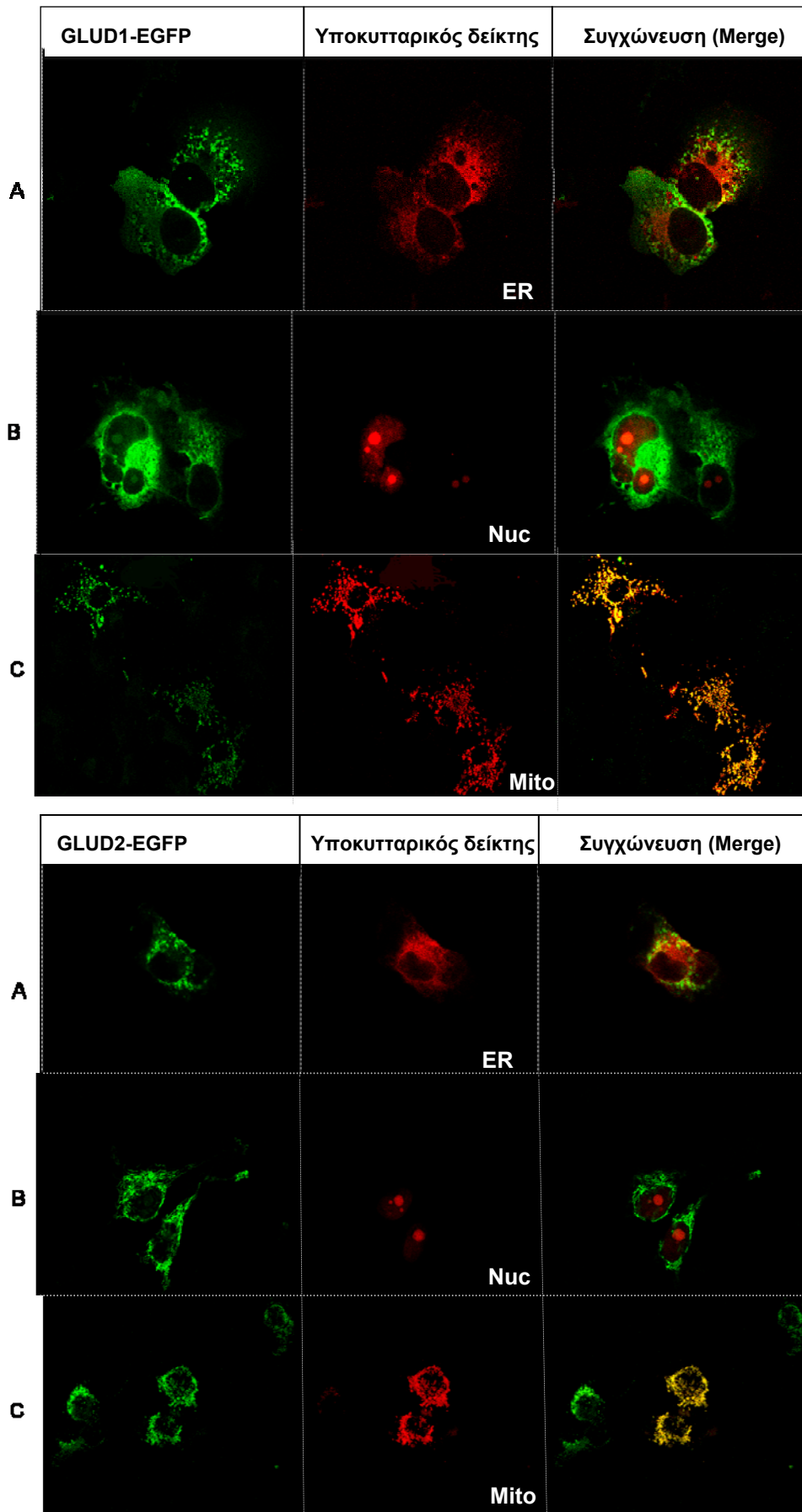
### 4.2.1 Οι φυσιολογικές πλήρους μήκους GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP χμαιοικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια.

Τα πειράματα που αφορούν τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.2.1 πραγματοποιήθηκαν από άλλα μέλη του εργαστηρίου, αλλά περιγράφονται ώστε να γίνει συγκριτική αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα των μεταλλαγμένων GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP μορφών.

Κύτταρα των σειρών COS7, HeLa ή HEK293 συνδιαμολώνθηκαν 1) με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που εκφράζει την πλήρους μήκους GLUD1-EGFP (ή GLUD2-EGFP) χμαιοική πρωτεΐνη και με 2) καθένα από τα πλασμίδια- δείκτες υποκυτταρικής εντόπισης (pDsRed2-Mito, pDsRed2-ER και pDsRed2-Nuc), ως εξής:



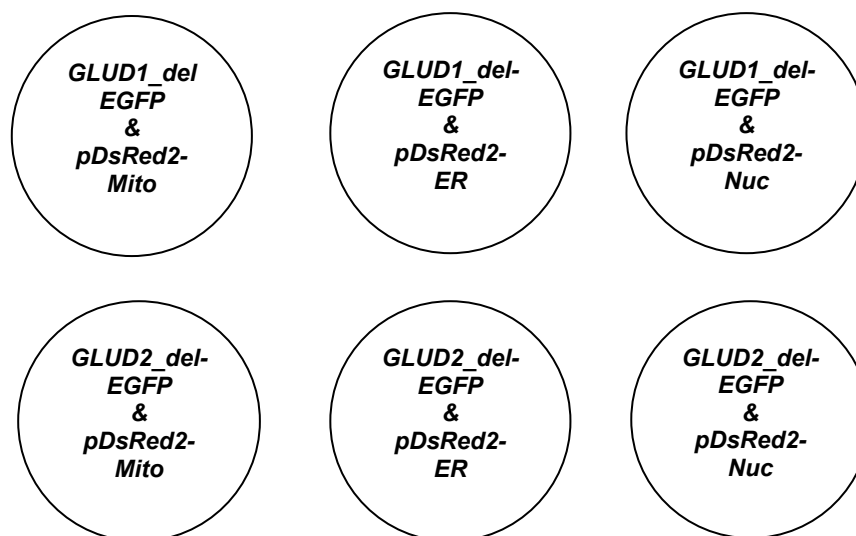
Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.1 που ακολουθεί, το πρότυπο φθορισμού των GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP χμαιοικών πρωτεϊνών παρουσιάζει σχεδόν πλήρη επικάλυψη με τον κόκκινο φθορισμό του δείκτη pDsRed2-Mito στα ίδια κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι και τα δύο ισοένζυμα της γλουταμικής αφυδρογονάσης εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Επιπρόσθετα ένας μικρός βαθμός συνεντοπισμού παρατηρείται σε κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με GLUD1-EGFP ή GLUD2-EGFP και τον δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου pDsRed2-ER. Τέλος μηδενικός συνεντοπισμός παρατηρείται με τον πυρηνικό δείκτη pDsRed2-Nuc.



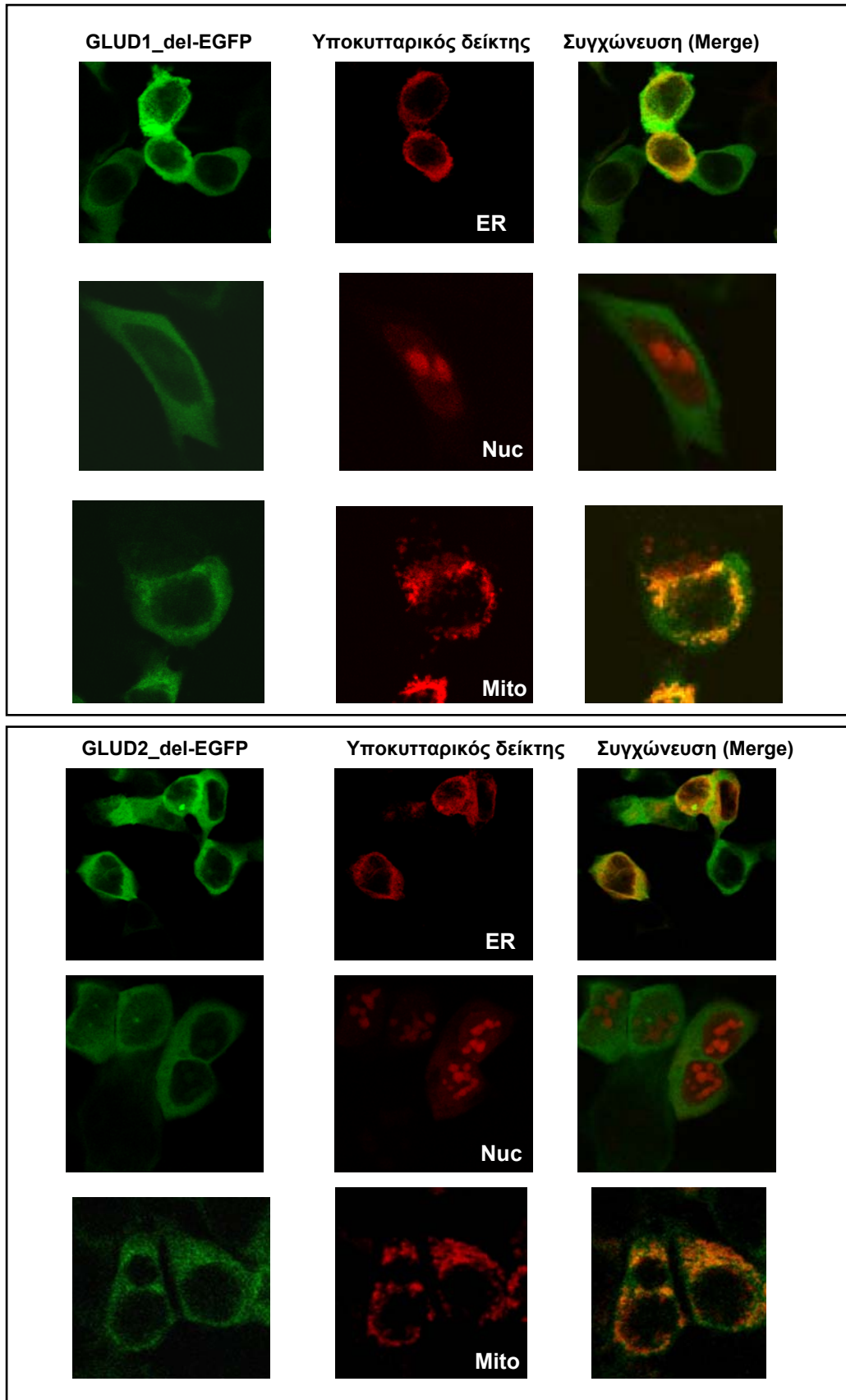
Εικόνα 4.1. Υποκυτταρική κατανομή των GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP χμιαρικών πρωτεϊνών συγκριτικά με γνωστούς δείκτες (Mito, ER, Nuc)

#### 4.2.2 Το αμινοτελικό οδηγό πεπτίδιο είναι απαραίτητο για την είσοδο των GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.

Κύτταρα HEK293 και SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια GLUD1\_del-EGFP και GLUD2\_del-EGFP, τα οποία κωδικοποιούν τη περικομμένη (deletion) μορφή των GLUD1-EGFP και GLUD2-EGFP χιμαιρικών πρωτεϊνών, από την οποία έχει εξαλειφθεί πλήρως το αμινοτελικό οδηγό πεπτίδιο των 53 αμινοξέων. Παράλληλα έγινε συνδιαμόλυνση με τους υποκυτταρικούς δείκτες pDsRed2-Mito, pDsRed2-ER και pDsRed2-Nuc για συγκριτικό έλεγχο της υποκυτταρική κατανομή.



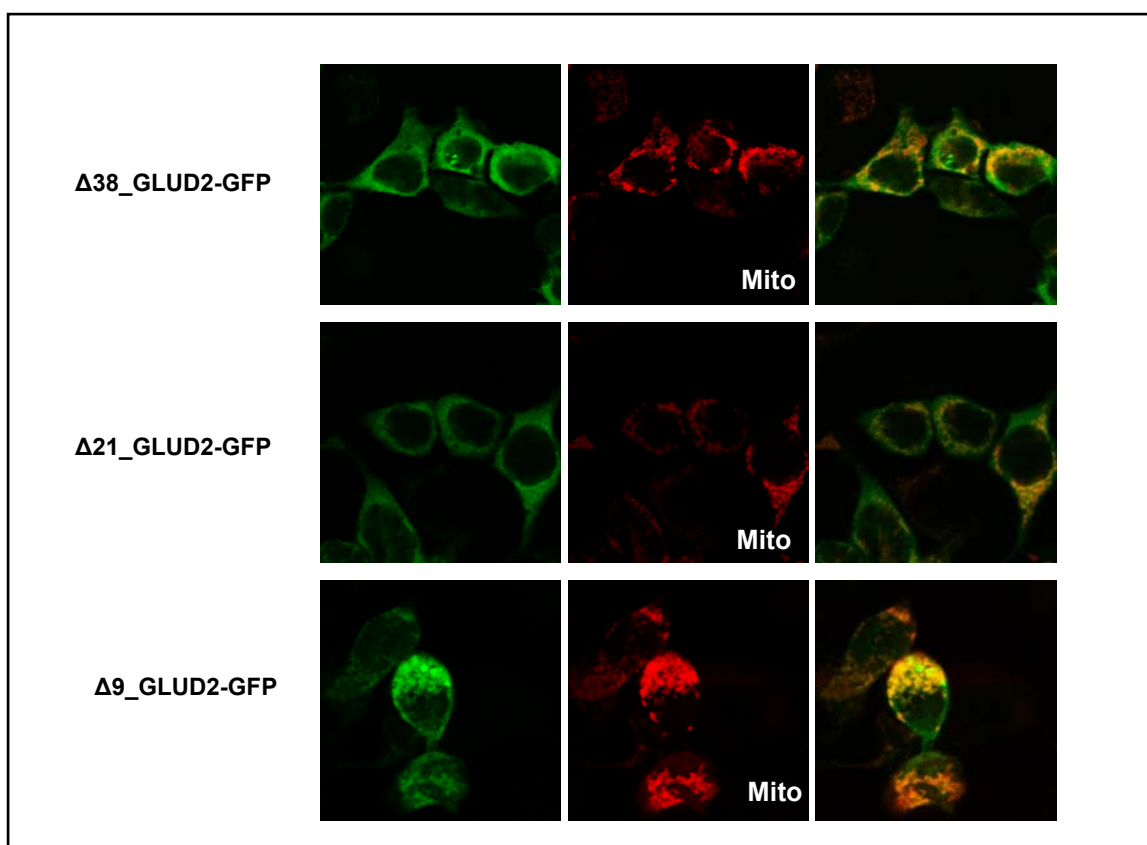
Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2 που ακολουθεί, η εξάλειψη του αμινοτελικού οδηγού πεπτιδίου καταργεί τη μιτοχονδριακή εντόπιση των GDH πρωτεϊνών. Ο πράσινος φθορισμός παρουσιάζει μια ομοιόμορφη ευρεία κατανομή γύρω από τον πυρήνα, σε μία περιοχή που πιθανώς αντιστοιχεί ανατομικά στο κυτταρόπλασμα. Η κατανομή αυτή διαφέρει πολύ από τη στικτή ‘οργανιδιακού τύπου’ κατανομή που παρουσιάζει ο μιτοχονδριακός δείκτης pDsRed2-Mito, όπως και οι φυσιολογικές πλήρους μήκους πρωτεΐνες [Εικόνα 4.1]. Παρατηρείται και πάλι κάποιου βαθμού συνεντοπισμός με το δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου pDsRed2-ER, όμως κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το δίκτυο του ER εκτείνεται πραγματικά σε όλη τη δεξαμενή του κυτταροπλάσματος, και να μην ανταποκρίνεται σε πραγματική εντόπιση των πρωτεϊνών στο ER.



Εικόνα 4.2. Η εξάλειψη του οδηγού πεπτιδίου καταργεί τη μιτοχονδριακή εντόπιση των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών και οδηγεί σε μία διάχυτη περιπυρηνική κατανομή του φορισμού τους.

#### 4.2.3 Αρχικά αποτελέσματα από την έκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που εκφράζουν τις ελλειμματικές μορφές του GLUD2 οδηγού πεπτιδίου

Κύτταρα HEK293 συνδιαμολύνθηκαν με καθένα από τα πλασμίδια Δ38\_GLUD2-GFP, Δ21\_GLUD2-GFP, Δ9\_GLUD2-GFP, και με το μιτοχονδριακό δείκτη DsRed2-Mito. Όπως έχει περιγραφεί, τα πλασμίδια αυτά κωδικοποιούν χμιαϊκές GLUD2-GFP πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν, αντίστοιχα, τα καρβοξυτελικά 38, 21, 9 αμινοξέα από την αλληλουχία του οδηγού πεπτιδίου.

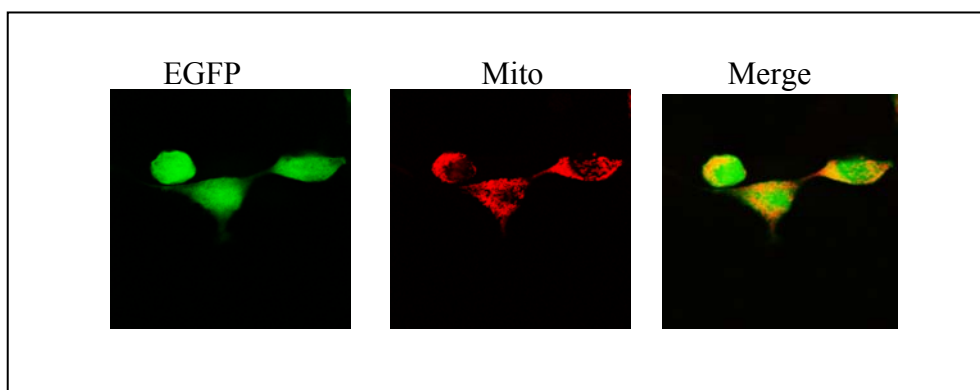


Εικόνα 4.3. Έκφραση των μεταλλαγμένων ‘ελλειμματικών’ μορφών του GLUD2 οδηγού πεπτιδίου σε κύτταρα HEK293 (πράσινο) και σύγκριση με το μιτοχονδριακό δείκτη DsRed2-Mito (κόκκινο).

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι καμία από τις μεταλλαγμένες μορφές ( $\Delta 38\_GLUD2\text{-GFP}$ ,  $\Delta 21\_GLUD2\text{-GFP}$ ,  $\Delta 9\_GLUD2\text{-GFP}$ ) του οδηγού πεπτιδίου δε μπορεί να οδηγήσει τη GLUD2 πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Αν και παρατηρείται μικρού βαθμού συνεντοπισμός με το μιτοχονδριακό δείκτη, η κατανομή του πράσινου φθορισμού είναι σαφώς πιο ομοιόμορφη και κατανέμεται καθολικώς στην περιφέρεια του πυρήνα.

#### 4.2.4. Υποκυτταρική κατανομή της EGFP πρωτεΐνης (control)

Κύτταρα HEK συν-διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N3 (μη τροποποιημένο) και το μιτοχονδριακό δείκτη DsRed2-Mito. Οι εικόνες που ελήφθησαν με το πολυεστιακό μικροσκόπιο δείχνουν μία ομοιόμορφη κατανομή του πράσινου φθορισμού σε όλο το κύτταρο, συμπεριλαμβανόμενου και του πυρήνα.





## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρούσα εργασία παρέχει ισχυρές ενδείξεις για τη σημασία του οδηγού πεπτιδίου (leader peptide) στην καθοδήγηση των GLUD1 και GLUD2 ισομορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης στα μιτοχόνδρια. Το κύριο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι το 'πρόσθετο' αμινοτελικό πεπτίδιο των 53αα είναι απαραίτητο για την είσοδο στο μιτοχόνδριο, καθώς μεταλλαγμένες GLUD1 και GLUD2 μορφές, από τις οποίες έχει εξαιρεθεί το πεπτίδιο αυτό, χάνουν το χαρακτηριστικό πρότυπο μιτοχονδριακής κατανομής των φυσιολογικών πρωτεϊνών, και αντίθετα, φαίνεται ότι κατακρατούνται στο κυτταρόπλασμα. Η παρατήρηση αυτή έρχεται να επιβεβαιώσει υποθέσεις παλαιότερων ερευνητών (Mihara και συν, 1982, Mavrothalassitis και συν, 1988), σύμφωνα με τους οποίους η γλουταμική αφυδρογονάση (αναφερόμενοι στην GLUD1 μορφή) συντίθεται ως ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο στο κυτταρόπλασμα, και οδηγείται στη συνέχεια στο μιτοχόνδριο, όπου αποκόπτονται τα πρώτα 53 αμινοξέα, για να παραμείνει η ώριμη μορφή.

Η δομική ανάλυση που έγινε με προγράμματα βιοπληροφορικής έδειξε ότι και τα δύο πεπτίδια εμφανίζουν πιθανότητα διαμόρφωσης σε α-έλικες σε δύο τουλάχιστον σημεία της αλληλουχίας τους. Η 1<sup>η</sup> έλικα πιθανώς σχηματίζεται από τα αμινοξέα 2-10 (1-15), η 2<sup>η</sup> έλικα από τα αμινοξέα 16-33 και η 3<sup>η</sup> (με μικρότερη πιθανότητα) από τα αμινοξέα 46-51. Έγινε προσπάθεια υπολογισμού της υδροφοβικής κλίσης για τις παραπάνω έλικες του GLUD2 πεπτιδίου, η οποία έδειξε ότι η πρώτη και η δεύτερη έλικα παρουσιάζουν αμφιπαθή χαρακτηριστικά, γεγονός που τις καθιστά υποψήφια 'σήματα' μιτοχονδριακής καθοδήγησης.

Ένα στοιχείο που διαφοροποιεί τα GLUD1 και GLUD2 οδηγά πεπτίδια από τα περισσότερα γνωστά οδηγά πεπτίδια άλλων πρωτεϊνών είναι το μεγάλο μέγεθός τους. Πράγματι, ένα τυπικό μιτοχονδριακό οδηγό πεπτίδιο, περιέχει 17-35 αμινοξέα (Hammen και συν, 1998) και διαμορφώνεται συνήθως σε μία α-έλικα. Η πιθανότητα ελικοειδούς διαμόρφωσης σε περισσότερα του ενός σημεία στα GLUD1 και GLUD2 οδηγά πεπτίδια γεννά το ερώτημα πού βρίσκεται το σήμα που είναι κυρίως υπεύθυνο για τη μιτοχονδριακή καθοδήγηση. Το ερώτημα αυτό προσπαθήσαμε να το προσεγγίσουμε κατασκευάζοντας πλασμίδια που εκφράζουν ελλειμματικές (shortened) μορφές του GLUD2 πεπτιδίου και εξετάζοντας την υποκυτταρική τους εντόπιση. Τα πειράματα αυτά είναι ακόμη σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας, άλλα προκαταρκτικά

αποτελέσματα δείχνουν ότι η υποθετική δεύτερη έλικα (38 αμινοξέα αμινοτελικά της ώριμης πρωτεΐνης) και η 3<sup>η</sup> έλικα (9 ή 21 αμινοξέα αμινοτελικά της ώριμης πρωτεΐνης) δε μπορούν από μόνες τους να οδηγήσουν τη GLUD2 πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η 1<sup>η</sup> έλικα (πρώτα 15 αμινοξέα) περιέχει το καθοριστικό σήμα καθοδήγησης, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ή ότι το σήμα για την καθοδήγηση των GLUD πρωτεϊνών εκτείνεται σε περισσότερα σημεία και όχι σε μία μόνο έλικα. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής έγινε με υπολογιστικά προγράμματα, τα οποία προβλέπουν τη διαμόρφωση ενός πεπτιδίου με ένα βαθμό πιθανότητας. Η μελέτη του οδηγού πεπτιδίου με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας θα μπορούσε να αποκαλύψει την πραγματική δευτεροταγή διαμόρφωση αυτού.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατασκευής EGFP-χμιαϊκών πρωτεϊνών για τη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των διάφορων ελλειμματικών μορφών των GLUD πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με φθορίζοντες υποκυτταρικούς δείκτες. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα της *in situ* παρατήρησης, με το μικροσκόπιο, της κατανομής του φθορισμού μιας πρωτεΐνης σε κυτταρικά παρασκευάσματα και έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για τη μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης πρωτεϊνών. Ένα σημαντικό μειονέκτημα, το οποίο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τις τεχνικές ιδιότητες του πολυεστιακού μικροσκοπίου και των laser, είναι η δυσχέρεια σαφούς διαχωρισμού των ορίων μεταξύ διαφορετικών οργανιδίων και διαμερισμάτων εντός των κυττάρων. Ως γνωστό, τα κύτταρα είναι τρισδιάστατες δομές και τα οργανίδια ‘επιπλέουν’ σε όλο τον όγκο του κυτταροπλάσματος. Είναι αναμενόμενο να υπάρχει πολλές φορές αλληλοεπικάλυψη μεταξύ διαφορετικών οργανιδίων σε εικόνες μικροσκοπίου, ειδικά όταν μελετάται φθορισμός. Η εξέταση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ίσως προσέφερε μία πιο σαφή εικόνα της κατανομής των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Επίσης η διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των GLUD1 και GLUD2 πρωτεϊνών θα μπορούσε να γίνει με πρόσθετες μεθόδους, ώστε να επιβεβαιωθούν τα υπάρχοντα αποτελέσματα. Μία *in vitro* μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί από κάποιους ερευνητές (π.χ. Duby και συν, 2001) είναι ο διαχωρισμός εκχυλισμάτων κυττάρων σε κλάσματα περιέχοντα διαφορετικά οργανίδια με την τεχνική της διαφορικής φυγοκέντρησης (differential centrifugation). Στη συνέχεια, η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης στα κλάσματα αυτά μπορεί να γίνει με ανοσοδοκιμασία Western Blot ή με μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας, αν πρόκειται για ένζυμο. Τέλος, μία μέθοδος που

έχει χρησιμοποιηθεί (Hortnagel και συν, 2003) για την διερεύνηση της μιτοχονδριακής εντόπισης πρωτεϊνών είναι η μέτρηση του ποσοστού εισόδου ραδιενεργά σσημασμένων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (in vitro mitochondrial import). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε in vitro σύνθεση (in vitro translation) και συνοδό ραδιενεργό σήμανση με  $[S]^3$  Met μίας πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή ακολούθως επωάζεται με παρασκεύασμα απομονωμένων μιτοχονδρίων, τα οποία έπειτα αναλύονται με αυτοραδιογραφία.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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
2. 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.
3. 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.
4. Cooper AJ. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(4):280-6.
5. di Prisco G, Garofano F. Links Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from ox liver nuclei. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974 Jun 4;58(3):683-9
6. Duby G, Oufattole M, Boutry M. Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import. *Plant J.* 2001 Sep;27(6):539-4
7. Erecinska M, Nelson D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 1990 Apr;54(4):1335-43
8. Farinelli SE, Nicklas WJ. Glutamate metabolism in rat cortical astrocyte cultures. *J Neurochem.* 1992 May;58(5):1905-15.
9. Gavel Y, von Heijne G. Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* 1990 Oct;4(1):33-7.
10. Hammen PK, Weiner H. Mitochondrial leader sequences: structural similarities and sequence differences. *J Exp Zool.* 1998 Sep-Oct 1;282 (1-2):280-3.
11. von Heijne G. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 1986 Jun;5(6):1335-42.

12. HOGEBROOM GH, SCHNEIDER WC. Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1953 Sep;204(1):233-8.
13. Hortnagel K, Prokisch H, Meitinger T. An isoform of hPANK2, deficient in pantothenate kinase-associated neurodegeneration, localizes to mitochondria. *Hum Mol Genet*. 2003 Feb 1;12(3):321-7.
14. Hudson RC, Daniel RM. L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp Biochem Physiol B*. 1993 Dec;106(4):767-92
15. Hogeboom GH, Schneider WC. 1953. Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J Biol Chem* 204:233–238.
16. Lai JC, Sheu KF, Kim YT, Clarke DD, Blass JP. 1986 The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem Res* 11(5):733-44
17. Lee WK, Shin S, Cho SS, Park JS. Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biochem*. 1999 Dec;76(2):244-53.
18. Komiya T, Rospert S, Schatz G, Mihara K. Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *EMBO J*. 1997 Jul 16;16(14):4267-75
19. 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.
20. McDaniel HG (1995) Comparison of the primary structure of nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Arch Biochem Biophys*. 10;319(1):316-21.
21. McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. 1996. Exogenous concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* 66:386 –393.
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. Mihara K, Omura T, Harano T, Brenner S, Fleischer S, Rajagopalan KV, Blobel G. Rat liver L-glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, D-

- beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, and sulfite oxidase are each synthesized as larger precursors by cytoplasmic free polysomes. *J Biol Chem.* 1982 Apr 10;257(7):3355-8.
24. Pfanner N, Geissler A. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 May;2(5):339-49.
  25. Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. (1982). Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216:193–196.
  26. Plaitakis A, Berl S and Yahr MD (1984). Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. *Ann Neurol* **15**, 144-153
  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. Preiss T, Sang AE, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN. The mRNA-binding protein COLBP is glutamate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 1995 Jul 3;367(3):291-6.
  30. Preiss T, Hall AG, Lightowlers RN. Identification of bovine glutamate dehydrogenase as an RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25;268(33):24523-6
  31. Rajas F, Gire V, Rousset B. (1996) Involvement of a membrane-bound form of glutamate dehydrogenase in the association of lysosomes to microtubules. *J Biol Chem.* 271 ;47:29882-90.
  32. Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. (1994). Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 62:1134 –1146.
  33. Salganicoff F, De Robertis E. 1965. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and  $\alpha$ -aminobutyric acid cycles in rat brain. *J Neurochem* 12:287–309.
  34. Sambrook, J., Fritsch E, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

35. 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.
36. 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
37. 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
38. Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate Dehydrogenase. The Enzymes (Boyer PD editor). 1975 Vol 11: 293-367. New York, Academic Press
39. 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.
40. 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
41. Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A. 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21:56 –63.
42. 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
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. Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):14473-6.

46. Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of <sup>14</sup>C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1982 Oct;39(4):954-60.
47. 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
48. 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