

L – ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟ ΟΞΥ

Το γλουταμικό είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ (σημαντικό πρόδρομο συστατικό για την σύνθεση των μη απαραίτητων αμινοξέων) με ευρεία κατανομή στον εγκέφαλο και με μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ιστό αυτόν από οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ (Fonnum 1984).

Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός νευρώνων ο οποίοι διαθέτουν γλουταμικό σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως στις συνάψεις και είναι κατανεμημένοι σε όλο τον εγκέφαλο. Γεγονός που οδήγησε σε περαιτέρω μελέτες οι οποίες συμπέραναν την δράση του γλουταμινικού ως νευροδιαβιβαστή των νευρικών κύτταρων (Fonnum 1984) το οποίο στηρίχθηκε και αποδείχθηκε από μεταγενέστερες μελέτες .

Οι κυριότεροι οδοί γλουταμινεργικών ινών στον εγκέφαλο είναι η ψαλίδα του ιππόκαμπου, το μεσολόβιο και η έσω κάψα (Aoki et al. 1987, Fonnum 1984)

Οι περιοχές με υψηλότερη περιεκτικότητα υποδοχέων γλουταμινικού είναι τα βασικά γάγγλια, οι θαλαμικές περιοχές της μέσης γραμμής και ο φλοιός του εγκέφαλου και της παρεγκεφαλίδας (Aoki et al. 1987, Halpain et al. 1989, Grandes et al 1994)

Ο ρόλος του έχει μελετηθεί ευρέως τα τελευταία 50 χρόνια στον εγκέφαλο και εκτός από το ότι αποτελεί τον κυριότερο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) - εγκέφαλου και νωτιαίου μυελού – και εμπλέκεται σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης, παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ συμμετέχοντας σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, μετανάστευση, διαφοροποίηση, επαγωγή ή εξάλειψη συνάψεων και τον θάνατο των κύτταρων ενώ ταυτόχρονα διατελεί σημαντικό ρόλο στις ενεργειακές και μεταβολικές λειτουργίες των εγκεφαλικών κύτταρων (βασικός μεταβολισμός).

Η απελευθέρωση γλουταμινικού στην συναπτική σχισμή πάνω από τα επίπεδα της φυσιολογικής νευροδιαβίβασης οδηγεί στον θάνατο των νευρικών κύτταρων (Choi 1988, Fonnum 1984) με την εκδήλωση του υποξικού νευρικού επεισοδίου διαδικασία γνωστή και ως διεγερτοτοξικότητα (Siesjo & Bengston 1989, Karlsen & Fonnum 1976, Stewart et al 1991, Didier et al. 1996, Sattler & Tymianski 2001, Izumi et al. 2002).

Ένας αυξανόμενος αριθμός πειραμάτων συνδέει ανωμαλίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σοβαρές νευρολογικές και ψυχιατρικές ασθένειες όπως η Parkinson, η Alzheimer η ALS και η Σχιζοφρένεια με ανωμαλίες στο μεταβολισμό και διαχείριση των αποθεμάτων του γλουταμινικού από τον ίδιο τον οργανισμό (Plaitakis et al. 1982, Duvoisin et al. 1983,1988, Beal et al. 1993)

Το σύνδρομο υπεραμμωναιμίας (διανοητική καθυστέρηση, ληθαργικότητα και συχνούς εμετούς - συμπτώματα που θεωρούνται αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων αμμωνίας στο ΚΝΣ λόγω της αδυναμίας μεταβολισμού της και αποβολής της μέσω του κύκλου της ουρίας) έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στην μερική έλλειψη

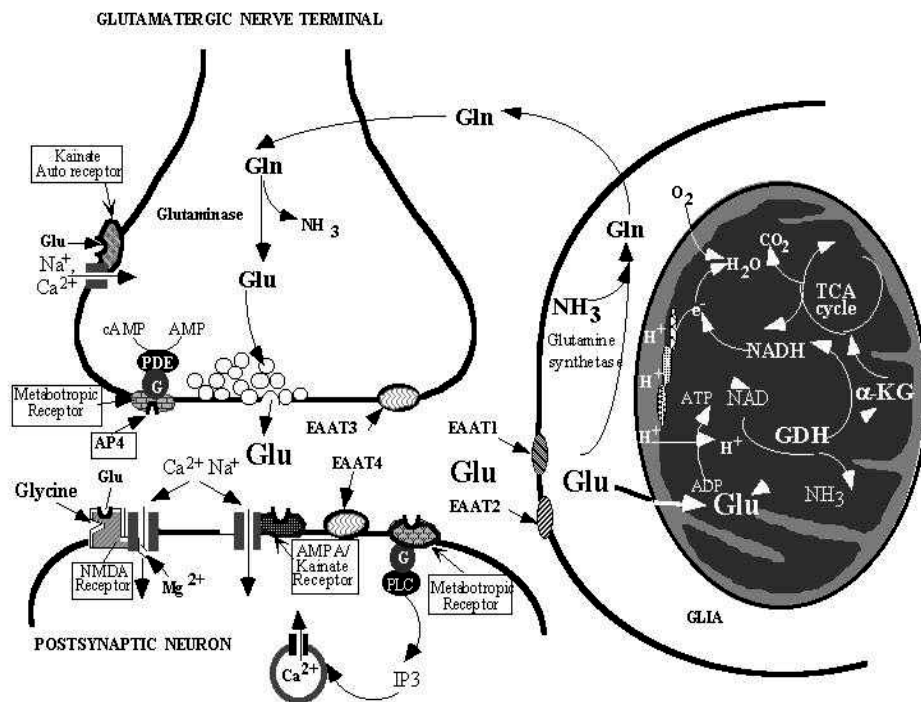
N-ακετυλογλουταμικού, απαραίτητος ενεργοποιητής της συνθέσεως του καρβουλοφωσφορικού, ενζύμου που αποτελεί ουσιαστικά το πρώτο βήμα του κύκλου της ουρίας, καθορίζοντας την ταχύτητα παραγωγής ουρίας από αυτόν.

Το N-ακετυλογλουταμικό συντίθεται από γλουταμικό και εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα του στο κύτταρο.

Αυτό έχει σημαντικότερες παθοφυσιολογικές επιπτώσεις καθώς με αυτόν τον τρόπο τα ενδομιτοχονδριακά επίπεδα του γλουταμικού καθορίζουν το ρυθμό παραγωγής ουρίας στον οργανισμό μας.

Στην ηπατική εγκεφαλοπάθεια, κύρια νευροψυχιατρική διαταραχή, η αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας αναστέλει την 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση, ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος (Cooper & Plum 1987).

Από όλα τα παραπάνω αναδεικνύεται η σημασία του ορθού μεταβολισμού και της σωστής διαχείρισης των ποσοτήτων του γλουταμινικού από τον οργανισμό.



Εικόνα 1: Νευρωνική διαβίβαση γλουταμικού και μεταβολισμός του στα αστροκύτταρα

Διαχείριση που ξεκινάει με την απομάκρυνση της απελευθερούμενης ποσότητας γλουταμικού από την συναπτική σχισμή μέσω ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων που βρίσκονται στον προσυναπτικό νευρώνα και στα αστροκύτταρα που περιβάλλουν την συναπτική σχισμή.

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

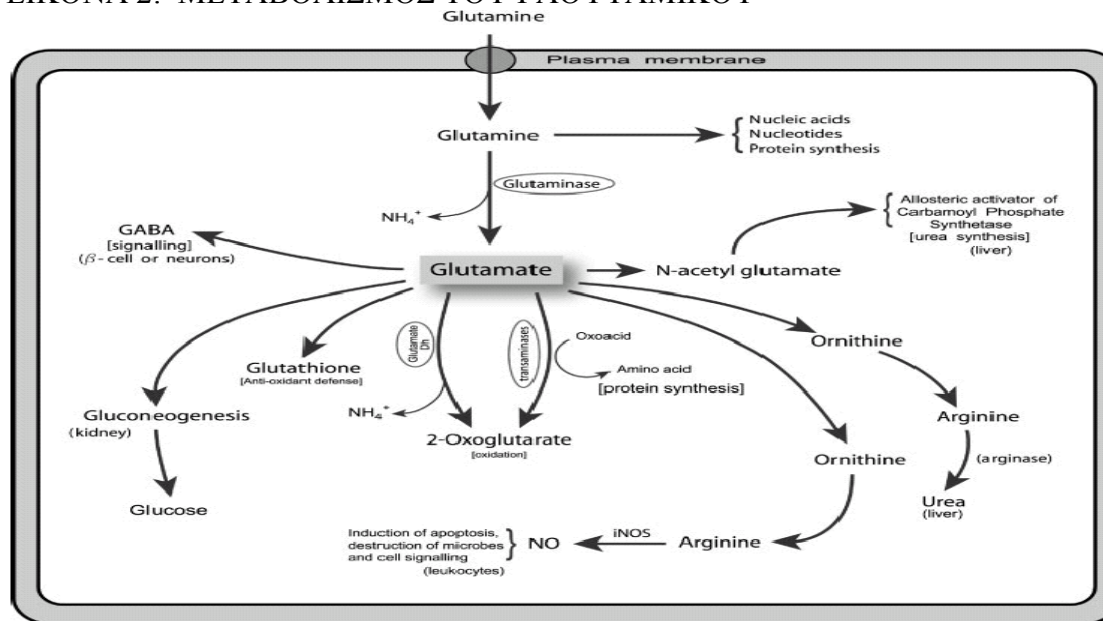
- 1) την μετατροπή του γλουταμινικού σε γλουταμίνη μέσω του ενζύμου της συνθετάσης της γλουταμίνης,
- 2) την χρησιμοποίηση του γλουταμινικού ως υπόστρωμα για τον κύκλο του κιτρικού οξέος μέσω του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης-GDH για την αύξηση των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου (Dennis et al. 1976)
- 3) σύνθεση και αποδόμηση αμινοξέων μέσω της αλανινικής και της ασπαρτικής αμινοτρασφοράσης
- 4) την είσοδο της αμμωνίας στον κύκλο της ουρίας μέσω του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης-GDH και την αποβολή της αμμωνίας από τον

οργανισμό μας αντίστοιχα (στην ομοίωση της αμμωνίας – Weil-Malherbe & Gordon 1971)

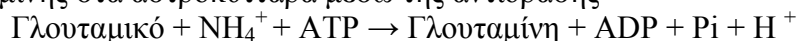
5) την σύνθεση GABA νευροδιαβιβαστή μέσω της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος, ενός από τους κύριους ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές του ΚΝΣ,

6) ενώ τέλος είναι απαραίτητο για την παραγωγή γλουταθειόνης, ενός τριπεπτιδίου που προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη από ελεύθερες ρίζες ROS και αποτελεί ρυθμιστή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των σουλφυδρικών ομάδων ενώ επίσης συμμετέχει στην μεταφορά αμινοξέων από τον εξωκυττάριο χώρο μέσα στα κύτταρα (Meister & Aderson 1983, Griffith & Meister 1985)

ΕΙΚΟΝΑ 2: ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟΥ



1) Το πρώτο μεταβολικό μονοπάτι είναι ευρύτερα γνωστό για την παραγωγή γλουταμίνης στα αστροκύτταρα μέσω της αντίδρασης



και την άμεση μεταφορά της στους προσυναπτικούς νευρώνες για την εκ νέου σύνθεση του κύριου νευροδιαβιβαστή τους, του γλουταμικού, και την διατήρηση έτσι του κύκλου γλουταμικού - γλουταμίνης μεταξύ νευρικών κυττάρων και αστροκυττάρων (Van den berg & Garfinkel 1971, Norenberg et al. 1979, Schousboe et al. 1979, Martin & Rimvall 1993).

2) Στο δεύτερο μεταβολικό μονοπάτι δηλαδή στη χρησιμοποίηση του γλουταμινικού ως υπόστρωμα για τον κύκλο του CREBS το γλουταμινικό είναι δυνατόν να ακολουθήσει δυο ξεχωριστές οδούς ανάλογα με την ποσότητα του στη συναπτική σχισμή.

Όταν η συγκέντρωση του γλουταμινικού στη συναπτική σχισμή δεν υπερβαίνει τα 0,2mM τότε μεταβολίζεται σύμφωνα με το τρίτο μεταβολικό μονοπάτι όπως θα δείτε στην συνέχεια και παίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση

Όταν η συγκέντρωση του όμως υπερβαίνει τα 0,2mM παράλληλα με την διαδικασία σύνθεσης της γλουταμίνης λαμβάνει χώρα και μια άλλη αντίδραση που μετατρέπει το γλουταμινικό σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία και η οποία καταλύεται από την γλουταμινική αφυδρογονάση (GDH).

Ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμινικού τον κύριο λόγο για την παραγωγή αμμωνίας έχει η γλουταμινική αφυδρογονάση.

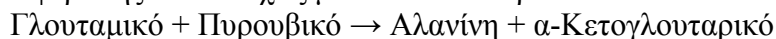
Όπως γίνεται αντιληπτό ο μεταβολισμός του γλουταμινικού οξέος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την παραγωγή αμμωνίας μέσω της GDH και της χρησιμοποίησης της από την συνθετάση της γλουταμίνης.

Ενώ λοιπόν η συνθετάση της γλουταμίνης διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανακύκλωση του γλουταμινικού, σε χαμηλές συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή το μονοπάτι της γλουταμινικής αφυδρογονάσης είναι πολύ σημαντικό για την απομάκρυνση μεγάλων ποσοτήτων γλουταμινικού μέσω του κύκλου του CREBS.

Επιπλέον η παραγωγή ATP και αμμωνίας κατά την διοχέτευση του γλουταμινικού στο μονοπάτι του τρικαρβοξυλικού οξέος εύνουν την λειτουργία της συνθετάσης της γλουταμίνης γεγονός που ενισχύει την άποψη της παράλληλης λειτουργίας των δυο μονοπατιών. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το ποσοστό του γλουταμινικού που μεταβολίζεται μέσω της GDH και του κύκλου του CREBS αυξάνει σημαντικά όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμινικού αυξηθεί από 0,1mM σε 0,5mM (McKenna et al 1996) και ότι το 50% αυτού που προσλαμβάνεται από αστροκύτταρα στις παραπάνω συνθήκες σε καλλιέργεια κύτταρων υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση μέσω του κύκλου του CREBS (Stonewall et al. 1997) οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η οξειδωτική απαμίνωση μέσω της GDH είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου το γλουταμινικό εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

3) Στο τρίτο μεταβολικό μονοπάτι δηλαδή στην σύνθεση και αποδόμηση άλλων μη απαραίτητων αμινοξέων το γλουταμινικό είναι σημαντικό γιατί αποτελεί πρόδρομη ουσία για την παραγωγή των αμινοξέων γλουταμίνη, προλίνη και αργινίνη και κύριο δοτή της α-αμινομάδας μέσω τρανσαμίνωσης (δηλαδή την μεταφορά μιας α-αμινομάδας από ένα αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ) για τα περισσότερα από τα υπόλοιπα μη απαραίτητα αμινοξέα. Η κατάλυση της παραπάνω αντίδρασης γίνεται από τα ένζυμα που ονομάζονται αμινοτρασφεράσες.

Για παράδειγμα η αλανίνη και το ασπαρτικό συντίθεται με ένα μόνο βήμα από τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων πυρουβικό και οξαλοξικό αντίστοιχα από τα ένζυμα της αλανινικής και ασπαρτικής αμινοτρασφεράσης αντίστοιχως μέσω των αντιδράσεων:



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

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

Ο ρόλος της GDH είναι σημαντικός στην ολοκλήρωση της αποδόμησης των αμινοξέων καθώς καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία. Έτσι φαίνεται η GDH να ρυθμίζει τα επίπεδα του γλουταμινικού στο κύτταρο ενώ ταυτόχρονα συνδέει τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτών των υδατανθράκων ενισχύοντας την παραγωγή ενέργειας. Υπό την ευρεία έννοια λοιπόν η GDH μπορεί να ρυθμίζει ποικιλοτρόπως την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου λειτουργώντας ως ενεργειακός αισθητήρας ενεργοποιούμενη από μόρια

που υποδηλώνουν χαμηλή ενεργειακή κατάσταση στο κύτταρο (GDP & ADP) και αναστέλλονται από μόρια που δηλώνουν περίσσεια ενεργειακών αποθεμάτων (GTP & ATP) (Smith 1979) όπως θα δούμε ακολούθως. Δηλαδή η μείωση του ενεργειακού φορτίου του κύτταρου επιταχύνει την οξειδωση των αμινοξέων (Stryer 1988)

4) Κατά την αποδόμηση των αμινοξέων και πρωτεϊνών έχουμε την διάσπαση τους σε στην α-αμινομάδα και στον ανθρακικό σκελετό του αμινοξέος. Αφού είδαμε λοιπόν τι συμβαίνει με τον ανθρακικό σκελετό των αποδομούμενων αμινοξέων θα περιγράψουμε τη μοίρα της α-αμινομάδας τους. Η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω μεταφέρεται μέσω αμινοτρανσφερασών στο α-κετογλουταμικό για να σχηματιστεί γλουταμικό το οποίο μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης από την GDH παράγει NH_4^+ (Stryer 1988)

Αμινοξύ \rightarrow Γλουταμινικό \rightarrow NH_4^+

$\alpha\text{-αμινοξύ} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-Κετοξύ} + \text{NH}_4^+ + \text{NAD(P(H))} + \text{H}^+$

Στα περισσότερα χερσαία σπονδυλωτά και σε όλα τα θηλαστικά η NH_4^+ που παράγεται από αυτήν την σειρά αντιδράσεων μετατρέπεται σε ουρία, μέσω του κύκλου της ουρίας, και απεκκρίνεται.

Ένα από τα άτομα αζώτου της παραγόμενης ουρίας μεταφέρεται στον κύκλο της από το αμινοξύ ασπαρτικό ενώ το άλλο άτομο αζώτου και το άτομο άνθρακα από την NH_4^+ και το CO_2 τα οποία εισέρχονται στον κύκλο της ουρίας ως καρβαμουλφωσφορικό αφού αρχικά έχουν σχηματίσει την ορνιθίνη.

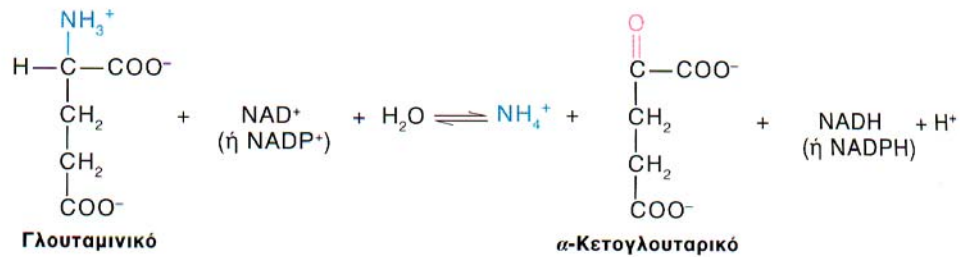
Το καρβαμουλφωσφορικό συντίθεται από NH_4^+ , CO_2 , ATP και H_2O με μια ουσιαστικά μη αναστρέψιμη αντίδραση λόγω της κατανάλωσης 2 μορίων ATP και η οποία καταλύεται από την συνθάση του καρβαμουλφωσφορικού και είναι το πρώτο βήμα του κύκλου της ουρίας καθορίζοντας την ταχύτητα παραγωγής της ουρίας.

Το ένζυμο αυτό όπως ανέφερα στην αρχή είναι ουσιαστικά ανενεργό χωρίς την παρουσία N-ακετυλογλουταμικού το οποίο συντίθεται από γλουταμικό και τα επίπεδα του καθορίζονται από αυτό.

Ο κύκλος της ουρίας είναι ιδιαίτερα σημαντικός στους ανθρώπους καθώς είναι ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης της αμμωνίας από τον οργανισμό μας, υψηλά επίπεδα της οποίας είναι άκρως τοξικά και θανατηφόρα σε ολική έλλειψη κάποιου από των ένζυμων του κυκλου της ουρίας. Μερική έλλειψη κάποιου εξ αυτών οδηγεί σε υπεραμμωναιμία και σοβαρά νευροψυχιατρικά συμπτώματα, αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων της αμμωνίας στο ΚΝΣ. Έχει προταθεί ότι υψηλή συγκέντρωση NH_4^+ στον εγκέφαλο ενισχύει την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταμικού μέσω GDH σε γλουταμικό. Η λειτουργία αυτή της GDH μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς έχειδειχθεί ότι οι αυξημένες ποσότητες αμμωνίας καταστέλλουν την δυνατότητα παραγωγής ATP από τα μιτοχόνδρια (Bailey et al. 1982) όπως επίσης ότι οι αυξημένες ποσότητες γλουταμικού και NH_4^+ οδηγούν σε αυξημένες ποσότητες γλουταμίνης, άρα και γλουταμικού στην συνέχεια, από την γλουταμινική συνθετάση και διεγερτοτοξικότητα (Stryer 1988)

ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ - GDH

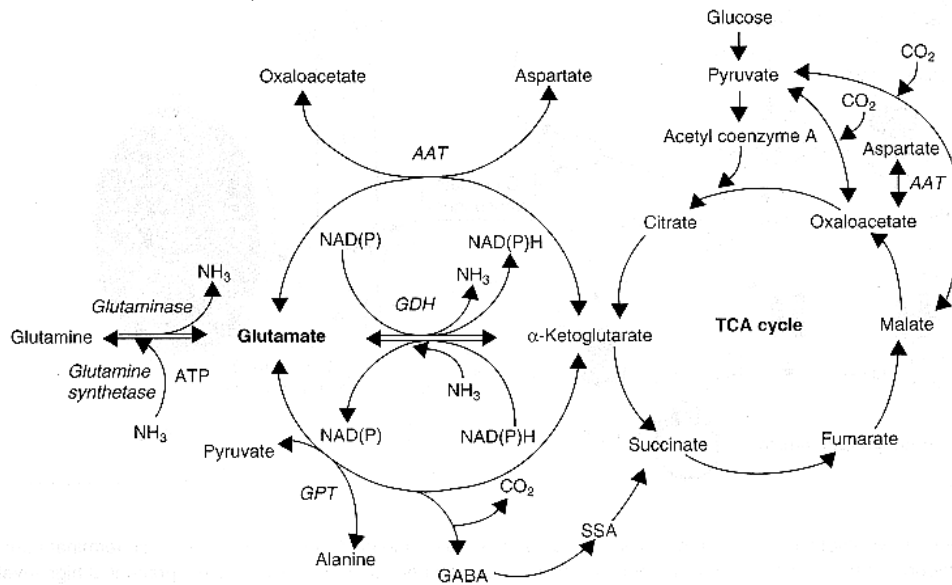
Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα κύριο ένζυμο στο μεταβολισμό του γλουταμινικού οξέος και καταλύουν την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του L-γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο είτε NAD είτε NADP (Smith et al. 1975).



Η ισορροπία της αντίδρασης που καταλύεται από την γλουταμική αφυδρογονάση ευνοεί την σύνθεση του γλουταμινικού (Smith et al. 1979). Αυτή όμως η κατεύθυνση απαιτεί υψηλά επίπεδα αμμωνίας που δεν είναι εύκολο να υπάρξουν στα κύτταρα των θηλαστικών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Δεν προκαλεί λοιπόν έκπληξη το γεγονός ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το γλουταμινικό στο νευρικό ιστό συντίθεται κυρίως από τον μεταβολισμό της γλυκόζης ή από την αποδόμηση άλλων αμινοξέων μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης και απαμίνωσης (Yudkoff et al. 1991, McKenna et al. 1996) όπως είδαμε νωρίτερα. Σε ειδικές περιπτώσεις όμως, που η συγκέντρωση της αμμωνίας υπερβαίνει τα φυσιολογικά επίπεδα, η σύνθεση του γλουταμινικού μέσω της GDH παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αποδόμησης της αμμωνίας (Cooper & Plum 1987, Kammamori & Ross 1995).

Φαίνεται λοιπόν ότι ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες η φορά της αντίδρασης είναι προς τα δεξιά αυτό μπορεί να αντιστραφεί ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου.

Το ένζυμο αυτό όπως είδαμε παραπάνω συνδέει τον μεταβολισμό του γλουταμινικού με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και παρέχει ένα σημαντικό μονοπάτι για την μετατροπή των α-αμινοξέων σε α-κετοξέα και το αντίστροφο, συνδέοντας έτσι τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αυτό των υδατανθράκων και ενισχύοντας την παραγωγή ενέργειας μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του γλουταμινικού στο κύτταρο (εικόνα 3)



Εικόνα 3: Λειτουργικός ρόλος της GDH στο μεταβολισμό των θηλαστικών

Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο ευρέως διαδεδομένο σε όλα τα έμβια όντα από τα θηλαστικά έως και τους βακτηριακούς οργανισμούς τόσο παλιά όσο τα αρχαιοβακτήρια. Πολύ λίγοι οργανισμοί υπάρχουν που δεν διαθέτουν GDH.

Γεγονός που τονίζει την σπουδαιότητα ύπαρξης του ενζύμου στα έμβια όντα.

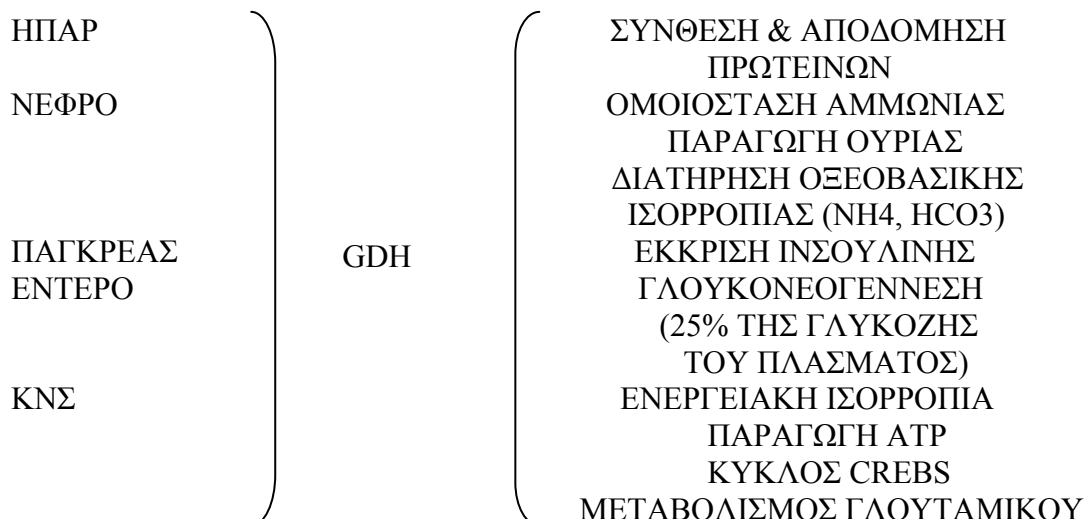
Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι γλουταμικής αφυδρογονάσης:

- 1) Αυτές που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο στην παραπάνω αντίδραση αποκλειστικά το NAD(H)
- 2) Αυτές που είναι ειδικές στο NADP(H)
- 3) και αυτές που χρησιμοποιούν και τα δυο συνένζυμα και οι οποίες είναι γνωστές ως GDH διπλής ειδικότητας ως προς το συνένζυμο

Οι περισσότερες GDH είναι ομοπολυμερή αποτελούμενα από 6 συνήθως υπομονάδες μοριακού βάρους 40-60 kDa. Η GDH του ανθρώπου αποτελείται από 2 διμερή τριμερών όμοιων υπομονάδων αποτελούμενες από 505 αμινοξέα και μοριακού βάρους 56 kDa.

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

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν μετρηθεί σε όργανα όπως το ήπαρ, νεφροί, πάγκρεας, καρδιά, έντερο, σπλήνα, πνεύμονες, ωοθήκες, όρχεις και ο εγκέφαλος (Smith et al 1975, Plaitakis et al. 1980) όπου κυρίως ρόλος της στο καθένα από αυτά όπως έχουμε δει μέχρι τώρα είναι:



Τα επίπεδα της GDH παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στους διαφορετικούς ιστούς των θηλαστικών κάτι που σχετίζεται με τις μεταβολικές ιδιαιτερότητες του κάθε ιστού, όπως έχουμε ήδη προαναφέρει στον μεταβολισμό του γλουταμικού. Το ήπαρ και ο εγκέφαλος είναι τα όργανα με την υψηλότερη δραστηριότητα GDH στον οργανισμό και την μεγαλύτερη έκφραση των GLUD γονιδίων.

Στο ΚΝΣ των θηλαστικών η GDH, εκτός από τον σπουδαίο ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων συμμετέχει και σε μηχανισμούς νευροδιαβίβασης. Θεωρείται ότι στα θηλαστικά η κατεύθυνση της αντίδρασης *in vivo* εξαρτάται από την βιοχημική κατάσταση του κυττάρου ή του ιστού στον οποίο βρίσκεται. Ενώ η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση των νικοτιναμιδικών συνενζύμων και του ίδιου του ενζύμου είναι ένας παράγοντας που πιθανότατα επηρεάζει παραπέρα την κατεύθυνση της αντίδρασης και τον προορισμό των τελικών προϊόντων. σημαντικό ρόλο στην κατεύθυνση της αντίδρασης παίζει φυσικά και η τοπική συγκέντρωση των διαφόρων υποστρωμάτων της αντίδρασης (α-κετογλουταρικό, αμμωνία, γλουταμικό) ιδιαίτερα σε σχέση με την παρουσία των αλλοστερικών τροποποιητών του ενζύμου. Αυτή η δυνατότητα της στενής ρύθμισης της ενζυμικής δραστηριότητας είναι και ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της GDH των θηλαστικών που την διαφοροποιεί σημαντικά από τα ένζυμα των απλούστερων οργανισμών.

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

Όλα τα παραπάνω κέντρισαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με αποτέλεσμα τόσο κλινικές μελέτες σε ασθενείς με τις παραπάνω νόσους όπως και μελέτες μοριακής βιολογίας στην υποκυτταρική εντόπιση της GDH και πρωτεϊνικές λειτουργικές μελέτες στην δραστηριότητα της GDH οδήγησαν στην εντόπιση δυο ισοδύναμων μορφών του ενζύμου στον εγκέφαλο αρουραίου με διαφορετική σταθερότητα στην θερμοκρασία (η μια ήταν ασταθής σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ η

άλλη σταθερή Plaitakis et al. 1984, Konagaya et al. 1986, Abe et al. 1992) και εντόπιση στο ομογενοποιημένο διάλυμα ιστών (η μια ήταν εύκολα διαλυτοποιούμενη δραστηριότητα GDH-άρα επερχόμενη από το στρώμα των μιτοχονδρίων- ενώ η άλλη ήταν συνδεδεμένη με σωματίδια δραστηριότητα GDH - πιθανόν συνδεδεμένη σε μεμβράνες- Colon et al. 1986) στο κύτταρο.

Οι Colon et al. καθάρισαν τις δυο αυτές ισόμορφες μέσω τριπλής στήλης χρωματογραφίας(υδροφοβικής αλληλεπίδρασης, ιοντικής ανταλλαγής και υδροξυαπατίτη) και μετά από κινητικές μελέτες ενώ δεν έδειξαν διαφορά στις Km τιμές μεταξύ των δυο ένζυμων για α-κετογλουταρικό, αμμωνία και γλουταμικό ωστόσο οι τιμές Km για NADH και NADPH του σωματιδιακού ένζυμου ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες από τις τιμές της διαλυτής μορφής. Επίσης η σωματιδιακή μορφή ήταν πιο θερμοσταθερή στους 45⁰ C, διέφερε στην αλλοστερική της ρύθμιση από GTP (την ανέστειλε περισσότερο από την διαλυτή επί παρουσίας 1mM ATP) και η καμπύλη αναστολής της διαλυτής GDH από GTP ήταν περισσότερο σιγμοειδική από αυτήν της σωματιδιακής υποδηλώνοντας μεγαλύτερη συνεργατικότητα της πρώτης από την δεύτερη. Έτσι οι Colon et al. 1986 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι δυο διαφορετικές GDH δραστηριότητες μπορεί να εξυπηρετούν διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες στον εγκέφαλο σχετιζόμενες με τον ενεργειακό μεταβολισμό όσο και με την σύνθεση και αποδόμηση του γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή.

Ενώ αργότερα οι Lee et al. 1999 βρίσκουν ότι η μιτοχονδριακή (διαλυτή) GDH έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το NAD⁺ δηλαδή μικρότερη Km ενώ η σωματιδιακή για το NADP⁺. Εύρημα που θα μπορούσε να σημαίνει έναν βιοσυνθετικό ρόλο για την σωματιδιακή GDH (παραγωγή γλουταμικού για χρήση στην πρωτεϊνοσύνθεση) και έναν καταβολικό ρόλο για την διαλυτή GDH (παραγωγή ενέργειας μέσω κυκλου ΤΚΑ)

Μετά από διαρκείς και συνεχείς μελέτες πάνω σε αυτό το εύρημα τελικώς αποδείχθηκε η ύπαρξη δυο ισοενζύμων της GDH με διαφορετική αλλοστερική ρύθμιση, σταθερότητα στην θερμοκρασία, αλληλουχία αμινοξέων και κωδίκευση τους από διαφορετικά γονίδια. Η σωματιδιακή GDH κωδिकεύεται από το γονίδιο GLUD1 (Michaelides et al. 1993) το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς ενώ το γονίδιο που ευθύνεται για την σύνθεση της διαλυτής μορφής είναι το GLUD2 η έκφραση του οποίου περιορίζεται στον νευρικό ιστό και στους όρχεις.

Με την ανακάλυψη της ύπαρξης δυο ισόμορφων του ενζύμου που κωδικεύονται από διαφορετική γενετική περιοχή κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του ισοενζύμου που εκφράζεται στον νευρικό ιστό με την ισόμορφη που παρουσίαζε αστάθεια σε κατάσταση θέρμανσης –την διαλυτή(Shashidharan et al.1997).

Η ακριβής λειτουργία της GDH στον εγκέφαλο όμως δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Η ανάγκη για την ύπαρξη δυο ισομορφών στον εγκέφαλο πιστεύεται ότι συνδέεται με τις σύνθετες λειτουργίες που κατέχει το γλουταμικό στον νευρικό ιστό της νευροδιαβίβασης, μεταβολισμού της γλυκόζης, παραγωγή ενέργειας και της διεγερτοτοξικότητας. Άρα ο ρόλος της GDH στον εγκέφαλο πέραν του σημαντικού ρόλου της στον μεταβολισμό του γλουταμικού, στην αποδόμηση και αποβολή της αμμωνίας και στην πρωτεϊνοσύνθεση και αποδόμηση αμινοξέων κατέχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας και νευροπροστασία (Shashidharan et al. 1997)

ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

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

Έχει επιβεβαιωθεί από ερευνά σε καλλιέργειες κύτταρων ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα και ειδικότερα τα αστροκύτταρα περιέχουν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα ειδικής ενεργότητας γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα νευρικά κύτταρα, στην κλίμακα του 2 με 4 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη των νευρικών κυττάρων.

Σε μελέτες που έγιναν στην ειδική ενεργότητα του ενζύμου σε πληθυσμούς νευρογλοιακών κυττάρων (αστροκυττάρων) διάφορων περιοχών του εγκεφάλου, φλοιού(0,154 μ mol/mg protein/min) και παρεγκεφαλίδας(0,136 μ mol/mg protein/min), βρέθηκε ότι ενώ υπάρχει διαφορά μεταξύ των δυο αυτών πληθυσμών αυτή είναι πολύ μικρή για να παρουσιάσει βιολογικό ενδιαφέρον.

Αντίθετα όμως μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς νευρικών κυττάρων, παρόλο που αυτά έχουν 2-4 φορές μικρότερη ειδική ενεργότητα στην GDH από τα νευρογλοιακά κύτταρα , παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους (Zaganas, Georgoroylos, Plaitakis, Sonnewald & Schousboe).

Ειδικότερα η ειδική ενεργότητα των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας είναι κατά 60% υψηλότερη από την αντίστοιχη των νευρώνων του φλοιού, εύρημα όμως που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα γιατί δεν συμπίπτει με ευρήματα προηγούμενων μελετών.

Τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας του ενζύμου στα αστροκύτταρα σχετίζεται πιθανότητα με την πρόσληψη και μεταβολισμό του γλουταμικού μέσα σε αυτά (Danbolt 2001) εύρημα που συμφωνεί με πολλές προηγούμενες μελέτες.

Η γλουταμική αφυδρογονάση όπως προείπαμε είναι κύριο ένζυμο του μεταβολισμού του γλουταμικού και εδράζεται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που έχει αποδειχθεί από έρευνες σε ιστούς θηλαστικών όπου η GDH εντοπίστηκε κυρίως στα μιτοχόνδρια (Hogeboom & Schneider 1953, Price & Stevens 1999) και μάλιστα στο στρώμα των μιτοχονδρίων (Salganicoff & De Robertis 1965). Η επιβεβαίωση της μιτοχονδριακής εντόπισης της GDH έγινε με υπερδομικές μελέτες χρησιμοποιώντας ανοσοιστοχημεία HM (Aoki et al. 1987, Rothe et al. 1994).

Υπάρχουν όμως ενδείξεις και για εξωμιτοχονδριακής εντόπισης του ενζύμου.

Σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις έχει εντοπιστεί στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου RER (Lee et al. 1999) όπως και στον πυρήνα (Di Prisco & Gasolia 1975, Di Matteo et al. 1976&1980, Lai et al. 1986, Mac Daniel 1995) εντόπιση όμως μη αποδεδειγμένη διότι η πυρηνική GDH θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μιτοχονδριακή επιμόλυνση του πυρηνικού κλάσματος.

Αν υπάρχει πυρηνική GDH θα μπορούσε να συμμετέχει στον ενεργειακό μεταβολισμό του πυρήνα, στον μεταβολισμό του αζώτου όπως και στην μεταγραφική ρύθμιση, καθώς κάποιοι άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι μπορεί να προσδένει RNA και tRNA. Αυτή η αλληλεπίδραση της GDH με το μιτοχονδριακό RNA, αν και δεν έχει αποδειχθεί, θα μπορούσε να προσφέρει σταθερότητα στο δεύτερο το οποίο σε αυτήν την περίπτωση θα μπορούσε να επηρεάζεται από ρυθμιστικούς παράγοντες όπως το ADP ή το NADH (Preiss et al. 1993).

Παρόλο όμως τους νέους δρόμους που ανοίγονται στο προσδιορισμό νέων λειτουργιών της γλουταμικής αφυδρογονάσης η άποψη αυτή δεν υιοθετείται από την επιστημονική κοινότητα, λόγω των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, Αρα για να στηριχθεί μια τέτοια θεωρία επιβάλλονται παραπάνω έρευνες προς αυτήν την κατεύθυνση.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μελέτες μοριακής βιολογίας οδήγησαν στην απομόνωση και κλωνοποίηση αρκετών αλληλουχιών cDNAs από βιβλιοθήκες προερχόμενες από ανθρώπινο συκώτι που κωδικοποιούν την ανθρώπινη GDH.

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης όλων αυτών των cDNAs προβλέπει ένα πολυπεπτιδίο μήκους 558 αμινοξέων, η αμινοξική αλληλουχία του οποίου συμφωνεί (υπάρχουν εξαιρέσεις) με τα δεδομένα της αμινοξικής αλληλουχίας του καθαρισμένου ενζύμου που είχε νωρίτερα δημοσιευθεί (Julliard & Smith 1979)

Παρόλο που η ώριμη GDH που εντοπίζεται στο ανθρώπινο ήπαρ είναι κατά 53 αμινοξέα μικρότερη λόγω της έλλειψης του οδηγού πεπτιδίου, μήκους 53 αμινοξέων, το οποίο αποκόπτεται από το πρόδρομο ένζυμο κατά την διάρκεια της μεταφοράς της πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα, όπου συντίθεται, στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων (Mavrothalassitis et al. 1988)

Μετάπειτα μελέτες με *in situ* υβριδοποίηση και Southern blot οδήγησαν στον εντοπισμό και προσδιορισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτό το ένζυμο όπως και των μεταγραφικών χαρακτηριστικών τους.

Έτσι βρέθηκε ότι στον άνθρωπο υπάρχουν δυο λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν για GDH, το *GLUD1* και το *GLUD2* (Mavrothalassitis et al. 1988, Anagnou et al. 1989&1993, Deloucas et al.1993, Shashidharan et al. 1994). Το *GLUD1* είναι γονίδιο κυτταρικής οικονομίας, εκφραζόμενο σε όλους τους ιστούς, περιέχει 13 εξόνια και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10, ενώ το *GLUD2* είναι ειδικό για τον νευρικό ιστό και τους όρχεις, δεν έχει ιντρόνια και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X.

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

Πέραν των δυο λειτουργικών γονιδίων της GDH (*GLUD1* & *GLUD2*) έχουν εντοπισθεί αλλά 6 ψευδογονίδια .

Οι Michaelidis et al. (1993) αναγνώρισαν 4 υποτιθέμενα κολοβωμένα ψευδογονίδια, 2 από τα οποία μπορεί να προέκυψαν από ρετρομετάθεση. Τα *GLUDP2* & *GLUDP3* εντοπίστηκαν στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q11.2 & 10q22.1 αντίστοιχα.

Το *GLUDP5* στο χρωμόσωμα 10p11.2 τα χαρακτηρίστηκα του οποίου δείχνουν ότι πρόκειται επίσης για ένα κολοβωμένο ψευδογονίδιο όπως και το *GLUDP4* στο χρωμόσωμα 18 με μη εξακριβωμένη θέση ακόμα.

Ανάλυση BLAST του ανθρώπινου γονιδιώματος με αλληλουχία αναζήτησης το mRNA του *GLUD1* δείχνει την πιθανότητα ύπαρξης και άλλων γονιδιακών τόπων

GLUD. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών των οποίων δείχνει ότι πρόκειται για επιπλέον ψευδογονίδια. Συγκεκριμένα υπάρχουν 3 ψευδογονίδια στην θέση 10q11.22 με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, τα οποία αντιστοιχούν *GLUDP2* και τα ονομάζουμε *GLUDP2A*, *GLUDP2B*, *GLUDP2C* αντιστοίχως. Τα ψευδογονίδια αυτά έχουν προκύψει με μηχανισμούς γονιδιακού διπλασιασμού.

ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *GLUD1*

Οι Michaelidis et al. (1993) κλωνοποίησαν ολόκληρο το λειτουργικό *GLUD1* γονίδιο και βρήκαν ότι περιέχει 13 εξόνια και έχει μήκος περίπου 45 kb. Τα 13 αυτά εξόνια είναι ταυτόσημα με τα αντίστοιχα μέρη του *GLUD1* cDNA.

Το πρώτο εξόνιο (540b), το οποίο είναι και το μεγαλύτερο, περιέχει την 5'-αμετάφραστη αλληλουχία, την κωδικοποιούσα αλληλουχία για το μιτοχονδριακό οδηγό πεπτιδίου και τα πρώτα 91 κωδικόνια που αντιστοιχούν στην ώριμη *GLUD1* πρωτεΐνη (Mavrothalassitis et al. 1988)

Το μέγεθος των ιντρονίων ποικίλλει σε μήκος από 89bp (ιντρόνιο 6) έως 18000bp (ιντρόνιο 1).

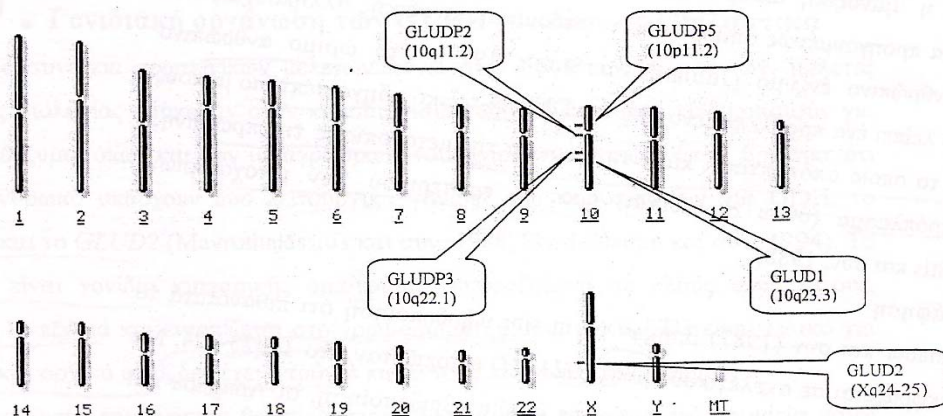
ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *GLUD2*

Το γονίδιο αυτό έχειδειχθεί ότι εκφράζεται μόνο στον νευρικό ιστό και στους όρχεις. Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία ακόμα για την δομή του γονιδίου *GLUD2* πέραν του κύριου χαρακτηριστικού του ότι δεν διαθέτει καθόλου ιντρόνια, γεγονός που εξηγείται από τον τρόπο δημιουργίας του.

Θεωρείται ότι το γονίδιο *GLUD2* έχει προέλθει μέσω εξέλιξης από το γονίδιο *GLUD1* μέσω του μηχανισμού της ρετρομετάθεσης.

Η ρετρομετάθεση συμβαίνει όταν ένα mRNA ρετρομεταγράφεται σε cDNA και έπειτα εισχωρεί τυχαία σε μια θέση μέσα στο γονιδίωμα, συνήθως σε διαφορετικό χρωμόσωμα από το πατρικό γονίδιο. Αυτή η διαδικασία εξηγεί και τα κύρια χαρακτηριστικά των ρετροποζονίων (γονίδια που έχουν προκύψει με ρετρομετάθεση): έλλειψη των ιντρονίων και των ρυθμιστικών αλληλουχιών του πατρικού γονιδίου, παρουσία αλληλουχιών με πολλαπλές αδενίνες στην 3' περιοχή τους και παρουσία βραχέων άμεσων επαναλήψεων δεξιά και αριστερά τους. Από τον μηχανισμό αυτού του τρόπου διπλασιασμού τα μόνο γονίδια που μπορούν να οδηγήσουν σε κληρονομήσιμη ρετρομετάθεση είναι μόνο τα γονίδια που εκφράζονται στα γεννητικά κύτταρα.

Συμπερασματικά το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει συνολικά οκτώ γεννητικούς τόπους *GLUD*: Τα δυο λειτουργικά γονίδια *GLUD1* και *GLUD2* και τα 6 ψευδογονίδια: 4 ακρωτηριασμένα ψευδογονίδια *GLUDP2A*, *GLUDP2B*, *GLUDP2C* και *GLUDP3* και 2 ρετροποζόνια *GLUDP4* & *GLUDP5*



ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ GDH

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Η παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών, οι τιμές pH και η θερμοκρασία πιστεύεται ότι επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τον μηχανισμό της αντίδρασης της GDH (Silverstein 1974, Di Matteo et al. 1980, Hornby et al. 1984)

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

Έχουν γίνει πολλές μελέτες ως προς το ποιο βήμα της αντίδρασης είναι ρυθμιστικό της ταχύτητας προς την κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού. Οι περισσότερες ενδείξεις συγκλίνουν στο ότι είναι η απελευθέρωση του ανηγμένου συνενζύμου (NADH/NADPH) από το σύμπλεγμα ένζυμο - NAD(P)H – α-κετογλουταρικό που καθορίζει την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης, οξειδωτικής απαμίνωσης, από την GDH. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική γιατί σχετίζεται με το γεγονός ότι το ADP ενεργοποιεί την αντίδραση της GDH προς την κατεύθυνση οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού από NADP⁺ μειώνοντας της σύνδεση του NADPH με το ένζυμο και επομένως αυξάνοντας την απελευθέρωση του από το σύμπλεγμα ένζυμο – NADPH – α-κετογλουταρικό. Επίσης το GTP αναστέλλει την αντίδραση αυτή επειδή μειώνει τον ρυθμό απελευθέρωσης NADPH από το σύμπλεγμα ένζυμο – NADPH – α-κετογλουταρικό. Στην περίπτωση του NAD(H) τα πράγματα είναι πιο σύνθετα επειδή το οξειδωμένο (και ίσως ανηγμένο) μη φωσφορυλιωμένο συνένζυμο μπορούν να συνδέονται εκτός από το ενεργό κέντρο και στη θέση σύνθεσης από ADP. Από την άλλη μεριά όμως έχει προταθεί επίσης ότι το ADP και το GTP ασκούν την δράση τους αποσταθεροποιώντας και σταθεροποιώντας, αντιστοίχως, ατελέσφορα αδρανή σύμπλοκα (Peterson & Smith 1999)

Με βάση λειτουργικές μελέτες έχουν προταθεί από παλιά τουλάχιστον 4 θέσεις συνδέσεις υποστρωμάτων και αλλοστερικών τροποποιητών ανά υπομονάδα GDH: το ενεργό κέντρο (θέση I), η ρυθμιστική θέση αδενοσινικού νουκλεοτιδίου (θέση II), η ρυθμιστική θέση γουανιλικού νουκλεοτιδίου (θέση III) και η ρυθμιστική θέση ανηγμένου συνενζύμου (θέση IV) (Frieden 1961&1963, Hudson&Daniel 1993).

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

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

	Γλουταμικό	α-κετο-γλουταρικό	Αμμωνία	NADP ⁺	NAD ⁺	NAD(P)H	ADP	GTP
Θέση I (ενεργό κέντρο)	+	+	+	+	+	+	-	-
Θέση II (ρυθμιστική θέση αδενινικού νουκλεοτιδίου)	-	-	-	-	+	-	+	-
Θέση III (ρυθμιστική θέση γουανινικού νουκλεοτιδίου)	-	-	-	-	-	-	-	+
Θέση IV (ρυθμιστική θέση ανηγμένου συνεχζύμου)	-	-	-	-	-	+	+	-

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

Παλαιότερα είχε προταθεί ότι τόσο η δραστηριότητα του ενζύμου από ήπαρ αγελάδος όσο και η αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου εξαρτώνται από τον βαθμό πολυμερισμού των εξαμερών του ένζυμου, δημιουργώντας μια λειτουργική σχέση ανάμεσα στον πολυμερισμό και την καταλυτική δραστηριότητα (Frieden & Colman 1967, Kempfler et al. 1972). Νεώτερα δεδομένα όμως κατέρριψαν αυτήν την θεωρία δείχνοντας ότι ο βαθμός πολυμερισμού και η GDH δραστηριότητα δεν αλληλεξαρτώνται (Zeiri & Reisler 1978).

Η σταθερότητα και η καταλυτική δραστηριότητα της GDH επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Ιδιότητες της GDH που φαίνονται να επηρεάζονται περισσότερο από τις μεταβολές τις θερμοκρασίες είναι η Km για γλουταμικό, α-κετογλουταρικό, η ειδική δραστηριότητα του ένζυμου και η Vmax (Di Matteo et al. 1980)

Μελέτες σε ανασυνδυασμένα ανθρώπινα GLUD1 και GLUD2 ισοένζυμα από Sf9 κύτταρα έδειξαν ότι ενώ το πρώτο είναι σχετικά θερμοσταθερό το δεύτερο είναι θερμοασταθές (Shashidharan et al. 1997), ο χρόνος ημίσειας ζωής στους 45⁰ C ήταν 3,5 ώρες και 0,5 ώρα αντίστοιχα για το GLUD1 & GLUD2.

Πέραν όμως των παραπάνω υπάρχουν αρκετές άλλες ουσίες που δρουν ως αλλοστερικοί τροποποιητές στην GDH και τις οποίες θα δούμε παρακάτω.

ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ

1) GTP

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

Μελέτες με ανασυνδυασμένα ανθρώπινα ισοένζυμα έδειξαν ότι στην ανθρώπινη GLUD1 GDH το GTP έχει μια ισχυρή ανασταλτική δράση (IC50-0.20μM) όταν δεν υπάρχουν στην αντίδραση αλλοστερικοί τροποποιητές (Plaitakis et al. 2000). Αντίθετα η μη ενεργοποιημένη GLUD2 GDH δεν επηρεάζεται καθόλου από αυτό το

νουκλεοτίδιο ($IC_{50} > 5000 \mu M$). Η προσθήκη ADP στην αντίδραση κάνει το GLUD1 ένζυμο πιο ανθεκτικό στην αναστολή από GTP, ενώ η GLUD2 GDH σε παρουσία ADP υπόκειται σε αναστολή από GTP, αν και σε μεγαλύτερα επίπεδα GTP από το GLUD1 ένζυμο. Ένας άλλος ενεργοποιητής της GDH, η L-λευκίνη, όταν χρησιμοποιείται μόνη της δεν είναι αποτελεσματική στην αναστροφή της αναστολής από GTP και για τα δυο ισοένζυμα. Όταν όμως χρησιμοποιείται παρουσία ADP είναι ικανή να μειώσει την αναστολή από GTP σε σημαντικό βαθμό (Plaitakis et al. 2000). Αυτές οι συνεργατικές δράσεις παρουσιάζονται σε συγκεντρώσεις L-λευκίνης ($125 \mu M$) και ADP ($50 \mu M$) που θα μπορούσαν να επικρατούν μέσα στα ανθρώπινα κύτταρα.

Ανάλυση κατά Hill των γραφικών παραστάσεων της αναστολής των δυο ανθρώπινων ισοενζύμων από GTP έδειξε ότι αυτά διαφέρουν σημαντικά στην συνεργατικότητα της αναστολής τους από αυτό νουκλεοτίδιο. Η GLUD1 GDH δείχνει θετική συνεργατικότητα στην αναστολή της από GTP (Hill > 1.0 , δείκτης συνεργατικότητας < 81) και η καμπύλη της αναστολής είναι σιγμοειδική που επιβεβαιώνει ακριβώς το παραπάνω (Plaitakis et al. 2000) Ενώ η GLUD2 GDH δείχνει αρνητική συνεργατικότητα (Hill < 1.0 και δείκτης συνεργατικότητας > 81), η καμπύλη της αναστολής είναι υπερβολή (Plaitakis et al. 2000). Το ADP και η L-λευκίνη, όταν προστίθενται μαζί, τροποποιούν διαφορετικά τις καμπύλες αναστολής από GTP των δυο ισοενζύμων. Συγκεκριμένα ο συντελεστής Hill για την GLUD1 μειώνεται ενώ για την GLUD2 αυξάνεται (Plaitakis et al. 2000).

2) ADP

Αποτελεί τον γνωστότερο ενεργοποιητή της GDH καταργεί την αρνητική συνεργατικότητα και μειώνει την ισχύ πρόσδεσης του $NAD(P)H$ στο ενεργό κέντρο (Koberstein 1973, Bailey et al. 1982, Hornby et al. 1984). Ομοίως τα ανηγμένα συνένζυμα μειώνουν την σύνδεση του ADP στο ένζυμο.

Σε μελέτες των δυο ανασυνδυασμένων ανθρώπινων ισοενζύμων GDH από κύτταρα Sf9 οι Shashidharan et al. (1997) έδειξαν ότι οι δυο ισομορφές είχαν την ίδια ειδική δραστηριότητα σε παρουσία 1 mM ADP. Σε απουσία όμως ADP το ειδικό για τον νευρικό ιστό ισοένζυμο GLUD2 ήταν σχεδόν ανενεργό ενώ το GLUD1 ισοένζυμο είχε σχεδόν την μισό της μέγιστης δραστηριότητας του.

3) ATP

Υπάρχουν τρεις ξεχωριστές φάσεις στην δράση του ATP πάνω στην GDH από ήπαρ αγελάδος: αναστολή σε συγκεντρώσεις μέχρι 0.2 mM η οποία μάλλον οφείλεται σε σύνδεση στη θέση σύνδεσης του GTP, ενεργοποίηση σε συγκεντρώσεις $0.2-1 \text{ mM}$ λόγω σύνδεσης στην ενεργοποιητική θέση της σύνδεσης του ADP, και αναστολή σε συγκεντρώσεις $> 1 \text{ mM}$ λόγω σύνδεσης του στο ενεργό κέντρο του ένζυμου, όπως συμβαίνει και με το ADP (Smith et al. 2001).

4) L-ΛΕΥΚΙΝΗ

Επίσης γνωστός ενεργοποιητής της GDH.

Οι Plaitakis et al. (2000) εκτίμησαν ότι η βασική ειδική δραστηριότητα του GLUD2 ισοενζύμου ήταν $< 5\%$ αυτής του GLUD1 ένζυμου σε κύτταρα Sf9 με ίδια επίπεδα έκφρασης του ιού.

Μετά από προσθήκη όμως 1mM L-λευκίνης η δραστηριότητα του ειδικού για τον νευρικό ιστό ένζυμου αυξάνει κατά 1600% της βασικής ενώ η δραστηριότητα του ενζύμου κυτταρικής οικονομίας αυξάνει μόνο κατά 75%.

Η προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων ADP στο μίγμα επέτρεψε σε συγκεντρώσεις L-λευκίνης, που σε απουσία ADP δεν είχαν καμία επίδραση στο ένζυμο, να ενεργοποιήσουν σημαντικά το ειδικό για το νευρικό ιστό ένζυμο (GLUD2).

Δηλαδή το ADP και η L-λευκίνη, όταν προστίθενται μαζί στην αντίδραση, δρούν συνεργιστικά για να προκαλέσουν μεγαλύτερου βαθμού ενεργοποίηση της GLUD2 GDH από ότι θα αναμενόταν από ένα απλό αθροιστικό αποτέλεσμα (Plaitakis et al. 2000)

5) ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το μαγνήσιο είναι γνωστό ότι αναστέλει την GDH θηλαστικών επί απουσίας αλλοστερικών τροποποιητών (Fahien et al. 1990, Kuo et al. 1994). Σε ανασυνδυασμένη ανθρώπινη GDH από κύτταρα Sf9 βρήκαν ότι ενώ απουσία ADP το GLUD1 αναστέλλεται από χλωριούχο μαγνήσιο το GLUD2 ένζυμο δεν επηρεάζεται εύρημα που αναστέλλεται και με την ελάχιστη προσθήκη ADP στο μίγμα.

Το Ca σε συγκέντρωση 10mM αναστέλει κατά 20 % την οξειδωτική απαμίνωση από την GDH σε απουσία και μόνο ADP από την αντίδραση (Bailey et al 1982).

Ο ψευδάργυρος βρέθηκε να αναστέλει ισχυρά την GDH, επί απουσία EDTA, από θηλαστικά αλλά να μην επηρεάζει αυτή από μη ζωικά είδη (Freiden 1965).

Ίδια δράση με τον ψευδάργυρο βρέθηκε να έχει και το αλουμίνιο η οποία αναιρείτε με την προσθήκη χημικών παραγόντων (Yang et al. 2003)

EDTA, έχει ενεργοποιητική δράση στην GDH από ήπαρ αγελάδας (Freiden 1965) για αυτόν τον λόγο παραδοσιακά προστίθεται και κάποια μικρή συγκέντρωση EDTA στο μίγμα.

5) ΟΡΜΟΝΕΣ κ ΦΑΡΜΑΚΑ

Ορισμένα αντιψυχωτικά είναι ισχυροί και ειδικοί αναστολείς της GDH (Tamir et al 1981, Couee & Tipton 1990, Ghous & Townshend 1999), ένα εκ των οποίων είναι και η αλοπεριδόλη (Chee et al 1979). Επί παρουσίας NADH GDH απομονωμένη από ιστούς εγκεφάλου και ήπατος αναστέλλονται το ίδιο από την αλοπεριδόλη ενώ επί παρουσίας NADPH ως συνενζύμου η απομονωμένη από εγκέφαλο GDH αναστέλλεται περισσότερο από το ηπατικό. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν μια

συσχέτιση ανάμεσα στον βαθμό αναστολής της GDH και την αντιψυχωτική δράση φάρμακων όπως η περφεναζίνη και η χλωροπρομαζίνη (Shemisa & Fahien 1971, Yoon et al. 2001). Η ανασταλτική δράση όμως αυτών των φάρμακων γίνεται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις φαρμακευτικές δοσολογίες που χρησιμοποιούνται ευρέως και από τα επίπεδα των φάρμακων αυτών στο αίμα ασθενών με τέτοια φαρμακευτική αγωγή. (Tamir et al. 1981, Couee & Tipton 1990)

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

Πέραν όμως των φαρμακευτικών σκευασμάτων, έχει εξετασθεί από πολύ παλιά η δράση διαφόρων ορμονών στην δραστηριότητα της GDH όπως η διαιθυλσουλβεστρολη, μια συνθετική οιστραδιολη, η οποία έχει βρεθεί ότι αναστέλει

την αντίδραση της GDH των θηλαστικών (από ήπαρ αγελάδας)(Talal & Tomkins 1964, Colon et al.1986). Το ίδιο αποτέλεσμα έχει βρεθεί για την προγεστερόνη, οιστραδιόλη και τεστοστερόνη σε GDH από ήπαρ αγελάδας (Hudson&Daniel 1993). Το πόσο είναι δυνατόν να επιτευχθούν συγκεντρώσεις των παραπάνω ορμονών μέσα στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια σε επίπεδα φυσιολογικά για τον οργανισμό μας ικανές να αναστείλουν την GDH μένει να δειχθεί.

Η θυρεοειδική ορμόνη θυροξίνη αναστέλει επίσης την GDH και μάλιστα με μη αναστρέψιμο τρόπο (Ghous& Townshend 2000) αλλά σε συγκεντρώσεις πολύ παραπάνω από τα εφικτά παθολογικά επίπεδα οποιασδήποτε θυρεοειδικής νόσου, επομένως η σημασία αυτής της αναστολής είναι αμφιλεγόμενη.

ΔΟΜΗ ΤΗΣ GDH

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

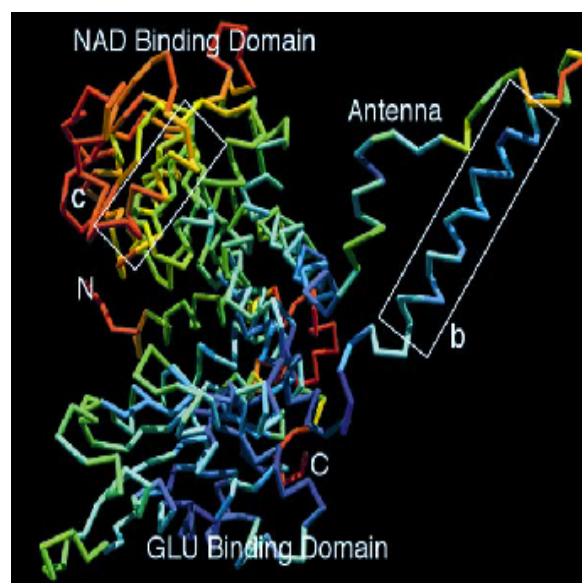
Οι δομές αρκετών συμπλεγμάτων της βοείας GDH όπως και της ανθρώπινης GDH έχουν καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Peterson et al. 1997, Peterson&Smith 1999, Smith et al. 2001&2002)

Μέχρι το 2002 (Smith et al.), όποτε και επιλύθηκε η δομή της ανθρώπινης GDH, η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλογραφική δομή θηλαστικών ήταν αυτή της βοείας GDH, μεταξύ των οποίων όμως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην δομή επιβεβαιώνοντας ότι παρατηρήσεις πάνω στην βοεία πρωτεΐνη ισχύουν και για την ανθρώπινη GDH.

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

Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές :

- 1) περιοχή πρόσδεσης του γλουταμικού στο αμινοτελικό άκρο
- 2) περιοχή πρόσδεσης του συνεχζύμου NAD⁺
- 3) περιοχή της αντένας (Εικόνα 6)

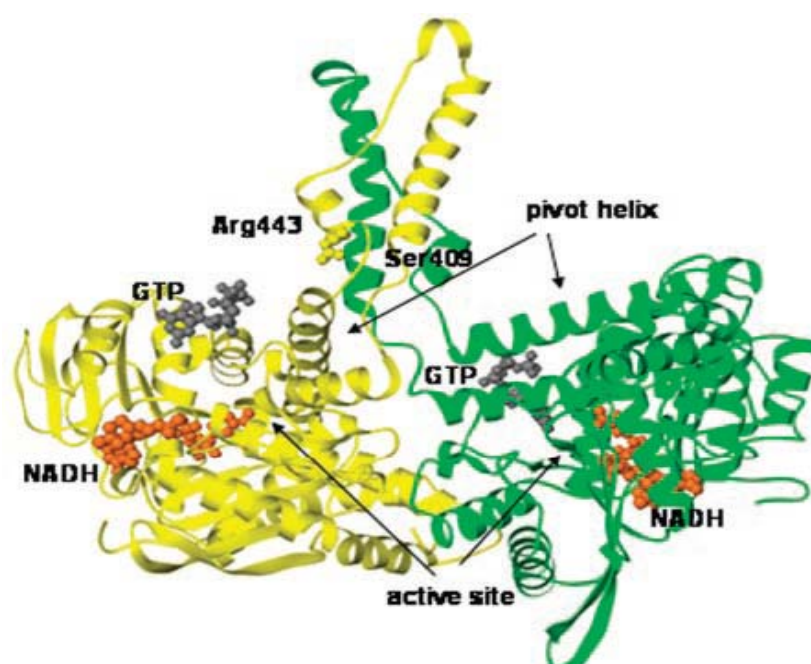


Εικόνα 6. Δομή μιας από τις 6 υπομονάδες του ένζυμου της GDH

Η αντένα αποτελείται από 48 αμινοξέα και υπάρχει σε όλες της ζωικές μορφές GDH, ενώ δεν υπάρχει στις βακτηριακές και μυκητιασικές GDH, και η οποία φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου, αλλά περισσότερο στην συνεργικότητα μεταξύ των υπομονάδων και την βελτίωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου (Banerjee et al. 2003).

Τα αλλά δυο κύρια μέρη της GDH των θηλαστικών (περιοχή προσδεσης NAD⁺ και περιοχή προσδεσης του γλουταμικού) υπάρχουν και σε απλούστερους οργανισμούς και ανάμεσα τους σχηματίζεται η σχισμή του ενεργού κέντρου.

Η αντένα αποτελείται από μια μεγάλη ανιούσα έλικα και μια μικρότερη κατιούσα έλικα. Οι ανιούσες έλικες μέσα στο τρίμερες περιελίσσονται μεταξύ τους δεξιόστροφα για να σχηματίσουν τον πυρήνα της προεκβολής της κεραίας. Αυτό τοποθετεί την κεραία μιας υπομονάδος πίσω από αυτήν της ανθρωλογιακά γειτονικής της υπομονάδας μέσα στο τρίμερες της GDH, διευκολύνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντενών γειτονικών υπομοναδων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Δομή 2 υπομονάδων του ενζύμου της GDH και τρόπος αλληλεπίδρασης τους

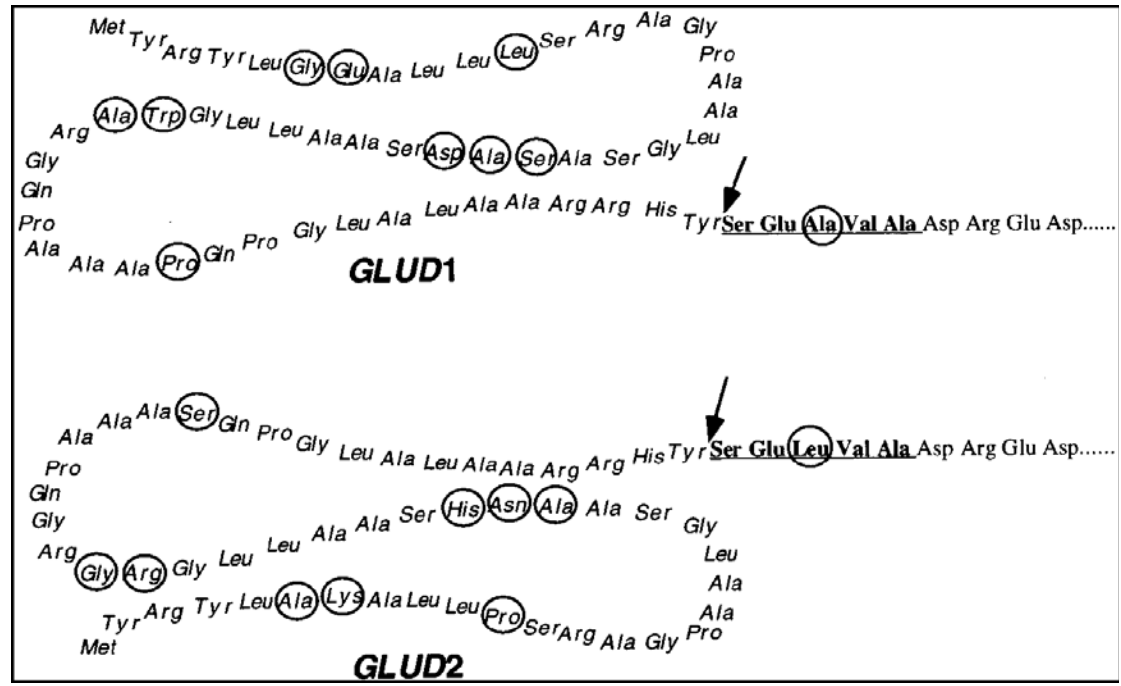
Ένα άλλο σημαντικό δομικό στοιχείο της GDH των θηλαστικών είναι η περιστρεφόμενη έλικα (από αμινοξυ 445-470) στην βάση της αντένας, η οποία περιστρέφεται κατά την πρόσδεση του γλουταμικού στο ενεργό κέντρο, μετακινώντας την περιοχή πρόσδεσης NAD⁺ προς την περιοχή πρόσδεσης γλουταμικού με αποτέλεσμα να κλείνει η σχισμή του ενεργού κέντρου και να δημιουργείται κατάλληλο περιβάλλον για την αντίδραση (Peterson&Smith1999) (εικόνα 6&7)

Μετακίνηση η οποία πραγματοποιείται από την μικρή κατιούσα έλικα της αντένας (η οποία αποτελεί συνέχεια της περιστρεφόμενης έλικας) που λειτουργεί σαν μοριακό ελατήριο αλλάζοντας μήκος κατά το άνοιγμα και κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου (εικόνα 7).

Το γλουταμικό συνδέεται στο βαθύτερο μέρος του ενεργού κέντρου του ενζύμου ενώ το NADH συνδέεται εσωτερικά αλλά προς το στόμιο του (Stillman et al. 1993, Peterson&Smith 1999) (εικόνα 6). Η γ-καρβοξυλομάδα του συνδεδεμένου

γλουταμικού αλληλεπιδρά με την Lys90 και η α-καρβοξυλομάδα συνδέεται με την Lys114. Περιοχή πρόσδεσης NAD⁺ κλείνει πάνω από τα προσδέματα φέρνοντας την Lys126 και τον δακτύλιο νικοτιναμιδίου σε άμεση σύνδεση με το γλουταμικό. Μελετώντας την εντόπιση των αλλοστερικών θέσεων και τον δομικό μηχανισμό της αλλοστερικής ρύθμισης οι Peterson&Smith (1999) πρότειναν ότι το μεγαλύτερο μέρος της αλλοστερικής ρύθμισης μεσολαβεί από έλεγχο της κινητικότητας της περιοχής πρόσδεσης NAD⁺. Αυτό που ρυθμίζει την ταχύτητα της κατάλυσης στην GDH είναι η απελευθέρωση του προϊόντος (Colen et al 1972). Το GTP αναστέλει την αντίδραση ενισχύοντας την πρόσδεση του υποστρώματος και κλείνοντας την σχισμή του ενεργού κέντρου, ενώ το ADP ενεργοποιεί διευκολύνοντας την απελευθέρωση του προϊόντος διευκολύνοντας το άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου (George & Bell 1980). Στο μόριο του ένζυμου υπάρχει μια μόνο περιοχή πρόσδεσης GTP, στην βάση της αντένας και αλληλεπιδρά με αρκετά αμινοξέα (Tyr262, Arg217, Arg265, Arg261, His209, His450) σε άτομα οξυγόνου του γ-φωσφορικού, κάνοντας την θέση αυτή έναν αισθητήρα ενέργειας που προσδένει κατά προτίμηση τριφωσφορικά νουκλεοτίδια αφού προσδένει και το ATP. Συνεπώς όταν στα μιτοχόνδρια υπάρχουν υψηλά επίπεδα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, άρα υψηλή ενεργειακή κατάσταση, τότε η δραστηριότητα της GDH αναστέλλεται. Ενώ το NADH (έχει και δεύτερη θέση πρόσδεσης πίσω από την περιοχή πρόσδεσης του NAD⁺), NAD⁺ και πιθανότατα το ADP, προσδένονται όλα στην ίδια θέση κάτω από την περιστρεφόμενη έλικα. Το NADPH όχι μόνο συνδέεται με δυο πιθανές διαμορφώσεις στο ενεργό κέντρο αλλά και καμία από τις δυο δεν συμπίπτει με αυτή του συνενζύμου NADH στο ενεργό κέντρο και αυτό μπορεί να εξηγήσει την προτίμηση που δείχνει το ένζυμο για το δεύτερο σε σχέση με το πρώτο.

Τα δυο αυτά λειτουργικά γονίδια *GLUD1* & *GLUD2* έχουν βρεθεί ότι διαφέρουν στην αλληλουχία τους μόνο σε 15 από τα 558 αμινοξέα τους κατά τα αλλά έχουν πλήρη ομολογία (Εικόνα 8)



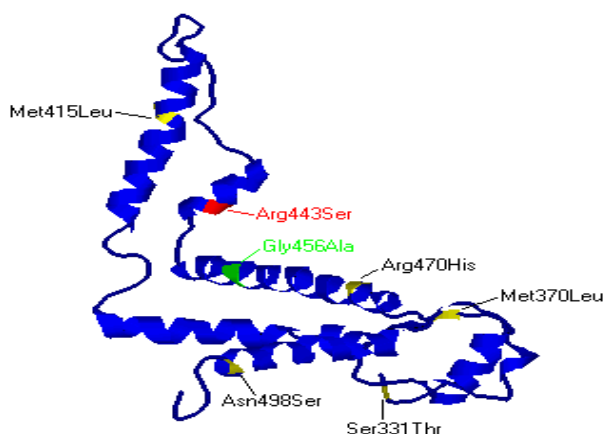
Εικόνα 8. Αμινοξική αλληλουχία των δυο ισοενζύμων. Τα 15 αμινοξέα στα οποία διαφέρει η αμινοξική αλληλουχία των δυο ισοενζύμων έχουν κυκλωθεί

Τα ισοένζυμα όμως (GLUD1 και GLUD2) που προκύπτουν από τα δυο αυτά γονίδια, όπως είδαμε παραπάνω, διαφέρουν σημαντικά ως προς τις λειτουργικές τους ιδιότητες, την αλλοστερική τους ρύθμιση από τους ίδιους τροποποιητές και στην σταθερότητα τους στην αύξηση της θερμοκρασίας, με το ειδικό για νευρικό ιστό ισοένζυμο (GLUD2) να έχει προσαρμοστεί λειτουργικά στις ιδιαίτερες συνθήκες του ιστού αυτού. Λειτουργική διαφοροποίηση των δυο ισοενζύμων η οποία φαίνεται να οφείλεται σε κάποιες από τις αμινοξικές διαφορές τους (εικόνα 8 και 9) σύμφωνα με μελέτες μεταλαξιογέννησης και λειτουργικές ενζυμικές μελέτες που έγιναν σε αυτές (Zaganas&Plaitakis et al. 2001&2002)

- Η μετάλλαξη στο GLUD1 από το αντίστοιχο αμινοξύ του GLUD2 στην θέση Arg443Ser ευθύνεται για τη χαμηλή βασική δραστηριότητα και την ισχυρή ενεργοποίηση από το ADP της Glud2-GDH (Zaganas et al. 2002)

και

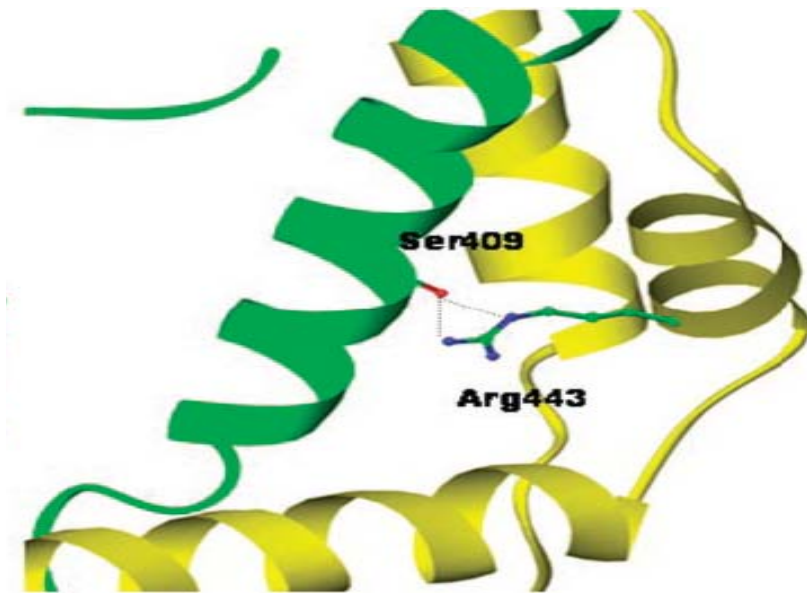
- Η ανάλογη μετάλλαξη στην θέση Glu456Ala ευθύνεται για την μειωμένη αναστολή από το GTP της Glud2-GDH (Zaganas & Plaitakis 2002)



Εικόνα 9. Δομή μέρους μιας υπομονάδας του ομοεξαμερούς της GDH με τοποθέτηση σε αυτήν κάποιων εκ των 15 αμινοξικών διαφορών των ισοενζύμων της GDH

Μελέτη της δομής της ανθρώπινης GLUD1 δείχνει ότι η Arg443 βρίσκεται στην μικρή κατιούσα έλικα της αντένας, σημαντική για την μετάβαση από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση του ένζυμου επηρεάζοντας την κίνηση της περιστρεφόμενης έλικας στην βάση της αντένας.

Η αλλαγή Arg443Ser φαίνεται να καταστρέφει δυνητικούς υδρογονικούς δεσμούς που υπάρχουν μεταξύ της Arg443 μιας υπομονάδος με αμινοξέα γειτονικής υπομονάδος όπως η Ser409 και η Tyr405 στην φυσιολογική GLUD1 (εικόνα 10). Η Ser409 βρίσκεται στην μεγάλη ανιούσα έλικα της αντένας γειτονικής υπομονάδος και η αλληλεπίδραση της με Arg443 έχει μεγάλη λειτουργική σημασία για το ένζυμο. Η μετάλλαξη Arg443Ser καταργεί ουσιαστικά την βασική δραστηριότητα του ενζύμου GLUD1 υποδηλώνοντας ότι παρεμποδίζει την λειτουργία της κατιούσας έλικας και ευνοεί την κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου. Ενώ η ικανότητα του ADP να αποκαθιστά την δραστηριότητα υποδηλώνει ότι το ADP διευκολύνει το άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου ή παρεμποδίζει την υπερσύγκλειση του.

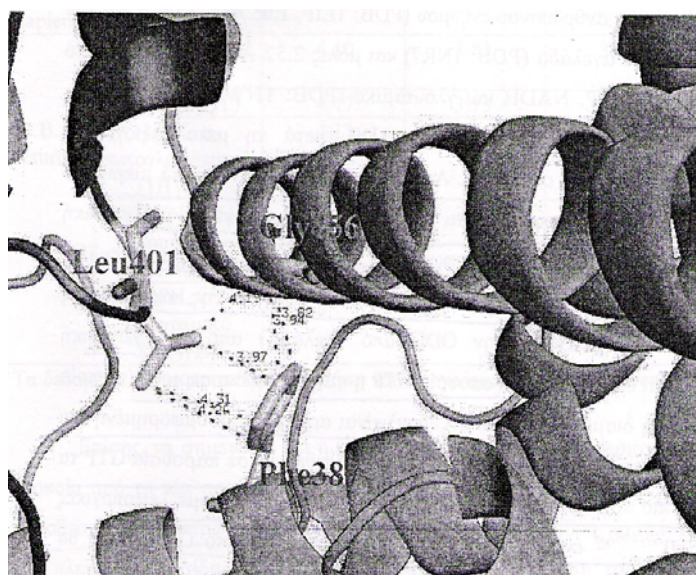


Εικόνα 10: Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των αντενών δυο υπομοναδων μέσω των αμινοξέων Arg 443 & Ser 409.

Η Glu456 της φυσιολογικής GLUD1 βρίσκεται σε μια πολύ πυκνά δομημένη περιοχή του εξαμερούς πάνω στην περιστρεφόμενη έλικα και απέναντι από την πλευρά στην οποία γίνεται η πρόσδεση του GTP. Από δομικές μελέτες φαίνεται ότι Glu456 έρχεται σε στενή επαφή με δυο ογκώδη αμινοξέα, την Phe387 από την ίδια υπομοναδα και την Leu401 από μια γειτονική υπομοναδα. Η υπολογιζόμενη ελάχιστη απόσταση ανάμεσα στην Ala 456 και την Phe387 ή την Leu401 είναι 2.8 Å, απόσταση πολύ μικρή για το συμπλοκο του ενζύμου με υποστρώματα και GTP Φέρνοντας την πλευρική αλυσίδα σε υστερική σύγκρουση αλλάζοντας την διαμόρφωση της και την διαμόρφωση γειτονικών υπομοναδων.

Είναι εμφανές λοιπον ότι σε απουσία GTP η περιοχή αυτή είναι αρκετά αποσυμφορημενη για να δεχτεί την επιπλέον μεθυλομαδα της Ala. Αντιθέτως παρουσία GTP η περιοχή συμφοριζετε να αποτελεσμα τις λειτουργικές διαφορές στη μεταλλαγμένη GLUD1 (εμποδίζοντας την επικοινωνία μεταξύ υπομοναδων, σημαντική για την αλλοστερική ρύθμιση από GTP και την συνεργατικότητα του ενζύμου) μόνο ως προς την ρύθμιση από GTP.

Εικόνα 11. Υδρογονικοί δεσμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ των αμινοξέων Gly 456, Phe 387 & Leu 401



OPMONEΣ

Hormone	Plasma conc.	Pregnancy
Estradiol	0,003-0,13 μ M	1,10-7,34 μ M
Oestriol	<0,5 ng/ml	3,02-10,75 μ M
Progesterone	0,0031-0,89 μ M	1,59-7,95 μ M

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Για να μελετηθεί η επίδραση των εν λόγω σεξουαλικών στεροειδών ορμονών στην λειτουργική δραστηριότητα των δυο ισοενζυμων της Γλουταμικής αφυδρογονάσης (GLUD 1-housekeeping και GLUD 2-ειδικής για το νευρικό σύστημα), έγιναν μαζικές καλλιέργειες κυττάρων Sf 21 (spodoptera fugiperda cells) με χρήση του συστήματος baculovirus. Το εργαστήριο μας διαθέτει ήδη baculoviruses με εκφρασμένα τα cDNA'ς των δύο ισοενζυμων της GDH από προηγούμενες μελέτες, άρα η παραγωγή ειδικού πλασμιδίου με τα παραπάνω cDNAs δεν ήταν αναγκαία σε αυτήν την μελέτη. Σκοπός αυτών των καλλιιεργειών ήταν η απομόνωση των ισοενζυμων της GDH (GLUD 1 & GLUD 2) από τα διαμολυσμένα Sf 21 κύτταρα, τον καθαρισμό των πρωτεϊνών αυτών με στήλες χρωματογραφίας και τελικά την ενζυμική μελέτη τους.

Κατά την διάρκεια της παραπάνω μελέτης εξακριβώθηκαν διαφορές στο τρόπο δράσης των συγκεκριμένων ορμονών στην λειτουργική δραστηριότητα των δύο ισοενζυμων της Γλουταμικής αφυδρογονάσης, γεγονός το οποίο θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω μέσα από την ενζυμική μελέτη της δράσης αυτών των ορμονών στα 15 αυτά αμινοξέα στα οποία διαφέρουν τα ισοενζυμα GLUD1 & GLUD2 ξεχωριστά.

Για να μελετηθεί η λειτουργική σπουδαιότητα των αμινοξικών διαφορών μεταξύ των δυο ανθρώπινων ισοενζυμων της GDH επιλέχθηκαν 11 μεταλλαγμένα ισοενζυμα GLUD1 τα οποία διάφεραν από την φυσιολογική πρωτεΐνη του GLUD1 σε μια και μόνο θέση από τις 15 με τις οποίες διάφερε από το GLUD 2 και η οποία έφερε το αντίστοιχο αμινοξυ του GLUD2 της επιλεγμένης θέσης.

Η μελέτη των παραπάνω μεταλλαγμένων ισοενζυμων προγραμματίστηκε αρχικά να γίνει σταδιακά σε αδρά εκχυλίσματα των παραπάνω πρωτεϊνών από καλλιέργειες κυττάρων Sf 21 έτσι ώστε να γίνει ο εντοπισμός κάποιων αμινοξικών διαφορών που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δυο ισοενζυμων και να αποτρέψει τον πιθανότατα ανούσιο κ χρονόβόρο καθαρισμό όλων των μεταλλαγμένων ισοενζυμων του GLUD 1 με στήλες χρωματογραφίας.

Τα μεταλλαγμένα ισοενζυμα τα οποία επιλέχθηκαν οδηγήθηκαν μέσω της ίδιας διαδικασίας που επιλέχθηκε για τα φυσιολογικά ισοενζυμα, της μαζικής καλλιέργειας τους και καθαρισμού τους μέσω υδρόφοβης στήλης χρωματογραφίας και στήλης υδροξυπατιτή διαδοχικά, για την χρήση τους τελικά σε λειτουργικές ενζυμικές μελέτες.

Η ίδια διαδικασία αναπαράχθηκε για την παραγωγή και καθαρισμό ενός πολυμορφισμού του GLUD 2 (S445A), που έχει συσχετισθεί με παρκισονικούς πληθυσμούς, και ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο τέλος της μελέτης για την στήριξη μέρους των αποτελεσμάτων της συνολικής μελέτης.

Ο σχεδιασμός των παραπάνω μεταλαξιογενέσεων και η παραγωγή των απαραίτητων πλασμιδίων και ιών για την χρήση τους σε καλλιέργειες κυττάρων Sf 21 για την παραγωγή των ανωτέρω μεταλλαγμένων ισοενζυμων GLUD1 όπως και η επιβεβαίωση της παρουσίας των σωστών μεταλλάξεων στους ανασυνδυασμένους baculoviruses και οι απαραίτητες πιλοτικές μελέτες για να δείξουν ότι οι τίτλοι του ιού σε κάθε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά ήταν συγκρίσιμοι είχαν ήδη πραγματοποιηθεί από μελέτες προηγούμενων συνάδελφων (Ζαγανας Ι.) πάνω στην διερεύνηση της λειτουργικής σπουδαιότητας των παραπάνω αμινοξικών διαφορών στην δραστηριότητα των δυο ισοενζυμων της GDH άρα δεν θα αναφερθούν και στην παρούσα μελέτη.

Τα κύτταρα Sf 21 προέρχονται από ωοθήκες εντόμου *Spodoptera Fugiperda* και επιλέχθηκαν για την έκφραση της ανθρώπινης GDH για το λόγο ότι παρόλο διαθέτουν ενδογενή GDH αυτή έχει απόλυτη ειδικότητα για το συνένζυμο NAD(H). Συνεπώς τα μη διαμολυσμένα με ανασυνδυασμένο ιό *Baculovirus Sf 21* δείχνουν μηδενική GDH δραστηριότητα όταν χρησιμοποιείται το NADP(H) ως συμπαραγοντας.

Γι' αυτό τον λόγο και όλες οι ενζυμικές μελέτες των εκχυλισμάτων των μολυσμένων με ανασυνδυασμένο ιό *Baculovirus Sf21* κυττάρων έγιναν με χρησιμοποίηση του NADP(H) ως συνενζυμου.

Αυτό επέτρεψε την μελέτη των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων ενζύμων ακόμη και σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα χωρίς την παρεμβολή της ενδογενούς GDH των κυττάρων του εντόμου, η οποία έχει μηδενική δραστηριότητα υπό αυτές τις συνθήκες.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Sf 21

Τα μεταλλαγμένα *GLUD1* cDNA, μαζί με το φυσιολογικού τύπου *GLUD1* Cdna (το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μαρτυράς για την ενζυμική ανάλυση των μεταλλαγμένων ισοενζύμων) εκφράστηκαν σε κύτταρα Sf21 με χρήση του συστήματος έκφρασης πρωτεϊνών *Baculovirus*. κύτταρα Sf21 συνδιαμολυνθηκαν με καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA (φορέας pVL 1393 περιέχον το *GLUD1* ένθεμα) και τροποποιημένο DNA *baculovirus* (*Baculo Gold*, *BD Pharmingen*) και επώαστηκαν στους 27° C για 4-5 ημέρες. Ο ιός πολλαπλασιαστηκε με 2-3 κύκλους μόλυνσης.

Έγινε συγκομιδή των κυττάρων στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση με ιό και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανασυνδυασμένων όπως και φυσιολογικών GDH πρωτεϊνών. Για να γίνει η εξαγωγή των παραπάνω πρωτεϊνών τα καλλιεργημένα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.05 M Tris HCL, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1mM PMSF & 0.5 M NaCl.

Το προκύπτον πλήρες ομογενοποιημα φυγοκεντρήθηκε στις 8000g, 4° C, για 10 min και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για ενζυμικές μελέτες με ακατέργαστα αδρά εκχυλίσματα η για περαιτέρω καθαρισμό των επιλεχθέντων πρωτεϊνών.

Τα κύτταρα Sf21 μπορούν να αναπτυχθούν είτε προσκολλημένα σε επιφάνεια είτε σε εναιώρημα, έχουν χρόνο διπλασιασμού 18-24 ώρες και δεν απαιτούν CO₂ για την καλλιέργεια τους. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείτε είναι το TNM-FH και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και μόλυνσης είναι οι 27±0.5° C

A. Απόψυξη Sf κυττάρων

1. Ξεπαγώνουμε τα παγωμένα κύτταρα γρήγορα μετά την απομάκρυνση τους από το υγρό άζωτο ανακινώντας ελαφρά μέσα σε υδατολουτρο 37° C.
2. Μόλις ξεπαγώσουν τα κύτταρα 30-40 sec ξεπλένουμε γρήγορα το εξωτερικό του φιαλιδίου με 70% αιθανολη και το μεταφέρουμε γρήγορα στην αποστειρωμένη κυτταροκαλλιέργεια
3. μεταφέρουμε τα κύτταρα σε erpendorf των 50ml, προσθέτουμε 20ml TNM-FH και φυγοκεντρουμε στα 600 x g για 2-5min.
4. Πετάμε το υπερκείμενο & επαναδιαλυουμε τα κύτταρα σε 10 ml φρέσκο TNM-FH

5. Σπέρνουμε όλο το εναιώρημα των κυττάρων σε μια φλάσκα και επωάζουμε στους 27° C. μετά από 12-24 ώρες αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και αντικαθιστούμε με φρέσκο TNM-FH.

B. Συνδιαμολυνση με ανασυνδυασμενο Baculovirus και συγκομιδή κυττάρων Sf21

1. Σπορά 2×10^6 Sf21 κυττάρων σε φλάσκα 25 cm² ή 75cm².
Επώαση στους 27° C για 16-24 hr
2. Προσθήκη 1 ml ή 5ml αντίστοιχα ανασυνδυασμενου Baculovirus.
Επώαση στους 27° C για 4-5 ημέρες
3. Αποκόλληση διαμολυσμενων Sf21 κυττάρων από την φλάσκα με πιπετα Pauster.
4. Φυγοκεντρηση (1200 rpm, 10 min, 4° C)
5. Μεταφορά υπερκείμενου (με ανασυνδυασμενο ιό) σε falkon των 50ml και αποθήκευση του στους 4° C και φύλαξη πελλετας στους -80° C μέχρι την ομογενοποιηση της για να γίνουν ενζυμικες μελέτες.
6. χρησιμοποίηση υπερκείμενου για νέους κύκλους διαμολυνσης Sf21 κυττάρων με τον ανασυνδυασμενο ιό.

C. Ομογενοποιηση

1. Απόψυξη σε πάγο πελετας διαμολυσμενων Sf21 κυττάρων από τους -80° C.
2. Διάλυση σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης (50 mM Tris HCL, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, PMSF 100mM) και Μεταφορά στο δοχείο ομογενοποιήσεις. Ομογενοποιηση σε ειδικό ομογενοποιητη με χαμηλή ταχύτητα για 5 min. Ξέπλυμα δοχείου ομογενοποιησης και ομογενοποιητη με 200μl ρυθμιστικού διαλύματος με ίδια ταχύτητα για 30 sec
3. Μεταφορά του ομογενοποιηματος σε erppendorf των 1.5 ml.
4. Φυγοκεντρηση σε 8000 rpm, 4° C, για 10min
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erppendorf και χρήση αυτού άμεσα σε ενζυμικες μελέτες που αφορούν αδρά εκχυλίσματα ή αποθήκευση στους 80°C

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών Έγινε από αδρά εκχυλίσματα μολυσμένων Sf21 κυττάρων (περίπου 200×10^6 cells) και τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris HCL, pH 7.4, που περιείχε 0.1mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100 & 0.1mM PMSF.

Στην συνεχεία στα ομογενοποιημένα εκχυλίσματα κυττάρων Έγινε καθίζηση των μεγαλομοριακων συμπλεγμάτων και των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους με 30% θεικού Αμμωνίου. Το μείγμα φυγοκεντρηθηκε και κρατήθηκε το υπερκείμενο (το οποίο περιέχει την GDH) και στο οποίο προστέθηκε επιπλέον θεικό Αμμώνιο μέχρι τελικής συγκέντρωσης 55%.

Το προκύπτον ίζημα μετά από Φυγοκεντρηση του παραπάνω διαλύματος επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris HCL, pH 6.0 και 15% θειικό Αμμώνιο.

Το παραπάνω διάλυμα φορτώθηκε σε στηλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης με υψηλής επίδοσης Φαινυλσεφαροζή (Amersham Biosciences) και εξισορροπημένη με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

Έκλυση της αναμενόμενης πρωτεΐνης Έγινε με διπλή βαθμιδωση μειούμενης συγκέντρωσης θειικού Αμμωνίου (15-0%) και αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθυλενογλυκολής (0-90%) η οποία αναστέλει το denaturation της πρωτεΐνης. Στον καθαρισμό κάποιων πρωτεϊνών Έγινε άθροιση των κλασμάτων που περιείχαν GDH και καθίζηση της GDH με 60% θειικό Αμμώνιο φυγοκεντρηση και επαναδιαλυση της πελλετας σε διάλυμα 50 mM Tris HCL, pH 6.0 και 15% θειικό Αμμώνιο και επαναδιαβαση αυτού στην ίδια στηλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης. Για τον περαιτέρω καθαρισμό των ανασυνδυασμενων πρωτεϊνών τα κλάσματα που περιείχαν GDH από την στηλη υδροφοβικής αλληλεπίδρασης υπεβλήθησαν σε διαπίδυση διαμέσου ημιδιαπερατής μεμβράνης στους 4° C έναντι αρκετών αλλαγών περιόσεως ρυθμιστικού διαλύματος 100mM Tris HCL, 200 mM KCl, pH 7.15 και στην συνεχεία φορτώθηκαν σε στηλη υδροξυαπατιτη .

Η στηλη εκλουσθηκε με μια κλίση συγκέντρωσης 10 mM->400mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου με pH 7.4.

Η καθαρή πλέον GDH χρησιμοποιήθηκε για λειτουργικές ενζυμικές μελέτες.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Για τον καθορισμό των κινητικών ιδιοτήτων των στεροειδών ορμονών στα φυσιολογικά και μεταλλαγμένα ισοενζυμα της GDH έγιναν μια σειρά από ενζυμικές δοκιμασίες τόσο σε αδρά εκχυλίσματα όσο και σε καθαρισμένες πρωτεΐνες.

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο (340nm) στην κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης του α-κετογλουταρικού (Colon et al., 1986) Το μίγμα αντίδρασης ήταν 1 ml και περιείχε 50 mM triethanolamine HCl buffer, pH 8.0, 100 mM οξεϊκο Αμμώνιο, 150 mM NADPH and 2.6 mM EDTA και ADP σε τρεις διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις (0, 0,5mM, 1mM).

Έναρξη της αντίδρασης πετυχαινοταν με την προσθήκη α-ketoglutarate 8 mM.

Το pH του buffer της αντίδρασης ήταν 8.0

Η ανασταλτική δράση των ορμονών στις GDHs λέχθηκε με την προσθήκη αυτών στο διάλυμα αντίδρασης σε αυξανόμενες τελικές συγκεντρώσεις (DES 0-50μM, estradiol 0-750μM ,oestriol 0-1,75mM, progesterone 0-2mM) σε διαλύτη αιθυλενογλυκολη, κρατώντας τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων σταθερές.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

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

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

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για την παρακάτω μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι εξής ανασυνδυασμένες GLUD1 πρωτεΐνες Arg443Ser, Ser409Arg, Gly456Ala, Gly300Arg, Ala374Val, Ser227Asp, Ile219Val, Aspartic195Glu, Arg92Glutamine, Glu87Lys, από τις οποίες κάποιες επιλέχθηκαν για την γνωστή τους όμοια αλλοστερική ρύθμιση με αυτήν της φυσιολογικής GLUD1 για λόγους σύγκρισης με κάποιες άλλες οι οποίες είναι γνωστές ότι προσδίδουν στο GLUD1 ιδιότητες του GLUD2, Arg443Ser&Gly456Ala, (Zaganas et al 2000&2001) και κάποιες άλλες που επιλέχθηκαν λόγω της θέσης τους κοντά ή πάνω στην αντένα που ως γνωστόν παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου.

Η έκφραση των φυσιολογικών GLUD1 & GLUD2 cDNA και των 11 ανασυνδυασμένων GLUD1 cDNA που επιλέχθηκαν αρχικά, για την μελέτη της δράσης των ορμονών, σε Sf21 κύτταρα οδήγησε στην παραγωγή ανασυνδυασμένων GDH πρωτεϊνών ικανών να καταλύουν την αναστρέψιμη μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε γλουταμικό παρουσία 1mM ADP. πιλοτικές μελέτες που έδειξαν ότι οι τίτλοι του ιού ήταν συγκρίσιμοι σε κάθε διαμολυσμένη σειρά, οι μεταλλάξεις των θέσεων που ζητάγαμε ήταν παρούσες στα κύτταρα και ότι δεν υπήρχαν ανεπιθύμητες μεταλλάξεις στα ενθεματα είχαν ήδη γίνει και επιβεβαιωθεί από προηγούμενη δουλειά διδακτορικής διατριβής του συνάδερφου μας Γεωργίου Ζαγανά (Zaganas et al.2000, Zaganas&Plaitakis 2001)

Όπως έχει ήδη περιγράψει τα Sf21 κύτταρα από ωοθήκες του εντόμου Spodoptera Frugiperda που χρησιμοποιήθηκαν στην ακόλουθη μελέτη περιέχουν ενδογενή GDH δραστηριότητα η οποία είναι ειδική στο NADH και παρουσιάζουν μηδενική δραστηριότητα όταν χρησιμοποιείται το NADPH ως συμπαραγοντας στην αντίδραση. Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν στην έκφραση των ανασυνδυασμένων GLUD1 πρωτεϊνών και για τον οποίο όλες οι ενζυμικές μελέτες των εκχυλισμάτων από αυτά τα κύτταρα έγιναν με χρησιμοποίηση του NADPH ως συνενζύμου (μη παρεμβολή της ενδογενούς GDH των κυττάρων του εντόμου). Σκοπός της παρούσας διατριβής όπως προ αναφέρθηκε είναι η μελέτη της δράσης των στεροειδών ορμονών στην δραστηριότητα της GDH και αν υπάρχουν διαφορές αυτής μεταξύ των δυο ισοενζύμων GLUD1 (κυτταρικής οικονομίας) & GLUD2 (ειδική για τον νευρικό ιστό). Στην οποία περίπτωση Σκοπός θα είναι και ο εντοπισμός των αμινοξικών διαφορών των δυο ισοενζύμων που είναι υπεύθυνες για αυτές τις διαφορές αλλοστερικής ρύθμισης των δυο ισοενζύμων από τις ετεροειδείς ορμόνες. Οι μεταλλαγμένες GLUD1 που προέκυψαν από την αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων της GLUD1 με τα αντίστοιχα αμινοξέα της GLUD2 μελετήθηκαν απουσία ADP και παρουσία ADP σε 2 δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0.1 & 1Mm. απουσία ADP για να ελεγχθεί η δράση των ορμονών στα ισοενζύμα χωρίς την παρουσία ενεργοποιητών και σε σύγκριση με την βασική τους δραστηριότητα (γνωρίζουμε ότι η GLUD2 είναι το 5-10% της μέγιστης δραστηριότητας της GLUD1-50% της μέγιστης) και παρουσία δυο συγκεντρώσεων ADP γιατί κάποιες από αυτές τις μεταλλαγμένες GLUD1 που θα μελετηθούν έχουν από ελάχιστη (Arg443Ser 0,8% της GLUD1) βασική δραστηριότητα ως μηδενική γεγονός που τις καθιστά αδύνατον να μελετηθούν απουσία ενεργοποιητών. Παράλληλα γνωρίζουμε ότι τα δυο ισοενζύμα παρουσιάζουν την ίδια ειδική δραστηριότητα παρουσία 1mM ADP (Shashidharan et al.1997, Plaitakis et al.2000) για αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί και η ενδιάμεση συγκέντρωση του 0.1mM ADP.

Οι σχετικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν αρχικά σε αδρά ολικά εκχυλίσματα κυττάρων και στην συνέχεια τα αποτελέσματα μελετήθηκαν περαιτέρω και επιβεβαιώθηκαν με χρήση καθαρισμένων πρωτεϊνών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΕΡΕΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗΝ GLUD1 & GLUD2

(Σε αδρά εκχυλίσματα κυττάρων και καθαρισμένες πρωτεΐνες)

Οι πρώτες δοκιμασίες που έγιναν σε αδρά εκχυλίσματα των δυο ισοενζυμων έγιναν επί απουσίας ADP για να εξετασθεί αν υπάρχει η όχι δράση των στεροειδών ορμονών στην βασική δραστηριότητα του ενζύμου.

αρχικά έγιναν ενζυμικές μελέτες μόνο με την Προσθήκη DES και έπειτα με 17 β -οιστραδιολης γιατί όπως είδαμε από προηγούμενες μελέτες την ισχυρότερη δράση αναστολής σε γλουταμική αφυδρογονάση των θηλαστικών την είχε η DES αρα λογικά θα παρατηρούσαμε αλλαγές στην δραστηριότητα των δυο ανθρώπινων ισοενζυμων, αν υπήρχαν, πιο εύκολα στην DES (διαιθυλσυλβεστρολη). Επειδή όμως επί απουσίας ADP με την DES παρατηρούσαμε μηδενική δραστηριότητα και στα δυο ισοενζυμα, ακόμα και στο GLUD1 που διαθέτει βασική δραστηριότητα ίση με το 40% της μέγιστης της, υποθέσαμε ότι η ανασταλτική της δράση είναι τόσο ισχυρή που μηδενίζει αμέσως την βασική δραστηριότητα έτσι προχωρήσαμε στην μελέτη της με 1mM ADP (πίνακας 1). Σύμφωνα με τον πίνακα βλέπουμε ότι η δραστηριότητα της GLUD2, από αδρά εκχυλίσματα κυττάρων, σε ίδια ποσότητα ενζύμου (ίδια βασική δραστηριότητα) αναστέλλεται 3 φορές περισσότερο από αυτήν της GLUD1 μέχρι σημείο μηδενισμού της δραστηριότητας του ενζύμου, από την DES και την οιστραδιολη. γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ενζυμικές μελέτες σε καθαρισμένες πρωτεΐνες όπου φάνηκε ότι όντως υπάρχει ανασταλτική δράση αυτών των ορμονών στα δυο ισοενζυμα και ότι το GLUD2 είναι 15 φορές πιο ευαίσθητο στην δράση τους από την GLUD1 (πίνακας 1) και σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις ορμονών από αυτές του GLUD1 στην αντίστοιχη ορμόνη (ΣΧΗΜΑ 1).

Πίνακας 1. Αναστολή από τις στεροειδής σεξουαλικές ορμόνες των φυσιολογικών ισοενζυμων σε αδρά εκχυλίσματα κυττάρων και σε καθαρισμένες πρωτεΐνες επί απουσίας ADP.

Hormones	Glud1 crude IC50	Glud2 crude IC50	Glud1 pure NOADP IC50	Glud2 pure NO ADP IC50
DES	26.3±1.19 1mM ADP	7.77±0.76 1Mm ADP	1,53±0,06	0,10±0,05
17 β Estradiol	17.5±0.91 NO ADP	6.85±0.67 NO ADP	26,93±1,07	1,53±0,23
Oestriol			144,7±18,8	11,34±0,74
Progesteron			105,8±27,9	12,31±2,63

Οι τιμές IC50 (\pm SE) καθορίστηκαν από την καμπύλη αναστολής του κάθε ενζύμου από κάθε ορμόνη χωριστά και καθορίστηκε με βάση τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς για το κάθε σημείο.

Το ίδιο αποτέλεσμα φάνηκε να ισχύει και για τις άλλες δυο ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας, οιστριολη και προγεστερονη, με μόνη διαφορά ότι παρουσιάζουν κορεσμό του ενζύμου από την συγκέντρωση της ορμόνης (μη μηδενισμός της δραστηριότητας του ενζύμου) σε αντίθεση με την DES και την οιστραδιολη (Σχήμα 1&2)

Σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις ορμονών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες μας και τις IC50 των γραφικών παραστάσεων φαίνεται ότι οι παραπάνω ορμόνες αναστέλλουν αντίστοιχα την GLUD1 & GLUD2 με την ίδια σειρά ανασταλτικής ισχύς DES>Οιστραδιολη>Οιστριολη>Προγεστερονη και σε συγκεντρώσεις πολύ κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα, Estradiol 1.10-7.34μM, Oestriol 3.02-10.75μM, Progesterone 1.59-7.95μM, κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης .

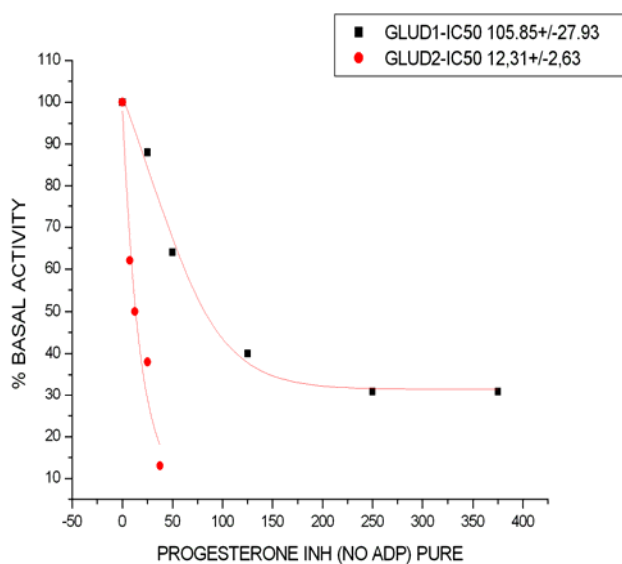
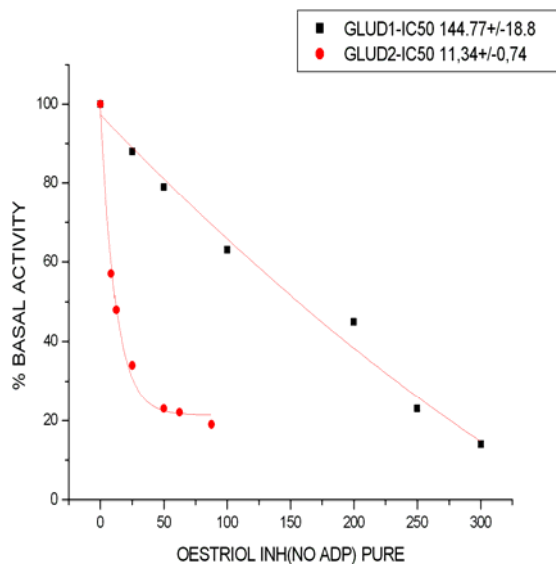
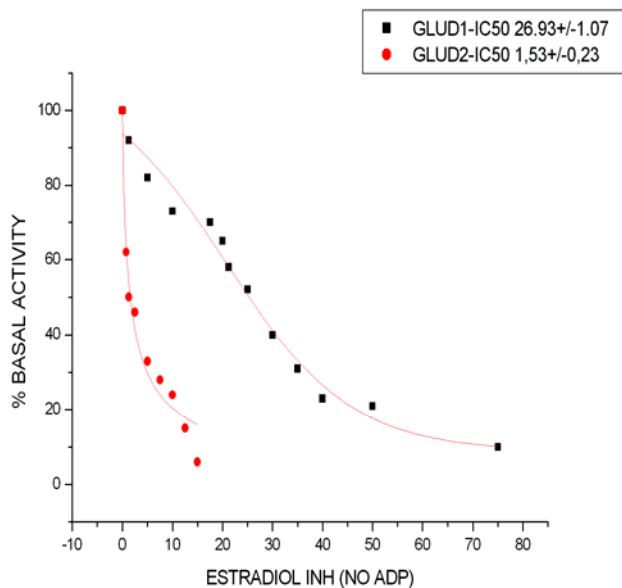
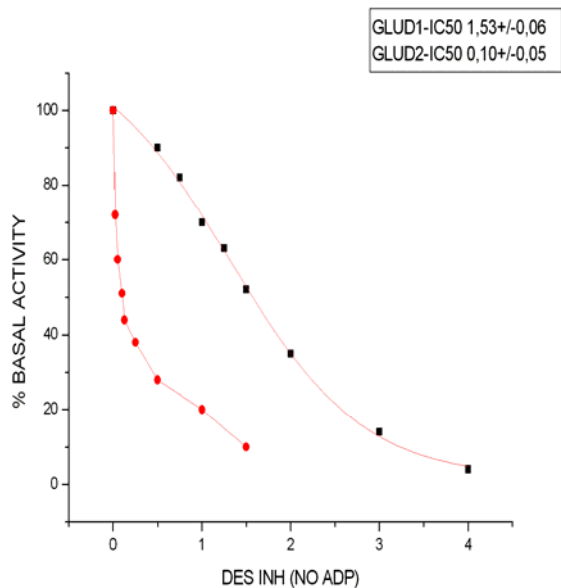
Με την Προσθήκη ADP στο διάλυμα της αντίδρασης κάθε ισοενζυμου (GLUD1&GLUD2), για κάθε ορμόνη χωριστά, φαίνεται ότι η Αναστολή της δραστηριότητας, από την κάθε ορμόνη χωριστά, μειώνεται σε σχέση με την Αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου επί απουσίας ADP. Η δραστηριότητα και των δυο ισοενζυμων αναστέλλεται όλο και λιγότερο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ADP (0.1 ή 1 mM ADP) που προστίθεται στο διάλυμα (ΠΙΝΑΚΑΣ 2). όσο αυξάνεται δηλαδή η σταθερή ποσότητα ADP που προστίθεται στο διάλυμα τόσο περισσότερη συγκέντρωση ορμόνης χρειαζόμαστε στο διάλυμα για να επιτύχουμε την Αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου (πίνακας 2 & Σχήμα 2 &3)

Εύρημα που μπορεί να μας δείχνει μια ανταγωνιστική δράση των ορμονών με το ADP ως προς την θέση προσδεσης τους.

πίνακας 2: Αναστολή των καθαρών ισοενζυμων GLUD1 & GLUD2 από τις σεξουαλικά ετεροειδής ορμόνες σε όλες τις συγκεντρώσεις ADP

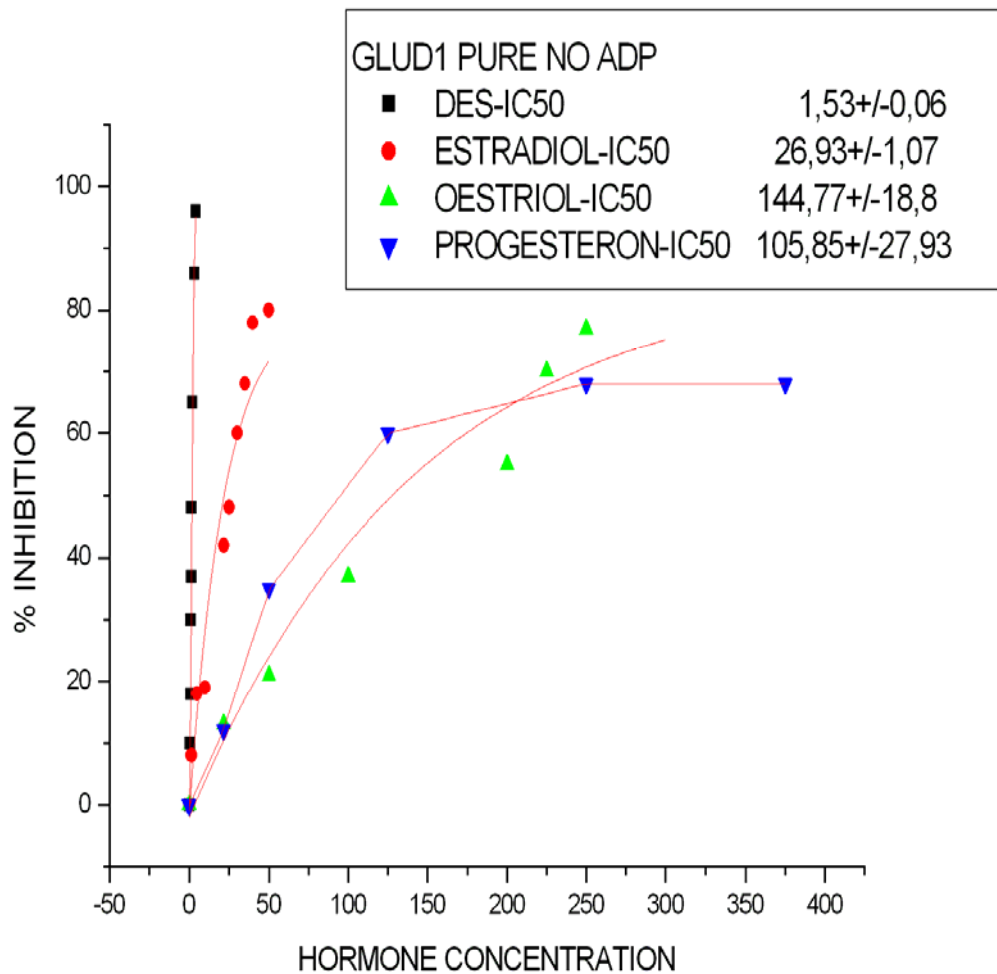
		GLUD1 pure IC50	GLUD2 pure IC50
No ADP	DES	1,53±0,06	0,10±0,05
	Οιστραδιολη	26,93±1,07	1,53±0,23
	Οιστριολη	105,8±27,9	11,34±0,74
	Προγεστερονη	144,7±18,8	12,31±2,63
0.1mM ADP	DES	7.07±0.4	1.04±0.09
	Οιστραδιολη	69.22±1.3	15.04±1.21
	Οιστριολη	315.53±26.1	188.72±17.9
	Προγεστερονη	596.39±50.87	58.86±24.1
1mM ADP	DES	24.3±1.57	8.38±0.85
	Οιστραδιολη	127.42±10.03	146.34±19.7
	Οιστριολη	400.55±55	274.89±9.19
	Προγεστερονη		392.21±8.91

Οι τιμές IC50 (± SE) καθορίστηκαν από την καμπύλη αναστολής από του κάθε ενζύμου από κάθε ορμόνη χωριστά και καθορίστηκε με βάση τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς για το κάθε σημείο.



Σχημα1: Σύγκριση αναστολής από τις στεροειδείς ορμόνες (DES, οιστραδιολη, οιστριολη, προγεστερονη αντίστοιχα) των καθαρισμένων GLUD1 & GLUD2 επί απουσίας ενεργοποιητων (ADP) στο διάλυμα της αντίδρασης.

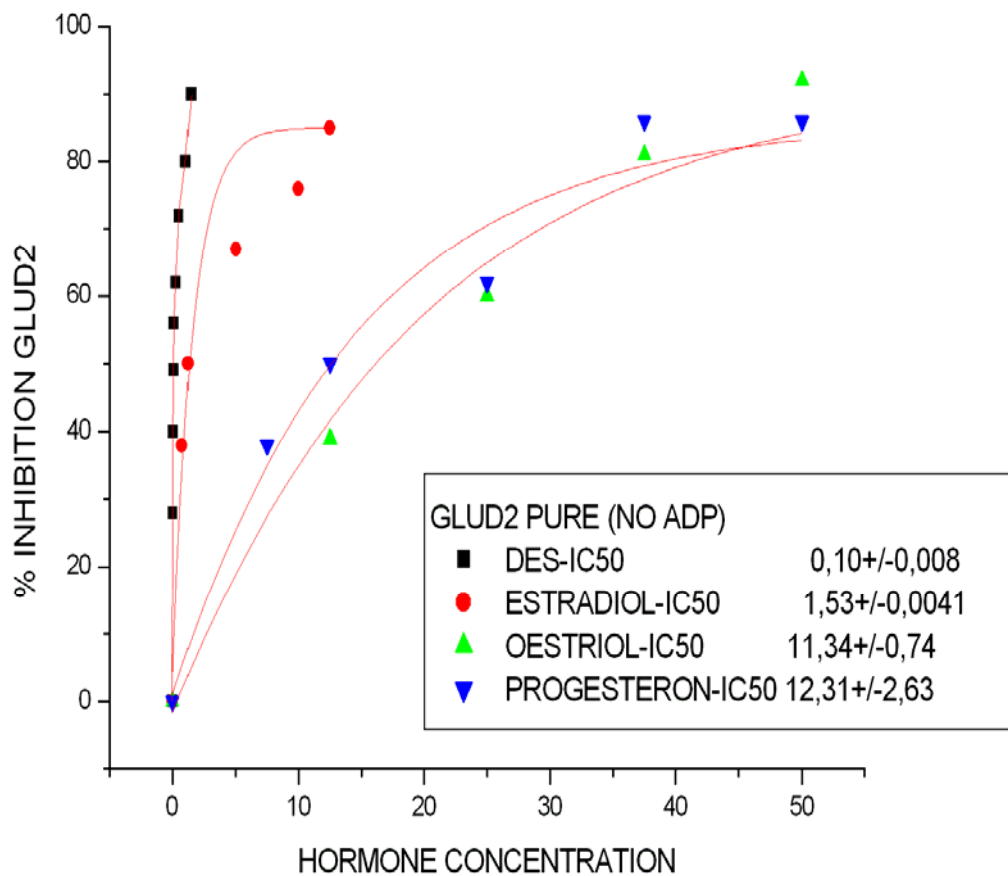
Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του κάθε ενζύμου (απουσία ενεργοποιητων). Στην GLUD2 σε σύγκριση με την φυσιολογική GLUD1 οι τιμές IC50 για την Αναστολή από ορμόνες είναι 15 φορές μικρότερες και η καμπύλη είναι υπερβολική (αρνητική συνεργατικότητα) από σιγμοειδική (θετική συνεργατικότητα)



Σχήμα 2 : Σύγκριση του ποσοστού αναστολής του GLUD1 από κάθε μια από τις ορμόνες χωριστά επί απουσίας ADP

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμινωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως αντιστρόφως ανάλογο ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του κάθε ενζύμου (απουσία ενεργοποιητών).

φαίνεται ότι η σειρά ανασταλτικής ισχύς των παραπάνω ορμονών είναι η ακόλουθη DES > Οιστραδιολη > Οιστριολη > Προγεστερονη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανάλογες με την ισχύ τους. Η οιστραδιολη και η προγεστερονη παρουσιάζουν κορεσμό από μια συγκέντρωση και μετά.



Σχήμα 3: Σύγκριση του ποσοστού αναστολής του GLUD2 από κάθε μια από τις ορμόνες χωριστά επί απουσίας ADP

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμινωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως αντιστρόφως ανάλογο ποσοστό της βασικής δραστηριότητας του κάθε ενζύμου (απουσία ενεργοποιητών).

φαίνεται ότι η σχέση την ανασταλτικής ισχύς των παραπάνω ορμονών στην GLUD2 είναι ανάλογη με αυτή της GLUD1 αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις των ορμονών και ανάλογες των φυσιολογικών επιπέδων κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΟΛΙΚΑ ΑΔΡΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Προκειμένου λοιπόν να γίνει εντοπισμός των αμινοξικών διαφορών των δυο ισοενζύμων που είναι πιθανόν υπεύθυνες για αυτές τις διαφορές στην αλλοστερική ρύθμιση των δυο ισοενζύμων από τις στεροειδείς ορμόνες έγιναν ενζυμικές λειτουργικές μελέτες σε 11 μεταλλαγμένες GLUD1 (Arg443Ser, Ser409Arg, Gly456Ala, Gly300Arg, Ala374Val, Ser227Asp, Ile219Val, Aspartic195Glu, Arg92Glutamine, Glu87Lys) από αδρά εκχυλίσματα κυττάρων Sf21. Η μελέτη αυτή Έγινε αρχικά επί παρουσίας ADP 0.1mM και με αναστολέα την DES, λόγω της ισχυρότερης ανασταλτικής της δράσης από τις 4 ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν, για εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων. μεταλλαγμένες GLUD1 που παρουσίαζαν IC50 συγκρίσιμη με την IC50 της GLUD2, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, επιλεγόταν Προκειμένου να περάσουν από καθαρισμό των πρωτεϊνών αυτών και περαιτέρω ενζυμικές μελέτες προς επιβεβαίωση της δράσης αυτών των ορμονών στην λειτουργία τους.

Οι ενζυμικές αυτές μελέτες έδειξαν ότι 6 από τις 11 μεταλλαγμένες GLUD1 (GLUD1^{Gly300Arg}, GLUD1^{Ala374Val}, GLUD1^{Ser227Asp}, GLUD1^{Ile219Val}, GLUD1^{Aspartic195Glu}, GLUD1^{Glu87Lys}) επί παρουσίας DES παρουσίαζαν ίδιο ποσοστό αναστολής με αυτό της GLUD1. Αντιθέτως η GLUD1^{Arg443Ser}, GLUD1^{Ser409Arg}, GLUD1^{Ldm} παρουσίαζαν επίπεδα αναστολής πολύ υψηλότερα από αυτό της GLUD2 επί παρουσίας 0.1mM ADP, ιδιότητα η οποία διατηρείται στο 1mM ADP (πίνακας 4), και μηδενική δραστηριότητα των ενζύμων επί απουσίας ADP στο διάλυμα της αντίδρασης (ιδιότητα GLUD2). Από τις παραπάνω Έγινε επιλογή αρχικά καθαρισμού και περαιτέρω μελέτης του ενζύμου GLUD1^{Arg443Ser} για την συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία τα υπόλοιπα δυο θα πρέπει να εξετασθούν μελλοντικά. Υποψήφια για μελλοντικές μελέτες είναι επίσης η μεταλλαγμένη GLUD1^{R92Q} λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσίασε στην δράση των ορμονών και η οποία φαίνεται να διατηρείτε σε μέγιστη ενεργοποίηση από 1mM ADP και η GLUD1^{Gly456Ala} λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσίασε στην δράση των ορμονών επίσης, ιδιότητα η οποία διατηρείται στο 1 mM ADP (πίνακας 4), και της παρόμοιας ανταπόκρισης της στο GTP, η μετάλλαξη αυτή έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την μειωμένη αναστολή από το GTP της Glud2-GDH (Zaganas & Plaitakis 2002) γεγονός που την καθιστά σημαντική Υποψήφια για μελλοντικές μελέτες.

(IC50: 81.244±8.721). μελέτες των επιλεγμένων μεταλλαγμένων ενζύμων στην Αναστολή τους από 17β-οιστραδιολη έδειξαν τα παρακάτω: η Αναστολή των R443S, S409A και Ldm παρουσιάζουν έντονη και ταχεία Αναστολή από την οιστραδιολη με ανάλογη εικόνα με αυτή της δράσης της DES αλλά η Αναστολή επιτεύχθηκε σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις οιστραδιολης από αυτές που χρειάζονται στην DES, ενώ η G456A εμφανίζει ανθεκτικότητα στην Αναστολή από οιστραδιολη σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες GLUD1. γεγονός που επιβεβαιώνει την ίδια σειρά ανασταλτικότητας των ορμονών αυτών και στις μεταλλαγμένες GLUD1 GDH δηλαδή DES>17β-Οιστραδιολη>Οιστριολη>Προγεστερονη.(πίνακας 4, Σχήμα 4&5)

πίνακας 3 : Επίδραση της DES σε όλες τις ανασυνδυασμένες GLUD1 πρωτεΐνες σε σύγκριση με τις φυσιολογικές GLUD1 & GLUD2 επί παρουσίας 0.1mM ADP.

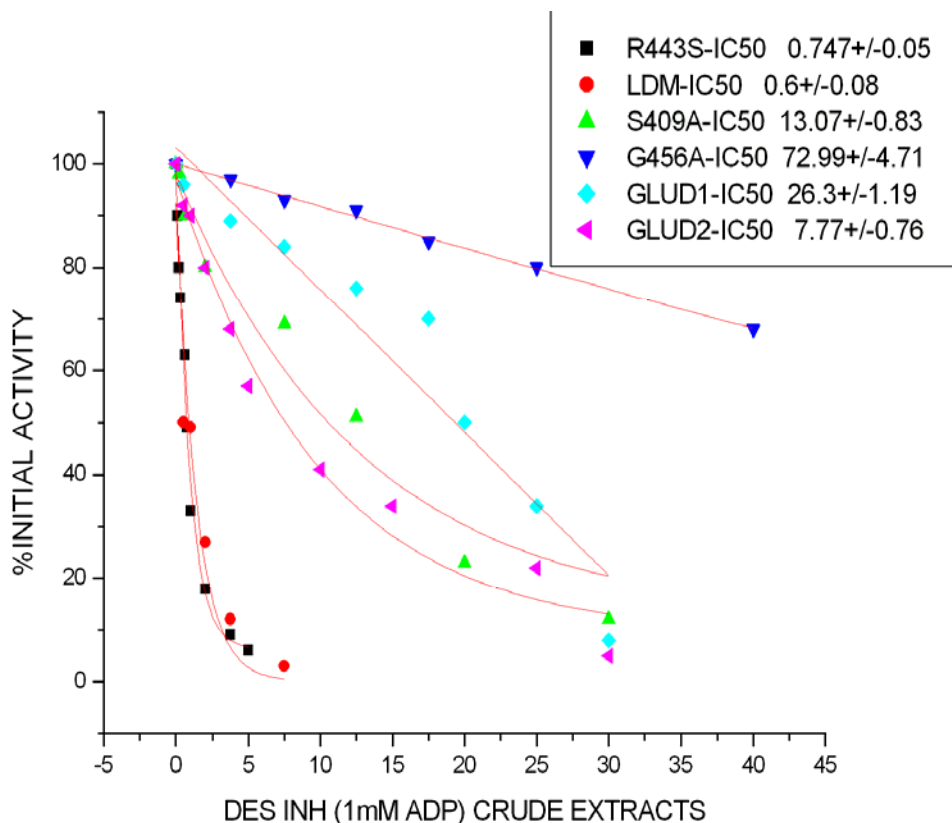
ENZYME	IC50 0.1mM ADP
GLUD 1	8,29±0,298
GLUD 2	5±0,927
Ldm	0,44±0,03
R443S	0.747±0.05 (IC50 1mM ADP)
S409R	1,70±0,231
G456A	29,15±0,82
G300R	11,71±0,60
A374V	11,54±0,55
S227N	16,48±6,97
I219V	11,49±0,47
D195E	12,83±1,27
R92Q	23,91±1,92
E87K	12,46±0,49

Οι τιμές IC50 (± SE) καθορίστηκαν από την καμπύλη αναστολής του κάθε ενζύμου από τις ορμόνες και καθορίστηκαν με βάση τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς για το κάθε σημείο. Η R443S (Arg443Ser) σε 0.1mM ADP παρουσίαζε μηδενική δραστηριότητα για αυτό παραθέσαμε την δραστηριότητα της σε 1 mM ADP. Με έντονα γράμματα αποτυπώνονται οι τιμές IC50 των μεταλλαγμένων GLUD1 που διαφέρουν από την φυσιολογική GLUD1. Οι μελέτες έγιναν σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα.

πίνακας 4: Επίδραση DES, Οιστραδιολης, Οιστριολης και Προγεστερονης σε αδρά εκχυλίσματα μεταλλαγμένων GLUD1 επί απουσίας και παρουσίας 0.1&1mM ADP στο διάλυμα της αντίδρασης.

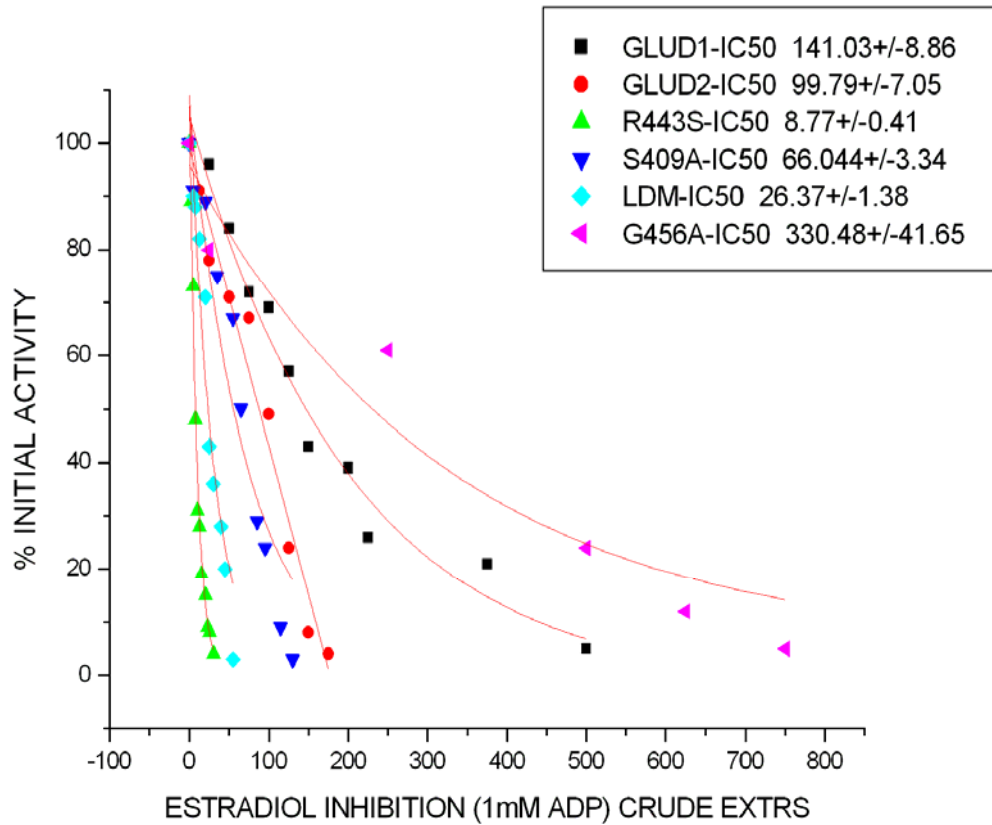
GDH crude Extracts	No ADP	ADP 0,1Mm	ADP 1mM	
Glud 1	DES	4,04±0,13	8,29±0,29	26,3±1,19
	17b-estradiol	17.56±0.91	83.09±5.62	141.03±8.86
	Progesterone	64.62±12.56	388.21±44.34	743.54
Glud 2	DES	3,68±0,34	5±0,47	7,77±0,7
	17b-estradiol	6.85±0.67	26.9±2.85	99.79±7.05
	Progesterone		138.56±54.45	726.92±39.80
Ldm	DES	0,13	0,44±0,03	0,6±0,08
	17b-estradiol	Not possible	4.22±0.74	26.37±1.38
	Oestriol	Not possible	56.53±16.9	140.18±36.2
	Progesterone	Not possible	45.83±15.47	530.43±47.76
R443S	DES	Not possible	Not possible	0,74±0,05
	17b-estradiol	Not possible	Not possible	8.77±0.41
	Oestriol	Not possible	Not possible	48.52±6.46
	Progesterone	Not possible	Not possible	78.57±9.19
S409R	DES	Not possible	1,41±0,11	13,07±0,8
	17b-estradiol	Not possible	23.01±1.05	66.04±3.34
	Oestriol	Not possible	38.47±5.75	698.98±33.6
	Progesterone	Not possible	116.33±7.03	304.83±33.12
G456A	DES	16,63±0,7	29,15±0,8	72,99±4,9
	17b-estradiol			330.48±41.65

Οι τιμές IC₅₀ (\pm SE) καθορίστηκαν από την καμπύλη αναστολής του κάθε ενζύμου από κάθε ορμόνη χωριστά και καθορίστηκε με βάση τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς για το κάθε σημείο. Οι μελέτες έγιναν στα ολικά μεταλλαγμένα κυτταρικά εκχυλίσματα που παρατηρήθηκαν διάφορες σε σύγκριση με το φυσιολογικό GLUD1 και τα οποία επιλέχθηκαν για περαιτέρω καθαρισμό.



Σχήμα 4: Σύγκριση της αναστολής των μεταλλαγμένων GLUD1 από την DES σε σύγκριση με αυτή των φυσιολογικών GLUD1 & GLUD2.

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας του ενζύμου. Οι μελέτες έγιναν σε αδρά ολικά εκχυλίσματα κυττάρων .



Σχήμα 5: Σύγκριση της αναστολής των μεταλλαγμένων GLUD1 από την 17β-οιστραδιολη με αυτή των φυσιολογικών GLUD1 & GLUD2.

Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμινωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας του ενζύμου. Οι μελέτες έγιναν σε αδρά ολικά εκχυλίσματα κυττάρων.

Μελέτες αναστολής της καθαρισμένης μεταλλαγμένης GLUD1^{Arg443Ser} από τις σεξουαλικές στεροειδής ορμόνες

Αποσκοπώντας να μελετήσουμε λεπτομερέστερα την δράση των ορμονών αυτών στην λειτουργία του μεταλλαγμένου αυτού ενζύμου σε σύγκριση με την φυσιολογική GLUD1 αλλά και να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα από τις μελέτες στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, προχωρήσαμε στον καθαρισμό του ενζύμου με διπλή στηλη χρωματογραφίας από ομογενοποιημένα Sf21 κυττάρων.

Είναι γνωστό ότι οι μελέτες σε αδρά κυτταρικά εκχυλίσματα είναι αρκετά αξιόπιστες ως προς την αξιολόγηση των γενικών ιδιοτήτων των εξεταζόμενων ενζύμων δεν μπορούν να αποσαφηνίσουν με λεπτομέρεια τις αλλοστερικές και κινητικές τους ιδιότητες, λόγω της παρουσίας σε αυτά πολλών κυτταρικών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν δυνητικά σε κάποιο βαθμό την αντίδραση. Οι μελέτες λοιπόν σε καθαρισμένα ενζυμικά παρασκευάσματα αποτελούν την οριστική επιβεβαίωση των ιδιοτήτων του εξεταζόμενου ενζύμου η αλλοστερικού τροποποιητή. λειτουργικές μελέτες της καθαρισμένης μεταλλαγμένης GLUD1 GDH επιβεβαίωσαν ότι η μετάλλαξη Arg443Ser ουσιαστικά χρειαζόταν να ενεργοποιηθεί αρχικά από υψηλές συγκεντρώσεις ADP προτού είναι δυνατή η μέτρηση αναστολής του ενζύμου από τις ορμόνες(πίνακας 5). Παρόλα αυτά όμως η Αναστολή της μεταλλαγμένης GLUD1 GDH έμοιαζε περισσότερο με αυτήν της φυσιολογικής GLUD2 GDH από αυτήν της GLUD1, η καμπύλη φαίνεται υπερβολή όπως και της ειδικής για το νευρικό ιστό γλουταμικής αφυδρογονάσης σε σχέση με την σιγμοειδική καμπύλη της GLUD1 και η Αναστολή είναι πολύ πιο ταχεία ακόμα και από αυτήν του GLUD2 γεγονός το οποίο μας δείχνει ότι πιθανότατα αυτή είναι η μετάλλαξη που ευθύνεται για την τόσο ισχυρή ανασταλτική δράση της DES και Οιστραδιολης του GLUD2.

Επίσης φαίνεται ότι η GLUD1^{Arg443Ser} έχει κάνει το ενζυμο 14 φορές πιο ευαίσθητο στην Αναστολή από DES και 31 φορές πιο ευαίσθητο στην οιστραδιολη σε σύγκριση με την φυσιολογική ανθρώπινη GLUD1 GDH στην παρουσία Μόλις 0.1mM ADP

(πίνακας 5). Ενώ επίσης φαίνεται ότι η ανασταλτική ισχύς των ορμονών στην μελέτη έχει την ίδια σειρά δράσης και στην μεταλλαγμένη GLUD1^{Arg443Ser} δηλαδή DES>17β-Οιστραδιολη>Οιστριολη>Προγεστερονη αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις γενικά από τις φυσιολογικές GDHs (Σχήμα 6)

Μια άλλη παρατήρηση στο Σχήμα 7&6 είναι ότι φαίνεται η προγεστερονη να φτάνει σε κορεσμό γρήγορα σχετικά με τις άλλες 3 εξεταζόμενες ορμόνες.

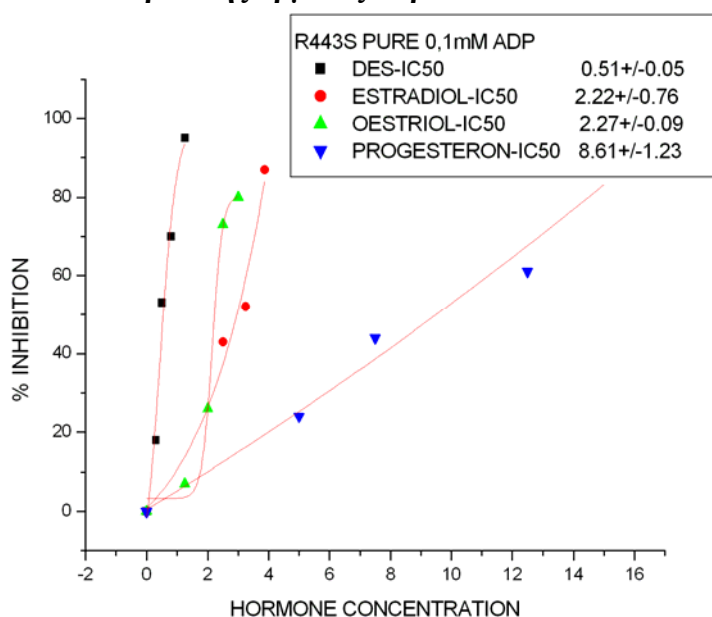
Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι η GLUD2 GDH οφείλει την ευαισθησία της στην ανασταλτική δράση των ορμονών στην μετάλλαξη Arg443Ser.

πίνακας 5 : Αναστολή της $GLUD1^{Arg443Ser}$ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ανθρώπινες $GLUD1$ & $GLUD2$ GDH από όλες τις στεροειδής σεξουαλικές ορμόνες.

GDH crude Extracts	No ADP	ADP 0,1Mm	ADP 1mM
Glud 1 DES	1.53±0.06	7.07±0.4	24.3±1.57
17b-estradiol	26.93±1.07	69.22±1.3	127.42±10.3
Progesterone	105.85±27.93	596.39±50.87	
Glud 2 DES	0.11±0.09	1.04±0.09	8.38±0.85
17b-estradiol	1.53±0.23	15.04±1.21	146.34±19.79
Progesterone	12.31±2.63	58.86±24.51	392.21±8.91
GLUD1^{Arg443Ser}			
DES	Not possible	0.51±0.05	2.50±0.09
17b-estradiol	Not possible	2.22±0.76	14.8±1.05
Progesterone	Not possible	8.61±1.23	

Οι τιμές IC₅₀ (± SE) καθορίστηκαν από την καμπύλη αναστολής του κάθε ενζύμου από κάθε ορμόνη χωριστά και καθορίστηκε με βάση τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς για το κάθε σημείο. Οι μελέτες έγιναν σε καθαρισμένα ένζυμα

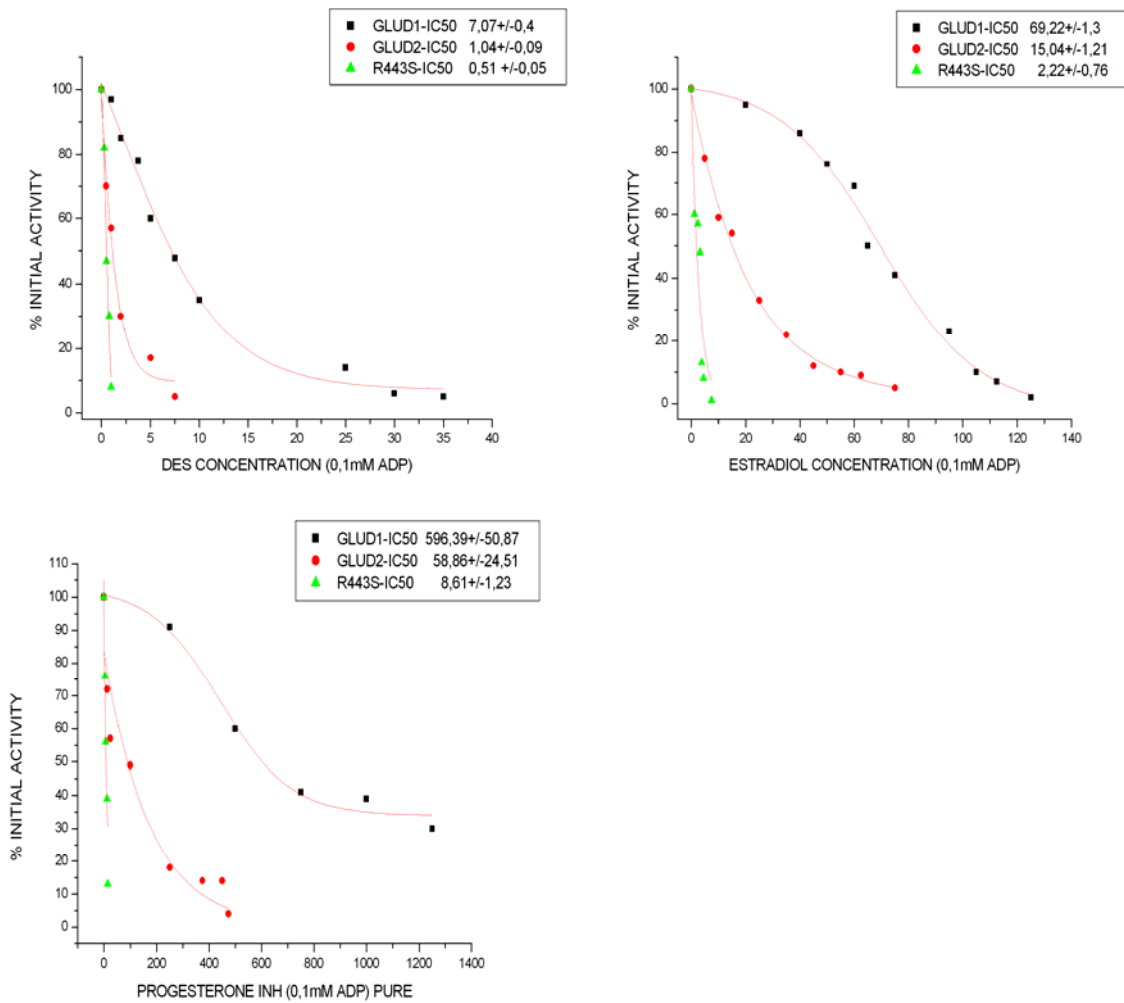
Σχήμα 6: σύγκριση αναστολής της μεταλλαγμένης $GLUD1^{Arg443Ser}$ από τις σεξουαλικά στεροειδής ορμόνες παρουσία 0.1mM ADP



Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμινωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως αντιστρόφως ανάλογο ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας του κάθε ενζύμου.

Οι μελέτες έχουν γίνει σε καθαρισμένη $GLUD1^{Arg443Ser}$ φαίνεται ότι η σχέση την ανασταλτικής ισχύς των παραπάνω ορμονών στην $GLUD1^{Arg443Ser}$ είναι ανάλογη με αυτή της $GLUD2$ αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις των ορμονών και ανάλογες των φυσιολογικών επιπέδων στο ανθρώπινο αίμα.

Σχήμα 7: Σύγκριση αναστολής της $GLUD1^{Arg443Ser}$ με τις φυσιολογικές $GLUD1$ & $GLUD2$ από κάθε ορμόνη χωριστά



Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως αντιστρόφως ανάλογο ποσοστό της μέγιστης δραστηριότητας του κάθε ενζύμου. Οι μελέτες έχουν γίνει σε καθαρισμένη $GLUD1^{Arg443Ser}$, $GLUD1$ & $GLUD2$

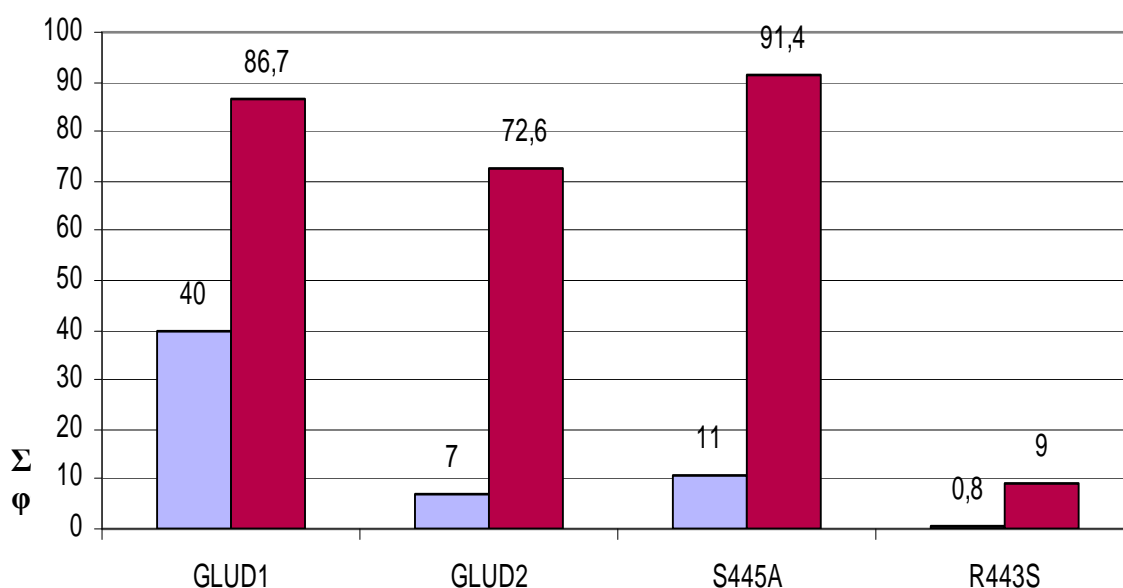
Συσχέτιση βασικής δραστηριότητας της GDH και ανασταλτικής δράσης των ορμονών σε αυτήν

Όπως έχουμε αναφέρει πολλαπλώς μέχρι τώρα από την εισαγωγή η βασική δραστηριότητα των δυο ισοενζύμων της GDH του GLUD1 (κντταρικής οικονομίας) και του GLUD2 (ειδικό για το νευρικό ιστό) διαφέρουν αρκετά (σχημα8)

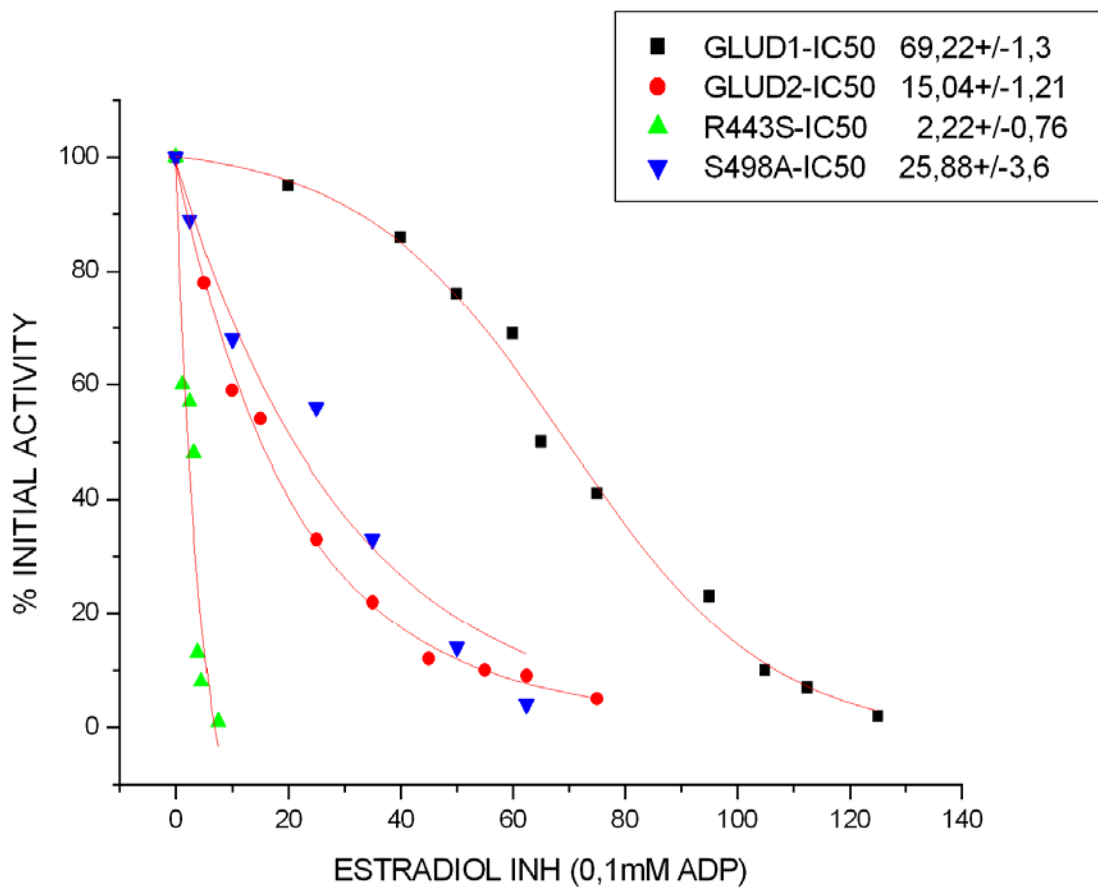
Όπως ξέρουμε και φαίνεται στο Σχήμα 8 το GLUD1 έχει βασική δραστηριότητα ίση με το 40% της μέγιστης δραστηριότητας του, το GLUD2 είναι 5-7% της μέγιστης, η μεταλλαγμένη GLUD1^{Arg443Ser} είναι Μόλις το 0.8-1% της μέγιστης δραστηριότητας της (Zaganas&Plaitakis) ενώ η βασική δραστηριότητα του GLUD2^{Ser445Ala}, ο οποίος πρόκειται για έναν πολυμορφισμό που έχει βρεθεί σε Παρκινσονικούς ασθενείς, χωρίς όμως σημαντικά αποδεδειγμένο ρόλο ακόμη, έχει βρεθεί η βασική του δραστηριότητα να είναι μεταξύ της GLUD1&GLUD2 GDH γύρω στο 11-15% της μέγιστης.

Από την παραπάνω μελέτη μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι τα ένζυμα που παρουσίαζαν χαμηλή βασική δραστηριότητα δηλαδή τα GLUD1^{Arg443Ser}, GLUD1^{Ser409Arg}, GLUD1^{Ldm} παρουσίαζαν και την υψηλότερη Αναστολή από όλα τα αλλά ένζυμα σε συγκεντρώσεις ADP 1mM, γεγονός που μας έκανε να αναρωτιόμαστε κατά πόσο μπορεί αυτό να ισχύει. Γι αυτό το λόγο καθαρίσαμε το GLUD2^{Ser445Ala}, ενζυμο που όπως αναφέραμε έχει μέση βασική δραστηριότητα μεταξύ των ισοενζύμων της GDH και κάναμε κινητικές λειτουργικές μελέτες πάνω σε αυτό με κύριο αναστολέα την 17β-οιστραδιολη από τις στεροειδης σεξουαλικές ορμόνες. Το αποτέλεσμα ήταν η Αναστολή της όντως να γίνετε παρόμοια με το GLUD2 (καμπύλη υπερβολής) αλλά σε συγκεντρώσεις ορμονών ενδιάμεσα των δυο ισοενζύμων (Σχήμα 9) ενώ φαίνεται καθαρά στο Σχήμα 10 ότι η ευαισθησία των ενζύμων της GDH στην ανασταλτική δράση των στεροειδών σεξουαλικών ορμονών είναι αντιστρόφως ανάλογη της βασικής δραστηριότητας του ενζύμου. δηλαδή όσο πιο χαμηλή η βασική δραστηριότητα ενός ενζύμου τόσο πιο μεγάλη η ανασταλτική δράση των ορμονών πάνω του. Στην περίπτωση μας λοιπον είναι **R443S GLUD1 < wtGLUD2 < wtGLUD1**.

Σχήμα 8: Σύγκριση βασικών δραστηριοτήτων & 0.1mM ADP δραστηριότητας μεταξύ GLUD1, GLUD2, GLUD2^{Ser445Ala} & GLUD1^{Arg443Ser}



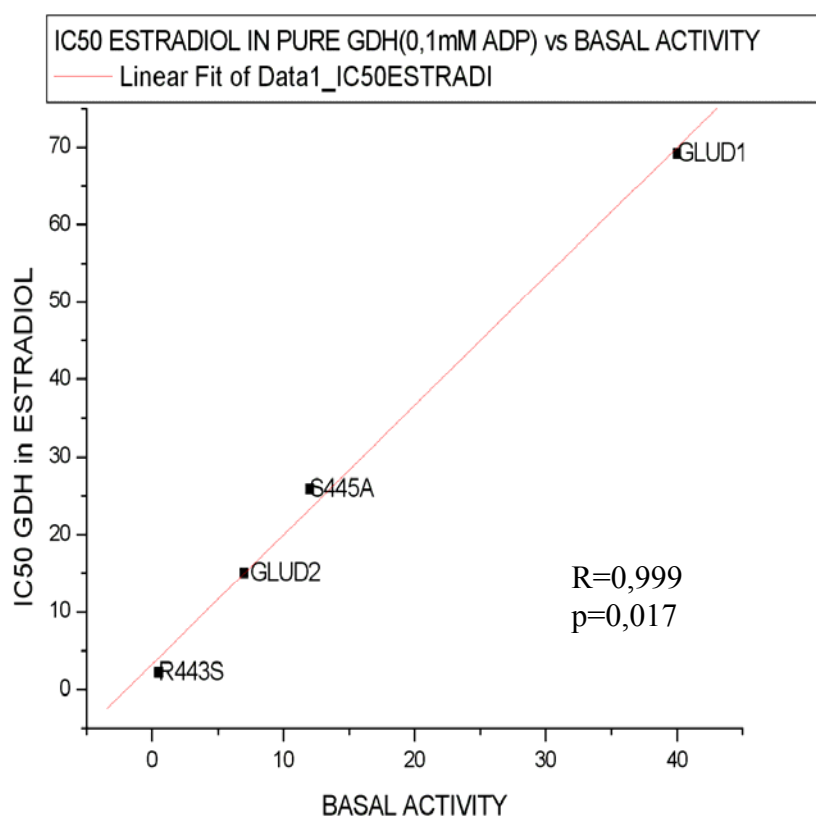
Σχήμα 9: Σύγκριση αναστολής της S445A (Ser445Ala) από την 17β-οιστραδιόλη επί παρουσίας 0.1mM ADP αυτές των φυσιολογικών GLUD1 & GLUD2 GDH και της μεταλλαγμένης GLUD1^{Arg443Ser}



Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμίνωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ορμονών. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως ποσοστό αναστολής της μέγιστης δραστηριότητας του κάθε ενζύμου.

Οι μελέτες έχουν γίνει σε καθαρισμένη GLUD1^{Arg443Ser}

Σχήμα 10: Γραμμική σχέση της βασικής δραστηριότητας της GDH με την ευαισθησία των ενζύμων στην ανασταλτική δράση των ορμονών.



Η δραστηριότητα της GDH μετρήθηκε προς την κατεύθυνση της αναγωγικής αμινωσης σε διάλυμα TRA (pH 8) σε παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης 17β-οιστραδιολης. Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από τουλάχιστον δυο πειραματικούς προσδιορισμούς και εκφράζονται ως το σημείο τομής της βασικής δραστηριότητας του κάθε ενζύμου σε σχέση με την Αναστολή του από την 17β-οιστραδιολη. Οι μελέτες έχουν γίνει σε καθαρισμένα ένζυμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

παρόλο που στο ήπαρ υπάρχει μόνο ένα από τα δυο ισοενζυμα της GDH, η GLUD1 GDH (κυτταρικής οικονομίας) προερχόμενη από το *GLUD1* γονίδιο στο χρωμόσωμα 10, στον εγκέφαλο υπάρχουν δυο ισοενζυμα GDH, το GLUD1 & το GLUD2 προερχόμενο από το *GLUD2* γονίδιο στο χρωμόσωμα X (Shashidharan et al. 1994). Τα δυο αυτά ισοενζυμα διαφέρουν σημαντικά ως προς τις λειτουργικές ιδιότητες με το δεύτερο να φαίνεται να έχει προσαρμοστεί λειτουργικά στις ιδιαίτερες συνθήκες του νευρικού ιστού λόγω των παρακάτω ιδιοτήτων του (Shashidharan et al. 1997, Plaitakis et al. 2000)

Όπως είναι ήδη γνωστό η GLUD2 είναι πιο ανθεκτική στην ανασταλτική δράση του GTP. Αυτή η αναστολή δεν δείχνει συνεργατικότητα. Παράλληλα έχει την δυνατότητα να λειτουργεί σωστά σε σχετικά χαμηλό pH επίσης είναι σχεδόν ανενεργή σε απουσία ADP, ενώ αποκτά μέγιστη δραστηριότητα συγκρίσιμη με αυτήν της GLUD1 GDH παρουσία 1mM ADP ενώ ADP με την L-λευκίνη την ενεργοποιούν συνεργιστικά. Είναι γνωστό λοιπόν ότι τα επίπεδα GTP στον εγκέφαλο είναι γενικά υψηλότερα από τα επίπεδα σε άλλους ιστούς, για αυτό τον λόγο η GLUD2 φαίνεται να χει προσαρμοστεί σε αυτό με το να μην αφήνει το GTP να ρυθμίζει σημαντικά την δραστηριότητα της καθώς θα μπορούσε να την διατηρεί συνεχώς ανενεργή.

επιπλέον η ανθεκτικότητα στην Αναστολή από GTP επιτρέπει στην Glud2 να λειτουργεί κάτω από συνθήκες υψηλού ενεργειακού φορτίου των νευρικών κυττάρων, συνθήκες οι οποίες ως γνωστόν συνδέονται με αυξημένη παραγωγή GTP, όπως και ATP, από τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. έτσι θα μπορούσε η GLUD2 να μεταβολίζει το νευροδιαβιβαστή γλουταμικό ακόμη και όταν ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων παράγει ποσότητες GTP ικανές να αναστείλουν πλήρως την GLUD1.

Ενώ η εξάρτηση του της δραστηριότητας του GLUD2 ενζύμου από τα επίπεδα του ADP στο κύτταρο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μηχανισμό ρύθμισης της ροής του γλουταμικού διάμεσου του μονοπατιού της GDH. Αυτό επιτρέπει την επιστράτευση του ενζύμου κάτω από συνθήκες χαμηλού ενεργειακού φορτίου (υψηλή αναλογία ADP προς ATP), όπως για παράδειγμα αυτές που παρουσιάζονται στα αστροκυτταρα που περιβάλλουν την συνοπτική σχισμή κατά την διάρκεια έντονης γλουταμινεργικής διαβίβασης (Erecinska & Nelson 1990) και σχετίζονται με την κατανάλωση ενέργειας για την πρόσληψη του απελευθερωμένου γλουταμικού. επιπλέον η ικανότητα της L-λευκίνης να ευαισθητοποιεί την GLUD2 σε μικρές συγκεντρώσεις ADP μπορεί να επιτρέπει στην ειδική για το νευρικό ιστό GDH να απαντάει σε μικρές αλλαγές στην συγκέντρωση του ADP ακόμη και σε απουσία ενεργειακού ελλείμματος. Ομοίως η δυνατότητα της GLUD2 να λειτουργεί σχετικά καλά σε χαμηλό pH μπορεί να της επιτρέπει να αντεπεξέρχεται στην πτώση του ενδομιτοχονδριακού pH που συνδέει κυτταρικές διεργασίες υψηλής κατανάλωσης ενέργειας όπως η νευροδιαβίβαση.

Έτσι ενώ η GLUD1 εξαρτά την δραστηριότητα της από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, αφού αναστέλλεται από GTP, αντίθετα η GLUD2 λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων της ανεξαρτητοποιείται από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, αφού τις επιτρέπουν να λειτουργεί σε συνθήκες τόσο χαμηλού όσο και υψηλού ενεργειακού φορτίου (Plaitakis et al. 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν φαίνεται ότι η GLUD1 είναι αυτή που παίζει τον μεταβολικό ρόλο της GDH στον εγκέφαλο (ρυθμίζεται από τα επίπεδα ενέργειας του κυττάρου) ενώ η GLUD2 είναι ελεύθερη να παίζει κάποιον άλλο σημαντικό ρόλο μέσα στα κύτταρα, πιθανότατα να σχετίζεται με την γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση π.χ. την παραγωγή και

αποδομηση του νευροδιαβιβαστικού κλάσματος του γλουταμικού όπως αναφέραμε παραπάνω (Plaitakis et al. 2005).

Ίσως εδώ να παίζει σημαντικό ρόλο η ισχυρότερη ανασταλτική δράση του ενζύμου στο ισοενζυμο αυτό από ότι στο GLUD1.

Πολλές μελέτες έως σήμερα έχουν μιλήσει για την πιθανή δράση των οιστρογόνων σε διάφορες νευροψυχιατρικές ασθένειες όπως η Πάρκινσον, η σχιζοφρένεια, Alzheimer's με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα κάποιες μιλάνε για νευροπροστασία από τα οιστρογόνα και κάποιες άλλες λένε το αντίθετο, ίσως επιπλέον έρευνες της δράσης των ορμονών στον μεταβολισμό αυτού του ενζύμου να μπορούσαν να ρίξουν παραπάνω φως στο αμφιλεγόμενο αυτό θέμα.

Τα αποτελέσματα αυτής της ερευνάς πάνω στο αν τελικά οι ορμόνες φαίνεται όντως να έχουν ανασταλτική δράση πάνω στην ανθρώπινη GDH συμπίπτουν με αυτά συνάδελφων που παλαιότερων ετών πάνω σε GDH βοοειδών ή άλλων θηλαστικών (Yielding&Tomkins 1960, 1965, Talal & Tomkins 1964, Warren et al. 1964, Colon et al, 1986), όπως και σε GDH από ομογενοποιημένο ανθρώπινο πλακούντα (Peterson & Warren 1966, Hudson & Daniel 1993).

Η σειρά ισχύς της ανασταλτικής δράση αυτών φαίνεται όντως να συμφωνεί με τις μελέτες κάποιων από των παραπάνω (Yielding&Tomkins 1960, Hudson & Daniel 1993) και η οποία Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας είναι η ακόλουθη DES > 17β-Οιστραδιολη > Οιστριολη > Προγεστερονη. Το σημαντικότερο όμως Εύρημα πάνω στην ανασταλτική δράση αυτών των ορμονών στα δυο ισοενζυμα της GDH είναι ότι επί απουσίας ADP τα δυο αυτά ισοενζυμα μηδενίζουν την δραστηριότητα σε συγκεντρώσεις ορμονών στο διάλυμα της αντίδρασης μέσα στα φυσιολογικά επίπεδα των ορμονών αυτών στο αίμα, σε κατάσταση εγκυμοσύνης, γεγονός που καθιστά τα αποτελέσματα αυτά σημαντικά και ενισχύει την θεωρία ότι οι σεξουαλικές στεροειδης ορμόνες μπορούν να παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό της GDH και μέσω αυτής στην παθογεννεση αρκετών νόσων ή στην προστασία του οργανισμού από αυτές.

Η πολυπλοκότητα όμως του συστήματος και η δυσκολία στο να αναφέρουμε πιθανή παθογενετική δράση τους στον οργανισμό φαίνεται από αρκετές άλλες μελέτες η οποίες δείχνουν την αντίστροφη δράση των ορμονών σε αλλά ένζυμα στενά συνδεδεμένα με τον μεταβολισμό του γλουταμικού όπως είναι η αλανινική αμινοτρανσφεραση (μεταβολίζει το γλουταμικό προς την παραγωγή αλανινης-σύνδεση αμινοξέων) και η οποία φαίνεται να ενεργοποιείται από τα οιστρογόνα παρέχοντας έτσι μια ισορροπία στο ανωτέρω σύστημα (Yielding&Tomkins 1960, John Kallos&Shaw 1970)

Από τις τέσσερις αυτές ορμόνες φαίνεται οι 2 πρώτες να έχουν πολύ ισχυρή ανασταλτική δράση και να μηδενίζουν την δραστηριότητα του ενζύμου. Οι υπόλοιπες δυο επί απουσίας ADP και 0.1mM ADP έχουν ανασταλτική δράση και μηδενίζουν την δραστηριότητα του ενζύμου ενώ επί παρουσίας 1mM ADP η ανασταλτική αυτή δράση φαίνεται να μειώνεται και το ενζυμο να φτάνει σε κορεσμό σε υψηλές συγκεντρώσεις ορμονών, γεγονός που μας κάνει να υποπτευόμαστε την πιθανή ανταγωνιστικότητα του ADP και των ορμονών, Οιστριολη & Προγεστερονη, στην ίδια θέση προσδεσης στο μόριο του ενζύμου ή την πιθανή αλλαγή της στερεομορφης του ενζύμου μετά την πρόσδεση του ADP με αποτέλεσμα να παρακωλύεται μερικώς η θέση προσδεσης των ορμονών.Υπόθεση που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Yielding&Tomkins (1960) ότι οι στεροειδης ορμόνες μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην στερεοδομική διαμόρφωση του ενζύμου και να προκαλέσουν αλλαγές στην καταλυτική του δραστηριότητα και στην σχετική ειδικότητα του στα υποστρώματα. Ενώ λίγο νεότερες μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη μιας ειδικής

αλλοστερικής θέσης προσδεσης των ορμονών για οιστρογόνα κοντά στην Cys 89 στην αρχή του ενζύμου και έχει υποτεθεί από μελέτες χημικής τροποποίησης και κινητικές δέσμευσης ραδιοσημασμένης ορμόνης (Yielding & Tomkins 1960, Kempfle, Mosebach & Muller 1973, Michel, Pons & Decomps 1977), των οιστρογόνων ότι βρίσκονται στις άκρες της αλληλουχίας γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της άμεσης πρόσδεσης των οιστρογόνων σε ειδική θέση στο ένζυμο. Η θέση αυτή πιθανόν να είναι προσβασίμη και από ADP όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα μας της κινητικότητας του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ADP σε συνδυασμό με οιστρογόνα.

Η ύπαρξη όμως μιας τέτοιας θέσης μένει να αποδεχτεί με περαιτέρω μελέτες όπως με κρυσταλλογραφικές μελέτες κτλ.

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο των αποτελεσμάτων μας στα καθαρισμένα φυσιολογικά GLUD1 & GLUD2 ισοενζυμα της GDH ήταν η ισχυρότερη ανασταλτική δράση των ορμονών στο GLUD2 (ειδικό για τον νευρικό ιστό) ισοενζυμο από ότι στο GLUD1 (κυτταρικής οικονομίας) που βρίσκεται σε όλους τους ιστούς του σώματος. Αναστολή η οποία φαίνεται να είναι 15 φορές ισχυρότερη στο GLUD2 με ίδιες συνθήκες αντίδρασης και ίδια ποσότητα ενζύμου (ίδια αρχική δραστηριότητα) επί απουσίας ADP σε όλες τις στερεοειδής σεξουαλικές ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν (DES, 17β-οιστραδιολη, Οιστριολη & Προγεστερονη).

Αναστολή η οποία φαίνεται να μειώνεται σε αναλογία ανάλογα με την ποσότητα ADP που προσθέτουμε στο διάλυμα αντίδρασης (0.1 & 1mM ADP) Εύρημα το οποίο ίσως να ενισχύει την παραπάνω θεωρία ανταγωνιστικότητας των δυο αλλοστερικών τροποποιητών (ADP & οιστρογόνα).

γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε κάποια από τις λειτουργικές ιδιότητες του GLUD2 η οποία το κάνει και πιο ευαίσθητο στην δράση τους.

ιδιότητες οι οποίες οφείλονται Σύμφωνα με τους Zagana & Plaitakis (2002) στις αμινοξικές διάφορες των δυο ισοενζυμων στις θέσεις 443 και 456 όπου μετά από μεταλλαξιογεννεση του GLUD 1 από τα αντίστοιχα αμινοξέα των θέσεων αυτών του GLUD2 βρέθηκε όπως ήδη έχουμε συζητήσει ότι οι μεταλλάξεις Arg443Ser & Gly456Ala είναι αυτές στις οποίες οφείλονται οι παραπάνω λειτουργικές διαφορές των δυο ισοενζυμων της GDH. Για αυτό τον λόγο και εμείς επιλέξαμε από όλες τις μεταλλαγμένες GLUD1 που μελετήσαμε από αδρά εκχυλίσματα κυττάρων με λειτουργικές μελέτες τελικά να περάσουμε από την διαδικασία του καθαρισμού και περαιτέρω λειτουργικές μελέτες πρώτη την Arg443Ser η οποία προσδίδει στην GLUD2 πολύ χαμηλή βασική δραστηριότητα και η οποία φάνηκε από τα αποτελέσματα μας πολύ ενδιαφέρουσα για μελέτη.

Παλαιότερες λειτουργικές μελέτες της συγκεκριμένης καθαρισμένης μεταλλαγμένης GLUD1 GDH είχαν επιβεβαιώσει ότι η μετάλλαξη Arg443Ser έκανε το ενζυμο ουσιαστικά ανενεργό σε απουσία αλλοστερικών ενεργοποιητών (Plaitakis et al.), το οποίο δεν εξαρτωνταν από την ποσότητα του ενζύμου στην αντίδραση, επί παρουσίας όμως έστω και ελάχιστης ποσότητας βασικής δραστηριότητας η Προσθήκη ακόμα και πολύ μικρών ποσοτήτων ενεργοποιητη, ADP, ήταν ικανές να ενεργοποιήσουν το ενζυμο στο μέγιστο. Η μελέτη αυτή έδειξε την GLUD1^{Arg443Ser} στα αδρά εκχυλίσματα να δίνει μηδενική δραστηριότητα στην μεταλλαγμένη GLUD1 GDH επί απουσίας ενεργοποιητών και επί παρουσίας 0.1mM ADP, ενώ επί παρουσίας 1mM ADP έδειχνε έως και 30 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από το φυσιολογικό GLUD1 και 10 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από το φυσιολογικό GLUD2. αποτέλεσμα το οποίο μας ώθησε και στην περαιτέρω μελέτη της μετά από καθαρισμό της πρωτεΐνης. κινητικές μελέτες σε καθαρό ενζυμο έδειξαν ότι η GLUD1 ενώ παραμένει ανενεργή επί απουσίας ADP όπως και αναμενόταν επί παρουσίας 0.1 & 1mM ADP παρουσίαζε

Αναστολή του ενζύμου στην DES παρόμοια με αυτή της καθαρής GLUD2 (2 φορές μόνο ισχυρότερο) και 14 φορές ισχυρότερη Αναστολή από αυτήν της GLUD1 επί παρουσίας 0.1mM ADP ενώ επί παρουσίας 1mM ADP η διαφορά αυτή μίκραινει σε 10 φορές ισχυρότερη Αναστολή της μεταλλαγμένης GLUD1 από την φυσιολογική και σε 3 φορές ισχυρότερη Αναστολή από αυτήν της GLUD2.

Στην περίπτωση της 17β-οιστραδιολης η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεταλλαγμένης GLUD1^{Arg443Ser} και των φυσιολογικών GLUD1 & GLUD2 έδειξαν ότι ενώ επί παρουσίας 0.1mM ADP έχει 37 φορές ισχυρότερη Αναστολή από ότι η πρώτη και 7 φορές ισχυρότερη αναστολή από την δεύτερη, επί παρουσίας υψηλότερων συγκεντρώσεων ADP (1mM ADP) η διάφορα αυτή της ισχύς της αναστολής των ορμονών στα δυο ένζυμα εξισώνεται (παρουσιάζουν δηλαδή ίσο ποσοστό αναστολής)

Στη περίπτωση της Προγεστερονης η σύγκριση των αποτελεσμάτων έδειξε παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή ότι η αναστολή της μεταλλαγμένης GLUD1^{Arg443Ser} ήταν παρόμοια με αυτή της GLUD2 ενώ είχε πολύ ισχυρότερη αναστολή από την φυσιολογική GLUD1 επί παρουσίας μικρής ποσότητας ενεργοποιητη (0.1mM ADP) ενώ επί παρουσίας μέγιστης ενεργοποίησης του ενζύμου από ενεργοποιητη (1mM ADP) η αναστολή του ενζύμου ήταν ελάχιστη και έφτανε γρήγορα σε κορεσμό προτού είναι αδύνατον να πάρουμε αρκετές τιμές για τον σχηματισμό καμπύλης αναστολής. Η Οιστριολη δεν μελετήθηκε για τον ίδιο με τον παραπάνω και λόγω έλλειψης χρόνου.

Όλα τα παραπάνω λοιπον φαίνεται να μας οδηγούν σε ανάλογο συμπέρασμα με αυτό που είχε η ομάδα του κ. Πλαιτακη (Plaitakis et al. 2002) για τους υπόλοιπους αλλοστερικούς τροποποιητες που έχουν μελετηθεί σε αυτό το μεταλλαγμένο ενζυμο και αυτό είναι ότι αυτή είναι η μετάλλαξη στην οποία μπορούμε να προσδώσουμε την ευαισθησία του GLUD2 στην αναστολή του από τα οιστρογόνα σε σχέση με το GLUD1. Πέραν αυτού όμως θα πρέπει να μελετηθεί καλύτερα η πιθανή θέση των οιστρογόνων πάνω στα ένζυμα της GDH γιατί όπως φαίνεται αυτή θα μπορούσε να είναι η ίδια θέση με αυτή του ADP η κοντά σε αυτή γιατί όπως φαίνεται η αναστολή από τις ορμόνες Οιστριολη & Προγεστερονη του μεταλλαγμένου ενζύμου όσο και των φυσιολογικών επί παρουσίας 1mM ADP φτάνει σε κορεσμό γρήγορα και δεν αφήνει να μηδενιστεί η δραστηριότητα του ενζύμου πάνω από μια συγκέντρωση και μετά της ορμόνης.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της παρούσης μελέτης ήταν ότι η αναστολή των ισοενζυμων της GDH (GLUD1, GLUD2 & GLUD1^{Arg443Ser}) παρουσιάζετε να είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη βασική δραστηριότητα των ενζυμων. Όπως αναφέραμε στα αποτελέσματα η βασική δραστηριότητα της GLUD1 είναι γύρω στο 40-50% της μέγιστης δραστηριότητας της, του GLUD2 είναι το 5-7% της μέγιστης και του μεταλλαγμένου ενζύμου της GLUD1 είναι 1% της μέγιστης. Για να βεβαιωθούμε όμως για την ορθότητα αυτής της θεωρίας ελέγχθηκε με κινητικές μελέτες αναστολής από την 17β-οιστραδιολη ένα επιπλέον καθαρισμένο ενζυμο GDH, γνωστός πολυμορφισμός της GDH, ο οποίος ήταν γνωστό, από αδημοσίευτες μελέτες συνάδερφου μου στο εργαστήριο του κ. Κανανουρα, ότι διαθέτει βασική δραστηριότητα ενδιάμεσα στην GLUD1 & στο GLUD2 και η οποία ήταν 11-15%της μέγιστης της. μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών και από σχηματισμό καμπύλης γραμμικής παλινδρόμησης αποδεικτικέ ότι η θεωρία μας αυτή ήταν σωστή και ότι όντως η αναστολή του κάθε ενζύμου GDH είναι αντιστρόφως ανάλογη της βασικής δραστηριότητας αυτών των ενζυμων.

Μέσω αυτής της μελέτης όμως σε αδρά εκχυλίσματα κύτταρων βρέθηκαν 4 ακόμα μεταλλαγμένες GLUD1 GDH η οποίες αξίζουν περαιτέρω μελέτης λόγω της ευαισθησίας του που έδειξαν επίσης στην αναστολή από τις ορμόνες που μελετήσαμε (GLUD1^{Ser409Arg}, GLUD1^{L^{dm}}) ή της ανθεκτικότητας στην δράση τους (GLUD1^{R92Q}, GLUD1^{Gly456Ala}).

Συμπερασματικά λοιπον βλέπουμε ότι η επίδραση των ορμονών αυτών που μελετήθηκαν γίνεται απευθείας με το ενζυμο ότι πιθανότατα υπάρχει μια θέση προσδεσης των ορμονών αυτών πάνω στο μόριο της GDH το οποίο θα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο στο μέλλον ίσως με κρυσταλλογραφικές μελέτες και ότι αυτή η θέση ίσως να είναι η ίδια η κοντά στην θέση προσδεσης της ADP. Το πιο σημαντικό μας όμως εύρημα ήταν ότι φαίνεται ότι οι ορμόνες έχουν άμεση επίδραση στο μεταβολισμό του γλουταμικού σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα στο αίμα και Μέσω αυτού ίσως να επηρεάζουν την παθογένεση διάφορων νόσων ή όχι.