

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αποσαφήνιση του λειτουργικού και εξελικτικού ρόλου των
γονιδίων της γλουταμικής δεϋδρογονάσης (*GDH*) στο
σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*

Παρασκευή Μάρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δ. Αλεξανδράκη

Ηράκλειο

Σεπτέμβριος, 2014

Αντί προλόγου

Ο Arthur Guinness, ήταν Ιρλανδός ζυθοποιός και ιδρυτής της ζυθοποιίας Guinness από όπου παράγεται και η διάσημη ιρλανδική μαύρη μύρα. Η έναρξη του θρύλου της Guinness ξεκίνησε με ένα καταπίστευμα 100 λιρών που εισέπραξε ο Guinness μετά το θάνατο του αναδόχου του. Με αυτό το ποσό έστησε αρχικά μια μικρή εταιρεία την οποία στη συνέχεια μετέφερε στο σημείο που βρίσκεται σήμερα το ομώνυμο εργοστάσιο της Guinness. Το συγκεκριμένο χώρο (~16.000 m²) ο Guinness τον ενοικίασε το 1759 υπογράφοντας συμβόλαιο ενοικίασης για 9.500 χρόνια με αντίτιμο ενοικίου στις 45 λίρες ετησίως. Το συμβόλαιο αυτό ισχύει έως και σήμερα...

Μέσα σε μια τέτοια συγκυρία γεννήθηκε η μύρα Guinness η οποία πλέον παράγεται σε πάνω από 60 χώρες και έχει πωλήσεις πάνω από 800εκ. λίτρα ετησίως.

Ο Guinness πίστευε ότι το μυστικό μιας καλής μύρας είναι το καλής ποιότητας κριθάρι, το καθαρό και άφθονο νερό και φυσικά ένα επτασφράγιστο μυστικό το οποίο φύλαγε στο θησαυροφυλάκιο του. Το μυστικό αυτό, που δεν είναι άλλο από τον ταπεινό σακχαρομύκητα, είναι και ο λόγος για τον οποίο στο εργοστάσιο της Guinness στο Δουβλίνο υπάρχει επιγραφή που λέει: "Arthur Guinness succeeded where others had failed".

Ο θρύλος λέει, ότι η μαγιά που χρησιμοποιείται στην παρασκευή της Guinness προέρχεται από την ίδια μαγιά που χρησιμοποιούσε ο ίδιος ο Guinness. Η εταιρεία εικάζει ότι το γνωρίζει αυτό, καθώς υπάρχουν αρχεία στα οποία φαίνεται ότι από τις αρχές του 19^ο αιώνα, μέρος της μαγιάς από κάθε ζυθοποιείο περνούσε στο επόμενο προκειμένου να υπάρχει σταθερότητα και επαναληψιμότητα στο τελικό προϊόν. Ο σακχαρομύκητας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της Guinness μεγαλώνει αποκλειστικά στο St. James Gate, όπου είναι και το ομώνυμο εργοστάσιο της Guinness και θεωρείται τόσο πολύτιμος ώστε πάντα ένα απόθεμα διατηρείται κλειδωμένο στο χρηματοκιβώτιο του εκάστοτε διευθυντή. Έτσι αν συμβεί οποιοδήποτε λάθος στις καλλιέργειες μπορεί να γίνει επανατροφοδότηση της παραγωγής σε μερικές ώρες.

Το κλασικό στέλεχος του σακχαρομύκητα μεταφέρεται σε κάθε ζυθοποιείο όπου ζυμώνεται σήμερα η Guinness. Κατά τον Arthur Guinness, ο σακχαρομύκητας παράγει τη μεγαλύτερη αλχημεία στη ζύμωση της μύρας, καθώς μετατρέπει τα σάκχαρα και τα θρεπτικά που υπάρχουν στο κριθάρι σε αιθανόλη.

Η Ιρλανδία είναι η χώρα των ξωτικών και των μύθων... Τι τελικά ισχύει με τα στελέχη του Guinness (αν ισχύει κάτι) μπορεί να είναι αλήθεια μπορεί και όχι.. Μελέτες πάντως σε μοντέλα ζώων για αρτηριοσκλήρωση στα οποία χορηγήθηκε

Guinness έδειξαν ότι, η συγκεκριμένη μύρα περιέχει ισχυρά αντιοξειδωτικά όμοια με αυτά των φρούτων και κάποιων λαχανικών που ευνοούν τη λειτουργία της καρδιάς, καθώς καθυστερούν την εναπόθεση της χοληστερολης στα αρτηριακά τοιχώματα (Mann & Folts, 2004).

Mann L.B. & J.D. Folts, (2004), Effects on ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: a review, *Pathophysiology* **10**(2): 105-112.

Περίληψη

Ο μεταβολισμός του γλουταμικού οξέος έχει συνδεθεί με διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως είναι ο μεταβολισμός των αμινοξέων και ο κύκλος του Krebs. Στο σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*), το γλουταμικό συντίθεται από α-κετογλουταρικό (α-KG) και αμμωνία μέσω της δράσης γλουταμικών δεϋδρογονασών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *GDH1* and *GDH3*. Η λειτουργία των συγκεκριμένων πρωτεϊνών καθώς και ο εξελικτικός τους ρόλος δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Στην παρούσα διατριβή έγιναν προσπάθειες δημιουργίας μεταλλαγμένων *GDH*-στελεχών για εξεύρεση φαινοτύπων με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των Gdh πρωτεϊνών στη βιοχημεία του σακχαρομύκητα. Παράλληλα έγιναν προσπάθειες να απαντηθούν ερωτήματα που σχετίζονται με τη δράση αλλά και τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η ενεργοποίηση των *GDH* γονιδίων κάτω από διαφορετικές πηγές άνθρακα ενώ σχολιάζονται οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες και ο ρόλος τους στην ανάπτυξη του σακχαρομύκητα.

Abstract

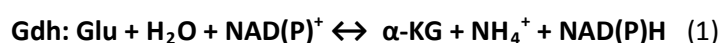
Glutamate metabolism is considered as an important cellular process with a crucial role in Krebs cycle as well as in neurotransmission. In yeast, (*S. cerevisiae*) glutamate is produced by α -ketoglutarate (α -KG) and ammonia through the catalysis of glutamate dehydrogenases Gdh1 and Gdh3 which are encoded by *GDH1* and *GDH3* respectively. The function as well as the evolutionary role of these proteins has not been fully elucidated. In this study *GDH*-mutant yeast strains were created in order to perform growth assays for discovering phenotypes that could provide input on the activity of Gdh1 and Gdh3 proteins under different carbon and nitrogen sources. Furthermore, efforts have been made to explain the absence of coexistence of the two isoforms during the different growth phases. Finally, questions concerning the post-transcriptional modifications that these proteins may acquire and their role in growth were addressed.

1. Εισαγωγή

1.1. Βιοχημεία του γλουταμικού οξέος

Το γλουταμικό οξύ (Glu; E) είναι ένα μη απαραίτητο (non-essential) δι-καρβοξυλικό αμινοξύ το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες του μεταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα, το γλουταμικό είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη σύνθεση και τον καταβολισμό πρωτεϊνών ενώ αναφέρεται ότι συμβάλλει καθοριστικά στο γενικότερο μεταβολισμό του αζώτου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το γλουταμικό, αποτελεί υπόστρωμα αντιστρεπτής δράσης αμινοτρανσφερασών με σκοπό τη μεταφορά αμινικών μορίων αζώτου (Kelly & Stanley, 2001). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη καθώς συμβάλλει στην εκ νέου πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά και τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των δεξαμενών των μη απαραίτητων αμινοξέων. Εκτός από τη σύνθεση, το γλουταμικό συμμετέχει ενεργά και στον καταβολισμό των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, καθώς τα αμινικά μόρια αζώτου μεταφέρονται μέσω του γλουταμικού, οι ανθρακικοί σκελετοί που παραμένουν μπορούν να οξειδωθούν ολοκληρώνοντας έτσι τον καταβολισμό των αμινοξέων (Kelly & Stanley, 2001).

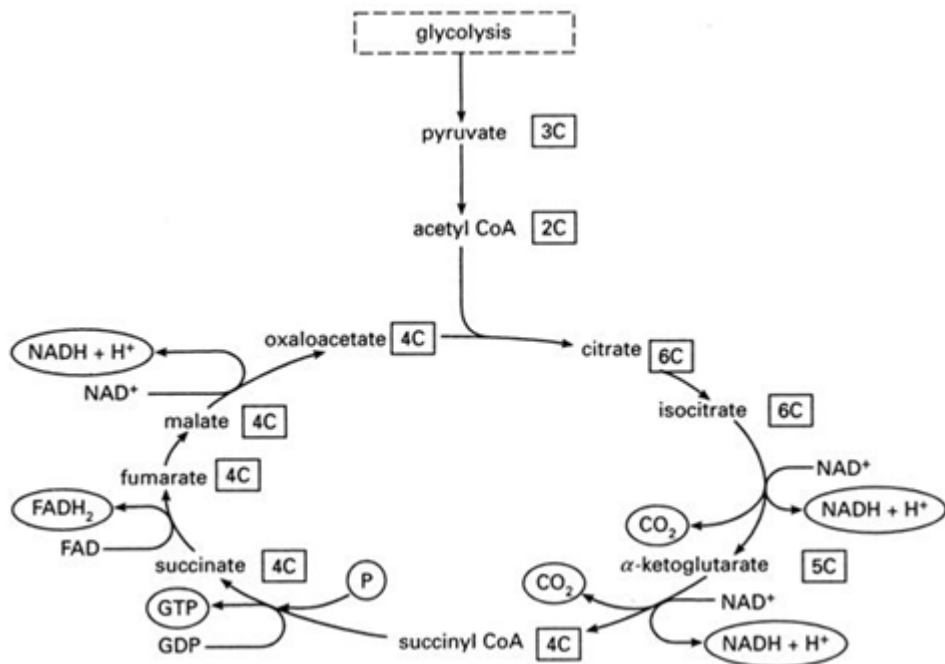
Το γλουταμικό συμπληρώνει την αποικοδόμηση των αμινοξέων μέσω της οξειδωτικής απαμίνωσης που υφίσταται από το ένζυμο γλουταμική δεϋδρογονάση (Gdh) (Brusilow & Horwich 1995). Πιο συγκεκριμένα, μέσω της πρωτεΐνης Gdh το γλουταμικό απαμινώνεται δίνοντας ως τελικά προϊόντα α-κετογλουταρικό (α-KG) και ελεύθερη αμμωνία σύμφωνα με την αντίδραση (1):



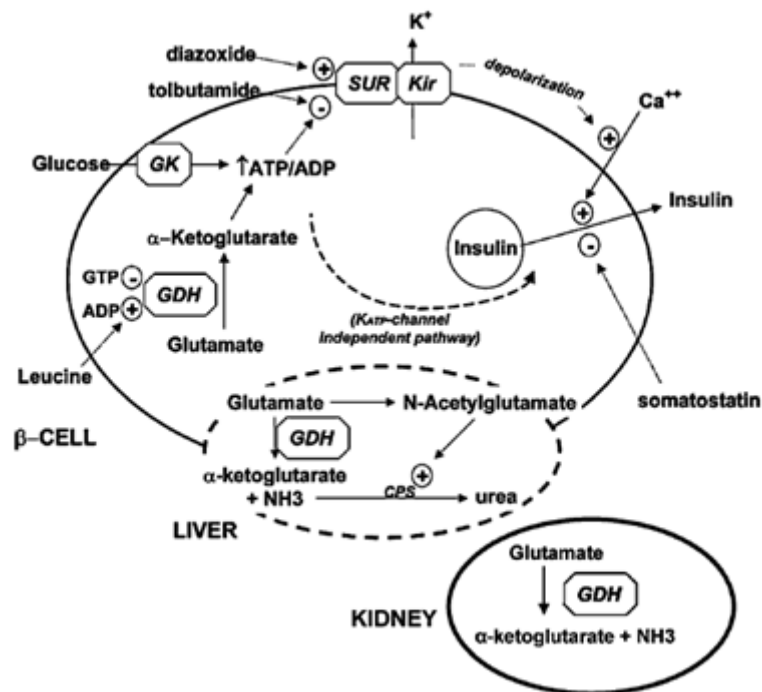
Με την παραπάνω διαδικασία το α-KG που σχηματίζεται, εισέρχεται και οξειδώνεται στον κύκλο του Krebs συμβάλλοντας στην παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP αλλά και στη σύνθεση του αναγωγικού παράγοντα NADH (εικόνα 1).

Με την απελευθέρωση της αμμωνίας ολοκληρώνεται ουσιαστικά και μέρος της διαχείρισης του ανόργανου αζώτου σε κύτταρα και ιστούς. Πιο συγκεκριμένα σε όργανα όπως είναι το συκώτι, η αμμωνία που παράγεται εισέρχεται απευθείας στον κύκλο της ουρίας και στη συνέχεια αποβάλλεται από τον οργανισμό. Αντίθετα σε όργανα όπου ο συγκεκριμένος κύκλος δεν είναι ενεργός (π.χ. εγκέφαλος, σκελετικοί μύες) πραγματοποιείται σχηματισμός γλουταμικού μέσω αμίνωσης του α-KG (reverse reaction Gdh) και εν συνεχεία γλουταμίνης (glutamine synthesis reaction). Η γλουταμίνη αποτελεί

τον κύριο ενδο-οργανικό μεταφορέα αμμωνίας με σκοπό τη μεταφορά της ουσίας στο συκώτι όπου θα πραγματοποιηθεί αποτοξικοποίηση (detoxification) μέσω του κύκλου της ουρίας (Kelly & Stanley, 2001) (εικόνα 2).



Εικόνα 1. Ο κύκλος του Krebs



Εικόνα 2. Απεικόνιση της δράσης του ενζύμου GDH σε 3 διαφορετικά όργανα (Palladino & Stanley, 2010)

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι το γλουταμικό μέσω του ενζύμου Gdh συνδέει το μεταβολισμό των αμινοξέων και των υδατανθράκων υποστηρίζοντας τόσο την

παραγωγή ενέργειας, όσο και την αποβολή της τοξικής αμμωνίας. Δυσλειτουργίες στις παραπάνω διαδικασίες έχουν συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι υπερ-λειτουργία του ενζύμου GDH λόγω μεταλλαγών κέρδους λειτουργίας (gain of function) οδηγεί σε υπερινσουλιναϊμία αλλά και σε υπεραμμωνιαϊμία, ο συνδυασμός των οποίων οδηγεί σε ένα εκ γενετής σύνδρομο που παρατηρείται κυρίως στα νεογνά (HI/HA syndrome) (Weinzimer et al., 1997; Yorifuji et al., 1999; Palladino & Stanley, 2010). Επίσης σε πρόσφατη βιβλιογραφία έχει προταθεί ο μηχανισμός δράσης της GDH στην έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά Β-κύτταρα, επεξηγώντας ότι ασθενείς με μεταλλαγές στη κωδική περιοχή του *gdh* είναι δυνατόν να υποφέρουν είτε από υπερινσουλιναϊμία είτε από υπογλυκαιμία (Fahien & MacDonald, 2011).

Αντίστοιχα προβλήματα που ευθύνονται σε εσφαλμένη λειτουργία της GDH έχουν παρατηρηθεί και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Πιο συγκεκριμένα αναλύσεις δειγμάτων από ασθενείς με μυοατροφική πλάγια σκλήρυνση (ALS) έχουν δείξει παρόμοιες μεταβολικές ανωμαλίες με ασθενείς οι οποίοι φέρουν ανεπάρκεια σε GDH (Plaitakis et al., 1980; Plaitakis & Yahr, 1986; Plaitakis et al., 1993). Επίσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στην περίπτωση της υπεραμμωνιαϊμίας λόγω δυσλειτουργίας της GDH, πέρα από την πρόκληση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας έχει καταγραφεί μορφολογική αλλοίωση (διόγκωση) της αστρογλοίας (Willard-Mack et al., 1996). Τέλος έχει αναφερθεί ότι φαρμακευτική αγωγή για σχιζοφρένεια φαίνεται να προκαλεί υπεργλυκαιμία σε ασθενείς γεγονός που αποδίδεται στην ικανότητα που έχουν τα αντι-σχιζοφρενικά σκευάσματα να αναστέλλουν τη δράση της GDH (Fahien & MacDonald, 2011).

1.2 Περιγραφή των ενζύμων της γλουταμικής δεϋδρογονάσης στα θηλαστικά και στον σακχαρομύκητα

Η πρωτεΐνη GDH στα θηλαστικά είναι ένα ένζυμο της μιτοχονδριακής μήτρας και βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες κυρίως στον εγκέφαλο, στο συκώτι, στο πάγκρεας και στους νεφρούς. Η αντιστρεπτή διαδικασία της οξειδωτικής απαμίνωσης του γλουταμικού σε α-KG από την GDH, ελέγχεται ισχυρά και η δράση της αναστέλλεται αλλοεστερικά από το GTP (Cho et al., 1996) ενώ ενεργοποιείται από το ADP, το ATP (Wrzeszczynski & Colman, 1994) και τη λευκίνη (Sener & Malaisse, 1980). Στον άνθρωπο η πρωτεΐνη GDH, κωδικοποιείται από το *GLUD1* (chr.10q) να ομοεξαμερές που αποτελείται από 13 εξόνια (Nakatani et al., 1988; Michaelidis et al., 1993). Παράλληλα έχει καταγραφεί και ένα δεύτερο γονίδιο, το *GLUD2*. Το *GLUD2* είναι ένα γονίδιο χωρίς ιντρόνια το οποίο βρίσκεται

στο χρωμόσωμα X και χαρακτηρίζεται από 95% ομολογία με το *GLUD1* (Shashidharan et al., 1994). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα θηλαστικά το *GLUD2* έχει καταγραφεί μόνο στον άνθρωπο και τον πίθηκο και φαίνεται ότι έχει προκύψει πριν από 18-25My μέσω της αντίστροφης μεταγραφής mRNA από το πατρικό γονίδιο *GLUD1* (Burki & Kaessmann, 2004). Παρόλη την υψηλή ομολογία υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ των δύο γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα το *GLUD1* υπάρχει τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με το *GLUD2* το οποίο βρίσκεται αποκλειστικά στη μιτοχονδριακή μήτρα. Προηγούμενη βιβλιογραφία αναφέρει ότι το *GLUD2* χαρακτηρίζεται από λειτουργικές ιδιότητες οι οποίες είναι ειδικές για τον εγκέφαλο (Plaitakis et al., 2003), λόγω δύο ισχυρών αμινοξικών αντικαταστάσεων που προέκυψαν μετά το διπλασιασμό (Burki & Kaessmann, 2004). Εξαιτίας αυτών των αντικαταστάσεων το *GLUD2* χαρακτηρίζεται από υψηλή ενεργότητα σε ουδέτερο pH, η δράση του δεν επηρεάζεται έντονα μέσω της αναστολής από GTP, ενώ αντίθετα από το *GLUD1*, απαιτεί πολύ υψηλά επίπεδα ADP για αλλοεστερική ενεργοποίηση (Kanavouras et al., 2007). Αυτές οι ιδιαιτερότητες θεωρείται ότι είναι λειτουργικές προσαρμογές του *GLUD2* προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες για αξιοποίηση του γλουταμικού ως νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο.

Η πρωτεΐνη Gdh κωδικοποιείται από τα αντίστοιχα *GDH* γονίδια και στους μύκητες. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται από τη βιβλιογραφία ότι πρόκειται για ένα ένζυμο εξαρτώμενο από NADP⁺ το οποίο χρησιμοποιείται στο μονοπάτι αφομοίωσης της αμμωνίας. Στο σακχαρομύκητα (*S.cerevisiae*) το κύριο μονοπάτι αφομοίωσης της αμμωνίας χρησιμοποιεί την αναγωγική αμίνωση του α-KG σε γλουταμικό μέσω του ενζύμου Gdh σύμφωνα με την αντίδραση (2):



Εναλλακτικά στο *S.cerevisiae* το γλουταμικό μπορεί να παραχθεί με τρανσαμίνωση (Gogot reaction) όπου μια αμινομάδα της γλουταμίνης παρουσία του ενζύμου Gogot (Gogot; Glutamate oxoglutarate transamination), μεταφέρεται στο α-KG παράγοντας 2 μόρια γλουταμικού σύμφωνα με την αντίδραση (3) (Magasanik, 2003):



Στο σακχαρομύκητα έχουν βρεθεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν τη Gdh: το *GDH1* που υπάρχει στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, το *GDH2* που είναι αποκλειστικά μιτοχονδριακό και το *GDH3* που βρίσκεται στον πυρήνα και το μιτοχόνδριο

(www.yeastgenome.org). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το *GDH1* και το *GDH3* είναι παράλογα γονίδια με το *GDH3* να έχει προκύψει από διπλασιασμό του γονιδιώματος κατά τον εξελικτικό διαχωρισμό του *S.cerevisiae* από συγγενή είδη (Zangh & Kishino, 2004). Τα *GDH1* και *GDH3* συνθέτουν γλουταμικό από αμμωνία και α-KG, σε αντίθεση με το *GDH2* το οποίο αποικοδομεί το γλουταμικό στα πρόδρομα μόρια (Tang et al., 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι ο ρυθμός με τον οποίο χρησιμοποιείται το α-KG μεταξύ των *GDH1* και *GDH3* διαφέρει. Πιο συγκεκριμένα, το *GDH1* χρησιμοποιεί το α-KG με μεγαλύτερο ρυθμό καθώς είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του 90% της Gdh στο σακχαρομύκητα σε αντίθεση με το *GDH3* το οποίο φαίνεται εκφράζει μόνο μέρος της δραστηριότητας του ενζύμου (Avendano et al. 1997; De Luna et al., 2001). Ο γενικότερος ρόλος του *GDH3* φαίνεται να μην απόλυτα ξεκάθαρος αν και πρόσφατα μελέτη έδειξε τον πιθανό ρόλο του γονιδίου στην ανθεκτικότητα κατά της επαγόμενης από στρες απόπτωσης και στη γήρανση (Lee et al., 2012).

Η ίδια μελέτη έχει δείξει ότι τα επίπεδα της Gdh1 στο σακχαρομύκητα δεν είναι σταθερά σε όλη τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης παρόλο που το *GDH1* εκφράζεται υψηλά σε οποιαδήποτε πηγή άνθρακα (Lee et al., 2012). Μεταλλαγές που έγιναν σε συγκεκριμένες λυσίνες στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης έδειξαν οδηγεί σε συνεχώς ενεργή Gdh1 καθ' όλη τη φάση ανάπτυξης του σακχαρομύκητα. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η Gdh1 πρωτεΐνη παραμένει ενεργή μόνο στην εκθετική φάση γιατί κατά τη είσοδο των κυττάρων στην στατική φάση ανάπτυξης ενδεχομένως να αποικοδομείται. Ο πλεονασμός αυτών των δύο αναβολικών γονιδίων είναι ένας τρόπος για ισορροπημένη χρήση του α-KG κάτω από συνθήκες αναπνοής και ζύμωσης, καθώς η έκφρασή τους ρυθμίζεται έντονα από πηγές άνθρακα και αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, το *GDH3* επάγεται από αιθανόλη και καταστέλλεται από γλυκόζη σε αντίθεση με το *GDH1* το οποίο εκφράζεται υψηλά σε οποιαδήποτε πηγή άνθρακα (DeLuna et al., 2001). Κάτω από συνθήκες ζύμωσης η Gdh1 οδηγεί στη βιοσύνθεση του γλουταμικού ενώ κάτω από περιορισμένες πηγές άνθρακα και γενικότερα σε συνθήκες μη-ζύμωσης η Gdh3 είναι η κύρια ισομορφή η οποία εξισορροπεί την κατανομή του α-KG ανάμεσα στη βιοσύνθεση του γλουταμικού και το μεταβολισμό της ενέργειας.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής πρότασης είναι η αποσαφήνιση της λειτουργίας και του εξελικτικού ρόλου των *GDH* γονιδίων στον σακχαρομύκητα καθώς και η μελέτη της ενεργότητας και των πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της ανθρώπινης Gdh πρωτεΐνης μετά από ετερόλογη έκφραση της σε μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών *S. cerevisiae* ως προς το κύριο μονοπάτι σύνθεσης γλουταμικού (*gdhΔ* mutants)

Προκειμένου να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα ως προς τα κύρια γονίδια που σχετίζονται με τη σύνθεση και την αποδόμηση του γλουταμικού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής γενετικής δημιουργήθηκαν μονά (*gdh1Δ*, *gdh2Δ*, *gdh3Δ*) και διπλά (*gdh1,2Δ*, *gdh1,3Δ*, *gdh2,3Δ*) μεταλλάγματα σακχαρομύκητα ως προς τα γονίδια *GDH*, ενώ κρίθηκε σημαντική και η κατασκευή ενός ακόμη στελέχους όπου υπάρχει απαλοιφή και των τριών μορφών της ενδογενούς πρωτεΐνης Gdh (*gdh1,2,3Δ*).

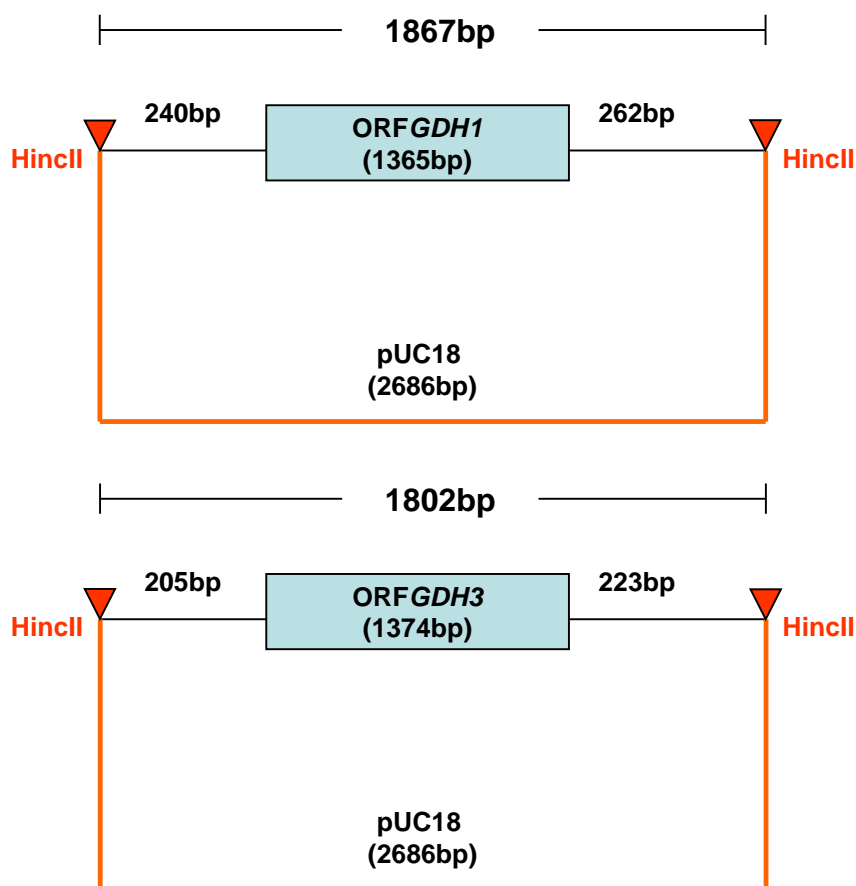
Αρχικά από τη συλλογή Yeast knockout strains της Open Biosystems (BY4742; **MAT- α** ; **his3Δ1**; **leu2Δ0**; **lys2Δ0**; **ura3Δ0**) επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε πιάτα πλούσιου μέσου (YPD), μονά μεταλλάγματα από τα οποία απουσίαζαν τα γονίδια *GDH1* (*gdh1Δ*), *GDH2* (*gdh2Δ*) και *GDH3* (*gdh3Δ*) αντίστοιχα. Στη συνέχεια έγιναν υγρές καλλιέργειες και απομονώθηκε γενωμικό DNA προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι απαλοιφές των γονιδίων και η αντικατάσταση τους από κασέτα ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη (*kanMX4*). Ο παραπάνω έλεγχος έγινε με τη χρήση PCR (small scale PCR), όπου χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινητές για κάθε ένα από τα 3 γονίδια καθώς και εκκινητές μέσα από το ORF της κασέτας της καναμυκίνης (πίνακας 1). Τα αναμενόμενα προϊόντα της PCR αναγράφονται στον πίνακα 2.

Γονίδιο/Κασέτα (bp)	Forward (Θέση: Αλληλουχία)	Reverse (Θέση: Αλληλουχία)
<i>GDH1</i> (1365 bp)	-240F: GCG TAA GAA GTA GCA GCA	+1627R: GGT GTC ACC TCG ATG CTT
<i>GDH2</i> (3279 bp)	-289F: GCC ACA ACA AGG AGC AAT	+3527R: AAT AAG AGC GCT TCC TGC
<i>GDH3</i> (1374 bp)	-205F: GTG ATG ACC ATG ATG CCT	+1597R: CGT AGC TAA CCA ATG CCA
kanamycin (1550bp)	+637F:	+157R:

Πίνακας 1. Οι εκκινητές για τα γονίδια *GDH* καθώς και για την κασέτα της καναμυκίνης.

2.1.α. Κλωνοποίηση των γονιδίων *GDH1* και *GDH3* στον πλασμιδιακό φορέα *pUC18*

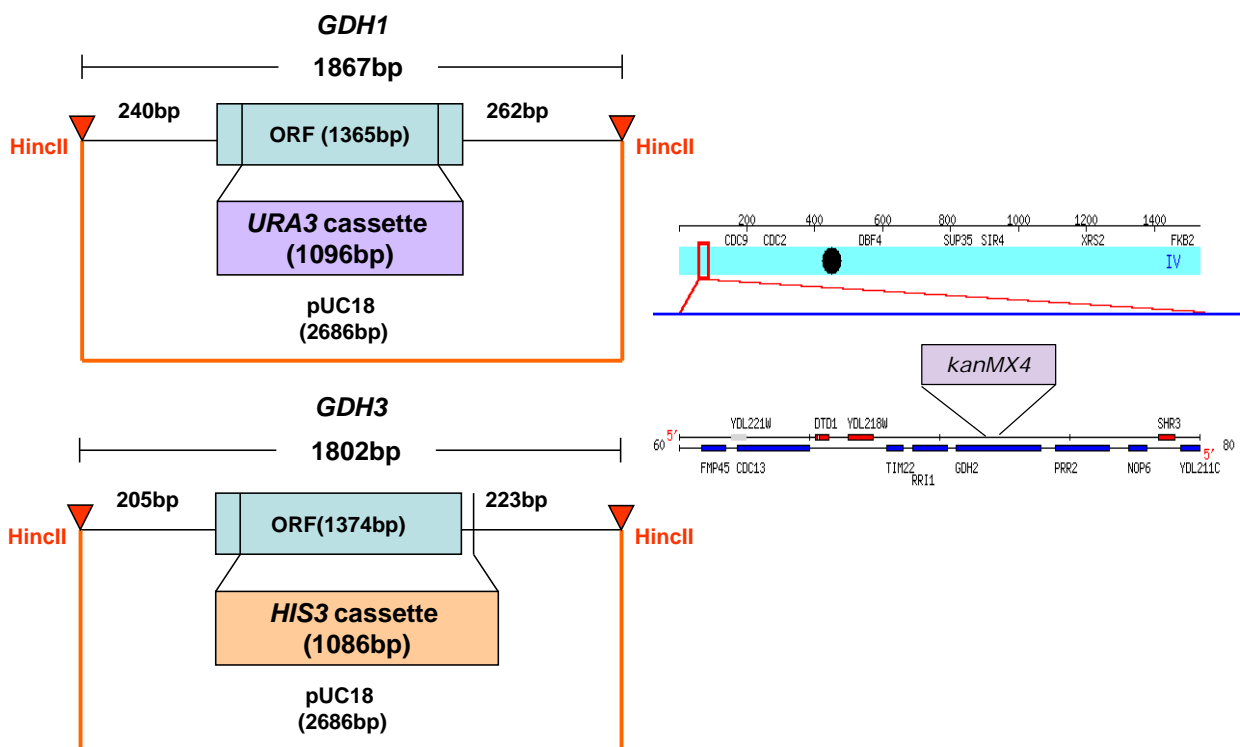
Το γονίδιο *GDH1* απομονώθηκε με PCR από αγρίου τύπου στέλεχος σακχαρομύκητα (BY4742 wt) και κλωνοποιήθηκε στο φορέα *pUC18* (σχήμα 1; Πίνακας 3). Το προϊόν της κλωνοποίησης μετασηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* (DH5a) και στη συνέχεια απλώθηκε σε πιάτα LB^{amp}. Από τα πιάτα επιλέχθηκαν αποικίες και έγιναν υγρές καλλιέργειες με σκοπό την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του βρασμού (boiling mini-preps). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων τα οποία κόβουν εκατέρωθεν από τη θέση κλωνοποίησης αλλά και μέσα στο γονίδιο (πίνακας 3). Αντίστοιχη διαδικασία έγινε και για το γονίδιο *GDH3* (σχήμα 1; πίνακας 3).



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της πλασμιδιακής κατασκευής *pUC18GDH1* (πάνω) και του *pUC18GDH3* (κάτω).

2.1.β.Εισαγωγή κασέτας *URA3* και *HIS3* στις κατασκευές *pUC18GDH1* και *pUC18GDH3*

Μετά την κλωνοποίηση και την επιβεβαίωση των κατασκευών *puc18GDH1* και *puc18GDH3* έγινε εισαγωγή της κασέτας των γονιδίων *URA3* (βιοσυνθετικό ένζυμο ουρακίλης) και *HIS3* (βιοσυνθετικό ένζυμο ισιδίνης) με αντικατάσταση της κωδικής περιοχής των *GDH1* και *GDH2* αντίστοιχα. Για την εισαγωγή της κασέτας *URA3* και *HIS3* αρχικά έγινε πέψη των πλασμιδίων *pUC18GDH1* και *pUC18GDH3* με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (πίνακας 3) και με κατάλληλη διαδικασία κλωνοποίησης δημιουργήθηκαν οι κατασκευές *puc18GDH1::URA3* και *puc18GDH3::HIS3* (disruption constructs). Οι κατασκευές *puc18GDH1::URA3* και *puc18GDH3::HIS3* στοχεύουν στην αντικατάσταση των *GDH1* και *GDH3* ORFs (σχήμα 2) ώστε σε επόμενο βήμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, να γίνει απαλοιφή των ενδογενών γονιδίων στον σακχαρομύκητα και να προκύψουν τα στελέχη με διπλή απαλοιφή αλλά και το στέλεχος με τριπλή απαλοιφή ως προς τα γονίδια *GDH*.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της απαλοιφής του γονιδίου *GDH1* (πάνω) και του *GDH3* (κάτω). Ενθεση της *URA3* και *HIS3* κασέτας αντίστοιχα και αντικατάσταση των κωδικών περιοχών *GDH1* και *GDH3*. Οι πλασμιδιακές κατασκευές απαλοιφής γραμμοποιήθηκαν και εισήχθησαν σε στέλεχος *gdh2Δ* (*his3Δ1*; *leu2Δ0*; *lys2Δ0*; *ura3Δ0*) προκειμένου να δημιουργηθούν το τριπλό και τα διπλά μεταλλάγματα. ORF: Open Reading Frame, κωδική περιοχή.

Ένζυμο	Θέση που κόβει στο πλασμίδιο/γονίδιο	Χρησιμοποιήθηκε για
HincII	pUC18 (MCS); 417	την κλωνοποίηση του <i>GDH1</i> & του <i>GDH3</i> στον φορέα puc18
HindIII	pUC18 (MCS); 399 / <i>GDH1</i> ; 264	την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του <i>GDH1</i> στον puc18
EcoRI	pUC18 (MCS); 450 / <i>GDH3</i> ; 1370	την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του <i>GDH1</i> & του <i>GDH3</i> στο φορέα
MfeI-HincII	<i>GDH1</i> ; 342 & 1365	την εισαγωγή της <i>URA3</i> κασέτας
AfeI- BglII	<i>GDH3</i> ; 439 & 1588	την εισαγωγή της <i>HIS3</i> κασέτας
SphI-EcoRI	puc18 <i>GDH1::URA3</i>	να γίνει γραμμικό το πλασμίδιο πριν τον ανασυνδυασμό
SphI-BamHI	puc18 <i>GDH::HIS3</i>	να γίνει γραμμικό το πλασμίδιο πριν τον ανασυνδυασμό

Πίνακας 3. Σύνοψη των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία και τον έλεγχο όλων των πλασμιδιακών κατασκευών.

Με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν στις παραπάνω ενότητες, προέκυψαν τα εξής επτά μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* ως προς το *GDH* μονοπάτι σύνθεσης του γλουταμικού:

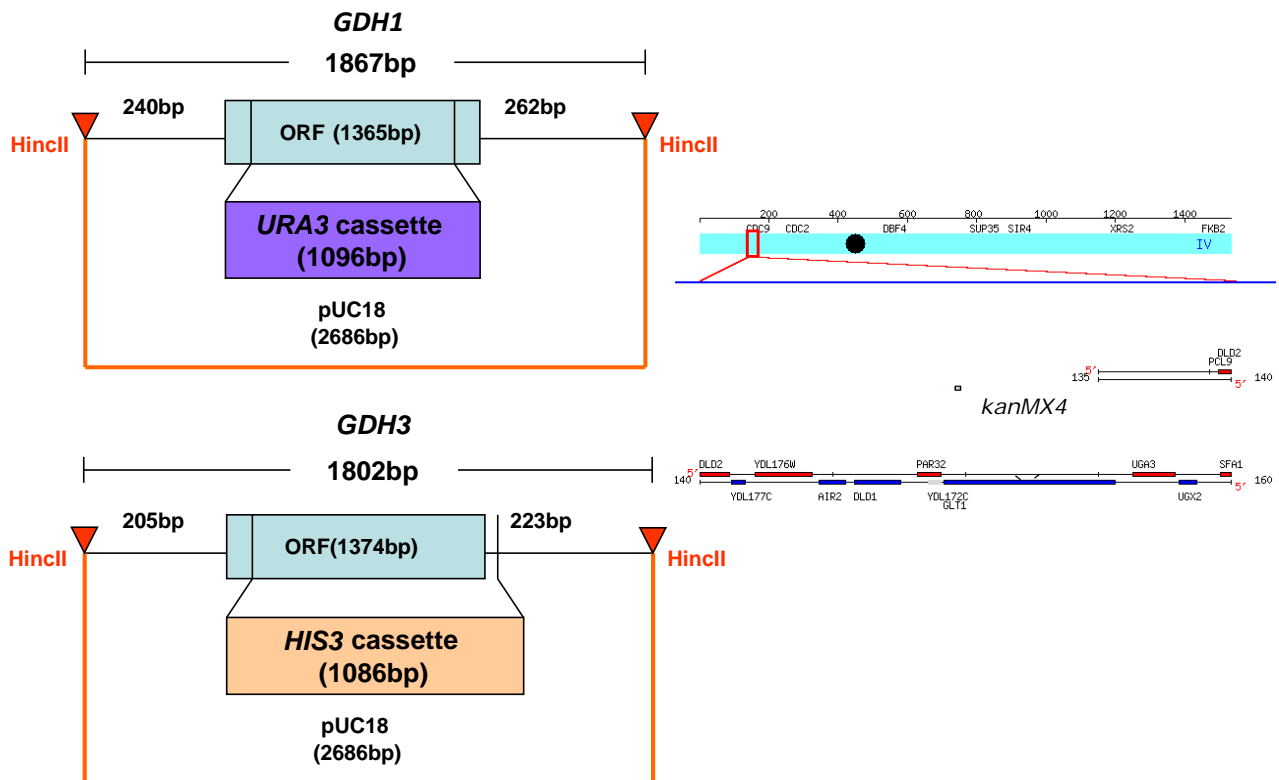
- *gdh1Δ*
- *gdh2Δ*
- *gdh3Δ*
- *gdh1,2Δ*
- *gdh1,3Δ*
- *gdh2,3Δ*
- *gdh1,2,3Δ*

2.2. Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών *S. cerevisiae* ως προς το εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης γλουταμικού (μεταλλάγματα απαλοιφής *glt1gdhΔ*)

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η σύνθεση του γλουταμικού στο σακχαρομύκητα πραγματοποιείται εναλλακτικά και μέσω του μονοπατιού της γλουταμίνης. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, η εναλλακτική σύνθεση του γλουταμικού στο σακχαρομύκητα απαιτεί τη μεσολάβηση του ενζύμου GOGAT που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLT1*.

Για το λόγο αυτό, συμπληρωματικά ως προς τα παραπάνω, δημιουργήθηκαν διπλά και ένα τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος σακχαρομύκητα όπου απουσιάζουν τα γονίδια τόσο του κύριου (*gdhΔ*) όσο και του εναλλακτικού μονοπατιού (*glt1Δ*) της σύνθεσης του γλουταμικού.

Για τη δημιουργία των συγκεκριμένων στελεχών, επιλέχθηκε αρχικά από τη συλλογή Yeast knockout strains της Open Biosystems (BY4742; **MAT-α**; **his3Δ1**; **leu2Δ0**; **lys2Δ0**; **ura3Δ0**) το μεταλλαγμένο στέλεχος *glt1Δ*, το οποίο όπως και στην περίπτωση των *gdhΔ* μεταλλαγμάτων επιβεβαιώθηκε με PCR. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τα disruption constructs στα πλασμίδια *ruc18GDH1::URA3* και *ruc18GDH3::HIS3* πραγματοποιήθηκε ομόλογος ανασυνδυασμός στο στέλεχος *glt1Δ* προκειμένου να αντικατασταθούν τα ενδογενή γονίδια *GDH1* και *GDH3* (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της απαλοιφής των γονιδίων του κύριου και του εναλλακτικού μονοπατιού της σύνθεσης του γλουταμικού. Οι κατασκευές απαλοιφής χρησιμοποιήθηκαν στο στέλεχος *glt1Δ* όπου και προέκυψαν το τριπλό και τα διπλά μεταλλάγματα.

Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν τα εξής 4 μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae*:

- ***glt1Δ***
- ***glt1gdh1Δ***
- ***glt1gdh3Δ***
- ***glt1gdh1gdh3Δ***

2.3. Κλωνοποίηση των γονιδίων *GDH1* και *GDH3* σε κατάλληλους φορείς σακχαρομύκητα (yeast vectors) και δημιουργία και του σημειακά μεταλλαγμένου *GDH1**

2.3.α. Κλωνοποίηση των *GDH1* και *GDH3* στους φορείς pRS315 και pRS316 (single copy-centromeric yeast vectors)

Τα γονίδια *GDH1* και *GDH3* απομονώθηκαν από τις πλασμιδιακές κατασκευές puc18*GDH1* και puc18*GDH3* και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους φορείς σακχαρομύκητα (yeast vectors) προκειμένου να μελετηθεί αναλυτικότερα ο ρόλος τους. Πιο συγκεκριμένα τα επιθυμητά κομμάτια απομονώθηκαν από τις κατασκευές puc18*GDH1* και puc18*GDH3* με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων (πίνακας 4) και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pRS315 που εκφράζει το γονίδιο *LEU2* (βιοσυνθετικό ένζυμο λευκίνης). Με αντίστοιχο τρόπο κλωνοποιήθηκε το κομμάτι του *GDH3* στον φορέα pRS316 που εκφράζει το γονίδιο *HIS3* (βιοσυνθετικό ένζυμο ιστιδίνης). Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν οι κατασκευές pRS135*GDH1*, pRS315*GDH3* και pRS316*GDH3* οι οποίες εισήχθησαν σε κάποια από τα μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Ένζυμο	Χρησιμοποιήθηκαν για
BamHI-PstI	Διπλή πέψη του φορέα pRS315
BamHI-PstI	Διπλή πέψη των κομματιών <i>GDH1</i> και <i>GDH3</i>
BamHI-HindIII	Διπλή πέψη του φορέα pRS316
BamHI-HindIII	Διπλή πέψη του κομματιού <i>GDH3</i>

Πίνακας 4. Ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της κλωνοποίησης στους φορείς pRS315 και pRS316.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μεταλλαξιγένεση μέσω PCR στην κατασκευή pRS135*GDH1* που ως αποτέλεσμα είχε τη σημειακή υποκατάσταση της λυσίνης 426 σε αλανίνη (K426A) στο C-άκρο του γονιδίου *GDH1* (pRS315*GDH1**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η λυσίνη 426 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Gdh1 και σημειακή υποκατάστασή της σε αλανίνη οδηγεί σε συνεχώς ενεργή πρωτεΐνη (Lee et al., 2012). Η μεταλλαξιγένεση έγινε χρησιμοποιώντας Pfu polymerase ακολουθώντας αντίστοιχο πρωτόκολλο μεταλλαξιγένεσης που χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη πολυμεράση (Pfu DNA Polymerase, AKP PPI 9PIM774 Promega). Οι εκκινητές δίνονται στον πίνακα 5.

Γονίδιο/θέση	Εκκινητές	Primer426(sense)
<i>GDH1</i> /(K426A)	ACC AAA GAT GGC AAG AC CGC ACC GTC CTT AGT GTA CTT CT	AGA AGT ACA CTA AGG ACG GT GCG GTC TTG CCA TCT TTG GT

Πίνακας 5. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταλλαξιγένεση. Με τα έντονα γράμματα φαίνεται η σημειακή μεταλλαγή Lys→Ala που ενσωματώθηκε στους εκκινητές.

2.3.β. Κλωνοποίηση των γονιδίων *GDH1* και *GDH3* στο φορέα pYX142 (single copy-centromeric expression yeast vector)

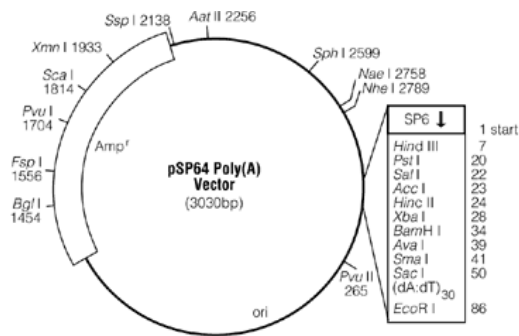
Παράλληλα με τα παραπάνω, PCR τμήματα (πίνακας 6) των γονιδίων *GDH1* και *GDH3*, που απομονώθηκαν από αγρίου τύπου στελέχη σακχαρομύκητα, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pYX142/(EcoRI)-SmaI που εκφράζει το γονίδιο *LEU2* (βιοσυνθετικό ένζυμο λευκίνης). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει υποκινητή συστατικής έκφρασης (*TPI1* constitutive promoter), με αποτέλεσμα να εκφράζονται σταθερά υψηλά επίπεδα RNA/πρωτεΐνης, ενώ φέρει επίσης και επίτοπο HA (HA-Tag) που βοηθά στην ανίχνευση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης μέσω δοκιμασίας Western. Τα PCR κομμάτια *GDH* κλωνοποιήθηκαν έτσι ώστε να είναι κάτω από το συστατικό υποκινητή *TPI1* και στη συνέχεια εισήχθησαν αρχικά σε στελέχη αγρίου τύπου προκειμένου να ελεγχθεί με δοκιμασία Western η έκφραση της πρωτεΐνης και εν συνεχεία σε μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της υπερέκφρασης των *GDH1* και *GDH3* γονιδίων στο σακχαρομύκητα.

Γονίδιο	Εκκινητές
<i>GDH1</i>	<i>GDH1</i> BamHI(For): GCGGA TCC ATG TCA GAG CCA GAA TTT CA <i>GDH1</i> Sma(Rev): GGG AAA TAC ATC ACC TTG GTC
<i>GDH3</i>	<i>GDH3</i> BamHI(For): CGCGGA TCC ATG ACA AGC GAA CCA GAG TT <i>GDH3</i> Sma(Rev): GGG AAA AAC GTC TCC CTG GTC

Πίνακας 6. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των κομματιών *GDH* από γενωμικό DNA. Με έντονα γράμματα φαίνονται τα νουκλεοτίδια αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την κλωνοποίηση των κομματιών στον φορέα pYX142.

2.4 *In vitro* μεταγραφή-μετάφραση των γονιδίων *GDH1* και *GDH3* και *in organello* πειράματα εισαγωγής των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια του *S.cerevisiae*

Το γονίδια *GDH1* και *GDH3* κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pSP64 (σχήμα 4) προκειμένου να παραχθούν *in vitro* οι αντίστοιχες πρωτεΐνες και να γίνουν πειράματα εισαγωγής τους σε μιτοχόνδρια του *S. cerevisiae* (*in organello*). Τα γονίδια απομονώθηκαν με PCR από αγρίου τύπου στελέχη και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pSP64 με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (πίνακας 7). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή-μετάφραση (TNT SP6 Quick coupled translation/transcription system; promega) των *GDH* ORFs και έλεγχος με τη χρήση ραδιοσημασμένης μεθειονίνης (³⁵S Met) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών Gdh.

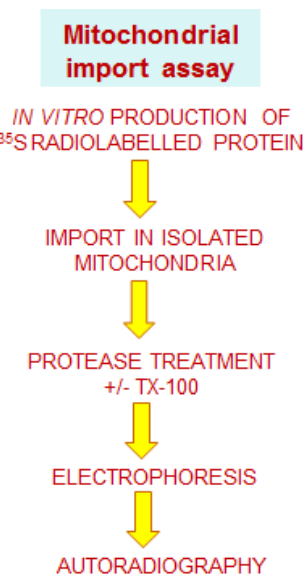


Σχήμα 4. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pSP64.

Γονίδιο	Εκκινητές
GDH1	GDH1BamHI(For): GCGGA TCC ATG TCA GAG CCA GAA TTT CA
	GDH1EcoRI(Rev): GGG AAA TAC ATC ACC TTG GTC
GDH3	GDH3BamHI(For): CGCGGA TCC ATG ACA AGC GAA CCA GAG TT
	GDH3BamHI(Rev): GGG AAA AAC GTC TCC CTG GTC

Πίνακας 7. Οι εκκινητές και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των κομματιών GDH στο φορέα pSP64.

Μετά την επιβεβαίωση της σύνθεσης, ακολούθησαν πειράματα εισαγωγής των πρωτεϊνών Gdh σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο σχήμα 5. Τα πειράματα αφορούσαν εισαγωγή των πρωτεϊνών τόσο στη φυσική τους μορφή (nature conditions) όσο και μετά την αποδιάταξή τους (denature conditions) που γίνεται με ουρία.



Σχήμα 5. Απεικόνιση της *in vitro* διαδικασίας εισόδου (import) πρωτεϊνών σε μιτοχόνδρια κυττάρων *S. cerevisiae*.

2.5 Κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου *GLUD1* στο φορέα pYX142

Στο φορέα σακχαρομύκητα pYX142 (σχήμα 6) κλωνοποιήθηκε επίσης και το ορθόλογο γονίδιο *GLUD1* που εκφράζει τη γλουταμική δεϋδρογονάση (hGDH) στα

θηλαστικά. Η παραπάνω κλωνοποίηση έγινε σταδιακά κλωνοποιώντας αρχικά το *GLUD1* στον πλασμιδιακό φορέα Bluescript (bpt) και μετά στον pYX142. Πιο συγκεκριμένα, λόγω δυσκολίας στην απομόνωση ολόκληρου του *GLUD1*, τα τελευταία οχτώ αμινοξέα (8aa) του C-άκρου του γονιδίου συντέθηκαν με υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων (double strand – ds- oligo annealing; Ausubel et al., 2003) και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα bpt (bpt+8aa) (πίνακας 8.α.). Στην κατασκευή bpt+8aa κλωνοποιήθηκε με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και το υπόλοιπο τμήμα του *GLUD1* που απομονώθηκε από το φορέα pSP64*GLUD1* (πίνακας 8.β.). Με τις παραπάνω διαδοχικές κλωνοποιήσεις προέκυψε η κατασκευή bpt*GLUD1* από όπου και απομονώθηκε ολόκληρο το *GLUD1* (πίνακας 8.β.; Manrothalassitis et al., 1987), το οποίο και κλωνοποιήθηκε τελικά στο φορέα pYX142.

Αναφορικά με τη διαδικασία του ds oligo annealing θα πρέπει να αναφερθεί ότι μια συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε oligo strand (50μg) διαλύθηκε σε 300μl Tris pH8 (10mM) και NaCl (0.2M) και τοποθετήθηκε στους 100°C για 5 min και μετά στο Tm ($\pm 2-3^{\circ}\text{C}$) των ολιγονουκλεοτιδίων O/N. Την επομένη, επιτράπηκε προοδευτική πτώση της θερμοκρασίας από το Tm των ολιγονουκλεοτιδίων σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ακολούθησε Φ/CHCl₃, κατακρήμνιση με EtOH και επαναδιάλυση σε ddH₂O. Η εξίσωση υπολογισμού του Tm δίνεται από τον παρακάτω τύπο (Ausubel et al., 2003):

$$T_m^* = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.4(\%GC) - 600/N$$

[Na⁺]=0.2M

16.6(log[Na⁺]) = -11.6

N: σύνολο νουκλεοτιδίων

	Εκκινητές για ds ολιγονουκλεοτίδια
GLUD18aaFor	5' TCT TCA AAG TGT ACA ATG AAG CTG GTG TGA CCT TCA CAC CCG GGT ATC CCGT ATG ATG TGC CTG ACT ACG CAT GAT ATC 3'
GLUD18aaRev	5' TCG AGA TAT CAT GCG TAG TCA GGC ACA TCA TAC GGA TAC CCG GGT GTG AAG GTC ACA CCA GCT TCA TTG TAC ACT TTG AAG A 3'

Πίνακας 8.α. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της υβριδοποίησης.

Ένζυμο	Χρησιμοποιήθηκαν για
EcoRV-XhoI	Διπλή πέψη του φορέα bpt προκειμένου να κλωνοποιηθούν τα 8aa του <i>GLUD1</i> που δημιουργήθηκαν με ds annealing
MscI-BsrGI	Απομόνωση του <i>GLUD1</i> από το φορέα pSP64 <i>GLUD1</i>
(EcoRI)-BsrGI	Διπλή πέψη του φορέα bpt+8aa προκειμένου να κλωνοποιηθεί το κομμάτι <i>GLUD1</i> που απομονώθηκε από το pSP64 <i>GLUD1</i>
EcoRI-XhoI	Απομόνωση ολόκληρου του <i>GLUD1</i> από το φορέα bpt <i>GLUD1</i>
EcoRI-XhoI	Διπλή πέψη του φορέα σακχαρομύκητα pYX142 προκειμένου να κλωνοποιηθεί το <i>GLUD1</i> που απομονώθηκε από φορέα bpt <i>GLUD1</i>

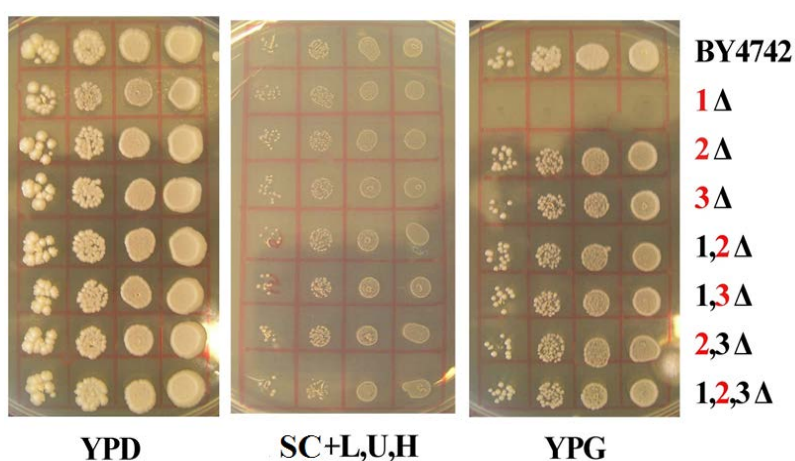
Πίνακας 8.β. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαδοχικές κλωνοποιήσεις του *GLUD1*.

3. Αποτελέσματα

3.1 Η απαλοιφή των γονιδίων του κυρίου μονοπατιού σύνθεσης του γλουταμικού (*GDH pathway*) δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των στελεχών *gdhΔ* σε διαφορετικές πηγές άνθρακα

Τα μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* ως προς το κύριο μονοπάτι σύνθεσης γλουταμικού καλλιεργήθηκαν σε πιάτα όπου υπήρχε στο στερεό θρεπτικό μέσο διαφορετική πηγή άνθρακα (Sambrook et al., 1989). Η επιλογή των διαφορετικών μέσων ανάπτυξης έγινε προκειμένου να διερευνηθεί αν η απαλοιφή των γονιδίων *GDH* εμφανίζει κάποιο φαινότυπο σε πηγές άνθρακες που επάγουν τη ζύμωση (γλυκόζη; $C_6H_{12}O_6$) ή αντίστοιχα την αναπνοή (γλυκερόλη; $C_3H_8O_3$). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στον *S. cerevisiae* υπάρχει ένα γονίδιο *GDH* που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα (*GDH2*) καθώς και ένα το οποίο εισάγεται στο μιτοχόνδριο υπό συνθήκες (*GDH3*).

Όλα τα *gdhΔ* στελέχη (*gdh1Δ*, *gdh2Δ*, *gdh3Δ*, *gdh1,2Δ*, *gdh2,3Δ*, *gdh1,3Δ*; *gdh1,2,3Δ*) αναπτύχθηκαν σε πλούσιο (YPD) και σε συνθετικό (SC+aa+uracil) μέσο γλυκόζης, καθώς και σε πλούσιο μέσο γλυκερόλης (YPG). Όπως φαίνεται από την εικόνα 4, δεν υπάρχουν αισθητές διαφορές στην ανάπτυξη μεταξύ των στελεχών *gdhΔ*. Επίσης, η ανάπτυξη των μονών, διπλών αλλά και του τριπλού μεταλλάγματος δε φαίνεται να επηρεάζεται από το διαφορετικό μέσο καλλιέργειας. Η αδυναμία ανάπτυξης του *gdh1Δ* σε YPG, αποδίδεται σε ενδεχόμενη δυσλειτουργία/μεταλλαγή που φέρει το στέλεχος της βιβλιοθήκης σε μιτοχονδριακό γονίδιο (π.χ. *ALD4*-μιτοχονδριακή αλδεϋδική αφυδρογονάση που βρίσκεται δίπλα στο *GDH1* και πιθανόν επηρεάζεται η λειτουργία του από την απαλοιφή του *GDH1*).

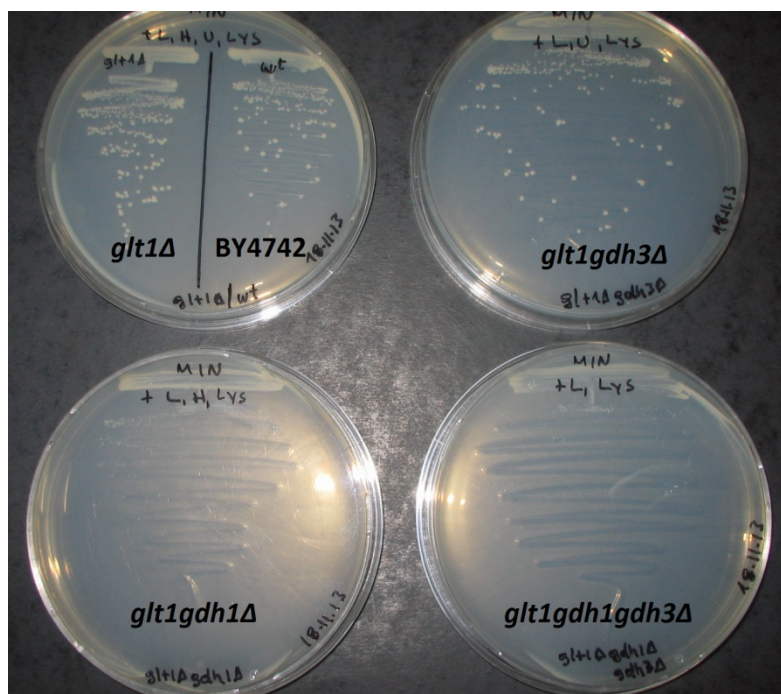


Εικόνα 4. Δοκιμασία ανάπτυξης των στελεχών *gdhΔ* σε διαφορετικές πηγές άνθρακα για αναζήτηση φαινοτύπου. Από αριστερά προς τα δεξιά: πλούσιο μέσο ανάπτυξης με γλυκόζη (YPD), συνθετικό μέσο ανάπτυξης με γλυκόζη (παροχή των απαραίτητων αμινοξέων λευκίνη και ιστιδίνη και του νουκλεοτιδίου ουρακίλη) (SC+aa+uracil), και πλούσιο μέσο ανάπτυξης με γλυκερόλη (YPG). Με κόκκινο σημαίνονται τα στελέχη από τη συλλογή απλών knockouts της Open Biosystems, πάνω στα οποία έγιναν τα διπλά και το τριπλό μεταλλάγματα.

3.2 Η απαλοιφή των γονιδίων του εναλλακτικού (Gogat pathway) και του κύριου μονοπατιού σύνθεσης γλουταμικού οδηγεί σε αναπτυξιακή ανεπάρκεια του σακχαρομόκητα σε φτωχό (minimal) μέσο καλλιέργειας

Αντίστοιχο πείραμα με το παραπάνω έγινε και στα στελέχη όπου απουσίαζε τόσο το κύριο όσο και το εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης του γλουταμικού (*glt1gdhΔ*). Στην περίπτωση αυτή τα στελέχη ελέγχθηκαν εξ αρχής σε φτωχό μέσο γλυκόζης (minimal) όπου ως πηγή αζώτου είχε μόνοθειικό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄] που αποτελεί το κύριο ανόργανο άλας σε όλα τα μέσα ανάπτυξης στον *S. cerevisiae*. Η επιλογή φτωχού μέσου γλυκόζης με ταυτόχρονη απουσία αζώτου έγινε προκειμένου να αποφευχθεί ο καταβολισμός αμινοξέων, όπως είναι η προλίνη και η αργινίνη, που παρέχονται φυσιολογικά στο θρεπτικό αλλά που μέσω εναλλακτικών μονοπατιών οδηγούν στη σύνθεση γλουταμικού.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 5, σε φτωχό μέσο καλλιέργειας, στελέχη στα οποία απουσιάζουν τα γονίδια *GDH1* και *GLT1* (*glt1gdh1Δ*, *glt1gdh1gdh3Δ*) αδυνατούν να μεγαλώσουν κάτω από συνθήκες περιορισμένου αζώτου. Αντίθετα με τα *glt1gdh1Δ*, στελέχη στα οποία απουσιάζουν τα γονίδια *GDH3* και *GLT1* (*glt1gdh3Δ*), αναπτύσσονται κανονικά υποδηλώνοντας τη σημασία του *GDH1* γονιδίου στη σύνθεση του γλουταμικού σε συνθήκες ζύμωσης. Η ανάπτυξη των συγκεκριμένων στελεχών σε αντίστοιχο φτωχό μέσο γλυκερόλης ή γαλακτικού οξέος που επάγουν την αναπνοή δεν ήταν εφικτή.

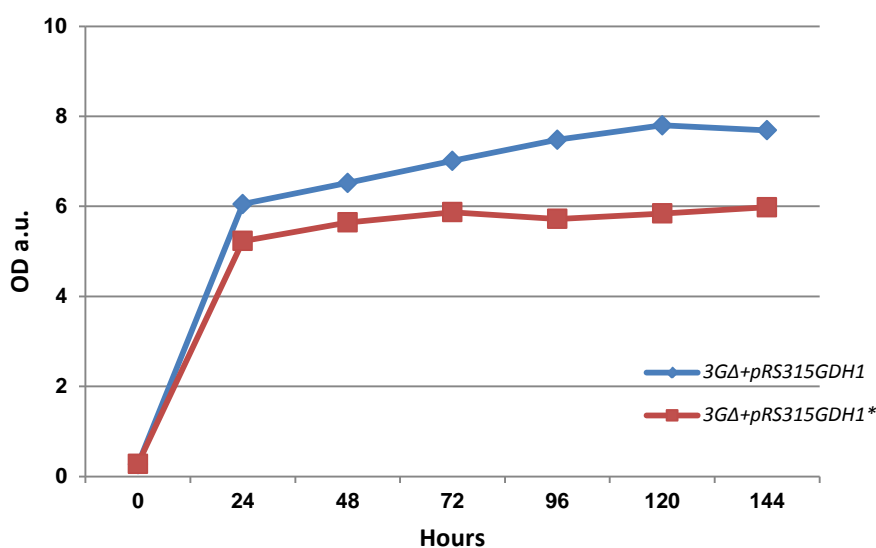


Εικόνα 5. Δοκιμασία ανάπτυξης των στελεχών *glt1Δ* και *glt1gdhΔ* σε φτωχό (minimal) στερεό θρεπτικό μέσο παρουσία γλυκόζης.

3.3 Στελέχη σακχαρομύκητα που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Gdh1* εμφανίζουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με στελέχη που εκφράζουν την αγρίου τύπου πρωτεΐνη

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της Gdh1 στο σακχαρομύκητα δεν είναι σταθερά σε όλη τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας παρόλο που το *GDH1* εκφράζεται υψηλά σε οποιαδήποτε πηγή άνθρακα (Lee et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, η Gdh1 εκφράζεται κατά την εκθετική φάση (0-24hr) ενώ κατά τη στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων (>48hr) απουσιάζει. Σημειακή υποκατάσταση της λυσίνης 426 σε αλανίνη (K426A) οδηγεί σε συνεχώς ενεργή Gdh1 καθ' όλη τη φάση ανάπτυξης του σακχαρομύκητα. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η Gdh1 πρωτεΐνη παραμένει ενεργή μόνο στην εκθετική φάση καθώς κατά τη είσοδο των κυττάρων στην στατική φάση ανάπτυξης, φαίνεται ότι αποικοδομείται μέσω ουβικουιτινιλίωσης, χωρίς όμως να αποσαφηνίζεται ο ρόλος αυτής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης καθώς και η ρύθμισή της.

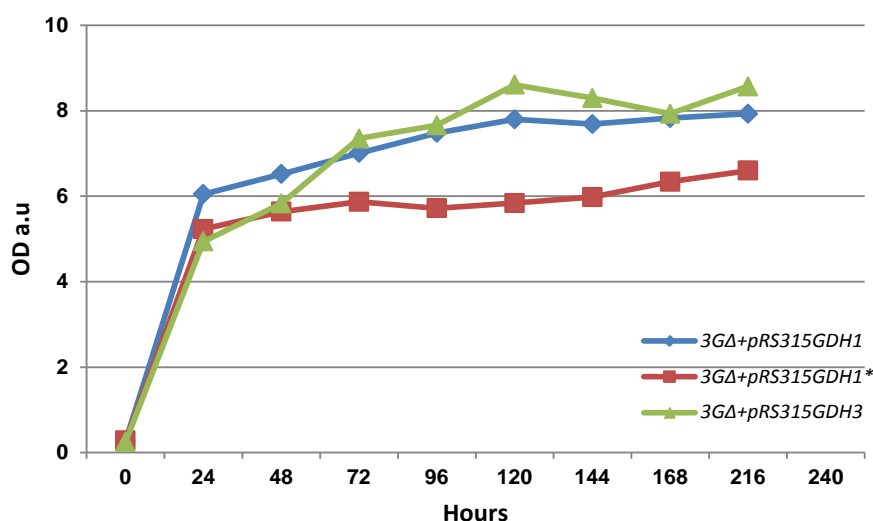
Η κατασκευή στην οποία έγινε η σημειακή υποκατάσταση K426A (pRS315GDH1*) εισήχθη στο τριπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *glt1gdh1gdh3Δ* προκειμένου να ελεγχθεί ο ρόλος της συνεχώς ενεργής πρωτεΐνης Gdh1 στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Όπως φαίνεται από το γράφημα 1.α., η μεταλλαγμένη Gdh1 (Gdh1*) προκαλεί ελλειμματική ανάπτυξη συγκριτικά με την αντίστοιχη αγρίου τύπου Gdh1. Πιο συγκεκριμένα, όταν το στέλεχος *glt1gdh1gdh3Δ* αναπτύσσεται σε minimal μέσο γλυκόζης και εκφράζει την πρωτεΐνη Gdh1* εμφανίζει ρυθμό ανάπτυξης μειωμένο κατά 20% συγκριτικά με το στέλεχος *glt1gdh1gdh3Δ* (**3GD**) που αναπτύσσεται στο ίδιο μέσο καλλιέργειας αλλά εκφράζει την αγρίου τύπου Gdh1. Η διαφορά αυτή φαίνεται εντονότερα κατά το πέρασμα των κυττάρων από την εκθετική φάση στη στατική όπου έχει ξεκινήσει ήδη ο μεταβολισμός μίγματος γλυκόζης/αιθανόλης (diauxic shift).



Γράφημα 1.α. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών 3GD+pRS315GDH1 και 3GD+pRS315GDH1*.

3.4 Τα επίπεδα έκφρασης της *Gdh3* επηρεάζουν την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα σε συνθήκες καλλιέργειας σε φτωχό μέσο γλυκόζης

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης *Gdh3* στο στέλεχος *3GD*. Όπως φαίνεται από το γράφημα 1.β. κατά την εκθετική φάση, η ανάπτυξη των στελεχών που εκφράζουν την πρωτεΐνη *Gdh3* είναι χαμηλότερη κατά 10-20% συγκριτικά με τα επίπεδα ανάπτυξης που έχουν τα στελέχη που εκφράζουν την αγρίου τύπου *Gdh1*. Επίσης, τα συγκεκριμένα στελέχη παρουσιάζουν ρυθμό ανάπτυξης όμοιο με τον αντίστοιχο που εμφανίζουν τα στελέχη που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη *Gdh1* (*Gdh1**). Αντίθετα, αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του στελέχους που εκφράζει τη *Gdh3* κατά 30%, και διαφοροποίηση από τα στελέχη *Gdh1* και *Gdh1** παρατηρείται μετά τις 48 ώρες καλλιέργειας όπου τα κύτταρα περνούν από την εκθετική στη στατική φάση ανάπτυξης.



Γράφημα 1.β. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών *3GD+pRS315GDH1*, *3GD+pRS315GDH1** και *3GD+pRS315GDH3*.

Η ομοιότητα που παρατηρείται στα επίπεδα ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών *3GD+pRS315GDH3* και *3GD+pRS315GDH1** κατά την εκθετική φάση της καλλιέργειας αποδίδεται σε διαφορετικούς λόγους σε κάθε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του στελέχους *3GD+pRS315GDH1** εμφανίζεται μειωμένη συγκριτικά με τα στελέχη που εκφράζουν την αγρίου τύπου *Gdh1* καθώς φαίνεται να επηρεάζεται από το γεγονός ότι η πρωτεΐνη *Gdh1** είναι συνεχώς ενεργή. Αντίθετα, η μειωμένη ανάπτυξη του στελέχους *3GD+pRS315GDH3* συγκριτικά με το στέλεχος που εκφράζει την αγρίου τύπου *Gdh1* πιθανόν να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα της *Gdh3* καθώς η μεταγραφή του *GDH3* επάγεται από αιθανόλη, διαδικασία που ενεργοποιείται μετά τις 48hr καλλιέργειας.

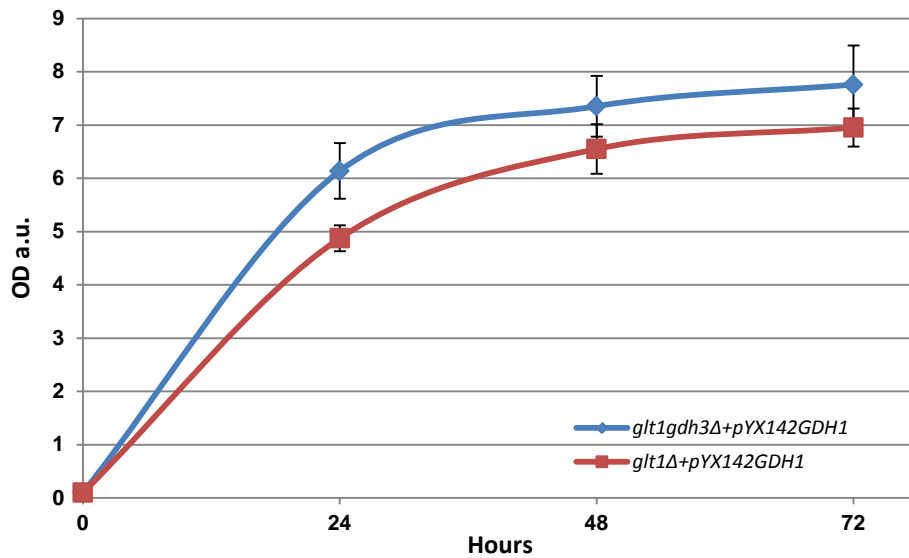
3.5 Υπερέκφραση της *Gdh1* και παράλληλη παρουσία της ενδογενούς *Gdh3* πρωτεΐνης οδηγεί σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης στελεχών σακχαρομύκητα

Ένας άλλος τρόπος αποσαφήνισης του ρόλου των πρωτεϊνών *Gdh* στον *S. cerevisiae* έγινε μέσω της συστατικής υπερέκφρασης της *Gdh1* με τη χρήση κατάλληλου φορέα σακχαρομύκητα (expression *TPI1* yeast vector). Πιο συγκεκριμένα, η κατασκευή *pYX142GDH1* εισήχθη στο στέλεχος *glt1Δ* καθώς και στο διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *glt1gdh3Δ* και καταγράφηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων παρουσία ραφινόζης ως πηγή άνθρακα. Η ραφινόζη είναι ένας τρισακχαρίτης που αποτελείται από γαλακτόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη και θεωρείται ότι προκαλεί ζύμωση ενώ ενεργοποιεί παράλληλα και την αναπνοή (Randez-Gil et al., 1998). Υπερέκφραση της *Gdh1* σε στελέχη όπου υπάρχει (*glt1Δ*) ή απουσιάζει (*glt1gdh3Δ*) η ενδογενής πρωτεΐνη *Gdh3* και ανάπτυξη σε ραφινόζη μπορεί ενδεχομένως να εξηγήσει το λόγο για τον οποίο οι δύο πρωτεΐνες δεν συνυπάρχουν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του σακχαρομύκητα.

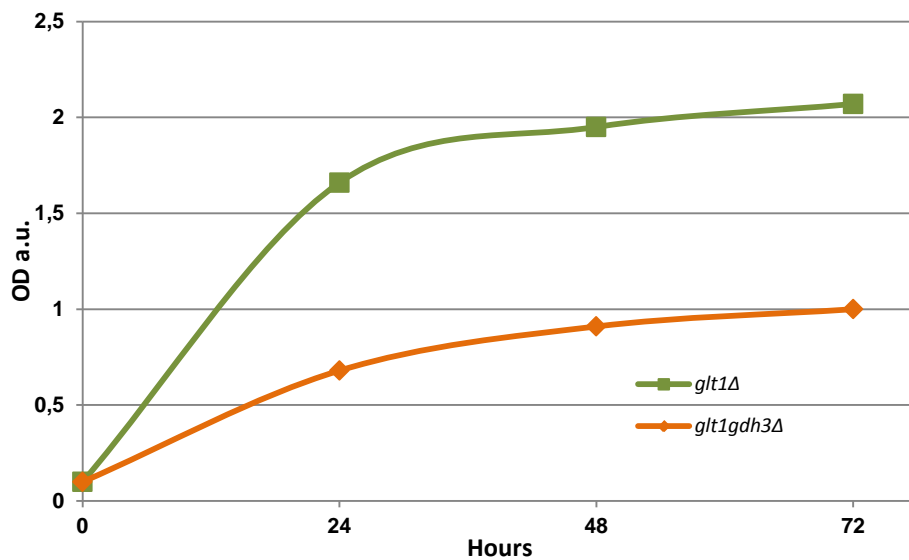
Από το γράφημα 2.α. φαίνεται ότι, στο στέλεχος όπου υπερέκφράζεται η *Gdh1* ενώ υπάρχει και η ενδογενής *Gdh3* (*glt1Δ+pYX142GDH1*), η ανάπτυξη είναι μειωμένη κατά 20% συγκριτικά με το στέλεχος όπου η *Gdh3* απουσιάζει. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στις περιπτώσεις όπου εκφράζονται οι ενδογενείς μορφές των πρωτεϊνών *Gdh*, τα αποτελέσματα φαίνονται να είναι αντίστροφα. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *glt1gdh3Δ*, στο οποίο εκφράζεται μόνο η ενδογενής *Gdh1* εμφανίζει μειωμένη ανάπτυξη κατά 40% συγκριτικά με το στέλεχος *glt1Δ* όπου εκφράζονται και οι δύο ενδογενείς πρωτεΐνες (γράφημα 2.β.). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα επίπεδα της *Gdh1* είναι περιορισμένα σε συνθήκες αναπνοής λόγω αποδόμησης της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με τη *Gdh3* πρωτεΐνη η οποία όπως αναφέρθηκε αρχίζει να εμφανίζει αυξημένα επίπεδα σε συνθήκες diauxic shift.

Όπως αναφέρθηκε η ραφινόζη είναι ένα μέσο ανάπτυξης που επάγει τη ζύμωση αλλά και την αναπνοή, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η συνύπαρξη των πρωτεϊνών *Gdh* κάτι που στη περίπτωση της γλυκόζης δεν θα ήταν εφικτό. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι υπερέκφρασμένη *Gdh1* παράλληλα με την ενδογενή *Gdh3* οδηγούν σε μείωση της ανάπτυξης των στελεχών γεγονός που συμφωνεί με την υπόθεση ότι η *Gdh1* υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αποικοδομείται όταν επάγεται η *Gdh3*. Επίσης εξηγείται και η σημασία της *Gdh3* στην επιβίωση των στελεχών σε συνθήκες αναπνοής όταν απουσιάζει το εναλλακτικό μονοπάτι της σύνθεσης του γλουταμικού (*glt1Δ*) ενώ υπάρχει ενεργή η ισομορφή της πρωτεΐνης η οποία όμως

εμφανίζει τη μέγιστη ενεργότητα της σε συνθήκες αποκλειστικής ζύμωσης (Gdh1) και όχι σε συνθήκες ζύμωσης/αναπνοής που προκαλεί η ραφινόζη.



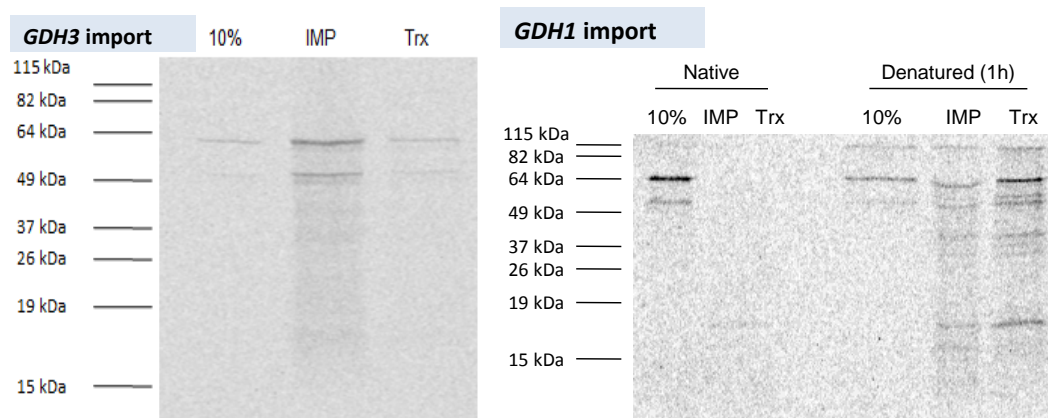
Γράφημα 2.α. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών που υπερεκφράζουν την Gdh1 παρουσία (*glt1Δ+pYX142GDH1*) ή απουσία (*glt1gdh3Δ+pYX142GDH1*) της ενδογενούς Gdh3 παρουσία ραφινόζης.



Γράφημα 2.β. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών που εκφράζουν τις ενδογενείς πρωτεΐνες Gdh1 και Gdh3 παρουσία ραφινόζης.

3.6 Η Gdh3 εισάγεται *in vitro* στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ORFs των γονιδίων *GDH1* και *GDH3* κλωνοποιήθηκαν στο πλασμιδιακό φορέα rSP64 που φέρει τον υποκινητή της SP6 πολυμεράσης. Τα *in vitro* πειράματα εισαγωγής των πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι, η πρωτεΐνη Gdh3 εισάγεται στα μιτοχόνδρια στη φυσική της μορφής (σχήμα 6).



Σχήμα 6. Πειράματα εισαγωγής της πρωτεΐνης Gdh3 (αριστερά) και Gdh1 (δεξιά) *in organello*.

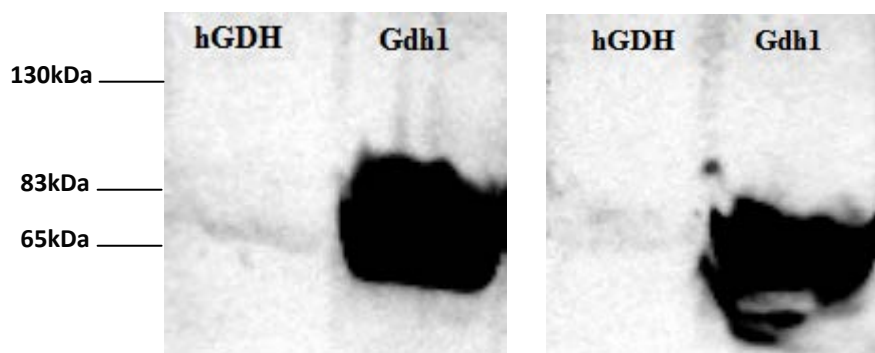
Η *in vitro* εισαγωγή της Gdh3 συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, όπου ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια έχει αποδειχθεί με τη χρήση υβριδίου με γονίδιο-marker GFP (*GDH3*-GFP) σε *in vivo* πειράματα. Με τα *in vitro* πειράματα αποδεικνύεται περαιτέρω ότι, η πρωτεΐνη εισάγεται στη φυσική της μορφή χωρίς να απαιτείται αποδιάταξη. Αυτό είναι σημαντικό καθώς η είσοδος στα μιτοχόνδρια πολλές φορές απαιτεί την απώλεια της τριτοταγούς ή και της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Αντίθετα με τη Gdh3, δεν παρατηρήθηκε *in vitro* εισαγωγή της Gdh1 στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον φαίνεται ότι η Gdh1 δεν εισάγεται *in organello* τόσο στη φυσικής της μορφή όσο και κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (σχήμα 6). Η συγκεκριμένη διαπίστωση συμφωνεί με τη βιβλιογραφία όπου βάσει *in vivo* πειραμάτων με υβρίδιο *GDH1*-GFP ο κυτταρικός εντοπισμός της Gdh1 έδειξε ότι βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

3.7 Η κλωνοποίηση του ορθόλογου γονιδίου *GLUD1* στο φορέα *pYX142* και η εισαγωγή του σε αγρίου τύπου στελέχη σακχαρομύκητα, δεν οδήγησε στην έκφραση της *hGDH* πρωτεΐνης

Όπως αναφέρθηκε, το *GLUD1* αποτελεί το ορθόλογο γονίδιο των θηλαστικών και παράγει την *hGDH* πρωτεΐνη που είναι ένζυμο-καταλύτης στη παραγωγή γλουταμικού. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγιναν προσπάθειες ετερόλογης έκφρασης cDNA του *GLUD1* γονιδίου σε στελέχη σακχαρομύκητα. Ο κυριότερος σκοπός ήταν η μελέτη της *hGDH* πρωτεΐνης σε ένα πιο απλό σύστημα που διατηρεί όμως το εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι της βιοσύνθεσης γλουταμικού οξέος. Η πειραματική προσέγγιση της ενεργότητας και της δράσης της *hGDH* στο σακχαρομύκητα θα γινόταν με τη χρήση προηγμένων τεχνικών αναλυτικής χημείας και πιο συγκεκριμένα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα πειράματα αφορούσαν μεταβολικό εμπλουτισμό με ^{13}C και *in vivo* χαρακτηρισμό της *hGDH* σε κύτταρα σακχαρομύκητα με τη χρήση και τροποποίηση αντίστοιχων πρωτοκόλλων που αφορούν τις *Gdh* πρωτεΐνες του *S. cerevisiae* (Tang et al., 2010). Επίσης, μέρος των πειραμάτων θα αφορούσε και την έκφραση της *hGDH* σε στελέχη σακχαρομύκητα όπου απουσιάζουν το *GLT1* και τα *GDH* γονίδια, την ανάπτυξη σε φτωχά μέσα καλλιέργειας με διαφορετικές πηγές άνθρακα προκειμένου να ταυτοποιηθούν τυχόν φαινότυποι.

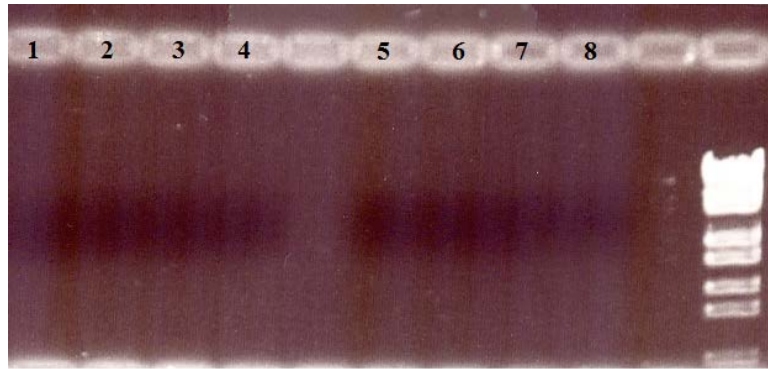
Αν και η κλωνοποίηση του *GLUD1* καθώς και η εισαγωγή της κατασκευής *pYX142GLUD1* σε αγρίου τύπου στελέχη σακχαρομύκητα έγινε με επιτυχία, παρόλα αυτά δεν εκφράστηκε η *hGDH* (σχήμα 7.α.). Αρνητικά ήταν επίσης και τα αποτελέσματα για την ανίχνευση/παραγωγή mRNA (σχήμα 7.β.).

Βάσει των παραπάνω απαιτείται επανέλεγχος της κατασκευής *pYX142GLUD1* και ενδεχομένως επανακλωνοποίηση του *GLUD1*.



Σχήμα 7.α. Στύπωμα Western (Western blot) για την ανίχνευση της *hGDH* (α-HA) μετά από κλωνοποίηση της στο φορέα *pYX142* και εισαγωγή της σε αγρίου τύπου στελέχη σακχαρομύκητα. Τα

στελέχη αναπτύχθηκαν σε γλυκόζη (αριστερά) και ραφινόζη (δεξιά), προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το μέσο της καλλιέργειας δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα έκφρασης της ανθρώπινης πρωτεΐνης στο σακχαρομύκητα. Επίσης στο ίδιο πείραμα φαίνεται και η έκφραση της πρωτεΐνης Gdh1 μετά την κλωνοποίηση στον pYX142 και την εισαγωγή της σε αγρίου τύπου στελέχη ως θετικός μάρτυρας.



Σχήμα 7.β. Η εικόνα του πηκτώματος αгарόζης όπως προέκυψε κατά την ανίχνευση του mRNA του *GLUD1* με τη μέθοδο Reverse Transcriptase. Οι θέσεις 1-4 αφορούν την κατασκευή pYX142*GLUD1* και την απομόνωση γενωμικού DNA από στελέχη που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη (1-2) και σε ραφινόζη (3-4) αντίστοιχα. Οι θέσεις 5-8 αφορούν την ίδια πειραματική διάταξη απουσία RT. Πρέπει να αναφερθεί ότι ως control χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *CMD1* το οποίο δούλεψε κανονικά.

4. Συζήτηση

Το γλουταμικό αποτελεί ένα σημαντικό αμινοξύ στη βιοχημεία των θηλαστικών καθώς εμπλέκεται στον κύκλο του Krebs αλλά και στη λειτουργία των νευρώνων ως μόριο νευροδιαβίβασης. Στην περίπτωση των μονοκύτταρων οργανισμών και πιο συγκεκριμένα στο σακχαρομύκητα, το γλουταμικό συμμετέχει καθοριστικά στον κύκλο του Krebs, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ένζυμα τα οποία συμβάλλουν στη σύνθεσή του, έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες (Lee et al., 2012).

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα ως προς το κύριο και το εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης γλουταμικού, σε μια προσπάθεια να διευρυνθεί η λειτουργία και ο εξελικτικός ρόλος των γονιδίων *GDH*. Σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάπτυξη στελεχών σακχαρομύκητα στα οποία απουσιάζουν τα γονίδια *GDH* δε φαίνεται να επηρεάζεται από πηγές άνθρακα που επάγουν είτε τη ζύμωση είτε την αναπνοή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, στον σακχαρομύκητα λειτουργεί και ένα εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης γλουταμικού το οποίο σε αντίθεση με τα θηλαστικά, απαιτεί τη μεσολάβηση του ενζύμου GOGAT το οποίο στον *S. cerevisiae* κωδικούεται από το γονίδιο *GLT1*. Τα στελέχη σακχαρομύκητα που προέκυψαν με παράλληλη απαλοιφή των γονιδίων *GLT1* και των *GDH*, έδειξαν ισχυρό φαινότυπο σε συνθήκες καλλιέργειας σε φτωχό μέσο γλυκόζης, επιβεβαιώνοντας τη συμπληρωματικότητα των δύο μονοπατιών στη σύνθεση του γλουταμικού.

Από τις τρεις (3) *Gdh* πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί στον *S. cerevisiae*, η μια είναι μιτοχondριακή και συμμετέχει στην αποδόμηση του γλουταμικού (*Gdh2*), ενώ οι άλλες δύο είναι η *Gdh1* πυρηνική/κυτταροπλασματική και η *Gdh3* πυρηνική με τη δυνατότητα της εισαγωγής στα μιτοχόνδρια και σχετίζονται με την σύνθεση του γλουταμικού. Μεγαλύτερη ενεργότητα έχει η *Gdh1* πρωτεΐνη η οποία φαίνεται ότι παράγει το κύριο μέρος του γλουταμικού (~90%) κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, σε αντίθεση με την *Gdh3* η ενεργότητα της οποίας είναι έως και 100 φορές πιο χαμηλή από τη *Gdh1*, αλλά αυξάνεται κατά το πέρασμα των κυττάρων στη στατική φάση (Tang et al., 2010). Μεταλλαγές στη *Gdh1* έδειξαν ότι η σημειακή υποκατάσταση της λυσίνης 426 του C-άκρου της πρωτεΐνης οδηγεί σε συνεχώς ενεργή πρωτεΐνη υπονοώντας πιθανή μετα-μεταφραστική τροποποίηση με σκοπό την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης πριν την είσοδο των κυττάρων στη στατική φάση ανάπτυξης. Επίσης έχει δημοσιευθεί σε high throughput πειράματα στον σακχαρομύκητα φυσική αλληλεπίδραση της *Gdh1* με την ουβικουιτίνη *Ubi4* (www.yeastgenome.org). Πρόσφατες δημοσιεύσεις που αφορούσαν πειράματα

προσδιορισμού θέσεων ουβικουιτινιλίωσης στο σακχαρομύκητα, αποκάλυψαν ότι η Gdh1 υφίσταται ουβικουιτινιλίωση μέσω της δράσης του *UBI4* (Starita, et.al., 2012; Swaney, et al., 2013), χωρίς όμως να διευκρινίζεται περαιτέρω ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιείται η αποικοδόμηση.

Αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω έδειξαν ότι, η σημειακά μεταλλαγμένη Gdh1 (K426A; Gdh1*) προκαλεί ελλειμματική ανάπτυξη συγκριτικά με την αντίστοιχη αγρίου τύπου Gdh1. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη σακχαρομύκητα που αναπτύσσονται σε φτωχό μέσο γλυκόζης και εκφράζουν τη μεταλλαγμένη Gdh1* εμφανίζουν ρυθμό ανάπτυξης μειωμένο κατά 20% συγκριτικά με τα στελέχη που αναπτύσσονται στο ίδιο μέσο καλλιέργειας αλλά εκφράζουν την αγρίου τύπου Gdh1. Η διαφορά αυτή φαίνεται εντονότερα κατά το πέρασμα των κυττάρων από την εκθετική φάση στη στατική όπου έχει ξεκινήσει ήδη ο μεταβολισμός μίγματος γλυκόζης/αιθανόλης (diauxic shift).

Αντίστοιχα αποτελέσματα φαίνονται και με πειράματα υπερέκφρασης της Gdh1 με παράλληλη συνέκφραση ή/και απουσία της Gdh3. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι, η υπερέκφραση της Gdh1 πρωτεΐνης με παράλληλη συνέκφραση της ενδογενούς Gdh3 οδηγεί σε ελλειμματική ανάπτυξη των στελεχών σακχαρομύκητα. Όπως αναφέρθηκε η Gdh1 καθώς και η ισομορφή της η Gdh3, είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνθέτουν γλουταμικό χρησιμοποιώντας α-KG που είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα αναπλήρωσης του κύκλου του Krebs. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, παράλληλη συνύπαρξη των δύο ισομορφών σε συνθήκες όπου υπάρχει ζύμωση και αναπνοή προκαλεί προβλήματα στην ανάπτυξη των στελεχών. Αυτό φαίνεται να γίνεται καθώς μέσω της υπερέκφρασης της Gdh1 αλλά και της συνέκφρασης της ενδογενούς Gdh3 υπάρχει ανταγωνισμός και παράλληλη κατανάλωση του α-KG με αποτέλεσμα να επηρεάζονται ενδεχομένως τα επίπεδα του υποστρώματος σε συνθήκες όπου η ενεργοποίηση και η σωστή διαχείριση του κύκλου του Krebs κρίνεται απαραίτητη. Η παραπάνω υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει και το λόγο για τον οποίο υπάρχει μια μόνο ενεργή Gdh πρωτεΐνη σε κάθε φάση του κύκλου ανάπτυξης, και πιο συγκεκριμένα να αποσαφηνίσει την αιτία για την οποία η Gdh1 αποικοδομείται μέσω ουβικουιτινιλίωσης, ενώ η Gdh3 ενεργοποιείται κατά το diauxic shift. Η υπόθεση της υπερκατανάλωσης του υποστρώματος, θα μπορούσε επίσης να ενδυναμωθεί και από το γεγονός ότι ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης Gdh3 σχεδόν τριπλασιάζονται κατά το πέρασμα των κυττάρων στη στατική φάση ανάπτυξης του σακχαρομύκητα, παρόλα αυτά είναι έως και 30% χαμηλότερα συγκριτικά με τα επίπεδα που εμφανίζει η Gdh1 (Lee et al., 2012). Το γεγονός ότι υπάρχει ένα μέγιστο όριο στα επίπεδα της Gdh3, ενδεχομένως να αποτελεί

μηχανισμό με τον οποίο κατά το πέρασμα των κυττάρων στο στάδιο της αναπνοής και άρα στην ενεργοποίηση του κύκλου Krebs, υπάρχει ενεργή πρωτεΐνη Gdh που μπορεί να παράγει μεν γλουταμικό, χωρίς όμως να επηρεάζει δραστικά τα επίπεδα του α -KG με πιθανότητα να προκαλέσει δυσλειτουργία στον κύκλο.

Σχετικά με τα πειράματα *in organello* πρέπει να αναφερθεί ότι αποτελούν μια διαφορετική προσέγγιση αναφορικά με τον εντοπισμό των πρωτεϊνών Gdh. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερα στην περίπτωση της Gdh3, απαιτούνται επιπλέον πειράματα εισαγωγής της πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια όπου με τη δημιουργία μιτοπλαστών και τη χρήση κατάλληλων πρωτεϊνών (K proteinase) ή μέσω αλκαλικής λύσης θα μπορέσει να διερευνηθεί αν η Gdh3 αποτελεί μια πρωτεΐνη του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου ή αν είναι ενσωματωμένη στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Η ετερόλογη έκφραση του cDNA της hGDH σε μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα με σκοπό την μέτρηση της ενεργότητας *in vivo* με φασματομετρία NMR δεν κατέστη εφικτή. Από τη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι, κατά την κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου GDH οι θέσεις στις οποίες τοποθετούνται επίτοποι (FLAGs και His-tags) επηρεάζουν τόσο τον κυτταρικό εντοπισμό όσο και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται ότι, η θέση των επιτόπων (C- ή N- άκρο) επηρεάζει την ADP ενεργοποίηση αλλά και την GTP καταστολή της πρωτεΐνης hGDH καθώς αλλάζει τα μοτίβα των θέσεων πρόσδεσης του ADP και/ή του GTP, συγκριτικά με τα αντίστοιχα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (Pajacka et al., 2013). Για το λόγο αυτό, απαιτούνται εκ νέου προσπάθειες τοποθέτησης του επίτοπου στο C-άκρο αλλά και στο N-άκρο καθώς και παρατήρηση των αμινοξικών μοτίβων που δημιουργούνται ώστε να διευκρινιστεί εάν η αποτυχία έκφρασης της hGDH, είναι μια τέτοια περίπτωση.

Με την παραγωγή της αναδυνδασμένης hGDH και τη μέτρηση της ενεργότητας της με NMR, πέρα από τη δημιουργία ενός εναλλακτικού πρωτοκόλλου *in vivo* μέτρησης της ενεργότητας πρωτεϊνών μέσω ετερόλογης έκφρασης, θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί και ο ρόλος της hGDH στο σακχαρομύκητα. Κάποια πρώτα πειράματα *in vitro* στο Εργαστήριο Βιογενέσης Μιτοχονδρίων έχουν δείξει ότι η hGDH μπορεί και εισέρχεται στο μιτοχόνδριο του *S. cerevisiae*. Ο ρόλος της εκεί παραμένει αδιευκρίνιστος δεδομένου ότι, η hGDH σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες Gdh του σακχαρομύκητα, είναι ένα ένζυμο που δρα αμφίδρομα καθώς συνθέτει αλλά και αποικοδομεί το γλουταμικό. Με τα πειράματα του μεταβολικού εμπλουτισμού, θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί η δράση της hGDH στο σακχαρομύκητα (σύνθεση ή αποδόμηση) εκτιμώντας παράλληλα την ενεργότητάς της. Το επόμενο βήμα θα ήταν να πραγματοποιηθούν μεταλλαγές στην κωδική περιοχή της hGDH και στη συνέχεια

με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω να μετρηθεί εκ νέου η πρωτεϊνική ενεργότητα και να ταυτοποιηθούν γενετικοί φαινότυποι. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί συσχέτιση ενεργότητας-γενετικών φαινοτύπων από δεδομένα *in vivo* και να υπολογιστεί ένα κατώφλι (threshold) κάτω από το οποίο η hGDH παύει να είναι λειτουργική.

Τέλος, είναι γνωστό ότι το DNA υφίσταται βλάβες οι οποίες επάγουν αποκρίσεις (DDR; DNA Damage Response) που στοχεύουν στην παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων επιτρέποντας έτσι την επιδιόρθωση του DNA (Fernandes-Marcos & Serrano, 2013). Ο διαφορετικός μεταβολισμός των υγιών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβη στο DNA είναι ένα αντικείμενο που τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον (DeBerardins et al., 2008).

Μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση δείχνει ότι η ADP-ριβοσυλίωση του GDH μέσω μιας μιτοχονδριακής ADP-ριβοσυλάσης (SIRT4), σχετίζεται με το μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA σε γενοτοξικές (genotoxic) βλάβες. Πιο συγκεκριμένα, οι Jeong et al., (2013), διαπιστώνουν ότι κατά την επαγωγή της DDR υπάρχει αρνητική ρύθμιση σε συγκεκριμένα υποστρώματα του κύκλου του Krebs και πιο συγκεκριμένα του κιτρικού και ηλεκτρικού οξέος και του α-KG. Οι συγγραφείς της μελέτης αναφέρουν ότι, μειωμένη αναπλήρωση του κύκλου του Krebs με α-KG μέσω καταστολής της δράσης της πρωτεΐνης GDH, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της κυτταρικής αναπνοής εικάζοντας ότι, επηρεάζεται αρνητικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που έχουν υποστεί γενοτοξικό στρες. Το πιο σημαντικό στοιχείο από τη μελέτη των Jeong et al., (2013) είναι ότι, η ενδεχόμενη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων επέρχεται μέσω της αρνητικής ρύθμισης της GDH και άρα μέσω της επίδρασης στη σύνθεση του γλουταμικού.

Γενωμικοί χάρτες απακετυλίωσης που έχουν δημιουργηθεί προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της απακετυλίωσης των ιστονών στο σακχαρομόκητα, αποκαλύπτουν περιοχές στο γένωμα (HAST domains; Hda1-Affected SubTelomeric domains) οι οποίες είναι κάτω από τη δράση της απακετυλάσης Hda1 (Histone deacetylase 1) (Roby et al., 2002). Η ενεργοποίηση των περιοχών HAST γίνεται μετά από αρνητική ρύθμιση (downregulation) των επιπέδων της Hda1 (Roby et al., 2002), διαδικασία που πραγματοποιείται κατά το diauxic shift (DeRisi et al., 1997). Το *GDH3* ανήκει στα HAST domains (Roby et al., 2002) γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει την επαγωγή του γονιδίου κατά το diauxic shift κάτι που δικαιολογεί την παρουσία της πρωτεΐνης μετά τις 48hr καλλιέργειας (Lee et al., 2012). Παράλληλα έχει αποδειχτεί ότι, στελέχη σακχαρομόκητα που βρίσκονται σε στατική φάση ανάπτυξης και στα οποία απουσιάζει το

γονίδιο *GDH3* (*gdh3Δ*), εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά επιβίωσης κάτω από οξειδωτικό (H_2O_2) και θερμικό ($50^\circ C$) στρες ενώ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης (Lee et al., 2012).

Βάσει των παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι, ο ρόλος του γλουταμικού σε καταστάσεις στρες καθώς και σε απόκριση σε βλάβη του DNA πρέπει να αποτελεί ένα συντηρημένο μηχανισμό αντίδρασης, ο οποίος στο σακχαρομύκητα μπορεί να γίνεται όπως και στα θηλαστικά μέσω της ADP-ριβουσύλιωσης των πρωτεϊνών Gdh, ή εναλλακτικά να επηρεάζεται από τη μεταγραφική ρύθμιση των *GDH* γονιδίων και πιο συγκεκριμένα του *GDH3*.

Τα δεδομένα που υπάρχουν για το ρόλο της Gdh3 σε συνθήκες στρες μπορούν να βοηθήσουν στο μελετηθεί περισσότερο ο μηχανισμός δράσης του γλουταμικού στο οξειδωτικό στρες και να απαντηθούν ερωτήματα που σχετίζονται με τον τρόπο που μπορεί ο μηχανισμός αυτός να ενεργοποιείται.

5. Συμπεράσματα

Ο ρόλος του γλουταμικού και η μελέτη των πρωτεϊνών GDH αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Όπως φαίνεται η σύνθεση του γλουταμικού είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι το οποίο αν και δεν χαρακτηρίζεται από ομολογία γονιδίων και πρωτεϊνών μεταξύ θηλαστικών και σακχαρομύκητα, παρόλα αυτά διακατέχεται από εξελικτικά συντηρημένες τροποποιήσεις και δράσεις.

Η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών ως προς το κύριο και εναλλακτικό μονοπάτι σύνθεσης του γλουταμικού, η εξεύρεση φαινοτύπων, καθώς και τα πειράματα που σχετίζονται με την έκφραση των πρωτεϊνών Gdh, μπορούν να αποτελέσουν ένα πρώτο υλικό για περαιτέρω έρευνα. Παράλληλα, η συγκεντρωτική και αναλυτική παράθεση της τρέχουσας βιβλιογραφίας μπορεί να βοηθήσει στο να τεθούν και να απαντηθούν ερωτήματα που σχετίζονται με ένα καινούριο ρόλο που φέρεται να έχει το γλουταμικό και που σχετίζεται με αποκρίσεις σε βλάβες του DNA.

Τέλος, η απόπειρα έκφρασης της hGDH στο σακχαρομύκητα και η παράθεση μεθόδων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην περαιτέρω στη μελέτη της, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικά αναλυτικά πρωτόκολλα που θα βοηθήσουν στη συλλογή πληροφοριών σχετικά με το ρόλο της.

6. Βιβλιογραφία

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., (2003), *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.
- Avendano, A et al., (1997), GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **179**(17): 5594-7.
- Brusilow, S.W. & A.L. Horwich, (1995), Urea cycle enzymes, *In*: Scriver, C.S., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, p 1187–1232.
- Burki, F., & H., Kaessmann, (2004), Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux, *Nature Genet.*, **36**: 1061–1063.
- Colman, R.F & C. Frieden, (1966), On the role of amino groups in the structure and function of glutamate dehydrogenase.I. Effect of acetylation on catalytic and regulatory proeperties, *J. Biol. Chem.*, **241**(16): 3652-3660.
- Cho, S.W., Ahn, J.Y., Lee, J., et al. (1996), Identification of a peptide of the guanosine triphosphate binding site within brain glutamate dehydrogenase isoproteins using 8-azidoguanosine triphosphate, *Biochemistry*, **35**:13907–13913.
- De Luna, A., Avendano, A., Riego, L. & Gonzale' s, A. 2001 NADPglutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*, *J.Biological Chemistry* **276**: 43775–43783.
- DeRisi, J.L., et al., (1997), Exploring the metabolic and genetic control of gene expression of a genomic scale, *Science*, **278**: 680–686.
- Fahien, L. A., & M.J. MacDonald, (2011), The complex mechanism of Glutamate Dehydrogenase in insulin secretion, *Diabetes*, **60**: 2450-2454.
- Fernandez- Marco, P.J. & M., Serrano (2013), Sirt4: The Glutamine Gatekeeper, *Cancer Cell*, **23**: 427-428.
- Haigis, M.C., et al., (2006), SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic b cells, *Cell* **126**: 941–954.
- Jeong et al., (2013), SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism, *Cancer Cell*, **23**:450-463.

- Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Borompokas, N., Spanaki, C., Plaitakis, A. (2007), Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase, *J. Neurosci. Res.*, **85**: 1101–1109.
- Kelly, A. & C.A. Stanley (2001), Disorders of glutamate metabolism, *Mental Retardation and Development Disabilities Research Reviews*, **7**: 287-295
- Lee, Y. J., Kim, K. J., Kang, H. Y., Kim H. R., Maeng, P. J., (2012), Involvement of GDH3-⁺ encoded NADP⁺-dependent Glutamate Dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary-phase cells, *J. Biological Chemistry* **287**(53):44221-33.
- Lombardo, D.B. et al., (2007), Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation, *Molecular and Cellular Biology*, **27**(24): 8807-8814
- Magazanik, B. (2003), Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell* **2**: 827–829.
- Mavrothalassitis, G., et al., (1987), Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: Evidence for a small gene family, *PNAS*, **85**: 3494-3498
- Michaelidis, T.M., Tzimagiorgis, G., Moschonas, N.K, et al. (1993), The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization, *Genomics*, **16**: 150 –160.
- Nakatani, Y., Schneider, M., Banner, C., et al. (1988), Complete nucleotide sequence of human glutamate dehydrogenase cDNA, *Nucleic Acids Res.*, **16**: 6237.
- Owen, O. E., et al., (2002), The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function, *J. Biol. Chem.*, **277**: 30409-30412
- Pajacka et al., (2014), Glutamate dehydrogenase isoforms with N-Terminal (His)6- or FLAG-Tag retain their kinetic properties and cellular localization, *Neurochem. Res.*, **39**(3): 487-499.
- Palladino, A.A. & C.A. Stanley (2010), The hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **11**:171–178
- Plaitakis, A., Nicklas, W.J., Desnick, R.J., (1980), Glutamate dehydrogenase deficiency in three patients with spinocerebellar syndrome, *Ann. Neurol.*, **7**: 297–303.
- Plaitakis, A., & M.D., Yahr, (1986), Abnormalities in GDH and glutamate metabolism in atypical Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy, *Neurology* **35**(Suppl 1):110.

- Plaitakis, A., Flessas, P., Natsiou, A.B., et al. (1993), Glutamate dehydrogenase deficiency in cerebellar degenerations: clinical, biochemical and molecular genetic aspects, *Can. J. Neurol. Sci.*, **20**(Suppl 3): S109–116.
- Plaitakis, A., Spanaki, C., Mastorodemos, V., Zaganas, I. (2003), Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme, *Neurochem. Int.*, **43**: 401–410.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.D., Pietro, J.A., (1998), Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast, *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2940–2948.
- Robyr, D., et al., (2002), Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases, *Cell*, **109**: 437-466.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis, T., (1989), Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sener, A. & W.J., Malaisse (1980), L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase, *Nature*, **288**:187– 189.
- Shashidharan, P., Michaelidis, T.M., Robakis, N.K., Kresovali, A., Papamatheakis, J., et al. (1994), Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene, *J. Biol. Chem.* **269**: 16971–16976.
- Starita, LM, et al., (2012), Sites of ubiquitin attachment in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proteomics* **12**(2):236-40
- Swaney DL, et al. (2013), Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation, *Nat Methods*, **10**(7):676-82
- Tang, Y., Sieg, A., Trotter, P. J. Trotter, (2010), ¹³C-metabolic enrichment of glutamate in glutamate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Research*, **166**: 521-530.
- Weinzimer, S.A., Stanley, C.A., Berry, G.T., et al. (1997), A syndrome of congenital hyperinsulinism and hyperammonemia, *J. Pediatr.*, **130**:661–664.
- Willard-Mack, C.L., Koehler, R.C., Hirata, T., et al. (1996), Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat, *Neuroscience* **71**:589–599.
- Yorifuji, T., Muroi, J., Uematsu, A., et al. (1999), Hyperinsulinism- hyperammonemia syndrome caused by mutant glutamate dehydrogenase accompanied by novel enzyme kinetics, *Hum. Genet.*, **104**:476–479.