

# Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes

Jakob D. Nissen, Kasper Lykke, Jaroslaw Bryk, Malin H. Stridh, Ioannis Zaganas, Dorte M. Skytt, Arne Schousboe, Lasse K. Bak, Wolfgang Enard, Svante Pääbo e Helle S. Waagepetersen

## Introdução

A manutenção da homeostase do glutamato é essencial para a função cerebral e para evitar a excitotoxicidade. A glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a etapa oxidativa inicial ao remover o grupo amina do glutamato e transformá-lo em  $\alpha$ -cetoglutarato intermediário do ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), utilizando NAD(P)<sup>+</sup> como cofator.

A maioria dos mamíferos, incluindo roedores, expressa apenas uma isoforma da GDH, a GDH1 (hGDH1 em humanos), mas os humanos e os primatas também expressam uma segunda isoforma, a GDH2, codificada pelo gene GLUD2. A hGDH1 é amplamente expressa no tecido humano, no entanto a expressão da hGDH2 só foi localizada nas células de Sertoli nos testículos, em astrócitos no cérebro e em células epiteliais no rim. A GDH encontrada em diferentes espécies é regulada alostericamente por uma vasta gama de substâncias, incluindo ADP e GTP, e afetada por várias outras como a L-leucina. A hGDH2 é quase insensível à inibição por GTP, contrariamente à hGDH1 que é fortemente inibida.

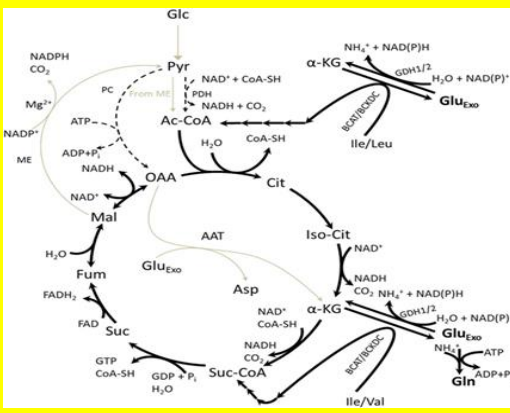
Este artigo destinou-se a estudar a importância da hGDH2 para a captação de glutamato nos astrócitos e para vias metabólicas específicas importantes para o metabolismo energético. Os astrócitos foram cultivados a partir de tecido cortical cerebral de ratos transgênicos que expressam a hGDH2 e de ratos wildtype.

## Materiais & Métodos

- Utensílios de plástico para cultura de astrócitos
  - Soro fetal de vitelo e OptiMEM
  - DMEM, D5030
  - dBcAMP
  - MTBSTFA
  - DMF
  - L-[U-<sup>13</sup>C]Ácido Glutâmico e d-[U-<sup>13</sup>C]Glucose (ambos enriquecidos em 99% com <sup>13</sup>C)
  - L-[U-<sup>14</sup>C]Ácido Glutâmico (0.1 mCi mL<sup>-1</sup> ou 278.0 mCi mmol<sup>-1</sup>) e L-[3,4-<sup>3</sup>H]Ácido Glutâmico (1 mCi mL<sup>-1</sup> ou 51.1 Ci mmol<sup>-1</sup>)
  - Ecocint A
  - Químicos para Cromatografia Gasosa - Espetrometria de Massa (GC-MS) e Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)
  - Colunas de cromatografia
  - Kit de ensaio da proteína micro ácido bicinchonínico (BCA)
1. Ratos transgênicos para o gene GLUD2 (expressam a hGDH2)
  2. Culturas primárias de astrócitos de murinos
  3. Western blot
  4. Captação e metabolismo de glutamato
  5. Determinação da produção de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>
  6. Incubação de astrócitos com [U-<sup>13</sup>C]Ácido Glutâmico e [U-<sup>13</sup>C]Glucose
  7. Determinação dos aminoácidos presentes
  8. Mapeamento metabólico por GC-MS
  9. Análise Estatística

## Resultados

- A expressão de hGDH2 afeta o metabolismo da glicose. O fluxo através da Piruvato Carboxilase (PC) diminui nos astrócitos que expressam hGDH2.
- O metabolismo do glutamato é afetado por um aumento no influxo de glutamato no ciclo.
- Observado um aumento na utilização de BCAAs (Ile, Leu e Val) em astrócitos que expressam hGDH2 na ausência de glicose como substrato.
- A expressão de hGDH2 aumentou a amidação de glutamato em glutamina na presença de glicose.



## Discussão & Conclusão

Neste artigo, foi demonstrado que a GDH é importante para sustentar a capacidade catalítica do ciclo dos TCA em astrócitos de rato-doméstico ao mediar a formação de intermediários e que a expressão reduzida de GDH induz o uso de substratos alternativos como a isoleucina (um dos aminoácidos com cadeia lateral).

Foi descoberto que a expressão de hGDH2 tem consequências para o metabolismo do carbono, especialmente durante uma carga de trabalho aumentada e condições hipoglicêmicas. Além disso, a expressão reduz a entrada anaplerótica da glicose enquanto aumenta a de glutamato e de aminoácidos com cadeia lateral.

No presente estudo, concluímos que os astrócitos de murinos que exprimem o hGDH2 apresentam uma maior capacidade de absorção e metabolismo oxidativo do glutamato, particularmente durante o aumento da carga de trabalho e da privação da glicose. Além disso, os astrócitos que expressam hGDH2 exibem uma maior utilização de aminoácidos de cadeia longa na ausência de glicose, bem como uma diminuição geral do metabolismo da glicose oxidativa. Especula-se que a expressão do hGDH2 permite aos astrócitos pouparem glicose e utilizarem os aminoácidos de cadeia longa durante a escassez do substrato. Estas conclusões apoiam o papel proposto do hGDH2 nos astrócitos como um importante fator de segurança em situações de intensa atividade glutamatérgica em que apoia a remoção do glutamato, bem como a homeostase energética e a anaplerose dos intermediários do ciclo dos TCA.

**Bibliografia:** Nissen, J.D., Lykke, K., Bryk, J., Stridh, M.H., Zaganas, I., Skytt, D.M., Schousboe, A., Bak, L.K., Enard, W., Pääbo, S. and Waagepetersen, H.S. (2017), Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. *Glia*, 65: 474-488. doi:10.1002/glia.23105

**Ficha Técnica:** Autores: Bernardo Augusto (2814) e Miguel Cisneiros (2674); UC: Metabolismo e Regulação; Docente: Rafael Costa; Ano Letivo 2019/2020; Licenciatura em Bioinformática; ESTBarreiro/IPS