



Samenvatting proefschrift

Youji He

**'Effects of tissue-specific inactivations
of Glutamine Synthetase in the mouse'**

**Promotie: 4 december 2007
Universiteit van Amsterdam**

**Promotor: Prof.dr. W.H. Lamers
Co-promotor: Dr. T.B.M. Hakvoort**

Glutamine is, met een plasmaconcentratie van 0.5-0.8 mmol/L, het meest voorkomende vrije aminozuur in het lichaam. De intracellulaire concentraties zijn 5-10x hoger. Hoewel toediening van glutamine via de voeding de circulerende concentratie enigszins verhoogt, wordt het merendeel van dit glutamine in de darm afgebroken. Het glutamine dat in het lichaam aanwezig is, wordt dan ook voor het allergrootste deel *de novo* gesynthetiseerd. Het enige enzym dat glutamine kan synthetiseren uit glutamaat en ammoniak is glutamine synthetase (GS; L-glutamate:ammonia ligase (ADP); EC 6.3.1.2). De functie van GS is, naast synthese van glutamine, het verwijderen van toxisch ammoniak en glutamaat.

Ongeveer een derde van alle stikstof die afkomstig is van eiwitafbraak wordt tussen organen getransporteerd in de vorm van glutamine. Het overgrote deel van dit glutamine zou uit de spier afkomstig zijn. Ongeveer 50% van het circulerende glutamine wordt geoxideerd, 10-20% wordt gebruikt voor gluconeogenesis, en de rest (her-)gebruikt voor eiwitsynthese.

Inactivering van het GS gen in alle cellen is reeds onverenigbaar met het leven voordat het embryo zich kan innestelen in de baarmoederwand (Hoofdstuk 2). De reden voor de vroegtijdige dood is waarschijnlijk het ontbreken van de ammoniakontgiftiging in het nog niet ingenestelde embryo. Indien embryonale stamcellen waarin GS op beide allelen is geïnactiveerd worden ingespoten in wildtype blastocysten op een zodanige wijze dat >90% van het embryo uit knockoutcellen bestaat, vindt normale ontwikkeling tot aan de geboorte plaats.

Om te kunnen nagaan in welke mate en onder welke omstandigheden 1) de synthese van glutamine in specifieke weefsels van belang is voor de circulerende glutamine spiegel en 2)

specifieke weefsels voor hun functie afhankelijk zijn van de lokale synthese van glutamine hebben wij daarom een muis "gemaakt", waarin het eiwitcoderende domein van het structurele GS gen wordt geflankeerd door zgn. "loxP sites". Dergelijke muizen zijn functioneel niet te onderscheiden van ongemodificeerde muizen. Door zo'n "conditioneel deficiënte" GS muis te kruisen met een transgene muis die het enzym "Cre" in een bepaald weefsel tot expressie brengt, wordt het GS gen selectief in dat weefsel geïnactiveerd.

In het centrale zenuwstelsel verwijderen de astrocyten ammoniak en glutamaat uit de synaptische spleet door er glutamine van te maken. Muisjes waarin het astrocytaire GS is geïnactiveerd (Hoofdstuk 3), zijn bij de geboorte nog niet te onderscheiden van hun niet-gemodificeerde broertjes en zusjes, maar overlijden 2-3 dagen later omdat ze niet meer eten en groeien. In de hersenen zijn geen morfologische afwijkingen aanwezig en treedt geen extra celdood op. De concentratie van glutamine in de hersenen is reeds voor de geboorte lager dan in controle dieren, terwijl de concentraties van glutamaat en ammoniak weinig veranderen. Onmiddellijk na de geboorte stijgt de spiegel van het aminozuur alanine voorbijgaand, waarna de spiegel van het aminozuur glycine gaat stijgen. Wij schrijven het gebrek aan eetlust en de daardoor optredende dood toe aan de stijging van het glycine gehalte in de hersenen. Wij begrijpen nog niet waarom glycine pas na de geboorte stijgt.

Inactivering van GS in de lever (Hoofdstuk 4) en/of spier (Hoofdstuk 5) heeft onverwacht geen effect op het welbevinden van de gemodificeerde dieren. Wij veronderstellen daarom dat het enzym alleen functioneel is onder "stress" omstandigheden. In spier "knockouts" beginnen de circulerende glutamine concentraties na 4 uur vasten te dalen, terwijl de spiegels van de aminozuren leucine, isoleucine, en valine ("vertakt-keten aminozuren"; BCAA) juist gaan stijgen. Na 20 uur vasten zijn de circulerende spiegels van alle aminozuren behalve glutamaat en BCAA gedaald. Dan pas zijn ook meetbare dalingen in de productie van deze aminozuren door de spier vast te stellen, waarbij de daling in de glutamine productie het meest prominent is. Een intraveneuze belasting met ammoniak, een tussenproduct in de eiwitafbraak, leidt ook reeds bij een veel lagere belasting tot de dood in spier knockouts dan in controle dieren.

Op vergelijkbare wijze hebben we vastgesteld dat een belasting met ammoniak in het drinkwater tot merkbare veranderingen in het glutamine metabolisme in de lever leidt. In 4 uur gevaste muizen is de dunne darm leeg en worden geen biochemische verschillen tussen controles en knockouts waargenomen, behalve dat de laatstgenoemde dieren geen glutamine in de lever kunnen maken. In de gevoede toestand absorberen de knockout dieren geen aminozuren uit de darm en produceert de lever geen aminozuren, zoals controle dieren doen. Een vergelijkbare aanpassing wordt in controle dieren na het toedienen van ammonia gevonden. Deze behandeling heeft echter geen additioneel effect op knockout dieren. De waarnemingen dat GS geen essentiële functie in de lever vervuld en dat de spieren een substantiële capaciteit hebben om ammoniak te ontgiften suggereren dat ammoniakvergiftigingen met geëigende voedingsmiddelen kunnen worden vermeden.

Voor het bovenbeschreven onderzoek is het van belang te weten in welke weefsels en in welke concentratie GS tot expressie komt (Hoofdstuk 6). Omdat geen verschillen in de mRNA- en eiwitconcentratie en enzymactiviteit van GS in de diverse organen werd waargenomen, hebben wij geconcludeerd dat regulering van expressie voornamelijk op transcriptieniveau plaatsvindt. GS komt in veel weefsels in zeer verschillende concentraties tot expressie. De concentratie van het enzym is vaak hoog (micromolaire range) in weefsels waar GS slechts in een deel van de cellen aanwezig is (bijv. de lever) en laag in weefsels waar alle cellen het tot expressie brengen (bijv. de skeletspier). De cellulaire concentratie lijkt ook samen te hangen met de primaire functie van het enzym: de cellulaire concentratie is 10-100x hoger in weefsels waarvan bekend is dat de functie van GS is om glutamaat of ammoniak te ontgiften (levercellen, astrocyten, bijbalepitheelcellen) dan in weefsels waarvan bekend is dat ze vooral glutamine produceren (skeletspiercellen, vetcellen). ◀