

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2387.**

**SZABÓ ESZTER**

**Funkcionális Idegtudományok**  
című program

Programvezető: Dr. Vizi E. Szilveszter, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Ambrus Attila, egyetemi docens

# A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz patogén mutánsainak szerkezetanalízise

Doktori értekezés

**Dr. Szabó Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ambrus Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Harmat Veronika, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Mészáros Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., habilitált egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2020

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. A dihidrolipoamid-dehidrogenáz szerepe és működése.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Metabolikus jelentőség.....	6
1.1.2. A LADH-reakció mechanizmusa .....	9
1.1.3. A fiziológias aktivitáson túl .....	12
1.1.4. Fehérjeszerkezet a funkció tükrében .....	15
<b>1.2. A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz-deficiencia .....</b>	<b>19</b>
1.2.1. A betegség háttere és klinikai tünetei.....	19
1.2.2. A betegség hátterében álló patomechanizmusok .....	20
1.2.2.1. A LADH-aktivitás csökkenése .....	21
1.2.2.2. A patogén variánsok emelkedett ROS-képző aktivitása .....	23
1.2.2.3. A multienzimkomplexek disszociációja.....	24
1.2.3. A megváltozott enzimaktivitások hátterében álló szerkezeti eltérések.....	25
1.2.4. Terápiás lehetőségek .....	27
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Vegyszerek .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. A plazmid vektorok előállítása.....</b>	<b>29</b>
3.2.1. A vad típusú hLADH-t kódoló plazmid.....	29
3.2.2. <i>In vitro</i> helyspecifikus mutagenézis.....	29
3.2.3. A plazmidok felszaporítása .....	30
3.2.4. Plazmid izolálás.....	30
3.2.5. Szekvencia-analízis .....	31
<b>3.3. Rekombináns fehérjeexpresszió és tisztítás .....</b>	<b>31</b>
3.3.1. Fehérjeexpresszió .....	31
3.3.2. Sejtfeltárás és előtisztítás .....	32
3.3.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás .....	32
<b>3.4. Fehérjekristályosítás .....</b>	<b>33</b>
3.4.1. Kristályosítási körülmények tesztelése .....	33
3.4.2. A kristályosítási körülmények optimalizálása.....	34
<b>3.5. Röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás és analízis .....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Adatgyűjtés.....	35
3.5.2. Adatfeldolgozás.....	36

3.5.3.	Szerkezetmegoldás molekuláris helyettesítéssel .....	38
3.5.4.	Szerkezetfinomítás .....	39
3.5.5.	Szerkezetvizsgálat .....	42
<b>3.6.</b>	<b>Enzimaktivitás mérések</b> .....	<b>43</b>
3.6.1.	Az enzimkoncentráció meghatározása .....	43
3.6.2.	A specifikus LADH-aktivitás mérése forward és reverz irányában.....	43
3.6.3.	ROS-képző aktivitás mérése .....	44
3.6.4.	A mérési eredmények kiértékelése.....	44
<b>4.</b>	<b>Eredmények</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.</b>	<b>Röntgenkristallográfiai eredmények</b> .....	<b>47</b>
4.1.1.	A vad típusú hLADH szerkezete .....	47
4.1.1.1.	A hLADH homodimer .....	48
4.1.1.2.	Az aktív centrum és a szubsztrátkötő helyek.....	50
4.1.1.3.	A H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O-csatorna .....	51
4.1.1.4.	A hLADH alegységkötő felszíne.....	55
4.1.2.	Hét betegséget okozó hLADH variáns szerkezete .....	57
4.1.2.1.	Az aktív centrum variáns P453L-hLADH szerkezete .....	57
4.1.2.2.	A NAD <sup>+</sup> /NADH-kötő domént érintő G194C-hLADH variáns szerkezete ..	63
4.1.2.3.	A dimerizációs domént érintő patogén variánsok kristályszerkezetei.....	64
4.1.2.3.1.	G426E-hLADH .....	64
4.1.2.3.2.	D444V-hLADH .....	66
4.1.2.3.3.	I445M-hLADH.....	70
4.1.2.3.4.	R447G-hLADH .....	71
4.1.2.3.5.	R460G-hLADH .....	73
<b>4.2.</b>	<b>Az enzimaktivitás-mérések eredményei</b> .....	<b>76</b>
4.2.1.	A betegséget okozó szubsztitúciók hatása .....	76
4.2.2.	A Glu332 és az Arg460 szubsztitúciók hatása .....	77
<b>5.</b>	<b>Megbeszélés</b> .....	<b>80</b>
<b>5.1.</b>	<b>A hLADH szerkezetét és a katalizált reakciót érintő új megfigyelések</b>	<b>80</b>
<b>5.2.</b>	<b>Az E3-deficienciához vezető szubsztitúciók okozta szerkezeti eltérések és azok korrelációja az enzimaktivitás csökkenéssel és a betegség súlyosságával</b> .....	<b>85</b>
5.2.1.	Az aktív centrumot közvetlenül érintő P453L szubsztitúció .....	85
5.2.2.	A NAD <sup>+</sup> /NADH-kötőhely közelében elhelyezkedő G194C és G426E szubsztitúciók hatásai .....	86
5.2.3.	A H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O-csatorna körül elhelyezkedő szubsztitúciók hatásai .....	89
<b>6.</b>	<b>Következtetések</b> .....	<b>93</b>

7.	<b>Összefoglalás</b> .....	<b>95</b>
8.	<b>Summary</b> .....	<b>96</b>
9.	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>97</b>
10.	<b>Saját publikációk jegyzéke</b> .....	<b>113</b>
11.	<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>114</b>

## Rövidítések jegyzéke

'	(adott aminosav megjelölését követően) a szóban forgó aminosav a szomszédos monomerhez tartozik
Bis-Tris	2-[bis(2-hidroxietyl)amino]-2-(hidroximetil)propán-1,3-diol
DHLA	redukált lipoamid, dihidrolipoamid
DHLS	redukált liponsav, dihidroliponsav
E1 <sub>ELKDHk</sub>	elágazó (szén)láncú $\alpha$ -ketosav dehidrogenáz v. dekarboxiláz, az ELKDHk E1-alegysége
E1 <sub>KGDHk</sub>	$\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz v. dekarboxiláz, a KGDHk E1-alegysége
E1 <sub>PDHk</sub>	piruvát-dehidrogenáz v. dekarboxiláz, a PDHk E1-alegysége
E2 <sub>ELKDHk</sub>	az ELKDHk dihidrolipoamid-aciltranszferáz (E2) alegysége
E2 <sub>KGDHk/KADHk</sub>	dihidrolipoil-transzszukciniláz v. dihidrolipoamid-szukciniltranszferáz, a KGDHk és a KADHk E2-alegysége
E2 <sub>PDHk</sub>	dihidrolipoil-transzacetiláz v. dihidrolipoamid-acetiltranszferáz, a PDHk E2-alegysége
E3	a mitokondriális $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplexek közös harmadik alegysége, dihidrolipoamid-dehidrogenáz
E3KF	E3-kötő fehérje
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav, N,N'-etán-1,2-diilbisz[N-(karboximetil)glicin]
ELKDHk	elágazó (szén)láncú $\alpha$ -ketosav dehidrogenáz komplex
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
GHR	glicin-hasító rendszer
GR	glutation-reduktáz
h	humán
HDX-MS	hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria ( <i>hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry</i> )
HEPES	2-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]etánszulfonsav
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
k	komplex
KADHk	$\alpha$ -ketoadipát-dehidrogenáz komplex
KGDHk	$\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex

KoA	koenzim A
LA	oxidált lipoamid
LADH	(dihidro)lipoamid-dehidrogenáz
LB	Luria-Bertani tápoldat, Lennox-féle kiserelés (5 g/l NaCl)
LB-agar	agar-tartalmú Luria-Bertani tápoldat
L-fehérje	a glicin-hasító rendszer dihidrolipoamid-dehidrogenáz alegysége (=LADH, E3)
NAD <sup>+</sup>	oxidált nikotinamid-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-dinukleotid
PDB	Fehérjeszerkezeti Adatbázis ( <i>Protein Data Bank</i> )
PDHk	piruvát-dehidrogenáz komplex
RMSD	négyzetes középérték eltérés ( <i>root mean-square deviation</i> )
ROS	reaktív oxigénszármazékok
S.E.M	standard hiba ( <i>standard error of the mean</i> )
TLS	transzlációs, billegő ( <i>libration</i> ) és csavarodó ( <i>screw</i> ) mozgás jellemzésére szolgáló paraméterek a merev testek anizotróp mozgásának modellezésére
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol

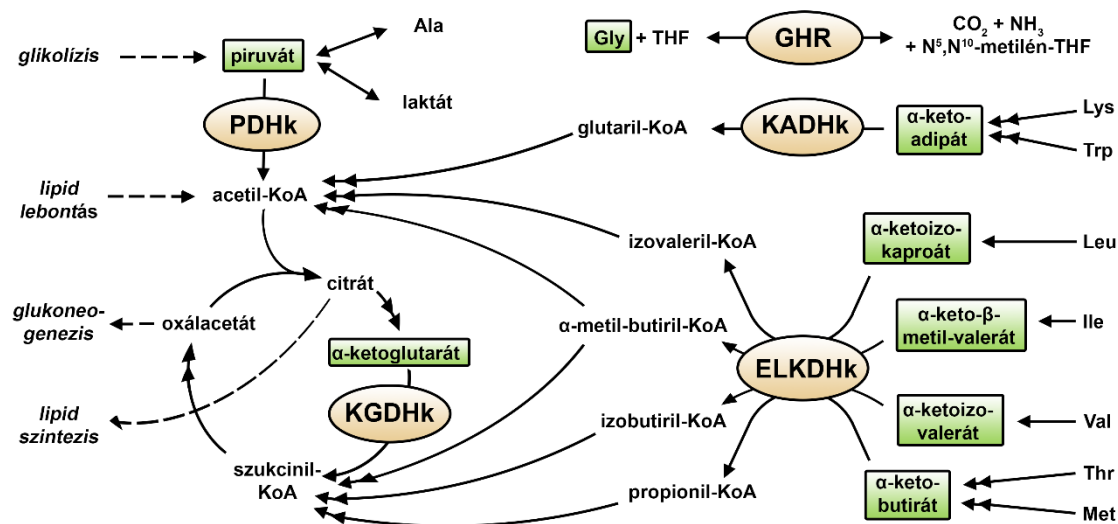
## 1. Bevezetés

### 1.1. A dihidrolipoamid-dehidrogenáz szerepe és működése

#### 1.1.1. Metabolikus jelentőség

A (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (LADH, E3, L-fehérje, EC 1.8.1.4) a piridin-nukleotid-diszulfid-oxidoreduktáz enzimsalád tagja, mely a dihidroliponsav-kofaktor oxidációját végzi  $\text{NAD}^+$  redukciójához kapcsoltn. A metabolizmusban betöltött kulcsszerepét annak köszönheti, hogy számos multienzim komplexben, így a mitokondriális  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplexekben (1-3) és a glicinhasító rendszerben (GHR, vagy más néven glicin-dekarboxiláz enzimkomplex) (4) is megtalálható, melyek mindegyikében a lipoát-kofaktor regenerálásáért és ezáltal a multienzim komplex katalitikus aktivitásának fenntartásáért felel (5, 6).

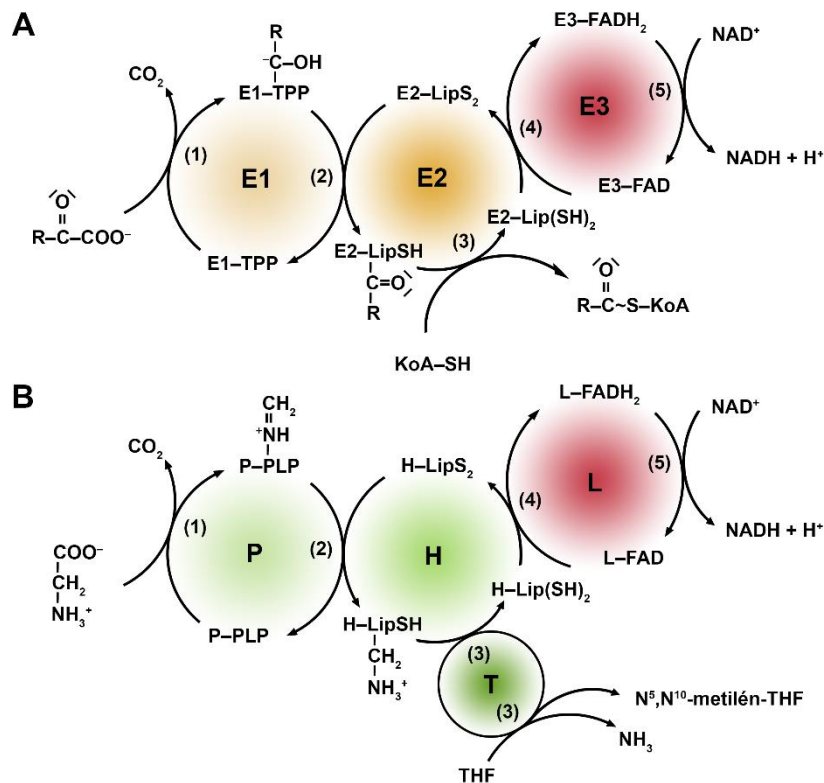
A mitokondriális  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek alatt a piruvát-dehidrogenáz (PDH), az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz (KGDH), az elágazó láncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz (ELKDH) és az  $\alpha$ -keto-adipát-dehidrogenáz (KADH) komplexeket (k) értjük, melyek metabolikus szerepéről az 1. ábra nyújt áttekintést.



**1. ábra. A LADH helye a metabolizmusban.** A LADH az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázok és a GHR közös alegységeként szerepet játszik az aerob szénhidrát metabolizmusban (PDHk), a citromsav ciklus egy sebesség meghatározó lépésének katalízisében (KGDHk) és számos aminosav metabolizmusában (elágazó szénláncú aminosavak, metionin és treonin – ELKDHk; lizin és triptofán – KADHk; glicin - GHR). A sematikus ábrán a metabolikus lépéseket nyilak jelölik (a duplaféjű nyilak a kettő vagy több lépésben megvalósuló átalakulásokat, a kétirányú nyilak a megfordítható reakciókat jelölik). Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázok által katalizált reakciókhoz kapcsoltn  $\text{NAD}^+$  redukálódik és  $\text{CO}_2$  szabadul fel, melyek nem kerültek feltüntetésre.



Az enzimkomplexek által katalizált reakciók alapja minden esetben egy  $\alpha$ -ketosav oxidatív dekarboxileződése, miközben a szén-dioxid mellett egy magas csoportátviteli potenciállal rendelkező acil-koenzim A (acil-KoA) termék keletkezik, az elektronok pedig  $\text{NAD}^+$  kofaktorra kerülnek (1, 2). Az enzimkomplexek katalitikus aktivitása három alegység összehangolt működését igényli (2.A ábra). Az első reakciólépést a ketosav-dehidrogenáz vagy más néven ketosav-dekarboxiláz alegység (E1) katalizálja, mely lényegében az egyes enzimkomplexek szubsztrátspecifitását is meghatározza. A legszélesebb szubsztrátspecifitással az  $\text{E1}_{\text{ELKDHk}}$  rendelkezik (lásd 1. ábra), amely az elágazó szénláncú  $\alpha$ -ketosavak ( $\alpha$ -ketoizokaproát,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -metilvalerát,  $\alpha$ -ketoizovalerát) és az  $\alpha$ -ketobutirát felé összemérhető affinitást mutat (7). Megjegyzendő továbbá, hogy kis mértékű átfedés van az egyes E1-alegységek szubsztrátspecifitásában: az  $\text{E1}_{\text{PDHk}}$   $\alpha$ -ketobutirát (7), az  $\text{E1}_{\text{KGDHk}}$   $\alpha$ -ketoadipát (8), az  $\text{E1}_{\text{KADHk}}$   $\alpha$ -ketoglutarát (3), az  $\text{E1}_{\text{ELKDHk}}$  pedig piruvát (9) dekarboxilálását is képes katalizálni, ám ezek kevésbé preferált szubsztrátjai az adott enzimeknek. Az E1-alegység a tiamin-pirofoszfát prosztetikus csoportja révén a szubsztrátot dekarboxilálja és  $\alpha$ -hidroxialkil-csoportként megköti, majd ezt követően acilcsoportként a transzacetiláz alegység (E2) kovalensen kötött lipoamid (LA) kofaktorához kapcsolja [2.A ábra, (1) és (2) reakció]. Az E2-alegység többnyire komplex specifikus, ám a KGDH és KADH komplexek közös E2-alegységen ( $\text{E2}_{\text{KGDHk/KADHk}}$ ) osztoznak (3). Az E2-alegység ezt követően az acilcsoportot az LA-kofaktorról KoA-ra helyezi miközben az LA-kofaktor dihidrolipoamiddá (DHLA) redukálódik [2.A ábra, (3) reakció]. Az enzimkomplexek folyamatos működését a DHLA oxidálását és ezáltal az E2-alegység regenerálását is végző harmadik, dihidrolipoamid-dehidrogenáz alegység (LADH, E3) teszi teljessé, mikor az elektronokat DHLA szubsztrátról FAD prosztetikus csoport segítségével  $\text{NAD}^+$  kofaktorra szállítja [2.A ábra, (4) és (5) reakció] (1, 2, 5). Az E3-alegység az egyes komplexeken belül különböző alegységekkel asszociálódik: a KGDHk-n belül az E1-alegység ( $\text{E1}_{\text{KGDHk}}$ ) (10, 11), az ELKDHk-n belül az E2-alegység ( $\text{E2}_{\text{ELKDHk}}$ ) (2), a PDHk-n belül pedig alacsonyabb rendű élőlényekben az E2-alegység ( $\text{E2}_{\text{PDHk}}$ ), magasabb rendű eukariótákban egy katalitikus aktivitással nem rendelkező E3-kötő fehérje ( $\text{E3KF}$ ) (12) felelős az E3-alegység kötéséért.



**2. ábra. Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplexek és a GHR működése.** Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek (A) és a GHR (B) a specifikus szubsztrátjaik oxidatív dekarboxilezését a sematikus ábrán bemutatott részreakciók (1-5) és proszтетikus csoportok/kofaktorok (TPP – tiamin-pirofoszfát, LipS<sub>2</sub>/Lip(SH)<sub>2</sub> – oxidált/redukált lipoamid, FAD – flavin-adenin-dinukleotid, KoA – koenzim A, PLP – piridoxál-foszfát, THF – tetrahidrofolsav) segítségével valósítják meg. Az egyes alegységek katalitikus aktivitása, ill. a részreakciók leírása a szövegben található.

Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázokkal mechanisztikus analógiát mutat bizonyos tekintetben a GHR működése, amely a glicint szén-dioxiddá és ammóniává alakítja, miközben N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-tetrahidrofolát és NADH keletkezik. A katalizált reakció megfordítható, az enzimkomplex glicin-szintázként is funkcionálhat. A reakció négy enzim, az ún. P-, T-, H- és L-fehérjék közreműködésével valósul meg (2.B ábra), melyek közül az utóbbi L-fehérje a fenti enzimkomplexekben E3-ként megismert LADH. Az alegységek nem alkotnak szoros komplexet (erre utal a glicinhasító rendszer elnevezés is). A katalitikus ciklus első lépéseként a glicin-dehidrogenáz aktivitású P-fehérje a glicint piridoxál-foszfát proszтетikus csoportján keresztül megköti, majd azt dekarboxilálás mellett egy aminometil-csoportként a H-fehérje LA-kofaktorára helyezi át [2.B ábra, (1) és (2) reakció]. A következő reakciólépést az aminometiltranszferáz T-

fehérje katalizálja: a H-fehérje kofaktorához kötött aminometil-csoportból a metilén-csoportot tetrahidrofolát kofaktorra viszi át, amit ammónia felszabadulása kísér [2.B ábra, (3) reakció]. A H-fehérje tehát tulajdonképpen közvetítő szerepet tölt be a P- és a T-fehérjék között, a reakciósorozatot követően azonban a DHLA-ként visszamaradó kofaktorát (az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázok E2-alegységéhez hasonlóan) regenerálni szükséges, melyet a GHR-ben az L-fehérje (az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázok E3-alegysége) végez. Az L-fehérje révén a DHLA-ról az elektronok  $\text{NAD}^+$  kofaktorra kerülnek [2.B ábra, (4) és (5) reakció] (4, 6).

A KGDH, KADH, PDH és ELKDH komplexekben tehát az E1- és E2-alegységek, a GHR-ben pedig a P-, T- és H-fehérjék biztosítják a katalizált reakciók szubsztrátspecifitását, a közös E3 vagy L-fehérje alegység (továbbiakban az enzimaktivitást tükröző elnevezést használva: LADH) pedig lényegében lehetővé teszi, hogy az enzimkomplexek ne merüljenek ki egy katalitikus ciklust követően. A LADH ilyen módon gyakorlatilag megkerülhetetlen a metabolizmusban, hiszen a PDHk révén az aerob szénhidrát-metabolizmusban és annak lipid-metabolizmussal való összehangolásában, a ELKDHk, KADHk és GHR révén számos aminosav lebontásában, a KGDHk által pedig nem csak a katabolikus, hanem az anabolikus folyamatok szempontjából is kulcsfontosságú citromsav ciklusban is szerepet játszik. Nem elhanyagolható tényező, hogy az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek egyik fontos szabályozása is a LADH enzimkomponensen keresztül érvényesül. A sejtek energia állapotát tükröző  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ -arány ugyanis a LADH aktivitásának szabályozása révén befolyásolja az enzimkomplexek működését (1, 13, 14).

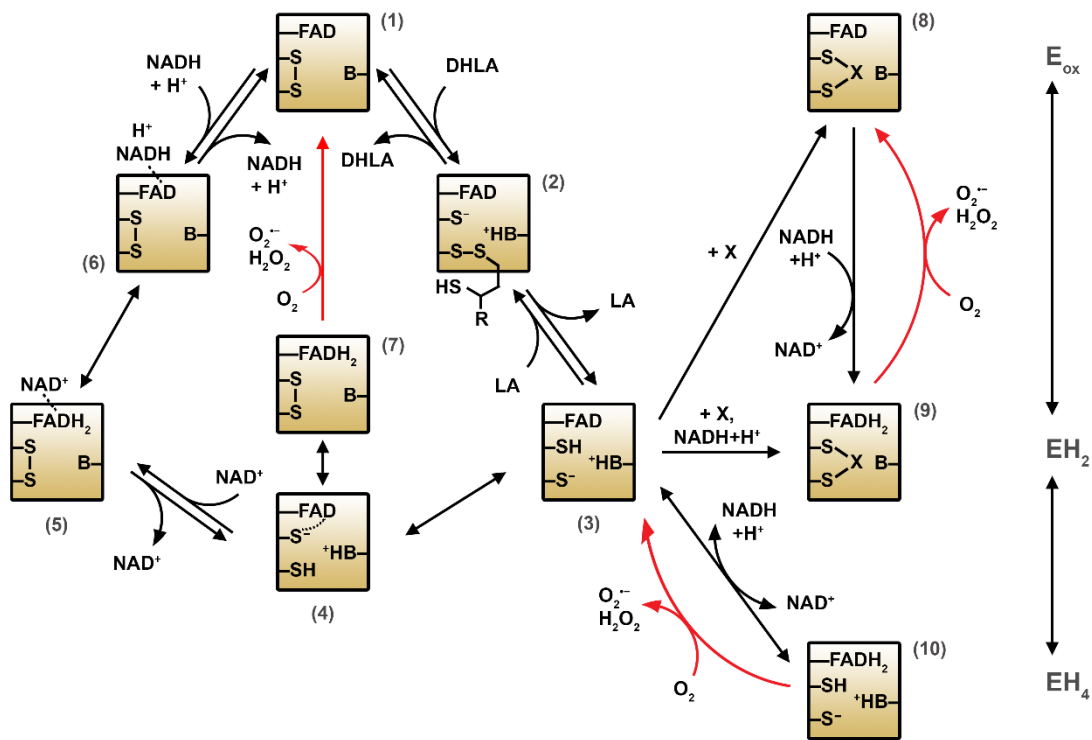
### 1.1.2. A LADH-reakció mechanizmusa

A LADH a piridin-nukleotid-diszulfid-oxidoreduktáz enzimcsalád egyik képviselője. Ezek az enzimek diszulfid/ditiol-csoport és  $\text{NAD(P)(H)}$  közötti elektronátvitelt katalizálnak FAD prosztetikus csoport közreműködésével (15). Fiziológias körülmények között a LADH DHLA oxidációját katalizálja  $\text{NAD}^+$  redukciójának terhére megfordítható reakcióban (5, 16).

A LADH-reakció ping-pong kinetikát követ (17). A fiziológias reakció (forward irányú LADH-reakció) sebesség meghatározó lépése az első félreakció (17), melynek során az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenázok E2-alegységéhez vagy a GHR H-fehérjéjéhez egy

lizin aminosav oldalláncon keresztül kovalensen kötött DHLA-kofaktor, mint szubsztrát, a LADH aktív centrumában oxidálódik. Ezzel párhuzamosan a kezdetben oxidált enzim ( $E_{ox}$ ) két elektron felvételével redukálódik és  $EH_2$  állapotba kerül (17, 18). A második félreakció csak azt követően veszi kezdetét, hogy az oxidált LA elhagyja az aktív centrumot és a másik szubsztrát, a  $NAD^+$  bekötődik. Az  $EH_2$   $NAD^+$  általi oxidációja rendkívül gyors lépésben történik (17).

A LADH-reakció mechanizmusát már az enzim kristályszerkezetének megismerése előtt részletesen feltérképezték. A katalitikus ciklus egy FAD proszтетikus csoport (17), egy aktív centrumbeli redox-aktív diszulfid-kötés (18-23) és egy katalitikus bázis (24, 25) közreműködésével valósul meg. A DHLA szubsztrát az aktív centrumba érve a katalitikus bázis közreműködésével deprotonálódik és ezáltal erős nukleofillé válva képes lesz az enzim diszulfid-csoportjával reagálni (24). Ennek eredményeként az enzim-diszulfid felnyílik és a szubsztráthoz közelebbi cisztein (FAD-tól távolabbi, „disztális” pozíciójú cisztein) S-atomja és a DHLA egyik S-atomja között egy kevert diszulfidkötés alakul ki [lásd 3. ábra, (2) *intermedier*, (15, 26, 27)]. A szubsztrát másik elektronja (és átmenetileg protonja) az enzim-diszulfid másik ciszteinjének (FAD-hoz közelebbi, „proximális” elhelyezkedésű cisztein) S-atomjára kerül, majd az oxidált LA termék elhagyja az aktív centrumot. A kialakult két elektron által redukált LADH ( $EH_2$  forma) valójában több tautomer egyensúlyi keverékét jelenti [3. ábra, (3-4) *intermedier*], melyben a két elektron az aktív centrumban a két cisztein tiolcsoportja és a FAD között oszlik meg. A domináns  $EH_2$  állapot a proximális cisztein tiolát-anionja és a FAD között megvalósuló ún. töltésátviteli komplex [3. ábra, (4) *intermedier*, (15, 17-19, 28-30)]. A protonált aktív centrumbeli bázis fontos szerepet játszik a tiolát és ezáltal a töltés-átviteli komplex stabilizálásában (31, 32). Ezt követően a  $NAD^+$  a redukált LADH-hoz kötődve a FAD/FADH<sub>2</sub> rendszer redoxpotenciáljának változtatásán keresztül elősegíti a tiol-csoportokról az elektronok FAD-ra történő átadását és egy FADH<sub>2</sub>- $NAD^+$  töltésátviteli komplex alakul ki [3. ábra, (5) *intermedier*, (28, 29, 32-35)]. A katalitikus ciklus a  $NAD^+$  két elektronos, hidridion ekvivalens általi redukációjával zárul ( $H^+$  felszabadulás mellett). A  $NAD^+$  jelenléte nélkül a FAD proszтетikus csoporton teljesen redukált állapotba [3. ábra, (7) *intermedier*] történő tautomerizáció lassú folyamatnak mutatkozott (36), ugyanakkor *E. coliban* ezt a lehetséges  $EH_2$ -állapotot is leírták (37) (lásd még 1.1.3. A fiziológiás aktivitáson túl fejezet).



**3. ábra. A LADH által katalizált reakciók.** A LADH katalitikus aktivitásához szükséges aktív centrumbeli csoportok: „enzim-diszulfid/ditiol” csoport [S-S/(SH)<sub>2</sub>], FAD prosztetikus csoport és egy katalitikus bázis (B). X jelöli az enzim-ditiol csoporttal (különböző mechanizmussal) reagáló anyagokat (arzenit, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, fenil-higany-acetát), melyek a LADH fiziológiás aktivitását gátolják, míg ROS-képző és/vagy diaforáz aktivitását fokozzák. A piros nyilak az alternatív elektronakceptorok révén megvalósuló reakciókat, azaz a diaforáz és ROS-képző reakciókat jelölik, melyek közül az utóbbi van feltüntetve. Az *E. coli* LADH enzimben a DHLA is képes az enzim négy elektronnal történő redukciójára, feltételezhetően a (7) intermedieren keresztül, ez azonban nincs feltüntetve.

DHLA és NAD<sup>+</sup> szubsztrátokkal, azaz a forward irányú LADH-reakció során tehát az elektronok először egy aktív centrumbeli diszulfidra, majd (egy töltésátviteli komplexen keresztül) a FAD prosztetikus csoportra, végezetül a NAD<sup>+</sup>-ra kerülnek, a katalitikus ciklus a 3. ábrán bemutatott (1) → (6) intermedierek közreműködésével zajlik (18, 19). A fordított (reverz) irányú, NADH általi redukcióban azonban az elektronok enzimen belüli átadása ellenkező irányban történik: elsőként a FAD redukálódik és csak ezt követően alakul ki a FAD-tiolát töltésátviteli komplex és a ditiol forma (18, 19). Ez a katalitikus ciklus megszakítható és egyúttal a LADH-reakció gátolható az aktív centrumbeli ditiollal különböző mechanizmussal reakcióba lépő ágensek segítségével [lásd 3. ábra, (8) és (9) állapot, az inhibitorok hatás-

mechanizmusainak megkülönböztetése nélkül]. Irreverzibilis gátlás érhető el arzenittal ditioarzenit képeződése és hidroxidion felszabadulása mellett [(18-20), bár a pontos mechanizmus vitatott],  $\text{Cd}^{2+}$ -ionokkal (19) vagy fenil higany-acetáttal (23) merkaptid képződés mellett, valamint  $\text{Cu}^{2+}$ -ionokkal történő oxidációval (21, 22). Ezzel ellentétben a  $\text{Zn}^{2+}$  komplexálódása (ahol a koordinációban az enzim-ditiol mellett nem kizárható a katalitikus bázis közreműködése sem) reverzibilis gátlással jár (30). Látható, hogy a gátlószerek nem minden esetben okoznak elektronleadást, ugyanakkor a reakció hatására a LADH NADH hiányában az oxidált enzimre jellemző spektrális tulajdonságokat mutat [3. ábra, (8) állapot].

A fiziológias aktivitás gátlásának másik lehetősége az enzim teljes, négy elektronnal történő redukciója (18). A fiziológias DHLA szubsztrát jellemzően még nagy feleslegben sem képes a katalitikusan inaktív  $\text{EH}_4$  állapot [3. ábra, (10) *intermediér*] kialakítására (kivéve az *E. coli* LADH esetén), ezzel szemben ez NADH hatására hatékonyan megtörténik (18, 38). A reverz LADH-reakcióban a  $\text{NAD}^+$  jelenléte aktiváló hatással bír, az  $\text{EH}_4$ -LADH állapot destabilizálása és az  $\text{EH}_2$ -állapot fenntartása révén (18, 38-40). A  $\text{EH}_2/\text{EH}_4$  formák közti megoszlás, és az azt befolyásoló NADH/ $\text{NAD}^+$  arány tehát lényeges szabályozó szereppel bír (14). Az E3-alegységen keresztül ily módon megvalósuló szabályozás kitüntetett szereppel bírhat egyes fajokban, pl. *E. coli* LADH esetén, ahol a PDHk nem szabályozódik foszforiláció útján. Ezt az elképzelést alátámasztja, hogy az *E. coli* LADH, más fajok LADH enzimeivel összehasonlítva rendkívül könnyen redukálható  $\text{EH}_4$  állapotba (13, 14, 38).

### 1.1.3. A fiziológias aktivitáson túl

Az izolált LADH a dehidrogenáz aktivitása mellett, a fiziológiástól eltérő alternatív elektronakceptorok használatával diaforázként (16, 41) és oxidázként (30, 42-44) is működhet. Diaforáz aktivitáson a NADH oxidációját értjük különböző mesterséges szerves vagy szervetlen elektronakceptorok (pl. 2,6-diklórfenol-indofenol vagy ferricianid) felhasználásával. Az oxidáz-reakció a fiziológias reakcióhoz hasonlóan mind forward irányban DHLA szubsztráttal, mind pedig reverz irányban NADH szubsztráttal is végbemehet, a végső elektronakceptor azonban a molekuláris oxigén. Az oxidáz-reakció reaktív oxigén származékok (ROS), szuperoxid-anion ( $\text{O}_2^-$ ), valamint hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) képzését eredményezi (30, 42-44) és ezáltal

patológiás jelentőségű. Ezt hangsúlyozandó, az oxidáz-aktivitásra a továbbiakban ROS-képző aktivitásként utalok.

A diaforáz és a ROS-képző aktivitás sok tekintetben hasonlóságokat mutat. Mind a diaforáz (21-23), mind pedig a ROS-képző (30) aktivitás növekedett, amennyiben a redukált LADH aktív centrumbeli tiol-csoportjait specifikus ágensekkel – kétértékű kationokkal ( $\text{Cu}^{2+}$  (21, 22),  $\text{Zn}^{2+}$  (30)), fenilhigany-acetáttal (23) – reagáltatták. A mechanizmus tekintetében tehát fontos közös vonás, hogy – ellentétben a fiziológiás reakcióval (lásd *1.1.2. A LADH-reakció mechanizmusa*) – sem a diaforáz, sem pedig a ROS-képzés nem igényli az aktív centrum redox-aktív diszulfidjának közreműködését [lásd *3. ábra*, (21-23, 30)]. A diaforáz és a ROS-képző aktivitás szempontjából az enzim FAD-on teljesen redukált állapota a meghatározó (21-23, 30, 36). Ezzel összhangban van, hogy az erősen redukáló körülmények között kialakuló  $\text{EH}_4$ -LADH forma képes diaforázként és oxidázként is működni (30, 36, 43, 45), az  $\text{EH}_2$ -állapothoz képest jellemzően nagyobb sebességgel: *Mycobacterium tuberculosis* LADH enzimét vizsgálva az  $\text{EH}_4$ -forma diaforáz- és ROS-képző aktivitás tekintetében rendre 90-, ill. 40-szeres reakciósebességet mutatott az  $\text{EH}_2$ -állapothoz képest, ezzel szemben az  $\text{EH}_2$ -LADH két nagyságrenddel nagyobb sebességgel volt képes redukálni a lipoát-szubsztrátot az  $\text{EH}_4$ -formához képest (36). További hasonlóságot jelent, hogy a pH csökkenés hatására a LADH diaforáz (46, 47) és ROS-képző aktivitása (44, 48) egyaránt jelentősen növekszik. Az enzim szubsztrát preferenciájának pH csökkenés hatására bekövetkező változását kezdetben a LADH-homodimer disszociációjának és egy diaforáz/oxidáz aktivitású monomernek tulajdonították (47). Extrém kísérleti körülmények között – pl. erősen savas közegben vagy nagymértékű hígítás hatására (47), apomerizáció, denaturáció, anaerob körülmények között NADH jelenlétében történő fagyasztás, magas sókoncentráció (49), ill. kémiai módosítások (50) hatására – valóban megfigyelhető a LADH-dimer disszociációja, miközben a felszabaduló monomerek diaforáz-aktivitása megmarad (47, 49, 50). A későbbiekben azonban bizonyítást nyert, hogy patológiásan releváns acidózis nem vezet a humán (h) LADH homodimer disszociációjához, tehát ez a mechanizmus nem állhat a pH-csökkenés hatására bekövetkező ROS-termelés fokozódás hátterében (44).

A LADH nem csak önmagában, hanem enzimkomplexek, elsősorban a KGDHk részeként is képes ROS-képzésre (51-53). A hKGDHk a mitokondrium egyik

legjelentősebb ROS termelője és ezáltal az oxidatív stressz fontos kialakítója, ezzel szemben a hPDHk általi ROS-képzés csak *in vitro* körülmények között mutatkozott számottevőnek (53-56). A hKGDHk ROS-képző aktivitása elsősorban a LADH-nak (51, 53), kisebb mértékben pedig a hE1<sub>KGDHk</sub>-alegységnek, ill. a (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplexnek (54) tulajdonítható. Az izolált E2<sub>KGDHk</sub>-alegység ROS-képzésének vizsgálatáról nem számol be a szakirodalom, az E2-alegységhez kötött lipoát-kofaktor szuperoxid-képzésben való közreműködése annak pro-oxidáns tulajdonsága miatt nem zárható ki (57, 58). Egyes kutatócsoportok (59) azonban vitatják a lipoil-gyök ROS-képző tulajdonságát, mivel sertésből izolált KGDHk szuperoxid-képzése a FAD kémiai módosításával – a redukált lipoát-kofaktor felhalmozódása ellenére – felfüggeszthető volt (51), továbbá amiért a hE1<sub>KGDHk</sub>-alegység a (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplexszel összemérhető szuperoxid-termelő aktivitást mutatott (54). A hKGDHk fokozott ROS-képző aktivitással bír a fiziológias elektronakceptor (NAD<sup>+</sup>) hiányában a forward irányban, valamint megnövekedett NADH/NAD<sup>+</sup> arány vagy acidózis esetén a reverz irányban (44, 52, 53), mely állapotok különböző kórélettani folyamatokban, pl. iszkémia, Komplex I. elégtelenség vagy magas kalóriabevitel esetén fordulhatnak elő (60-62). Ezen felül a fent tárgyalt, fokozott LADH általi ROS-képzéshez vezető körülmények közül a Zn<sup>2+</sup> indukáló hatásának iszkémia-reperfúzióban és Alzheimer-kórban lehet jelentősége (30, 60).

A KGDHk nem csak előidézője, de célpontja is az oxidatív stressznek és a mitokondriális ROS termelés hatására, ill. ahhoz kapcsolódóan működése gátlódik. A KGDHk aktivitásának csökkenése megfigyelhető volt szuperoxid hatására patkányból származó izom kivonatban (63), valamint H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására tengerimalac szinaptoszóma preparátumban (64, 65), ill. patkány szívizomsejtben (66). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> KGDHk-ra kifejtett inaktíváló hatását reverzibilisnek találták, továbbá mind az inaktíválódás, mind pedig az aktivitás visszanyerése háttérben a mitokondriális redox státusz modulálását feltételezték, ugyanis csak intakt mitokondriumban volt megfigyelhető a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelés hatására bekövetkező enzimaktivitás csökkenés, ill. az enzimaktivitás visszanyerése a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalázzal történő elbontását követően, szolubilizálószer jelenlétében nem (66). Későbbi tanulmányok a reverzibilis inaktíválódás háttérben egyrészt az E2-alegység lipoát-kofaktorán bekövetkező glutationálódást (67), továbbá a LADH-alegység ciszteinjeinek tioból szulfén funkcióscsoporttá (R-SOH) való oxidálódását írták le



[(68), bár ez utóbbi tanulmány nem szolgál közvetlen, tömegspektrometriás bizonyítékkal arra vonatkozóan, hogy az enzim hat ciszteinje közül a katalízisben ténylegesen résztvevő ciszteinek szulfenálódása bekövetkezne]. Az oxidatív stressz a lipidperoxidáció révén ugyancsak gátolja a KGDHk-t (és a PDHk-t). A lipidperoxidáció fragmentációs termékei közül a 4-hidroxi-2-nonenal az enzimkomplexek E2-alegységének lipoát-kofaktorával reakcióba lépve gátolja az enzimaktivitást (69), későbbi tanulmányok ezen felül a LADH-val való addukt képződést is leírták (70), a pontos mechanizmus azonban ez utóbbi esetben nem ismert. A KGDHk, ill. a LADH reaktív nitrogén származékok általi gátlásával kapcsolatban ellentmondó eredmények születtek: patkányból származó izomkivonatban nitrogén-monoxid hatására nem volt megfigyelhető a KGDHk aktivitásának csökkenése (63), egér mikrogliaiban ezzel szemben az enzimkomplex inaktiválódását írták le nitrogén-oxid és peroxinitrát hatására is az E1- és az E2-alegységek tirozin aminosavak oldallánci nitrálódása következtében, a LADH-alegység érintettsége nélkül (71). Égési füstnek kitett patkány hippocampusából (72), ill. spontán hipertenzív patkány vesevelőjéből származó mintákon (73) ezzel ellentétben kimutatták a LADH nitrálódását, mely a vizsgált, reaktív nitrogén származékok képződésével járó állapotokban patológiás jelentőséggel bírhat.

#### **1.1.4. Fehérjeszerkezet a funkció tükrében**

Ugyan a LADH fiziológias reakciómechanizmusát már a szerkezet ismerete előtt leírták, az aktív centrum felépítéséhez és ezáltal a reakciómechanizmus teljes körű jellemzéséhez szükséges volt az enzim kristályszerkezetének meghatározása. A LADH szerkezetének leírását megelőzte és egyfajta mérföldkőnek tekinthető a piridin-nukleotid-diszulfid-oxidoreduktáz enzimsalád egy másik képviselőjének, a glutation-reduktáznak (GR) a kristályosítása és röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározása (74-77). A kristályszerkezet lehetővé tette nemcsak a LADH-reakcióval analóg GR-funkció értelmezését, hanem a későbbiekben (a viszonylag alacsony, 26% szekvencia homológia ellenére) az *Azotobacter vinelandii* LADH kristályszerkezetének molekuláris helyettesítésen alapuló meghatározását is (78, 79). A következő években számos faj, többek között a humán LADH enzim kristályszerkezetét is publikálták (80-94). A

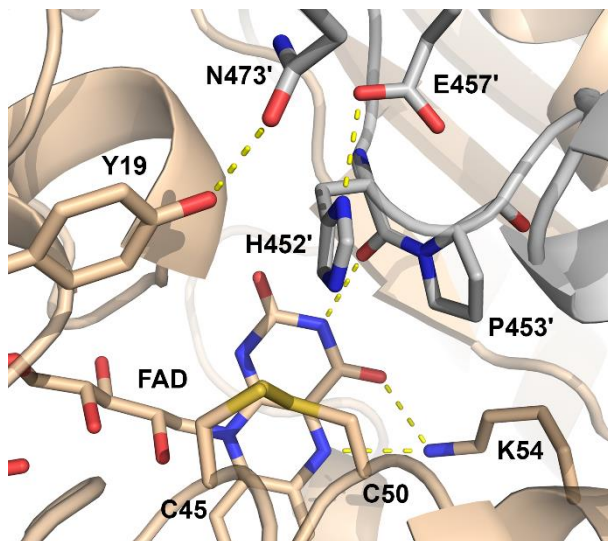
továbbiakban a szerkezet ismertetése során a humán, (35 aminosav hosszúságú) mitokondriális szignálszekvencia nélküli fehérje számozását követem.

A LADH fehérje egy homodimer, amelyet két ~50 kDa molekulatömegű alegység alkot. A monomerek viszonya kétfogású tengelyszimetriával írható le. A hLADH monomerek négy doménre tagolódnak, megkülönböztethetünk FAD-kötő (Ala1-Gly149),  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ -kötő (Ser150-Pro282), központi (Phe283-Asp350) és dimerizációs (Tyr351-Phe474) doméneket (91).

Az aktív centrum legfőbb elemei – FAD prosztetikus csoport, egy aktív centrumbeli redox-aktív diszulfid-kötés és egy katalitikus bázis – a korábbi spektroszkópai és enzimkinetikai mérések révén már ismertek voltak az első LADH (és a GR) szerkezetének leírásakor (lásd előző fejezet, 1.1.2. *A LADH-reakció mechanizmusa*). A kristályszerkezetek ismerete azonban lehetővé tette a már ismert funkció értelmezését a szerkezet függvényében. Bebizonyosodott, hogy a LADH homodimer funkcionális vagy más néven obligát homodimer, mivel két, egymástól térben elkülönülő aktív centruma a dimerizációs felszínen helyezkedik el, felépítésükben és a katalitikus reakcióban mindkét monomer aminosav oldalláncai szerepet játszanak. Az egyik monomer szolgáltatja az aktív centrumot felépítő aminosavak döntő többségét, beleértve a redox-aktív Cys45-Cys50 diszulfidot, a FAD-prosztetikus csoportot és az azt stabilizáló aminosavak döntő többségét, valamint a  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ -kötőhelyet. A másik monomer adja a katalitikus bázisként azonosított His452'-t (a ' szimbólum a szomszédos monomerhez tartozó aminosavakat jelöli) és az annak megfelelő konformációját, valamint pKa értékét befolyásoló aminosavakat (lásd alább) [4. ábra, (79, 91)]. A FAD prosztetikus csoport központi szerepet játszik az aktív centrum felépítésében. A kristályszerkezetek alapján az aktív centrumbeli Cys45-Cys50 diszulfid és His452' és ezáltal a DHLA kötőhelye az izoalloxazin gyűrűrendszer *si* oldalán, míg a  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$  kosubsztrát kötőhelye a *re* oldalon helyezkedik el. A ping-pong kinetikát követő enzimreakció redukív és oxidatív félreakciója tehát térben elválasztva, a FAD izoalloxazin gyűrűrendszerének két ellentétes oldalán valósul meg (79, 91).

Az aktív centrumban a Cys45-Cys50 diszulfid szerkezete (4. ábra) egyértelműen alátámasztja a két cisztein eltérő szerepét a katalízisben: a Cys45 tiol csoportja a FAD-tól távolabb („disztális” tiol), a szubsztrátkötőhelyet alkotó üregben található és ezáltal

ez felel a DHLA szubsztráttal a vegyes diszulfid kötés kialakításáért, míg a Cys50 tiolcsoportja a FAD izoalloxazin gyűrűjének C4 $\alpha$  atomjához közel helyezkedik el térben („proximális” tiol), így ez felelős a töltésátviteli komplex kialakításáért (15, 79, 91). A kristályszerkezetek alapján azonosított, majd a későbbiekben mutagenézis kísérletekkel (31, 32, 95) is bizonyítottan katalitikus bázisként funkcionáló His452' az aktív centrumba a Cys45 felé nyúlik. A His452' megfelelő orientációjának kialakításához kitüntetett jelentőséggel bír a His452'-Pro453' peptidkötés *cisz*-konfigurációja és a Glu457' oldallánci karboxilcsoportjával kialakított H-híd (79, 91). Ez utóbbi kölcsönhatásnak egy további szerep is tulajdonítható: a Glu457' elektronszívó hatása feltehetőleg nélkülözhetetlen a His452' imidazols csoportjában található  $\epsilon$ 2N-atom pKa értékének beállításában és ezáltal a DHLA szubsztrát hatékony deprotonálásában (32, 95).



**4. ábra. A hLADH aktív centruma.** Az aktív centrum a FAD *si* oldalán helyezkedik el, felépítéséhez és a katalízishez mindkét monomer szolgáltat aminosav oldalláncokat, melyek a hLADH szerkezetében (PDB kód: 6I4Q) pálcika ábrázolásban láthatóak. A köztük megvalósuló, katalitikus aktivitáshoz szükséges H-hidakat sárga szaggatott vonal jelzi. A homodimer A és B monomerjeihez tartozó aminosavak rendre bézs és szürke színűek.

Az aktív centrum két útvonalon közelíthető meg a LADH enzimben: egy hidrofób, ~10 Å hosszúságú és egy 20 Å-nél is hosszabb, hidrofilebb csatornán keresztül (27, 96). A két csatorna egymás folytatásának tekinthető, lefutásuk megközelítőleg merőleges egymásra. Mindezzel együtt a DHLA szubsztrát kötődését röntgenkristallográfiával nem sikerült tanulmányozni. Fiziológiás körülmények között

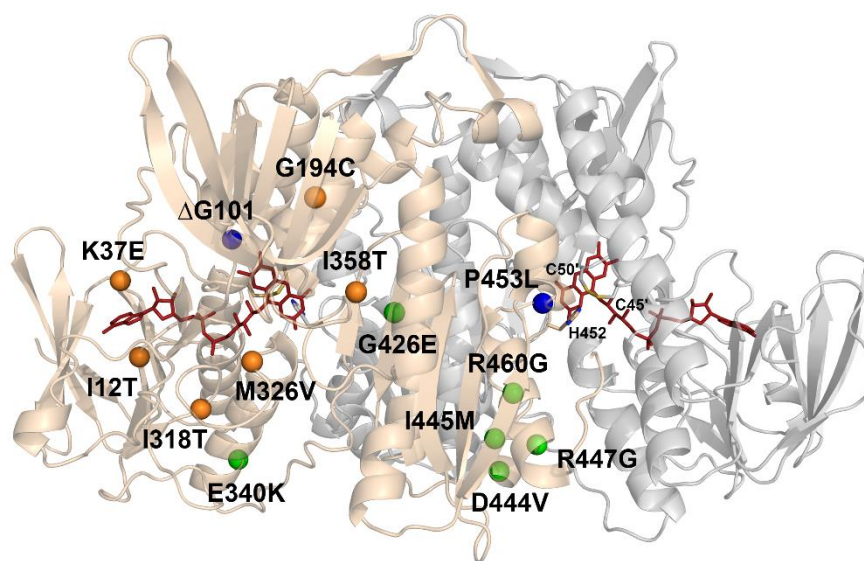
a LADH szubsztrátja a fentebb említett multienzim komplexek specifikus E2-alegységeihez egy lizin oldalláncon keresztül savamid kötéssel kapcsolódik. Az így kialakuló lipoil-lizin-csoport egy megközelítőleg 14 Å hosszúságú, flexibilis molekularész (1). A szubsztrátmolekula hossza és hidrofób karaktere egyértelműen meghatározza a LADH-beli kötőhelyét, a hosszú, hidrofil csatornán keresztül az E2-alegységhez kötött lipoát ugyanis nem lenne képes elérni az aktív centrumot. de Kok és mtsai. a *Pseudomonas fluorescens* LADH szerkezetét (81) alapul véve számítógépes dokkolási kísérlettel modellezték az (R)-DHLA szubsztrát bekötődését. A modellezés alapján valószínűsíthető, hogy a DHLA az S8-atomján keresztül létesíti a Cys45-DHLA kevert diszulfidkötést a redukív félreakció intermedier molekulájában [3. ábra, (2) intermedier] (27). A szubsztrát felismerésében és kötésében résztvevő aminosavakat konzerválnak találták a különböző fajokban, ami alátámasztja a feltételezett kötőmódot (27). Ugyanezen kutatócsoport a hosszabb, a DHLA-kötőhelyhez viszonyítva megközelítően merőleges lefutású csatornával kapcsolatban azzal a feltételezéssel élt, hogy az az aktív centrumból kivezetésül szolgálhat vízmolekulák számára, amelyeket a szubsztrát a bekötődéskor az aktív centrumból fizikailag kiszorít (27) és/vagy  $H^+/H_3O^+$  számára, ami az enzimreakcióban a  $NAD^+$  redukciójakor felszabadul ( $NADH + H^+$ ) (96).

A  $NAD^+/NADH$ -kötőhely a FAD izoalloxazin gyűrűjének *re* oldalán található. Ellentétben a DHLA szubsztráttal, mind a  $NAD^+$ , mind pedig a NADH kötődése tanulmányozható volt különböző fajokból származó LADH kristályszerkezetekben (80, 91). Megállapítást nyert azonban, hogy az oxidált LADH a nikotinamid kötőhely hidrofób karakteréből kifolyólag a NADH kötődésének kedvez (80, 91), így a kristályszerkezetekben csak a NADH esetén volt megfigyelhető a nikotinamid gyűrű és a FAD izoalloxazin gyűrűjének egymáshoz illeszkedő, párhuzamos elrendeződése (91), mely lehetővé teszi a hidridion-transzfert az enzimreakció során. Ez a megfigyelés a ping-pong mechanizmust újfent bizonyító krisztallográfiai eredményként fogható fel.

## 1.2. A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz-deficiencia

### 1.2.1. A betegség háttere és klinikai tünetei

A hLADH deficienciája, az ún. E3-deficiencia egy ritka, autoszómális recesszív öröklődésű genetikai kórkép (97-100). A betegség megjelenése az askenázi zsidó populációban a leggyakoribb (~1:40000), elsősorban a hLADH-t kódoló *DLD* gén G194C szubsztitúcióhoz vezető mutációja következtében, melyet az említett populáció megközelítőleg 1%-a hordoz (101). A klinikai irodalom 14 betegséget okozó *DLD* mutációról számol be, amely szubsztitúciót vagy deléciót hordozó hLADH variáns kifejeződéséhez vezet (97-112). Ezek a hLADH kristályszerkezetének ismeretében csoportosíthatóak aszerint, hogy az enzimszerkezet mely funkcionálisan meghatározó részét érintik: az I12T, K37E, G194C, I318T, M326V, I358T aminosavcserék a kofaktor-kötő régiókban, a P453L és a G101del az aktív centrumban vagy annak közelében, míg az E340K, G426E, D444V, I445M, R447G és R460G szubsztitúciók a dimerizációs felszínen jönnek létre (5. ábra).



**5. ábra. A LADH betegséget okozó mutációi.** A patogén aminosav cserék és egy deléció helye a vad típusú hLADH szerkezet (PDB kód: 6I4Q) egyik monomerében vannak feltüntetve. Az érintett aminosavak Ca atomját jelző gömbök az enzim funkcionális régiói szerint különböző színűek: kék – aktív centrum, narancssárga – kofaktor-kötőhely, zöld – dimerizációs felszín. A hLADH homodimer A és B monomerei rendre bézs és szürke színűek. A FAD prosztetikus csoport, a Cys45-Cys50 diszulfid híd és a His452' katalitikus bázis pálcikás ábrázolással van megjelenítve.

A hLADH alulműködése vagy hiánya számos, a korábbiakban ismertetett metabolikus utat érint egyidejűleg (lásd 1. ábra). A hPDHk alulműködése miatt a felhalmozódó piruvát a citromsav ciklust tápláló acetyl-CoA helyett laktát képződés irányában alakul tovább, ami nem csak acidózishoz, de a citoszólikus NADH/NAD<sup>+</sup>-arány csökkenéséhez és ezáltal a glukoneogenezis gátlásához is vezet. A hKGDHk funkcióvesztése a citromsav ciklus alulműködését és ezáltal általános energiadeficit kialakulását okozza a mitokondriumban és lényegében mind a lebontó, mind pedig a felépítő folyamatok károsodását eredményezi. Mindezek mellett a hELKDHk alulműködése következtében az elágazó szénláncú aminosavak felhalmozódnak a vérben és a cerebrospinális folyadékban, ami súlyos mentális károsodáshoz vezethet.

Az E3-deficiencia fenotípusos megjelenése rendkívül változatos. A korai, akár már pár napos korban jelentkező E3-deficienciára a metabolikus eltérések (laktát acidózis, hipoglikémia, hiperammonémia) mellett jellemző a neurológiai érintettség (letargia, a megfelelő izomtónus hiánya, görcsös rohamok, pszichomotoros zavarok, ataxia, mikrocefália, enkefalopátia, visszamaradott fejlődés, Leigh-szindróma stb.) és a korai halál (97-99, 101, 103-108, 113). A D444V- és R447G-hLADH variánsokkal összefüggésben a neurológiai tünetek mellett hipertrófiás kardiomiopátiát is leírtak (103, 108). A betegség másik jellegzetes formáját elsődlegesen epizodikusan jelentkező májelégtelenség jellemzi, mely elsősorban a G194C mutációra homozigóta betegekben megfigyelhető. Az akut májelégtelenség során fellépő metabolikus dekompenzáció és hepatikus enkefalopátia a betegek halálához vezethetnek, ugyanakkor elmondható, hogy az E3-deficienciának ezen formája esetén a betegek várható élettartama hosszabb, a tünetek első megjelenése pedig gyakran a későbbi évekre tehető (97, 99, 101, 109, 110, 114). Mindezek mellett újabban az E3-deficiencia miopátiás fenotípusáról is beszámoltak az I445M- és G426E-hLADH variánsokhoz kapcsolódóan, melynek során az epizodikusan jelentkező rosszullétek a betegek életminőségét lényegesen kisebb mértékben befolyásolták (111, 112).

### **1.2.2. A betegség hátterében álló patomechanizmusok**

Az E3-deficienciában szenvedő betegek szövetmintáiban, valamint a rekombináns úton előállított patogén hLADH variánsokkal *in vitro* mért LADH-aktivitás különböző mértékben csökkent a vad típushoz képest, mind a forward, mind pedig a reverz irányú

reakcióban (lásd *1. táblázat*). A vizsgált szövetmintákon a hLADH csökkent mennyisége volt kimutatható Western blot technikával (kivételet egyedül az I445M mutációt homozigóta formában hordozó beteg jelenti, az I318T/G101del és I358T/splice variáns mutációkat hordozó betegekből származó szövetmintákon pedig nem végeztek ezirányú vizsgálatot; hivatkozásokért lásd *1. táblázat*). A betegekből származó mintákból mért és teljes szöveti fehérjére vonatkoztatott enzimaktivitás részben tehát az enzimvariáns csökkent mennyiségéből is adódik, ami hibás feltekeredés vagy instabilitás következménye és hozzájárul a patogenezishez.

A betegekből származó mintákban mérhető LADH-aktivitás csökkenés mértéke azonban többnyire nem korrelál a tünetek súlyosságával (97, 103). Feltételezhető tehát, hogy egyéb súlyosbító mechanizmusok is hozzájárulnak a patogenezishez. Az eddigi kutatási eredmények alapján ilyen mechanizmus lehet potenciálisan a hLADH egyes patogén variánsainak megnövekedett ROS-képző aktivitása (115, 116) (különösen acidózisban (115), amely az E3-deficiencia egy jellegzetes tünete), a hLADH-mutánsokat tartalmazó enzimkomplexek disszociációja (92, 117), fokozva a komplexek betegekből tapasztalt alulműködését (lásd *1. táblázat*), valamint a hKGDHK tekintetében az esetleges disszociáció után visszamaradó E1-E2-alkomplex erőteljes ROS termelése (54).

#### **1.2.2.1. A LADH-aktivitás csökkenése**

A hLADH betegséget okozó mutációi különböző mértékű katalitikus aktivitás csökkenést eredményeznek (lásd *1. táblázat* és a benne feltüntetett hivatkozások). A rendelkezésre álló LADH-aktivitás értékek összehasonlíthatóságát azonban több tényező is megnehezíti: i.) a betegekből származó szövetminták többször eltérő típusúak/eredetűek, ii.) a betegekből származó mintákban mérhető csökkent aktivitáshoz hozzájárul az enzimfehérje csökkent mennyisége is, iii.) mind a betegekből származó minták, mind pedig a rekombináns úton előállított fehérjék aktivitás méréséről beszámoló publikációk meglehetősen következtelnek azt illetően, hogy a LADH enzimaktivitást a forward vagy reverz irányú reakcióval jellemzik-e (ritka esetben történik csak meg a mérés mindkét reakcióirányban), iv.) az alkalmazott kísérleti körülmények gyakran meglehetősen eltérőek.

**1. táblázat E3-deficiens betegekből származó szövetmintákban, illetve rekombináns fehérjével mért enzimaktivitások.** Jelölések: F=fibroblaszt, I=vázizom, L=limfocita, M=máj, ND=nem detektálható, RF=rekombináns fehérje, Sz=szívizom, fs=leolvasási keret eltolódás (frame shift), #= a számozás a 35 aminosav hosszúságú mitokondriális szignálszekvenciát is tartalmazó fehérjére vonatkozik, †=a referencia tartomány alsó értékéhez viszonyítva. A két allélon különböző mutációt hordozó betegekből származó adatok csak az egyik mutáció kapcsán vannak ismertetve. Az idő előtti terminációt (Y35X<sup>#</sup> és I5Lfs\*4), ill. a splicing zavarából adódóan instabil és nem átíródó mRNS-t (IVS9+1G>A) okozó mutációk esetén a másik allél mutációja határozza meg a fenotípust.

Aminosav-csere	Enzimaktivitás (% a kontrollhoz képest)					Vizsgált minta	Beteg genotípusa	Hivatkozás
	LADH-forward	LADH-reverz	PDHk	KGDHk	ELKDHk			
<b>P453L</b>	6	-	-	-	-	F	P453L/K37E	(102)
	9	4	-	-	-	RF	-	(115)
	0	-	0	ND	-	RF élesztő sejtben	-	(118)
<b>K37E</b>	20-75	126	-	-	-	RF	-	(115, 117, 119)
	92	-	88	68	-	RF élesztő sejtben	-	(118)
<b>G194C</b>	28-34 <sup>F</sup>	7-21 <sup>I</sup> , 8-33 <sup>F</sup>	11-12 <sup>I</sup> , 20 <sup>F</sup>	12-19 <sup>I</sup>	-	I, F	G194C/G194C	(101, 103, 109, 110)
	-	8-20	-	-	-	I	Y35X <sup>#</sup> /G194C	(101)
	10	30	69	44	58	F	G194C/I12T	(97)
	75-103	47-90	29	61	-	RF	-	(54, 115, 116, 120)
<b>I318T</b>	9-29	-	80	107	24	F	I318T/G101del	(98)
<b>M326V</b>	5	7	-	-	-	RF	-	(115)
<b>I358T</b>	-	29 <sup>I†</sup>	14 <sup>I†</sup> , 100 <sup>F</sup>	-	-	I, F	I358T/IVS9+1G>A	(106)
	41-100	30	-	-	-	RF	-	(115, 121)
<b>E340K</b>	9 <sup>L</sup> , 2 <sup>F</sup> , 4 <sup>Sz</sup> , 11 <sup>I</sup> , 10 <sup>M</sup>	-	13 <sup>L</sup> , 12 <sup>F</sup> , 22 <sup>Sz</sup> , 14 <sup>I</sup> , 21 <sup>M</sup>	6 <sup>F</sup> , 1 <sup>Sz</sup> , 1 <sup>I</sup> , 3 <sup>M</sup>	-	L, F, Sz, I, M	E340K/G101del	(107)
	9	28	59	25	63	F	E340K/I12T	(97)
	14 <sup>F†</sup> , 6 <sup>I†</sup> , 12 <sup>L†</sup>	-	44 <sup>F†</sup> , 14 <sup>I†</sup> , 38 <sup>L†</sup>	-	-	F, I, L	E340K/M326V	(105)
	0,2-71	71-100	38	-	-	RF	-	(92, 115-117, 122)
<b>G426E</b>	-	-	44	22	43	F	I5Lfs*4/G426E	(112)
<b>D444V</b>	-	15	0	2	-	M	D444V/D444V	(103)
	31	37-100	12	-	-	RF	-	(92, 115, 116, 123)
<b>I445M</b>	-	ND	97 <sup>†</sup>	-	-	F	I445M/I445M	(111)
<b>R460G</b>	1,5 <sup>L</sup> , 14 <sup>F</sup>	-	26 <sup>L</sup> , 11 <sup>F</sup>	20 <sup>F</sup>	-	L, F	Y35X <sup>#</sup> /R460G	(104)
	22-91	10-40	ND	-	-	RF	-	(92, 115-117, 124)
<b>R447G</b>	-	20	63	0	56	F	R447G/R447G	(108)
	-	54-92	28	-	-	RF	-	(92, 116)



### 1.2.2.2. A patogén variánsok emelkedett ROS-képző aktivitása

A vad típushoz képest szignifikánsan megnövekedett ROS-termelést mutatott az aktív centrumot érintő P453L-hLADH, a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő domént érintő G194C-hLADH, valamint a dimerizációs felszínt érintő E340K- és D444V-hLADH variáns (115). Hasonlóan tehát a hLADH fiziológiás aktivitásának változásához, a patogén hLADH variánsok megváltozott ROS-termelő kapacitása sem mutatott korrelációt a szubsztitúciók lokalizációjával (115). Figyelembe véve az E3-deficienciában gyakran tapasztalható acidózist, kiemelt jelentőségű az említett mutánsok ROS-képzésének pH függése: mind a négy patogén variáns ROS-képző kapacitása a pH csökkenés hatására a vad típushoz képest nagyobb mértékű növekedést mutatott (115). Egy másik tanulmány során az E340K-, D444V-, R447G- és R460G-hLADH mutánsokról élesztő modellben kimutatták, hogy az E2-kötött LA-kofaktor oxidatív károsodását okozzák a KGDHk és a PDHk enzimkomplexekben (D444V-homozigóta betegből származó fibroblasztokban ugyanez a hatás volt megfigyelhető) (116).

A ROS-termelő aktivitás fokozódása mellett a megfelelő mutánsok LADH-aktivitása általában – a várakozásnak megfelelően – kisebbnek adódott a kontrollhoz képest (*1. táblázat*). Összevetve a fiziológiás és a ROS-képző aktivitás változását elmondható, hogy a P453L- és G194C-hLADH a betegséget okozó variánsok két szélsőséges esetét képviselik: a P453L-hLADH fiziológiás aktivitása csaknem teljes egészében elveszett és ezzel párhuzamban a ROS-termelés jelentősen megnövekedett, ezzel szemben a G194C-hLADH mutánsban a megnövekedett ROS-képző aktivitás mellett a LADH-aktivitás gyakorlatilag nem károsodott a kutatócsoportunk által végzett kísérletek alapján (115). A P453L szubsztitúció okozta rendkívül súlyos klinikai tünetek (102) jól magyarázhatóak a LADH-aktivitás hiányával (115), amely mellett a ROS-képzés fokozódása (115) feltehetőleg másodlagos szereppel bír. Ezzel szemben a G194C szubsztitúció által kiváltott E3-deficiencia esetén gyakori a tünetek későbbi megjelenése és a hosszabb várható élettartam (101, 109, 110), amely összhangban van a megtartott LADH-aktivitás mellett megemelkedett ROS-termelő kapacitással, a fokozott oxidatív stressz okozta károsodások ugyanis valószínűleg akkumulálódnak a betegekben a korábbi, tünetmentes éveik során (115).

### 1.2.2.3. A multienzimkomplexek disszociációja

E3-deficienciában az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek diszfunkciója nem csak az E3-alegység LADH-aktivitásának csökkenéséből eredhet. A hPDHk alulműködéséhez nagy valószínűséggel hozzájárul az is, hogy egyes patogén hLADH variánsok (E340K-, D444V-, R447G-, R460G-, K37E-, P453L-hLADH) a hPDHk-ben a hLADH kötéséért felelős hE3KF-alegységhez csökkent affinitással kötődnek (92, 117). Klinikai eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az E3-deficienciában előforduló betegséget okozó aminosavcserek a hLADH hKGDH- és hELKDH-komplexekre vonatkoztatott kötődési állandóit is befolyásolják (108, 111).

Amennyiben a komplex-kötött hLADH mennyisége szuboptimális (pl. E3-deficiencia vagy acidózis esetén – ez utóbbi körülményben valószínűsítik a hLADH affinitásának csökkenését a hKGDHk-hez (44)), a (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplex ugyancsak képes lehet számottevő mennyiségben ROS-t termelni (54). A jelenség *in vitro* körülmények között az izolált alegységekből összeállított (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplexe esetén volt megfigyelhető, másik három hasonló módon létrehozott alkomplex (hPDHk, *E. coli* KGDHk, *E. coli* PDHk) E1-E2 alkomplexeire nem volt jellemző (54). Mivel az hE1<sub>KGDHk</sub>-alegység a (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplexszel összemérhető szuperoxid-termelő aktivitást mutatott (54), a mechanizmus hátterében a hE1<sub>KGDHk</sub>-alegység tiamin-pirofoszfát prosztetikus csoportjából kialakuló kation-gyök feltételezhető (125). Felmerülhet továbbá az E2<sub>KGDHk/KADHk</sub>-alegységhez kötött DHLA pro-oxidáns sajátsága is (51, 57, 58), ugyanakkor ennek jelentősége vita tárgyát képezi (59). Azon patológiás körülmények között tehát, amikor a hLADH vagy annak betegséget okozó variánsai részben vagy teljesen disszociálnak a hKGDHk-ról, nem csak a szabad vagy még komplex-kötött hLADH, ill. mutánsai lehetnek képesek ROS-képzésre (elsősorban a reverz reakcióban), hanem egyidőben, tőlük függetlenül a visszamaradó (hE1-hE2)<sub>KGDHk</sub>-alkomplex is termelhet számottevő mennyiségben ROS-t a forward reakcióban, amennyiben az  $\alpha$ -ketoglutarát szubsztrát megfelelő koncentrációban rendelkezésre áll (100).

### 1.2.3. A megváltozott enzimaktivitások háttérében álló szerkezeti eltérések

A hLADH és számos patogén variánsa cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszópiával történő összehasonlítása során szignifikáns eltérések nem voltak kimutathatóak a globális konformációban (115, 119). Ez a megállapítás a betegséget okozó variánsok egy speciális csoportjára, a dimerizációs domént érintő variánsokra is igaz volt, melyek esetén a patogenezis elsődleges okának kezdetben a funkcionális homodimer disszociációját feltételezték (91, 103, 112). Analitikai ultracentrifugálás (92), méretkizárásos kromatográfia és tömegspektrometria módszerekkel (115) bizonyították azonban, hogy az eddig vizsgált betegséget okozó dimerizációs felszín mutációk nem vezetnek a homodimer disszociációjához. Később molekuláris dinamika (MD) szimulációk (126, 127), majd hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS) analízis eredmények (128) ugyancsak ezt a megfigyelést támasztották alá.

Kizárva tehát annak lehetőségét, hogy a hLADH homodimer akár a mutáció következtében (115), akár a betegség során fellépő acidózis miatt (44) disszociációt szenvedne (lásd *1.1.3. A fiziológiás aktivitáson túl* fejezet), mind a LADH-aktivitásban, mind pedig a ROS-képző kapacitásban megfigyelt eltérések okai egyéb szerkezeti változásokban keresendők. Ennek felderítésére az eddigi egyedüli kísérletes szerkezeti eredmények egy tíz patogén mutáns elvégzett HDX-MS analízisből származnak (128). Az eredményekből fény derült arra, hogy a vizsgált tíz patogén mutáns mindegyikében számos, a FAD-kötésében résztvevő aminosavakat tartalmazó peptidszakasz hozzáférhetősége és/vagy dinamikája megváltozott (128), amely magyarázatul szolgálhat az egyes hLADH variánsokban korábban tapasztalt részleges FAD-vesztésre. Az eddig vizsgált hLADH-variánsok FAD tartalma (mol FAD/1 mol hLADH monomer egységben kifejezve): P453L-hLADH (0,66), G194C-hLADH (0,72), E340K-hLADH (0,99), D444V-hLADH (0,95), K37E-hLADH (0,76 ill. 0,67) (115, 119). A részleges FAD vesztes összefüggésbe hozható a csökkent katalitikus aktivitással, továbbá hozzájárulhat a betegséget okozó variánsok esetlegesen csökkent stabilitásához, ugyanakkor a ROS-képzéshez a FAD (feltételezhetően teljesen redukált formájában) elengedhetetlen. A FAD-kötő peptidszakaszok megváltozott hozzáférhetősége és/vagy dinamikája ugyanakkor okozhatja a FAD megváltozott reaktivitását, hiszen a prosztetikus csoport redox potenciálját annak környezete és kölcsönhatásai befolyásolják.

Összességében a négy megnövekedett ROS-képző aktivitással rendelkező patogén hLADH variánsról a következő megállapítások születtek a HDX-MS eredmények alapján: a G194C- és P453L-hLADH mutánsok esetében a fokozott ROS-termelés hátterében feltehetőleg az LA-kötő zsebben, a FAD izoalloxazin-gyűrűjének *si* oldalán bekövetkező (kismértékű) szerkezeti változások állnak; az E340K-hLADH esetében egy LA-kötő zsebhez közeli peptidszakasz elmozdulása, ill. a FAD izoalloxazin-gyűrűjének megváltozott konformációja/reaktivitása stimulálhatja a ROS-képző aktivitást; nem volt ugyanakkor kimutatható az LA-kötőhely érintettsége a D444V szubsztitúció esetében, az erősödő szuperoxid-képzésnek más mechanizmus által kell megvalósulnia, feltehetőleg a FAD prosztetikus csoport érintettségével (128).

A HDX-MS vizsgálat eredményei a hPDHk alegységeire történő disszociációjának értelmezését is elősegítették. A hLADH-hE3KF-alkomplex kristályszerkezeteinek ismeretében a D444V és R447G szubsztitúciók hatása ugyanis könnyen magyarázható, hiszen ezek az Asp444 és Arg447 aminosavak közvetlenül érintettek a komplexképzésben (92, 93), a többi patogén variáns esetén azonban távolra ható szerkezeti változásoknak kell történnie. A HDX-MS analízis révén szerkezetalapú bizonyítást nyertek korábbi disszociációs állandó mérések eredményei (92, 117, 129) öt patogén szubsztitúció esetében (E340K, D444V, R447G, R460G, K37E) (128). Emellett további három aminosavcsere (I318T, I358T és I445M) esetén kimutatható volt egyes hE3KF-kötődéshez szükséges peptidszakaszok megváltozott flexibilitása és/vagy oldószer általi hozzáférhetősége és ezáltal feltételezhető, hogy a vizsgált variánsok szintén előidézhetik a hPDHk disszociációját (128).

Jelenleg tehát az E3-deficienciához vezető mutációk molekuláris patomechanizmusának értelmezéséhez közvetlen szerkezeti információ csak HDX-MS technikának köszönhetően áll rendelkezésre. A módszer előnye, hogy a kísérletet a fiziológias állapotot közelítő oldatkörülmények között is el lehet végezni, hátránya viszont a korlátozott felbontás. A megváltozott enzimaktivitások szerkezeti hátterének jobb megértéséhez további, nagyobb felbontású adatokra lenne szükség.

#### 1.2.4. Terápiás lehetőségek

Az E3-deficiencia kezelésére jelenleg mindössze egy étrendi megköötéseken alapuló, empirikus, kombinációs megközelítés lehetséges (99, 100). Akut epizódok során a legfontosabb a metabolikus acidózis kezelése és a normoglikémia fenntartása, a rohamok sikeres megelőzésére azonban jelenleg nincs elfogadott klinikai protokoll. Kiegészítő antioxidáns-terápia alkalmazása jótékony hatású lehet a kezelés során. Kifejezetten hatásosnak bizonyulhat a liponsav antioxidáns adása, mivel az direkt módon gátolhatja a patogén hE3 mutánsok ROS-termelését, elsősorban az E3-deficienciát általában kísérő acidózisban (44). Flavinok adása ugyancsak ésszerű terápiás lehetőség lehet (109, 111, 112) elsősorban azon mutációk esetében, amelyek a hLADH FAD-tartalmának csökkenéséhez vezetnek, ehhez azonban mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* körülmények között vizsgálni szükséges a szóban forgó mutáns enzimek flavinpótlásra adott válaszát. A jövőben terápiás megoldást jelenthetne a vad típusú hLADH-val végzett ún. enzimhelyettesítő terápia, melynek hatékonyságára vonatkozóan biztató eredmények születtek egér modellben és humán sejtek vizsgálatakor (130-134).

## 2. Célkitűzések

Elsődleges célom a hLADH és betegséget okozó variánsainak röntgenkristallográfiával történő szerkezetmeghatározása volt. Az ily módon nyerhető nagy felbontású szerkezeti információ birtokában az E3-deficiencia molekuláris hátterét kívántam feltérképezni. A részletes analízis érdekében az enzim különböző funkcionális régióit érintő szubsztitúciókat egyaránt vizsgáltam. A szerkezeti eredmények értelmezéséhez célom volt a korábban a laboratóriumunkban még nem vizsgált patogén mutánsok specifikus és ROS-képző aktivitásának meghatározása is annak érdekében, hogy a különböző variánsok szerkezeti változásait azonos körülmények között mért enzimaktivitás értékekkel lehessen összevetni.

Munkám második részében a kristályszerkezetek alapján feltárt eredmények alátámasztására és a LADH-reakció eddig nem ismert részleteinek feltárására további enzimaktivitás mérések kivitelezését tűztem ki célul. Ennek érdekében a hLADH  $H^+/H_2O$ -csatornáját érintő mesterséges variánsokat hoztam létre és vizsgáltam azok specifikus aktivitását (a fiziológiás reakció forward és reverz irányában egyaránt) és a ROS-képző aktivitást.

### **3. Módszerek**

#### **3.1. Vegyszerek**

A laboratóriumi munka során alkalmazott vegyszereket molekuláris biológiai tisztaságban a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be, amennyiben másként nem kerül feltüntetésre.

#### **3.2. A plazmid vektorok előállítása**

##### **3.2.1. A vad típusú hLADH-t kódoló plazmid**

A hLADH fehérje heterológ expressziójához használt pET52b(+) típusú plazmid vektort (Novagen, Medison, WI, USA) a DNA2.0 cég (Menlo Park, CA, USA) állította elő részünkre, mely a hLADH-t kódoló *DLD* gén cDNS-ét, mint inszertet mitokondriális szignál-szekvenciát nem tartalmazó, *E. coli*-ban történő expresszióra kodon-optimalizált formában tartalmazta. Az alkalmazott plazmid vektor T7 promóter és lac operátor régiót követően tartalmazta a kérdéses gén szekvenciáját, egy N-terminális Strep affinitás címkének megfelelő DNS-szakasszal együtt, szelekciós markerként pedig a  $\beta$ -laktamáz génjét kódolta.

##### **3.2.2. *In vitro* helyspecifikus mutagenézis**

A pontmutációkat tartalmazó plazmidok előállítása a laboratóriumunkban, a vad típusú hLADH szekvenciáját hordozó plazmidot felhasználva, *in vitro* helyspecifikus mutagenézissel történt. A szükséges primereket az online QuikChange Primer Design program segítségével terveztük, majd a HPLC-tisztított oligonukleotidokat kezdetben az IBA-tól (Göttingen, Németország), majd a későbbiekben a Sigma-Aldrich-től szereztük be. Az *in vitro* mutagenézist QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis csomaggal (Agilent, Santa Clara, CA, USA), a gyártói előírásokat követve, PCR-technikával (Master Cycle Personal, Eppendorf, Hamburg, Németország) végeztünk. 15 termociklust követően a reakcióelegyet jégre téve hűtöttük, majd Dpn I enzimmel 37 °C-on 1 óras inkubáció révén emésztettük a vad típusú szekvenciát tartalmazó metilált templát DNS-t.

### 3.2.3. A plazmidok felszaporítása

A mutagenézis végtermékét, azaz a mutáns hLADH szekvenciáját hordozó plazmidokat kompetens TOP10 *E. coli* sejtekben (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) szaporítottuk fel. Ennek első lépése a plazmid vektor kompetens TOP10 klónozó *E. coli* baktériumsejtbe történő transzformációja volt, melyet a gyártói utasításoknak megfelelően végeztünk. 25 µl TOP10 sejthez 1 µl mutagenézis végterméket mértünk, majd jégen történő inkubációt követően 30 s időtartamú, 42 °C-os hősokkot alkalmaztunk. Az elegyet ezután lehűtöttük, majd 250 µl SOC táptalajon, állandó rázatás mellett 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A transzformált sejtek negatív szelekcióját 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú LB-agar táptalajra történő szélesztéssel végeztük. A 37 °C-on kb. 16 órán át inkubált táptalajokról kinőtt 1-1 jól elkülönülő telepet oltókacs segítségével 3-10 ml 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú LB-táptalajba oltottunk. Az így kapott mini kultúrákat újabb 16 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk folyamatos rázatás mellett.

### 3.2.4. Plazmid izolálás

A felszaporított hLADH-variánsokat kódoló plazmidok baktériumsejtekből történő izolálását QIAprep Spin Miniprep csomag (Qiagen, Hilden, Németország) használatával végeztük. Ehhez a baktériumsejteket centrifugálással (3 min, 6800g, 20 °C) üleptítettük, majd 250 µl RNáz-tartalmú P1 pufferben reszuszpendáltuk és 2 ml-es Eppendorf csövekbe vittük át. Ezt követően a baktériumsejteket 250 µl, alkalikus körülményeket biztosító P2 lízispufferrel feltártuk; a P2 puffer hozzáadásakor bekövetkező pH változást a reakcióelegy kék elszíneződése jelezte. 3 min elteltével 350 µl N3 puffer segítségével neutralizáltuk a reakcióelegyet, melyet a baktériumsejtek genomiális DNS-ének és fehérjetartalmának kicsapódása kísért. (5 ml-t meghaladó kultúra esetén a fenti lépések során a P1, P2 és N3 pufferekből kétszeres mennyiséget alkalmaztunk.) Az oldatfázisban maradó plazmid DNS-t centrifugálással (10 min, 17900g, 20 °C) választottuk el a csapadéktól. Az így kapott felülúszót a QIAprep 2.0 spin-oszlopra töltöttük, majd az oszlopok tartalmát 1 percig, 17900g-vel centrifugálva a plazmid DNS az oszlopon kötve maradt. (5 ml-t meghaladó kultúra esetén ez utóbbi lépést az alkalmazott oldattérfogat (kb 1,7 ml) és az oszlop térfogata (1 ml) miatt két lépésben kellett elvégezni.) Az oszlopon megkötött plazmidok esetleges endonukleáz



tartalmát 500 µl PB puffer, só tartalmát pedig 750 µl PE puffer egymást követő hozzáadásával és 1-1 percen keresztül, 17900g-vel végzett centrifugálással mostuk le az oszlopkőről. A mosás befejezésekképpen a pufferoldatok tökéletes eltávolítására további 1 min centrifugálást alkalmaztunk. Végül a plazmidot 500 µl RNáz és DNáz mentes steril vízzel eluáltuk, majd a koncentrációját NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, München, Németország) készülékkel spektrofotometriásan meghatároztuk.

### **3.2.5. Szekvencia-analízis**

A mutagenézis sikerességének igazolására a plazmid mintákat a LGC cég (Berlin, Németország) közreműködésével szekvenáltattuk. Az eredményeket a SnapGene programmal (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) ellenőriztük és a szekvenciákat a BLAST online program segítségével a vad típusú hLADH szekvenciájára illesztve bizonyosodtunk meg a pontmutációk jelenlétéről.

## **3.3. Rekombináns fehérjeexpresszió és tisztítás**

### **3.3.1. Fehérjeexpresszió**

A hLADH és variánsainak előállítására pET52b(+)/BL21(DE3) expressziós rendszert alkalmaztunk. A plazmid vektor kompetens BL21(DE3) *E. coli* sejtekbe (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) történő transzformálása 10 s időtartamú, 42 °C-os hősoikk alkalmazásával történt. Az elegy hűtését követően a baktériumsejteket 300 µl SOC médiumban rázatás mellett 1 órát 37 °C-on inkubáltuk, majd a transzformált sejtek negatív szelekcióját 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú LB-agar táptalajra történő szélesztéssel végeztük.

A 37 °C-on inkubált LB-agar táptalajról kinőtt *E. coli* sejtekből egy-egy telepet felhasználva, 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú LB tápoldatot beoltva 100 ml prekulturát készítettünk, melyet kb. 16 óra, 37 °C-on történő inkubációt követően 5 l, ugyancsak 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú baktériumkultúra előállítására használtunk. A baktériumok osztódását fotométerrel követtük nyomon. Az optikai denzitás 0,5-0,6 értékét elérve került sor a fehérjeexpresszió indukciójára izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG; VWR, Radnor, PA, USA) hozzáadásával (1 mM végkoncentrációban). Az expresszió 25 °C-on, állandó keverés mellett, 3 órán keresztül történt. Ezt követően

a kultúrákat lecentrifugálva (15 min, 7500g, 4 °C) a baktériumsejteket összegyűjtöttük és tisztításig -20 °C-on tároltuk.

### **3.3.2. Sejtfeltárás és előtisztítás**

A baktériumsejtek feltárása összesen 120 ml B-PER szolubilizálószer (Thermo Fisher Scientific) és 24 mg lizozim segítségével történt 1200 µl EDTA-mentes Halt proteáz inhibitor koktél (Thermo Fisher Scientific) és 12 µl Univerzális Nukleáz (Thermo Fisher Scientific) jelenlétében, Potter-homogenizátor használatával. A lizátumot 30 percen keresztül 4 °C-on kevertetve inkubáltuk, majd a sejtörmelékét centrifugálással választottuk el a fehérjetartalmú felülúszótól (30 min, 27000g, 4 °C). A mintához a hLADH és variánsaink stabilizálására, illetve a prosztesztikus csoporttal való esetleges telítésére 70 µl 20 mM FAD-oldatot, míg a biotinilált fehérjék kicsapására 33 µl 50 mg/ml avidint (IBA) adtunk. Végezetül 0,45 µm pórusátmérőjű steril filteren (Sartorius, Göttingen, Németország) keresztül szűrtük a fehérje oldatot.

### **3.3.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás**

A fehérjetisztítást AKTA Purifier 10 UPC FPLC készüléken (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Svédország) 3 db sorba kötött, 5 ml-es Strep-Tactin Macroprep típusú kolonnán (IBA) végeztük. Első lépésként az oszlopokat 100 ml mosó pufferrel (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris puffer, pH 8,0) ekvilibráltuk. Ezt követte a mintafelvétel, majd a fehérjeminta nem specifikusan kötődő komponenseit mosó pufferrel (350 ml) távolítottuk el az oszlopról. Az elúcióhoz 2,5 mM desztiobiotin (IBA) tartalmú eluáló puffert (115 ml) alkalmaztunk. Az oszlopok regenerálását 150 ml 1 mM hidroxizofenil-benzoészav tartalmú pufferrel végeztük, melyet végül 150 ml mosó pufferrel távolítottunk el. A kapott 10-20 ml tiszta fehérjeoldatot ezt követően Amicon Ultracel centrifuga filteren (MWCO=30 kDa; Millipore, Cork, Írország) ultraszűréssel kb. 2-5 mg/ml-re koncentráltuk (7000g, 4 °C), továbbá – amennyiben a fehérjét kristályosításra szántuk – az eluáló puffert nagy tisztaságú vízzel készített mosó pufferre cseréltük (a ciklusok számát a desztiobiotin 4000-szeres hígulásához igazítottuk). A koncentrált fehérjék tisztaságát SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztük. A fehérje preparátumokat minden esetben tömegspektrometriával is

ellenőriztük az aminosav szekvencia tekintetében. A fehérjeoldatokat felhasználásig folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően -80 °C-on tároltuk.

### **3.4. Fehérjekristályosítás**

#### **3.4.1. Kristályosítási körülmények tesztelése**

A hLADH és patogén variánsainak kristályosítási próbáit a Qiagen által forgalmazott NeXtal oldatsorozataival kezdtük. A Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) Biolaborjában rendelkezésünkre bocsájtott Gryphon kristályosító robot (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA, USA) és ülő csepp gőzdiffúziós módszerre kialakított 96-lyukú kazetták (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) használatával nagyszámú körülmény gyors és gazdaságos kipróbálására volt lehetőségünk. A kristályosítási próbákhoz jellemzően 0,1-0,3 µl fehérjeoldatot és kristályosító oldatot elegyítettünk változó arányban, majd a lezárt kazettákat 20 °C-os rázkódásmentes inkubátorban tartottuk. A NeXtal pHClear II oldatsorozat Na/K-foszfátpuffer alapú körülményei (#49-72) a D444V-hLADH esetén kristálynövekedést eredményezett. Ezek a kristályok nem bizonyultak megfelelő méretűnek és minőségűnek a röntgendiffrakciós adatgyűjtéshez, de a további optimalizáláshoz kiindulópontként szolgáltak. A vad típusú enzim és a többi variáns esetén nem kaptunk pozitív eredményt a fenti oldatkészletekkel.

A vad típusú hLADH és további mutánsainak kristályosítását a Semmelweis Egyetemen folytattuk a Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) által forgalmazott Index, Crystal, PEG/Ion és SaltRx oldatsorozataival. A 24-lyukú, ülő csepp gőzdiffúziós módszerre alkalmas kazettákon (Hampton Research) 1 µl fehérjeoldatot és 1 µl kristályosító oldatot elegyítettünk, majd a cseppeket 500 µl kristályosító oldattal körülvéve, lezárva, 20 °C-os rázkódásmentes inkubátorban tartottuk. A Hampton Research "Index" oldatsorozatának 83-85. számú körülményeiben a hLADH és legtöbb variánsa esetén kristálynövekedés volt megfigyelhető, az így kapott fehérjekristályok azonban nem bizonyultak megfelelő minőségűnek a röntgendiffrakciós tesztelés során. A G426E-, I445M- és R447G-hLADH variánsok esetén a "Crystal I." oldatsorozat 39. számú körülménye [2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 v/v% PEG 400, 0,1 M Hepes (pH 7,5)] további optimalizálás nélkül is adatgyűjtésre alkalmas kristályokat eredményezett (6.A-6.C *ábra*).

### 3.4.2. A kristályosítási körülmények optimalizálása

Röntgendiffrakciós adatgyűjtésre alkalmas D444V-hLADH fehérjekristályok előállítását a NeXtal pHClear II kizárólag Na/K-foszfát tartalmú körülményeinek optimalizálása tette lehetővé. Ennek során 2,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- és 2,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-törzsoldatokat (Merck, Darmstadt, Németország) elegyítve pH 7,0-8,1 közötti Na/K-PO<sub>4</sub> pufferoldatokat állítottunk elő, majd ezeket 1,3-2,0 M-ra hígítottuk. Az így előállított kristályosító oldatokból 0,15 µl-t elegyítettünk 0,3 µl fehérjeoldattal 96-lyukú kazettákon, melyet ezt követően 70 µl rezervoár oldattal körülvéve 20 °C-on tartottunk. 1,5-1,9 M Na/K-PO<sub>4</sub> pufferkoncentráció között a teljes vizsgált pH tartományban kristálynövekedés volt tapasztalható, ezek közül a szerkezetmeghatározáshoz használt kristály 1,6 M Na/K-PO<sub>4</sub> (pH 8,1) oldatból származott (6.D ábra). A kristályt a folyékony nitrogénben történő lefagyasztást megelőzően 1,8 M Na/K-PO<sub>4</sub> (pH 7,5), 20 v/v% glicerin (Merck) összetételű krio-védőoldatba mártottuk.

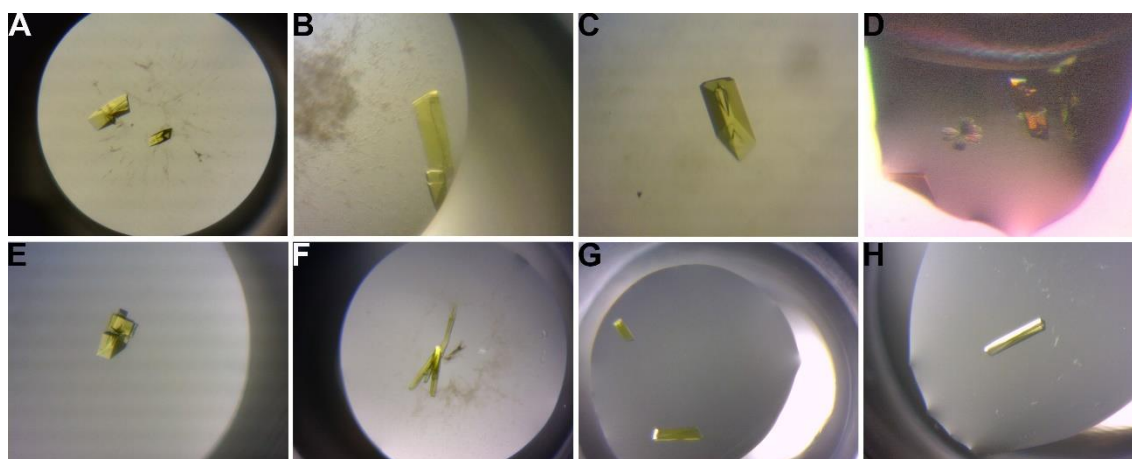
A hLADH kristályosítását az Index #83-85 oldatok összetételének optimalizálásával valósítottuk meg. Az említett oldatok összetétele: 0,2 M MgCl<sub>2</sub>, 25 m/v% PEG 3350 és 0,1 M puffer, ahol a puffer anyagi minősége és a pH-ja eltérő (#83: Bis-Tris, pH 6,5; #84: HEPES, pH 7,5; #85: Tris, pH 8,5; a feltüntetett pH értékek az oldatkészítéshez használt 1 M koncentrációjú puffertörzsoldatokra vonatkozik). Ezen körülmények optimalizálása során a pufferkomponenst és a puffertörzsoldat pH-ját (Bis-Tris esetén pH 6,5-7,45 tartományban, Tris esetén pH 7,5-8,7 tartományban, 5 M NaOH vagy HCl segítségével beállítva), továbbá a PEG 3350 vegyesszázalékos összetételét változtattuk (21-31 m/v%), míg a MgCl<sub>2</sub>-t változatlan koncentrációban alkalmaztuk. (Az 1 M puffertörzsoldatokat, a 2 M MgCl<sub>2</sub>-törzsoldatot és az 50 m/v%-os törzsoldat elkészítéséhez használt PEG 3350-et a Hampton Researchtől szereztük be, a kristályosításhoz 24-lyukú kazettákat alkalmaztunk.) A későbbiekben szerkezetmeghatározásra használt vad típusú hLADH fehérjekristály 0,2 M MgCl<sub>2</sub>, 25 m/v% PEG 3350 és 0,1 M Bis-Tris, pH 7,45 összetételű kristályosító oldatból származott (6.E ábra). Krio-védőoldatként Parabar 10312-t (korábbi nevén Paratone N, Hampton Research) használtunk.

A fent említett optimalizálási próbák ugyan egyes patogén variánsok kristályosítását is lehetővé tették, a P453L-, a G194C- és R460G-hLADH variánsok esetén a Crystal I oldatsorozat 39. számú körülményének optimalizálása lényegesen

eredményesebbnek bizonyult. Az eredeti gyártói oldatösszetételt kiindulásként használva [2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 v/v% PEG 400, 0,1 M Hepes (pH 7,5)] az optimalizálást ezúttal 0,1 M Bis-Tris vagy Hepest alkalmazva pH 6,5-7,5 tartományban, 0-30 v/v% PEG 400 és 0,2-2,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mellett végeztük. (Az 1 M puffertörzsoldatokat, a 100 v/v% PEG 400-t és a 3,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  törzsoldatot szintén a Hampton Researchtől szereztük be, az 1 M puffertörzsoldatok pH-jának beállítására 5 M NaOH-t vagy HCl-t alkalmaztunk, a kristályosításhoz 24-lyukú kazettákat alkalmaztunk.) A három patogén hLADH-variánusra az alábbi körülmények bizonyultak a legmegfelelőbbnek:

P453L-hLADH: 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.5 v/v% PEG 400, 0.1 M Hepes (pH 7,3) (6.F ábra);  
G194C-hLADH: 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 v/v% PEG 400, 0.1 M Bis-Tris (pH 6,9) (6.G ábra);  
R460G-hLADH: 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 v/v% PEG 400, 0.1 M Bis-Tris (pH 6,5) (6.H ábra).

Krio-védőoldat alkalmazására nem volt szükség sem az eredeti Crystal I #39 oldatból, sem pedig annak optimalizált változatából származó kristályok esetén.



**6. ábra.** A szerkezetmeghatározáshoz használt fehérjekristályok sztereómikroszkópos képe. (A) G426E-hLADH (B) I445M-hLADH (C) R447G-hLADH (D) D444V-hLADH (E) vad típusú hLADH (F) P453L-hLADH (G) G194C-hLADH (H) R460G-hLADH. A felvételek különböző nagyítás mellett készültek.

### 3.5. Röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás és analízis

#### 3.5.1. Adatgyűjtés

A röntgendiffrakciós adatgyűjtés szinkrotron sugárforrás használatával a Helmholtz-Zentrum Berlin kutatóintézet BESSY II részecskegyorsítójában (Adlershof, Berlin, Németország), a Makromolekula Krisztallográfia Kutatócsoport által

működtetett BL14.1 mérőállomáson történt (135). Az egyes adatgyűjtéseket megelőzően a fehérjekristályt CATS típusú mintacserélő robotkar helyezte a mini-kappa goniométerre. Ez utóbbi kompakt forgatószerkezete révén számos kristályorientáció beállítását tette lehetővé. A mérések során a szinkrotronsugárzásnak kitett fehérjekristályt 100 K hőmérsékleten tartottuk nitrogén gáz áramoltatásával annak érdekében, hogy minimalizáljuk a fehérje sugárzás általi károsodását és a kristály víztartalmát amorf módosulatban tartsuk. A diffraktált sugarak detektálására Dectris Pilatus 6M pixeldetektor szolgált. Az adatgyűjtés paramétereit MxCube vezérlőszoftver segítségével állítottuk be, az egyes adatgyűjtések során alkalmazott mérési paramétereket a 2. táblázat foglalja össze.

**2. táblázat Adatgyűjtési paraméterek.** Adott fehérjekristály esetén az X1 és az X2 jelölésű adatsorokat a goniométer kappa tengelyének eltérő orientációja mellett gyűjtöttük.

Fehérje (-hLADH)	vad típus		P453L		G194C	G426E	D444V	I445M	R447G	R460G
Adatgyűjtés időpontja	2016. 09.23.		2017. 08.26.		2017. 08.25.	2016. 09.24.	2015. 05.06.	2016. 09.24.	2016. 02.29.	2017. 08.26.
Hullámhossz (Å)	0,9184		0,9184		0,9184	0,9184	0,9184	0,9184	0,9184	0,9184
Kristályok száma	1		1		1	1	1	1	1	1
Adatsorok	X1	X2	X1	X2	1	1	1	1	1	1
Detektor-kristály távolság (mm)	421,5	421,4	421,3	421,3	345,6	319,8	323,7	371,2	297,1	266,6
Oscillációs intervallum/felvétel (°)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Expozíciós idő/felvétel (s)	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,3
Teljes rotációs intervallum (°)	200	200	360	200	180	180	120	180	180	180
Felvételek száma	2000	2000	3600	2000	1800	1800	1200	1800	1800	1800

### 3.5.2. Adatfeldolgozás

A nyers adatok feldolgozása a méréssel párhuzamosan, online módban történt az XDSAPP 2.0 szoftver alkalmazásával (136, 137). A vad típusú hLADH, továbbá a P453L-hLADH variáns triklin kristályrendszerben, P1 tércsoport szerint kristályosodott.

A szerkezeti adatok megfelelő teljessége érdekében mindkét fehérje esetén két különböző orientációban volt szükség adatgyűjtésre, melyet a goniométer kappatengelyének változtatása tett lehetővé, majd a két adatsort az adatfeldolgozás során az XDS programcsomag (138) XSCALE alkalmazásával egy skálára hoztuk és ezt a továbbiakban egy egyesített adatsorként kezeltük. Az összes további LADH variáns ortorombos kristályrendszerben, P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub>2 tércsoport szerint kristályosodott; a nagyfokú szimmetriából kifolyólag ezen fehérjék esetén nem volt szükség többszöri adatgyűjtésre. Az egyes adatsorok statisztikai mutatóit a 3. táblázat foglalja össze.

**3. táblázat A feldolgozott adatsorok jellemzése.** A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.

Fehérje	hLADH			P453L-hLADH		
Adatsor	X1	X2	összevont	X1	X2	összevont
<b>Tércsoport</b>	P 1	P 1	P 1	P 1	P 1	P 1
<b>Elemi cella a, b, c (Å)</b>	60,06 113,54 136,88	60,05 113,61 137,00	60,06 113,54 136,88	55,56 123,39 158,41	55,55 123,58 158,34	55,56 123,39 158,41
<b>Elemi cella <math>\alpha, \beta, \gamma</math> (°)</b>	83,2 84,8 81,1	83,2 84,7 81,1	83,2 84,8 81,1	106,0 91,3 90,0	106,0 91,3 90,0	106,0 91,3 90,0
<b>Felbontás tartomány (Å)</b>	46,62-2,33 (2,48-2,33)	46,64-2,27 (2,41-2,27)	46,64-2,27 (2,33-2,27)	46,57-2,34 (2,48-2,34)	46,58 - 2,53 (2,69 - 2,53)	46,57 - 2,34 (2,40 - 2,34)
<b>Reflexiók száma</b>	287781 (46963)	315318 (51537)	602581 (23308)	571308 (91016)	247894 (39199)	817849 (38849)
<b>Egyedi reflexiók száma</b>	135996 (22147)	148835 (24324)	160435 (11068)	156829 (24784)	118657 (19011)	164477 (10787)
<b>Multiplicitás</b>	2,12	2,12	4,54	3,64	2,09	4,97
<b>Adatsor teljessége (%)</b>	90,5 (91,1)	90,9 (91,8)	98,1 (91,9)	92,1 (90,2)	88,2 (87,6)	96,6 (85,6)
<b>I/<math>\sigma</math>I</b>	11,55 (1,69)	13,93 (1,72)	13,68 (1,46)	6,62 (1,30)	7,79 (1,46)	7,45 (1,22)
<b>Wilson B-faktor (Å<sup>2</sup>)</b>	56,94	56,23	48,38	47,55	49,31	40,21
<b>Mozaicitás (°)</b>	0,104	0,096	-	0,339	0,318	-
<b>CC<sub>1/2</sub> (%)</b>	99,8 (66,7)	99,9 (72,1)	99,9 (66,0)	99,2 (64,0)	99,4 (68,5)	99,3 (60,2)
<b>Isa</b>	31,21	40,42	-	12,42	23,46	-

**3. táblázat A feldolgozott adatsorok jellemzése (folytatás).** A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.

Fehérje	G194C-hLADH	G426E-hLADH	D444V-hLADH	I445M-hLADH	R447G-hLADH	R460G-hLADH
<b>Tércsoport</b>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<b>Elemi cella a, b, c (Å)</b>	119,49	118,74	118,04	118,92	117,27	118,38
	169,42	168,66	168,94	169,00	169,04	169,64
	61,87	61,04	61,28	60,83	60,85	62,01
<b>Elemi cella α, β, γ (°)</b>	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0
	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0
	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0
<b>Felbontás tartomány (Å)</b>	48,82- 1,60 (1,69 - 1,60)	48,55 - 1,84 (1,95 - 1,84)	48,38 -1,84 (1,95 -1,84)	48,63 – 1,82 (1,93 - 1,82)	48,18 - 1,75 (1,85 - 1,75)	48,54 - 1,44 (1,52 - 1,44)
<b>Reflexiók száma</b>	1051475 (141600)	711417 (114374)	477625 (77892)	716118 (110546)	800678 (130782)	1487502 (226718)
<b>Egyedi reflexiók száma</b>	162966 (23841)	106853 (16793)	105160 (16698)	108394 (16652)	121942 (19452)	225933 (34983)
<b>Multiplicitás</b>	6,45	6,66	4,54	6,61	6,57	6,58
<b>Adatsor teljessége (%)</b>	97,4 (89,1)	99,2 (97,5)	98,1 (97,4)	98,5 (94,5)	99,1 (98,9)	99,0 (95,5)
<b>I/σI</b>	11,26 (0,57)	13,27 (1,24)	10,78 (0,87)	11,05 (1,39)	14,49 (1,49)	12,12 (0,62)
<b>Wilson B-faktor (Å<sup>2</sup>)</b>	33,73	35,85	36,45	36,4	29,41	28,65
<b>Mozaicitás (°)</b>	0,105	0,145	0,069	0,134	0,215	0,088
<b>CC<sub>1/2</sub> (%)</b>	99,9 (66,9)	99,9 (80,7)	99,9 (51,1)	99,9 (84,0)	99,9 (69,0)	99,9 (59,7)
<b>I<sub>sa</sub></b>	23,49	28,36	50,85	17,35	37,42	22,65

### 3.5.3. Szerkezetmegoldás molekuláris helyettesítéssel

A fázisprobléma megoldása a CCP4 szoftvercsomag (139) Molrep programjának (140) segítségével, molekuláris helyettesítéssel történt egy korábban meghatározott hLADH szerkezetet használva kiindulási modellként (PDB kód: 1ZMD, „A” monomer). A program 8 monomert (azaz 4 homodimert) azonosított az aszimmetrikus egységben a vad típusú hLADH és a P453L-hLADH esetén, míg mindössze két monomert (azaz egy funkcionális homodimert) a D444V-, R447G-,



R460G-, I445M-, G194C- és G426E-hLADH variánsok esetén. A homodimerek egymáshoz való viszonya kétfogású nemkrisztallográfia szimmetriával volt leírható.

#### 3.5.4. Szerkezetfinomítás

A szerkezetfinomítás első lépéseként merev test finomítást végeztünk a CCP4 Refmac5 programjával (141). Ezt követően a finomítás modellépítéssel iterálva történt: a Coot programban (142), valós térben végzett modell(újra)építést mindig geometria megkötésekkel terhelt finomítási lépés követte. A finomítási lépésekre a D444V-hLADH szerkezet esetén végig a Refmac5 programot használtuk, az anizotrópia modellezésére TLS paraméterek bevezetése szolgált (a két monomer mindegyike 1-1 TLS csoportként volt figyelembe véve). A többi szerkezet esetén kezdetben a Refmac5 programot, majd a későbbi lépések során a Phenix szoftvercsomag (143) phenix.refine programját használtuk automatikus TLS csoport kijelöléssel, NCS-megkötéssel és a H-atomok geometriai megfontolásokon alapuló modellezésével. Ez utóbbi finomítási paraméter kedvezően hatott a teljes szerkezetek geometriájára, így a H-atomok a végső modelltől sem lettek kitörölve. A röntgendiffrakciós adatgyűjtés és a szerkezetmegoldás eredményeképpen kapott elektronsűrűségi térkép a vizsgált kristályt felépítő egyedi makromolekulák összességére, ill. az adatgyűjtés időtartamára nézve egy átlagos szerkezetet jellemez. Ebből adódóan az elektronsűrűségi térkép bizonyos aminosavak oldalláncai esetén két összemérhető betöltöttségű elhelyezkedést (konformációt/rotamert) is valószínűsíthet. Ezeket az aminosav oldallánccokat/funkciós csoportokat a modellépítés/finomítás végső szakaszában (az elektronsűrűségi térképbe illeszkedő) alternatív konformerekkel modelleztük a Coot program használatával, majd a konformerek betöltöttségét a phenix.refine program automatikusan finomította a finomítási ciklusok során. A modellszerkezet „jóágát”, azaz a mért adatokhoz való illeszkedés mértékének javulását az R-faktor és a szabad R-faktor változásával követtük nyomon, míg a két faktor közötti különbség alacsony értéken tartása ( $R - R_{\text{szabad}} < 0,05$ ) a túllillesztés elkerülésére szolgált. A modellszerkezetek helyességének validálására a finomításra használt phenix.refine-hoz kapcsolt Molprobity programot használtuk (144). A kész szerkezetek mindegyike feltöltésre került a Fehérjeszerkezeti Adatbázisba (Protein Data Bank, PDB). A végső modellszerkezetek minőségi mutatóit és a hozzárendelt PDB kódokat a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat A szerkezetfinomítással nyert végső szerkezetek jellemzése. A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.

Fehérje	hLADH	P453L-hLADH	G194C-hLADH	G426E-hLADH
PDB kód	5NHG	6I4Z	6I4P	6I4U
Felbontás tartomány (Å)	46,62 – 2,27 (2,35 – 2,27)	45,82 – 2,34 (2,43 – 2,34)	42,98 – 1,60 (1,69 – 1,60)	42,56 – 1,84 (1,95 – 1,84)
Reflexiók száma	155316 (10696)	164476 (14978)	162789 (13181)	106812 (10203)
$R_{\text{szabad}}$ számolásához használt reflexiók száma	2309 (154)	2465 (225)	2085 (169)	2094 (200)
R-faktor	0,1805	0,2272	0,1873	0,1838
$R_{\text{szabad}}$	0,2096	0,2490	0,2115	0,2006
RMSD (kötéshossz) (Å)	0,007	0,012	0,012	0,006
RMSD (kötésszög) (°)	0,94	1,26	1,28	1,15
Atomok száma				
nem-H	28780	29093	7990	7719
fehérje-alkotó	28011	28082	7224	7205
ligandum-alkotó	494	559	179	167
víz-molekula	275	452	587	347
Ramachandran eloszlás				
kedvezményezett (%)	98,06	97,93	98,63	98,42
engedélyezett (%)	1,92	2,07	1,37	1,58
tiltott (%)	0,03	0,00	0,00	0,00
Kedvezőtlen rotamer (%)	2,89	3,76	2,18	2,07
Átlagos B-faktor				
fehérje	67,79	58,35	42,17	41,50
ligandum	68,16	58,64	41,96	41,66
víz	57,32	54,40	47,45	41,59
TLS csoportok	48,39	45,04	43,15	38,11
TLS csoportok	54	53	12	9
Molprobity értékelés				
“Clashscore”	4,41 (99 <sup>th</sup> percentilis)	8,13 (97 <sup>th</sup> percentilis)	2,62 (99 <sup>th</sup> percentilis)	3,18 (98 <sup>th</sup> percentilis)
Molprobity pontszám	1,58 (98 <sup>th</sup> percentilis)	1,90 (94 <sup>th</sup> percentilis)	1,31 (96 <sup>th</sup> percentilis)	1,35 (98 <sup>th</sup> percentilis)

4. táblázat A szerkezetfinomítással nyert végső szerkezetek jellemzése (folytatás). A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.

Fehérje	D444V- hLADH	R447G- hLADH	R460G- hLADH	I445M- hLADH
PDB ID	5J5Z	6I4S	6I4R	6I4T
Felbontás tartomány (Å)	48,38 – 1,84 (1,91 – 1,84)	45,51 – 1,75 (1,81 – 1,75)	46,11 – 1,44 (1,52 – 1,44)	45,6 – 1,82 (1,93 – 1,82)
Reflexiók száma	105102 (10355)	121929 (12018)	225005 (21038)	108233 (9940)
$R_{szabad}$ számolásához használt reflexiók száma	2095 (207)	2099 (207)	2348 (221)	2093 (192)
R-faktor	0,1824	0,1784	0,1714	0,1909
$R_{szabad}$	0,2261	0,1944	0,1888	0,2103
RMSD (kötéshossz) (Å)	0,027	0,009	0,006	0,006
RMSD (kötésszög) (°)	2,43	1,35	1,23	1,16
Atomok száma				
nem-H	7848	8056	8292	7732
fehérje-alkotó	7209	7164	7200	7159
ligandum-alkotó	140	156	179	162
víz-molekula	499	736	913	411
Ramachandran eloszlás				
kedvezményezett (%)	97,48	98,42	98,31	98,10
engedélyezett (%)	2,52	1,58	1,69	1,90
tiltott (%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Kedvezőtlen rotamer (%)	4,04	1,30	1,42	2,48
Átlagos B-faktor				
fehérje	39,61	28,28	30,43	43,31
ligandum	39,28	27,67	29,49	43,47
víz	33,39	34,68	32,45	42,84
TLS csoportok	46,14	32,83	37,50	40,73
TLS csoportok	2	13	12	16
Molprobity értékelés				
“Clashscore”	3,25 (98 <sup>th</sup> percentilis)	2,66 (99 <sup>th</sup> percentilis)	2,22 (99 <sup>th</sup> percentilis)	2,65 (99 <sup>th</sup> percentilis)
Molprobity pontszám	1,75 (85 <sup>th</sup> percentilis)	1,14 (99 <sup>th</sup> percentilis)	1,11 (98 <sup>th</sup> percentilis)	1,35 (97 <sup>th</sup> percentilis)

### 3.5.5. Szerkezetvizsgálat

A szerkezetmeghatározások végső célja a hLADH és patogén variánsainak összehasonlítása és ezáltal olyan szerkezeti eltérések feltárása volt, ami párhuzamba hozható az enzimaktivitások megváltozásával. Ennek céljából a variánsok szerkezeteit (teljes dimert) a vad típusú hLADH szerkezetére (teljes dimerre) illesztettük a legkisebb négyzetes célfüggvényt alkalmazó ProFit program segítségével (<http://www.bioinf.org.uk/software/profit>). A teljes szerkezetre kapott átlagos, illetve az aminosavszintű atomi koordináták közötti négyzetes középérték eltérés (*root-mean square deviation*, RMSD) a szerkezeti különbségek számszerű jellemzésére szolgált.

A dimerizációs felszín illetve a FAD prosztetikus csoportot stabilizáló kölcsönhatások jellemzésére az online PISA (Proteins, Interfaces, Structures, Assemblies) szervert (145) és a CCP4 CONTACT nevű programját használtuk.

A fehérjeszerkezetek LA-szubsztrátkötő- és H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornáit a Caver Analyst 2.0 programmal (146) vizsgáltuk. Az említett program a makromolekulák belső üregeit, csatornáit olyan módon modellezi, hogy a kiindulási ponttól kezdődően 0,5 Å lépésenként egy maximális sugarú gömböt helyez el. A program automatikusan számol az oldalláncok H-atomjainak jelenlétével is. Alternatív konformációjú oldalláncok esetén csak a nagyobb betöltöttségű, ún. domináns konformert veszi figyelembe a program. Ebből adódóan a különböző konformerek csatorna geometriára gyakorolt hatását csak úgy lehetett vizsgálni, hogy a csatornák modellezését először az adott domináns konformer mellett a végleges szerkezetben, majd ezt követően egy módosított, csak az amúgy kisebb betöltöttséggel jelen levő oldallánci konformert tartalmazó szerkezetben végeztük el, azonos kiindulási pontot választva. A kalkuláció kiindulópontjának az aktív centrumot, azon belül is a diszulfid hidat alkotó Cys45 aminosav tiol-csoportbeli (PDB szerkezetben SG jelölésű) S-atomjának és a katalitikus His452' imidazolcsoportjának (PDB szerkezetben NE2 jelölésű) ε2N-atomjának tömegközéppontját választottuk. A P453L-hLADH szerkezetben a katalitikus bázis oldallánca sok esetben fordított orientációban fordult elő, ezekben az esetekben a Cys45(SG) atomja mellett a His452'(ε1C/CE1) atomja határozta meg a kiindulási pontot.

A szerkezet felszíni polaritásának megjelenítése és analízise, a konformációs változások vizuális kiértékelése, továbbá a szerkezeti ábrák készítése a PyMol program segítségével történt.

A teljes szerkezetvizsgálatot két vad típusú hLADH szerkezeten (PDB kódok: 5NHG és 6I4Q) is elvégeztem, melyek meghatározásban egyaránt részt vettem, de csak az 5NHG kódjelű szerkezet meghatározását tekintem saját eredménynek (a Módszerek fejezetben bemutatott kristályosítási, adatgyűjtési és szerkezetmeghatározási körülmények, továbbá a 2-4. táblázatok adatai ezen 5NHG kódjelű szerkezetet jellemzik). A 6I4Q kódjelű szerkezet képezte azonban a referenciát a patogén variánsok összehasonlító elemzése során a nagyobb felbontás és a kristályon belüli elrendeződés, ill. a kristálykontaktusok hasonlósága miatt.

### **3.6. Enzimaktivitás mérések**

#### **3.6.1. Az enzimkoncentráció meghatározása**

A fehérjepreparátumok koncentrációjának mérésére a kolorimetriás Bradford módszert alkalmaztuk. Ennek során a spektrofotometriás mérés 595 nm-en történik, mely hullámhosszon a FAD proszitetikus csoport fényelnyelése nem zavarja a fehérje-koncentráció pontos meghatározását. A mérés során 5 µl, két különböző hígítású fehérje oldatot 250 µl Bradford-reagenssel elegyítettük 96-lyukú EIA/RIA lapos aljú, polisztrén kazettákban (Corning, Corning, NY, USA), majd 10 min szobahőmérsékleten történő inkubációt követően SpectraMax 190 (Molecular Devices, San José, CA, USA) spektrofotométer segítségével határoztuk meg az oldatok fényelnyelését. A koncentráció kiszámításához a mintákkal azonos körülmények között előkészített, azonos kazettára összemért hét pontos szarvasmarha szérum albumin kalibrációs sor szolgált 0,1-1,4 mg/ml koncentráció tartományban. A kalibráló oldatsor mintáira öt-öt, míg a hLADH és variánsainak hígított mintáira három-három párhuzamos mérést végeztünk.

#### **3.6.2. A specifikus LADH-aktivitás mérése forward és reverz irányában**

Az enzimaktivitást mind a forward, mind pedig a reverz katalitikus irányban meghatároztuk a laboratóriumunkban még nem vizsgált hLADH patogén variánsok (G426E-, I445M- és R447G-hLADH), valamint az H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát érintő újonnan létrehozott variánsok esetében. A mérések során a kutatócsoportunk által korábban alkalmazott kísérleti körülményeket alkalmaztuk az aktivitásértékek összehasonlíthatósága érdekében (115). Az enzimreakció 96-lyukú EIA/RIA lapos aljú, polisztrén kazettákban, 300 µl végtérfogatban, 50 mM K-PO<sub>4</sub> pufferben (pH 7,3), 37 °C-on zajlott,

a forward reakció során 0,9 mM dihidroliponsav (DHLS; a DHLA a kereskedelmi forgalomban nem elérhető) és 165  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ , a reverz reakcióban pedig 0,9 mM LA és 165  $\mu\text{M}$  NADH jelenlétében. Magasabb szubsztrát koncentráció alkalmazásának a DHLS/LA esetén az oldhatóság, míg a NADH esetén az enzim esetleges négy elektronos redukciója és inhibíciója szabott határt. A fehérje mennyiségét a forward reakcióban 123 ng-ra, a reverz reakcióban 12,3 ng-ra állítottuk be. A reakcióelegyek 15 perces inkubálását követően a mérést DHLS (forward) vagy NADH (reverz) hozzáadásával indítottuk, majd a NADH koncentrációjának változását 340 nm hullámhosszon SpectraMax 190 spektrofotométerrel követtük nyomon.

### 3.6.3. ROS-képző aktivitás mérése

A fenti patogén és  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornát érintő szubsztitúciók szuperoxid-képzésre kifejtett hatását részlegesen acetilált citokróom c redukcióján alapuló spektrofotometriás méréssel (147), a laboratóriumunkban korábban is alkalmazott kísérleti körülmények között valósítottuk meg (115). A reakció 96-lyukú EIA/RIA lapos aljú, polisztrén kazettákban, 200  $\mu\text{l}$  végtérfogatban, 50 mM  $\text{K-PO}_4$  pufferben (pH 6,3), 37 °C-on zajlott, 50  $\mu\text{M}$  részlegesen acetilált citokróom c, 165  $\mu\text{M}$  NADH és 2,47  $\mu\text{g}$  enzim jelenlétében. A reakcióelegyek 15 perces inkubálását követően a NADH hozzáadásával indítottuk, majd 550 nm hullámhosszon SpectraMax 190 spektrofotométerrel követtük nyomon a citokróom c szuperoxid általi redukcióját. Kísérleti körülményeink között a redukált citokróom c extrinkciós koefficiense 14378  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -nek adódott, melyet nátrium-ditionittal ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) történő teljes redukcióval határoztunk meg. Kontroll kísérletben ellenőriztünk, hogy a NADH reagens (vagy esetleges szennyezője) közvetlenül (enzim hiányában) nem képes a citokróom c redukciójára továbbá, hogy a citokróom c redukciója valóban a LADH által termelt szuperoxidnak köszönhető, 100 U ló szívből származó szuperoxid-dizmutáz jelenlétében ugyanis a színváltozás elmaradt.

### 3.6.4. A mérési eredmények kiértékelése

A reverz irányú LADH-aktivitás mérése során a reakció jellemzően 60 s-ot is meghaladó időtartam után érte csak el a maximális sebességét, amely ezt követően kb. 100-150 s-on keresztül megtartott volt. Irodalmi adatok alapján (18) mindez a hLADH inaktív  $\text{EH}_4$ -állapotának átmeneti kialakulásával magyarázható, melyet idővel a

növekvő koncentrációban jelen levő  $\text{NAD}^+$  képes destabilizálni és ezáltal az enzimaktivitást fenntartani (lásd még *1.1.2. A LADH-reakció mechanizmusa* fejezet). Ebből kifolyólag az adatok kiértékelésénél az abszorbancia-idő görbék későbbi, lineáris szakasza alapján határoztuk meg a (kezdeti) reakciósebességet. A kutatócsoportunk által korábban, azonos körülmények között, de lassabb detektálást biztosító műszerrel végzett kísérletek során a fenti megfigyelés nem volt tapasztalható (115).

Az enzimaktivitás adatok statisztikai kiértékelésére kétmintás t-próbát végeztünk eltérő varianciát feltételezve,  $p \leq 0,05$  szignifikancia szint mellett, Prism Graphpad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) program használatával.

#### 4. Eredmények

Kutatócsoportunk a vad típusú hLADH és hét betegséget okozó variánsának határozta meg a kristályszerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel. A szerkezetek felbontása 1,44 és 2,34 Å között változott, a statisztikai és minőségi mutatókat a 4. táblázat összegzi. Elvégeztem továbbá a funkcionális vizsgálatát a hét variáns közül mindazoknak, melyeket laboratóriumunkban korábban még nem vizsgáltunk. Ezáltal a szerkezeti adatokat azonos kísérleti körülmények között végzett aktivitásmérés adatokkal tudtuk összevetni.

Munkám második részében az ún.  $H^+/H_2O$ -csatorna két kitüntetett aminosavjának szerepét vizsgáltam a hLADH normál, illetve ROS-képző aktivitásaiban annak érdekében, hogy a szerkezetalapú mechanisztikus predikciókat és egyes patogén hLADH mutációk molekuláris patomechanizmusait tisztázzam. Ehhez helyspecifikus mutagenezissel hLADH variánsokat hoztam létre, amelyek az említett csatorna geometriáját és/vagy polaritását modulálhatják, majd enzimaktivitás mérést végeztem.

Az alábbiakban a krisztallográfiai eredményeket és enzimaktivitás mérések eredményeit külön ismertetem.



## 4.1. Röntgenkristallográfiai eredmények

### 4.1.1. A vad típusú hLADH szerkezete

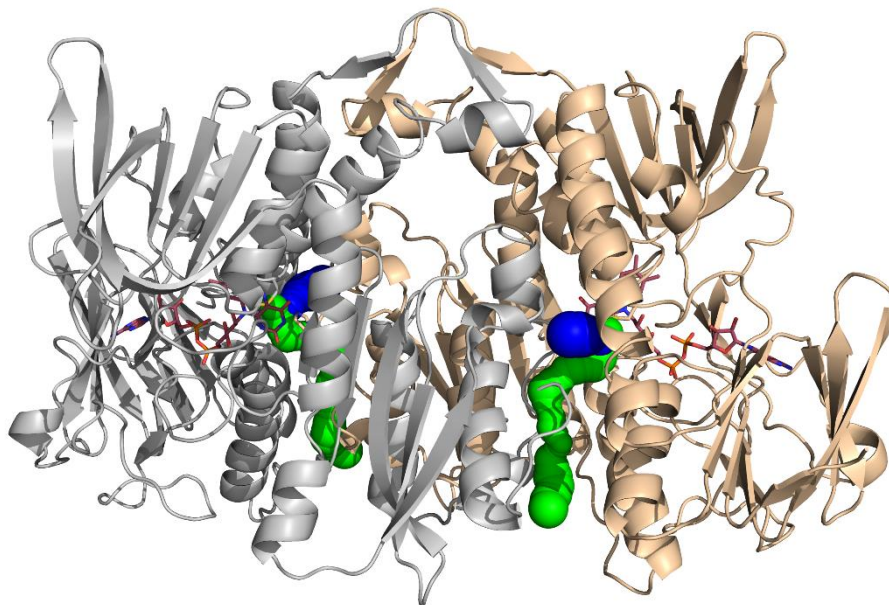
Csoportunk két ligandum nélküli, nem-komplexált vad típusú hLADH szerkezetet jegyez (PDB kódok: 5NHG és 6I4Q). PhD munkám során ezek közül mindkettő meghatározásban részt vettem, de csak az első (5NHG) szerkezet meghatározását tekintem saját eredménynek; a Módszerek fejezetben bemutatott kristályosítási, adatgyűjtési és szerkezetmeghatározási körülmények, továbbá a 2-4. táblázatok adatai ezen 5NHG szerkezetet jellemzik. Munkám eredménye ugyanakkor mindkét vad típusú hLADH és a betegséget okozó variánsok szerkezetének analízise.

Brautigam és mtsai. 2005-ben két,  $\text{NAD}^+$  és  $\text{NADH}$  kosubsztrátokkal kristályosított, de nem a kanonikus szekvenciával rendelkező hLADH szerkezetet közöltek [PDB kódok: 1ZMC és 1ZMD (91)]. Ezen modellek alapján leírt főbb szerkezeti következtetések az általunk meghatározott két hLADH szerkezetben megfigyeltekkel összhangban voltak. Két funkcionális régió esetén azonban új részleteket írtunk le: az 5NHG szerkezet a  $\text{hE3KF}$ , ill. a  $\text{hE2}_{\text{ELKDHK}}$ -alegységgel kölcsönható területét, míg a 6I4Q szerkezet a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornát illetően nyújtott új szerkezeti információt. A vad típusú hLADH-t érintő új szerkezeti eredményeken felül az alábbiakban a patogén variánsok szerkezetének elemzéséhez szükséges egyéb funkcionális régiók – aktív centrum, LA/DHLA-, ill.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötőhelyek, FAD-kötés, dimerizációs felszín – is bemutatásra kerülnek.

Mivel a patogén szubsztitúciókat hordozó hLADH variánsok kristályosítási körülményei és ezáltal a kristályon belüli elrendeződése, ill. a kristály kontaktusok minősége a 6I4Q PDB kódú hLADH szerkezetéhez volt hasonló [2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 v/v% PEG 400, 0.1 M Bis-Tris (pH 6,9)], továbbá a nagyobb felbontásból adódóan ez a vad típusú szerkezet részletgazdagabb volt a másikkhoz képest, elsősorban ez (6I4Q) képezte a referenciát az összehasonlító elemzésekhez. A vad típusú hLADH szerkezeteiben a megfigyelések két funkcionális régió ( $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna és a felszíni alegység-kötőhely) esetén különböznek csak. Kihasználva a nagyobb részletgazdagságot és a patogén variánsokkal való jobb összehasonlíthatóságot, a 6I4Q szerkezet kerül bemutatásra a részletesebb szerkezetelemzés során, amennyiben nincs másképp jelölve. Az alkompexek kialakulásában szerepet játszó felszíni régió jellemzésére azonban az 5NHG hLADH szerkezetet vesszük alapul.

#### 4.1.1.1. A hLADH homodimer

A megközelítőleg 50 kDa-os hLADH monomerek négy doménre tagolódnak (lásd 1.1.4. *Fehérjeszerkezet a funkció tükrében* fejezet). Két, egymáshoz kétfogású nemkrisztallográfiai tengelyszimetriával viszonyuló hLADH-monomer a 5. táblázatban felsorolt kölcsönhatások révén funkcionális homodimert alkot (7. ábra). A dimerizációs felszín területe  $3894 \text{ \AA}^2$ .



**7. ábra. A hLADH homodimer szerkezete és az aktív centrumok megközelíthetősége.** A hLADH homodimerben (PDB kód: 6I4Q) a két aktív centrum mindegyike egy LA-kötő csatornán (kék) és egy hosszabb  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornán (zöld) keresztül érhető el. A csatornák Caver 2.0 programmal történő megjelenítéséhez a monomerekben a domináns Leu46, Glu332 és Arg460 konformereket alkalmaztuk. A homodimer A és B monomerjei rendre bézs és szürke színűek.

**5. táblázat A hLADH homodimert stabilizáló kölcsönhatások.** Jelölések: <sup>\*</sup>=a homodimerekben a szimmetria ellenére csak egyszer előforduló kölcsönhatások, <sup>A/B</sup>=az Arg460 aminosav [A], ill. [B] konformációját jellemző kölcsönhatások, <sup>±</sup>=az adott kölcsönhatást az Asn430 vagy az OD1, vagy az ND2 atomjával hozza létre, F=FAD-kötő domén, N=NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő domén, K=központi domén, D=dimerizációs domén.

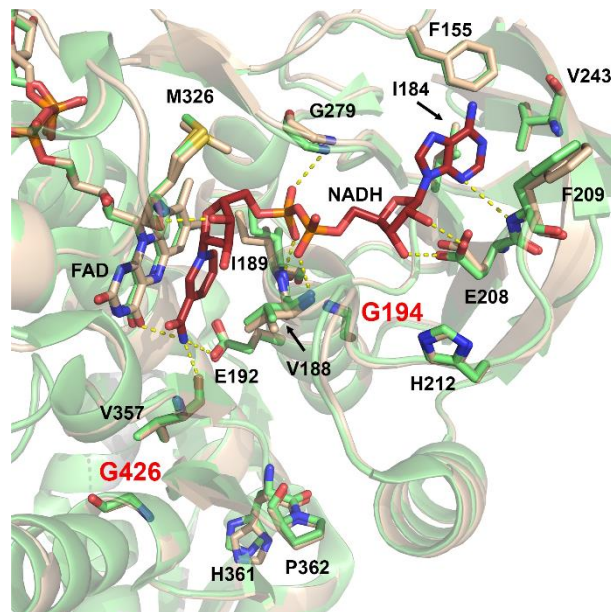
Kölcsönható aminosavak (atomok)	Kölcsön- ható domének	Átlagos távolság (Å)				
		6I4Q	5NHG			
		A-B- dimer	A-B- dimer	C-D- dimer	E-F- dimer	G-H- dimer
Tyr19(OH) - Asn473'(OD1)	F - D'	2,71	3,00	2,99	3,08	3,06
Gln27(NE2) - Ser471'(O)	F - D'	3,07	3,38	3,33	3,38 <sup>*</sup>	3,14
Asn58(ND2) - Arg74'(NH1)	F - F'	3,23	3,38	3,28	3,32	3,09
Asn58(ND2) - Asn397'(OD1)	F - D'	3,24	-	-	-	-
Asn59(OD1) - Arg74'(NH1/2)	F - F'	3,08	3,06	2,87	3,27	3,10
Gly75(O) - Asn84'(N)	F - F'	2,80	2,83	2,95	2,81	2,83
Glu77(N) - Arg82'(O)	F - F'	3,00	2,97	3,05	2,98	2,97
Glu77(O) - Arg82'(N)	F - F'	2,89	2,79	2,86	2,79	2,69
Glu77(OE1) - Arg82'(NE)	F - F'	2,81 <sup>*</sup>	-	-	-	-
Glu77(OE1) - Arg82'(NH2/1)	F - F'	3,22 <sup>*</sup>	2,81 <sup>*</sup>	-	2,85 <sup>*</sup>	3,07
Glu77(OE2/1) - Asn84'(ND2)	F - F'	2,68	2,71	2,74	2,62	2,62
Ser79(OG) - Ser79'(OG)	F - F'	2,30 <sup>*</sup>	3,28 <sup>*</sup>	2,93 <sup>*</sup>	3,04	3,06
Glu80(OE2) - Ser79'(OG)	F - F'	3,26 <sup>*</sup>	-	-	-	-
Gln91(NE2) - Thr396'(O)	F - D'	3,15	3,21	3,15	3,03	3,06
Gln109(NE2) - Phe474'(OXT)	F - D'	3,24	3,13	2,96	3,06	3,05
His329(ND1) - His452'(N)	K - D'	3,05	3,06	3,05	3,04	3,02
Glu332[A](OE1/2) - Arg460'(NH2/1)	K - D'	3,16 <sup>B</sup>	-	-	-	-
Asp333(OD1) - Arg460'(NH1)	K - D'	2,60 <sup>A</sup> / 2,86 <sup>B</sup>	3,21	3,05	3,30	3,17 <sup>*</sup>
Asp333(OD1) - Arg460'(NH2)	K - D'	3,16 <sup>A</sup> / 3,02 <sup>B</sup>	3,03	3,18	3,05	3,05 <sup>*</sup>
Asp333(OD2) - Arg460'(NH1/2)	K - D'	3,24 <sup>A</sup>	3,06	3,32	3,30	3,04
Glu340(OE1) - Arg447'(NH1)	K - D'	2,80	-	2,95	-	3,01
Glu340(OE1) - Arg447'(NH2)	K - D'	3,23	2,82 <sup>*</sup>	-	3,13	-
Glu340(OE2) - Arg447'(NH2)	K - D'	3,32	-	3,24	-	3,47 <sup>*</sup>
Glu340(OE2) - Arg447'(NH1)	K - D'	3,32 <sup>*</sup>	3,12 <sup>*</sup>	3,12	2,82 <sup>*</sup>	3,21
Tyr359(OH) - Pro453'(O)	D - D'	2,90	3,41	3,33	3,45	3,50 <sup>*</sup>
Tyr359(OH) - Pro453'(N)	D - D'	3,37	3,01	3,14 <sup>*</sup>	3,05	3,13
Glu363(OE2) - Arg393'(NH2)	D - D'	2,80	2,78	2,77	2,71	2,90
Arg393(NH1) - Glu427'(OE2)	D - D'	2,92	2,98	2,77	2,81	2,90
Glu427(OE2) - Leu455'(N)	D - D'	3,29	3,25	3,33	3,18	3,27
Glu427(OE1) - Ser456'(N)	D - D'	3,01	2,96	2,99	2,87	2,90
Glu427(OE2) - Leu455'(N)	D - D'	2,84	2,76	2,68	2,63	2,63
Asn430(OD1) - Ala451'(N)	D - D'	2,85	2,88	3,03 <sup>±</sup>	2,87 <sup>±</sup>	3,01 <sup>±</sup>
Asn430(ND2) - Ser456'(OG)	D - D'	3,04	2,74	2,47 <sup>±</sup>	2,62 <sup>±</sup>	2,58 <sup>±</sup>
Asn430(ND2) - Thr454'(OG1)	D - D'	-	-	3,31 <sup>±</sup>	3,00	3,35 <sup>±</sup>
Tyr438(OH) - Asp444'(OD2)	D - D'	2,84	-	3,29	-	3,14
Tyr438(OH) - Asp444'(O)	D - D'	-	2,62	-	2,68	-

#### 4.1.1.2. Az aktív centrum és a szubsztrátkötő helyek

A hLADH aktív centruma a dimerizációs felszínen helyezkedik el a FAD izoalloxazin gyűrűrendszerének *si* oldalán. A katalizált reakció szempontjából kitüntetett jelentőségű Cys45-Cys50 diszulfid híd, a katalitikus bázisként szolgáló His452', és az utóbbival H-kötést létesítő Glu457' konformációja és egymáshoz viszonyított helyzete (lásd 1.1.4. *Fehérjeszerkezet a funkció tükrében* fejezet, 4. ábra) a korábban közölt hLADH szerkezetekkel (91-94) megegyezett. A diszulfid kötés mindkét aktív centrumban részlegesen redukált formában lett modellezve. A hLADH monomerenként egy FAD prosztetikus csoportot tartalmaz, melynek nyújtott konformációját a 6. táblázatban (lásd 4.1.2.1. *Az aktív centrum variáns P453L-hLADH szerkezete* fejezet, 60. oldal) felsorolt kölcsönhatások stabilizálják.

A DHLA/LA szubsztrát számára az aktív centrum egy ~10 Å hosszúságú, hidrofób csatornán keresztül közelíthető meg (7. ábra). A csatornát, melyre a továbbiakban LA-kötőhelyként vagy LA-kötő csatornaként utalok, az egyik monomer részéről a Pro16, Tyr19, Leu46, Ile51, Ala98-Ile103, Leu106, míg a másik monomer részéről az Ala386', Ala389'-Ser392', Lys395' és Asn473'-Phe474' aminosavak határolják. A Leu46 oldallánca két konformációval lett modellezve, mely befolyásolja a diszulfid híd hozzáférhetőségét. A Leu46 konformációs flexibilitását alátámasztja a viszonylag magas B-faktor és az is, hogy a korábbi hLADH szerkezetekben (91-94) az említett oldallánc hol az egyik, hol a másik konformációban lett modellezve. A jelen nagy felbontású szerkezet esetén azonban mindez alternatív konformációk formájában figyelhető meg, melyek közül az egyik feltételezhetően a szubsztrát bekötődésével stabilizálódik. A Leu46 szerepével a továbbiakban nem foglalkozunk.

A NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhely a FAD izoalloxazin gyűrűjének *re* oldalán helyezkedik el (8. ábra). Kialakításában a Val188-Gly201  $\alpha$ -hélix N-terminálisa és az azt megelőző Ile184-Glu192 hurok, továbbá az ugyancsak kevésbé rendezett Glu208-Gly215 és Cys277-Arg280 peptidszakaszok és négy viszonylag különállóbb aminosav (Phe155, Val243, Met326, Val357) vesz rész. Korábban megállapítást nyert, hogy az oxidált hLADH alapvetően semleges, hidrofób nikotinamid-kötőhelye a NADH kötésének kedvez (80, 91). Mivel az oxidált enzim nikotinamid-kötőhelyén a NAD<sup>+</sup> kötődése mindezidáig nem volt megfigyelhető, a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő aminosavakon elsősorban a NADH-kötésében közreműködő aminosavakat értjük (lásd 8. ábra).

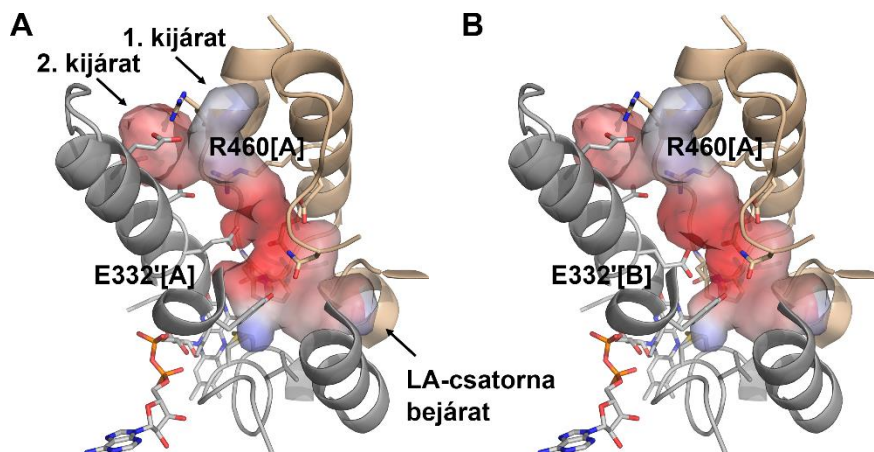


**8. ábra. A hLADH NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő zsebe.** A hLADH NADH-t kötő (PDB kód: 1ZMD (91), zöld) és ligand nélküli (PDB kód: 6I4Q, bézs) szerkezetét egymásra illetve látható, hogy a NADH bekötődése mindössze kismértékű szerkezeti változást indukál. A NADH és az annak kötésében résztvevő aminosavak közötti H-hidakat sárga szaggatott vonal jelzi az 1ZMD szerkezetben (a vízmolekulák közvetítésével megvalósuló kölcsönhatások nincsenek megjelenítve). A kötőhely kialakításához hozzájáruló His361-Pro362 *cisz*-peptid kötés, valamint a közeli G194C és G426E szubsztitúciós helyek ugyancsak fel vannak tüntetve. A Gly368-His419 peptidszakasz a láthatóság érdekében nincs megjelenítve.

#### 4.1.1.3. A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna

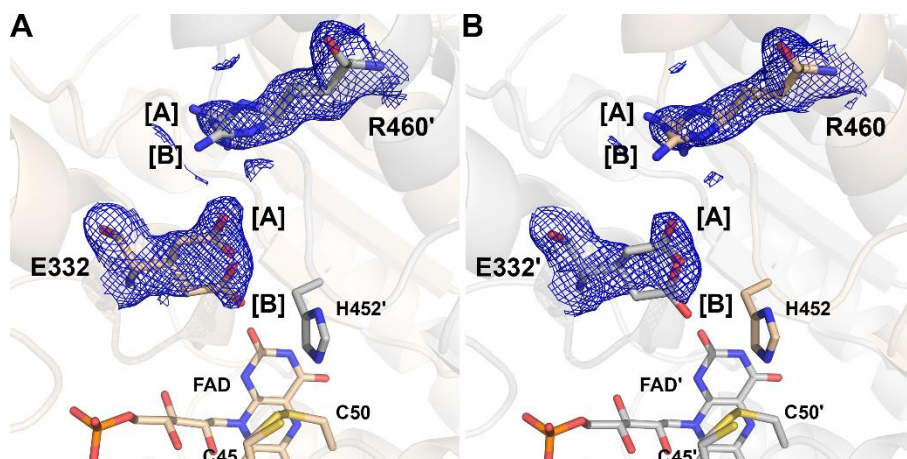
Az aktív centrumot a fehérjefelszínnel összekötő másik csatorna ugyancsak a dimerizációs felszínen helyezkedik el, kialakításában négy  $\alpha$ -hélix (Pro16-Gly29, Leu327-Gly344, Glu443'-Val448' és His452'-Phe468') és a C-terminális egy szakasza (Ser471'-Asn473') vesz részt (7. és 9. ábra). A három hosszabb határoló  $\alpha$ -hélix (Pro16-Gly29, Leu327-Gly344 és His452'-Phe468') mindegyike az N-terminálisával az aktív centrum, illetve a FAD prosztetikus csoport felé mutat. A csatorna üregét a fehérje felszínén a Glu340-Arg447' sóhíd két kijáratra osztja (9. ábra). A továbbiakban az aktív centrumot a fehérje felszínével összekötő rövidebb és egyenesebb útvonalat biztosító csatornát tekintjük az ún. H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornának (9. ábra, 1. kijárat). A ~26 Å hosszúságú H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna belső ürege lényegesen hidrofílebb a fent tárgyalt LA-kötő

csatornához képest, melyet a Lys24, Glu332, Asp333, Glu340, Glu443', Arg447', Glu457', Arg460' és Glu461' aminosavak oldalláncai biztosítanak (9. ábra).



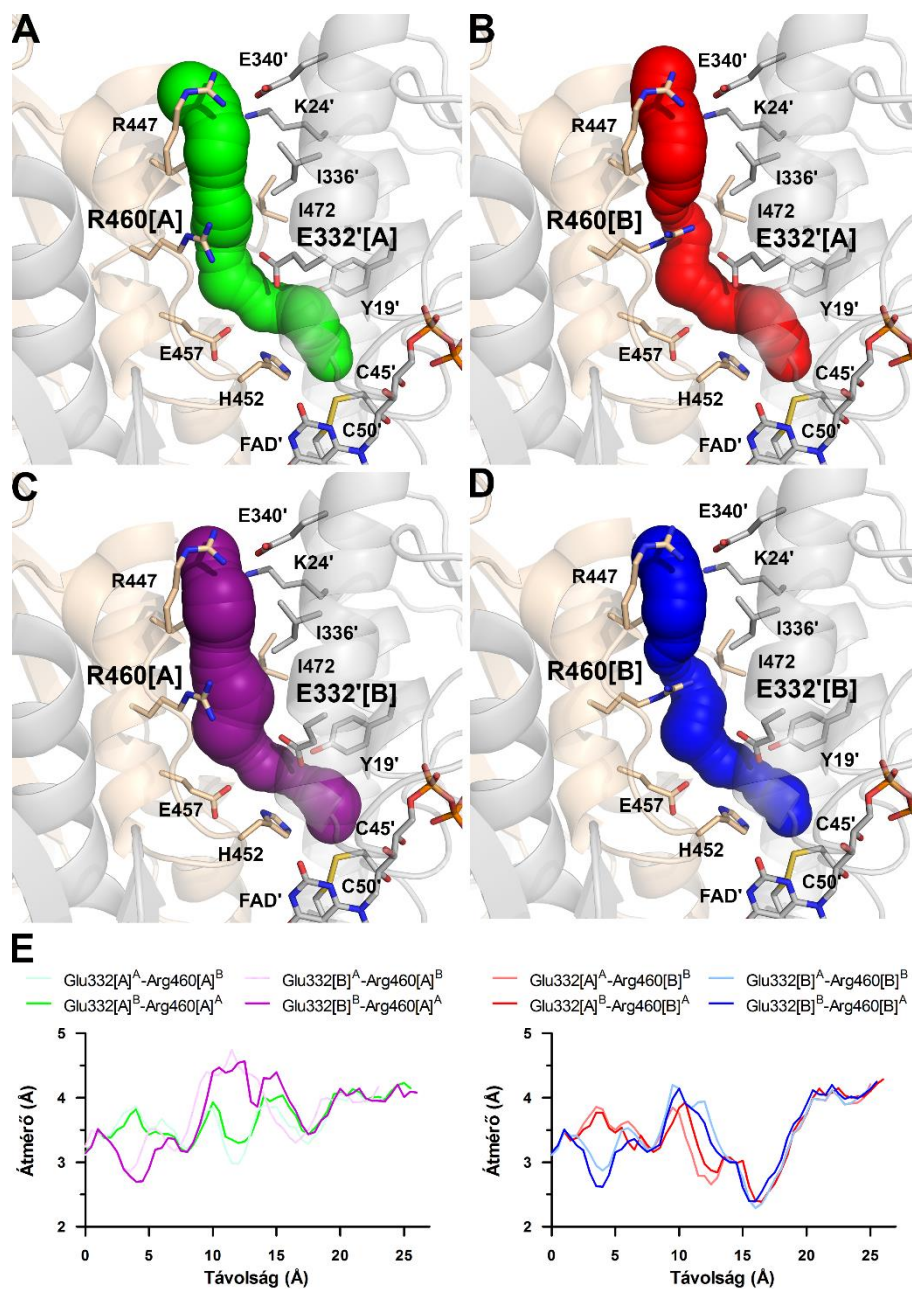
**9. ábra.** A hLADH aktív centrumához vezető csatornák belső felszíni polaritása Glu332[A]-Arg460[A] (A) és Glu332[B]-Arg460[A] (B) jelenlétében. A csatornákat övező másodlagos szerkezeti elemek mellett a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna belső felszínének polaritásához hozzájáruló poláros és protonálható oldallánccal rendelkező aminosavak vannak bemutatva a hLADH szerkezetében (PDB kód: 6I4Q). Az A és B monomerekhez tartozó aminosavak rendre bézs és szürke színűek, a felszíni polaritás relatív skálán van megjelenítve: negatív – piros; pozitív – kék). A csatornaalkotó Pro16-Gly29  $\alpha$ -hélix egy részlete a láthatóság érdekében nincs megjelenítve, így a Lys24, mely ugyancsak részt vesz a felszíni polaritás kialakításában, nem látható.

Az 1,44 Å felbontású hLADH szerkezetben (6I4Q) először volt megfigyelhető két csatornaalkotó aminosav, a Glu332 és az Arg460 oldallancának konformációs flexibilitása (10. ábra). A Glu332 a Glu457' és Glu461' aminosavakkal együttesen a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna aktív centrumhoz közeli, kezdeti szakaszát erősen negatív töltésűvé teszi (9. ábra). A Glu332 oldallánca azonban két konformációt is felvehet: az [A]-val jelölt konformer az aktív centrumtól távolabb, az Arg460' felé nyúlik, míg a [B] konformer az aktív centrum felé (10. ábra) és ilyen módon a csatorna felszínének töltéseloszlását is modulálja (9. ábra). Az Arg460' szintén két konformációt vesz fel a hLADH szerkezetében, a flexibilitás elsősorban a guanidino-csoportot érinti (10. ábra). Az Arg460' az [A] konformációt felvéve az Asp333-mal, míg a [B] konformációban az Asp333 és Glu332[A] aminosavakkal is sóhidat képez (lásd 5. táblázat). Az Arg460'-Asp333 interakció nagyban hozzájárul a csatorna integritásának a fenntartásához azáltal, hogy két csatornaalkotó  $\alpha$ -hélixet kapcsol össze egymással.



**10. ábra. A Glu332 és az Arg460' aminosavak alternatív konformációi.** A  $2mF_o-DF_c$  típusú kihagyásos elektronsűrűségi térkép  $1,2 \sigma$  izoelektronsűrűségi szint mellett az A monomer (A), ill. a B monomer (B) aktív centruma közelében is alátámasztja az alternatív konformerek jelenlétét (az ábrán [A] és [B] jelöléssel) a hLADH szerkezetében (PDB kód: 6I4Q). A és B monomer rendre bézs és szürke színű mindkét panelen.

A Glu332 és az Arg460' oldalláncai a konformációs flexibilitásuk révén együttesen befolyásolják a csatorna belső átmérőjét, geometriáját (11. ábra). A  $H^+/H_2O$ -csatorna, egészét tekintve, a Glu332[A] és Arg460'[A] konformációk mellett a legszélesebb (lásd 11.A és 11.E ábra): a 3-3,2 Å átmérőjű szűk keresztmetszetet a Glu332[A] mellett a hLADH homodimer egyik csatornájában a Glu457' és az Asn473', másikon pedig a Glu461' és az Arg460'[A] alkotja. A Glu332 oldalláncának [A] konformációból [B]-be történő átmenetét a szűk keresztmetszet áthelyeződése kíséri (lásd 11.C és 11.E ábra): az új, 2,7-2,9 Å átmérőjű szűkületet a Tyr19, Glu332[B] és His452' aminosavak alkotják. Az Arg460' oldalláncának [A] konformációból [B]-be történő átmenete nagyobb mértékű változást indukál (11.B, 11.D és 11.E ábra): a 2,3-2,4 Å átmérőjű szűk keresztmetszetet az Arg460'[B]-Leu464'-Ile472' aminosavháromas alkotja függetlenül attól, hogy a Glu332 milyen konformációban van jelen.



**11. ábra. A hLADH H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornájának geometriája. (A-D)** A hLADH B monomerének aktív centrumához vezető H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna Caver reprezentációja Glu332'[A]-Arg460[A] (A), Glu332'[A]-Arg460[B] (B), Glu332'[B]-Arg460[A] (C) és Glu332'[B]-Arg460[B] (D) jelenlétében. Az A és B monomer rendre bézs és szürke színű. (E) A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna tengely mentén mért belső átmérője az aktív centrumtól való távolság függvényében a Glu332 és az Arg460 különböző alternatív konformációinak jelenlétében. Az aminosavak A, ill. B jelölései felső indexben az A, ill. B monomereket jelölik. A B monomer aktív centrumához vezető útvonalat bemutató grafikon színei megegyeznek az A-D paneleken használt színekkel.

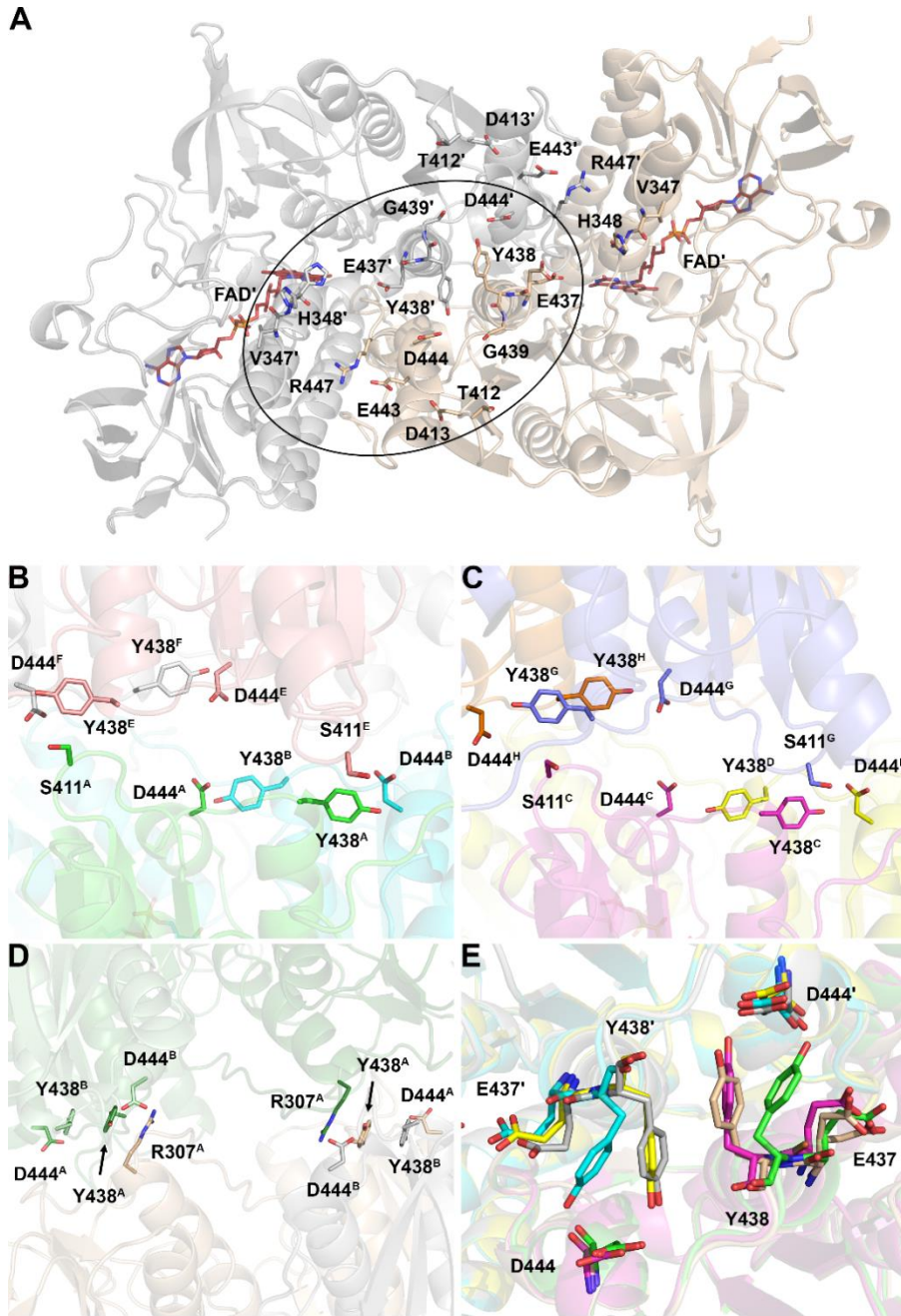


#### 4.1.1.4. A hLADH alegységkötő felszíne

A hPDHk felépítéséhez szükséges hE3-hE3KF-alkomplex (92, 93) és a hELKDHk felépítéséhez szükséges hE3-hE2<sub>ELKDHk</sub>-alkomplex (94) kialakításához a kölcsönható aminosavakat a hLADH részéről a dimerizációs domének szolgáltatják (12.A ábra), a hE3KF és a hE2<sub>ELKDHk</sub>-alegység részéről pedig megfelelő alegységkötő domének. (A továbbiakban az egyszerűség kedvéért nem teszünk különbséget a teljes hE3KF- és hE2<sub>ELKDHk</sub>-alegységek, ill. azok hLADH kötésért felelős doménjei között az alegységek közötti kölcsönhatások tárgyalása kapcsán.) A hLADH felszínén a hE3KF- és a hE2<sub>ELKDHk</sub>-kötőhely átfed egymással: a Glu437, Tyr438, Glu443, Asp444 és Asp413 aminosavak mind a hE3KF, mind pedig a hE2<sub>ELKDHk</sub> kötéséhez szükségesek; a hE3KF-vel való kötődéshez ezen felül még a Val347, His348, Thr412, Arg447 és Gly439 aminosavakra, a hE2<sub>ELKDHk</sub>-vel való kötődéshez azonban csak az Arg414 aminosavakra van szükség (92-94).

A hE3KF/hE2<sub>ELKDHk</sub>-kötőhely a vad típusú hLADH 2,27 Å felbontású kristályszerkezete (PDB kód: 5NHG) alapján flexibilis szerkezettel bír (12.B, 12.C és 12.E ábra). A Tyr438 hidroxilcsoportja kétféleképpen lép kölcsönhatásba a szomszédos monomer Asp444' aminosavjával: az 5NHG szerkezetet adó négy hLADH homodimer közül a C-D és G-H dimerekben az Asp444' oldallánci karboxilcsoportjával, míg az A-B és E-F dimerekben a főlánci karbonilcsoportjával alakít ki H-kötést (lásd 5. táblázat). Az előbbi kölcsönhatás esetén a homodimer két Tyr348 oldallánci aromás gyűrűjének síkja egymással közel párhuzamos és ezáltal egy dominánsan  $\pi$ - $\pi$  típusú kölcsönhatás tud megvalósulni a Tyr438-Tyr348' viszonylatban (12.E ábra). Az így kialakuló hidrofób folt lényeges eleme a hE3KF/hE2<sub>ELKDHk</sub>-kötőhelynek (92-94).

A Brautigam és mtsai. (91), valamint az általunk közölt másik (6I4Q kódjelű) nem-komplexált hLADH szerkezetben a Tyr438-Asp444' kölcsönhatás csak egyféle, az Asp444' karboxilcsoportját igénybe vevő H-híd formájában figyelhető meg (12.A, 12.D és 12.E ábra, továbbá 5. táblázat). Ezekben a szerkezetekben nincs lehetőség a két Tyr438 egymástól való eltávolodására, mivel a kristályban a szimmetria partner homodimer Arg307 aminosav oldallánca révén a Tyr438-Tyr438'  $\pi$ - $\pi$  típusú kölcsönhatása stabilizálódik (12.D ábra). Az 5NHG kódjelű szerkezetben az Arg307 helyét a kisebb térkitöltésű Ser411 foglalja el (12.B és 12.C ábra).



**12. ábra.** A hLADH hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő felszíne. (A) A hE3KF kötésében résztvevő aminosavak a 6I4Q-hLADH szerkezetben (A és B monomer rendre bézs és szürke színű). A hE3KF kétféleképpen kötődhet be, az egyik orientáció által megközelítőleg lefedett területet egy ellipszis szemlélteti. A kötőfelszín két Tyr438 aromás gyűrűjének síkja az 5NHG-hLADH szerkezet A-B- (zöld/kék), ill. E-F-dimerjeiben (rózsaszín/szürke) egymástól távol helyezkedik el (B), míg a C-D- (ciklámen/sárga), ill. G-H-dimerjeiben (lila/narancs) (C), valamint a 6I4Q-hLADH szerkezetben (A-B-dimer: bézs/szürke; szimmetria partner A-B-dimer: világos és sötétzöld) (D) egymáshoz közel és megközelítőleg párhuzamosan rendeződik. (E) A lehetséges Tyr438-Tyr438' konformációkat az 5NHG-hLADH A-B, ill. C-D dimerjeinek és a 6I4Q-hLADH A-B-dimerjének egymásra illesztett szerkezetei szemléltetik.

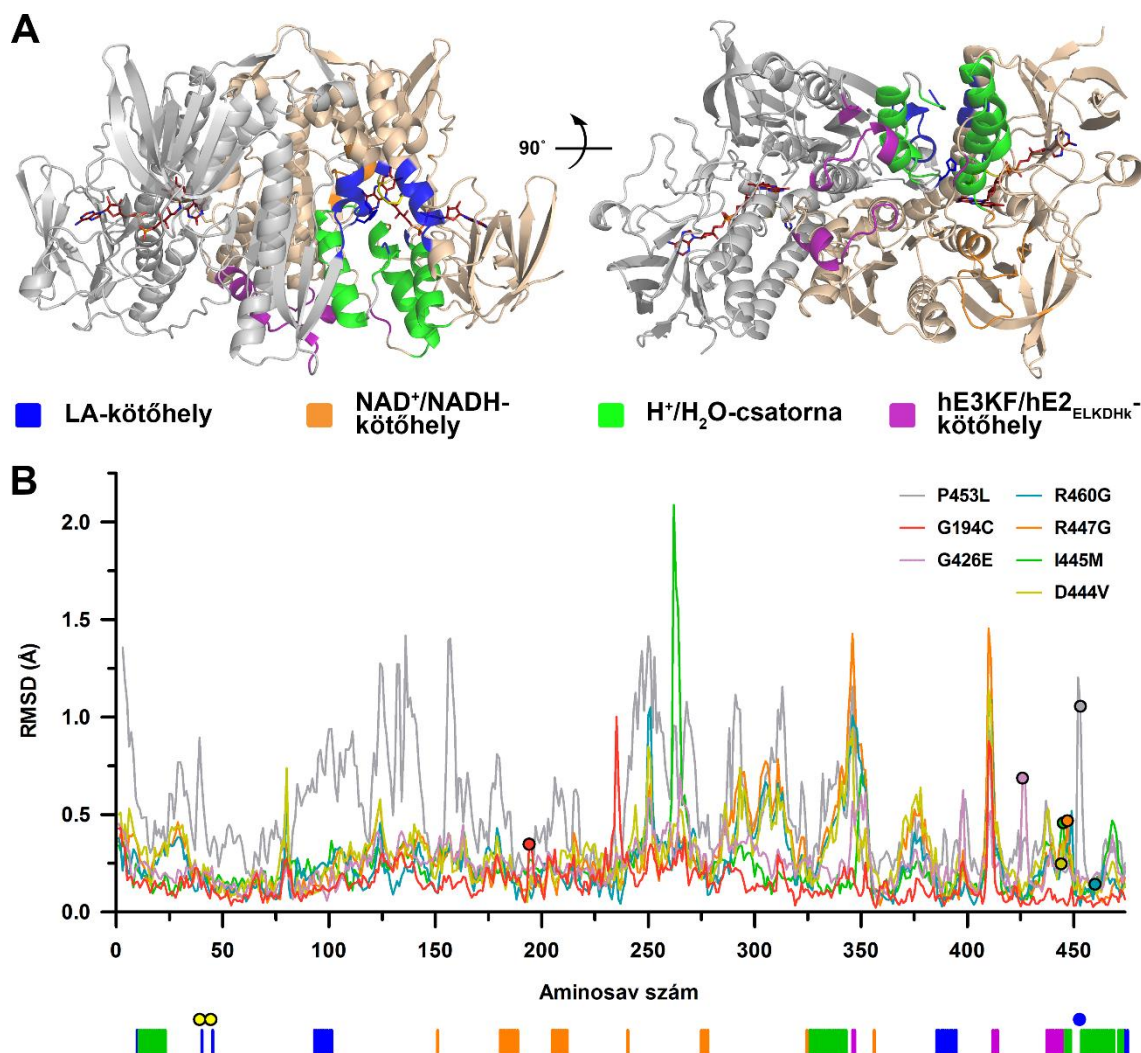
Általánosságban elmondható, hogy a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötésben résztvevő felszíni aminosavak kristálykontaktusok tekintetében erősen érintettek a 6I4Q szerkezetben. Mivel azonban a 6I4Q-hLADH szerkezetben megfigyeltekkel lényegében megegyező kristálykontaktusok jellemzőek a továbbiakban tárgyalt patogén variánsokban is, az említett vad típusú szerkezet képezte a referenciát a szerkezetek elemzéséhez.

#### **4.1.2. Hét betegséget okozó hLADH variáns szerkezete**

Az E3-deficiencia molekuláris hátterének tanulmányozására kutatócsoportunk hét betegséget okozó hLADH variáns szerkezetét határozta meg. A vizsgált szubsztitúciók egyike közvetlenül az aktív centrumot érintette (P453L), egy a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő doménben (G194C), további öt pedig a dimerizációs doménben (G426E, D444V, I445M, R447G and R460G) helyezkedett el. A variánsok közül a P453L-hLADH mutatta a legnagyobb mértékű szerkezeti eltéréseket, míg a G194C szubsztitúció rendkívül kismértékű változásokat indukált (lásd 13. ábra). A továbbiakban a patogén variánsokra vonatkozó szerkezeti eredményeket egyesével ismertetem.

##### **4.1.2.1. Az aktív centrum variáns P453L-hLADH szerkezete**

A P453L-hLADH kristályszerkezetét 2,34 Å felbontással határoztuk meg. Az elemi cella aszimmetrikus egységét nyolc monomer építette fel (A-H monomerek), melyek páronként kétfogású nemkrisztallográfiai szimmetriával jellemezhető homodimereket alkottak. A P453L-hLADH dimereket a hLADH-dimerre (6I4Q) illetve a C $\alpha$  atomokra kapott átlagos RMSD érték 0,52 Å -nek adódott, mely értékkel ez a patogén variáns bizonyult a szerkezetileg legeltérőbbnek a vad típushoz képest a vizsgálat tárgyát képező hét variáns közül. A P453L szubsztitúció közvetlenül az aktív centrumot érinti, ugyanakkor a szubsztitúció által kiváltott szerkezeti változások nem korlátozódtak az aktív centrum területére (lásd 13. ábra).



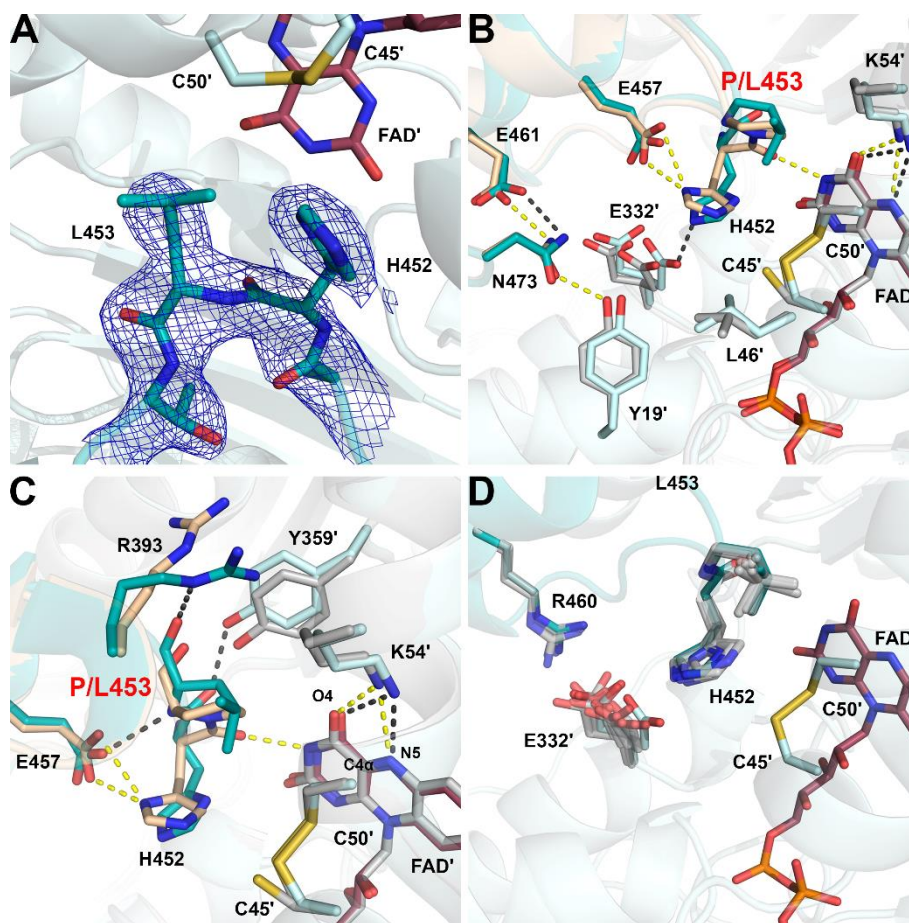
**13. ábra.** A patogén szubsztitúciók okozta aminosavsztű elmozdulások a hLADH funkcionális régióiban. (A) A szerkezeti elemzések központjában álló funkcionális régiók a vad típusú hLADH szerkezeten (PDB kód: 6I4Q), az A monomer aktív centruma körül vannak bemutatva két orientációban. A NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő régió kivételével az egyes régiók kialakításában mindkét monomer szerepet játszik, ezek az ábrán nincsenek eltérő színezéssel megkülönböztetve. (B) A vizsgált hLADH variánsok homodimerjeit (a P453L-hLADH esetén az A-B dimert) a vad típusú szerkezet homodimerjére (PDB kód: 6I4Q) illetve a főlánci atomokra kapott aminosavsztű RMSD értékek az aminosavszámozás függvényében vannak bemutatva. Mivel két hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-hLADH kötődésben szerepet játszó felszíni peptidszakasz (Gly344-Val354, ill. Lys410-Arg414) a B monomerekben kevésbé volt érintett kristály kontaktusokban az A monomerekhez képest, a B monomerekre kapott RMSD értékek kerültek ábrázolásra. A szubsztitúció által érintett aminosavra vonatkozó RMSD érték minden variáns esetén körrel van jelölve (a görbével megegyező színezéssel). A grafikon alatt az (A) panelen bemutatott funkcionális régiók szekvenciális elhelyezkedése és kiterjedése látható, megegyező színezéssel. A Cys45-Cys50 redox-aktív pár, valamint a His452 helyzetét rendre sárga és kék körök jelzik.

A vad típusú hLADH-ban az érintett Pro453 alapvető fontosságú az aktív centrum kialakításában, A His452-Pro453 *cisz*-peptidkötés révén a His452 katalitikus bázis megfelelő orientációját biztosítja. A P453L szubsztitúció révén a patogén variánsban a katalitikus bázis és a szomszédos Leu453 között *transz*-peptidkötés volt megfigyelhető (14.A ábra), aminek következtében a His452 pozíciója és konformációja lényegesen eltérő volt a vad típusú szerkezetben megfigyelthez képest. A His452 elmozdulása a katalízis szempontjából elengedhetetlenek tartott interakciók megszűnését okozta (14.B ábra): sem a His452 karbonil O-atomja és a FAD' izoalloxazin gyűrűjének N3 jelölésű N-atomja közötti H-híd (6. táblázat), sem pedig a His452-Glu457 sóhíd kialakulása nem volt lehetséges. Ez utóbbi interakció hiányában a Glu457 aminosav oldallánca is elmozdult. Az aktív centrum környékét érintő további változás a Tyr19' és az Asn473 közötti H-híd elvesztése a dimerek többségében.

A FAD konformációja nem mutatott eltérést a vad típushoz képest, annak ellenére sem, hogy több stabilizáló interakció is megszűnt a szubsztitúció közvetlen (His452(O)-FAD(N3), lásd 14.B ábra) vagy távolra ható effektusa (Lys37 és Asn38 - FAD ribóz) révén (6. táblázat). Megfigyelhetőek voltak ugyanakkor eltérések a vad típusú szerkezethez képest a FAD prosztetikus csoport izoalloxazin gyűrűje körül. Ezek közül a legszembetűnőbb az Arg393 oldallancának nagy mértékű elmozdulása volt (14.C ábra). A hLADH szerkezetében az említett arginin két sóhíd alkotása révén is részt vett a homodimer stabilizálásában (5. táblázat), a P453L-hE3 szerkezetében azonban sem a Glu363', sem pedig a Glu427' aminosavval nem volt ionos kölcsönhatásban, hanem a FAD és az azzal interakcióban levő Lys54 felé nyúlt (14.C ábra). Nem volt megfigyelhető a Lys54 oldallancának jelentős mértékű elmozdulása, viszont a vad típusú hLADH-val és a többi patogén variánszal összehasonlítva az oldallánc körüli elektronsűrűségi térkép itt volt a legkevésbé definiált, a Lys54 vad típusra vonatkoztatott aminosavsztintú RMSD értéke pedig a P453L-hLADH esetén volt a legmagasabb (13. ábra).

**6. táblázat A FAD konformációját stabilizáló kölcsönhatások a hLADH és a P453L-hLADH szerkezetében.** A feltüntetett értékek a hLADH és P453L-hLADH szerkezetekben előforduló FAD molekulák mindegyikére (vad típus: 2, P453L-hLADH: 8) megvizsgált távolságok átlag értékeit adják meg. <sup>(n)</sup>=A felső indexben megadott zárójeles számok azon monomerek számát adják meg, ahol a vizsgált atomok távolsága meghaladta a 3,6 Å értéket, ezen távolságok pedig nem képezték az átlagszámítás alapját.

Aminosav (atom)	FAD atom	Átlagos távolság (Å)	
		hLADH	P453L-hLADH
Pro16(N)	OP2	3,48	3,38
Gly17(N)	O2P	2,95	3,12
Glu36(OE1)	O3B	2,81	2,76
Glu36(OE2)	O2B	2,71	2,72
Glu36(OE2)	O3B	3,17	2,96
Lys37(N)	N3A	3,30	3,35
Lys37(NZ)	O2B	2,93	3,18 <sup>(3)</sup>
Asn38(OD1)	O2B	3,48	3,52 <sup>(6)</sup>
Asn38(ND2)	O2B	2,99	3,39 <sup>(4)</sup>
Thr44(N)	O1A	2,81	3,01
Thr44(OG1)	O2A	2,64	2,62
Cys45(N)	O2'	3,38	3,47 <sup>(1)</sup>
Cys45(N)	O4'	3,26	3,44
Lys54(NZ)	N5	3,18	3,26
Lys54(NZ)	O4	2,66	2,91
Gly119(N)	N1A	2,92	3,05
Gly119(O)	N6A	2,85	3,07 <sup>(1)</sup>
Ser150(N)	O2A	3,35	3,33 <sup>(1)</sup>
Asp320(N)	O1P	2,88	2,92
Asp320(OD1)	O3'	2,87	3,02
Asp320(OD2)	O3'	3,31	3,18
Met326(O)	O3'	3,39	3,30
Leu327(N)	O3'	3,27	3,38
Ala328(N)	N1	3,34	3,38
Ala328(N)	O2	2,76	2,81
Ala328(N)	O3'	3,36	3,43 <sup>(2)</sup>
His329(ND1)	O2	3,27	3,52 <sup>(2)</sup>
His452'(O)	N3	2,78	4,82



**14. ábra.** A P453L-hLADH szerkezete. (A) Az Ala451-Thr454 körül megjelenített  $2mF_o-DF_c$  típusú kihagyásos elektronsűrűségi térkép ( $1,5\sigma$ ) alátámasztja a Leu453 jelenlétét és a His452-Leu453 peptidkötés *transz* konfigurációját (A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék, FAD: liláspiros). (B, C) A B monomerhez tartozó aktív centrum környéke a P453L-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros, H-híd: szürke szaggatott vonal) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: bézs, H-híd: sárga szaggatott vonal) egymásra illesztett szerkezeteiben van bemutatva. (D) A His452, Leu453, Arg460 és Glu332' aminosav oldalláncok konformációs dinamikáját a P453L-hLADH nyolc egymásra illesztett monomere szemlélteti.

Az aktív centrumhoz vezető két csatorna – azaz a LA-kötőhely és a  $H^+/H_2O$ -csatorna – területén is megfigyelhetőek voltak szerkezeti változások a P453L-hLADH-ban: a szubsztrátkötő-csatorna bejáratát határoló Ala98-Leu106  $\alpha$ -hélix, továbbá a  $H^+/H_2O$ -csatorna kijáratát határoló Val20-Gly29 és Leu327-Gly344  $\alpha$ -hélixek C-terminális szakaszainak főláncai elmozdultak a szubsztitúció következtében (13. ábra). Ezen változások mindegyike befolyásolhatja az aktív centrum megközelíthetőségét. Ezen túlmenően az aktív centrum közelében, a  $H^+/H_2O$ -csatorna mentén elhelyezkedő

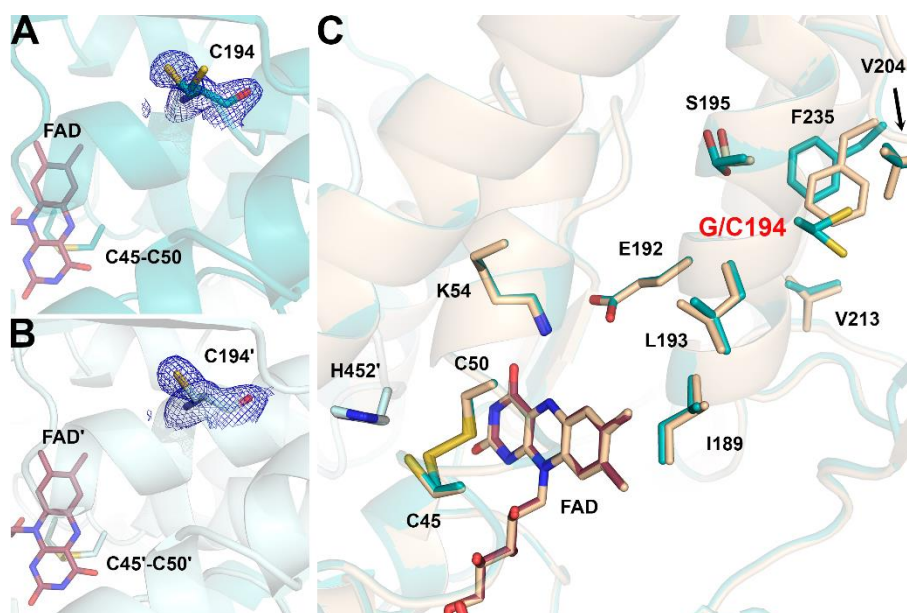
egyres aminosavak oldallánci konformációjában is megfigyelhető volt eltérés a vad típushoz képest. Ezek közül említésre érdemes a Glu332' oldalláncának konformációja, melynek dinamikája a P453L-hLADH szerkezetben megtartott volt. Ez azonban a vad típusal ellentétben nem diszkrét alternatív konformációkban mutatkozott meg – ami feltehetőleg a P453L-hLADH szerkezet rosszabb felbontásának rovására írható –, az oldalláncok körüli elektronsűrűségi térkép itt csak bizonyos monomerek esetén tette lehetővé két alternatív konformer modellezését, jellemzően inkább kevésbé jól definiált denzitás volt megfigyelhető. A nyolc mutáns monomert egymásra illesztve azonban jól látható az oldalláncok konformációs flexibilitása (*14.D ábra*). A Glu332' oldalláncának nagyfokú flexibilitását alátámasztja, hogy mivel az Arg460 guanidino-csoportja csak egy konformációban volt megfigyelhető (Arg460[A], a vad típusú szerkezetben bevezetett nomenklaturát követve), nem volt lehetőség a Glu332'-Arg460[B] sóhíd kialakulására és ezáltal a glutamát oldalláncának a stabilizálására. Ugyanakkor a közeli és a vad típushoz képest megváltozott konformációjú His452 oldalláncával egyes Glu332 konformációk H-híd kialakításához megfelelő közelségbe kerültek. Ezekben az esetekben a His452 imidazol gyűrűje olyan „átfordult” („flipped”) konformációban lett modellezve, ami a H-híd kialakulása szempontjából optimálisabb volt (*14.B ábra*). A Glu332' és a His452 oldalláncainak konformációs flexibilitása egyben a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kezdeti szakaszának változatosságát is okozta a tárgyalt patogén variánsban. A P453L-hLADH H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornájának geometriája azonban nehezen hasonlítható össze kvantitatíve a vad típuséval, mivel az aktív centrum körüli nagyfokú konformációs eltérések miatt a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát modellező gömbök száma és középpontjainak koordinátája, azaz a csatorna lefutása a kezdeti szakaszon eltérő volt. Általánosságban elmondható, hogy a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna az aktív centrum közelében, elsősorban a megváltozott His452 konformációja miatt, jelentősen leszűkült a vad típusú szerkezetben megfigyelthez képest, a csatorna szűk keresztmetszetének kialakításában a Tyr19' mellett vagy a Glu332', vagy a His452 játszott szerepet.

Ugyan a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő felszín erősen érintett volt kristály kontaktusokban, a Val347, His348, Glu437 és Tyr438 aminosavak kismértékű elmozdulást mutattak a vad típushoz képest.



#### 4.1.2.2. A NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő domént érintő G194C-hLADH variáns szerkezete

A G194C-hLADH szerkezetét 1,60 Å felbontással határoztuk meg. A patogén variáns szerkezetét a vad típusú szerkezetre illesztve az RMSD érték 0.17 Å-nak adódott a C $\alpha$ -atomokra nézve, ami alapján megállapítható, hogy a G194C-hLADH rendkívül kismértékű szerkezeti eltéréseket mutatott a vad típusú hLADH-hoz képest (lásd 13. ábra). A szubsztitúció egy konzervált  $\alpha$ -hélixet (Val188-Gly201) érint, melynek N-terminális aminosavai részt vesznek a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhely, azon belül is a nikotinamid-kötőhely kialakításában a FAD izoalloxazin gyűrűjének *re* oldalán (8. és 15. ábrák). Lokalizációja ellenére a G194C szubsztitúció nem okozott konformációs változást a nikotinamid-kötő aminosavakban, csak a közvetlen környezetében levő aminosav oldalláncokban (pl. Phe235, Val204, Val213, lásd 15.C ábra). A homodimer egyik monomerében (A lánc) a Cys194 és a szomszédos Ser195 oldalláncai körüli elektronsűrűségi térkép két alternatív konformer meglétét is jelezte (15.A ábra), ami a szubsztitúció környezetének megnövekedett dinamikájára utal.



**15. ábra.** A G194C-hLADH szerkezete. (A, B) A Cys194 aminosav körüli 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> típusú kihagyásos térkép 1,5  $\sigma$  izoelektronsűrűségi szint mellett az A és B monomerekben. Az A monomerben (A) a Cys194 a differencia denzitások alapján két alternatív konformációval lett modellezve. (C) A G194C-hLADH (zöldeskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs, FAD: bézs) egymásra illesztett szerkezetein az aktív centrum és a szubsztitúció által érintett terület látható az A monomerekben. A Ile160-Lys180 peptidszakasz a láthatóság érdekében nincs megjelenítve.

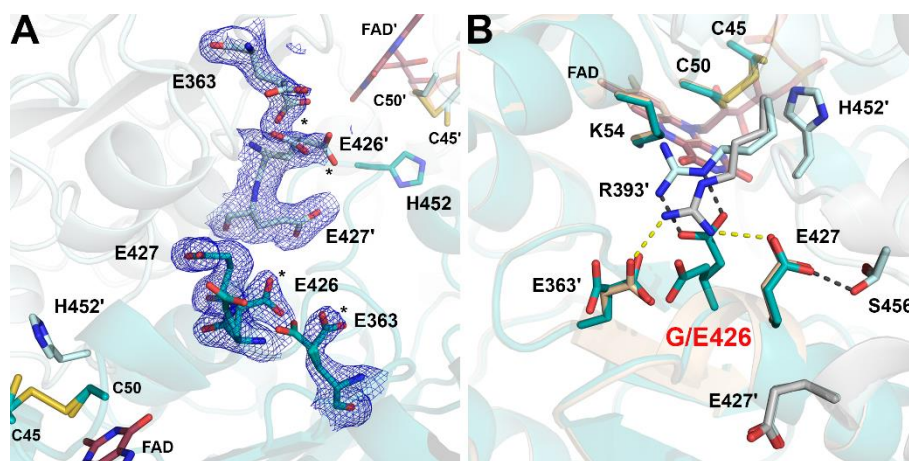
A G194C aminosavcsere hatására nem volt megfigyelhető szerkezeti eltérés a vad típushoz képest sem az aktív centrumban, sem az LA-kötőhelyen (13. ábra), sem pedig a FAD konformációjában vagy az azt stabilizáló kölcsönhatásokban. A monomerek közötti interakciók közül mindössze egy (Asp333-Arg460'[A]) hiányzott, mivel az Arg460 aminosavak oldalláncai a két monomerben csak egy-egy konformációban (Arg460[B]) lettek modellezve, ez azonban a dimerizációs felszín csak jelentéktelen mértékben érintette ( $3822 \text{ \AA}^2$ , szemben a vad típusban mért  $3894 \text{ \AA}^2$  értékkel). Az Arg460 oldallánc konformációs flexibilitásának csökkenése jelenti a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna egyedüli említésre méltó eltérését a vad típushoz képest. A Glu332 oldallánca a G194C-hLADH szerkezetben is két-két alternatív konformerrel lett modellezve. A  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna hasonló geometriával rendelkezett, szűkületét ugyanazon aminosav oldallánccok alakították ki, mint Arg460[B] jelenlétében a vad típusú szerkezetben (ezért ez nem került bemutatásra). A hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő aminosavak közül mindössze a Thr412 és az azt körülvevő aminosavak (Lys410-Thr412) főlánci atomjai mozdultak el a mutáns szerkezet B monomerében (13. ábra).

#### **4.1.2.3. A dimerizációs domént érintő patogén variánsok kristályszerkezetei**

##### **4.1.2.3.1. G426E-hLADH**

Az általunk meghatározott G426E-hLADH szerkezet  $1.84 \text{ \AA}$  felbontású, a vad típusú hLADH-dimerre illesztve a  $\text{C}\alpha$ -atomokra vonatkozó RMSD érték  $0,27 \text{ \AA}$ -nak adódott. A G426E szubsztitúció a dimerizációs domén Ala425-Tyr438  $\alpha$ -hélixének N-terminálisát érinti. Ugyan a szubsztituált aminosav (glicin lévén) nem érintett közvetlenül a dimer alegységeinek összetartásában, a szomszédos Glu427 és a sztérikusan közeli Glu363 már annál inkább: mindkét említett, oldallánci karboxilcsoportot hordozó aminosav az Arg393'-mal létesít ionos kölcsönhatást a vad típusú hLADH szerkezetben (lásd 5. táblázat). A Glu427, Glu363 és Arg393' aminosavak meglehetősen konzerváltak különböző fajok LADH szekvenciáinak összehasonlítása alapján. A patogén variánsban a két glutamát közé harmadikként beékelődő Glu426 hatása ezáltal kettős volt. Egyrészt sztérikusan akadályozta az Arg393' oldalláncának a vad típusú szerkezetben megfigyelt konformációját, így az eltávolodott a Glu427 és Glu363 aminosavaktól (16.B ábra). Ebből kifolyólag a Glu426-Arg393' és Glu363-Arg393' sóhidak nem tudtak kialakulni, lehetőség volt

viszont a Glu426-Arg393' interakció kialakítására. Ilyen módon a G426E-hLADH dimerizációs felszíne 3794 Å<sup>2</sup> volt (hLADH: 3894 Å<sup>2</sup>), az aminosavcsere itt sem vezetett a dimer disszociációjához. Másrészt azonban a Glu426 jelenléte jelentős mértékű konformációs dinamikát indukált a mutáció által közvetlenül érintett területen. A Glu426 oldalláncát a Glu426-Arg393' sóhíd nem volt képes egy konformációban stabilizálni, így az kétféle alternatív konformációban volt megfigyelhető mindkét monomerben, amivel együtt járt a Glu363 oldalláncának konformációs flexibilitása is (16. ábra). Sztérikus okokból a Glu426 és a Glu363 aminosavak alternatív konformerei „kapcsoltak” voltak, ez a phenix.refine szoftverrel történő szerkezetfinomítás során az alternatív konformerekre alkalmazott ún. „betöltöttségi csoport korlátozás” (constrained occupancy groups) segítségével lett figyelembe véve. A Glu427 oldallánca esetén a szerkezetfinomítás során elvetettük az alternatív konformerek jelenlétét, így az csak egy konformációban lett modellezve; a Glu427 feltehetőleg továbbra is stabilizálva volt a közeli Ser456 révén (annak ellenére is, hogy ez utóbbi oldallánca is mozgékonyak bizonyult), míg a Glu363 esetén ilyen jellegű kölcsönhatás kialakítására nem volt lehetőség.



**16. ábra.** A G426E-hLADH szerkezete. (A) A 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> típusú kihagyásos térkép (1,5σ) alátámasztja a G426E szubsztitúció jelenlétét és a környezetében elhelyezkedő aminosavakban indukált szerkezeti változásokat. A Glu426 és Glu363 aminosavak adott monomerben domináns konformerét csillag (\*) jelöli, az A monomer zöldeskék, a B monomer pedig világoskék színű. (B) A G426E-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: bézs) egymásra illesztett szerkezetein a szubsztitúció környezetében található kölcsönhatások láthatóak. A vad típusra jellemző, de a patogén variánsban akadályozott ionos kölcsönhatásokat sárga, az újonnan kialakuló Glu426-Arg393' interakciót szürke szaggatott vonal jelöli.

A G426E szubsztitúció okozta szerkezeti változások a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhelyhez közel helyezkedtek el, a Glu363-tól N-terminális irányban elhelyezkedő peptidszakasz ugyanis aminosavakat szolgáltat a NAD<sup>+</sup>/NADH kötéséhez (Val357, lásd 8. ábra). A kofaktor-kötőhely ezen szakaszát a His361 és Pro362 közötti *cis*-peptidkötés által kialakított éles  $\beta$ -kanyar választja el a Glu363-tól. Megfigyelhető volt a His361 oldalláncának kismértékű konformációs változása a vad típushoz képest, ami feltehetőleg a Glu363 konformációjának változásához köthető, de ennek jelentősége nem tisztázott, mivel a His361 továbbra is képes volt sóhíd kialakítására a Asp399 aminosav oldalláncával (nincs ábrázolva). Bár a tárgyalt szerkezeti változások a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhely környezetét érintik, a kofaktor-kötő aminosavak nem mutattak szerkezeti eltérést a vad típushoz képest (13. ábra).

Nem volt megfigyelhető változás továbbá sem az aktív centrumban, sem az LA-kötő csatornában, sem a FAD-kötő aminosavak konformációjában (13. ábra). Az aktív centrumhoz vezető másik csatornát, a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát illetően csak kisebb szerkezeti eltérések voltak megfigyelhetőek: a Glu461 oldalláncának kis mértékben megváltozott konformációja a csatorna helyi (nem jelentős) szűkületét okozta. A G426E-hLADH szerkezetben megfigyelt H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna alapvetően megegyezett a vad típusú hLADH csatornájával, geometriáját és belső felszínének polaritását a két-két alternatív konformerrel modellezett Glu332 és Arg460' oldalláncok együttesen szabályozták.

#### 4.1.2.3.2. D444V-hLADH

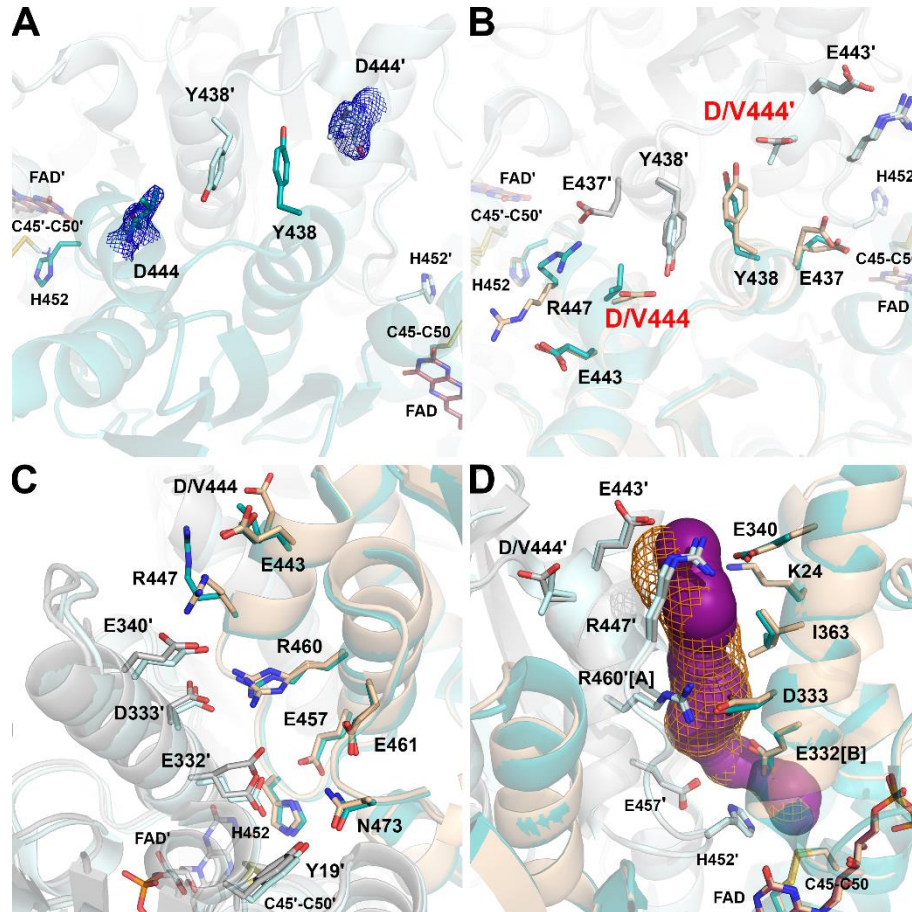
A D444V-hLADH kristályszerkezetét 1,84 Å felbontással határoztuk meg. A patogén szubsztitúciót hordozó variáns teljes szerkezetének vad típustól való eltérése RMSD(C $\alpha$ )=0,31 Å értékkel jellemezhető. A D444V szubsztitúció a hLADH szerkezetében kettős funkciót betöltő, konzervált aminosavat érint. Az Asp444 a Tyr438' aminosavval kialakított H-híd révén fontos eleme a dimerizációs felszínnek (5. táblázat), továbbá részt vesz a hE3KF és a hE2<sub>ELKDHk</sub> kötésében, és ezáltal a hPDHk és a hELKDHk komplexek kialakulásához is nélkülözhetetlen (12. ábra). Az Asp444 negatív töltésű oldalláncának valinnal történő szubsztitúciója nem okozta a homodimer disszociációját, a dimerizációs felszín területe csak kis mértékben változott a vad típushoz képest (3769 Å<sup>2</sup>, hLADH: 3894 Å<sup>2</sup>). A D444V-hLADH szerkezetben a két Tyr438 oldallánci aromás gyűrűjének síkja a vad típushoz képest elbillent, de nem volt

megfigyelhető jelentős konformációs változás (17.B ábra). Ennek oka egyrészt, hogy a két Tyr438 térben továbbra is közel helyezkedett el egymáshoz és hidrofób oldalláncuk révén továbbra is képesek voltak kölcsönhatni egymással, ezt a típusú interakciót pedig a D444V szubsztitúció nem befolyásolta. Másrészt viszont a szimmetria partner homodimer Arg307 aminosavja a vad típusú (6I4Q kódjelű) szerkezetben megfigyeltekhez hasonlóan akadályozta a tirozinok nagy mértékű eltávolodását (lásd 12. ábra). A patogén D444V-hLADH szerkezetében a két Asp444 hiányában a Tyr438-Tyr438' által kialakított hidrofób folt dominálta a fehérje felszínének hE3KF- és hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötésben szerepet játszó területét (18. ábra). Az Asp444-Tyr438' H-híd általi stabilizáció hiányában a környező, hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötésben résztvevő aminosavak közül a Glu437, Tyr438, Gly439 főlánci atomjainak kis mértékű elmozdulása volt megfigyelhető (13. ábra). A távolabbi peptidszakaszokon elhelyezkedő hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő aminosavak közül a Val347, His348 és a Thr412 főlánci mozdultak el kis mértékben (13. ábra).

A fent említett jelentős felszíni polaritásbeli változás a komplexálódás mellett a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kijáratának területét is érintette. A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna belső felszínén, elsősorban az aktív centrumhoz közeli szakaszon ugyancsak megfigyelhető volt polaritásbeli eltérés a vad típushoz képest, mely elsősorban a Glu332' megváltozott oldallánci konformációjának a következménye. Az említett Glu332' csak egyféle, a vad típusban [B]-vel jelölt konformációban volt megfigyelhető (17.C ábra). A Glu332' konformációs flexibilitásának hiányában az aktív centrum környezete tartósabban negatív töltésű. A másik, a vad típusú hLADH-ban szintén dinamikus mozgást mutató aminosav oldallánc, az Arg460 ugyancsak egyféle (Arg460[A]) konformációban lett modellezve (17.C ábra). A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna 2,5-2,7 Å átmérőjű szűk keresztmetszete ilyen módon az aktív centrumhoz közel esett és azt a vad típushoz hasonlóan a Tyr19'-Glu332'-His452 aminosavhármassal alakította ki. A csatorna aktív centrumtól távolabbi szakaszán egyes aminosavak (többek között az Ile336') kisebb konformációs eltérései, valamint két csatorna-alkotó α-hélix (Leu327-Glu344 és Val20-Gly29) C-terminálisának elmozdulása következtében a csatorna belső átmérője a vad típushoz képest megnövekedett (17.D ábra).

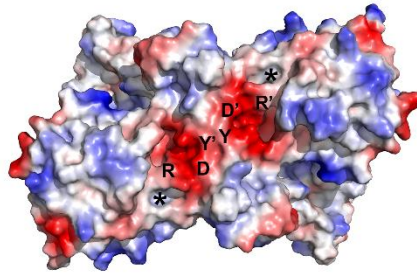
Az aktív centrumban a Cys45-Cys50 redox pár csak oxidált formában lett modellezve, ugyanakkor a S-S kötéshossz a jellemzőnél hosszabb volt, ami ugyancsak a

nyitott és zárt állapotok együttes jelenlétére utal, szerkezeti változásnak nem tekinthető. Emellett a LA- és NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhelyek területén, ill. a FAD-kötő aminosavakban sem volt tapasztalható változás a vad típushoz képest (13. ábra).



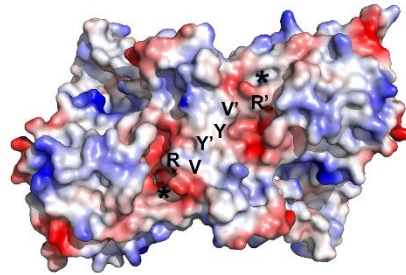
**17. ábra. Az D444V-hLADH szerkezete.** (A) A 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> típusú kihagyásos térkép (1.5 σ) alátámasztja az D444V szubsztitúció jelenlétét (A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék). A hE3KF-kötő felszín részlete (B), ill. a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát kialakító másodlagos szerkezeti elemek és az itt található poláros és protonálható oldallánccal rendelkező aminosavak (C) a D444V-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: megfelelő monomerrel megegyező színnel) egymásra illesztett szerkezetén láthatóak. (D) A D444V-hLADH (narancssárga háló) és a vad típusú enzim (lila gömbök) Caver program segítségével modellezett H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornája az egymásra illesztett szerkezeteken. A csatornák mindkét szerkezetben R460G[A] és Glu332'[B] jelenlétében lettek modellezve. (A D444V-hLADH szerkezetében a Glu332 és az Arg460 mindkét monomerben csak ez utóbbi konformációkban voltak megtalálhatóak.)

vad típus

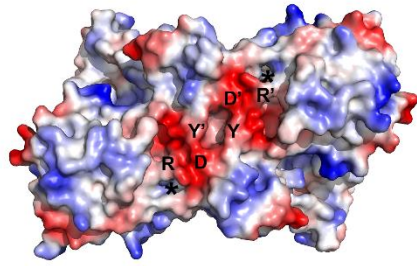


614Q

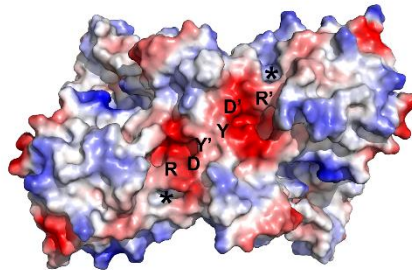
patogén variáns



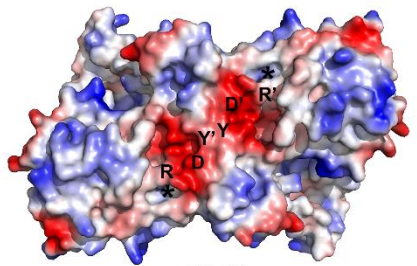
D444V-hLADH



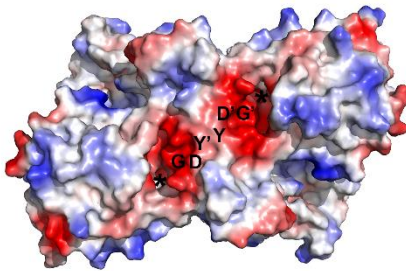
5NHG  
AB-dimer



I445M-hLADH



5NHG  
CD-dimer

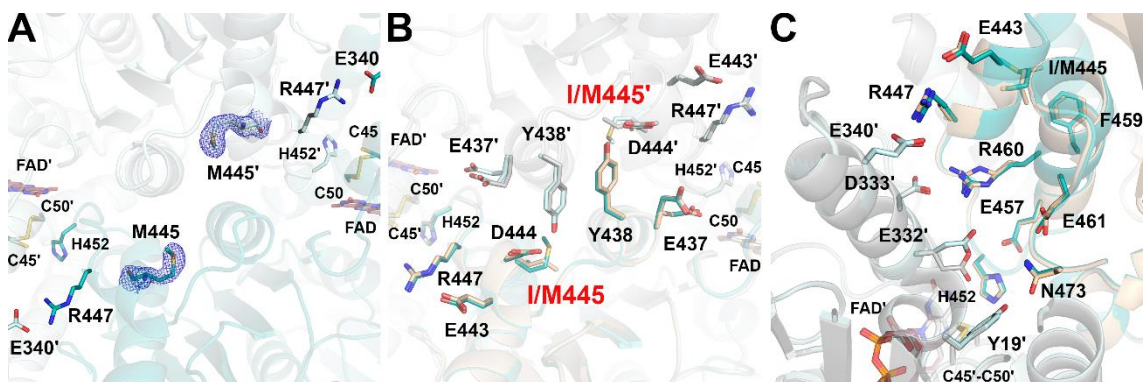


R447G-hLADH

**18. ábra.** A hLADH és egyes patogén variánsainak felületi töltéseloszlás térképei a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötőhely, ill. a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kijáratának környékén. A felszíni töltéseloszlás relatív skálán van megjelenítve (negatív – piros, pozitív – kék), a szerkezetek orientációja pedig megegyezik a 12.A ábrán bemutatott hLADH szerkezetével. A D, Y, R, V és G betűk rendre az Asp444, Tyr348, Arg447, Val444 és Gly447 aminosavakat jelölik, a csillag (\*) a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna elsődleges kijáratát jelöli (lásd 9. ábra, 1. kijárat).

#### 4.1.2.3.3. I445M-hLADH

Az I445M-hLADH szerkezetét 1,82 Å felbontással határoztuk meg. A patogén variáns teljes szerkezetének vad típustól való eltérését jellemző RMSD érték a C $\alpha$  atomokra vonatkoztatva 0,26 Å-nak adódott, mely érték a többi dimerizációs domént érintő variánssal hasonló/közel megegyező.



**19. ábra. Az I445M-hLADH szerkezete.** (A) A 2mF<sub>0</sub>-DF<sub>c</sub> típusú kihagyásos térkép (2,0 $\sigma$ ) alátámasztja az I445M szubsztitúció jelenlétét (A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék). A hE3KF-kötő felszín részlete (B), ill. a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát kialakító másodlagos szerkezeti elemek és az itt található poláros és protonálható oldallánccal rendelkező aminosavak (C) az I445M-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: megfelelő monomerrel megegyező színnel) egymásra illesztett szerkezetén láthatóak. Az I445M-hLADH szerkezetében a Glu332 és az Arg460 mindkét monomerben egy-egy konformációban lett modellezve.

Az I445M szubsztitúció a többi, itt tárgyalt dimerizációs domént érintő aminosavcserével ellentétben egy hidrofób aminosavat érint. Az Ile445 a hLADH szerkezetében egy rövid helikális szakaszon (Glu443-Val448) helyezkedik el a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötőhely és a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kijáratának közelében. Megjegyzendő, hogy a homodimer hLADH-ban a két említett peptidszakasz és ezáltal a két Ile445 egymáshoz térben közel helyezkedik el (19.A ábra). Az I445M szubsztitúció esetén hasonló méretű és hidrofóbicitású aminosavval való helyettesítés történik, amely kismértékben befolyásolta csupán az Glu443-Val448 peptidszakaszt (19.B ábra). A közeli His452-Phe468  $\alpha$ -hélixet alkotó aminosavakban ellenben megfigyelhetőek voltak szerkezeti eltérések: a Phe459 és a Glu461 oldallánca elmozdult a vad típusú szerkezetben megfigyeltekhez képest, míg az Arg460 oldallánca csak egyféle konformációban (Arg460[B]) volt jelen (19.C ábra). Ezzel párhuzamosan a Glu332'



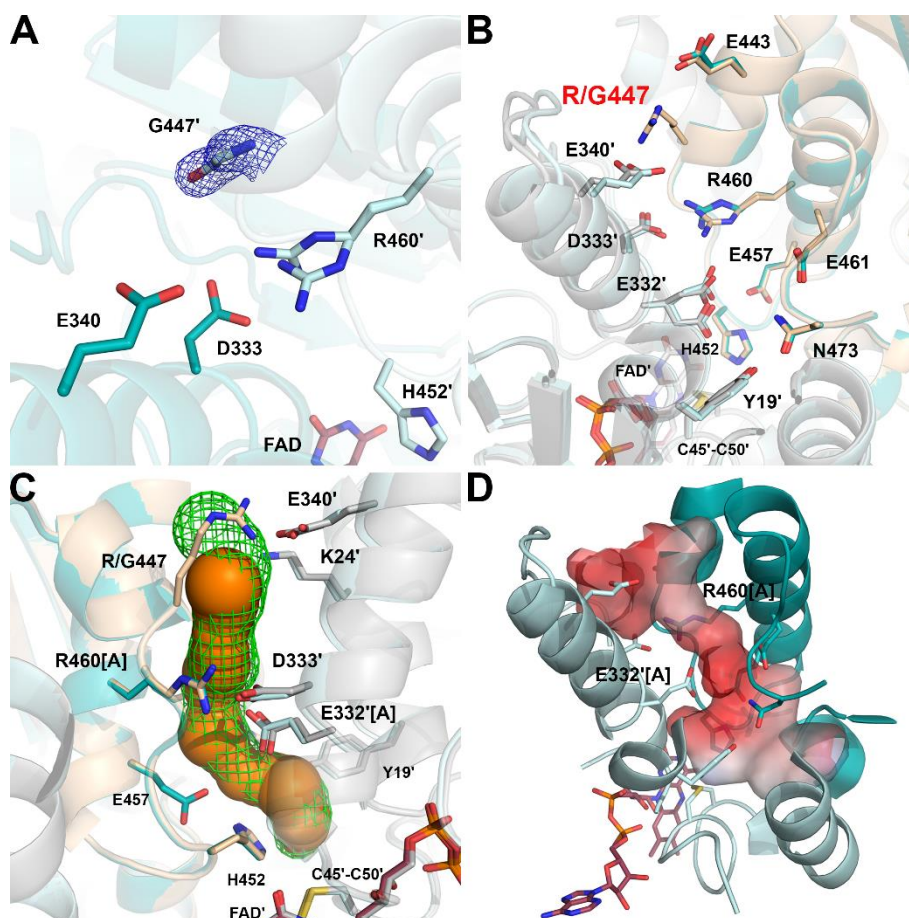
oldallánca ugyancsak elvesztette a konformációs flexibilitását és csak a Glu332'[A]-val jelölt formában volt megtalálható az I445M-hLADH szerkezetében. Az utóbbi három aminosav (Glu461, Arg460, Glu332') fontos alkotója a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornának, melynek ily módon mind a geometriája, mind pedig a polaritása eltéréseket mutatott a vad típushoz képest, de legfőképpen a csatorna dinamikája szenvedett zavart. A kristályszerkezet alapján a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna 2,1-2,5 Å átmérőjű szűk keresztmetszetét az Arg460 és az ugyancsak eltérő konformációjú Ile472 aminosavak mellett harmadikként az I445M-hLADH dimer két csatornájának egyikében a Glu461, míg a másikban a Leu464 határozta meg.

Az Arg460 és Glu332' aminosavak fent tárgyalt csökkent konformációs dinamikája az egyetlen olyan hatás, amely révén az I445M szubsztitúció befolyásolta a hLADH monomereket stabilizáló kölcsönhatásokat. Az Arg460[B] konformáció mellett ugyanis csak egyféle ionos interakció jöhet létre az Asp333' és a Glu332' aminosavakkal, ami kis mértékben befolyásolta csupán a dimerizációs felszín PISA szerver által becsült területét (3730 Å<sup>2</sup> szemben a hLADH 3894 Å<sup>2</sup> felszínével). Mindezek mellett az aktív centrum, az LA-, ill. NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhely változatlan volt a patogén variánsban a vad típushoz képest, a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötéséhez szükséges aminosavak közül a szubsztitúció helyéhez térben közeli Tyr438, Asp444, Glu437, Gly439, Glu443 és Arg447 nem mozdultak el lényeges mértékben, csak a távolabbi Thr412 volt érintett (13. ábra). (Megjegyzendő, hogy a felsorolt aminosavak egy része a kristálykontaktusok révén érintett, így korlátozott mértékben vonhatók le következtetések.)

#### 4.1.2.3.4. R447G-hLADH

Az R447G-hLADH szerkezet esetén 1.75 Å felbontást értünk el. A patogén variáns a vad típusú szerkezetre illesztve a C $\alpha$ -atomokra kapott RMSD érték 0,32 Å-nek adódott. Az R447G szubsztitúció a dimerizációs domén dimerizációban és hE3KF-kötésben egyaránt szerepet játszó argininjét érinti. Az R447G-hLADH kristályszerkezete alapján az Arg447-Glu340' ionos kölcsönhatás elvesztése nem vezetett a dimer disszociációjához, a dimerizációs felszín területe 3735 Å<sup>2</sup>, míg a hLADH esetén ez 3894 Å<sup>2</sup> volt. A szubsztitúció nem indukált szerkezeti változásokat

sem az aktív centrum, az LA-, ill.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -köthelyek területén, sem pedig a FAD stabilizálásában résztvevő aminosavakban (13. és 20.B ábra).



**20. ábra. Az R447G-hLADH szerkezete.** (A) A  $2mF_o-DF_c$  típusú kihagyásos térkép ( $1,5\sigma$ ) alátámasztja az R447G szubsztitúció jelenlétét (A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék). Az Arg460 csak a B monomerben lett két alternatív konformerrel modellezve. (B) A  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornát kialakító másodlagos szerkezeti elemek és az itt található poláros és protonálható oldallánccal rendelkező aminosavak az R447G-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: szürke) egymásra illesztett szerkezetén láthatóak. (C) Az R447G-hLADH (narancssárga gömbök) és a vad típusú enzim (zöld háló) Caver program segítségével modellezett  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornái az egymásra illesztett szerkezeteken vannak szemléltetve. A csatornák mindkét szerkezetben R460G[A] és Glu332'[A] jelenlétében lettek modellezve. (D) Az R447G-hLADH LA-, ill.  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornáinak belső felszíni polaritástérképei Glu332'[A] és Arg460[A] jelenlétében vannak bemutatva (negatív – piros, pozitív – kék; a vad típusúval való összehasonlításhoz lásd 9.A ábra).

A hLADH szerkezetben az Arg447-Glu340' sóhíd közvetlenül a fehérje felszínén, a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna kijáratánál található meg és két szűkebb kivezető

szakaszra osztja azt (9. ábra). Az R447G-hLADH szerkezetben az említett sóhíd hiányában a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kijárata a vad típushoz képest kitágult és tölcészerű formát mutatott, továbbá lerövidült ~ 21 Å-re (hLADH: ~26 Å) (lásd 20.C és 20.D ábra). Az Arg447-Glu340' interakció által biztosított stabilizáló hatás hiányában az Ile337'-Asn352' peptidszakasz elmozdult a vad típushoz képest, ami egyrészt a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornaalkotó Leu327'-Gly344' α-hélix C-terminális szakaszát (20.B ábra), másrészt az azt követő, hE3KF-kötésében szerepet játszó Gly345'-Val354' rendezetlen szerkezetű (random coil) régióinak egy részét is érintette. (Az utóbbi változás az A monomerben a kristálykontaktusok miatt kevésbé tapasztalható.) A Glu340' energetikailag kedvező konformációja megtartott volt, viszont neutralizáció hiányában a csatorna kijáratának környezetét és egyben a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötőhely területét jelentősen negatívabbá tette a vad típushoz képest (18. és 20.D ábra). A hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő aminosavakat illetően a mutáció közvetlenül érinti az Arg447 aminosavat, továbbá a Glu443, Val347, His348, Thr412 és Asp413 érintettsége volt megfigyelhető (13. ábra). A többi, alkompexek kialakításában résztvevő aminosav a kristálykontaktusok miatt nem volt vizsgálható.

Az R447G-hLADH H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornájának aktív centrumhoz közeli szakasza a vad típusal lényegében megegyező volt, geometriáját és polaritását a két alternatív konformerrel modellezett Glu332' szabályozta, mivel az Arg460 döntően (az egyik monomerben kizárólagosan, a másikban dominánsan) Arg460[A] konformációban volt megfigyelhető. A csatorna szűk keresztmetszetét Glu332'[A] mellett a Glu332'[A]-Glu457-Asn473 aminosavak (3 Å), míg Glu332'[B] mellett a Glu332'[B]-Tyr19'-His452 aminosavak (2,6 Å) alkották. Az Arg460[B] melletti jelentősebb szűkület csak az egyik aktív centrumhoz vezető csatornában volt megfigyelhető (2,2 Å, az Arg460[B]-Leu464-Ile336 aminosavak révén).

#### 4.1.2.3.5. R460G-hLADH

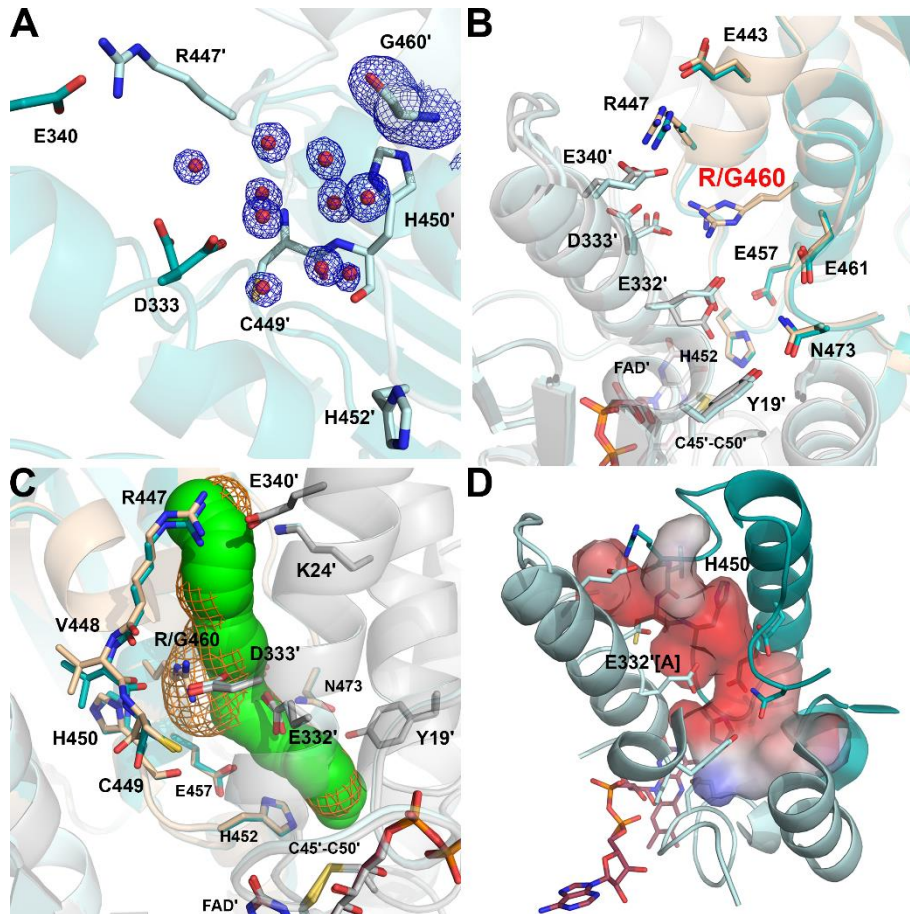
Az R460G-hLADH szerkezetét 1,44 Å felbontással sikerült meghatározni. A patogén szubsztitúciót hordozó variáns teljes szerkezetének vad típustól való eltérése a többi dimerizációs domént érintő variánshoz hasonló mértékű volt, a dimerek egymásra illesztésekor az RMSD értéke 0,26 Å-nek adódott a C<sub>α</sub>-atomokra. Az R460G patogén szubsztitúció következtében nincs lehetőség a hLADH homodimer Arg460-Asp333'

sóhidjának kialakulására, de a monomerekre történő disszociációt a kristályszerkezet ennél a variánsnál sem tudta kimutatni: a dimerizációs felszín  $3735 \text{ \AA}^2$ -re becsülhető a vad típus  $3894 \text{ \AA}^2$  felszínével szemben. Hasonlóan a G194C-hLADH és a dimerizációs domént érintő egyéb variánsokhoz, az R460G-hLADH szerkezetében nem volt megfigyelhető szerkezeti változás sem az aktív centrum, az LA-, ill.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötőhelyek területén, sem pedig a FAD stabilizálásában résztvevő aminosavakban (lásd *13. és 21.B ábra*).

A hLADH szerkezetében az Arg460-Asp333' sóhid nemcsak a dimerizációhoz, hanem a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna integritásához is szükséges azáltal, hogy két csatornaalkotó  $\alpha$ -hélixet (Leu327'-Gly344' és His452-Phe468) kapcsol össze egymással, valamint közvetlenül is részt vesz a csatorna belső felszínének kialakításában. Az Arg460-Asp333' sóhid általi stabilizáció hiányában a fent említett Leu327'-Gly344'  $\alpha$ -hélix (*20.B ábra*) és az azt követő Gly345-Cys353' rendezetlen szerkezetű (random coil) szakasz kismértékben elmozdult a vad típushoz képest (a változás az A monomerben a kristálykontaktusok miatt kevésbé jelentős). A nagy kiterjedésű Arg460 glicinre történő szubsztitúciója a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna kiöblösödését vonta maga után az R460G-hLADH szerkezetben (*21.C ábra*). Az így kialakult öblösödést vízmolekulák töltötték ki és ezáltal a Cys449-His450 aminosavak víz-általi hozzáférhetősége megnőtt (*21.A és 21.C ábra*). A Cys449-His450 peptidkötés, valamint a His450 oldallánci imidazolgyűrűjének konformációja eltért a vad típushoz képest (*21.C ábra*), továbbá a Cys449 oldallánca két konformációval lett modellezve az R460G-hE3 B monomerében. Mindezen szerkezeti változások hatására a His450-tól N-terminális irányban elhelyezkedő aminosavak főláncának egészen a Glu443-ig tartó szakasza kis mértékben elmozdult a vad típushoz képest érintve ezáltal több hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötésben résztvevő aminosavat is. Az R460G szubsztitúció tehát, különböző mértékben ugyan, de hatással volt a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub> kötésében szerepet játszó Val347, His348, Thr412, Asp413, Glu443, Asp444 és Arg447 aminosavak szerkezetére is (*13. ábra*).

A  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna geometriájában a fent tárgyalt kiöblösödésen felül az aktív centrumhoz közeli szakaszon is mutatkoztak eltérések az R460G-hLADH szerkezetben. A Glu332' oldallánca csak egy konformációban (Glu332[A]) volt megfigyelhető, melynek következtében a csatorna  $3.0\text{-}3.2 \text{ \AA}$  átmérőjű szűk keresztmetszetét (az Arg460 hiányában) a Glu332'-Glu457-Asn473 aminosav-hármas alakította ki, míg dinamika

nem volt megfigyelhető. Az R460G szubsztitúció közvetlenül befolyásolta a csatorna belső felszínének polaritását is: az Asp333' neutralizációjának hiányában a szubsztitúció környéke fokozottan negatív polaritású volt (21.D ábra).

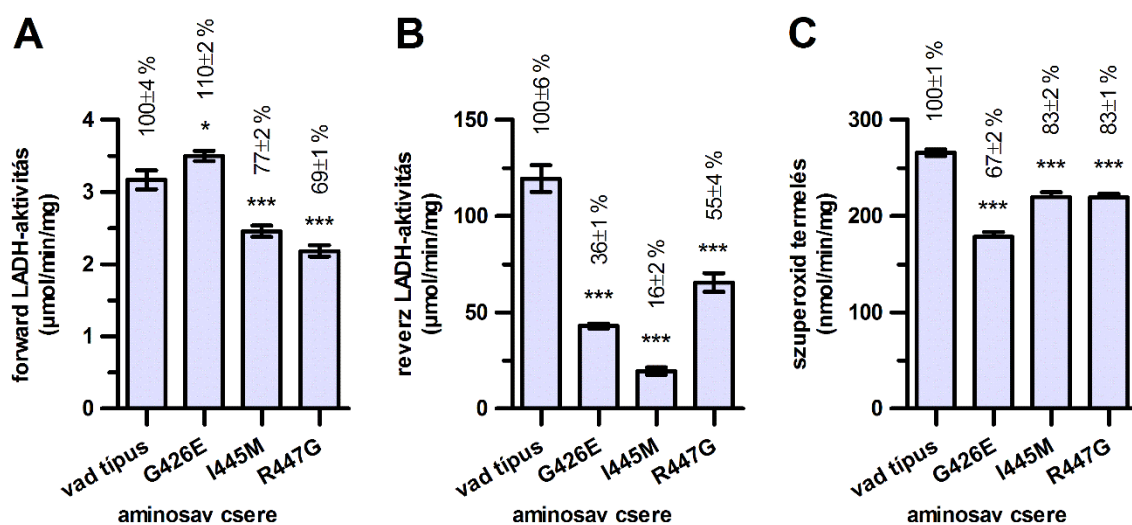


**21. ábra. Az R460G-hLADH szerkezete.** (A) A 2mF<sub>o</sub>-DF<sub>c</sub> típusú kihagyásos térkép (1,5σ) alátámasztja az R460G szubsztitúció és a nagy térkitöltésű Arg460 oldallánc helyén a vízmolekulák jelenlétét (A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék). (B) A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornát kialakító másodlagos szerkezeti elemek és az itt található poláros és protonálható oldallánccal rendelkező aminosavak az R460G-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: liláspiros) és a vad típusú hLADH (PDB kód: 6I4Q; bézs/szürke, FAD: szürke) egymásra illesztett szerkezetén láthatóak. (C) Az R460G-hLADH (narancssárga háló) és a vad típusú enzim (zöld gömbök) Caver program segítségével modellezett H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornái az egymásra illesztett szerkezeteken lettek bemutatva. A csatornák mindkét szerkezetben R460G[A] (vad típus) és Glu332'[A] jelenlétében lettek modellezve. (D) Az R460G-hLADH LA-, ill. H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornáinak belső felszíni polaritástérképei Glu332'[A] és Arg460[A] jelenlétében vannak bemutatva (negatív – piros, pozitív – kék; a vad típusal való összehasonlításhoz lásd 9.A ábra).

## 4.2. Az enzimaktivitás-mérések eredményei

### 4.2.1. A betegséget okozó szubsztitúciók hatása

Munkám során a hLADH betegséget okozó mutációi közül három dimerizációs domént érintő szubsztitúció, a G426E, I445M és R447G enzimaktivitásra kifejtett hatását vizsgáltam. A kísérleti körülmények megegyeztek a laboratóriumunkban korábban alkalmazott körülményekkel, ami az eredmények összehasonlíthatóságát tette lehetővé (115). Az eredményeket a 22. ábra foglalja össze.



**22. ábra. Patogén aminosav szubsztitúciók hatása a LADH specifikus és szuperoxid termelő aktivitásaira.** A vad típusú hLADH és három patogén variánsának specifikus aktivitását a forward irányban (A) a NADH termelésén, reverz irányban (B) pedig a NADH fogyasztásán keresztül, 340 nm-en történő spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. Kísérleti körülmények: 165 µM NAD<sup>+</sup>, 0,9 mM DHLIS és 123 ng fehérje (forward), vagy 165 µM NADH, 0,9 mM LA és 12,3 ng fehérje (reverz), 50 mM K-PO<sub>4</sub> puffer, pH 7,3, 300 µl végtérfogat, 37 °C. A szuperoxid-képző aktivitást (C) részlegesen acetilált citokróm c szuperoxid általi redukcióján alapuló méréssel, 550 nm-en történő spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. Kísérleti körülmények: 165 µM NADH, 50 µM részlegesen acetilált citokróm c, 2,47 µg fehérje, 50 mM K-PO<sub>4</sub> puffer, pH 6,3, 200 µl végtérfogat, 37 °C. A hibásávok a 3-5 párhuzamos mérés alapján számolt standard hibákat (S.E.M.) mutatják, az oszlopok feletti százalékos értékek a variánsok aktivitásait (± S.E.M.) fejezik ki a vad típushoz képest. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket csillag jelöli (\*: p≤0,05, \*\*: p≤0,01, \*\*\*: p≤0,001).

A vizsgált aminosavcserek mindegyike nagyobb mértékű aktivitáscsökkenést okozott a LADH-reakció reverz irányában a forward irányú reakcióhoz képest. A G426E-hLADH variánsban (egyedülként a vizsgált mutánsokban) a forward irányú

LADH-aktivitás kismértékben megnövekedett a kísérleti körülményeink között, míg a reverz irányú aktivitás  $36\pm 1\%$ -ra csökkent a vad típushoz képest. Az I445M-hLADH variáns esetén ugyancsak jelentős eltérés volt az aktivitás csökkenésének mértékében a LADH-reakció két irányában: a forward irányban  $77\pm 2\%$ -ra, ezzel szemben a reverz irányban  $16\pm 2\%$ -ra csökkent az aktivitás a vad típushoz képest. Az R447G szubsztitúció ezzel szemben hasonló mértékben csökkentette mind a forward, mind pedig a reverz irányú LADH-aktivitást (rendre  $69\pm 1\%$  és  $55\pm 4\%$  a vad típushoz képest). A három patogén variáns egyike sem mutatott emelkedett ROS-képzést a vad típushoz képest.

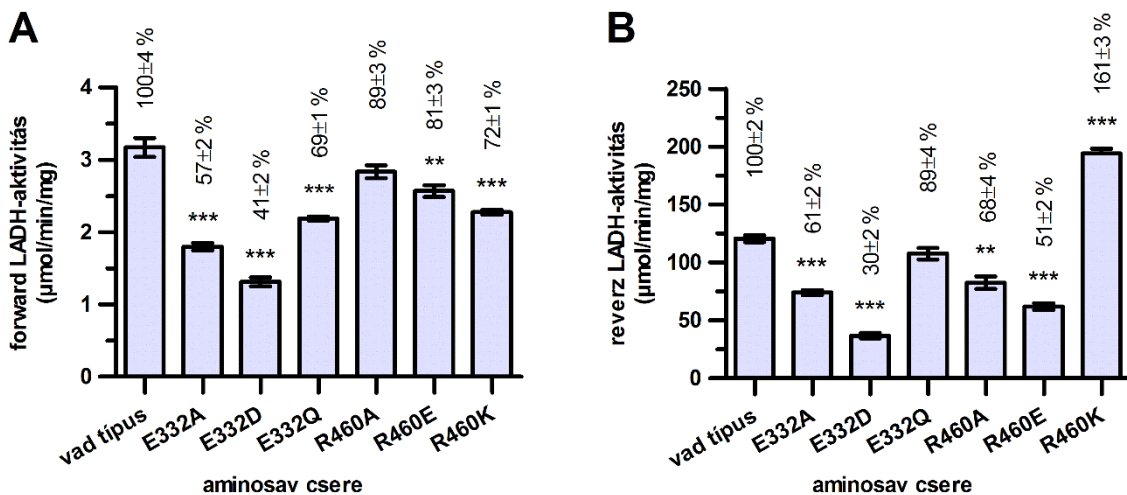
#### 4.2.2. A Glu332 és az Arg460 szubsztitúciók hatása

A vad típusú hLADH szerkezetben a Glu332 és az Arg460 konformációs flexibilitást mutatott és ezáltal a  $H^+/H_2O$ -csatorna geometriáját és/vagy polaritását dinamikusan modulálták (lásd 4.1.1.3. A  $H^+/H_2O$ -csatorna fejezet). A két említett aminosav legalább egyike a jelen dolgozatban vizsgált hét betegséget okozó hLADH variáns többségében konformációs változást szenvedett. A Glu332 és Arg460 szerepét a fiziológiás és ROS-képző aktivitásban az aminosavak szubsztituált variánsainak enzimaktivitás mérésén keresztül vizsgáltam. Az eredményeket a 23. és 24. ábrák foglalják össze.

A Glu332 alaninnal, aszpartáttal, illetve glutaminnal való szubsztitúciói egymással összehasonlítva különböző mértékben csökkentették az enzimaktivitást mind a forward, mind pedig a reverz irányban a vad típushoz képest, az aktivitáscsökkenés azonban az egyes szubsztitúciók esetén a két irányban hasonló mértékű volt. A legkisebb aktivitáscsökkenést az E332Q szubsztitúció, míg a legnagyobb mértékű aktivitás csökkenést az E332D szubsztitúció okozta. A ROS-képző aktivitásra egyedül az E332A szubsztitúció nem volt hatással, az E332D-hLADH esetén  $61\pm 2\%$ -ra csökkent, az E332Q-hLADH esetén pedig  $18\pm 2\%$ -kal megnövekedett ROS-képzés volt megfigyelhető a vad típushoz képest.

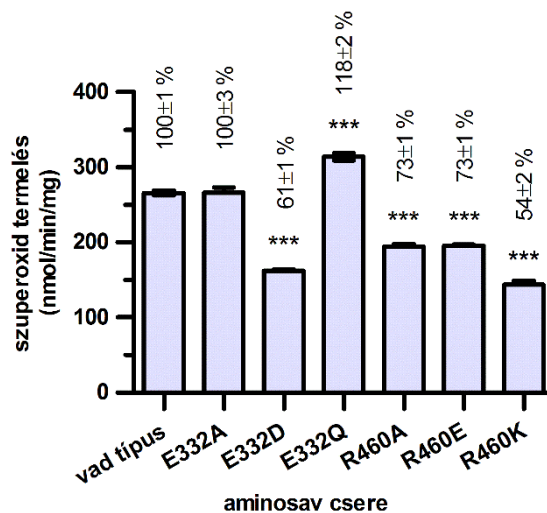
Az Arg460 alaninra, glutamátra, illetve lizinre történő cseréje elsősorban a reverz irányú LADH-aktivitásra volt hatással: az R460A és R460E aminosav cserék rendre  $68\pm 4\%$  és  $51\pm 2\%$ -ra csökkentették, míg az R460K  $161\pm 3\%$ -ra növelte a specifikus aktivitást a vad típushoz képest. Ezzel ellentétben a forward irányú LADH-aktivitást legnagyobb mértékben az R460K aminosavcsere csökkentette ( $72\pm 1\%$  a vad

típushoz képest), míg az R460A nem okozott szignifikáns változást. A ROS-képző aktivitást mindhárom vizsgált szubsztitúció csökkentette.



**23. ábra.** A Glu332 és az Arg460 szubsztitúciók hatása a LADH-aktivításra. A vad típusú hLADH és variánsainak specifikus aktivitásait a forward irányban (A) a NADH termelésén, reverz irányban (B) pedig a NADH fogyasztán keresztül, 340 nm-en történő spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. Kísérleti körülmények: 165 µM NAD<sup>+</sup>, 0,9 mM DHLIS és 123 ng fehérje (forward), vagy 165 µM NADH, 0,9 mM LA és 12,3 ng fehérje (reverz), 50 mM K-PO<sub>4</sub> puffer, pH 7,3, 300 µl végtérfogat, 37 °C. A hibasávok a 3-5 párhuzamos mérés alapján számolt standard hibákat (S.E.M.) mutatják, az oszlopok feletti százalékos értékek a variánsok aktivitásait (± S.E.M.) fejezik ki a vad típushoz képest. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket csillag jelöli (\*: p≤0,05, \*\*: p≤0,01, \*\*\*: p≤0,001). Összehasonlításképpen, azonos körülmények között mérve a patogén R460G aminosavcsere a LADH-aktivitást a forward katalitikus irányban 22±6%-ra, a reverz irányban pedig 18±1%-ra csökkentette a vad típushoz képest (115).





**24. ábra. A Glu332 és az Arg460 szubsztitúciók hatása a szuperoxid-képzésre.** A szuperoxid-képzést részlegesen acetilált citokróm c szuperoxid általi redukcióján keresztül, 550 nm-en történő spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. Kísérleti körülmények: 165  $\mu$ M NADH, 50  $\mu$ M részlegesen acetilált citokróm c, 2,47  $\mu$ g fehérje, 50 mM K-PO<sub>4</sub> puffer, pH 6,3, 200  $\mu$ l végtérfogat, 37 °C. A hibaszávok a 3-5 párhuzamos mérés alapján számolt standard hibákat (S.E.M.) mutatják, az oszlopok feletti százalékos értékek a variánsok aktivitását ( $\pm$  S.E.M.) fejezik ki a vad típushoz képest. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket csillag jelöli (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ). Összehasonlításképpen, azonos körülmények között mérve a patogén R460G aminosavcsere a szuperoxid-képzést a 74 $\pm$ 2%-ra csökkentette a vad típushoz képest (115)

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A hLADH szerkezetét és a katalizált reakciót érintő új megfigyelések

A hLADH jelen dolgozatban bemutatott két új kristályszerkezete nem változtatta meg az enzim szerkezetével és a katalizált reakció mechanizmusával kapcsolatos főbb ismereteinket. A kristályszerkezetek és a Glu332, ill. Arg460 aminosavak szubsztitúciójával létrehozott variánsok aktivitás méréséből származó eredmények együttesen azonban új részletek feltárására adott lehetőséget egyes funkcionális régiókkal, elsősorban a  $H^+/H_2O$ -csatornával kapcsolatban.

#### 5.1.1. A $H^+/H_2O$ -csatorna és két kitüntetett aminosavjának feltételezett szerepe

Az aktív centrumhoz vezető, a komplex specifikus E2-alegységhez kovalensen kötött DHLA-kofaktor, mint szubsztrát befogadására azonban geometriájából kifolyólag alkalmatlan, víz számára hozzáférhető csatorna szerepét korábban nem vizsgálták részletesen. Feltételezhető, hogy a csatornán keresztül  $H_2O$  molekulák hagyhatják el az aktív centrumot, melyeket a DHLA a bekötődésekor passzívan kiszorít (27), és/vagy a csatorna a szubsztrát oxidációja során keletkező  $H^+/H_3O^+$  számára szolgál kivezetésként (96). A  $H^+/H_2O$ -csatornát határoló  $\alpha$ -hélixek N-terminálisukkal az aktív centrum és a FAD prosztetikus csoport felé, C-terminálisukkal a csatorna kijárata felé mutatnak. Az  $\alpha$ -hélixek ilyen jellegű elrendeződésének szerepe lehet akár a FAD-prosztetikus csoport redox potenciáljának, vagy akár a katalitikus bázis, a His452 pKa értékének finom szabályozásában (27). A  $H^+/H_2O$ -csatornát a szubsztrátkötő-csatornától a fehérje aktív centrum felé beékelődő C-terminális szakasza választja el. Ez utóbbi szerkezeti elemet ugyancsak összefüggésbe hozták a FAD redox potenciáljának szabályozásával, delécíója ugyanis jelentősen megnövelte a LADH a érzékenységet NADH általi inhibícióra (148).

Az 1,75 Å felbontású hLADH-szerkezetben (PDB kód: 6I4Q) a hidrofil  $H^+/H_2O$ -csatornát alkotó két, fiziológias pH-n töltéssel rendelkező aminosav, a Glu332 és az Arg460' oldalláncának konformációs flexibilitása volt megfigyelhető. Az alternatív konformerek révén a két aminosav dinamikusan szabályozza a  $H^+/H_2O$ -csatorna geometriáját, a csatorna szűk keresztmetszetének elhelyezkedését és töltéseloszlását. Fontos megemlíteni, hogy az Arg460' egyik lehetséges konformációja

(Arg460'[A]) mellett a Glu332 mindkét lehetséges konformációban részt vesz a csatorna szűk keresztmetszetének kialakításában olyan konzervált aminosav oldalláncokkal együttesen (His452' és Tyr19, vagy Glu457' és Asn473'), melyek a katalitikus aktivitásban és/vagy a szubsztrát kötődésében, továbbá az aktív centrum integritásának fenntartásában is szerepet játszanak (27, 31, 32, 95, 148, 149). Az Arg460' mindemellett a csatornát határoló His452'-Phe468' és Leu327-Gly344  $\alpha$ -hélixeket kapcsolja össze az Asp333 és Glu332 aminosavakkal létesített sóhidak révén.

Különböző fajok LADH-szekvenciáit összehasonlítva megállapítható, hogy a (humán számozás szerinti) Glu332 az eukariótákban konzervált aminosav, míg prokariótákban a helyét többnyire szerin tölti be, mindössze az *E. coli* LADH enzimben és a *Pseudomonas putida* ELKDHk-ben megtalálható LADH-Val izoformában helyettesíti apoláros oldalláncú aminosav, rendre valin és metionin.

A Glu332 alaninnal, aszpartáttal, valamint glutaminnal történő szubsztitúciója a forward és reverz irányú LADH-aktivitást párhuzamosan, de egymással összehasonlítva különböző mértékben csökkentették. Az E332A-hLADH esetén megfigyelt közel 40%-os aktivitáscsökkenés (reverz és forward irányban egyaránt, a vad típushoz képest) alátámasztja az aktív centrumhoz közeli Glu332 szerepét a katalízisben. Az E332Q aminosavcsere által okozott viszonylag kis mértékű aktivitáscsökkenés (31% a forward és 11% reverz irányban) alapján az oldallánci karboxilcsoport szerepe a töltést nem, de nagy elektronegativitású atomot ugyancsak hordozó amidcsoporttal részlegesen helyettesíthető, elsősorban a reverz irányú LADH-reakció során. Az E332D aminosavcsere a E332A-val összehasonlítva nagyobb mértékű aktivitáscsökkenést okozott (59% a forward és 70% reverz irányban). Ez alapján megállapítható, hogy az oldallánci karboxilcsoport az aktív centrumtól nem megfelelő távolságban önmagában nem elégséges az LADH-aktivitás fenntartására, ellenkezőleg, feltételezhetően kedvezőtlenebb töltéseloszlást és/vagy kedvezőtlenebb kölcsönhatások kialakulását eredményezi az aktív centrum körül és ezáltal potenciálisan akadályozza a negatív töltés átmeneteken alapuló szubsztrát átalakítást.

A krisztallográfiai és enzimaktivitás eredmények alapján feltételezhető, hogy a Glu332 a szubsztráttal vagy egy átmeneti intermedierral esetlegesen kölcsönhat és/vagy a  $H^+/H_2O$  továbbításában aktívan részt vesz. A prokariótákban sok esetben azonos pozícióban elhelyezkedő szerin mindezen funkciókat elméletileg szintén képes lehet

betölteni, aszpartáttal összehasonlítva azonban valószínűleg nem vezet kedvezőtlen interakciók kialakulásához. A ROS-képzés szempontjából a Glu332 önmagában inert aminosavnak mutatkozott, alaninnal történő szubsztitúciója ugyanis a ROS-képző aktivitást nem befolyásolta. Szerepe volt ugyanakkor az oldallánci karboxilcsoport áthelyeződésének, vagy amidcsoportra történő cseréjének: az E332D 39%-kal csökkentette, míg az E332Q 18%-kal növelte a ROS-képző aktivitást. Egy aszpartát vagy glutamin megjelenése tehát direkt vagy indirekt módon befolyásolni látszik a ROS-képzés aktivitását és/vagy mechanizmusát, egyelőre ismeretlen módon.

Az Arg460 esetén teljes konzerváltságáról még eukarióták között sem beszélhetünk, a homológ pozícióban növényekben és egyszeljtű eukariótákban lizinnel, a prokarióták többségében pedig hisztidennel való konzervált helyettesítés történik. Kivételeket azonban itt is találunk, *Staphylococcus aureus* és *Bacillus stearothermophilus* fajokban metionin, *Mycobacterium tuberculosis*ban és *Pseudomonas putida* LADH-Val izoenzimében glutamin, *E. coli*-ban pedig glicin található a homológ pozícióban. A tárgyalt arginin helyettesítése rövidebb oldalláncú aminosavval azonban magával vonja a szomszédos H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna-alkotó  $\alpha$ -hélixen a kölcsönható aminosav helyettesítését is: a humán LADH szerkezetben jelenlevő Arg460-Asp333' sóhidat ebből adódóan Lys-Glu', illetve His-Glu' kölcsönhatások váltják fel, melyek ugyancsak képesek lehetnek az  $\alpha$ -hélixek stabilizálására és a csatorna integritásának fenntartására. Egyedül a *Trypanosoma brucei brucei* esetén figyelhető meg a Lys-Asp aminosav kombináció. A fentebb említett, kivételt képező fajokban az arginint helyettesítő metionin, glutamin vagy glicin mellett az Asp333' aminosavval homológ pozícióban rendre tirozin, alanin, ill. hisztidin helyezkedik el, ezen fajok LADH enzimjeiben tehát a két aminosav között sóhid kialakítására nincsen lehetőség, ugyanakkor minden esetben jelen van egy, poláros oldallánci csoporttal rendelkező, nagyobb térkitöltésű aminosav.

A hLADH-ban az Arg460 alaninnal, glutamáttal, valamint lizinnel történő szubsztitúciója a kísérleti körülményeink között a forward irányú LADH-reakciót nem, vagy csak kismértékben csökkentette (max. 28%-os csökkenés a vad típushoz képest), míg a reverz irányú reakciót illetően nem egységes a kiváltott hatás: az R460A és az R460E aminosav cserék rendre 32 és 49%-os aktivitáscsökkenést eredményeztek, az R460K ezzel ellentétben 61%-kal növelte az aktivitást a vad típushoz képest. A hLADH

ROS-képző aktivitását mind a három vizsgált aminosavcsere csökkentette. Korábban, azonos kísérleti körülmények között a patogén R460G aminosavcsere ezzel szemben igen jelentős, rendre 78 és 82%-os csökkenés okozott a LADH-aktivitásban a forward és reverz irányban és a ROS-képzést is csökkentette (lásd 1. és 7. táblázat) (115).

Az eredmények alapján a LADH szerkezetekben megfigyelhető (humán szekvencia szerinti) Arg460-Asp333' vagy Lys-Glu'/His-Glu' sóhídnak a reverz irányú LADH-aktivitás szempontjából tehát nagyobb jelentősége van. A szomszédos  $\alpha$ -hélixek összekapcsolása és stabilizálása révén az Arg460 aminosavnak a fő szerepe feltehetőleg egy stabilabb aktív centrum biztosítása, továbbá az érintett  $\alpha$ -hélixek dipólusmomentumain keresztül a FAD redox potenciáljának befolyásolása. A FAD redox potenciáljának változására ugyanis a reverz irányú reakció feltételezhetően nagyobb érzékenységet mutat figyelembe véve, hogy a LADH négyelektronos redukciója, azaz az inaktív  $\text{EH}_4$ -LADH állapot kialakulása NADH által könnyen megvalósul, DHLA révén azonban jellemzően még nagy koncentráció esetén sem lehetséges (18, 38). Mindez magyarázatul szolgálhat az R460A- és R460E-hLADH variánsok megtartott forward irányú, de csökkent reverz irányú LADH-aktivására. Az R460E aminosavcsere esetén a negatív töltést hordozó glutamát jelenléte a más, ugyancsak negatív töltést hordozó aminosav oldalláncokkal körülvett pozícióban az alaninhoz képest még kedvezőtlenebb is volt, valószínűleg a markánsabban megváltozott lokális töltéseloszlás miatt. Az R460K-hLADH variánsban a Lys460-Asp333' sóhíd kialakulása esetén a kapcsolódó His452-Phe468 és Leu327'-Gly344'  $\alpha$ -hélixek közelednek és nem feltétlenül csak a FAD redox potenciáljának módosulásával, de akár aktív centrumbeli változásokkal is lehet számolni, amelyek csökkenő forward irányú LADH-aktivitás mellett kedvezhetnek a reverz irányú reakciónak.

A R460G és az R460A aminosav cserék hatása között mutatkozó különbség valószínűleg az alanin és a glicin  $\alpha$ -hélixek kialakítására való hajlamában leírt különbségével magyarázható (150, 151): az alanin esetén a metil-oldallánc passzív fizikai jelenléte mellett a glicinhez képest kisebb mértékű szerkezeti flexibilitás engedélyezhetett a His452 aminosavban végződő és a katalitikus bázissal kölcsönható Glu457 aminosavat is hordozó His452-Phe468  $\alpha$ -hélixben. Korábbi HDX-MS eredmények alapján az R460G szubsztitúció megnövelte a His452 és Glu457 aminosavakat is magába foglaló Ile445-Ala458 peptidszakaszban a deutérium beépülést

(128). Az R460G-hLADH kristályszerkezetében azonban maga az aktív centrum változatlanul mutatkozott a vad típushoz képest, a megnövekedett deutérium beépülés az aktív centrumba vezető Arg447-His452 hurok víz számára megnövekedett hozzáféréssel magyarázható csak teljes biztonsággal. Szobahőmérsékleten ugyanakkor nem zárható ki, sőt feltételezhető az aktív centrumot érintő kisebb-nagyobb mértékű dinamika is. A reverz irányú LADH-aktivitás szempontjából az érintett  $\alpha$ -hélix egy rövid (metil-) oldallánc általi részleges stabilizálása önmagában nem volt elégséges az aktivitás fenntartására, ami ugyancsak alátámasztja az előző bekezdésben tárgyaltakat.

A szerkezet stabilizáló és ezáltal FAD redox potenciálját is befolyásoló szerepén felüli, aktív, poláros vagy sav-bázis interakción alapuló szerep az itt bemutatott adatok alapján nem tulajdonítható az Arg460 oldallánci guanidino-csoportjának. Elképzelhető ugyan, hogy az R460G-hLADH szerkezetben és ezáltal feltehetőleg az R460A-hLADH-ban hasonlóképpen víz számára hozzáférhetővé váló Cys449, His450 és Asp333' aminosavak (részlegesen) képesek átvenni az Arg460 esetleges  $H^+/H_2O$ -továbbító szerepét, ami azonban az R460G-hLADH variánsban nem képes ellensúlyozni a fent tárgyalt, enzimaktivitást csökkentő hatásokat. Ugyanezt a  $H^+/H_2O$ -továbbító szerepet az R460E- és R460K-hLADH esetén a glutamát és a lizin is betöltheti. Mindez azonban jelen vizsgálatokra alapozva nem állítható.

### 5.1.2. A hLADH alegységkötő felszíne

A 2,27 Å felbontású hLADH szerkezet (PDB kód: 5NHG) az enzim azon felszíni régiójáról nyújtott új információt, amely a hLADH/hE3KF- és hLADH/hE2<sub>ELKDHK</sub>-alkomplexek és ezáltal a hPDHk és hELKDHk multienzim komplexek kialakulásában vesz részt. Korábbi szerkezetekben a hLADH ezen hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötőfelszínén nem volt megfigyelhető konformációs flexibilitás, a kötésben résztvevő aminosavak konformációja megegyezett a fent említett alkomplexekben is megfigyeltekkel (91-94). A tanulmányok szerzői ezáltal kizárták annak lehetőségét, hogy a kötés alapja indukált illeszkedés volna (92-94). Az 5NHG kódjelű hLADH szerkezetben azonban kétféle konformációs állapot volt megfigyelhető, mely elsősorban a Tyr438 aminosavak egymáshoz viszonyított helyzetében mutatkozott meg. A hE3KF-vel vagy a hE2<sub>ELKDHK</sub>-vel való komplexálódás az egyik orientáció stabilizálódásának kedvez és kizárja a másik jelenlétét. Azonos jellegű stabilizáló hatás

volt megfigyelhető az 1ZMC és 1ZMD, valamint a 6I4Q kódjelű szerkezetekben is, ezekben az esetekben azonban egy szimmetria partner molekulának (kristálykontaktus) tudható be a hatás. A hLADH hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő felszínén megfigyelt többféle konformációs állapot jelentősége egyelőre nem tisztázott.

## **5.2. Az E3-deficienciához vezető szubsztitúciók okozta szerkezeti eltérések és azok korrelációja az enzimaktivitás csökkenéssel és a betegség súlyosságával**

### **5.2.1. Az aktív centrumot közvetlenül érintő P453L szubsztitúció**

Korábbi vizsgálatok alapján a P453L szubsztitúció drasztikus mértékben, a kontrollhoz képest 10% alá csökkentette a hLADH aktivitást betegből származó fibroblasztokban (102) és rekombináns fehérjével végzett *in vitro* mérések során egyaránt (115) (lásd 1. és 7. táblázatok). A jelen dolgozatban bemutatott P453L-hLADH szerkezetben – a korábbi elképzeléseknek megfelelően (91) – a His452 és a Leu453 aminosavak közötti peptid kötés *transz*-konfigurációjú volt, aminek következtében a katalitikus bázis szerepét betöltő His452 konformációja megváltozott és ez egyben maga után vonta a His452(O)-FAD(N3) és a His452(ND1)-Glu457(OE1 és OE2) kölcsönhatások elvesztését. Az előbbi szerkezeti változás a FAD redox potenciáljának, míg az utóbbi a His452 pKa értékének megváltozását okozhatja (95). Egyes P453L-hLADH dimerekben ugyanakkor megfigyelhető volt egy új kölcsönhatás kialakulása a His452 oldallánci imidazolcsoportja és a közeli Glu332' karboxilcsoportja között. A P453L-hLADH variáns esetén megfigyelt jelentős mértékben csökkent katalitikus aktivitás a kristályszerkezeti eredmények alapján tehát elsősorban a His452-t érintő ugyancsak jelentős szerkezeti eltérésekből fakad: feltehetőleg sem a konformáció, sem a megváltozott pKa érték nem teszi lehetővé a DHLA-szubsztrát hatékony deprotonálását, illetve az esetlegesen kialakuló töltésátviteli komplex stabilizálást. A betegekben tapasztalt PDHk és KGDHk alulműködés elsősorban a csökkent hLADH-aktivitás rovására írható, bár egyes hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő aminosavak elmozdulása megfigyelhető volt a vad típushoz képest, ami magyarázatul szolgálhat a P453L-hLADH/hE3KF-alkomplex disszociációs állandójának megnövekedett értékére (117).

A His452(O)-FAD(N3) kölcsönhatás elvesztésén felül más FAD-kötést érintő változások is megfigyelhetőek voltak a P453L-hLADH variánsban, ami magyarázatul szolgálhat a mutánsban korábban mért 34%-os FAD vesztesésre (115). Említésre méltó

továbbá a FAD O4 és N5 atomjával H-kötést létesítő Lys54 aminosav körüli változások. A Ly54 aminosavat kulcsfontosságúnak tartják a FAD redox potenciáljának szabályozásában és a katalízis során a tiolát-FAD töltésátviteli komplex stabilizálásában (152). A P453L-hLADH variánsban a nagy térkitöltésű oldallánccal rendelkező Arg393 a Lys54' és Leu453 aminosavakhoz térben jelentősen közelebb mozdult, a szintén közeli Tyr359 oldallánca pedig ugyancsak megváltozott konformációt mutatott. Mindezek nem okoztak ugyan számottevő változást a Lys54-FAD interakcióban a P453L-hLADH kristályszerkezetében, ugyanakkor magyarázhatják a szobahőmérsékleten végzett HDX-MS eredményeit, miszerint (a Lys54-et is magába foglaló) Ile35-Asp70 peptidszakasz megváltozott flexibilitással/hozzáférhetőséggel rendelkezik (128). Figyelembe véve, hogy a szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzés helyét a FAD N5-C4 $\alpha$  lókuszával hozzák összefüggésbe (43), továbbá hogy ezen N5-C4 $\alpha$  atomok közelében elhelyezkedő pozitív töltésű csoport fokozhatja a FAD O<sub>2</sub> felé mutatott reaktivitását (153, 154), a Lys54 körül megfigyelt szerkezeti változásoknak szerepe lehet a P453L szubsztitúció ROS-képzést fokozó hatásában [lásd 7. táblázat, (115)].

**7. táblázat A vizsgált patogén szubsztitúciók enzimaktivásra gyakorolt hatásai rekombináns fehérjével végzett kísérletek alapján.** A táblázat a laboratóriumban, azonos körülmények között végzett kísérletek eredményeit foglalja össze.

Szubsztitúció	Enzimaktivitás a vadítpushoz képest (%)			Hivatkozás
	LADH-forward	LADH-reverz	ROS-képző	
P453L	9 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	230 $\pm$ 9	(115)
G194C	103 $\pm$ 8	90 $\pm$ 12	172 $\pm$ 2	(115)
G426E	110 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	67 $\pm$ 2	jelen dolgozat
D444V	31 $\pm$ 5	37 $\pm$ 2	131 $\pm$ 5	(115)
I445M	77 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2	jelen dolgozat
R447G	69 $\pm$ 2	55 $\pm$ 4	83 $\pm$ 1	jelen dolgozat
R460G	22 $\pm$ 6	18 $\pm$ 1	74 $\pm$ 2	(115)

### 5.2.2. A NAD<sup>+</sup>/NADH-kötőhely közelében elhelyezkedő G194C és G426E szubsztitúciók hatásai

A G194C és G426E szubsztitúciók lokalizáció tekintetében a hLADH két eltérő doménjét érintik, térben azonban egyaránt a nikotinamid-kötőhelyhez közel helyezkednek el. A két szubsztitúcióban közös vonás, hogy egy glicin cseréje történik



nagyobb térkitöltésű, poláros (G194C) vagy protonálható/deprotonálható oldalláncú (G426E) aminosavra, amely megváltoztatja a helyi töltéeloszlást. A G194C-hLADH-ban csak az egyik, a G426E-hLADH variánsban viszont mindkét monomerben megfigyelhető volt az érintett aminosavnak és környezetének a konformációs flexibilitása alternatív konformációk formájában. Egyik variáns kristályszerkezetében sem volt leírható az aktív centrum, a LA-kötőhely, a NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő aminosavak, vagy akár a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna Glu332 aminosavjának szerkezeti változása; a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő aminosavakat ez a két szubsztitúció érintette a legkevésbé.

A G194C az egyik legtöbbet vizsgált E3-deficienciához vezető szubsztitúciónak tekinthető, számos betegből származó mintán és rekombináns fehérje segítségével *in vitro* egyaránt vizsgálták a szubsztitúció enzimaktivásra kifejtett hatását (lásd 1. táblázat). Homozigóta G194C/G194C betegből származó fibroblaszt és izom homogenizátumból 7-21% hLADH-aktivitás volt mérhető a kontrollhoz képest (101, 103, 109, 110), ennek ellenére a szubsztitúció gyakran enyhébb klinikai képpel és jó túlélési eséllyel társul (97, 99, 101, 109, 110, 114). Rekombináns fehérjével végzett kísérletek alapján jellemzően magasabb specifikus enzimaktivitás adatokról számoltak be (47% (116) és 103% (115) a forward, illetve 75% (120) és 90% (115) a reverz irányban, a kontrollhoz képest) A laboratóriumunkban korábban elvégzett enzimaktivitás mérés alapján a G194C szubsztitúció a fiziológias aktivitást sem a forward, sem pedig a reverz irányban nem befolyásolta szignifikáns mértékben, ugyanakkor 28%-os FAD vesztést és 72%-kal megnövekedett ROS-termelő kapacitást váltott ki a vad típusú enzimhez képest [lásd 7. táblázat, (115)]. A jelen dolgozatban bemutatott kristályszerkezet alátámasztja a G194C-hLADH megtartott enzimaktivitását és a gyakran mérsékelt klinikai tüneteket, ugyanakkor a többi biokémiai vizsgálat eredményére nem nyújtott szerkezeti magyarázatot. Ezzel ellentétben HDX-MS vizsgálatok során kimutathatóak voltak FAD kötésben résztvevő peptidszakaszok, köztük – a P453L-hLADH kapcsán is tárgyalt – Lys54 aminosavat magába foglaló peptidszakasz megnövekedett hozzáférhetősége/flexibilitása (128), melyek összefüggésbe hozhatóak a vad típusúhoz képest megemelkedett ROS képzéssel és a FAD vesztéssel egyaránt. Feltehetőleg a kismértékű szerkezeti változások inkább csak fiziológias hőmérsékleten manifesztálódnak és/vagy a fehérjestabilitás csökkenését

okozzák, a fehérjeszerkezet maga pedig nem szenved nagymértékű változást a G194C szubsztitúció következtében.

Ellentétben a G194C szubsztitúcióval, a G426E aminosavcsere hatásait mindezidáig kevésbé vizsgálták. A szubsztitúciót egy leolvasási keret eltolódás mutációval együtt írták le egy miopátiás fenotípussal társuló E3-deficiens betegen (112). A tanulmány nem számol be a LADH-aktivitás vizsgálatáról, így a variáns működéséről a munkám során végzett enzimaktivitás mérés szolgál a legelső információval. Megállapítást nyert, hogy a G426E-hLADH variánsban a forward irányú LADH-aktivitás kismértékben megnövekedett (110% a vad típushoz képest), a reverz irányú LADH-aktivitásban 64%-os, a ROS-képző aktivitásban pedig 33%-os csökkenés volt megfigyelhető a vad típushoz képest (7. táblázat). A G426E-hLADH kristályszerkezetében megfigyelt legfőbb változások a G426E szubsztitúció hatására bekövetkező megváltozott töltéseloszlás és egyes töltéssel rendelkező aminosavak (Glu426 és Glu363) megnövekedett dinamikája voltak a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötőhely közelében anélkül, hogy maguknak a  $\text{NAD}/\text{NADH}$ -kötő aminosavaknak a szerkezete megváltozott volna. Nem elhanyagolható továbbá az Arg393' elmozdulása a FAD irányába a P453L-hLADH variánsban megfigyeltékhez hasonlóan (bár azzal összehasonlítva kisebb mértékben). A kristályszerkezet alapján a reverz irányú LADH- és ROS-képző aktivitásban megfigyelt csökkenés lehetséges magyarázata, hogy a G426E szubsztitúció következtében a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötőhelyhez közel a megváltozott töltéseloszlás és egyes töltéssel is rendelkező aminosavak megnövekedett dinamikája (Glu426 és Glu363) vagy elmozdulása (Arg393') befolyásolhatja a térben közeli FAD környezetét, és ezáltal annak redox potenciálját, ill. a NADH kötését anélkül is, hogy maguknak a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötő aminosavaknak a szerkezete megváltozna. A kismértékben megemelkedett forward irányú LADH-aktivitás alapján a leírt szerkezeti változások a  $\text{NAD}^+$  kötődése szempontjából akár előnyösek is lehetnek. A G194C szubsztitúcióhoz hasonlóan elmondható tehát, hogy a kismértékű szerkezeti változások és a megtartott/megemelkedett forward irányú LADH-aktivitás jól korrelálnak a G426E aminosavcserét jellemző enyhébb fenotípussal.

### 5.2.3. A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna körül elhelyezkedő szubsztitúciók hatásai

Az Asp444, Arg447, Arg460 és a Glu340 a dimerizációs felszín konzervált aminosavjai, melyek kulcsfontosságúak a hLADH homodimer stabilizálásában. Ezeknek az aminosavaknak az eddig leírt patogén szubsztitúciói (R447G, R460G, D444V és E340K) minden esetben egy-egy dimerizációban szerepet játszó ionos interakció elvesztését okozzák és rendkívül súlyos klinikai állapothoz és gyakran korai halálhoz vezetnek (97, 103-105, 107, 108). [Megjegyzendő, hogy az E340K aminosavcsere esetén másik alléljukon egy másik mutációt hordozó, ún. összetett heterozigóta betegekről számol csak be az irodalom (97, 105, 107).] Lokalizációjából adódóan a fenti mutációkkal együtt tárgyalandó az ugyancsak a dimerizációs felszínen elhelyezkedő Ile445 metioninnal történő szubsztitúciója is, amely azonban – hidrofób oldallánról lévén szó – nem jár ionos kölcsönhatás elvesztésével. További eltérést jelent, hogy az I445M mutációra homozigóta beteg lényegesen enyhébb klinikai tüneteket mutatott, a klinikai tanulmány írásakor 32 éves volt (111).

A fenti dimerizációs felszínt érintő hLADH variánsok betegekből származó mintákon minden esetben 80%-ot meghaladó funkcióvesztést okoztak [(97, 103-105, 107, 108), az I445M-hLADH esetén a hLADH aktivitás nem volt detektálható (111)], míg rekombináns fehérjével (különböző körülmények között) végzett kísérletekben a fiziológiás aktivitás csökkenése tág határok között mozgott [(92, 115-117, 122-124), lásd *1. táblázat*]. Laboratóriumunkban a dimerizációs felszínt érintő patogén aminosav cserék fiziológiás és ROS-képző aktivitásra gyakorolt hatását részben egy korábbi tanulmány (115), részben pedig a jelen dolgozat során vizsgáltuk, azonos kísérleti körülmények között (lásd *7. táblázat*).

A patomechanizmus hátterében kezdetben a funkcionális homodimer disszociációját feltételezték (91, 103), melyet azonban későbbi kísérleti eredmények (44, 92, 115, 128) és a D444V-, R447G-, R460G- és I445M-hLADH itt bemutatott kristályszerkezetei is megcáfoltak (az E340K-hLADH kristályszerkezete egyelőre nem áll rendelkezésre). A kristályszerkezetek révén fény derült arra, hogy mind a négy szubsztitúció az aktív centrumhoz vezető H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna körül helyezkedik el és annak tulajdonságait – geometriáját és/vagy polaritását – különböző mértékben befolyásolják. Ennek jelentőségét tovább erősíti, hogy sem az aktív centrubeli, sem a

FAD-kötő vagy a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -kötő aminosavak konformációjában nem mutatkozott számottevő eltérés a D444V-, R447G-, R460G- és I445M-hLADH variánsokban. Az R447G és az R460G aminosav cserék közvetlenül érintettek egy-egy töltött oldallánci funkcióscsoportot hordozó, a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna integritásában kulcsszerepet játszó aminosavat és mindkét szubsztitúció a csatorna helyi tágulatát és megnövekedett pozitív felszíni töltését okozta. A D444V-, I445M- és R460G-hLADH variánsokban a Glu332 és az Arg460 oldallánca a vad típustól eltérően egyik monomerben sem mutatott konformációs flexibilitást: a D444V-hLADH variánsban a Glu332[B] és az Arg460'[A], az I445M-hLADH variánsban pedig a Glu332[A] és az Arg460'[B] konformerek voltak megfigyelhetők, míg az R460G-hLADH variánsban a hiányzó arginin oldallánc mellett csak a Glu332[A] konformer volt jelen. A Glu332 egyik vagy másik konformációban való stabilizálódása és ezáltal a katalitikus His452' hozzáférhetőségének megváltozása párhuzamba vonható a korábbi HDX-MS mérések eredményeivel, ahol is kimutatható volt a Ile445-Ala458 peptidszakaszban a deutérium beépülés változása [kismértékű csökkenés a Glu332[B] konformerrel modellezett D444V-hLADH variánsban, növekedés a Glu332[A] konformerrel modellezett R460G- és I445M-hLADH variánsokban (128)]. Önmagában a csatorna geometriájának megváltozása (elsősorban az R460G-hLADH variáns esetén tapasztalt kiöblösödés) nem hozható összefüggésbe a LADH-funkció csökkenésével. Ezzel szemben a Glu332 megváltozott konformációjának kitüntetett szerepe lehet a fenti három patogén mutánsban, figyelembe véve a Glu332 alaninra, ill. aszpartátra való cseréjével létrehozott hLADH variánsokban tapasztalt enzimaktivitás csökkenést is (lásd 5.1.1. *A  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna és két kitüntetett aminosavjának feltételezett szerepe* fejezet). A kristályszerkezeti eredmények alapján tehát a patomechanizmus hátterében a  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornát érintő szerkezeti változások szerepe feltételezhető, melyek közül is kiemelkedik az aktív centrum közelében elhelyezkedő és a szubsztrát átalakításban és/vagy a  $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ -transzlokációban feltételezhetően szerepet játszó Glu332 érintettsége.

A fenti megállapítás azonban önmagában nem elégséges a jellemzően az E332A, ill. E332D szubsztitúciók által kiváltott változásokat is meghaladó LADH-aktivitás csökkenés, illetve az esetenként megnövekedett ROS-képző aktivitás magyarázatára. Ehhez az itt tárgyalt patogén szubsztitúciók helyzetéből kiindulva, valamint a már többször említett HDX-MS eredményeket figyelembe véve kell a fehérjeszerkezet

kiterjedtebb szakaszainak esetlegesen megváltozó dinamikájával kapcsolatban feltételezésekkel élünk, melyekre vonatkozóan a kristályszerkezetek nem nyújtanak közvetlen információt a röntgendiffrakciós adatgyűjtés körülményei, elsősorban a kriogén körülmények és a kristálykontaktusok jelenléte miatt. Az itt tárgyalt patogén szubsztitúciókról egy-egy stabilizáló kölcsönhatás elvesztése, ill. az I445M esetén a környező hidrofób kölcsönhatások megzavarása miatt feltételezhető, hogy az aktív centrum felé az N-terminális végével mutató, a katalitikus bázisban végződő His452-Phe468  $\alpha$ -hélix megváltozott dinamikáját okozzák közvetlenül (R460G) vagy az azzal érintkező és kapcsolódó rövidebb helikális Glu443-Val448 peptidszakasz érintettsége révén közvetetten (D447V, I445M, R447G). Ezt alátámasztja, hogy a HDX-MS vizsgálat során a Ile445-Ala458 és az Ala465-Phe474 peptidszakaszok megváltozott hozzáférhetősége/dinamikája volt megfigyelhető D444V-, I445M-, R447G- és R460G-hLADH variánsokban (128). Az előbbi, Ile445-Ala458 peptidszakasz érintettsége a Glu332 oldalláncát érintő szerkezeti változások és ezáltal a His452' hozzáférhetőségének megváltozásával is összefüggésbe hozható (lásd előző bekezdés). Az Ile445-Ala458 peptidszakasz esetén a legnagyobb mértékű változás az R460G szubsztitúció hatására volt megfigyelhető, mely összefüggésben lehet a glicin  $\alpha$ -hélix destabilizáló hatásával (lásd 5.1.1. *A H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna és két kitüntetett aminosavjának feltételezett szerepe* fejezet) és a Cys449 és His450 aminosavak megnövekedett hozzáférhetőségével is. A deutérium beépülés megnövekedése az Ala465-Phe474 peptidszakaszban az I445M és R447G szubsztitúciók hatására nagyon jelentős volt, kisebb mértékben a D444V hatására is megfigyelhető volt, az R460G hatására ezzel szemben csökkenés volt megfigyelhető (128). A tárgyalt peptidszakasz magába foglalja a hLADH C-terminálisát, amely az aktív centrum felé beékelődve részt vesz mind az LA-szubsztrátkötő-, mind pedig a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna kialakításában. Az *Azotobacter vinelandii* LADH enzimen végzett kísérletek alapján a C-terminális szakasznak kiemelt jelentősége van a FAD redox potenciáljának szabályozásában, delécióna jelentősen megnövelte az enzim érzékenységét NADH általi inhibícióra (148). A D444V-, R447G- és R460G-hLADH variánsokban ezen felül egy-egy stabilizáló sóhíd elvesztése révén a His452-Phe468  $\alpha$ -hélixszel szomszédos, dipólusának pozitív oldalával ugyancsak az aktív centrum, illetve a FAD proszitetikus csoport felé orientálódó Leu327'-Gly344'  $\alpha$ -hélix destabilizálódása is feltételezhető. Az utóbbi  $\alpha$ -hélix C-terminális szakaszának

kismértékű elmozdulása valóban megfigyelhető volt a tárgyalt variánsok kristályszerkezeteiben. Mindezek a – fiziológias hőmérsékleten feltehetőleg jelentősebb mértékű – fehérje dinamikabeli változások a His452-Phe468 és Leu327'-Gly344'  $\alpha$ -hélixek dipól momentumain és a C-terminális mobilitásán keresztül szerepet játszhatnak az aktív centrum His452' pKa értékének és/vagy a FAD prosztetikus csoport redox potenciáljának befolyásolásában, továbbá az LA-kötő és a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna, ill. az aktív centrum szerkezetének modulálásában, mely hatások mind hozzájárulhatnak a H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatorna körül elhelyezkedő patogén szubsztitúciók patomechanizmusában.

A D444V-, R447G- és R460G szubsztitúciók mindegyikéről kimutatták, hogy nagyságrendekkel csökkentik a hLADH affinitását a hPDHk hE3KF-alegysége iránt [(92, 117), az I445M erre vonatkozó hatását még nem vizsgálták], ami a LADH-aktivitás csökkenése mellett hozzájárul az enzimkomplex alulműködéséhez [(92, 103, 104, 108), lásd *1. táblázat*], és ezáltal az E3-deficiencia patomechanizmusához is. A kristályszerkezetekben a hE3KF és a hE2<sub>ELKDHK</sub>-alegység kötőhelye kristálykontaktusokban erősen érintett volt, így patogén szubsztitúciók okozta szerkezeti változások csak korlátozott mértékben voltak vizsgálhatóak. Kiemelendő ugyanakkor, hogy a D444V és az R447G szubsztitúciók jelentős mértékben befolyásolták a hE3KF/hE2<sub>ELKDHK</sub>-kötő felszín polaritását, míg az I445M (és a távolabbi R460G) esetén ez nem volt kimutatható. A D444V, R447G és R460G szubsztitúciók mindegyikéről megállapítást nyert, hogy befolyásolják a hE3KF kötésében szerepet játszó Gly345'-Val354' random coil egy részét is, ami összefügg a fent említett Leu327'-Gly344'  $\alpha$ -hélixre kifejtett szerkezeti hatásokkal.

## 6. Következtetések

A hLADH és hét E3-deficienciához vezető variánsának röntgenkristallográfiás szerkezetanalízisét végeztük el a betegség és a megváltozott enzimaktivitások háttérében álló molekuláris patomechanizmusok felderítésére. Az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Az aktív centrumot közvetlenül érintő, korábbi vizsgálatok alapján teljes aktivitásvesztéshez vezető P453L aminosavcsere az aktív centrumban jelentős és kiterjedt szerkezeti változásokat indukált, amik nagy valószínűséggel megakadályozzák a DHLA-szubsztrát kötődését és/vagy a katalitikus bázis általi deprotonálását az aktív centrumban. A P453L-hLADH megnövekedett szuperoxid termelése a FAD prosztetikus csoport környezetében, a szuperoxid képzés lókusza közelében bekövetkező szerkezeti változások és egyes FAD-ot stabilizáló és redox potenciálját feltételezhetően befolyásoló kölcsönhatások elvesztésével hozhatók összefüggésbe.
2. A G194C-hLADH variáns kismértékű szerkezeti változásokat eredményezett a közeli kofaktor-kötő aminosavak érintettsége nélkül, ami jól korrelál a megtartott enzimaktivitással. A G426E szubsztitúció ugyancsak a kofaktor-kötőhelyhez közel okozott kisebb, elsősorban a helyi töltéseloszlás és az oldallánci dinamika változásával járó szerkezeti eltéréseket, ami összefüggésben lehet a specifikus enzimaktivitás reverz irányban történő csökkenésével, ill. forward irányban történő kismértékű emelkedésével.
3. A dimerizációs felszínt érintő szubsztitúciók egy csoportja, a D444V, I445M, R447G és R460G aminosav cserék közös jellemzője, hogy mindegyikük jelentős enzimaktivitás csökkenéssel társul (kivételt csupán az I445M forward irányú specifikus aktivitása képez), melynek háttérében a kristályszerkezetek alapján az aktív centrumhoz vezető ún.  $H^+/H_2O$ -csatornában bekövetkező szerkezeti változások állhatnak, melyek közül a Glu332 érintettsége kiemelendő. Az enzimaktivitás-változások mértéke azonban nagyobb mértékű, mint amit a kristályszerkezetben megfigyelt változásokkal magyarázni tudunk. A szubsztitúciók elhelyezkedéséből és

az elvesztett kölcsönhatásokból következően további, megváltozott dinamikából eredő, illetve  $\alpha$ -hélixek dipólus momentumai által közvetített hatások is feltételezhetőek, melyek befolyásolhatják a katalitikus bázis pKa értékét, illetve a FAD-prosztetikus csoport redox potenciálját.

A vad típusú hLADH kristályszerkezete alapján két aminosav, a Glu332 és az Arg460' alternatív konformációk felvétele révén az említett  $H^+/H_2O$ -csatorna belső átmérőjét és ezáltal a szűk keresztmetszetének helyzetét, valamint a felszíni polaritását együttesen modulálják. A két említett aminosav a D444V-, I445M- és R460G-hLADH variánsokban nem mutatta a vad típusú hLADH-ban megfigyelt konformációs flexibilitást. Ezekre a szerkezeti megfigyelésekre alapozva, a Glu332 és az Arg460 szerepének tisztázására *in vitro* helyspecifikus mutagenezissel hLADH-variánsokat hoztunk létre és vizsgáltuk azok katalitikus aktivitását a fiziológiás reakció forward és reverz irányában, valamint a ROS-képzés tekintetében. Az eredmények birtokában az alábbi következtetéseket vontuk le:

4. A Glu332 oldallánci karboxilcsoportjának szerepét egy amidcsoport részlegesen helyettesíteni tudja, ugyanakkor hiánya, vagy a karboxilcsoport nem megfelelő pozíciója az enzimaktivitást jelentősen csökkenti. Feltételezhető, hogy a Glu332 szerepet játszik a szubsztrát vagy egy átmeneti intermedier aktív centrubeli stabilizálásban és/vagy a katalitikus ciklus során a  $H^+/H_3O^+$  továbbításában. A Glu332 konformációját érintő szerkezeti változások tehát összefüggésbe hozhatók egyes betegséget okozó aminosavcserek patomechanizmusával.
5. Az Arg460 valószínűsíthetően passzívabb szereppel bír: két olyan  $\alpha$ -hélixet kapcsol össze, melyek N-terminálisukkal az aktív centrum és a FAD prosztetikus csoport felé mutatnak és ezáltal szerepe elsősorban az aktív centrum integritásának fenntartásában, ill. a FAD prosztetikus csoport redox potenciáljának modulálásában lehet. A jelen dolgozatban bemutatott eredmények alapján a katalízisben betöltött aktív szerep nem tulajdonítható az Arg460 oldallánci guanidino-csoportjának.



## 7. Összefoglalás

A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hLADH, hE3) deficienciája egy gyakran korai elhalálozással járó genetikai betegség, melynek hátterében a hLADH megváltozott enzimaktivitásokkal jellemezhető variánsai állnak. A betegség molekuláris patomechanizmusainak feltérképezése érdekében meghatároztuk a vad típusú hLADH és hét betegséget okozó variánsának kristályszerkezetét. A szerkezet-funkció összefüggések értelmezése érdekében a szerkezeti adatokat azon három patogén variáns esetén (G426E, I445M és R447G), amelyeket korábban laboratóriumunkban nem vizsgáltunk, funkcionális mérésekkel egészítettem ki. Megállapítást nyert, hogy a patogén P453L, G194C és G426E aminosavcserék által kiváltott enzimaktivitásváltozások mértéke és a betegség súlyossága általában jól korrelálnak a megfigyelt szerkezeti változásokkal. A kristályszerkezetek alapján a hLADH homodimer dimerizációs felszínén elhelyezkedő, ugyanakkor jelentős enzimaktivitás csökkenéssel társuló D444V, I445M, R447G és R460G aminosav cserék az aktív centrumhoz vezető ún.  $H^+/H_2O$ -csatornában okoznak különböző mértékű szerkezeti változásokat. A nagymértékű enzimaktivitás-csökkenés és az esetenként tapasztalt megnövekedett intenzitású ROS-képző aktivitás csak további, a megváltozott dinamikából eredő, illetve  $\alpha$ -hélixek dipólus momentumai által közvetített hatásokkal volt értelmezhető.

A Glu332 és az Arg460 aminosavak a vad típusú hLADH szerkezetében két alternatív konformációban voltak jelen és ezáltal a  $H^+/H_2O$ -csatorna geometriáját és polaritását befolyásolják. A Glu332 és Arg460 aminosavak konformációs flexibilitása a D444V-, I445M- és R460G-hLADH variánsokban nem volt megfigyelhető. A fent említett két aminosav szerepének tisztázására *in vitro* helyspecifikus mutagenezissel hLADH-variánsokat hoztunk létre és elvégeztük azok funkcionális vizsgálatát. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a Glu332 szerepet játszik a szubsztrát vagy egy átmeneti intermedier aktív centrumbeli stabilizálásban és/vagy a katalitikus ciklus során  $H^+/H_3O^+$ -ok továbbításában. Ezzel szemben az Arg460 oldallánci guanidincsoportjának nem tulajdonítható aktív szerep a katalízis szempontjából, az oldallánc két  $\alpha$ -hélix stabilizálásán keresztül az aktív centrum integritásának fenntartásában és a FAD proszterikus csoport redox potenciáljának modulálásában játszhat szerepet.

## 8. Summary

Human dihydrolipoamide dehydrogenase (hLADH, hE3) deficiency is an often prematurely lethal genetic disease usually caused by inactive or partially inactive hLADH variants. Crystal structures of the wild type hLADH and seven of its disease-causing variants were determined to reveal the molecular pathomechanisms of hE3-deficiency. To study the structure-function relationships, three variants (G426E-, I445M-, and R447G-hLADH) never studied before in our laboratory, were also subjected to *in vitro* enzyme activity measurements. It can be concluded that the structural alterations induced by the pathogenic P453L, G194C and G426E substitutions correlate well with both the changes in enzyme activity and the severities of the disease phenotypes. The D444V, I445M, R447G, and R460G substitutions all reside farther away from the active site on the homodimer interface of hLADH, however, they are still associated with significant losses in catalytic activity. Our structural data revealed considerable perturbations in the so-called H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O channel, leading to the active site, for the above four variants. The significant losses in LADH-activity and the often enhanced ROS-producing activities of the latter variants could only be interpreted by presuming additional effects acting on the active site and/or the FAD, mediated perhaps by local dynamics and/or dipole moment alterations in selected nearby  $\alpha$ -helices.

The Glu332 and Arg460 residues were found to possess two alternative conformations in the wild type hLADH and therefore were suggested modulating the geometry and polarity of the H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O channel. Conformational flexibilities of the Glu332 and Arg460 residues were affected in the D444V-, I445M-, and R460G-variants. The potential roles in catalysis of the two amino acids mentioned above were investigated further by functional analysis using hLADH variants. According to our results, Glu332 likely contributes to the stabilization of the substrate or a reaction intermediate in the active site, and/or the H<sup>+</sup>/H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-translocation in the course of the catalytic cycle. On the other hand, no active catalytic role could be attributed to the guanidino group of the Arg460; this side chain is likely important for maintaining the structural integrity of the active site and/or modulating the redox potential of the FAD prosthetic group by interconnecting two  $\alpha$ -helices.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Reed LJ. (1974) Multienzyme complexes. *Acc Chem Res*, 7: 40-46.
2. Yeaman SJ. (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J*, 257(3): 625-632.
3. Nemeria NS, Gerfen G, Nareddy PR, Yang L, Zhang X, Szostak M, Jordan F. (2018) The mitochondrial 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes share their E2 and E3 components for their function and both generate reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 115: 136-145.
4. Kikuchi G. (1973) The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem*, 1(2): 169-187.
5. Massey V. (1960) The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta*, 38: 447-460.
6. Fujiwara K, Okamura K, Motokawa Y. (1979) Hydrogen carrier protein from chicken liver: purification, characterization, and role of its prosthetic group, lipolic acid, in the glycine cleavage reaction. *Arch Biochem Biophys*, 197(2): 454-462.
7. Paxton R, Scislawski PW, Davis EJ, Harris RA. (1986) Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. *Biochem J*, 234(2): 295-303.
8. Nemeria NS, Gerfen G, Guevara E, Nareddy PR, Szostak M, Jordan F. (2017) The human Krebs cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex creates an additional source of superoxide/hydrogen peroxide from 2-oxoadipate as alternative substrate. *Free Radic Biol Med*, 108: 644-654.
9. Pettit FH, Yeaman SJ, Reed LJ. (1978) Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10): 4881-4885.
10. McCartney RG, Rice JE, Sanderson SJ, Bunik V, Lindsay H, Lindsay JG. (1998) Subunit interactions in the mammalian alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex - Evidence for direct association of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and dihydrolipoamide dehydrogenase components. *J Biol Chem*, 273(37): 24158-24164.
11. Zhou J, Yang L, Ozohanics O, Zhang X, Wang J, Ambrus A, Arjunan P, Brukh R, Nemeria NS, Furey W, Jordan F. (2018) A multipronged approach unravels

unprecedented protein-protein interactions in the human 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J Biol Chem*, 293(50): 19213-19227.

12. Patel MS, Roche TE. (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J*, 4(14): 3224-3233.
13. Wilkinson KD, Williams CH, Jr. (1981) NADH inhibition and NAD activation of *Escherichia coli* lipoamide dehydrogenase catalyzing the NADH-lipoamide reaction. *J Biol Chem*, 256(5): 2307-2314.
14. Moxley MA, Beard DA, Bazil JN. (2014) A pH-Dependent Kinetic Model of Dihydrolipoamide Dehydrogenase from Multiple Organisms. *Biophys J*, 107(12): 2984-2998.
15. Williams CH, Jr. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase—a family of flavoenzyme transhydrogenases. In: Müller F, editor. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. 3. CRC Press, Boca Raton FL, 1992: 121-211.
16. Massey V. (1960) The identity of diaphorase and lipoyl dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 37: 314-322.
17. Massey V, Gibson QH, Veeger C. (1960) Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase). *Biochem J*, 77: 341-351.
18. Massey V, Veeger C. (1961) Studies on the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 48: 33-47.
19. Searls RL, Peters JM, Sanadi DR. (1961) Alpha-ketoglutaric dehydrogenase. X. On the mechanism of dihydrolipoyl dehydrogenase reaction. *J Biol Chem*, 236: 2317-2322.
20. Massey V, Veeger C. (1960) On the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 40: 184-185.
21. Veeger C, Massey V. (1960) Inhibition of lipoyl dehydrogenase by trace metals. *Biochim Biophys Acta*, 37: 181-183.
22. Casola L, Brumby PE, Massey V. (1966) The reversible conversion of lipoyl dehydrogenase to an artifactual enzyme by oxidation of sulfhydryl groups. *J Biol Chem*, 241(21): 4977-4984.

23. Casola L, Massey V. (1966) Differential effects of mercurial on the lipoyl reductase and diaphorase activities of lipoyl dehydrogenase. *J Biol Chem*, 241(21): 4985-4993.
24. Matthews RG, Williams CH, Jr. (1976) Measurement of the oxidation-reduction potentials for two-electron and four-electron reduction of lipoamide dehydrogenase from pig heart. *J Biol Chem*, 251(13): 3956-3964.
25. Matthews RG, Ballou DP, Thorpe C, Williams CH, Jr. (1977) Ion pair formation in pig heart lipoamide dehydrogenase: rationalization of pH profiles for reactivity of oxidized enzyme with dihydrolipoamide and 2-electron-reduced enzyme with lipoamide and iodoacetamide. *J Biol Chem*, 252(10): 3199-3207.
26. Thorpe C, Williams CH, Jr. (1976) Differential reactivity of the two active site cysteine residues generated on reduction of pig heart lipoamide dehydrogenase. *J Biol Chem*, 251(12): 3553-3557.
27. de Kok A, Berg A, van Berkel W, Fabisz-Kijowska A, Westphal A, van den Akker F, Mattevi A, Hol WGJ. The pyruvate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. In: Yagi K, editor. *Flavins and Flavoproteins*; Nagoya, Japan. Walter de Gruyter, Berlin, 1993: 535-544.
28. Massey V, Veeger C. (1963) Biological Oxidation. *Annu Rev Biochem*, 32: 579-638.
29. Massey V, Ghisla S. (1974) Role of charge transfer interactions in flavoprotein catalysis. *Ann N Y Acad Sci*, 227(1): 446-465.
30. Gazaryan IG, Krasnikov BF, Ashby GA, Thorneley RNF, Kristal BS, Brown AM. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *J Biol Chem*, 277(12): 10064-10072.
31. Williams CH, Jr., Allison N, Russell GC, Prongay AJ, Arscott LD, Datta S, Sahlman L, Guest JR. (1989) Properties of lipoamide dehydrogenase and thioredoxin reductase from *Escherichia coli* altered by site-directed mutagenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 573: 55-65.
32. Benen J, van Berkel W, Dieteren N, Arscott D, Williams C, Jr., Veeger C, de Kok A. (1992) Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*: site-directed

mutagenesis of the His450-Glu455 diad. Kinetics of wild-type and mutated enzymes. *Eur J Biochem*, 207(2): 487-497.

33. Massey V, Palmer G. (1962) Charge transfer complexes of lipoyl dehydrogenase and free flavins. *J Biol Chem*, 237: 2347-2358.
34. Matthews RG, Ballou DP, Williams CH, Jr. (1979) Reactions of pig heart lipoamide dehydrogenase with pyridine nucleotides. Evidence for an effector role for bound oxidized pyridine nucleotide. *J Biol Chem*, 254(12): 4974-4981.
35. Argyrou A, Blanchard JS, Palfey BA. (2002) The lipoamide dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* permits the direct observation of flavin intermediates in catalysis. *Biochemistry*, 41(49): 14580-14590.
36. Argyrou A, Sun G, Palfey BA, Blanchard JS. (2003) Catalysis of diaphorase reactions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoamide dehydrogenase occurs at the EH4 level. *Biochemistry*, 42(7): 2218-2228.
37. Wilkinson KD, Williams CH, Jr. (1979) Evidence for multiple electronic forms of two-electron-reduced lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 254(3): 852-862.
38. Koike M, Shah PC, Reed LJ. (1960) Alpha-Keto acid dehydrogenation complexes. III. Purification and properties of dihydrolipoic dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 235: 1939-1943.
39. Matthews J, Reed LJ. (1963) Purification and properties of a dihydrolipoic dehydrogenase from *Spinacia oleracea*. *J Biol Chem*, 238: 1869-1876.
40. Ide S, Hayakawa T, Okabe K, Koike M. (1967) Lipoamide dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem*, 242(1): 54-60.
41. Straub FB. (1939) Isolation and properties of a flavoprotein from heart muscle tissue. *Biochem J*, 33(5): 787-792.
42. Massey V, Strickland S, Mayhew SG, Howell LG, Engel PC, Matthews RG, Schuman M, Sullivan PA. (1969) The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 36(6): 891-897.
43. Bando Y, Aki K. (1991) Mechanisms of generation of oxygen radicals and reductive mobilization of ferritin iron by lipoamide dehydrogenase. *J Biochem*, 109(3): 450-454.

44. Ambrus A, Tretter L, Adam-Vizi V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *J Neurochem*, 109: 222-229.
45. Gibson QH. (1965) Mechanisms of reaction of some flavoprotein enzymes with oxygen. *J Gen Physiol*, 49(1): Suppl:201-211.
46. Nakamura M, Yamazaki I. (1972) One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups. *Biochim Biophys Acta*, 267(2): 249-257.
47. Klyachko NL, Shchedrina VA, Efimov AV, Kazakov SV, Gazaryan IG, Kristal BS, Brown AM. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state - Response to mitochondrial matrix acidification. *J Biol Chem*, 280(16): 16106-16114.
48. Nakamura M, Yamazaki I. (1979) Salts- induced oxidase activity of lipoamide dehydrogenase from pig heart. *Eur J Biochem*, 96(2): 417-422.
49. Visser J, Veeger C. (1968) Relations between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. 3. Protein association-dissociation and the influence on catalytic properties. *Biochim Biophys Acta*, 159(2): 265-275.
50. Tsai CS, Templeton DM, Wand AJ. (1981) Multifunctionality of lipoamide dehydrogenase: Activities of chemically trapped monomeric and dimeric enzymes. *Arch Biochem Biophys*, 206(1): 77-86.
51. Bunik VI, Sievers C. (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur J Biochem*, 269(20): 5004-5015.
52. Tretter L, Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*, 24(36): 7771-7778.
53. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24(36): 7779-7788.
54. Ambrus A, Nemeria NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V. (2015) Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-

oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. *Free Radic Biol Med*, 89: 642-650.

55. Mailloux RJ, Gardiner D, O'Brien M. (2016) 2-Oxoglutarate dehydrogenase is a more significant source of O<sub>2</sub>·-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than pyruvate dehydrogenase in cardiac and liver tissue. *Free Radic Biol Med*, 97: 501-512.

56. Quinlan CL, Goncalves RL, Hey-Mogensen M, Yadava N, Bunik VI, Brand MD. (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. *J Biol Chem*, 289(12): 8312-8325.

57. Mottley C, Mason RP. (2001) Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid. *J Biol Chem*, 276(46): 42677-42683.

58. Kooyman EC. (1967) Thiyl radicals. *Pure and Applied Chemistry*, 15(1): 81-88.

59. Bunik VI. (2019) Redox-Driven Signaling: 2-Oxo Acid Dehydrogenase Complexes as Sensors and Transmitters of Metabolic Imbalance. *Antioxid Redox Signal*, 30(16): 1911-1947.

60. Tretter L, Adam-Vizi V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 360(1464): 2335-2345.

61. Adam-Vizi V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*, 7(9-10): 1140-1149.

62. Chinopoulos C, Adam-Vizi V. (2006) Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology - Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J*, 273(3): 433-450.

63. Andersson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, Newsholme EA. (1998) Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 249(2): 512-516.

64. Chinopoulos C, Tretter L, Adam-Vizi V. (1999) Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurochem*, 73(1): 220-228.



65. Tretter L, Adam-Vizi V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*, 20(24): 8972-8979.
66. Nulton-Persson AC, Szweda LI. (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 276(26): 23357-23361.
67. Applegate MAB, Humphries KM, Szweda LI. (2008) Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: Glutathionylation and protection of lipoic acid. *Biochemistry*, 47(1): 473-478.
68. Yan LJ, Sumien N, Thangthaeng N, Forster MJ. (2013) Reversible inactivation of dihydrolipoamide dehydrogenase by mitochondrial hydrogen peroxide. *Free Radic Res*, 47(2): 123-133.
69. Humphries KM, Szweda LI. (1998) Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: Reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*, 37(45): 15835-15841.
70. Hussain SN, Matar G, Barreiro E, Florian M, Divangahi M, Vassilakopoulos T. (2006) Modifications of proteins by 4-hydroxy-2-nonenal in the ventilatory muscles of rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290(5): L996-1003.
71. Park LCH, Zhang H, Sheu KFR, Calingasan NY, Kristal BS, Lindsay JG, Gibson GE. (1999) Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J Neurochem*, 72(5): 1948-1958.
72. Lee HM, Reed J, Greeley GH, Jr., Englander EW. (2009) Impaired mitochondrial respiration and protein nitration in the rat hippocampus after acute inhalation of combustion smoke. *Toxicol Appl Pharmacol*, 235(2): 208-215.
73. Tyther R, Ahmeda A, Johns E, Sheehan D. (2007) Proteomic identification of tyrosine nitration targets in kidney of spontaneously hypertensive rats. *Proteomics*, 7(24): 4555-4564.
74. Thieme R, Pai EF, Schirmer RH, Schulz GE. (1981) Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J Mol Biol*, 152(4): 763-782.
75. Pai EF, Schulz GE. (1983) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J Biol Chem*, 258(3): 1752-1757.

76. Karplus PA, Schulz GE. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J Mol Biol*, 195(3): 701-729.
77. Karplus PA, Schulz GE. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J Mol Biol*, 210(1): 163-180.
78. Schierbeek AJ, Swarte MB, Dijkstra BW, Vriend G, Read RJ, Hol WG, Drenth J, Betzel C. (1989) X-ray structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* determined by a combination of molecular and isomorphous replacement techniques. *J Mol Biol*, 206(2): 365-379.
79. Mattevi A, Schierbeek AJ, Hol WG. (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J Mol Biol*, 220(4): 975-994.
80. Mattevi A, Obmolova G, Sokatch JR, Betzel C, Hol WGJ. (1992) The refined crystal structure of *Pseudomonas putida* lipoamide dehydrogenase complexed with NAD<sup>+</sup> at 2.45 Å resolution. *Proteins*, 13(4): 336-351.
81. Mattevi A, Obmolova G, Kalk KH, van Berkel WJ, Hol WG. (1993) Three-dimensional structure of lipoamide dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* at 2.8 Å resolution. Analysis of redox and thermostability properties. *J Mol Biol*, 230(4): 1200-1215.
82. Glasser NR, Wang BX, Hoy JA, Newman DK. (2017) The pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes of *Pseudomonas aeruginosa* catalyze pyocyanin and phenazine-1-carboxylic acid reduction via the subunit dihydrolipoamide dehydrogenase. *J Biol Chem*, 292(13): 5593-5607.
83. Faure M, Bourguignon J, Neuburger M, MacHerel D, Sieker L, Ober R, Kahn R, Cohen-Addad C, Douce R. (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system 2. Crystal structures of H- and L-proteins. *Eur J Biochem*, 267(10): 2890-2898.
84. Mande SS, Sarfaty S, Allen MD, Perham RN, Hol WG. (1996) Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrolipoamide acetyltransferase. *Structure*, 4(3): 277-286.

85. Li de la Sierra I, Pernot L, Prange T, Saludjian P, Schiltz M, Fourme R, Padron G. (1997) Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of a surface antigen from *Neisseria meningitidis*. *J Mol Biol*, 269(1): 129-141.
86. Toyoda T, Suzuki K, Sekiguchi T, Reed LJ, Takenaka A. (1998) Crystal structure of eucaryotic E3, lipoamide dehydrogenase from yeast. *J Biochem*, 123(4): 668-674.
87. Rajashankar KR, Bryk R, Kniewel R, Buglino JA, Nathan CF, Lima CD. (2005) Crystal structure and functional analysis of lipoamide dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 280(40): 33977-33983.
88. Nakai T, Kuramitsu S, Kamiya N. (2008) Structural bases for the specific interactions between the E2 and E3 components of the *Thermus thermophilus* 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *J Biochem*, 143(6): 747-758.
89. Chandrasekhar K, Wang JJ, Arjunan P, Sax M, Park YH, Nemeria NS, Kumaran S, Song JY, Jordan F, Furey W. (2013) Insight to the Interaction of the Dihydrolipoamide Acetyltransferase (E2) Core with the Peripheral Components in the *Escherichia coli* Pyruvate Dehydrogenase Complex via Multifaceted Structural Approaches. *J Biol Chem*, 288(21): 15402-15417.
90. Bryk R, Arango N, Maksymiuk C, Balakrishnan A, Wu YT, Wong CH, Masquelin T, Hipskind P, Lima CD, Nathan C. (2013) Lipoamide channel-binding sulfonamides selectively inhibit mycobacterial lipoamide dehydrogenase. *Biochemistry*, 52(51): 9375-9384.
91. Brautigam CA, Chuang JL, Tomchick DR, Machius M, Chuang DT. (2005) Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD(+)/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *J Mol Biol*, 350(3): 543-552.
92. Brautigam CA, Wynn RM, Chuang JL, Machius M, Tomchick DR, Chuang DT. (2006) Structural insight into interactions between dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) and E3 binding protein of human pyruvate dehydrogenase complex. *Structure*, 14(3): 611-621.
93. Ciszak EM, Makal A, Hong YS, Vettaikorumakankauv AK, Korotchkina LG, Patel MS. (2006) How dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein binds dihydrolipoamide dehydrogenase in the human pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem*, 281(1): 648-655.

94. Brautigam CA, Wynn RM, Chuang JL, Naik MT, Young BB, Huang TH, Chuang DT. (2011) Structural and Thermodynamic Basis for Weak Interactions between Dihydrolipoamide Dehydrogenase and Subunit-binding Domain of the Branched-chain alpha-Ketoacid Dehydrogenase Complex. *J Biol Chem*, 286(26): 23476-23488.
95. Kim H, Patel MS. (1992) Characterization of 2 site specifically mutated human dihydrolipoamide dehydrogenases (His-452-Gln and Glu-457-Gln). *J Biol Chem*, 267(8): 5128-5132.
96. de Kok A, van Berkel WJH. Lipoamide dehydrogenase. In: Patel MS, Roche TE, Harris RA, editors. *Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes*. Birkhäuser, Basel, 1996: 53-70.
97. Cameron JM, Levandovskiy V, MacKay N, Raiman J, Renaud DL, Clarke JTR, Feigenbaum A, Elpeleg O, Robinson BH. (2006) Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *Am J Med Genet A*, 140(14): 1542-1552.
98. Quinonez SC, Leber SM, Martin DM, Thoene JG, Bedoyan JK. (2013) Leigh Syndrome in a Girl With a Novel DLD Mutation Causing E3 Deficiency. *Pediatr Neurol*, 48(1): 67-72.
99. Quinonez SC, Thoene JG. Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors, *GeneReviews® 1993-2020* [Internet]. University of Washington, Seattle (WA), 2014: 1-37.
100. Ambrus A, Adam-Vizi V. (2018) Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism. *Neurochem Int*, 117: 5-14.
101. Shaag A, Saada A, Berger I, Mandel H, Joseph A, Feigenbaum A, Elpeleg ON. (1999) Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *American Journal of Medical Genetics*, 82(2): 177-182.
102. Liu TC, Kim H, Arizmendi C, Kitano A, Patel MS. (1993) Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11): 5186-5190.

103. Shany E, Saada A, Landau D, Shaag A, HersHKovitz E, Elpeleg ON. (1999) Lipamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(1): 163-166.
104. Hong YS, Kerr DS, Craigen WJ, Tan J, Pan YZ, Lusk M, Patel MS. (1996) Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipamide dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet*, 5(12): 1925-1930.
105. Cerna L, Wenchich L, Hansiková H, Kmoch S, Peskova K, Chrastina P, Brynda J, Zeman J. (2001) Novel mutations in a boy with dihydrolipamide dehydrogenase deficiency. *Med Sci Monit*, 7(6): 1319-1325.
106. Grafakou O, Oexle K, van den Heuvel L, Smeets R, Trijbels F, Goebel HH, Bosshard N, Superti-Furga A, Steinmann B, Smeitink J. (2003) Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation. *Eur J Pediatr*, 162(10): 714-718.
107. Hong YS, Kerr DS, Liu TC, Lusk M, Powell BR, Patel MS. (1997) Deficiency of dihydrolipamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del) - Analysis of a family and prenatal testing. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1362(2-3): 160-168.
108. Odievre MH, Chretien D, Munnich A, Robinson BH, Dumoulin R, Masmoudi S, Kadhom N, Rötig A, Rustin P, Bonnefont JP. (2005) A novel mutation in the dihydrolipamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency. *Hum Mutat*, 25(3): 323-324.
109. Hong YS, Korman SH, Lee J, Ghoshal P, Qu Q, Barash V, Kang S, Oh S, Kwon M, Gutman A, Rachmel A, Patel MS. (2003) Identification of a common mutation (Gly194Cys) in both Arab Moslem and Ashkenazi Jewish patients with dihydrolipamide dehydrogenase (E3) deficiency: Possible beneficial effect of vitamin therapy. *J Inher Metab Dis*, 26(8): 816-818.
110. Brassier A, Ottolenghi C, Boutron A, Bertrand AM, Valmary-Degano S, Cervoni JP, Chretien D, Arnoux JB, Hubert L, Rabier D, Lacaille F, de Keyzer Y, Di Martino V, de Lonlay P. (2013) Dihydrolipamide dehydrogenase deficiency: A still overlooked cause of recurrent acute liver failure and Reye-like syndrome. *Mol Genet Metab*, 109(1): 28-32.

111. Quintana E, Pineda M, Font A, Vilaseca MA, Tort F, Ribes A, Briones P. (2010) Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) deficiency in a Spanish patient with myopathic presentation due to a new mutation in the interface domain. *J Inher Metab Dis*, 33: S315-S319.
112. Carozzo R, Torraco A, Fiermonte G, Martinelli D, Di Nottia M, Rizza T, Voza A, Verrigni D, Diodato D, Parisi G, Maiorana A, Rizzo C, Pierri CL, Zucano S, Piemonte F, Bertini E, Dionisi-Vici C. (2014) Riboflavin responsive mitochondrial myopathy is a new phenotype of dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. The chaperon-like effect of vitamin B2. *Mitochondrion*, 18: 49-57.
113. Sakaguchi Y, Yoshino M, Aramaki S, Yoshida I, Yamashita F, Kuhara T, Matsumoto I, Hayashi T. (1986) Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency - a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction. *Eur J Pediatr*, 145(4): 271-274.
114. Barak N, Huminer D, Segal T, Ben Ari Z, Halevy J, Kaspa RT. (1998) Lipoamide dehydrogenase deficiency: a newly discovered cause of acute hepatitis in adults. *J Hepatol*, 29(3): 482-484.
115. Ambrus A, Torocsik B, Tretter L, Ozohanics O, Adam-Vizi V. (2011) Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase. *Hum Mol Genet*, 20(15): 2984-2995.
116. Vaubel RA, Rustin P, Isaya G. (2011) Mutations in the Dimer Interface of Dihydrolipoamide Dehydrogenase Promote Site-specific Oxidative Damages in Yeast and Human Cells. *J Biol Chem*, 286(46): 40232-40245.
117. Patel MS, Korotchkina LG, Sidhu S. (2009) Interaction of E1 and E3 components with the core proteins of the human pyruvate dehydrogenase complex. *J Mol Catal B-Enzym*, 61(1-2): 2-6.
118. Lanterman MM, Dickinson JR, Danner DJ. (1996) Functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae* of naturally occurring amino acid substitutions in human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Hum Mol Genet*, 5(10): 1643-1648.
119. Liu TC, Korotchkina LG, Hyatt SL, Vettakkorumakankav NN, Patel MS. (1995) Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its site-directed mutants. *J Biol Chem*, 270(26): 15545-15550.

120. Yuan L, Cho YJ, Kim H. (2008) Characterization of Two Naturally Occurring Mutations Close to Cofactors in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *Bull Korean Chem Soc*, 29(12): 2327-2328.
121. Yuan L, Kim H. (2012) Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Ile-358 to Thr) in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase of a Patient with Leigh Syndrome. *Bull Korean Chem Soc*, 33(5): 1445-1446.
122. Kim H. (2012) Characterization of Two Naturally Occurring Mutations (Gly-101 Deletion and Glu-340 to Lys Substitution) in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase of a Patient with Metabolic Acidosis. *Bull Korean Chem Soc*, 33(8): 2477-2478.
123. Babady NE, Pang YP, Elpeleg O, Isaya G. (2007) Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15): 6158-6163.
124. Yuan L, Kim H. (2010) Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Arg-460 to Gly) Close to FAD in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *Bull Korean Chem Soc*, 31(12): 3511-3512.
125. Nemeria NS, Ambrus A, Patel H, Gerfen G, Adam-Vizi V, Tretter L, Zhou J, Wang J, Jordan F. (2014) Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex E1 Component Forms a Thiamin-derived Radical by Aerobic Oxidation of the Enamine Intermediate. *J Biol Chem*, 289(43): 29859-29873.
126. Ambrus A, Adam-Vizi V. (2013) Molecular dynamics study of the structural basis of dysfunction and the modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic mutants of human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 538(2): 145-155.
127. Ambrus A, Mizsei R, Adam-Vizi V. (2015) Structural alterations by five disease-causing mutations in the low-pH conformation of human dihydrolipoamide dehydrogenase (hLADH) analyzed by molecular dynamics – Implications in functional loss and modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic hLADH forms. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2: 50-56.
128. Ambrus A, Wang JJ, Mizsei R, Zambo Z, Torocsik B, Jordan F, Adam-Vizi V. (2016) Structural alterations induced by ten disease-causing mutations of human dihydrolipoamide dehydrogenase analyzed by hydrogen/deuterium-exchange mass

spectrometry: Implications for the structural basis of E3 deficiency. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1862(11): 2098-2109.

129. Park Y-H, Patel MS. (2010) Characterization of interactions of dihydrolipoamide dehydrogenase with its binding protein in the human pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 395(3): 416-419.

130. Tischner C, Wenz T. (2015) Keep the fire burning: Current avenues in the quest of treating mitochondrial disorders. *Mitochondrion*, 24: 32-49.

131. Rapoport M, Saada A, Elpeleg O, Lorberboum-Galski H. (2008) TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Mol Ther*, 16(4): 691-697.

132. Rapoport M, Salman L, Sabag O, Patel MS, Lorberboum-Galski H. (2011) Successful TAT-mediated enzyme replacement therapy in a mouse model of mitochondrial E3 deficiency. *J Mol Med*, 89(2): 161-170.

133. Papadopoulou LC, Tsiftoglou AS. (2011) Transduction of Human Recombinant Proteins into Mitochondria as a Protein Therapeutic Approach for Mitochondrial Disorders. *Pharm Res*, 28(11): 2639-2656.

134. Lin BY, Kao MC. (2015) Therapeutic applications of the TAT-mediated protein transduction system for complex I deficiency and other mitochondrial diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1350: 17-28.

135. Mueller U, Förster R, Hellmig M, Huschmann FU, Kastner A, Malecki P, Pühringer S, Röwer M, Sparta K, Steffien M, Ühlein M, Wilk P, Weiss MS. (2015) The macromolecular crystallography beamlines at BESSY II of the Helmholtz-Zentrum Berlin: Current status and perspectives. *Eur Phys J Plus*, 130(7): 141-151.

136. Krug M, Weiss MS, Heinemann U, Mueller U. (2012) XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J Appl Crystallogr*, 45(3): 568-572.

137. Sparta KM, Krug M, Heinemann U, Mueller U, Weiss MS. (2016) XDSAPP2.0. *J Appl Crystallogr*, 49(3): 1085-1092.

138. Kabsch W. (2010) XDS. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2): 125-132.

139. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS,



- Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4): 235-242.
140. Vagin A, Teplyakov A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1): 22-25.
141. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 53(Pt 3): 240-255.
142. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 4): 486-501.
143. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2): 213-221.
144. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1): 12-21.
145. Krissinel E, Henrick K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*, 372(3): 774-797.
146. Jurcik A, Bednar D, Byska J, Marques SM, Furmanova K, Daniel L, Kokkonen P, Brezovsky J, Strnad O, Stourac J, Pavelka A, Manak M, Damborsky J, Kozlikova B. (2018) CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics*, 34(20): 3586-3588.
147. Mayo LA, Curnutte JT. (1990) Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol*, 186: 567-575.
148. Benen J, van Berkel W, Veeger C, de Kok A. (1992) Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. The role of the C-terminus in catalysis and dimer stabilization. *Eur J Biochem*, 207(2): 499-505.

149. Kim H. (2005) Asparagine-473 residue is important to the efficient function of human dihydrolipoamide dehydrogenase. *J Biochem Mol Biol*, 38(2): 248-252.
150. Serrano L, Neira JL, Sancho J, Fersht AR. (1992) Effect of alanine versus glycine in alpha-helices on protein stability. *Nature*, 356(6368): 453-455.
151. Serrano L, Sancho J, Hirshberg M, Fersht AR. (1992) Alpha-helix stability in proteins. I. Empirical correlations concerning substitution of side-chains at the N and C-caps and the replacement of alanine by glycine or serine at solvent-exposed surfaces. *J Mol Biol*, 227(2): 544-559.
152. Liu TC, Hong YS, Korotchkina LG, Vettakkorumakankav NN, Patel MS. (1999) Site-directed mutagenesis of human dihydrolipoamide dehydrogenase: Role of lysine-54 and glutamate-192 in stabilizing the thiolate-FAD intermediate. *Protein Expr Purif*, 16(1): 27-39.
153. Mattevi A. (2006) To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem Sci*, 31(5): 276-283.
154. Gadda G. (2012) Oxygen activation in flavoprotein oxidases: the importance of being positive. *Biochemistry*, 51(13): 2662-2669.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Szabo E**, Wilk P, Nagy B, Zambo Z, Bui D, Weichsel A, Arjunan P, Torocsik B, Hubert A, Furey W, Montfort WR, Jordan F, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A. (2019) Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants. Hum Mol Genet 28(20): 3339-3354.

**IF: 5,100**

**Szabo E**, Mizsei R, Wilk P, Zambo Z, Torocsik B, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A. (2018) Crystal structures of the disease-causing D444V mutant and the relevant wild type human dihydrolipoamide dehydrogenase. Free Radic Biol Med 124: 214-220.

**IF: 5,657**

**Szabó E**, Ambrus A. (2017) A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiencia molekuláris patomechanizmusa. Biokémia 41(2):44-63.

**IF nélküli**

*Az enzimaktivitás mérések ÚNKP támogatott projekt keretében valósultak meg (2019/2020, 5 hónap), az eredmények nem publikált adatok.*

### Egyéb közlemények:

Jako T, **Szabo E**, Tabi T, Zachar G, Csillag A, Szoko E. (2014) Chiral analysis of amino acid neurotransmitters and neuromodulators in mouse brain by CE-LIF. Electrophoresis 35(19): 2870-2876.

**IF: 3,028**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Szökő Éva Professzor Asszonynak, hogy egyetemi tanulmányaim befejezése után bízott a tudományos kutatói munkára és a PhD fokozat megszerzésére.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Ambrus Attilának, hogy az évek során munkámat irányította, kritikus szemléletre tanított és lehetőséget biztosított számos külföldi tanulmányúton való részvételre, melyek során értékes szakmai tapasztalatra tehettem szert.

Köszönöm Ádám Veronika Professzor Asszonynak, a Neurobiokémiai Kutatócsoport vezetőjének, amiért a háttérből biztosította PhD munkám megvalósítását.

Köszönöm Prof. Csanády Lászlónak és Prof. Tretter Lászlónak, az Orvosi Biokémiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatójának, hogy a PhD munkámat az Intézetben lehetővé tették és támogatták

Köszönettel tartozom a németországi Helmholtz-Zentrum Berlin Makromolekuláris Krisztallográfia kutatócsoport munkatársainak, de legfőképpen Dr. Manfred S. Weissnak és Dr. Piotr Wilknek, amiért az intézményükben eltöltött tanulmányutak és a röntgendiffrakciós vizsgálatok során személyesen, majd az adatok kiértékelése során távolról, időt és energiát nem kímélve segítettek a munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani mindazon jelenlegi és korábbi kollégáimnak, akik a munkám különböző fázisaiban, különböző technikákban segítséget nyújtottak és ezáltal hozzájárultak a doktori fokozat megszerzéséhez: Dr. Töröcsik Beáta a molekuláris biológiai módszerek kivitelezésében és elsajátításában nyújtott értékes segítséget, Zámbo Zsófia, Vass Krisztina Rubina, Bui Dávid, Dr. Nagy Bálint, Dr. Ozohanics Olivér, Nemes-Nikodém Éva és Dr. Hubert Ágnes a fehérjeizolálással, kristályosítással, ill. enzimaktivitás méréssel kapcsolatos laboratóriumi munkában segítette a munkámat.

Hálával tartozom Dr. Jordan Iordanovnak, aki nem csak számos alkalommal nyújtott szakmai segítséget, de a mindennapok során egy kiegyensúlyozott érzelmi háttérrel is biztosított.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a szüleimnek és a húgomnak, amiért az évek során biztosítottak támogatásukról és a munkámat érdeklődéssel követték nyomon.