

A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz patogén mutánsainak szerkezetanalízise

Doktori tézisek

Dr. Szabó Eszter

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi 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

BEVEZETÉS

A (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (LADH, E3, L-fehérje, EC 1.8.1.4) a piridin-nukleotid-diszulfid-oxidoreduktáz enzimes család tagja. Fiziológiás körülmények között a LADH a dihidroliponsav-kofaktor oxidációját katalizálja NAD^+ redukciójához kapcsolatan megfordítható reakcióban. A LADH kulcsszerepe abban rejlik, hogy számos multienzim komplexben, így a mitokondriális α -ketosav-dehidrogenáz komplexekben és a glicinhasító rendszerben (GHR) is megtalálható, melyek mindegyikében az E2-alegységhez, ill. a H-fehérjéhez kovalensen kötött lipoát-kofaktor regenerálása révén az enzimkomplexek katalitikus aktivitásának fenntartásáért felel. A LADH ilyen módon gyakorlatilag megkerülhetetlen a metabolizmusban, hiszen a piruvát-dehidrogenáz komplex (PDHk) révén az aerob szénhidrát-metabolizmusban, az elágazó láncú α -ketosav-dehidrogenáz komplex (ELKDHk), az α -ketoadipát-dehidrogenáz komplex (KADHk) és a GHR révén számos aminosav lebontásában, az α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (KGDHk) által pedig nem csak a katabolikus, hanem az anabolikus folyamatok szempontjából is kulcsfontosságú citromsav ciklusban is szerepet játszik. Nem elhanyagolható tényező, hogy az α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek egyik fontos szabályozása is a LADH enzimkomponensen keresztül érvényesül. A sejtek energia állapotát tükröző NADH/NAD^+ -arány ugyanis a LADH aktivitásának szabályozása révén befolyásolja az enzimkomplexek működését.

A LADH-reakció egy FAD proszтетikus csoport, egy aktív centrumbeli redox-aktív diszulfid-kötés és egy katalitikus bázis közreműködésével valósul meg. A LADH funkcionális vagy más néven obligát homodimer. A kristályszerkezetek alapján az enzimet felépítő egyik monomer szolgáltatja a Cys45-Cys50 redox-párt (a humán szekvencia szerinti számozást követve), a FAD proszтетikus

csoporthoz és az azt stabilizáló aminosavak döntő többségét, valamint a NAD^+/NADH -kötőhelyet. A másik monomer adja ugyanakkor a katalitikus bázisként azonosított His452'-t (a ' szimbólum a szomszédos monomerhez tartozó aminosavakat jelöli) és az annak megfelelő konformációját és pKa értékét befolyásoló aminosavakat. A dihidrolipoamid (DHLA) kötőhelye (továbbiakban LA-kötőhely), ill. az ez utóbbival közös belső üreget képező, hidrofílebb karakterű, feltételezhetően $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ és/vagy H_2O kivezetésére szolgáló $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatorna a dimerizációs felszínen helyezkedik el.

A ping-pong kinetikát követő enzimreakció redukzív és oxidatív félreakciója térben elválasztva, a FAD izoalloxazin gyűrűrendszerének két ellentétes oldalán valósul meg. DHLA és NAD^+ szubsztrátokkal, azaz a forward irányú LADH-reakció során az elektronok először az aktív centrumbeli diszulfidra kerülnek és az enzim két elektron által redukált állapotba (EH_2) kerül. Az EH_2 -állapotban a két elektron az aktív centrumban a két cisztein tiolcsoportja és a FAD között oszlik meg, a domináns forma a Cys50 tiolát-anionja és a FAD között megvalósuló ún. töltésátviteli komplex. A második félreakció során az elektronok a FAD prosztetikus csoporton keresztül a NAD^+ kofaktorra kerülnek hidridion ekvivalens formájában (H^+ felszabadulás mellett). A reakcióban a His452' szerepe a DHLA deprotonálása és a töltésátviteli komplex stabilizálása. A fordított (reverz) irányú, NADH általi redukció során 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. A katalitikus ciklus megszakítható és egyúttal a LADH-reakció gátolható az aktív centrumbeli ditiollal (különböző mechanizmussal) reakcióba lépő ágensek, valamint az enzim négyelektronos redukciója révén, mely DHLA szubsztráttal nem, de NADH-val hatékonyan megtörténik.

Az izolált LADH a dehidrogenáz aktivitása mellett, a fizioiógiaától eltérő alternatív elektronakceptorok használatával diaforázként és oxidázként is működhet. Mindazon körülmények, melyek elősegítik a FAD proosztetikus csoporton a teljesen redukált állapot kialakulását (pl. NADH általi négyelektronos redukció, vagy redukció az aktív centrumbeli tiol-csoporttal reagáló ágensek jelenlétében) a specifikus aktivitás gátlása mellett a diaforáz és az oxidáz aktivitások növekedését okozzák. Az oxidáz-reakció reaktív oxigén származékok (ROS), szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot -}$), valamint hidrogén-peroxid (H_2O_2) képzését eredményezi és ezáltal patológiás jelentőségű. A humán (h) LADH nem csak önmagában, hanem enzimkomplexek részeként is képes ROS-képzésre. A LADH-nak tulajdonítható a hKGDHk ROS-képző aktivitása, mely az enzimkomplexet a mitokondrium egyik legjelentősebb ROS termelőjévé és ezáltal az oxidatív stressz fontos kialakítójává teszi. A hKGDHk fokozott ROS-képzést mutatott a fizioiógias elektronakceptor (NAD^+) hiányában a forward irányban, valamint megnövekedett NADH/ NAD^+ arány vagy acidózis esetén a reverz irányban, mely állapotok különböző kórélettani folyamatokban, pl. iszkémia, Komplex I. elégtelenség vagy magas kalóriabevitel esetén fordulhatnak elő.

A hLADH deficienciája, az ún. E3-deficiencia egy ritka, autoszómális recesszív öröklődésű genetikai kórkép. A klinikai irodalom 14 betegséget okozó *DLD* mutációról számol be, amelyek szubsztitúciót vagy deléciót hordozó és ezáltal megváltozott enzimaktivitásokkal jellemezhető hLADH variánsok kifejeződéséhez vezetnek. A mutációk az enzim különböző funkcionális régióit érintheti, a lokalizáció azonban nem mutatott korrelációt a specifikus aktivitásban kiváltott csökkenés mértékével. Az E3-deficiencia fenotípusos megjelenése rendkívül változatos. A gyakran epizodikusan jelentkező metabolikus eltérések (laktát acidózis,

hipoglikémia, hiperammonémia) mellett jellemző lehet a neurológiai érintettség, esetenként kardiológiai tünetek, májelégtelenség, ill. izomgyengeség és -fájdalom.

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. A betegekből származó mintákban mérhető LADH-aktivitás csökkenés mértéke azonban többnyire nem korrelál a tünetek súlyosságával. Feltételezhető tehát, hogy egyéb súlyosbító mechanizmusok is hozzájárulnak a patogenezishez. Az eddigi kutatási eredmények alapján ilyen mechanizmus lehet a hLADH egyes patogén variánsainak megnövekedett ROS-képző aktivitása (különösen acidózisban), a hLADH-mutánsokat tartalmazó enzimkomplexek disszociációja, fokozva a komplexek betegekből tapasztalt alulműködését, valamint a hKGDHk tekintetében az esetleges disszociáció után visszamaradó alegységek, ill. komplexeik erőteljes ROS termelése.

Jelenleg az E3-deficienciához vezető mutációk molekuláris patomechanizmusának értelmezéséhez közvetlen szerkezeti információ csak hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS) technikának köszönhetően áll rendelkezésre. A megváltozott enzimaktivitások szerkezeti hátterének jobb megértéséhez további, nagyobb felbontású szerkezeti adatokra lenne szükség.

CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célom a hLADH és betegséget okozó variánsainak röntgenkrisztallográfiával 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 LADH- 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 Glu332-, ill. Arg460-variánsait hoztam létre és vizsgáltam azok specifikus aktivitását (a fiziológiai reakció forward és reverz irányában egyaránt) és a ROS-képző aktivitást.

MÓDSZEREK

Plazmid vektorok előállítás

A heterológ fehérjeexpresszióhoz pET52b(+) típusú plazmid vektort alkalmaztunk. Az alapplazmid a vad típusú hLADH-t kódoló *DLD* gén cDNS-ét, mint inszertet mitokondriális szignálszekvenciát nem tartalmazó, *E. coli*-ban történő expresszióra kodon-optimalizált formában. A plazmid biztosította a Strep affinitás címkének a hLADH N-terminálisára való fúzionáltatását, szelekciós markerként pedig a β -laktamáz génjét kódolta.

A pontmutációkat tartalmazó plazmidok előállítását *in vitro* helyspecifikus mutagenézissel végeztük a fent ismertetett alapplazmid, QuikChange Primer Design program segítségével tervezett primerek és QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis csomag használatával. A mutagenézis végterméket, azaz a mutáns hLADH szekvenciáját hordozó plazmidokat One Shot TOP10 kompetens *E. coli* sejtekben szaporítottuk fel, majd a plazmidok izolálására QIAprep Spin Miniprep csomagot használtunk. A mutagenézis sikerességének igazolására a plazmid mintákat szekvenáltattuk.

Rekombináns fehérje expresszió és tisztítás

A hLADH és variánsainak heterológ expressziójára pET52b(+)/BL21(*DE3*) rendszert alkalmaztunk. A rekombináns fehérjetermékeket Strep-címke alapú affinitáskromatográfiás módszerrel tisztítottuk. A fehérje izolálásához a kutatócsoportunk által kidolgozott protokollt alkalmaztuk. A fehérjepreparátumok tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel, aminosav szekvencia tekintetében pedig tömegspektrometriával ellenőriztük. A

fehérjeoldatokat felhasználásig folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően -80 °C-on tároltuk.

Fehérjekristályosítás

A kristályosítási próbákat a kereskedelemben elérhető, Qiagen és Hampton Research által forgalmazott oldatsorozatokkal kezdtük ülőcsepp gőzdiffúziós módszer alkalmazásával. A G426E-, I445M- és R447G-hLADH variánsok esetén a Hampton Research “Crystal I.” oldatsorozat #39 körülménye [2 M (NH₄)₂SO₄, 2 v/v% PEG 400, 0,1 M Hepes (pH 7,5)] további optimalizálás nélkül is adatgyűjtésre alkalmas kristályokat eredményezett, a többi fehérje esetén azonban a kristályosítási körülmények optimalizációjára volt szükség.

A hLADH kristályosítását a Hampton Research Index #83-85 oldatok összetételének módosításával valósítottuk meg, az adatgyűjtésre legalkalmasabb kristály 0,2 M MgCl₂, 25 m/v% PEG 3350 és 0,1 M Bis-Tris (pH 7,45) összetételű oldatból származott.

A P453L-, G194C- és R460G-hLADH variánsok esetén a Crystal I. oldatsorozat #39 körülményének (lásd feljebb) optimalizálása bizonyult eredményesnek, a végső oldatkörülmények csak a puffer anyagi minőségében és/vagy pH-jában, ill. a P453L-hLADH variáns esetén még a PEG 400 v/v%-os összetételében különbözött a kiindulási körülménytől. A végső oldatkörülmények pontos összetételei a következők voltak: P453L-hLADH: 2 M (NH₄)₂SO₄, 1,5 v/v% PEG 400, 0,1 M Hepes (pH 7,3); G194C-hLADH: 2 M (NH₄)₂SO₄, 2 v/v% PEG 400, 0,1 M Bis-Tris (pH 6,9); R460G-hLADH: 2 M (NH₄)₂SO₄, 2 v/v% PEG 400, 0,1 M Bis-Tris (pH 6,5).

A D444V-hLADH kristályosítását a Qiagen NeXtal pHClear II kizárólag Na/K-foszfát tartalmú körülményeinek optimalizálása tette

lehetővé, a szerkezet meghatározáshoz használt kristály 1,6 M Na/K-PO₄ (pH 8,1) oldatból származott.

Krio-védőoldatot a hLADH (Parabar 10312) és a D444V-hLADH (1,8 M Na/K-PO₄ (pH 7,5), 20 v/v% glicerin) esetén használtunk. A fehérjekristályokat az adatgyűjtésig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, ill. tároltuk.

Röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás és analízis

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 100 K hőmérsékleten. A nyers adatok feldolgozását a méréssel párhuzamosan, online módban végeztük az XDSAPP 2.0 szoftver alkalmazásával.

A fázisproblémát a Molrep program alkalmazásával, molekuláris helyettesítéssel oldottuk meg egy korábban meghatározott hLADH szerkezetet használva kiindulási modellként (PDB kód: 1ZMD, „A” monomer). A szerkezetfinomítás első lépéseként merev test finomítást végeztünk a CCP4 Refmac5 programjával. Ezt követően a finomítás modellépítéssel iterálva történt: a Coot programban, valós térben végzett modell(újra)építést mindig geometria megkötésekkel terhelt finomítási lépés követte. Ez utóbbi finomítási lépésekre a D444V-hLADH szerkezet esetén végig a Refmac5 programot, a többi szerkezet esetén kezdetben a Refmac5 programot, majd a későbbi lépések során a Phenix szoftvercsomag phenix.refine programját használtuk. A modellszerkezetek helyességének validálására a phenix.refine-hoz kapcsolt Molprobability program szolgált. A vad típusú hLADH, valamint a patogén D444V-, P453L-, G194C-, R460G-, R447G-, I445M-, ill. G426E- hLADH

variánsok végső modell szerkezeteinek koordinátái és a közvetlenül mért amplitúdók mindegyike feltöltésre került a Fehérjeszerkezeti Adatbázisba (Protein Data Bank, PDB), ahol hozzáférhetőek rendre az 5NHG, 5J5Z 6I4Z, 6I4P, 6I4R, 6I4S, 6I4T és 6I4U kódjelek alatt.

Két vad típusú hLADH szerkezet elemzését végeztem el. A fent említett 5NHG kódjelű szerkezetet illetően mind a szerkezetmeghatározás, mind a szerkezetelemzés az én munkám eredménye, a 6I4Q kódjelű szerkezet meghatározásban társszerzőként vettem részt és csak az elemzését tekintem saját eredménynek (lásd még Eredmények fejezet). A patogén hLADH-variánsok szerkezeteit a 6I4Q PDB kódjelű hLADH szerkezethez képest végeztem el. A variánsok szerkezeteit (teljes dimert) a vad típusú hLADH szerkezetére (teljes dimerre) illesztettük a legkisebb négyzetes célfüggvényt alkalmazó ProFit program segítségével. A teljes szerkezetre kapott átlagos, illetve az aminosavszintű atomi koordináták közötti négyzetes középérték eltérés (*root-mean square deviation*, RMSD) ilyen módon a szerkezeti különbségek számszerű jellemzésére szolgált. A dimerizációs felszín, ill. a FAD prosztetikus csoportot stabilizáló kölcsönhatások jellemzésére az online PISA (Proteins, Interfaces, Structures, Assemblies) szervert és a CCP4 CONTACT nevű programját használtuk. A fehérjeszerkezetek szubsztrátkötő- és H⁺/H₂O-csatornáit a geometria tekintetében a Caver Analyst 2.0 programmal vizsgáltuk. A kalkuláció kiindulópontjának az aktív centrumot alkotó Cys45 és His452' megfelelő atomjainak tömegközéppontját választottuk. A szerkezet felszíni polaritásának megjelenítése és analízise, a konformációs változások vizuális kiértékelése a PyMol program segítségével történt.

Enzimaktivitás mérések

Az enzimaktivitás méréseket megelőzően a fehérje-preparátumok koncentrációjának mérésére a kolorimetriás Bradford módszert alkalmaztuk szarvasmarha szérum albuminnal készített kalibrálósorral szemben.

A vad típusú hLADH és variánsainak specifikus LADH-aktivitásait a forward irányban a NADH termelésén, reverz irányban pedig a NADH fogyasztán keresztül, 340 nm-en történő spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. Kísérleti körülmények: 165 μM NAD^+ , 0,9 mM dihidroliponsav (DHLS) és 123 ng fehérje (forward irány), vagy 165 μM NADH, 0,9 mM lipoamid és 12,3 ng fehérje (reverz irány), 50 mM K-PO_4 puffer, pH 7,3, 300 μl végtérfogot, 37 °C. Az enzimreakciót az elegyek 37 °C-on 15 percig történő inkubációját követően DHLS (forward irány) vagy NADH (reverz irány) hozzáadásával indítottuk.

A szuperoxid-képzést részlegesen acetilált citokróm c szuperoxid általi redukcióján keresztül, 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_4 puffer, pH 6,3, 200 μl végtérfogot, 37 °C. Az enzimreakciót az elegyek 37 °C-on 15 percig történő inkubációját követően NADH hozzáadásával indítottuk.

Az enzimaktivitás adatok statisztikai kiértékelésére kétmintás t-próbát végeztünk eltérő varianciát feltételezve, $p \leq 0,05$ szignifikancia szint mellett.

EREDMÉNYEK

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 egyik (5NHG) szerkezet meghatározását tekintem saját eredménynek. Munkám eredménye azonban mindkét vad típusú hLADH szerkezet analízise.

A hLADH két új kristályszerkezete nem változtatta meg az enzim szerkezetével és a katalizált reakció mechanizmusával kapcsolatos főbb ismereteinket. 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 töltéeloszlását. 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 szerepet játszanak. Az Arg460'[A]-ból Arg460'[B]-be történő átmenet jelentős helyi szűkületet okoz a csatorna átmérőjében és a szűk keresztmetszet áthelyeződését okozza, függetlenül a Glu332 konformációjától. Az Arg460' mindemellett két csatornát határoló α -hélixet kapcsol össze az Asp333 és Glu332 aminosavakkal létesített sóhidak révén.

A 2,27 Å felbontású hLADH szerkezet (PDB kód: 5NHG) az enzim azon felszíni régiójáról nyújtott új információt, amely a

hPDHk-ban jelen levő E3-kötő fehérje (hE3KF), valamint a hELKDHk E2-alegyége (hE2_{ELKDHk}) megfelelő alegységkötő doménjével lép interakcióba. Az 5NHG kódjelű hLADH szerkezetben az említett felszíni régió flexibilis szerkezettel bír, mely elsősorban a Tyr438 aminosavak egymáshoz viszonyított helyzetében mutatkozott meg. A Tyr438 hidroxilcsoportja kétféleképpen lép kölcsönhatásba a szomszédos monomer Asp444' aminosavjával: a 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. Az előbbi kölcsönhatás esetén a homodimer két Tyr348 oldallánci aromás gyűrűjének síkja egymással közel párhuzamos és ezáltal egy dominánsan π - π típusú kölcsönhatás tud megvalósulni a Tyr438-Tyr348' viszonylatban.

Hét betegséget okozó hLADH variáns szerkezete

Az E3-deficiencia lehetséges patomechanizmusainak felderítése érdekében hét betegséget okozó hLADH variáns kristályszerkezetét határoztuk meg. A vizsgált patogén szubsztitúciók az enzim különböző funkcionális régióit érintették közvetlenül: a P453L az aktív centrumot, a G194C a NAD⁺/NADH-kötő domént, a G426E, D444V, I445M, R447G és R460G pedig a dimerizációs felszínt. A szerkezetek felbontása 1,44 és 2,34 Å között változott. Az összehasonlító elemzést a nagyobb felbontású, részletgazdagabb és hasonló oldatkörülményből származó kristályból nyert 6I4Q PDB kódjelű hLADH szerkezetéhez képest végeztem el.

A P453L-hLADH variáns bizonyult a szerkezetileg legeltérőbbnek a vad típushoz képest a vizsgálat tárgyát képező hét variáns közül. A szubsztitúció a His452 aminosavval *cis*-peptidkötéssel kapcsolódó és ezáltal a katalitikus bázis megfelelő orientációját biztosító prolint érinti. A patogén variánsban a His452 és

a szomszédos Leu453 között *transz*-peptidkötés volt megfigyelhető, aminek következtében a katalitikus bázis pozíciója és konformációja lényegesen eltérő volt a vad típusú szerkezetben megfigyelthez képest. A His452 elmozdulása a katalízis szempontjából elengedhetetlennek tartott interakciók megszűnését okozta: sem a His452 karbonil O-atomja és a FAD' izoalloxazin gyűrűjének N3 jelölésű N-atomja közötti H-híd, sem pedig a His452-Glu457 sóhíd kialakulása nem volt lehetséges. Megfigyelhetőek voltak továbbá eltérések a vad típusú szerkezethez képest a FAD prosztetikus csoport izoalloxazin gyűrűje körül. Ezek közül a legszembetűnőbb az Arg393 oldalláncának nagy mértékű elmozdulása volt a FAD' és az azzal interakcióban levő Lys54' felé. Mindezen felül az aktív centrumhoz vezető két csatorna – azaz a LA-kötőhely és a H⁺/H₂O-csatorna – területén is mutatkoztak szerkezeti változások a P453L-hLADH-ban, melyek befolyásolhatják az aktív centrum megközelíthetőségét.

A G194C-hLADH rendkívül kismértékű szerkezeti eltéréseket mutatott a vad típusú hLADH-hoz képest. A szubsztitúció egy konzervált α -hélixet (Val188-Gly201) érint, melynek N-terminális aminosavai részt vesznek a NAD⁺/NADH-kötőhely, azon belül is a nikotinamid-kötőhely kialakításában. Lokalizációja ellenére a G194C szubsztitúció nem okozott konformációs változást a nikotinamid-kötő aminosavakban, csak a közvetlen környezetében levő aminosav oldalláncokban. A G194C aminosavcsere hatására nem volt megfigyelhető szerkezeti eltérés a vad típusúhoz képest sem az aktív centrumban, sem a LA-kötőhelyen, sem pedig a FAD konformációjában vagy az azt stabilizáló kölcsönhatásokban, a H⁺/H₂O-csatornát illetően mindössze az Arg460 vesztette el a konformációs flexibilitását.

A G426E szubsztitúció a dimerizációs felszín nikotinamid-kötőhelyhez közeli részét érinti. A patogén variánsban a Glu426 térben két glutamát (Glu363 és a Glu427) közé ékelődik be

harmadikként. A G426E-hLADH szerkezetben a vad típusra jellemző Glu427-Arg393' és Glu363-Arg393' sóhidak sztérikus okokból nem tudtak kialakulni, helyettük Glu426-Arg393' interakció volt megfigyelhető. Mindezek mellett a Glu426 jelenléte jelentős mértékű konformációs dinamikát indukált a mutáció által közvetlenül érintett területen: a Glu426 és a Glu363 oldalláncai alternatív konformációkban voltak megfigyelhetőek, melyek (sztérikus okokból) „kapcsoltak” voltak egymással. Bár a tárgyalt szerkezeti változások a NAD⁺/NADH-kötőhely környezetét érintik, a kofaktor-kötő aminosavak nem mutattak szerkezeti eltérést a vad típushoz képest. Nem volt megfigyelhető változás továbbá sem az aktív centrumban, sem az LA-kötő csatornában, sem a FAD-kötő aminosavak konformációjában. Az H⁺/H₂O-csatornát illetően csak elhanyagolható szerkezeti eltérések voltak megfigyelhetőek.

A D444V, R447G és R460G szubsztitúciók egy-egy, a dimerizációban szerepet játszó ionos interakció elvesztését okozták. Az I445M aminosavcsere a dimerizációs felszín hidrofób aminosavakban gazdag területét érintette. A kristályszerkezetek révén fény derült arra, hogy mind a négy szubsztitúció az aktív centrumhoz vezető H⁺/H₂O-csatorna körül helyezkedik el és annak tulajdonságait – geometriáját és/vagy polaritását – különböző mértékben befolyásolják. Az R447G és az R460G aminosav cserék közvetlenül érintettek egy-egy töltött oldallánci funkciócsoportot hordozó, a H⁺/H₂O-csatorna integritásában kulcsszerepet játszó aminosavat és mindkét szubsztitúció a csatorna helyi tágulatát és megnövekedett negatív 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 Arg460'[A], az I445M-hLADH variánsban pedig a Glu332[A] és Arg460' [B] konformerek voltak megfigyelhetőek, míg az R460G-

hLADH variánsban a hiányzó arginin oldallánc mellett csak a Glu332[A] konformer volt jelen. A D444V-, R447G- és R460G-hLADH variánsokban ezen felül egy-egy stabilizáló sóhíd elvesztése révén a H^+/H_2O -csatornát határoló Leu327'-Gly344' α -hélix C-terminális szakaszának kismértékű elmozdulása megfigyelhető. Mindezek mellett sem az aktív centrumbeli, sem a FAD-kötő vagy a $NAD^+/NADH$ -kötő aminosavak konformációjában nem mutatkozott számottevő eltérés a D444V-, R447G-, R460G- és az I445M-hLADH variánsokban.

A betegséget okozó G426E, I445M és R447G szubsztitúciók hatása az enzimaktivitásra

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.

A vizsgált aminosavcserék 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 10%-kal növekedett a kísérleti körülményeink között, míg a reverz irányú aktivitás 36%-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%-ra, ezzel szemben a reverz irányban 16%-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% és 55% a vad

típushoz képest). A három patogén variáns egyike sem mutatott emelkedett ROS-képzést a vad típushoz képest.

Glu332 és az Arg460 szubsztitúciók hatása az enzimaktivitásra

A hLADH Glu332 és Arg460 aminosavjaihoz köthető esetleges szerep felderítéséhez, továbbá a dimerizációs domént érintő, azon belül is a H^+/H_2O -csatorna környezetében elhelyezkedő betegséget okozó szubsztitúciók patomechanizmusának megértéséhez további hLADH variánsokat hoztam létre és vizsgáltam azok enzimaktivitását a specifikus reakció és a ROS-képzés tekintetében. A Glu332 alaninnal, aszpartáttal, illetve glutaminnal történő szubsztitúciói egymással összehasonlítva különböző mértékben csökkentették az enzimaktivitást mind a forward, mind pedig a reverz katalitikus irányban a vad típushoz képest, az aktivitáscsökkenés azonban az egyes szubsztitúciók esetén a két irányban hasonló mértékű volt. A legkisebb aktivitáscsökkenést az E332Q szubsztitúció (31% a forward és 11% reverz irányban), míg a legnagyobb mértékű aktivitáscsökkenést az E332D szubsztitúció (59% a forward és 70% reverz irányban) okozta. A ROS-képző aktivitásra egyedül az E332A szubsztitúció nem volt hatással, az E332D-hLADH esetén 39%-kal csökkent, az E332Q-hLADH esetén pedig 18%-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 32% és 49%-os csökkenést, míg az R460K igen jelentős, 61%-os növekedést okozott a vad típushoz képest. Ezzel ellentétben a forward irányú LADH-aktivitást legnagyobb mértékben az R460K aminosavcsere csökkentette (72% a vad típushoz képest), míg az R460A nem okozott szignifikáns változást. A ROS-képző aktivitást mindhárom vizsgált szubsztitúció csökkentette.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az E3-deficienciához vezető szubsztitúciók okozta szerkezeti eltérések

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 deprotonálódását 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 töltéeloszlás 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 felszint 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 α -hélixek dipólus momentumai által közvetített hatások is feltételezhetőek, melyek befolyásolhatják a katalitikus bázis pKa értékét, illetve a FAD-prosztetikus csoport redox potenciálját.

A hLADH szerkezetét és a katalizált reakciót érintő új megfigyelések

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 mutagenézissel hLADH-variánsokat hoztunk létre és vizsgáltuk azok specifikus aktivitását a fiziológias 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 centrumbeli 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 α -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. 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.

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