

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2821.

NAGY BÁLINT

Funkcionális Idegtudományok
című program

Programvezető: Dr. Sperlággh Beáta, c. egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Ambrus Attila, egyetemi docens

A humán alfa-ketosav-dehidrogenáz komplex komponensek szerkezet-funkció vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Nagy Bálint

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ambrus Attila, MTA doktora, h. egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Király Róbert, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Hegedűs Tamás, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csala Miklós, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Harmat Veronika, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Keszler Gergely, PhD, egyetemi docens

Budapest

2022

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek.....	7
1.2. A humán α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek patológiás szerepe.....	12
1.2.1. Dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiencia és ROS-képzés	14
1.2.2. α -ketosav-dehidrogenáz deficienciák és ROS-képzés	16
1.2.3. Dihidrolipoamid-aciltranszferáz deficienciák és ROS-képzés	19
1.3. Térszerkezet-vizsgálati módszerek.....	20
1.3.1. Röntgenkristallográfia	21
1.3.2. NMR-spektroszkópia	22
1.3.3. Krio-elektronmikroszkópia	23
1.4. Kismolekulás szintézisek	24
1.4.1. Izoliponsav	24
1.4.2. FAD.....	25
2. Célkitűzések	26
3. Módszerek	27
3.1. Vegyszerek.....	27
3.2. Az izoliponsav előállítása.....	27
3.3. Pontmutációs konstruktok létrehozása.....	29
3.3.1. hKGDHk	29
3.3.1.1. Vad típusú fehérjéket kódoló plazmidok	29
3.3.1.2. <i>In vitro</i> helyspecifikus mutagenézis.....	29
3.3.1.3. Plazmidok felszaporítása és izolálása	29
3.3.1.4. Szekvenciaanalízis	31
3.3.2. hKADHk	31
3.3.2.1. Vad típusú fehérjéket kódoló plazmidok	31
3.3.2.2. <i>In vitro</i> helyspecifikus mutagenézis.....	31
3.3.2.3. Plazmidok felszaporítása és izolálása	32
3.3.2.4. Szekvenciaanalízis	32
3.4. Rekombináns fehérjeexpresszió és -tisztítás.....	32
3.4.1. <i>Strep</i> affinitás címkével rendelkező fehérjekonstruktok	33
3.4.1.1. Fehérjeexpresszió	33

3.4.1.2. Sejtfeltárás és előtisztítás	33
3.4.1.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás.....	34
3.4.2. Hexahisztidin címkével rendelkező hE1k fehérjekonstrukt	35
3.4.2.1. Fehérjeexpresszió	35
3.4.2.2. Sejtfeltárás és előtisztítás	36
3.4.2.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás.....	36
3.5. A dimerizációs domén deletált hE3 fehérje előállítása.....	37
3.5.1. Fehérjeexpresszió	37
3.5.2. Minimum médiumos fehérjeexpresszió.....	37
3.5.3. Sejtfeltárás és előtisztítás	37
3.5.4. A fehérje natív konformációjának visszaállítása (<i>Refolding</i>).....	38
3.5.5. Affinitáskromatográfiás tisztítás	38
3.5.6. A <i>Strep</i> affinitás címke eltávolítása.....	38
3.5.7. Natív gélelektroforézis	39
3.6. NMR-előkísérletek	39
3.7. Röntgenkristallográfiai szerkezetmeghatározás	40
3.7.1. Fehérjekristályosítás	40
3.7.1.1. Kristályosítási körülmények tesztelése	40
3.7.1.2. Kristályosítási körülmények optimalizálása	41
3.7.2. A vad típusú hE3 röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározása.....	41
3.7.2.1. Adatgyűjtés és -feldolgozás.....	41
3.7.2.2. Szerkezetmegoldás molekuláris helyettesítéssel	42
3.7.2.3. Szerkezetfinomítás.....	42
3.8. Krio-elektronmikroszkópai szerkezetmeghatározás	45
3.8.1. Negatív festésű elektronmikroszkópai felvétel	45
3.8.2. Krio-elektronmikroszkópai felvétel.....	45
3.8.3. Szerkezetmeghatározás.....	46
3.8.3.1. Önálló részecskék rekonstrukciója	46
3.8.3.2. Molekulamodellés és a térkép dokkolása.....	46
3.8.3.3. Az N-terminális szakasz dokkolása.....	47
3.8.4. Szerkezeti analízis	48
3.8.4.1. Belső szerkezeti analízis	48
3.8.4.2. A hKGDHk szubsztrátjainak dokkolása.....	48
3.8.4.3. A hKADHk szubsztrátjainak dokkolása	49

3.9. A hKGDHk szerkezeti topológiájának meghatározása.....	49
4. Eredmények	50
4.1. Kismolekulás szintézisek	50
4.1.1. Az izoliponsav előállítása	50
4.1.2. Az izotópjelölt FAD előállítási protokolljának kidolgozása	50
4.2. Pontmutációs konstruktok létrehozása.....	56
4.2.1. hE3 mutáns változatok.....	56
4.2.2. hE1a mutáns változatok.....	56
4.3. A hKGDHk természetes és módosított alegységeinek expressziója és tisztítása	57
4.3.1. A hE2k expressziója és tisztítása.....	58
4.3.2. A hE1k expressziós kísérletei	59
4.3.3. A hE1k tisztítása.....	62
4.3.4. A szolúbilis hdE3 expressziója	64
4.3.5. A natív konformációjában helyreállított hdE3 tisztítása és szerkezetvizsgálata	66
4.3.5.1. Natív konformáció helyreállítása és tisztítás.....	66
4.3.5.2. A <i>Strep</i> affinitás címke eltávolítása	69
4.4. A hKGDHk alegységeinek röntgenkristallográfiai analízise	73
4.4.1. A hE1k fehérje kristályosítási próbái.....	73
4.4.2. A hE3 mutáns variánsok kristályosítási próbái	73
4.4.3. A vad típusú hE3 kristályosítása és röntgenkristallográfiai szerkezete	74
4.5. A hE2k krio-elektronmikroszkópiai szerkezete és annak analízise	77
4.5.1. A monomer.....	80
4.5.2. Multimerek	82
4.5.3. Az aktív centrum	88
4.5.3. Szubsztrátok megkötése.....	93
4.5.4. Az adipoil-dihidrolipoamid bekötődése	95
4.5.5. Az N-terminális régió	97
4.6. A hKGDHk szerkezete	100
5. Megbeszélés	107
5.1. hKGDHk.....	110
5.1.1. hE3.....	111
5.1.1.1. Expresszió és tisztítás	111

5.1.1.2. A vad típusú fehérje kristályosítása.....	111
5.1.1.3. A vad típusú fehérje szerkezete.....	112
5.1.1.4. Mutáns változatok.....	112
5.1.1.5. A hdE3 expressziója és tisztítása, NMR-előkísérletek.....	112
5.1.2. hE2k.....	114
5.1.2.1. Expresszió és tisztítás.....	115
5.1.2.2. Krio-elektronmikroszkópiai szerkezetmeghatározás.....	115
5.1.2.3. Az N-terminális régió.....	116
5.1.3. hE1k.....	116
5.1.3.1. Expresszió és tisztítás.....	117
5.1.3.2. Kristályosítási próbák.....	117
5.1.4. Teljes komplex.....	118
5.2. hKADHk.....	120
5.2.1. hE1a mutáns változatok.....	120
5.3. Kismolekulás szintézisek.....	121
5.3.1. Az izoliponsav előállítása.....	121
5.3.2. Az izotópjelölt FAD előállítási protokolljának kidolgozása.....	121
6. Következtetések.....	123
7. Összefoglalás.....	127
8. Summary.....	128
9. Irodalomjegyzék.....	129
10. Saját publikációk jegyzéke.....	149
11. Köszönetnyilvánítás.....	150

Rövidítések jegyzéke

'	multimer szerkezet esetén a szomszédos monomerhez tartozó elem
av	<i>Azotobacter vinelandii</i>
ALA	adipoil-dihidrolipoamid
ATP	adenozin-trifoszfát
CC	korrelációs koeficiens (<i>correlation coefficient</i>)
CD	cirkuláris dikroizmus
CL	kémiai keresztkötés (<i>chemical cross-linking</i>)
dE3	dimerizációs domén deletált dihidrolipoamid-dehidrogenáz
DHLA	dihidrolipoamid
DSBD	a hE1k másik két alegység kötéséért felelős régiója (<i>dual-subunit-binding domain</i>)
DTT	ditiotreitól
E1a	α -ketoadipát-dehidrogenáz
E1e	elágazó szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz
E1k	α -ketoglutarát-dehidrogenáz
E1p	piruvát-dehidrogenáz
E2e	dihidrolipoamid-aciltranszferáz
E2k/a	dihidrolipoamid-szukciniltranszferáz
E2p	dihidrolipoamid-acetiltranszferáz
E3	dihidrolipoamid-dehidrogenáz
E3KF	E3-kötő fehérje
<i>E. coli</i> , ec	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELKDHk, e	elágazó szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz komplex
FAD	flavin-adenin-dinukleotid (oxidált forma)
FADH ₂	flavin-adenin-dinukleotid (teljesen redukált forma)
gNHSQC	¹⁵ N magra specifikus heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia (<i>gradient sensitivity enhanced ¹H-¹⁵N heteronuclear single-quantum coherence</i>)
GST	glutation-S-transzferáz
h	humán
HDX	hidrogén/deutérium-csere (<i>hydrogen/deuterium exchange</i>)
ILS	izoliponsav
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalakto-piranozid
KADHk, a	α -ketoadipát-dehidrogenáz komplex

KGDHk, k	α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex
KoA	koenzim-A
krio-EM	krio-elektronmikroszkópia
KSDHk	α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplex
LA	lipoamid
LB	Luria-Bertani
LD	lipoil domén
LDS	lítium-dodecilszulfát
LS	liponsav
MOPS	4-morfolin-propánszulfonsav
MS	tömegspektrometria (<i>mass spectrometry</i>)
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált forma)
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált forma)
NMR	mágneses rezonancia (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
O ₂ ⁻	szuperoxid-anion
OD	optikai denzitás
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDHk, p	piruvát-dehidrogenáz komplex
PEG	polietilén-glikol
RMSD	négyzetes közép eltérés (<i>root-mean-square deviation</i>)
ROS	reaktív oxigénszármazék (<i>reactive oxygen species</i>)
SLA	szukcinil-dihidrolipoamid
ThDP	tiamin-difoszfát (<i>thiamine diphosphate</i>)
TLS	<i>Translation/Libration/Screw</i> csoport (transzlációs, billegő és csavarodó mozgás jellemzésére szolgáló paraméterek a merev testek anizotróp mozgásának modellezésére)
TROSY	transzverzális relaxációra optimalizált spektroszkópia (<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>)

1. Bevezetés

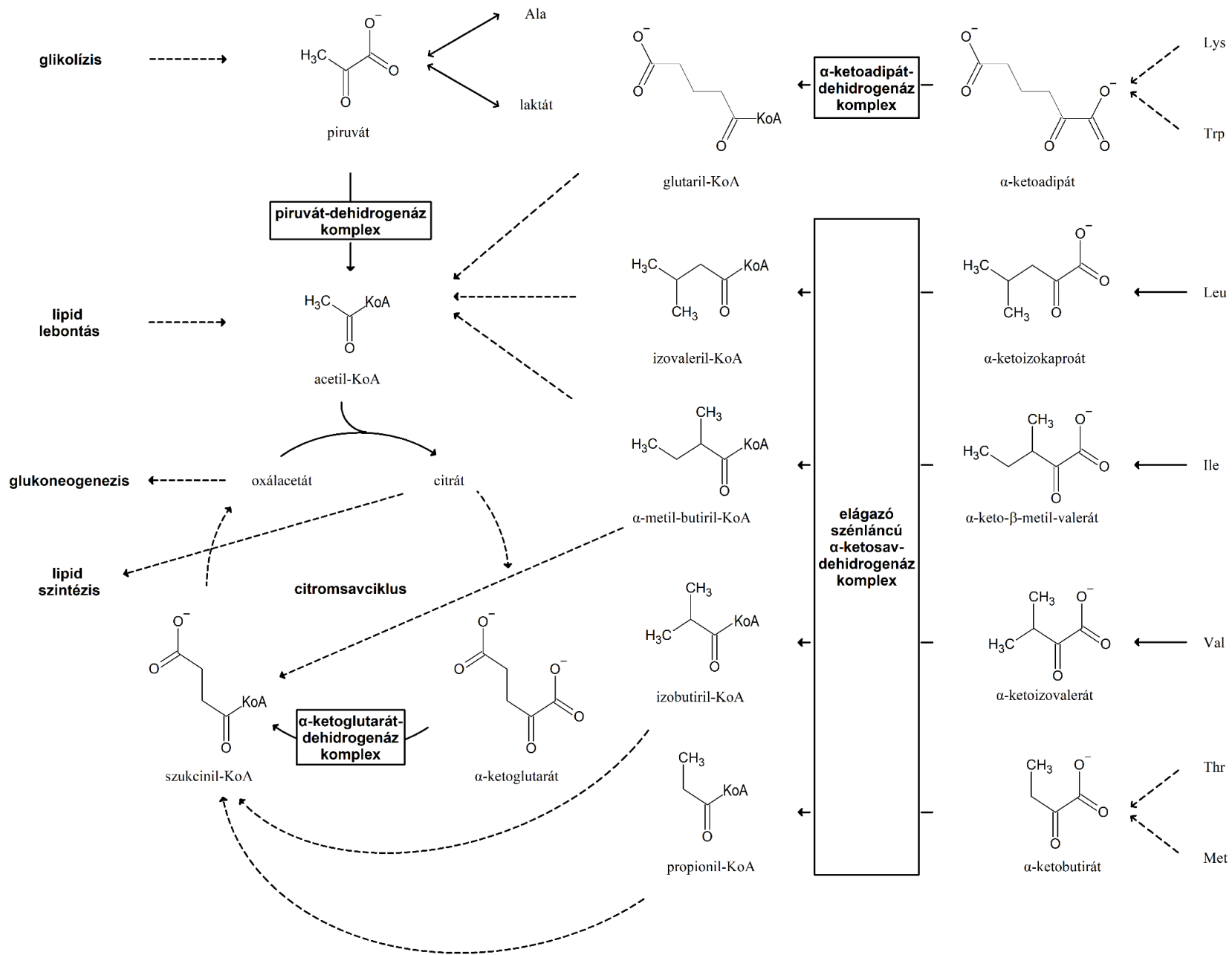
1.1. α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek

Az α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek (KSDHk-k) kulcsszerepet töltenek be a mitokondrium és így a sejt működésében. Az eltérő α -ketosavak oxidatív dekarboxilezésére specializálódott komplexek egyszerre bírnak jelentőséggel az energiatermelő és metabolikus folyamatokban (1. ábra). Katalitikus reakcióikban magas csoportátviteli potenciálú acil-koenzim-A (acil-KoA) és CO₂ keletkezése mellett nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) redukálódik [1, 2] (2. ábra).

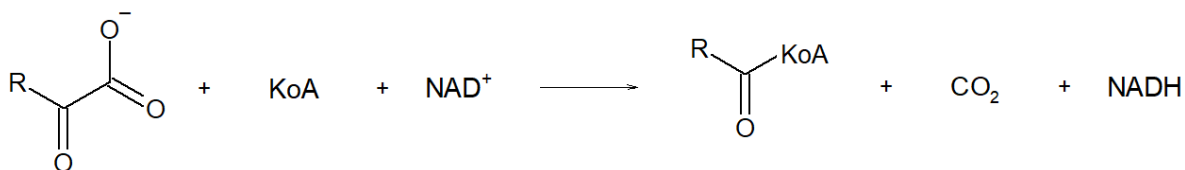
A komplexeket általában háromféle alegység építi fel. Ezeket a szakirodalom az enzimet kifejező E melletti számmal (1, 2, 3), illetve kisbetűkkel jelöli. Ez utóbbiak a faji eredetre (pl.: humán, h), illetve a szubsztrátspecifitásra (pl.: α -ketoglutarát, k) utalnak (1. táblázat). A reakciók pontos végbemeneteléhez a három komponens (E1: α -ketosav-dehidrogenáz, E2: dihidrolipoamid-aciltranszferáz, E3: dihidrolipoamid-dehidrogenáz) összehangolt működése szükséges.

1. táblázat. A KSDHk alegységek

Komplex	Magképző alegységek	Perifériás alegységek
piruvát-dehidrogenáz komplex (PDHk, p)	dihidrolipoamid-acetiltranszferáz (E2p) E3-kötő fehérje (E3KF)	piruvát-dehidrogenáz (E1p) dihidrolipoamid-dehidrogenáz (E3)
α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (KGDHk, k)	dihidrolipoamid-szukciniltranszferáz (E2k)	α -ketoglutarát-dehidrogenáz (E1k) E3
α -ketoadipát-dehidrogenáz komplex (KADHk, a)	E2k/a	α -ketoadipát-dehidrogenáz (E1a) E3
elágazó szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz komplex (ELKDHk, e)	dihidrolipoamid-aciltranszferáz (E2e)	elágazó szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz (E1e) E3



1. ábra. A KSDHk-k által katalizált reakciók. A sematikus ábrán a metabolikus lépéseket nyilak jelölik. A több lépéses reakciósorok esetén szaggatott nyilak láthatóak.



2. ábra. A KSDHk-k által katalizált általános reakció

A szerkezeti gerincet az E2 alegység biztosítja. A 60 (az eukarióta PDHk-ra jellemző pentagonális dodekaéder, 20x3-as felépítés) vagy 24 (minden más esetben jelentkező kocka/hexaéder, 8x3-as felépítés) kópia összekapcsolódásából létrejövő szabályos maghoz kötődhetnek a perifériás alegységek (1-2. táblázatok). Az eukarióta PDHk-k esetén egy további - az E3 alegység kötésére szakosodott, éppen ezért „E3-kötő fehérje” (E3KF) névre hallgató - alegység is szükséges a funkcionális komplex felépítéséhez. Ennek az alegységnek a szerkezeten belüli kópiaszáma jelenlegi tudásunk alapján nem ismert teljes bizonyossággal. Az irodalom 12 [3], illetve 20 [4] (E2 alegységeket helyettesítő) E3KF alegységről is ír, de felmerült már az ötszögletű lapokhoz való kötődése is [5]. Az E3KF enzimatis (katalitikus) aktivitással nem bír. A három enzimaktivitással bíró alapalkotó alegység számos arányú megjelenését írták le (2. táblázat). A különbségek okai a faji eredetben és a komplexek (szubsztrátspecifikus) különbözőségében (valamint néhol sajnálatos mérési hibákban is) gyökerezhetnek. Erős bizonyosságot azonban csak az eddig meg nem született komplett komplex szerkezetmeghatározásoktól remélhetnénk.

Az alegységek között kialakuló kapcsolatok erősségük alapján elkülönülnek. Az E1-dimerek erősebben, míg az E3-dimerek gyengébben kötődnek a magokhoz [1, 6, 7]. Újjonnan publikált kísérleti eredmények azt is kimutatták, hogy például a hKGDHk esetén a hE3 csak hE1k jelenlétében vehet részt a komplexképzésben [8]. A perifériás alegységek kötésében elsősorban a magalkotó E2 alegységek kinyúló perifériás alegység-kötő doménje vesz részt [9-11], ám bizonyos esetekben a magdomén is fontos szerepet tölt be az E1 egység kötésében [8, 12]. A KSDHk-k szabályozásában a szubsztrátok hatásain túl a PDHk és az ELKDHk esetén szabályozó kináz (gátló) és foszfatáz (aktivátor) egységek is részt vesznek. Ezek szerepét és arányát a faji eredet és a katalizált specifikus reakciók egyszerre befolyásolják [1, 2, 9-11, 13, 14].

2. táblázat. A KSDHk-k felépítése

Komplex	Faj	Láncarány (E1:E2:E3)	Perifériás alegységek térbeli helyzete ^a	Referencia
α -ketosav- dehidrogenáz komplex	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	42 (E2)	-	[15]
PDHk	<i>Escherichia coli (E. coli, ec)</i>	24:24:12	E1: élek E3: lapok	[13, 16, 17]
	<i>Azotobacter vinelandii (av)</i>	24:24:12	E1: élek E3: lapok	[18]
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	48:60:12	E1: külső szféra E3: külső szféra	[19-22]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60:12:12 (E2:E3KF:E3)	E3: külső szféra, lapok	[23]
	<i>Bos taurus</i>	120:60:10-12 (E1[$\alpha_2\beta_2$]: E2:E3)	E1: élek E3: lapok	[24]
	<i>Bos taurus</i>	60:12:12 (E2:E3KF:E3)	E3: lapok	[25]
	<i>Bos taurus</i>	88:60:12:12 (E1[$\alpha_2\beta_2$]:E2: E3KF:E3)	E1: külső szféra E3: külső szféra	[26]
	<i>Bos taurus</i>	48:12 (E2:E3KF)	-	[3]
	<i>Homo sapiens (humán, h)</i>	120:60:12:12 (E1[$\alpha_2\beta_2$]:E2: E3KF:E3)	E1: külső szféra E3: külső szféra	[5, 13]
	<i>Homo sapiens</i>	160:40:20:40 (E1[$\alpha_2\beta_2$]:E2: E3KF:E3)	E1: külső szféra E3: külső szféra	[4]

KGDHk	<i>Escherichia coli</i>	12:24:12	E1: élek és lapok között E3: élek és lapok között	[13, 27-29]
	<i>Acetobacter xylinum</i>	12:12:12	-	[30]
	<i>Rattus norvegicus</i>	10:12:14	-	[31]
	<i>Bos taurus</i>	2:2:3	-	[32]
	<i>Bos taurus</i>	6:1:6	-	[33]
	Emlős	24:24:12	E1: élek E3: lapok	[34, 35]
	<i>Homo sapiens</i>	24:24:12	-	[13]
	<i>Bos taurus</i>	24 (E2)	E1: élek	[36]
	<i>Homo sapiens</i>	24 (E2)	E1: élek E3: lapok	[37]
	ELKDHk	<i>Bos taurus</i>	24 (E2)	E1: élek
<i>Homo sapiens</i>		24 (E2)	E1: élek E3: lapok	[37]

^aA térbeli pozíció a 24-merre (kocka), illetve a 60-merre (pentagonális dodekaéder) van vonatkoztatva.

Az enzimek sorszámuk sorrendjében egyre csökkenő szubsztrátspecifitást mutatnak [9, 10]. A specifitásban így elsőrangú felelősséggel bíró E1 alegység tiamin-difoszfát (*thiamine diphosphate*, ThDP) koenzime révén a szubsztrátot dekarboxilálja. A bekövetkező CO₂ felszabadulás teszi irreverzibilissé a teljes folyamatot. Így is kimutatható azonban némi átfedés a szubsztrátspecifitásban egyes alegységek esetében. Ugyan alacsonyabb preferencia szint mellett, de az E1p α -ketobutirátot [38], az E1k α -keto adipátot [39], az E1a α -ketoglutarátot [40], míg az E1e piruvátot [41] is képes dekarboxilálni. A folyamat során keletkező α -hidroxialkil-egység végül acilcsoportként kapcsolódik az E2 alegységhez kovalensen kötött lipoamidhoz (LA). Ez a folyamat vezet el végül az E1 enzim regenerációjához.

Az E2 alegység alacsonyabb specificitását a KGDH és KADH komplexek közösen használt E2k/a alegysége mutatja [40]. Az enzim kettős, transzporter és enzimátikus

funkcióval bír. A már fentebb leírt kötés által a nagy mozgékonyaságú N-terminális rész, mint gyöktranszporter működik. Az acilcsoport az enzim aktív centrumában KoA-ra helyeződik át. Ez a lipoamid dihidrolipoamiddá (DHLLA) történő redukcióját vonja maga után.

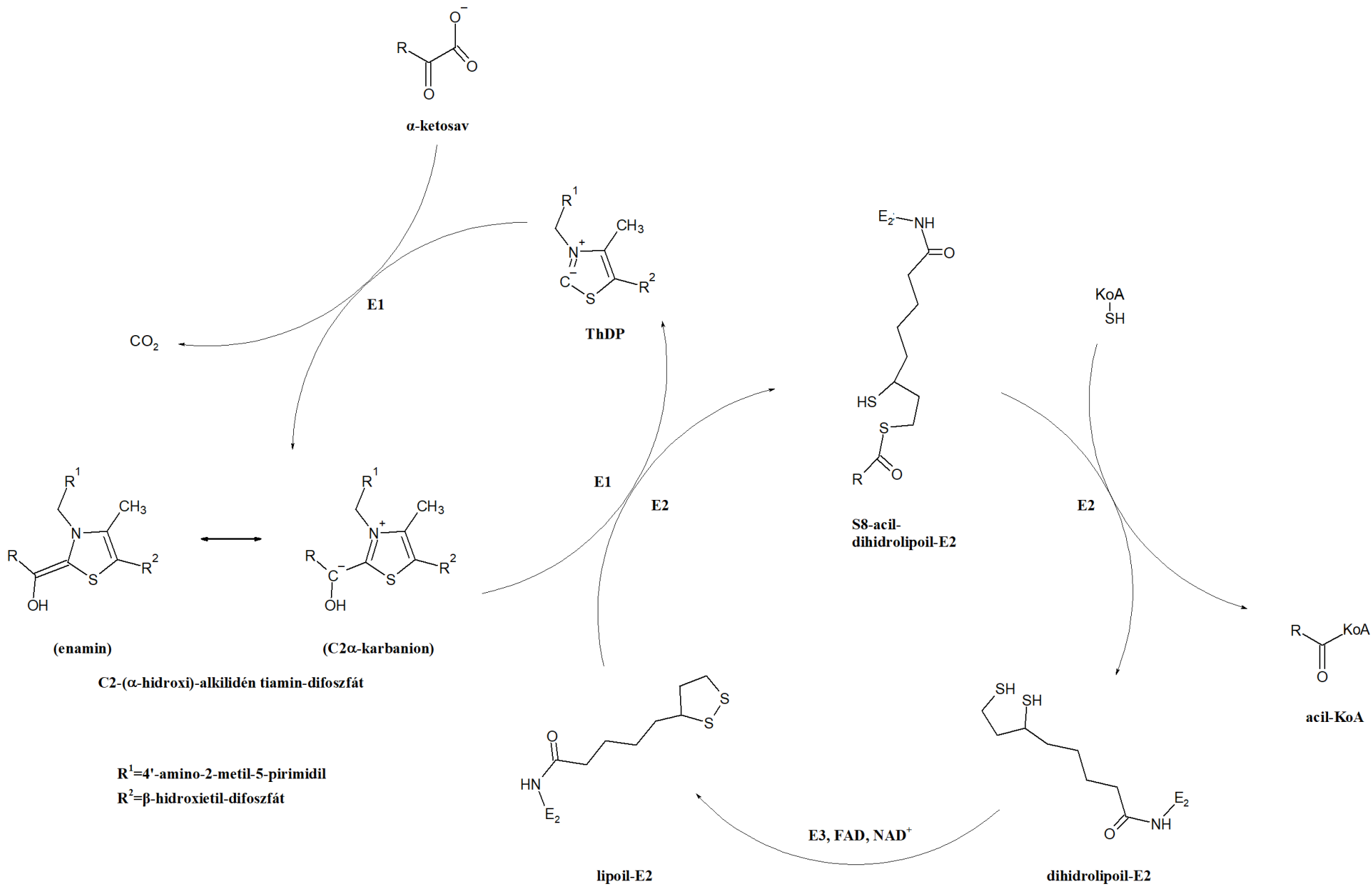
Az utóbbi regenerációját a minden komplexben azonos E3 enzim biztosítja. A DHLLA reoxidációja során az elektronok az E3 enzim redox-aktív cisztein aminosavain és a prosztetikus csoportként funkcionáló flavin-adenin-dinukleotidon (FAD) keresztül végső soron a NAD⁺ kosubsztrátra kerülnek [2, 42, 43]. Ez teszi végül teljessé a 3. ábrán felrajzolt folyamatot.

Az E3 alegység a KSDHk-*knál* megismerthez nagyon hasonló szerepet tölt be a glicinhasító rendszerben is. A négy enzimet felölelő „enzim-csoport” a fenti komplexekkel ellentétben nem alkot szoros konstruktot. A korábban leírtakkal analóg módon az itt L-fehérjeként azonosított enzim feladata a gyök szállításában fontos H-fehérje regenerációja.

1.2. A humán α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek patológiás szerepe

A metabolikus enzimdeficienciák az emberi betegségek egy egyre fokozódó figyelmet nyerő csoportját jelentik. A betegségek hátterében a sejtek metabolizmusában résztvevő enzimek szerzett vagy öröklött hiánya, illetve elégtelen működése áll. A hKSDHk-k sebességmeghatározó szerepükből, illetve a metabolizmus elágazási pontjaiban elfoglalt helyükből adódóan kerültek a vizsgálatok középpontjába [44]. Az öröklött deficienciák alapját az enzimek mutációi jelentik, melyek általában autoszomális és X kromoszómához kötődő recesszív módon jelentkezhetnek [44].

Patológiás állapotok a környezet változásából adódóan is bekövetkezhetnek. A mitokondriális mátrixban megjelenő acidózis, illetve emelkedett NADH/NAD⁺ arány elsősorban a közös hE3 alegység működését és a komplexhez való kapcsolódását befolyásolja [13, 35, 45, 46].



3. ábra. A KSDHk alegységek katalitikus szerepe

A hKSDHk-kat kitüntetetten fontos enzimaktivitásukon túl reaktív oxigénszármazék (*reactive oxygen species*, ROS) képző képességük is kiemeli. A fent megjelölt acidózis és emelkedett NADH/NAD⁺ arány mind kiváltói, mind pedig következményei lehetnek az KSDHk-k helytelen működésének. Az így keletkező szuperoxid-anionok (O₂^{•-}), valamint H₂O₂ molekulák komoly tényezőt jelentenek a mitokondriális oxidatív stressz kialakulásában [13, 45-54]. A legnagyobb ROS-képző kapacitása révén kiemelt figyelmet érdemlő hKGDHk [55] ilyen jellegű aktivitását kutatócsoportom vezetői mutatták ki elsőként [46].

A katalitikus funkcióvesztéssel megszakadó biokémiai reakciósorok, a felszaporodó metabolikus melléktermékek, valamint a ROS kiindulópontját jelentik számos betegségnek, illetve hozzájárulhatnak egyes betegségek súlyosbodásához. Ilyen értelemben érintettek például a neurodegeneratív kórképek (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kórok), a Friedreich-ataxia, az iszkémia-reperfúzió szindróma, a progresszív szupranukleáris parézis, hipoxia-, illetve glutamát-indukálta agykárosodások, a Wernicke-Korsakoff szindróma, a csecsemőkori laktát acidózis, különböző neoplasztikus elváltozások, a (sejt)öregedés és bizonyos ráktípusok [34, 46, 56-69].

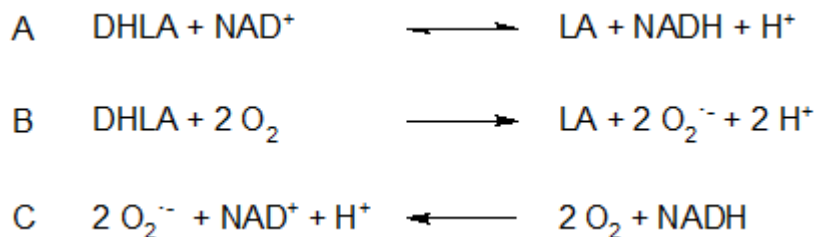
Az okok ismeretében jelenleg hétféle terápiás mód ismert. A komplex szubsztrátjának megvonása, a megmaradt enzimaktivitás fokozása (kofaktorok nagy mennyiségű adásával), a toxikus metabolitok blokkolása, a helytelenül működő enzim külső forrású pótlása, szervtranszplantáció, génterápia, valamint bizonyos releváns, kapcsolódó enzimműködések kikapcsolása mind segíthetnek [44]. Kutatócsoportunk elsődleges célja a komplexek szerkezetének megértésén keresztül modern farmakológiai módszerekkel az eredeti funkció legalább részleges visszaállítása.

1.2.1. Dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiencia és ROS-képzés

Az enzim alulműködése a számos komplexben betöltött dehidrogenáz funkció miatt súlyos következményeket von maga után (1. ábra). A hPDHk-hoz kötődően kárt szenved a glikolízis során keletkező piruvát citromsavciklusba lépése, melynek egyaránt következménye a laktát képződésével megjelenő szisztémás acidózis, valamint a NADH/NAD⁺ arány csökkenése által a glukoneogenezis gátlása. A hKGDHk esetén a citromsavciklus közvetlenül sérül, mely az energiametabolizmuson túl bizonyos felépítő és

lebontó folyamatokat is negatívan befolyásol. A hKADH és hELKDH komplexek aluműködése a különböző aminosavak felhalmozódásához vezet.

A hKSDHk-k deficienciája sokszor indirekt módon is képes oxidatív stresszt indukálni. Ezt mélyülő acidózis és további következményes oxidatív stressz követheti, amely végül klinikai tüneteket is okozhat. A komplexek általi direkt ROS-képzésért intakt komplexek esetén a hE3 alegység a felelős (4. ábra). Érdekes módon míg *in vitro* körülmények között elsősorban *reverz* irányban keletkeznek szabad gyökök [46], addig az *in situ* kísérletek a *forward* irányú ROS-képzést támasztják alá [47]. Ezen folyamatokban végső elektronakceptorként molekuláris oxigén lép fel [45, 70-72], mely a gyökképző elektronokat közvetlenül a FAD prosztetikus csoportról veszi át. Emellett azonban a hKGDHk esetén bizonyítottan, míg más komplexek esetén feltételezhetően az E1 alegység, illetve az E1 és E2 alegységek által alkotott alkomplesz is képes ROS-t termelni [13].



4. ábra. A hE3 normál funkciója és ROS-képzése. A. Az izolált hE3 alegységen végbemenő fiziológiás, illetve *reverz* irányú katalitikus reakciók. B. Elégtelen koncentrációjú NAD^+ jelenlétében (vagy teljes NAD^+ hiány esetén) végbemenő *forward* irányú ROS-képző E3-reakció. C. Emelkedett NADH/NAD^+ arány mellett lejátszódó *reverz* katalitikus irányú ROS-képző E3-reakció. A gyökösödő molekuláris oxigén DHLA-ról (*forward* irány) vagy NADH -ról (*reverz* irány) kap elektronokat.

A hE3 deficiencia autoszomális recesszív öröklésmenettel rendelkezik és legtöbbször az érett enzimtermék mutáns változatában manifesztálódik [73]. A leggyakoribb, az askenázi zsidó populáció minden 100. tagjánál legalább hordozottként kimutatható G194C szubsztitúción túl [73] 13 további patológiás változatot tart számon az irodalom [61, 73-87]. (A mutánsok konvencionálisan aminosavcseréik egybetűs kódjával vannak jelölve, a számozás minden esetben az érett fehérjére vonatkozik.) Ezek az enzimszerkezeti érintettség

szerint csoportosíthatóak, így beszélhetünk a kofaktor-kötő régiót, az aktív centrumot és ahhoz közeli területet, valamint a dimerizációs felszín érintő patológiás esetekről.

Az eddig vizsgált patogén mutánsok többnyire (a várakozásnak megfelelően) a *forward*, illetve *reverz* irányú aktivitások csökkenését, négy esetük pedig a ROS-képzés fokozódását is mutatta. A vizsgálatok azt is megmutatták, hogy ezen esetekben a szabadgyökképzést az enyhe acidózis fokozta. Az aktivitásvesztés potenciálisan a funkcionális homodimer szétesésével, a FAD prosztetikus csoport (részleges) elvesztésével, a szerkezeti stabilitás csökkenésével (*unfolding*/részleges denaturáció/gyorsabb *in vivo* lebomlás), strukturálisan/funkcionálisan meghatározó interakciók elvesztésével, illetve lokális konformációváltozásokkal magyarázható az irodalom szerint [54].

Kalibrált méretkizárásos kromatográfiával, illetve folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai analízissel (*nano-liquid chromatography mass spectrometry*, nano-LC-MS) megállapították, hogy még a dimerizációs felszínen megjelenő mutációk esetén sem a monomerizáció vezetett a fent említett specifikus aktivitások modulációjához. Számos esetben lehetett megfigyelni azonban a FAD részleges elvesztését (még olyan esetben is, amikor a ROS-képző képesség növekedése volt megfigyelhető). Cirkuláris dikroizmus (CD) spektropolarimetriai vizsgálatok pedig azt mutatták meg, hogy a patogén mutánsok harmadlagos szerkezete nem tér el számottevő mértékben a vadtypusétól. Ezek alapján egyértelmű, hogy a különbség a finomszerkezeti eltérésekben rejlik [54].

A szabadgyökképzések, valamint a metabolikus eltérések (laktát acidózis, hipoglikémia, hiperammonémia, stb.) súlyos neurológiai elváltozásokhoz (melyek skálája a letargiától egészen a fejlődési visszamaradásig terjed), sőt az egyén korai halálához vezethetnek [61, 73-75, 78-83, 88]. Az idegrendszeri tüneteken túl a szintén nagy energiaigényű egyéb szervek (mint a szív [78, 83] és a máj) betegségei is jelentkezhetnek [61, 73, 74, 84, 85, 89]. A deficiencia enyhébb formájának tekinthető az egyes mutánsok esetén jelentkező miopátia [86, 87].

1.2.2. α -ketosav-dehidrogenáz deficienciák és ROS-képzés

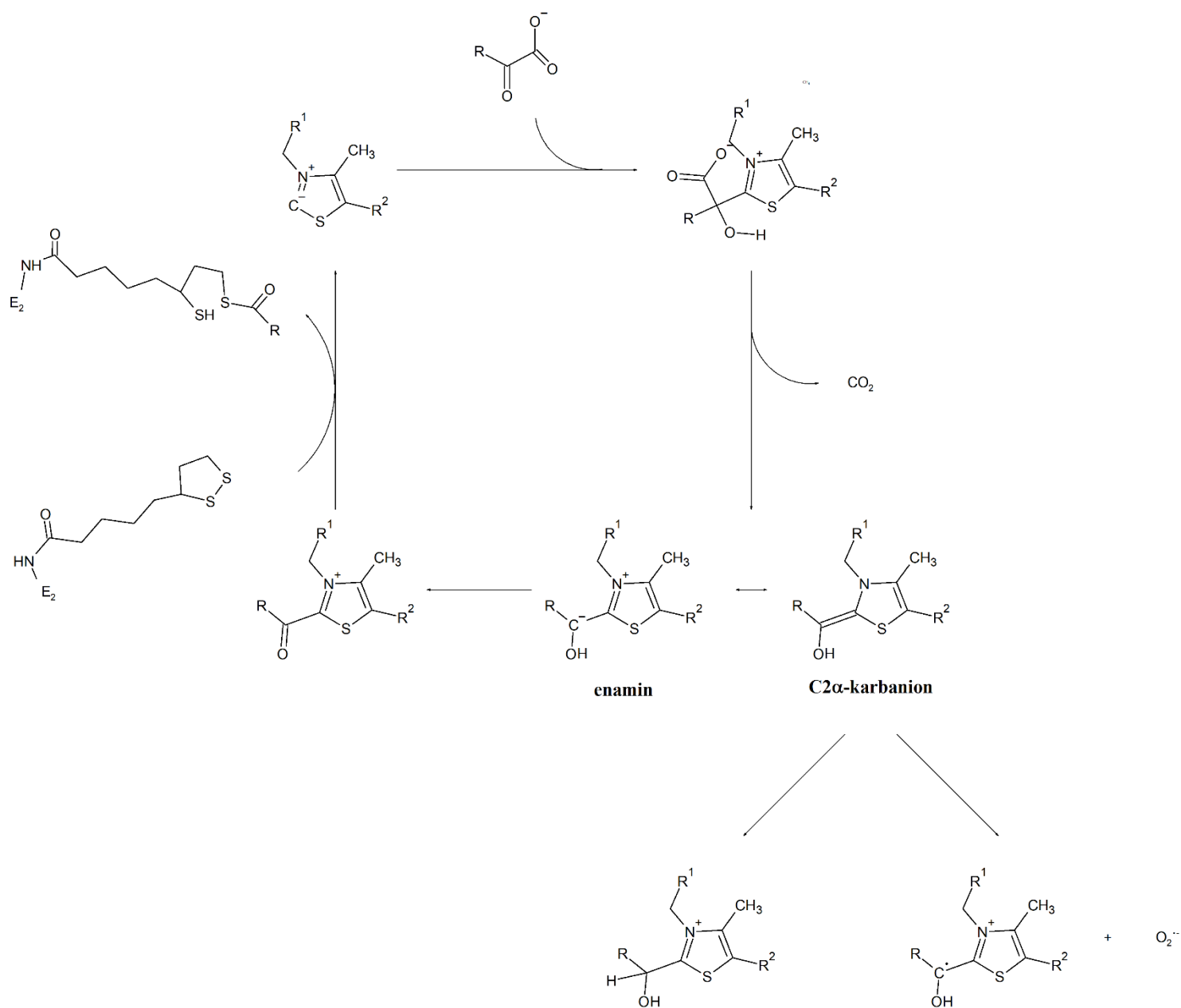
Témavezetőm elsőként mutatta ki, hogy a hKGDHk esetén az E3 mellett az E1-E2-alkomplex is részt vehet ROS-képzésben (acidózis vagy patogén mutáns hatására disszociál

hE3 esetén) [13]. Kérdés, hogy az általuk vizsgált hKGDHk-n és hPDHk-n túl más rokon komplexek (esetleg más körülmények között) részesei-e hasonló folyamatoknak. A ROS forrása azonban minden esetben viták tárgyát képezi, mivel mindkét alkotóenzim alkalmas kiindulópontnak tűnik. Kiindulási pont lehet az E1 alegységek koszubsztrátjaként működő ThDP, mely 2α -karbanion formája tud reakcióba lépni molekuláris oxigénnel (5. ábra) [90]. A mutációk talán az aktív centrum működésének vagy a koszubsztrát, illetve más komplexalkotók kötésének befolyásolásával indukálhatják a patogén folyamatokat.

A hE1k fehérje esetén is azonosítottak autoszomális recesszív öröklésmintát mutató deficienciát. Az alegység jelentőségéből adódóan (az enzimsaládban a komplexeken belül az E1 alegységek által katalizált reakciólépések a sebességmeghatározók) a mutációkat hordozó egyedek döntő többsége már magzatkorban elhal, így az irodalom mindösszesen kilenc ismert esetet ír le. A komplex károsodásából adódó izomgyengeség, fejlődési lemaradás, központi idegrendszeri problémák, köztük rohamok, valamint májmegnagyobbodás sorolhatók a tünetek közé. A laktát acidózist kezdetben alacsony, majd hipertóniába átcsapó vérnyomásállapot kíséri [91].

A szintén autoszomális recesszív öröklődésű alfa-aminoacidopát és alfa-ketoadipát acidúriák oka a hKADHk E1 alegységének genetikai hibája [92]. A metabolikus acidózis [93] mellett rohamokhoz [94-96], elhízáshoz [94], immundeficienciához [97], hipotóniához és motoros fejlődési lemaradáshoz [93, 98, 99], beszédzavarhoz [99, 100], visszatérő hányingerhez [101], légzéscsökkentéshez [101], fejfájáshoz és migrénhez [102], figyelemhiányos hiperaktivitáshoz [99], valamint diszmorf jelenségekhez [95, 99] kapcsolható betegség oka az enzim misszensz, nonszensz és egyéb típusú mutációiban keresendő.

A hPDHk E1 alegységéhez kötődő betegségcsoport különlegessége az enzim összetételében rejlik. A fenti komplexeknél megismert E1-homodimerrel ellentétben egy α - és β -alegységek által kialakított heterotetramer szerkezet teszi lehetővé két külön fehérje mutációinak jelenlétét [103]. Az egyik esetben X kromoszómához kötött (α -alegység), míg a másik részalegységnél autoszomálisan öröklődő (β -alegység) misszensz, nonszensz és egyéb típusú mutációkat írt le a szakirodalom [104, 105]. A betegeknél a mentális retardáció



5. ábra. A hE1k normál és (javasolt) ROS-képzési mechanizmusai. A katalitikus ciklus során az α -ketosav belépéséből származó karboxilcsoport CO_2 -ként távozik. Az így keletkező átmeneti komplex $\text{C2}\alpha$ -karbanion formája léphet reakcióba molekuláris oxigénnel. A ciklus szabályos záródása esetén az LA acilációja által a kosubsztrát regenerálódik. A reakciókban résztvevő molekulák a 3-4. ábráknak megfelelően vannak reprezentálva.

mellett kisfejtűség, mozgáskoordinációs zavarok, görcsök, rohamok, látási problémák, sőt bizonyos esetekben vakság is jelentkezik. A laktát acidózist esetükben alacsony vérnyomás kíséri [103, 104].

A hELKDHk alegységeihez kötődő hiánybetegségeket a vizeletben felgyülemelő és édes illatot adó elágazó szénláncú savak okán összefoglalóan juharszirup vizelet betegségnek nevezik. A hPDHk-nál leírthoz hasonló módon az E1 alegység itt is heterotetramerként jelenik meg. Misszensz és egyéb típusú mutációik öröklődnek autoszomálisán [106, 107]. Tüneteiként étkezési és légzési nehézségek, hasnyálmirigygyulladás, központi idegrendszeri görcsök, kontrollálatlan lábmozgás, általános izom rigiditás és opisthotonus jelentkezik. A kortikális atrófia és az agyi ödéma végül a betegek halálához vezet. Labordiagnosztikailag hipoglikémiát és hiperammonémiát írtak le [106].

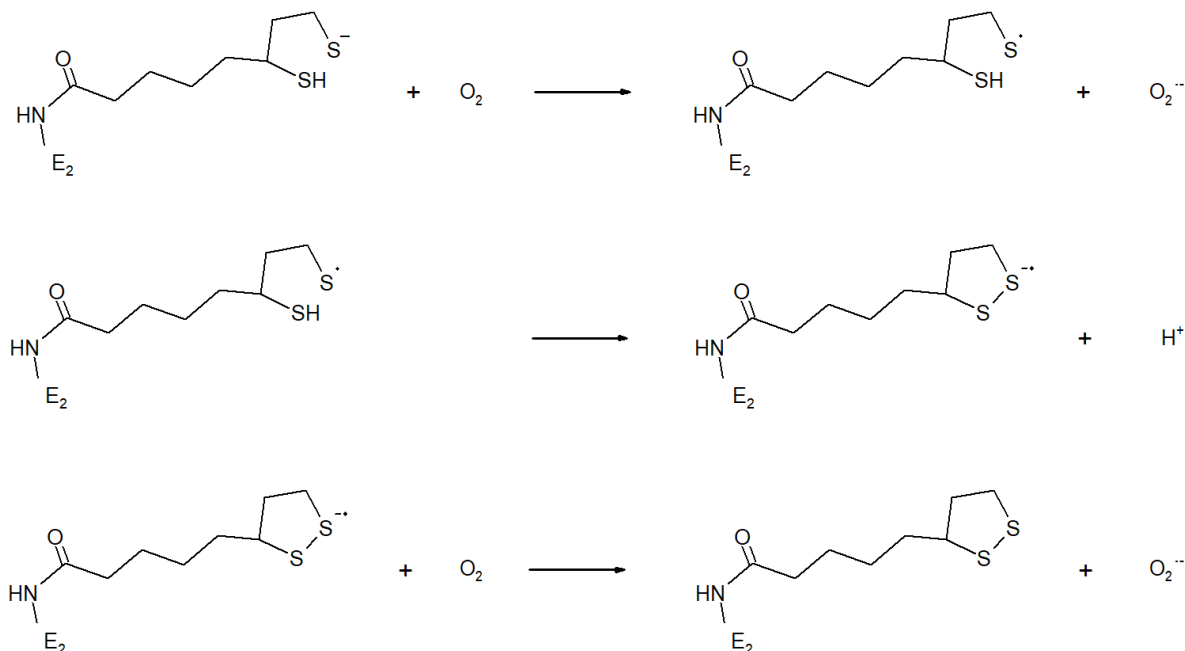
1.2.3. Dihidrolipoamid-aciltranszferáz deficienciák és ROS-képzés

A hE1k-hE2k-alkomplex által termelt ROS másik forrásaként a dihidrolipoamid-aciltranszferázok prosztetikus csoportjaként funkcionáló DHLA merült fel. Az utóbbi erős antioxidáns hatása ellenére bizonyos körülmények között prooxidánsként is fellép [35, 90, 108-110]. Ezen esetben a szubsztrátjától már megszabadult és parciálisan deprotonált DHLA *forward* irányban, egy kétlépéses reakcióban képezhet $O_2^{\cdot-}$ -t molekuláris oxigénnel (4. és 6. ábrák) [13, 45, 76, 111].

α -ketosav-dehidrogenáz párjához (hE1k alegység) hasonlóan a hE2k deficiencia is elsősorban a komplex működésének károsodásához, semmint az izolált enzim működési zavaraihoz kötődik. A szakirodalom igen kevés autoszomális öröklődésű misszensz mutációt ír le, melyek közül egy mutáns okozza a hE1k esetén már leírt tünetegyüttest [91, 112].

A hPDHk E2 alegységéhez kötődő deficiencia szintén számos hasonlóságot mutat a hE1p alegységnél leírtakkal. A betegség elsősorban neurológiai tünetekként jelentkezik (szemtekerezgés, ataxia, koordinációs problémák, végtagok gyengeségei), melyek végül tolokocsiba kényszerítik az érintetteket [113]. Eleddig csak autoszomális öröklésű misszensz mutációt írtak le [113, 114].

A hE2e autoszomális öröklésű deficienciája is elsősorban a hELKDHk-n keresztül érvényesül. Az eddig megismert mutánsok között találhatóak misszensz, nonszensz és egyéb változatok is [107], melyek a juharszirup vizelet betegség tüneteit mutatják [106].



6. ábra. A hE2k javasolt ROS-képzési mechanizmusa. A már parciálisan deprotonált DHLA először egyik, majd pedig tovább deprotonálódva második elektronját is molekuláris oxigénre juttatja.

1.3. Térszerkezet-vizsgálati módszerek

A betegségek kezeléséhez elengedhetetlen a mutánsok esetén fellépő patológiás állapotok molekuláris hátterének megismerése. A „térszerkezet és funkció egysége” elvnek megfelelően ez csak a természetes és mutáns formák térszerkezeteinek megértésével és összevetésével érhető el [115].

A több száz vagy akár ezer aminosavból felépülő fehérjék mérete átlagosan néhány nm-től 1 μm-ig terjedhet. Ezen szubmikroszkópikus mérettartományban szórási és diffrakciós jelenségek alapján, illetve spektroszkópai módszerekkel kaphatunk szerkezeti információkat [115]. Az atomi szintű felbontás jelenleg három módszer segítségével lehetséges.

1.3.1. Röntgenkristallográfia

A térszerkezeti adatbankban (*Protein Data Bank*, PDB) tárolt több mint 160 ezer fehérjeszerkezet közel 90%-a fehérjekristallográfiai munka eredménye (forrás: rcsb.org/stats). Ez jól mutatja a technika alapvető fontosságát.

Az egykristályos röntgendiffrakció alapja a röntgensugárzás szabályos, rendezett távolságban lévő rácspontokról való diffrakciója. A kristályban periodikusan ismétlődő molekulák atomjairól szórt sugárzás bizonyos irányokban nagymértékű erősítést mutat. A kis távolságban lévő rácssíkokról szóródó reflexiókat összegezve, az intenzitás adatok alapján felállítható egy térszerkezeti térkép. Az elektronokról való szóródás okán elektronsűrűségi térképként megjelenő 3D-s képletbe a szekvencia ismeretében beépíthető a teljes fehérje. Így végső soron térszerkezete tárul elénk. A fentieknek megfelelően a technika alapja a néhány tízed mm-es egykristály létrehozása. Az azonos távolságokkal való szabályos betagozódás feltétele a natív állapot viszonylag állandó konformációja, mely másodlagos kölcsönhatásokkal stabilizálódik. A 30-70 (v/v)%-ban vizet magába záró képletek képzésére elsősorban globuláris fehérjék képesek. A mozgékony régiók azonban nem, vagy csak a natívtól eltérő állapotban stabilizálhatóak [116].

Ezen szűkítő körülmények ellenére is az információgazdagság szempontjából legjobb technikáról beszélünk, így tudósok tízezrei dolgoznak manapság is fehérje egykristályok létrehozásán. A kristályosítás során a cél egy olyan metastabil oldatkörülmeny kialakítása, melyben a fehérjeegységek szabályos, lassú folyamat során tagozódnak be a kristályrácsba. Ehhez elengedhetetlen egy kezdeti labilis állapot elérése, mely gócképződéssel teszi lehetővé a későbbi kristálynövekedést. Ebbe a stádiumba azonban fehérjeoldatunkat el kell juttatnunk, melyre számos technika áll rendelkezésre [116].

A részletes kifejtést elkerülendő a laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott gőzdiffúziós ülőcsepp módszert írom le. A zárt térben nyitott platformra helyezett fehérjeoldat a gőztéren keresztül érintkezik a vele egyensúlyba kerülő kristályosító szer oldatával. A fehérje- és kristályosító oldatok általában 1:1 arányú elegyként megszülető csepp (melynek térfogata néhány százaléka a kristályosító szer oldatának) lassú töményedéssel éri el a labilis, majd pedig a metastabil állapotot. A kristályosodás természetesen nagyban függ az oldatok összetételétől, koncentrációjától, kémhatásától és

hőmérsékletétől. Ezen optimális paraméterek megtalálása azonban még manapság is próbálgatáson alapul. Természetesen jó kiindulópontot jelent a még alacsonyabb minőségű kristályokat tartalmazó körülmények, valamint más hasonló szerkezetű fehérjék esetén sikeresnek bizonyult oldatok optimalizálása [116].

1.3.2. NMR-spektroszkópia

A magmágneses rezonancia (*nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroszkópia főleg a páratlan rendszámú vagy tömegszámú izotópok atomjainak mágneses tulajdonságán alapul. A parányi rúd-mágnesek a külső mágneses tér hatására két orientációt vehetnek fel. A rádiófrekvenciás besugárzás hatására a magspinek az alacsonyabb energiájú állapotból a magasabba kerülnek. Ennek megszűnése után az eredeti állapotba visszatérve a mágnesvektorok összegzésével kapott elemi mágnes egy tekercsben az adott atomokra jellemző frekvenciájú jelet produkál. A kiváltott jel erősen függ a kémiai, illetve térbeli kapcsolatuktól, így a fehérjéket alkotó azonos típusú atomok környezetüknek megfelelően eltérő jelet produkálnak [117].

Az NMR-kísérletnek természetesen feltétele a mágneses, páratlan rendszámú vagy tömegszámú izotópok jelenléte, melyek előfordulási gyakorisága eltérő. A közel 100%-os előfordulású ^1H -hoz képest a szintén aktív ^{13}C izotóp körülbelül, míg a ^{15}N izotóp csak kevesebb mint 1%-os gyakoriságú. Így az utóbbi kettő fehérjékbe való beépülése az izotópszelektív forráson alapul, mely jelentősen növeli az előállítás költségeit [117].

A lokális, illetve globális térszerkezet-meghatározás alapja a mágnesezettség-átvitel. Ez a szomszédos spinek esetében a külső mágneses teret erősítő vagy gyengítő hatáson alapul. Az egymástól általában három kovalens kötésnél nem távolabb lévő vagy a térben ~ 5 Å távolságon belül elhelyezkedő magok között mágnesezettség-átvitel valósulhat meg. Ezek ismerete jelenti alapját az aminosavak szekvencián belüli azonosításának, illetve egymáshoz viszonyított térbeli helyzetük meghatározásának [117].

A jelszolgáltató atomok számának növekedése (különösen jelfelhasadások esetén) az elemzésül szolgáló spektrumot nagyon sűrűvé teszi. A méretnövekedés ráadásul a jelek kiszélesedését is eredményezi, így kialakult egy mérethatár. A nagyobb térerővel növelhető

érzékenység és spektrumfeloldás mellett is tipikusan 10-30 kDa (esetleg 50 kDa) jelenti az NMR-spektroszkópiával meghatározható felső molekulatömeg határt [117].

Emellett is azonban nagy előnyt jelent az oldatfázisban való vizsgálhatóság, mely a dinamikus kísérletekkel komoly motivációt jelent ilyen irányú mérésekre [117].

1.3.3. Krio-elektronmikroszkópia

A krio-elektronmikroszkópia (krio-EM) a harmadik, jelenleg leggyorsabban fejlődő szerkezetmeghatározási módszer. Az izzó katódról az anód irányába kilépő elektronok egy a folyékony nitrogén hőmérsékletén tartott mintán áthaladva transzmissziós képet adnak. Az etánban gyorsfagyasztott oldatban az elektronok a fehérjékkel eltérő orientációkban találkoznak, így a képek is eltérő orientációkat mutatnak be. Kellően nagy partikulumszám esetén nagyszámú orientáció, tehát gyakorlatilag a részecske minden oldalú képe megjelenik. Az egy-egy orientációhoz tartozó több tízezer kép átlaga által kiadott orientációs vetületekből felállítható a részecske 3D szerkezete [118].

A röntgenkristallográfiával összevetve több ponton hasonló, más szempontból azonban eltéréseket mutató technika született. Az NMR-spektroszkópia számára jól látható nagy flexibilitású részek (számos orientációjuk okán) így sem láthatók, ám az ott leírtakhoz hasonlóan natív szerkezet vázolható fel. Halvány eltérést jelent a röntgen fotonok és az elektronok között fennálló elektrosztatikus különbség. Ez a negatívan töltött részek láthatóságát befolyásolja. Hátrányként jelentkezik a detektorok ma még meglévő relatív fejletlensége, mely így alacsonyabb felbontást biztosít. Egyértelmű előny azonban a kristályosítás lépésének kiesése, mely rendkívüli mértékben gyorsítja meg a szerkezetek megismerését. Ez ráadásul kifejezetten előnyös lehet komplexek esetén, melyeknél egyszerre több részecske, illetve a konjugátumok között kialakuló kapcsolatok stabilitása kell fennálljon.

A fentiek hatására évről évre nő a krio-EM-mel meghatározott szerkezetek száma (3. táblázat).

3. táblázat. A krio-EM és a röntgenkristallográfia segítségével meghatározott fehérjeszerkezetek száma (forrás: rcsb.org/stats)

Év	2017	2018	2019	2020	2021
Krio-EM	564	885	1452	2388	2952
Röntgenkristallográfia	10073	9862	9643	11205	9259

1.4. Kismolekulás szintézisek

A térszerkezet-vizsgálatokon túl más technikák is érdekesek lehetnek a patológiás mutánsok szerkezet-funkció vizsgálatait tekintetében. A kismolekulák a korábban felsorolt kezelési módok szempontjából is jelentőséggel bírnak.

1.4.1. Izoliponsav

Nyilvánvaló összefüggés mutatható ki a hKGDHk-hoz kapcsolódó ROS-képzés, illetve bizonyos patológiás állapotok között (lásd fentebb). Kutatócsoportunk tagjai kimutatták a szabad liponsavnak (LS) a hKGDHk, illetve hE3 általi ROS-képzésre gyakorolt gátló hatását [45]. Ez az enzimatis mellékreakció és gátlás mindkét katalitikus irányban kimutatható, de eltérő mechanizmus a működés feltétele. Az LS a *reverz* katalitikus irányban, mint az oxigénnél jobb elektronakceptor képes megakadályozni a gyökök képződését, de igazán hatékonyan csak alacsony pH-n (acidózisban, KGDHk és E3 esetében is). A *forward* katalitikus irányú folyamatban pedig az E2 alegység aktív centrumának elfoglalásával akadályozza meg az enzimatis és gyökképző folyamatokat egyaránt [45].

Ezen tények kézenfekvővé tennék a molekula potenciális gyógyászati felhasználását, melyben azonban problémát jelent az alacsony hatékonyság (a ~70-80%-os gátlás kiváltásához minimum 2 mM koncentráció szükséges) és az aspecificitása. Gyógyszerészi szempontból megvizsgálva ez rögtön felveti a molekula módosított változatainak esetleges alkalmazását. Az ismert módosulatok és derivatívumok közül [119] legkézenfekvőbb potenciális megoldásnak a molekula izomer változata, azaz az izoliponsav (ILS) adódik.

1.4.2. FAD

Jelentős kapcsolat mutatható ki a hE3 fehérje FAD-tartalma és specifikus aktivitása között [120]. Az enzim vadtypustól eltérő mutáns változatai esetén bizonyos esetekben leírtak eltérő affinitású FAD-kötődéseket.

A fentiek kapcsán a FAD redoxpotenciáljában esetlegesen fellépő változások mindenképp kapcsolatban kell álljanak az izoalloxazin gyűrű [72], illetve esetlegesen más molekularészek térszerkezet-torzulásaival is. Ennek kiváló vizsgálati módszere lehet a mágnesesen aktív molekula jelmintázatában bekövetkező változások dinamikus követését is lehetővé tevő NMR-spektroszkópia. Ezen technika alkalmazásának alapfeltétele azonban az alkalmazandó prosztetikus csoport részleges vagy teljes izotópjelölése, melyhez a magas költségek okán a leghatékonyabb előállítási módot kell kidolgozni.

2. Célkitűzések

Kutatócsoportunk elsődleges célja a hKSDHk-khoz kötődő patológiás állapotok szerkezetalapú magyarázata.

Ennek megfelelően én a komplexek, kiemelten a hKGDHk térszerkezet-vizsgálatait tűztem ki magam elé. Fokozott figyelmet fordítottam a hKGDHk alegységeire, beleértve a szerkezetek felderítését, modellek építését, valamint ezek analízisét.

Céljaimat így az alábbi pontokban foglaltam össze.

1. A hKGDHk vad típusú alegységeinek előállítása. Ehhez ki kellett dolgoznom a tisztításhoz szükséges általános, illetve az alkalmazni kívánt szerkezetmeghatározási módszerekhez igazodó egyedi protokollokat.
2. Az alegységek tiszta mintáinak birtokában szerkezetmeghatározások. Ehhez a röntgenkristallográfia, az NMR-spektroszkópia és a krio-EM módszereket kívántam alkalmazni.
3. Az alegységek betegséget okozó mutáns változatainak előállítása. Ehhez pontmutációval mutánsokat kódoló plazmidokat kellett létrehoznom.
4. Az alegységek szempontjából releváns kismolekulák vizsgálata. Ehhez a koenzimként funkcionáló molekulák szintézisei kínáltak lehetőséget.

3. Módszerek

3.1. Vegyszerek

Külön jelölés hiányában molekuláris biológiai tisztaságú vegyszereinket a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

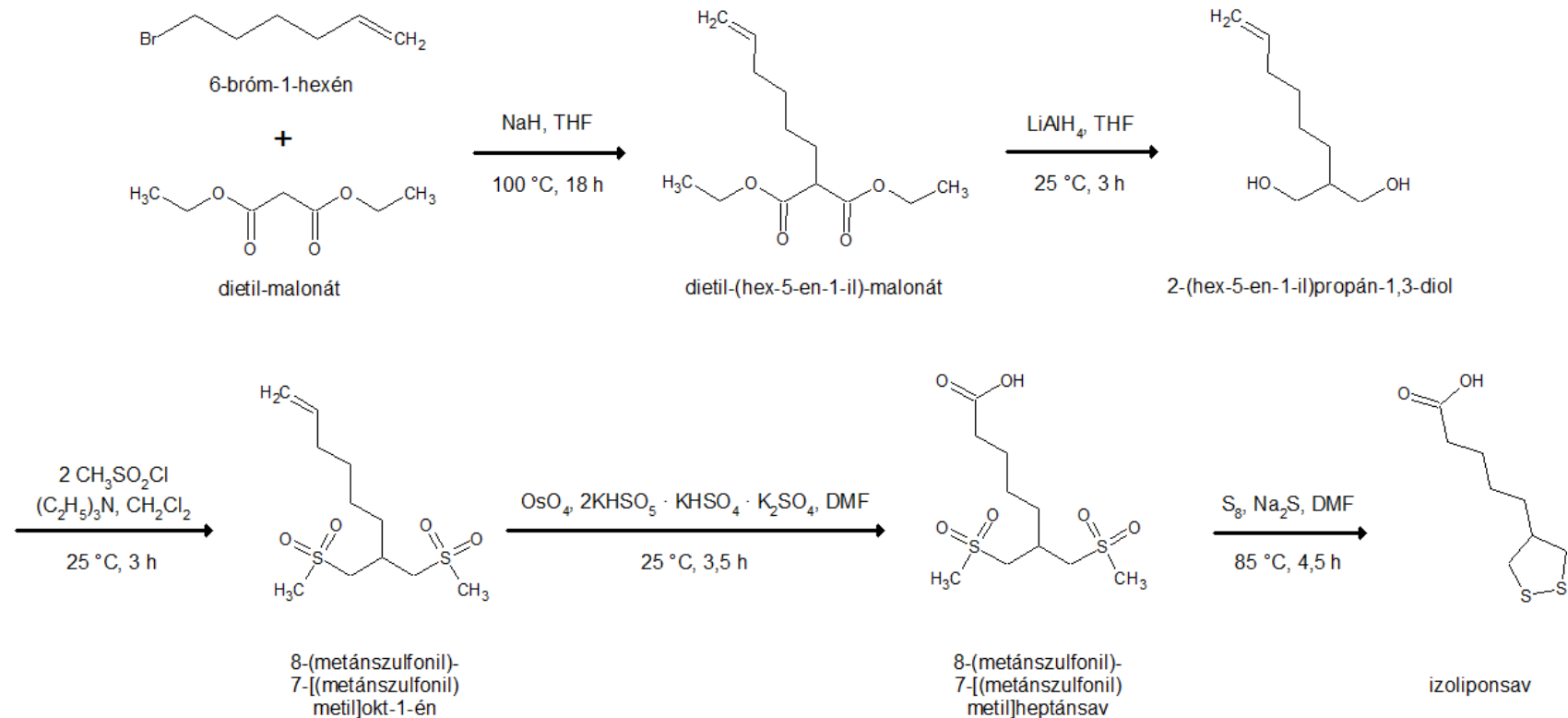
3.2. Az izoliponsav előállítása

Legjobb előállítási módnak a Joly és munkatársai által kidolgozott szintetikus út kínálkozott [121]. Ennek lépéseit a 7. ábra mutatja be.

Az alapanyagok és vegyszerek általános forrása alól kivételt jelentettek a Tokyo Chemical Industry (Tokió, Japán) által biztosított 6-bróm-1-hexén, illetve az Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) által fogalmazott kálium-peroximonoszulfát.

A munka Dr. Mirzahosseini Arash, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet adjunktusa vezetésével, az intézetük által biztosított laboratóriumban történt együttműködésben.

A céljainknak és eszközkészletünknek jobban megfelelő módon az eredeti (közölt recept szerinti) anyagmennyiségek megközelítőleg 25%-ával dolgoztunk.



7. ábra. Az izoliponsav szintézise (tetrahydrofurán, THF; dimetilformamid, DMF)

3.3. Pontmutációs konstruktok létrehozása

Az előállítás két egymástól jól elkülönülő projekt keretein belül, két eltérő technikával történt.

3.3.1. hKGDHk

3.3.1.1. Vad típusú fehérjéket kódoló plazmidok

A hKGDHk minden alegységének expressziójához az ATUM cég (Newark, CA, USA) által előállított (géninszertet is tartalmazó) pET52b(+) típusú plazmid vektort (alapplazmid: Novagen, Madison, WI, USA) használtuk. Az *E. coli* BL21(DE3) baktériumtörzsében (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) megvalósuló expresszióra (kodon)optimalizált, mitokondriális szignál szekvenciájától megfosztott géneket ezen plazmidba integrálva juttattuk tehát be a gazdasejtbe. A T7 promóterrel rendelkező konstrukta a kódoló génszakaszon túl számos a fehérjék előállításához és alkalmazhatóságához elengedhetetlen szakaszt is tartalmazott. A sejtek szelekcióját a β -laktamáz gén, míg a képződő fehérjék könnyű megtisztíthatóságát a gén N- és/vagy C-terminálisán elhelyezett *Strep* affinitás címkék egy vagy két kópiás változata biztosította.

3.3.1.2. *In vitro* helyspecifikus mutagenézis

A mutáns változatokat kódoló hE3 plazmidok a vad típusú szekvencián végrehajtott pontmutálással jöttek létre. Az ehhez szükséges rövid oligonukleotidokat az online elérhető, QuikChange Primer Design programmal terveztük meg. A QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) leírását követve 15 termociklust (Master Cycle Personal, Eppendorf, Hamburg, Németország) alkalmaztunk a Sigma-Aldrich-től rendelt (HPLC-tisztított) rövid oligonukleotidokban rögzített mutánsokat kódoló plazmidok felszaporítására. A vad típusú változat eltávolítását a Dpn I enzimmal történő 1 órás inkubációval (37 °C) értük el.

3.3.1.3. Plazmidok felszaporítása és izolálása

A plazmidokat egy 30 másodperc időtartamú, 42 °C-os hősokk és az azt követő 2 perces jégretétel kombinációjával juttattuk be a (sokszorosításukra alkalmas) TOP10 típusú

E. coli sejtekbe (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A 100 µl SOC-ban (*super optimal broth with catabolite repression*; katabolit represszió alatt működő szuperoptimális táptalaj) történő 1 órás, 37 °C-os rázatásos inkubáció után a transzformált sejtek negatív szelekcióját a 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú Luria-Bertani(LB)-agar táptalaj biztosította. A 16 órás, 37 °C-os inkubációt követően izolált 1-1 jól elkülöníthető telep adta alapját a 15 ml-nyi, azonos ampicillin tartalmú LB-kultúrának. Az ilyen módon felszaporított sejtekből a QIAprep Spin Miniprep csomag (Qiagen, Hilden, Németország) használatával szabadítottuk fel a plazmidokat. A protokollt a megnövekedett mennyiségnek megfelelően módosítottuk.

A kultúra kettéosztásával létrehozott párhuzamosokból a baktériumsejteket centrifugálással (5 min, 8000g, 25 °C) izoláltuk. Az 500-500 µl RNáz-tartalmú P1 pufferrel (10 mM etilén-diamin-tetraecetsav – *ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA, 50 mM Tris, pH=8,0, 100 µg/ml RNáz A) reszuszpendált mintákat előbb 500-500 µl, alkalikus körülményeket biztosító P2 lízispufferrel (200 mM NaOH, 1 (w/v)% SDS; 4 perc állás), majd pedig 700-700 µl neutralizáló N3 pufferrel (titkos összetétel) kezeltük. A genomiális DNS és fehérjék kicsapódása mellett oldatfázisban maradt plazmidokat centrifugálással (10 min, 16000g, 25 °C) különítettük el, melyeket a QIAprep 2.0 spin-oszlopon kötöttünk meg. Ezeket előbb az oldószerkomponensektől, majd pedig az 500-500 µl PB puffertől (endonukleáz mentesítő; titkos összetétel) és a 750-750 µl PE puffertől (sómentesítő; titkos összetétel) ismételt centrifugálásokkal (40 s, 16000g, 25 °C) választottuk el. Az oldatfázist végül 50-50 µl RNáz- és DNáz-mentes elúciós pufferrel centrifugálva állítottuk vissza. A minta plazmid tartalmát egy NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, München, Németország) duplaszálú DNS-re specifikált spektrofotometriás mérési protokollal határoztuk meg.

Mivel a szekvenciaanalízisre kiválasztott LGC Genomics (Berlin, Németország) által meghatározott minimális koncentrációértékek ezen módszerrel nem voltak elérhetőek, munkánkat méretnöveléssel kellett folytatnunk. Ehhez immáron már rutinszerűen a QIAprep Spin Midiprep csomagját (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk.

Az előbbieken leírthoz képest e folyamat során az azonos módon izolált telepeket 200 ml-es kultúrában növesztettük, mely tartalmát 50 ml-es mérőcsövekbe centrifugálva nyertük ki. A 8-8 ml P1 pufferben reszuszpendált sejteket 8-8 ml P2, majd pedig 8-8 ml P3 neutralizáló (3 M kálium-acetát, pH=5,5) oldattal kezeltük. A nagy mennyiségű csapadékot

tartalmazó oldatot szűrőoszlopon átnyomva helyeztük a QBT oldattal (750 mM NaCl, 50 mM 4-morfolin-propánszulfonsav – MOPS, pH=7, 15 (v/v)% izopropanol, 0,15 (v/v)% Triton X-100) ekvilibrált tisztító oszlopra. A még meglévő szennyezőket 20-20 ml QC pufferes (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH=7, 15 (v/v)% izopropanol) mosással távolítottuk el. Az oszlopról alkalikus QF pufferrel (1,25 M NaCl, 50 mM Tris, pH=8,5, 15 (v/v)% izopropanol) eluált minták DNS tartalmát tiszta 3,5-3,5 ml izopropanollal csaptuk ki, melyet egy szűrővel választottunk el. A 2-szer 2 ml 70%-os etanos tisztítómosás után a plazmidokat DNáz- és RNáz-mentes víz 800-800 µl-ével nyertük ki. Az így nyert minimum 100 ng/µl feletti koncentrációjú oldatok már alkalmasak voltak szekvenenciaanalízisre.

3.3.1.4. Szekvenenciaanalízis

Az LGC által megállapított nukleotidsort fehérjeszekvenciára fordítva (Translate Tool, Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Svájc), és a vad típusnak megfelelővel összevetve (BLAST online program) azonosítottuk a mutációkat.

3.3.2. hKADHk

3.3.2.1. Vad típusú fehérjét kódoló plazmidok

A hE1a egy más típusú plazmid vektorba lett integrálva. A szintén az ATUM által biztosított pET22b(+) típusú plazmidokban lévő géninszert ugyancsak az *E. coli* BL21(DE3) baktérium törzsben megvalósuló expresszióra volt (kodon)optimalizálva. A hKGDHk esetében leírtakkal ellentétben a fehérje megtisztíthatóságát itt a C-terminálison megtalálható hexahisztidin affinitás címke biztosította.

3.3.2.2. *In vitro* helyspecifikus mutagenézis

A hKGDHk-nál leírtakhoz nagyon hasonló módon jártunk el. Jelentős különbséget csak a felhasznált rövid oligonukleotidok eredete (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA; kisózott) jelentett.

3.3.2.3. Plazmidok felszaporítása és izolálása

A plazmidokat (sokszorosításukra alkalmas) XL10-Gold típusú *E. coli* sejtekben (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) szaporítottuk fel. A 45-45 µl ultrakompetens sejteket, illetve 2-2 µl β-merkaptotetanolt tartalmazó elegyet a 2-2 µl mutánst kódoló plazmid hozzáadása után félóráig jégen, majd 30 másodpercig 42 °C-on és végül 2 percig újra jégen tartottuk. A 0,5-0,5 ml NZY+ médium hozzáadás után 1 óráig 37 °C-on rázatott sejtelegeket 3 módon (150 µl médium és 5 µl kultúra; 100 µl médium és 50 µl kultúra; 250 µl kultúra) szélesztettük. A negatív szelekciót az agar gélek 0,05 mg/ml-es ampicillin tartalma biztosította. A kinyert telepeket mutánsenként 5 db, 10 ml térfogatú, a géllal azonos ampicillin tartalmú LB-tápcoldatban növesztettük fel. A plazmidokat a Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) módosított protokolljának megfelelően izoláltuk. A centrifugálással (5 min, 8000g, 25 °C) kinyert sejteket 500-500 µl RNáz-tartalmú oldattal (10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH=7,5, 100 µg/ml RNáz A) reszuszpendáltuk, melyekhez 400-400 µl alkalikus lízispuffert (0,2 M NaOH, 1 (w/v)% SDS; 3 perc sejteltérés), majd pedig 800-800 µl neutralizáló oldatot (1,32 M kálium-acetát, pH=4,8) adtunk. A 10 perc állás után 15 perc centrifugálással nyert szupernatánsokat a kit által biztosított oszlopokon, vákuum segítségével szívtuk át. A mintákat 2-2 ml 4,2 M guanidin-HCl 40%-os izopropanolos oldatával (30 ml 7 M guanidin-HCl oldat és 20 ml izopropanol elegye), majd pedig 2-2 ml 55 (v/v)%-os etanoltartalmú mosópufferrel tisztítottuk. A plazmidokat végül 50-50 µl elősterilezett MilliQ vízbe (Merck, Kenilworth, NJ, USA) centrifugálással nyertük ki.

3.3.2.4. Szekvencaanalízis

A Rutgers Egyetem (Rutgers University, Newark, NJ, USA) magánlaboratóriuma által megállapított szekvenciát a hKGDHk esetén leírtakkal azonos módon ellenőriztük.

3.4. Rekombináns fehérjeexpresszió és -tisztítás

A Pontmutációs konstruktok létrehozása című fejezetben leírtakhoz hasonló módon a tiszta fehérje minták előállítása is két, egymástól jól elkülönülő módszerrel történt meg.

3.4.1. *Strep* affinitás címkével rendelkező fehérjekonstruktok

3.4.1.1. Fehérjeexpresszió

A laboratóriumunkban folyó fehérjetisztítások alapját a pET52b(+) típusú plazmid vektorok és az *E. coli* BL21(DE3) baktériumtörzs által megszabott keretrendszer jelenti [120]. A hKGDHk minden alegységét, valamint a harmadik alegység mutáns változatait is ezen rendszerrel tisztítottuk meg, immáron rutinszerűen. A humán dimerizációs domén nélküli (deletált) dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hdE3) megtisztítása is ezen protokollon alapult.

A plazmidok sejtekbe való bejuttatása, illetve a telepek képzése a 3.3.1.3. Plazmidok felszaporítása és izolálása című fejezetben tárgyalta hoz hasonló módon valósult meg. Eltérést jelentett azonban a kompetens sejt-ként alkalmazott BL21(DE3) baktériumtörzs, melynek izolált telepei adták az alapját a 100 ml-es („éjszakai”) sejt-kultúráknak. Ezek 16 órás, 37 °C-os rázatásos inkubációjával keletkező sejt-suszpenzióját hétfelé osztva inokuláltuk a 700 ml-es tápoldatokat. Az LB-alapú oldatok negatív szelekcióját e lépések során is a 0,1 mg/ml ampicillin tartalom biztosította. A fotométerrel követett optikai denzitás (OD) 0,5-ös értékének elérésekor a fehérjeexpressziót 1 mM végkoncentrációjú, a *lac* operont aktiváló izopropil-β-D-1-tiogalakto-piranozid (IPTG; VWR, Radnor, PA, USA) hozzáadásával biztosítottuk [120].

A hE1k, illetve hE2k alegységek megfelelő hajtogatódása e ponton 2 mM MgCl₂ és 0,5 mM ThDP, illetve 0,3 mM LS jelenlétét is igényelte.

Az alapprotokollunk szerint a 3 órán keresztül, 25 °C-on folyó expressziót a sejtek centrifugálással (15 min, 7500g, 4 °C) történő összegyűjtése követte [120]. Ezen expressziós körülmények a hE1k és a hE2k fehérjék esetén a kísérleteknek és a végső protokollnak megfelelően eltérést mutattak. (A megfelelő paramétereket a 4.3. A hKGDHk természetes és módosított alegységeinek expressziója és tisztítása című fejezetben foglaltam össze.)

3.4.1.2. Sejt-feltárás és előtisztítás

A -20 °C-on tárolt sejteket 120 ml B-PER lízispufferben (Thermo Fisher Scientific) feloldott 24 mg lizozim jelenlétében, Potter-homogenizátor segítségével tártuk fel. A kiszabaduló proteázok semlegesítését 1,2 ml EDTA-mentes Halt proteáz inhibitor koktéllal

(Thermo Fisher Scientific), míg az oldat jobb kezelhetőségét 12 µl Univerzális Nukleázzal (Thermo Fisher Scientific) biztosítottuk. 30 percnyi, 4 °C-os további kevertetés után, a sejttörmelékektől centrifugálással (30 min, 27000g, 4 °C), míg a biotinilált fehérjéktől 33 µl 50 mg/ml avidin oldattal (IBA, Göttingen, Németország) szabadultunk meg. Az FPLC tisztítórendszer és a kolonnák dugulás elleni védelme érdekében a mintákat 0,45 µm pórusátmérőjű filteren (Sartorius, Göttingen, Németország) is átszűrtük.

A hE3 és variánsai esetén 70 µl 20 mM FAD oldattal biztosítottuk a prosztetikus csoport feleslegben lévő jelenlétét és ezáltal a fehérje helyes feltekeredését [120]. Az E1 alegység esetén a fenti lépések mindegyike 2 mM MgCl₂ és 0,5 mM ThDP folytonos jelenlétét igényelte.

3.4.1.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás

A fehérjetisztítás alapját a szekvenciába kódolt nyolc aminosav hosszúságú *Strep* affinitás címke, illetve a Macroprep típusú kolonnákban kötött (IBA) *Strep-Tactin* között kialakuló affinitás kapcsolat jelentette. A rendszer hatékonysága és a fehérjék felhasználási igényei a hE3 alegység mutáns változatai esetén egy (*original linkeres*), a hE2k fehérje, valamint a hE3 vad típus esetén két *Strep* affinitás címke szakasz (*Twin-Strep*) N-terminális jelenlétét, míg a hE1k alegységnél a szekvencia mindkét végén *Twin-Strep* címkék együttesét kívánta meg (4. táblázat).

A keletkező fehérjék mennyiségének megfelelően az egy vagy három (ekkor sorba kapcsolt) kromatográfiás kolonnát egy AKTA Purifier 10 UPC FPLC készülékbe (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Svédország) építve használtuk. Az ekvibráltatott (100 ml W0 mosópuffer; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris, pH=8,0) oszlopokra történő mintafelvitelt a nem specifikusan kötődő komponensek mosópufferrel való eltávolítása (350 ml; W1 puffer) követte. Az elúciót (hétszeres oszloptérfogat W alapú E puffer) 2,5 mM desztiobiotin (IBA), a regenerációt (150 ml W alapú R puffer) 1 mM hidroxizofenilbenzoésav (HABA), míg az utóbbi komponens eltávolítását tiszta mosópufferrel való mosás (150 ml; W3 puffer) biztosította. (Az elúció és a regeneráció elválasztása érdekében 7 ml-nyi W2 mosási lépést is alkalmaztunk.) Az eluátumokat Amicon Ultracel ultrafiltráló

centrifugális csövekben (szűrési mérethatár MWCO=30 kDa; Millipore, Cork, Írország) koncentráltuk, illetve puffercseréltük mosópufferre [120].

A hE1k alegység esetén e lépéseknél is elengedhetetlen volt 2 mM MgCl₂ és 0,5 mM ThDP használata.

A fehérjék molekulatömegét, intaktságát és tisztaságát az Invitrogen (Waltham, MA, USA) által kidolgozott protokollt követve lítium-dodecilsulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (LDS-PAGE, NuPAGE™ 4-12%, Bis-Tris, 1 mm), míg a szekvenciák pontosságát MS-sel ellenőriztük. A fehérje mintákat felhasználásig folyékony nitrogénes hirtelenfagyasztás után -80 °C-on tároltuk.

4. táblázat. Strep affinitás címkék felépítése. Az affinitásért felelős *Strep* címke szakasz sárga, a címke lehasítását lehetővé tevő HRV 3C hasítóhely zöld színnel van kiemelve.

Strep affinitás címke	Aminosavszekvencia
N-terminális <i>original linker</i> változat	MASWSHPQFEKGALEVLFPQGP
N-terminális <i>Twin-Strep</i> változat	MASWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKLEVLFPQGP
C-terminális <i>Twin-Strep</i> változat	LEVLFPQGPWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

3.4.2. Hexahisztidin címkével rendelkező hE1k fehérjekonstruktt

3.4.2.1. Fehérjeexpresszió

A hE1k fehérje esetén a fehérjetisztítás egy alternatív, pET22b(+) típusú plazmid vektor és az *E. coli* BL21(DE3) baktériumtörzs alapú változatát is megvalósítottuk. (A plazmid típusa megegyezik 3.3.2. hKADHk fejezetben leírttal.) Az amerikai együttműködő partnerünknel folyó munka során a glicerinben tárolt („glycerol stock”) sejtek már eleve magukban őrizték a kódoló plazmidokat.

Az összesen 200 µl-nyi szuszpenziót ezerszeres térfogatú LB-tápotdatban 16 órán át, 37 °C-on rázattuk. A négyszer 800 ml-nyi azonos összetételű médiumokba szétosztott

sejteket 2 óra elteltével 0,5 mM IPTG hozzáadásával készítettük a kívánt fehérjék létrehozására. A fenti lépésekben a negatív szelekciót 0,05 mg/ml ampicillin, míg a képződő fehérjék helyes feltekeredését 1 mM MgCl₂ és 0,5 mM ThDP biztosította. A 15 órán keresztül 25 °C-on folyó expressziót a sejt kultúrák centrifugálással (15 min, 7500g, 4 °C) történő összegyűjtése követte. A foszfát pufferben (0,2 M K-PO₄ – KH₂PO₄/K₂HPO₄ –, pH=7,4, 0,15 M NaCl) mosott sejteket felhasználásig -20 °C-on tároltuk [90].

3.4.2.2. Sejtfeltárás és előtisztítás

A 60-80 ml szonikáló pufferben (50 mM K-PO₄, pH=7,5, 0,3 M KCl, 0,5 mM ThDP, 2 mM MgCl₂, 1 mM benzamidin-HCl, 0,5 (v/v)% Triton X-100) felvett sejtek feltárását 0,6 mg/ml lizozim melletti 20 perces, 4 °C-os inkubáció és 10 percnyi jégen való szonikálás (20 másodperc szonikálás, 20 másodperc szünet) tette teljessé. A felszabaduló nukleinsavakat a két lépés között hozzáadott DNáz I-gyel, mikrokokkális nukleázzal (20 perc inkubáció), illetve a végén beoldott 0,8 (w/v)%-nyi sztreptomycin-szulfáttal távolítottuk el. A kiváló csapadéktól centrifugálással szabadultunk meg [122].

3.4.2.3. Affinitáskromatográfiai tisztítás

A fehérjetisztítás alapját a szekvencia C-terminálisára kódolt 6 His aminosav által kialakított hexahisztidin címke jelentette, mely az oszlop ágyzatában (Ni-Sefaróz, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) lévő Ni fémionokhoz (Ni-kelát formában) koordinációs módon kötődött. Az oldatok mozgását a gravitációs erő biztosította.

A mintát az oszlop mosópufferrel (100 ml, 50 mM K-PO₄, pH=7,5, 0,3 M KCl, 0,25 mM ThDP, 2 mM MgCl₂) való ekvilibrációja után vittük fel. Ezt először a nem specifikusan kötődő (700 ml mosópuffer) majd pedig a specifikusan kötődő (100 ml 45 mM imidazol tartalmú mosópuffer) szennyezők eltávolítása követte. Az elúciót 100 ml, imidazol 300 mM koncentrációban tartalmazó mosópuffer biztosította. Az így gyűjtött frakciók tisztaságáról és összetételéről saját összeállítású gélen való elektroforézissel győződünk meg. Az oszlopot 200 ml mosópufferrel regeneráltuk.

A megfelelő frakciók egyesítésével született minta magas imidazol tartalma okán dialízist igényelt. A dializáló fóliába zárt mintát 15 órán keresztül 4 °C-on kevertetett 2 l

dializáló külső puffer oldatban (50 mM K-PO₄, pH=7,5, 0,3 M KCl, 0,5 mM ThDP, 2 mM MgCl₂, 1 mM benzamidin-HCl) tartottuk. A mintákat Amicon Ultracel ultrafiltráló centrifugális csövekben (MWCO=30 kDa) centrifugálva koncentráltuk, illetve puffercseréltük (50 mM K-PO₄, pH=7,5, 0,2 M NaCl, 0,5 mM ThDP, 2 mM MgCl₂, 1 mM benzamidin-HCl). A fehérje mintákat felhasználásig folyékony nitrogénes hirtelenfagyasztás után -80 °C-on tároltuk [122].

3.5. A dimerizációs domén deletált hE3 fehérje előállítása

A hE3 fehérje mind felhasználási célja, mind pedig eltérő viselkedése okán számos ponton igényelte az eredetileg kidolgozott protokoll jelentős módosítását.

3.5.1. Fehérjeexpresszió

A fehérje génjének expressziója a pET52b(+)/BL21(DE3) rendszernek megfelelően történt. A folyamat több szempontból megegyezett a 3.4.1.1. Fehérjeexpresszió fejezetben leírtakkal, jelentős különbséget jelentettek azonban bizonyos expressziós körülmények (lásd alább).

3.5.2. Minimum médiumos fehérjeexpresszió

A minimum médium alapját egy előre elkészített, az *E. coli* baktériumok növekedéséhez elengedhetetlen ásványi anyagokat, illetve vitamin-alapanyagokat tartalmazó oldat jelentette (*E. coli* Genome Project, University of Wisconsin – Madison, WI, USA). A tízszeres hígítású oldatba literenként 4 g glükózt, illetve 1 g ammónium-kloridot oldottunk be. Az izotópjelzett fehérjék előállításához ¹⁵N izotóp tartalmú ammónium-kloridot (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) használtunk. A minimum médium mellett várható alacsonyabb fehérjetermelést a szokásos expressziós térfogatok megduplázásával ellensúlyoztuk.

3.5.3. Sejtfeltárás és előtisztítás

A 3.4.1.2. Sejtfeltárás és előtisztítás fejezetben leírtaknak megfelelően elvégzett sejtfeltárást követő centrifugálással összegyűlt pellettömeget Polytron diszpergátorral

(Kinematica AG, Malters, Svájc) vittük szuszpenzióba. A 0,1 (v/v)%-os Triton X-100-at tartalmazó, illetve a tiszta W0 mosópufferrel kétszer-kétszer ismételt folyamat centrifugálásokkal (30 min, 27000g, 4 °C) megszakítva egy nagy tisztaságú, többnyire fehérjéket tartalmazó, fehér masszát (inklúziós test frakció) eredményezett.

3.5.4. A fehérje natív konformációjának visszaállítása (*Refolding*)

Az összegyűlt fehérjetömeg minden grammjára 6,7 ml-nyi 6 M guanidin-HCl-ot és 5 mM ditiotreitolt (DTT) tartalmazó mosópuffert számolva reszususpendáltunk, majd az elegyet 1 órán át 4 °C-on kevertettük. A szuszpenzió végső lecentrifugálását követően nyert tiszta fehérje mintát cseppenként adagoltuk az 50-szeres térfogatú, 10 µM FAD és 10 mM DTT tartalmú, mosópuffer alapú, a fehérje (újra)feltekeredést biztosító (*refoldingot* támogató) oldathoz. A 4 °C-on végrehajtott többórás folyamat után a fényvédeletten tárolt oldatot további 15 órán át kevertettük [123].

3.5.5. Affinitáskromatográfiás tisztítás

A fehérjetisztítás alapját a szekvenciába N-terminálisán kódolt *Twin-Strep* címke jelentette. A nagy térfogatú oldatot a biotinizált fehérjék kiküszöbölése érdekében 130 µl 50 mg/ml avidin oldattal kezeltük, és a tisztítórendszer védelme érdekében a korábban leírtakhoz hasonlóan 0,45 µm pórusátmérőjű steril filteren szűrtük át. A három sorbakötött kolonnával megvalósuló tisztítási folyamat a minta és az oldatok térfogatainak megnövekedését (W0: 100 ml, minta: 2300 ml, W1: 450 ml, E: 115 ml, W2: 7 ml, R: 200 ml, W3: 200 ml) leszámítva a 3.4.1.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás fejezetben leírtaknak megfelelően történt. Ezen hasonlóság kiterjedt a végső fehérje minta tisztaságának ellenőrzésére is. A mintákat felhasználásig folyékony nitrogénes hirtelenfagyasztás után -80 °C-on tároltuk.

3.5.6. A *Strep* affinitás címke eltávolítása

A Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kit (Thermo Fischer Scientific) leírását szem előtt tartva 200 µg fehérjének megfelelő mintát 5 µl HRV 3C reakciópufferrel (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=8,0) és 1 µl (2 nemzetközi egységnek megfelelő) HRV 3C proteáz

oldattal elegyítettünk. A 16 órán át 4 °C-on folyó inkubációt követően egy erre a célra kifejlesztett GST affinitáskromatográfiás oszloppal (Pierce Glutathione Spin Columns, 0.2 ml resin bed, Thermo Fischer Scientific) a glutation-S-transzferáz (GST) címkével rendelkező proteázot is eltávolítottuk. Ehhez az oszlopot először három ismétléssel lecentrifugálva ekvibráltattuk a HRV 3C reakciópufferrel, melyet követett a pufferrel tízszeresen kihígított minta 90 percig való oszlopon pihentetése, majd centrifugálással az immáron proteázmentesített oldat visszanyerése. Az oszlopot a reakciópufferrel négyszer átmosva a hasított fehérjék utolsó maradványait is összegyűjtöttük és egy oldatban egyesítettük. Az oszlopot a 10 mM redukált glutation tartalmú elúciós pufferével (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=8,0) regeneráltuk.

A mintában megmaradt *Twin-Strep* címkéket gravitációs affinitáskromatográfiás oszlopok (IBA) segítségével távolítottuk el. Ehhez a 3.4.1.3. Affinitáskromatográfiás tisztítás fejezetben leírtakhoz hasonlóan az oszlopot először ekvibráltattuk, majd pedig a minta átfolytatása után a fehérjék minden mennyiségét a mosópuffer újabb mennyiségeivel mostuk le. Az oszlopok újbóli felhasználhatóságát a *Strep* címkék elúciójával, mosásával, regenerációjával és a regeneráló lemosásával érték el. Az utolsó lépésben a teljes regeneráláshoz elengedhetetlen volt a mosópuffer pH=10,5-ös változatának átfolytatása is.

3.5.7. Natív gélelektroforézis

A NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System (Thermo Fisher) géljeit protokolljuknak megfelelően használtuk. Az enyhe körülmények között (pH~7,5, Coomassie G250) futtatott mintákat tartalmazó 3-12%-os Bis-Tris géleket 40 (v/v)% metanolt és 10 (v/v)% ecetsavat tartalmazó elegyben fixáltuk (15 perc billegtetés 65 másodperc hőkezelés után). A festék feleslegét 8 (v/v)% ecetsav oldattal 65 másodpercig hőkezelve, majd pedig a szükséges ideig billegtetve távolítottuk el.

3.6. NMR-előkísérletek

A kísérletekhez szükséges NMR spektrométert (800 MHz Varian, Palo Alto, CA, USA) és a hozzá kapcsolódó hűtött mérőfejet a Richter Gedeon Nyrt, Szerkezetkutatási Osztálya bocsájtotta rendelkezésünkre. Az 500 µl fehérje mintát 5 mm átmérőjű, Wilmad®

típusú NMR-csőbe töltöttük. A fehérje korlátozott stabilitása okán a méréseket alacsony hőmérsékleten (277, illetve 280 K) folytattuk.

Vizsgálatainkban transzverzális relaxációra optimalizált spektroszkópiával (*transverse relaxation optimized spectroscopy*, TROSY) kombinált és egyszerű, grádienssel kombinált, érzékenyített, a ^{15}N magra specifikus heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia (*gradient sensitivity enhanced ^1H - ^{15}N Heteronuclear Single-Quantum Coherence*, gNHSQC) kísérleteket hajtottunk végre. Ezek paraméter adatai az 5. táblázatban olvashatóak.

5. táblázat. NMR-kísérleti paraméterek

	90°-os impulzus (^1H)	90°-os impulzus (^{15}N)	Gyűjtött adatpontok száma (direkt és indirekt dimenziók)	Relaxációs késleltetés	Tranziensek száma	Ablak- függvény
gNHSQC- TROSY	7,5 μs	74,5 μs	2048x64	1 s	128	Lorenz (lb: 0,5 Hz)
gNHSQC- TROSY	9,3 μs	74,5 μs	2048x64	1 s	32	Lorenz (lb: 0,5 Hz)
gNHSQC	7,5 μs	74,5 μs	1024x32	1 s	32	Lorenz (lb: 0,5 Hz)

3.7. Röntgenkristallográfiai szerkezetmeghatározás

3.7.1. Fehérjekristályosítás

3.7.1.1. Kristályosítási körülmények tesztelése

A laboratóriumunkban folyó kristályosítások első próbáit a Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) által forgalmazott oldatsorozatok (*Index Screen*, *Crystal Screen*, *PEG/Ion Screen* és *SaltRx Screen*) jelentették. A gőzdiffúziós ülőcsepp módszerre kifejlesztett, 24 nyílt platformot, illetve az őket körülvevő oldatüreget tartalmazó kristályosító kazettákat szintén a Hampton Research biztosította. A pontosan 20 °C-os környezetet, illetve rázkódásmentességet biztosító inkubátor (Peltier-cooled incubator, Memmert, Németország) kiváló kristályosítási környezetet tett lehetővé.

3.7.1.2. Kristályosítási körülmények optimalizálása

A kristályosítási körülmények a megfelelő mértékű sikerességet mutató oldatok összetételének ismeretében optimalizálhatóak. Ehhez kísérleteinkben az opcióként adódó só- és kicsapószer koncentrációk változtatásai, valamint a pH érték tartományá váló kiterjesztése közül választhatunk. Munkánk során elsősorban az utóbbi kettő megoldásra koncentráltunk.

A vad típusú hE3 esetén a kiindulási alapot a *Crystal Screen I* 39. számú oldata jelentette. Az ehhez tartozó megfelelő optimalizációs teszt körülményeket a Hampton Research cégtől vett törzsoldatokkal, polietilén-glikollal (PEG), illetve 5 M koncentrációjú NaOH- és HCl-oldatokkal hoztuk létre. A diffrakciós kísérletekhez használt kristályt az alábbi oldatkörülmények biztosították:

Puffer: 0,1 M Bis-Tris, pH=6,9

Só komponens: 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Kicsapószer komponens: 1,5 (v/v)% PEG-400

3.7.2. A vad típusú hE3 röntgendiffrakciós szerkezet meghatározása

A létrejött kristályt kihalászás (CryoVial Assembly, MiTeGen, Ithaca, NY, USA) után folyékony nitrogénbe mártva tároltuk a röntgendiffrakciós adatgyűjtés pillanatáig. A magas sókoncentráció protektív hatásának köszönhetően kriogén védőoldatot nem használtunk.

3.7.2.1. Adatgyűjtés és -feldolgozás

A kutatócsoportunk által létrehozott kristályok röntgendiffrakciós vizsgálatait a Dr. Manfred Weiss vezetésével a Helmholtz-Zentrum Berlin kutatóintézetben működő Makromolekula Krisztallográfia Kutatócsoportban végezzük. A BESSY II részecskegyorsító (Adlershof, Berlin, Németország) BL14.1 mérőállomásán [124] egy CATS típusú mintacserélő robotkar helyezte a kristályt a mini-kappa goniométerre.

A nagyobb mértékű sugárkárosodást megelőzendő (és a környező víztartalom amorf módosulatban tartása miatt) a fehérjekristályt 100 K-en tartottuk nitrogéngáz

áramoltatásával. A diffraktált sugarakat Dectris Pilatus 6M pixeldetektorral gyűjtöttük össze. Az MxCube vezérlőszoftverrel beállított paraméterek a 6. táblázatban olvashatóak. Az XDSAPP 2.0 program [125, 126] biztosította adatfeldolgozás eredményei a 7. táblázatban találhatóak.

3.7.2.2. Szerkezetmegoldás molekuláris helyettesítéssel

A fázisprobléma feloldására a molekuláris helyettesítés technikája szolgált, melyhez a CCP4 szoftvercsomag [127] Molrep programját [128] használtuk. A kiindulási modellt a PDB 1ZMD kódú szerkezetének „A” monomerje jelentette.

3.7.2.3. Szerkezetfinomítás

Az első lépésként alkalmazott merev test finomítást (CCP4 program: Refmac5, [129]) az egymást iteratív módon követő modellépítési és a valós térben végzett, a geometriai megkötésekkel terhelt finomítási lépések követték (Coot program, [130]). Míg a munka első szakaszában a Refmac5 programmal dolgoztunk, a későbbiekben a Phenix szoftvercsomag [131] phenix.refine programjával folytattuk a munkát. Ez utóbbit automatikus TLS (Translation/Libration/Screw) csoport kijelöléssel, *non-crystallographic symmetry* megkötéssel (NCS) és a H-atomok geometriai megfontolásokon alapuló modellezésével alkalmaztuk. Tekintettel arra, hogy a folyamat eredményeképpen kapott elektronsűrűségi térkép a vizsgált kristályt felépítő fehérjemolekulák mind térben, mind pedig az adatgyűjtés során megjelenő időbeli átlagát adja, bizonyos aminosavak esetén többféle konformációs, illetve rotamer helyzet is láthatóvá vált. Az így kimutatható alternatív oldalláncokat, illetve funkciós csoportokat a modellépítés/finomítás végső szakaszában alternatív konformerekként modelleztük be. Ebben a Coot program volt segítségünkre, míg a konformerek betöltöttségét a phenix.refine program finomította automatikusan a számítási ciklusok során. A létrejött modellszerkezet mért adatokhoz való illeszkedését, illetve ennek javulását az R-faktor és a szabad R-faktor változásával követtük nyomon. A két paraméter közötti különbség alacsony értéken tartásával ($R-R_{szabad} < 0,05$) a túlillesztést kontrolláltuk. A modellszerkezetek validálására a Molprobity programot használtuk [132]. A kész szerkezet

a PDB adatbázisba 6I4Q kóddal lett feltöltve. A szerkezetet jellemző minőségi mutatók az 8. táblázatban olvashatóak.

6. táblázat. Röntgendiffrakciós adatgyűjtési paraméterek

Adatgyűjtés időpontja	2017.08.25.
Hullámhossz (Å)	0,9184
Kristálysorszám	1
Adatsor	1
Detektor-kristály távolság (mm)	319,766
Oscillációs intervallum/felvétel (°)	0,1
Expozíciós idő/felvétel (s)	0,3
Teljes rotációs intervallum (°)	180
Felvételek száma	1800

7. táblázat. Feldolgozott adatsorok. (A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.)

Térce csoport	P 2 ₁ 2 ₁ 2
Elemi cella a, b, c (Å)	119,411; 169,945; 61,555
Elemi cella α, β, γ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Felbontás tartomány (Å)	46,002- 1,75 (1,85 - 1,75)
Reflexiók száma	827399 (127246)
Egyedi reflexiók száma	125138 (19837)
Multiplicitás	6,61
Adatsor teljessége (%)	98,1 (97,4)
I/σI	10,72 (0,55)
Wilson B-faktor (Å ²)	40,24
Mozaicitás (°)	0,190
CC _{1/2} (%)	99,9 (63,2)
Isa	21,65

A táblázatban szereplő, korábban nem jelölt CC rövidítés jelentése: korrelációs koefficiens (*correlation coefficient*).

8. táblázat. A végső szerkezet jellemzése. (A zárójelben feltüntetett értékek a legnagyobb felbontású héjat jellemzik.)

Felbontás tartomány (Å)	46,00-1,75 (1,85-1,75)
Reflexiók száma	123930
R _{szabad} számolásához használt reflexiók száma	2072
R-faktor	0,2052
R _{szabad}	0,2238
RMSD	
Kötéshossz (Å)	0,012
Kötésszög (°)	1,19
Atomok száma	
Nem-H	7904
Fehérje-alkotó	7183
Ligandum-alkotó	184
Víz molekula	537
Ramachandran eloszlás	
Kedvezményezett (%)	98,21
Engedélyezett (%)	1,79
Tiltott (%)	0,00
Kedvezőtlen rotamer (%)	1,43
Átlagos B-faktor	49,15
Fehérje	19,01
Ligandum	61,36
Víz	46,84
TLS csoportok	15
Molprobity értékelés	
„Clashscore”	0,88 (99 th percentilis)
Molprobity pontszám	0,89 (100 th percentilis)

A táblázatban szereplő, korábban nem jelölt RMSD rövidítés jelentése: négyzetes közép eltérés (*root-mean-square deviation*).

3.8. Krio-elektronmikroszkópiai szerkezetmeghatározás

3.8.1. Negatív festéses elektronmikroszkópiai felvétel

Az előzetes vizsgálatul szolgáló negatív festéses kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpontjában, a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Dr. Labár János által vezetett Vékonyréteg-fizikai Osztályán végeztük.

A 4 μl -es mintákat egy 400-as hálószem méretű (az egy hüvelyk távolságon belül elhelyezkedő lyukak száma) szénburkolt réz mikrorostély rácshálóra (CF400-Cu, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) vittük fel. Az 1 perces penetrációt előbb desztillált vizes, majd pedig 2 (w/v)%-os ammónium-molibdát oldattal kivitelezett mosás követte, melyek folyadékfeleslegeit szűrőpapírral itattuk le. A 300 kV gyorsítófeszültség mellett megvalósuló adatgyűjtéshez egy GATAN Orius CCD kamerával (GATAN, Pleasanton, CA, USA) felszerelt JEOL JEM-300 típusú (JEOL, Tokió, Japan) magas felbontású analitikai transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk.

3.8.2. Krio-elektronmikroszkópiai felvétel

A szerkezetmeghatározáshoz használt felvételek a csehországi Brnóban, a Masaryk Egyetem keretein belül működő Közép-európai Technológiai Intézetben (Central European Institute of Technology), egy PhD-hallgató társam közreműködésével készültek. Az adatfelvétel folyamata a következők szerint zajlott.

Az ismételten 4 μl -es mintákat egy 200-as hálószemű szénburkolt réz mikrorostély rácshálóra (R2/1, Quantifoil, Großlobichau, Németország) vitték fel, melyről az 1 perces penetrációt követően a folyadékfelesleget leitatták. A rostélyt egy Vitribot Mark IV típusú (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gép segítségével gyorsfagyasztották. A 300 kV gyorsítófeszültséggel dolgozó Titan Krios típusú transzmissziós elektronmikroszkópba (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kapcsolt Falcon II (4k x 4k) típusú direkt detektoron gyűjtött adatoknál 75000-szeres névleges nagyítást alkalmaztak. Az 1,06 Å kalibrált pixel méret mellett -1,8 és -2,6 μm közötti defókuszálással dolgoztak.

Az EPU szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) rögzített 3810 dinamikus felvétel minden eleme 16 képet tartalmazott, melyek 1-1 másodperc rögzítési idővel és 48,8 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ dózissal készültek. A sugárzás okozta elmozdulást a MotionCor2 szoftver [133] segítségével

korrigáltuk, míg a kontraszt transzfer függvény paramétereit Gctf alkalmazásával [134] határoztuk meg.

Az adatgyűjtés paramétereit a 9. táblázatban olvashatóak.

9. táblázat. Adatgyűjtés és feldolgozása

Mikroszkóp	FEI Titan Krios
Kamera	Falcon II
Nagyítás	75000
Gyorsítófeszültség (kV)	300
Elektron dózis ($e^-/\text{Å}^2$)	48,8
Defókuszálási tartomány (μm)	-1,8 – -2,6
Pixelméret (Å)	1,06
Kezdeti részecskeszám	1533026
Végző részecskeszám	740101

3.8.3. Szerkezetmeghatározás

3.8.3.1. Önálló részecskék rekonstrukciója

Az automatikus részecske kiválasztáshoz először az EMAN2 szoftvercsomag e2boxer programjában [135] választottunk ki manuálisan körülbelül 1000 elemet, melyek mintául szolgáltak a Cryosparc v2 [136] segítségével kivitelezett szűréshez. A folyamat során kiemelt 1533026 részecske kiválasztását többfordulós 2D osztályozás követte, mely során kigyűjtött 740100 részecske adta a szerkezetfinomítás alapját. A *stochastic gradient descent* algoritmus alkalmazásával keletkezett kezdeti modellt a Cryosparc v2 szimmetria megkötés nélkül hozta létre. A nagyfokú egyezőség okán a 3D osztályozás során nem történt szelektálás. A 3D finomítás során alkalmazott oktahedrális szimmetria végül egy 2,9 Å felbontású térkép megszületéséhez vezetett (*Fourier shell correlation*=0,143).

3.8.3.2. Molekulamodellezés és a térkép dokkolása

A modellépítés alapját a hE2k-val 60%-os szekvenciaazonosságot mutató *E. coli* analóg már ismert szerkezete (PDB kód: 1E2O [137]) jelentette. Az UCSF Chimera programban [138] végzett merevtest illesztést követően a Coot programban aminosavak

cseréjével tettük a szerkezetet a humán szekvenciának megfelelővé. A Phenix programmal végrehajtott valós terű finomítások, valamint lokális optimalizációk ismétlődő ciklusai (Coot) után született meg a végső szerkezet, amely validálását a Molprobity program biztosította. A modellszerkezetet és a térképet az *Electron Microscopy Data Bank*be töltöttük fel, mely ezeket a saját rendszerében alkalmazott kódján (EMD-0108) túl a PDB adatbázisban (6H05) is rögzítette.

A szerkezet, illetve finomítási paraméterek a 10. táblázatban olvashatóak.

10. táblázat. Szerkezetfinomítás

Modell	
Aminosavak száma	24x236
Finomítás	
Felbontás (Å)	2,9
CC _{maszk}	0,7496
CC _{térfogat}	0,7460
CC _{csúcsok}	0,7136
Térkép élesítés (B-faktor; Å ²)	-59,21
RMSD	
Kötéshossz (Å)	0,012
Kötésszög (°)	1,062
Validálás	
MolProbity érték	1,55
„Clashscore”	2,58
Gyenge rotamerek (%)	0
Ramachandran térkép	
Kedvező (%)	91,45
Engedélyezett (%)	8,55
Nem engedélyezett (%)	0

3.8.3.3. Az N-terminális szakasz dokkolása

A krio-EM számára flexibilitása okán nem detektálható N-terminális szakasz térszerkezetét munkatársam, Dr. Ozohanics Olivér határozta meg. A keresztkötő

komponensekkel (1,1'-karbonilimidazol, diszukcinimidil-vajsav-urea) nyert távolságadatokon nyugvó, keresztkötött tömegspektrometriai (*chemical cross-linking-coupled mass spectrometry*, CL-MS) alapú szerkezetet ugyanezen molekulák magdoménnel mutatott távolságadatai alapján illesztettük modellemhez. Ebben a Chimera program volt segítségünkre.

3.8.4. Szerkezeti analízis

3.8.4.1. Belső szerkezeti analízis

A magasabb fokú szerveződési egységeket (trimerek, 24-mer) felépítő monomerek távolságadatait a Ring 2.0 [139], a PISA [140] és a CONTACT/CCP4 programok segítségével határoztuk meg. Reprezentációra elsődlegesen a Pymol programot [141] használtuk, míg a másodlagos szerkezeti elemek, illetve a csatornahálózat elemzésében az ENDscript [142] és a Caver 3.0 programok [143] voltak segítségünkre. A csatornahálózat meghatározásához szükséges kiindulási pontot az aktív centrumot alkotó három aminosav térbeli középpontjában jelöltük ki. A láncok közötti páros és többszörös összevetésekbe a LALIGN [144] és a Clustal Ω programokat [145] vontuk be.

3.8.4.2. A hKGDHk szubsztrátjainak dokkolása

A dokkoláshoz használt DHLA és KoA molekulák az avE2p kristályszerkezet alapú PDB fájljaiból (1EAE és 1EAD [146]) származtak. (Tekintettel arra, hogy a kristályosíthatóság érdekében a KoA terminális tiolcsoportját oxidálták – SOH-csoport –, a beiktatott oxigén atomot először töröltük a fájlból.) A dokkolás helyét a trimer két szomszédos monomerje által létrehozott csatornarendszer jelölte ki.

A megfelelő orientációba helyezett szubsztrátok, illetve a DHLA S8 atomján szukcinilcsoporttal konjugált változat (szukcinil-DHLA, SLA) energiainimalizációja a Chimera programban történt meg. A fehérjekomponens rögzítése mellett végbement folyamat paramétereit a 11. táblázat mutatja.

11. táblázat. Energiaminimalizáció paraméterei

Nagy-energia-csökkenésű lépések száma	1000
Nagy-energia-csökkenésű lépések mérete	0,05 Å
Kapcsolt gradiens lépések száma	100
Kapcsolt gradiens lépések mérete	0,02 Å

3.8.4.3. A hKADHk szubsztrátjainak dokkolása

A fent leírt módon történt meg a hKADHk esetében alternatív szubsztrátként szolgáló adipoil-DHLA (ALA) és KoA molekulák dokkolása is. Jelentős különbséget csak a (konjugátlan) DHLA KoA jelenlétében végrehajtott energiaminimalizáció jelentett, amely esetben két ciklust alkalmaztunk.

A folyamat paraméterei megegyeztek a 11. táblázatban leírtakkal.

3.9. A hKGDHk szerkezeti topológiájának meghatározása

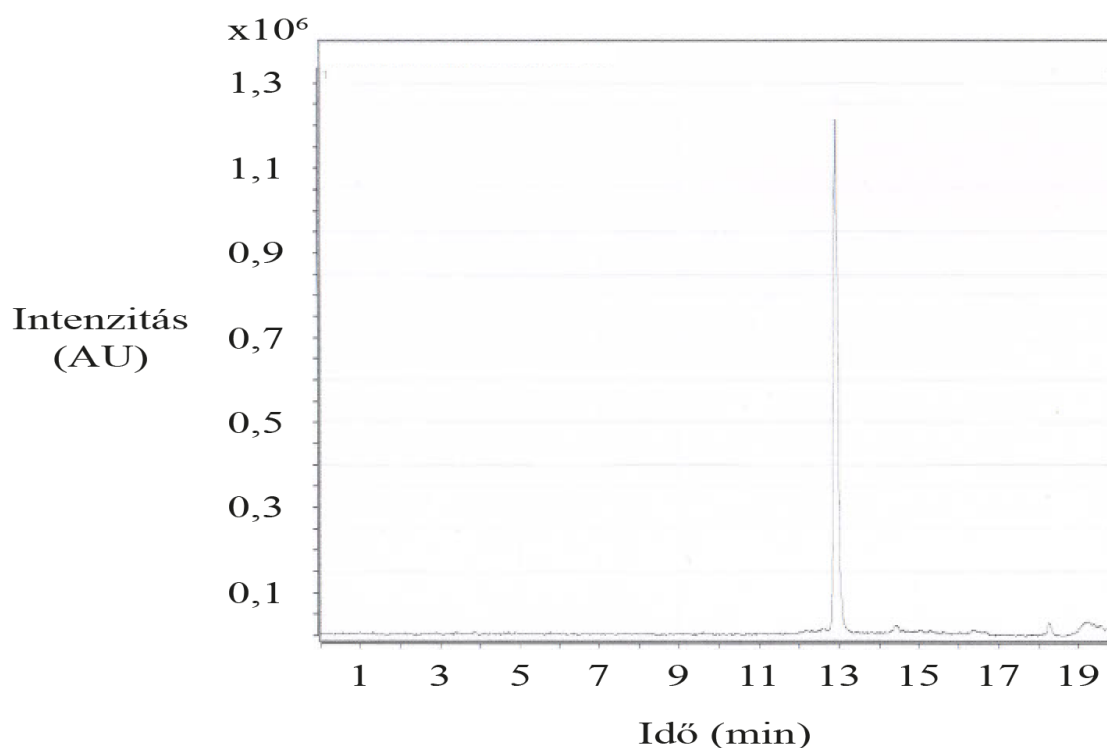
A teljes komplex modellezéséhez az általam röntgenkristallográfiával meghatározott hE3 szerkezetet (6I4Q), a krio-EM-mel megfejtett hE2k modellemet (6H05) és a Dr. Ozohanics Olivér által modellezett hE1k szerkezetet használtuk. Korábbi hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (*hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*, HDX-MS), valamint CL-MS mérések során megállapított kapcsolódási adatok alapján a PyMol programban építettük fel a teljes komplexet.

4. Eredmények

4.1. Kismolekulás szintézisek

4.1.1. Az izoliponsav előállítása

A protokoll pontos követésekor a termék bomlását tapasztaltuk. Ebből is adódóan kismértékű módosítás (a vizes oldatok savanyítása, a víz kizárólag exszikkátoros elvonása) mellett döntöttünk. Így végeredményben az eredetileg elvárt megközelítőleg 40%-os elméleti kitermelés helyett közel 25%-os eredményt értünk el. A nagytisztaságú ILS-t végül dimetilszulfoxidban oldottuk fel. A 8. ábrán bemutatott kromatogram bizonyította a biokémiai vizsgálatoknak megfelelő minőséget.



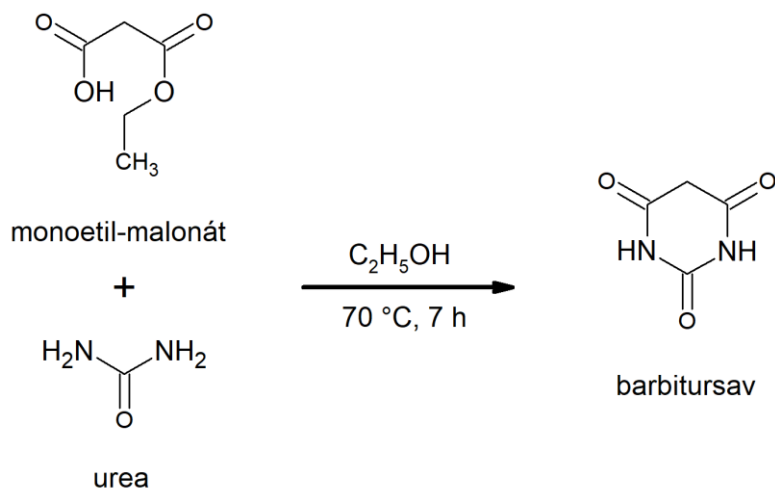
8. ábra. Az ILS extraktált ion kromatogramja. Az ILS kiugró jelet mutat a minimális mennyiségű egyéb szennyezők mellett.

4.1.2. Az izotópjelölt FAD előállítási protokolljának kidolgozása

A fentiek során szerzett tapasztalatokra alapozva megterveztem a FAD molekula előállítását is. Az így megszületett experimentális terv totálszintetikus és enzimátikus

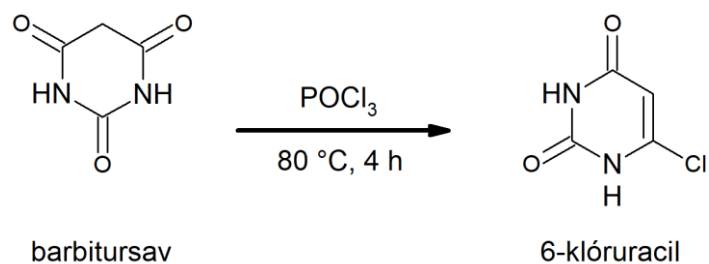
lépéseket ötvözve egy új típusú, izotópjelölésre alkalmas előállítási protokollt biztosít az irodalomhoz képest.

A szintézis első lépésében barbitursav keletkezik. A monoetil-malonát és urea etanolban képzett elegyét 7 órán át, 70 °C-on folyó refluxáltatás után egy éjszakán át kell jégen hűteni. A szárítás után tisztán kiváló csapadék várhatóan ~75%-os kitermelésű (9. ábra) [147].



9. ábra. A barbitursav szintézise

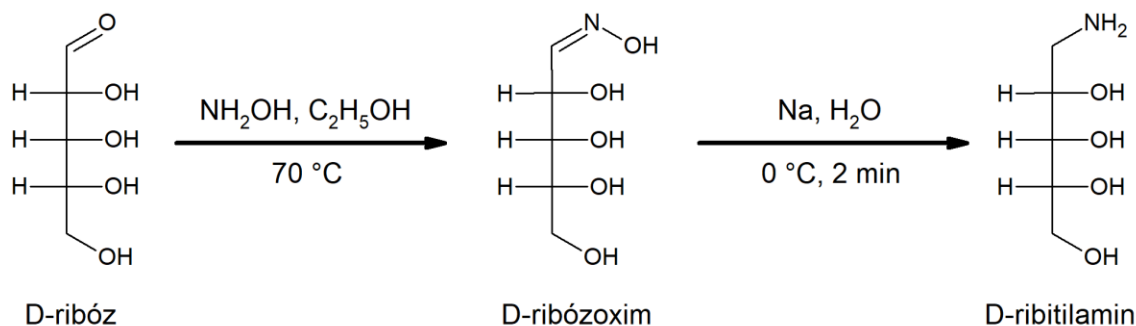
Ezt 80 °C-on 4 órán át foszforil-kloriddal reagáltatva lehet 6-klóruracillá alakítani. Ennek metanolban történő kikristályosítása ~80%-os kitermelést biztosít (10. ábra) [148].



10. ábra. A 6-klóruracil szintézise

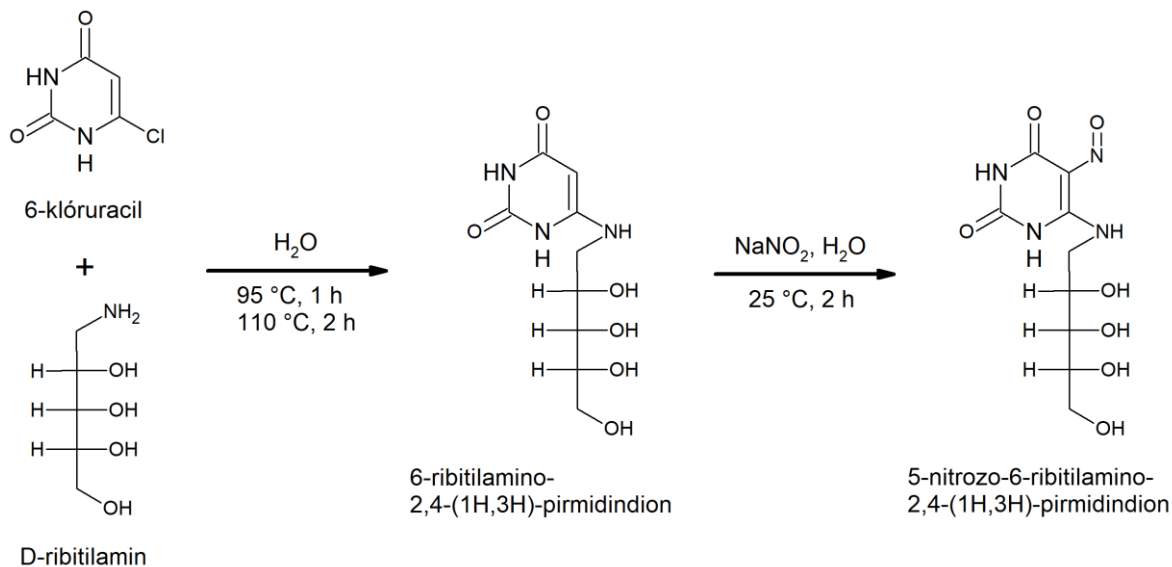
A fenti reakciótermék újabb reakciópartnere a D-ribitilamin, mely két lépésben keletkezik. Ribóz etanolos oldatába szükséges csepegtetni szintén etanolos hidroxil-amint, majd bepárlás következik [149]. Ez nátrium-amalgám jeges vizes oldatában 1-2 perc alatt

továbbalakul. A 96%-os kitermeléssel keletkező D-ribitilamin alkoholból kikristályosítható (11. ábra) [150].



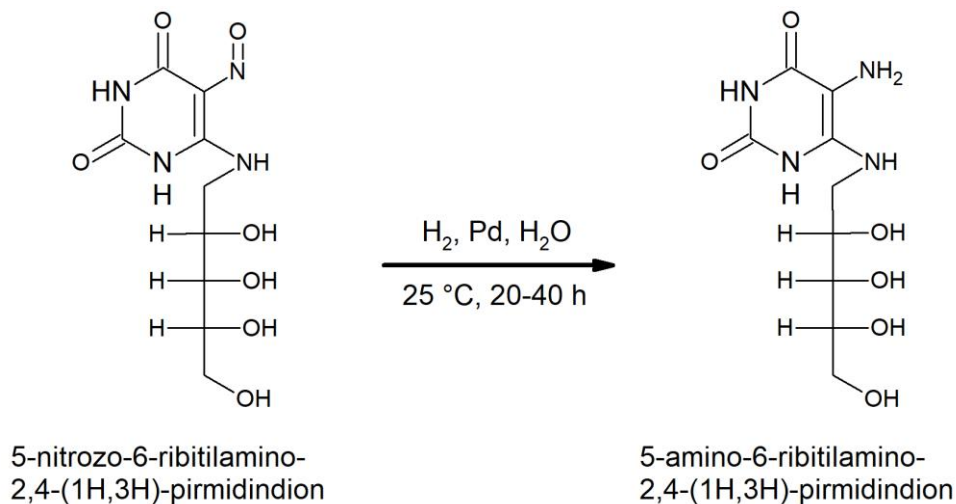
11. ábra. A D-ribitilamin szintézise

A 6-klóruracil és D-ribitilamin vizes oldatát előbb 1 órán át, 95 °C-on, majd 2 órán át, 110 °C-on vákuum alatt reagáltatva 6-ribitilamino-2,4-(1H,3H)-pirimidindion képződik. Ezen barna szirup nátrium-nitrittel, pH=4,6-os ecetsavas közegben 5-nitrozo-6-ribitilamino-2,4-(1H,3H)-pirimidindionná alakul. Ezt bepárolva majd pedig ammóniában feloldva anioncserés oszlopkromatográfiának kell alávetni. A hangyasavval létrehozott savas eluátumot bepárolva majd pedig vízben kikristályosítva 60%-os kitermelést lehet elérni (12. ábra) [151].

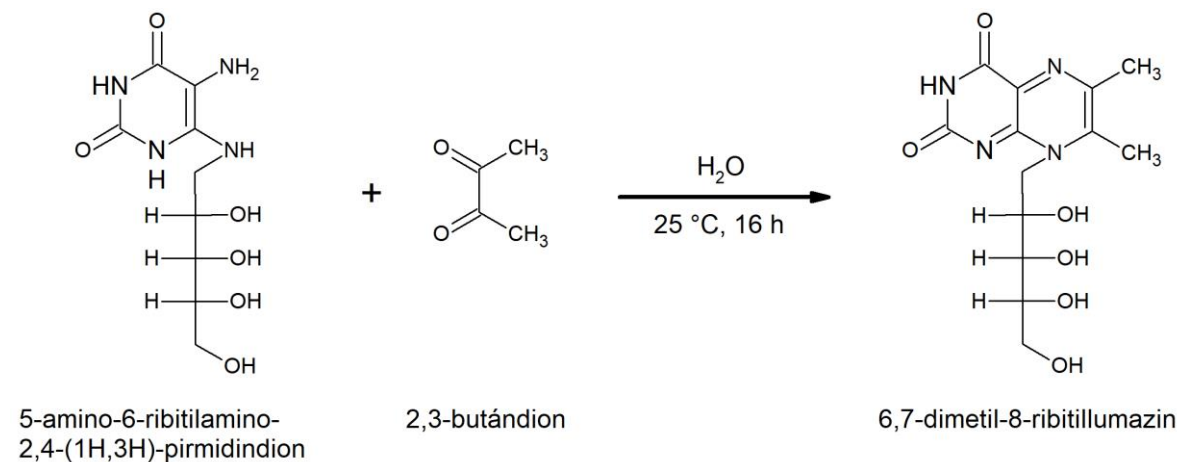


12. ábra. Az 5-nitrozo-6-ribitilamino-2,4-(1H,3H)-pirimidindion szintézise

Ez palládium katalizátor mellett, vizes oldatban hidrogénnel 20-40 órán át kezelve teljes mértékben 5-amino-6-ribitilamino-2,4-(1H,3H)-pirimidindionná alakítható (13. ábra). A szuszpenziót 2,3-butándionnal kell nitrogén-atmoszféra alatt egy éjszakán át savas közegben állni hagyni. Az oszlopkromatográfiával elválasztott frakcióból szárazra párlás és vízből történő kikristályosítás után 93%-os kitermeléssel lehet zölden fluoreszkáló 6,7-dimetil-8-ribitillumazint képezni (14. ábra) [152].



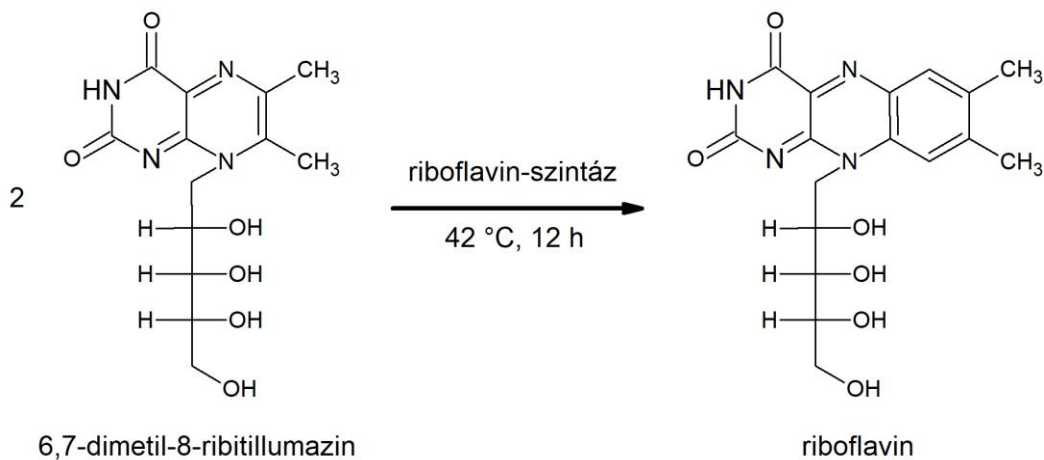
13. ábra. Az 5-amino-6-ribitilamino-2,4-(1H,3H)-pirimidindion szintézise



14. ábra. A 6,7-dimetil-8-ribitillumazin szintézise

Ezt a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető riboflavin-szintázzal lehet riboflavinná alakítani. A reakció nátrium-szulfit mellett, foszfát pufferben 42 °C-on tartva 12 óra alatt megy végbe. Az oszlopkromatográfia után (aceton és 2 M ammónia – 1:1 arányú –

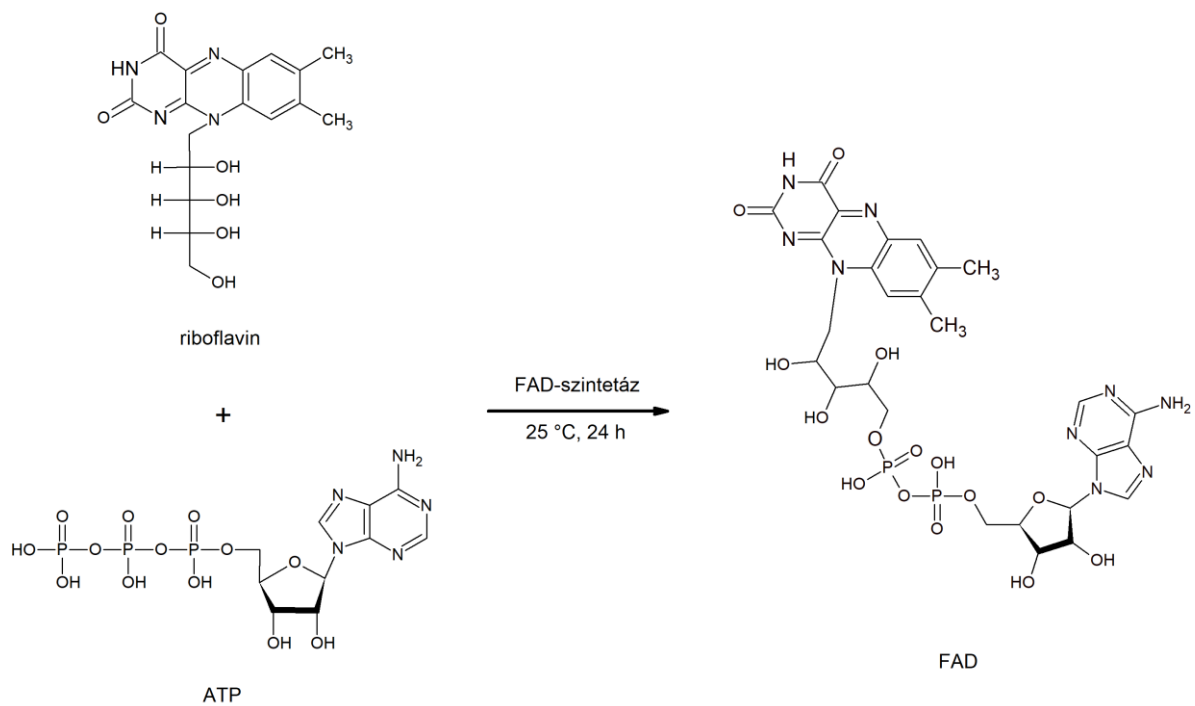
elegyével) nyert eluátumot csökkentett nyomáson kell szárazra párolni. Az ismételt oszlop-kromatografált (protoncsere) mintát (0,1 M sósavval eluálva) előbb szárazra kell párolni, majd pedig 2 M ecetsavból kell kristályosítani. Ez 96%-os kitermeléssel vezet a kívánt termékhez (15. ábra) [152].



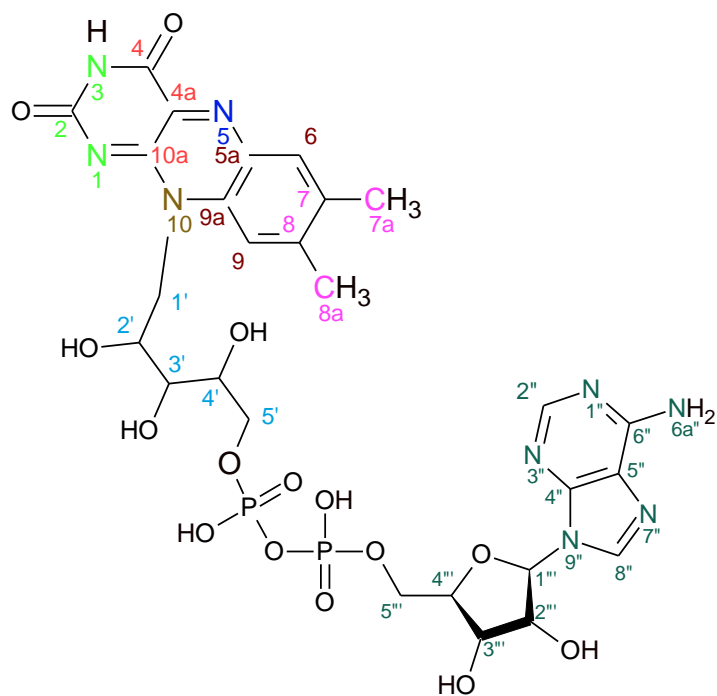
15. ábra. A riboflavin szintézise

A végsőként megjelölt termék ismét enzimatis reakcióval hozható létre. A riboflavin, adozin-trifoszfat (ATP), $MgCl_2$, foszfo kreatin és kreatinfoszfo kináz elegyét a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető FAD-szintetáz hozzáadása után egy napig kell hagyni pihenni. Az enzimek eltávolítása érdekében szűrt, majd pedig oszlop-kromatografált és fagyasztva szárított mintából 40-70%-os arányban nyerhető ki FAD. A reakció ATP 20-szoros feleslege esetén vezet elsősorban FAD képződéséhez (16. ábra) [153].

A nyolc egymástól független publikáció kombinációjával fent leírt reakciósor a FAD teljes ^{13}C , illetve ^{15}N jelölésére teremt lehetőséget (17. ábra, 12. táblázat). A kiindulási anyagokra nézve 20-30%-os végső kitermelésű folyamatsorral lehetőség van szelektív jelölésre, mely kísérleti terveinkhez elengedhetetlen.



16. ábra. A FAD szintézise



17. ábra. FAD. Az izotópjelzett atomok reagenseredete a 12. táblázatból olvasható ki.

12. táblázat. A FAD izotópjelzett atomjainak eredete

Jelzett atom	Reagens molekula
N ₁ , C ₂ , N ₃	Urea
C ₄ , C _{4a} , C _{10a}	(Monoetil-)malonsav
N ₅	Nátrium-nitrit
C _{5a} , C ₆ , C ₉ , C _{9a}	2,3-butándion ^a
C ₇ , C _{7a} , C ₈ , C _{8a}	2,3-butándion ^a
N ₁₀	Hidroxil-amin
C _{1'} , C _{2'} , C _{3'} , C _{4'} , C _{5'}	Ribóz
N _{1''} , C _{2''} , N _{3''} , C _{4''} , C _{5''} , C _{6''} , N _{6a''} , N _{7''} , C _{8''} , N _{9''} , C _{1'''} , C _{2'''} , C _{3'''} , C _{4'''} , C _{5'''}	ATP

^aA két molekula ellentétes lefutásban épül be.

4.2. Pontmutációs konstruktok létrehozása

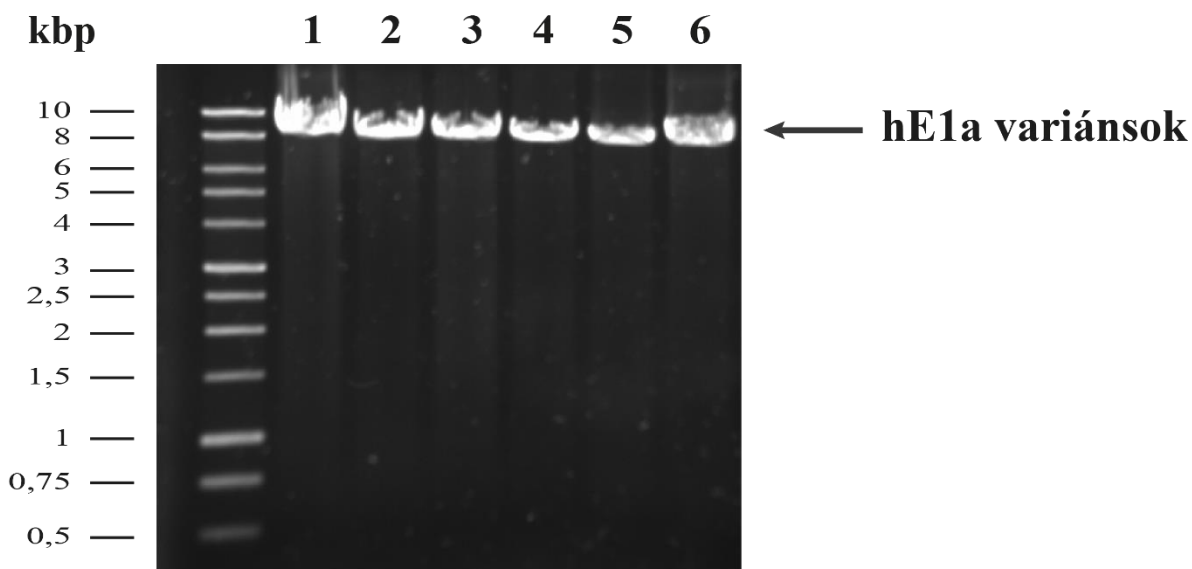
4.2.1. hE3 mutáns változatok

A laboratóriumi igényeknek megfelelően létrehoztam a munkánk során elengedhetetlen rekombináns fehérjék expressziós plazmidjait. Elsősorban a fehérjekristályosításba bevont mutáns hE3 változatokra koncentráltam (I12T, K37E, G101del, G194C, I318T, M326V). A kulcs aminosavak szerepének felderítése érdekében további, a természetben elő nem forduló mutáns módosulatoknak megfelelő plazmidokat (G194A, H329Q) is előállítottam.

A végcéljüket ért projekteken túl munkám során olyan tapasztalatot szereztem, mely elengedhetetlen volt a mienktől eltérő plazmidok hasonló processzáálásához.

4.2.2. hE1a mutáns változatok

A Rutgers Egyetemen folyó kutatómunkám (Erasmus+ ösztöndíj, 5 hónap) egyik feladata volt a hE1a enzim bizonyos patogén mutánsait kódoló expressziós plazmidok létrehozása. A kiválasztott mutánsok többségét (L234G, Q305H, R455Q, G729R, P773L) nekem kellett létrehoznom. Ezt minden esetben sikeresen meg is valósítottam (18. ábra).



18. ábra. hE1a variáns plazmidok analízise agaróz gélelektroforézissel. Az *in vitro* helyspecifikus mutagenézissel létrehozott plazmidokat agaróz gélelektroforézisnek és etídium-bromidos festésnek vetettük alá. A közel 8 kDa-os vad típusú (1) és az L234G, Q305H, R455Q, G729R, valamint P773L szubsztitúcióknak megfeleltethető mutáns plazmidok (2-6) pozíciója 20 perc inkubáció után UV-fény alatt vált láthatóvá.

4.3. A hKGDHk természetes és módosított alegységeinek expressziója és tisztítása

A laboratóriumunkban a hE3 fehérje vonatkozásában rutinszerűen alkalmazott protokoll adta az alapját a további fehérjék megtisztításának. Célom minden esetben az optimális expressziós körülmények beállítása volt. Természetesen meg kellett vizsgálnom a kinyerhető szolúbilis fehérjék mennyiségét is és ehhez képest kellett módosítanom a tisztítási protokollunkat.

4.3.1. A hE2k expressziója és tisztítása

Vizsgálataimat négy paraméterre terjesztettem ki, melyek kombinációjaként létrejövő mátrix legjobb esetét tekintetem az optimális expressziós körülménynek. Kísérleti körülményeim az alábbiak szerint álltak fel.

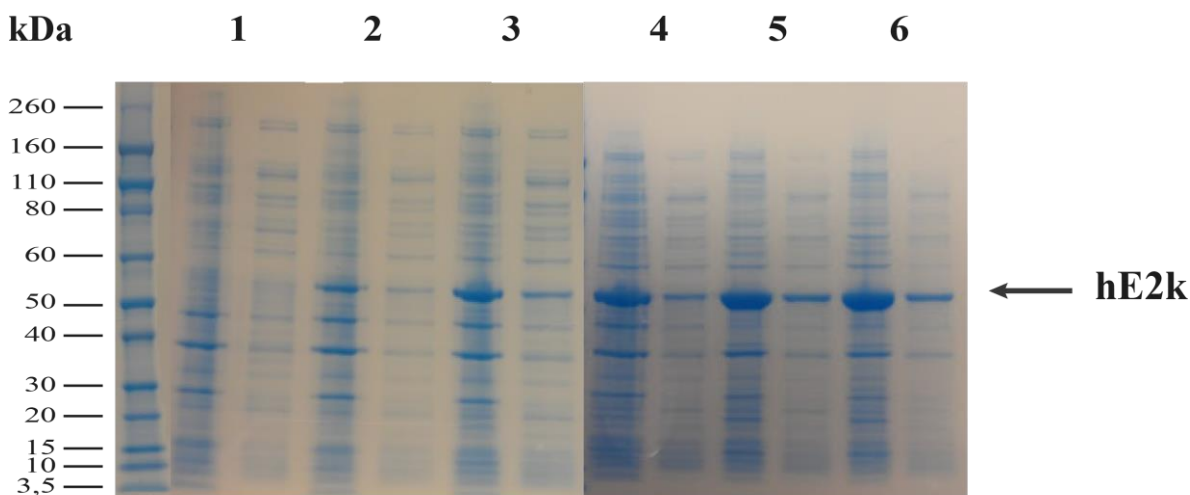
Indukciós pont: OD=0,5, 2,0

IPTG koncentráció: 0,3, 1 mM

Expresszió hőmérséklete: 12, 20, 25 °C (25 °C-os expresszió esetén 37 °C-on történő – indukció előtti – növesztés után az alapprotokollnak megfelelően)

Expresszió hossza: 5 min, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 és 24 h

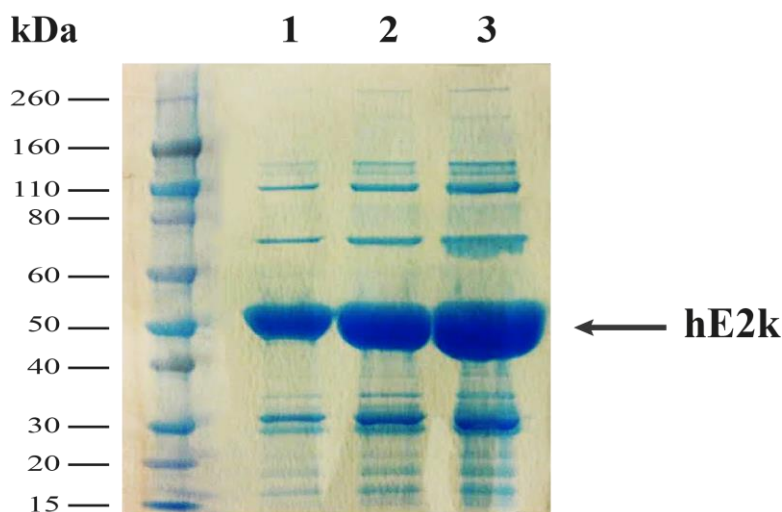
A konstrukt N-terminális végén *Twin-Strep* címkével ellátott fehérje számára legmegfelelőbbnek a 20 °C-on történő expresszió bizonyult. Az OD=0,5-nél 0,3 mM IPTG-vel történő indukció optimalizációját a 19. ábra reprezentálja. (A 3.4.1.1. Fehérjeexpresszió fejezetben leírtaknak megfelelően a hE2k fehérje megfelelő hajtogatódása érdekében 0,3 mM LS jelenlétét igényelte a fehérjeexpresszió.)



19. ábra. A hE2k indukciós próbái. A minták 0,3 mM IPTG 0,5 OD-nál történő hozzáadása után növekvő időmúlás szerint kerültek az LDS-PAGE gélekre. A 20 °C-on pelletbe zárt, illetve szolúbilis formában megjelenő fehérjék felváltva követik egymást 0, 1, 2, 3, 10 és 15 h (1-6) indukciós idők szerint. A bal oldalon húzódó markersáv a *Twin-Strep*-hE2k konstrukt (MW=45,5 kDa) azonosítását hivatott elősegíteni. (A hKGDHk más alegységeinél is gyakran tapasztalt, nagyobb molekulatömegnél jelentkező sávok a látszólagos elektroforetikus mobilitás jelenségére vezethetőek vissza.)

Megállapítható volt, hogy ugyan a pelletekbe kerülő fehérje aránya jelentős, ám a szolúbilis fázisban lévő mennyiség mégis megfelelő tisztítási kísérleteim megkezdéséhez. Mivel a 15 órás expresszió nyújtotta a legjobb opciót, így e mellett döntöttem (13. táblázat).

A tisztítási protokoll nem igényelt módosítást, így a 20. ábrán látható tisztaságnak megfelelően sikerült a krio-EM vizsgálatokhoz mintát előállítanom.



20. ábra. A hE2k tisztítási eredményei. A bekonzentrált és puffercserélt mintákat növekvő mennyiségben (2, 6, 10 μ l; 1-3) vittem fel az LDS-PAGE géltre.

4.3.2. A hE1k expressziós kísérletei

A hKGDHk első alegysége esetén sokkal hosszabb optimalizációra volt szükség. Ennek oka a fehérje feltételezhető kisebb szerkezeti stabilitásából eredő nagyfokú érzékenysége lehet.

Ebből adódóan a hE2k esetén felvetett négy paramétert szélesebb skálájú vizsgálatnak vettem alá. Kísérleti körülményeim az alábbiak szerint álltak fel.

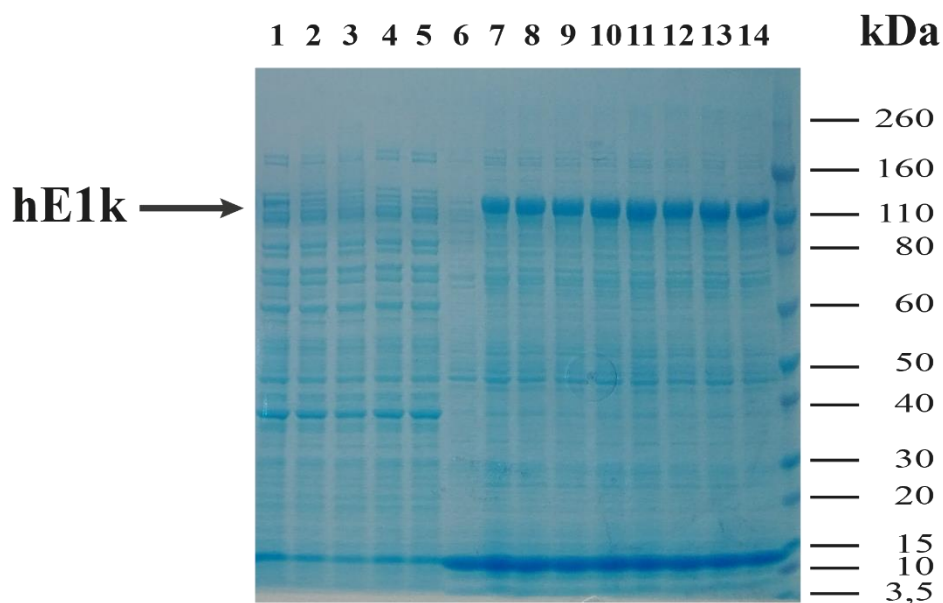
Indukciós pont: OD=0,2, 0,4, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,1, 1,3, 1,5 és 1,7

IPTG koncentráció: 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,0, 1,1, 1,3 és 1,5 mM

Expresszió hőmérséklete: 12, 20, 25, 30 és 37 °C (25 °C-os expresszió esetén 37 °C-on történő – indukció előtti – növesztés után az alapprotokollnak megfelelően)

Expresszió hossza: 5 min, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 és 24 h

A kísérleteket kezdetben az *original linker*es változattal, míg később a *Twin-Strep* címkével ellátott fehérjekonstrukttal hajtottam végre. A már kezdetben is tapasztalt alacsony koncentrációjú szolúbilis fehérje frakciót látva az inklúziós testképzés által pelletként megjelenő frakciókat is megvizsgáltam (21. ábra).



21. ábra. hE1k indukciós próbák eltérő IPTG koncentrációk mellett. A gél az indukció során keletkező fehérje szolúbilis, illetve pelletbe zárt frakcióit is bemutatja az alábbi paraméterek szerint.

Indukciós pont: OD=0,5

Expresszió hőmérséklete: 12 °C

Expresszió hossza: 24 h

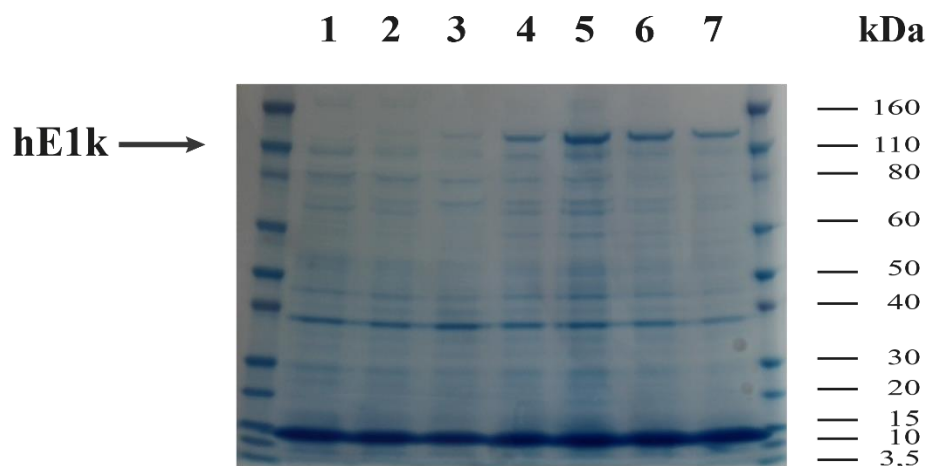
Szolúbilis frakciók IPTG koncentrációi: 0,7, 0,9, 1,1, 1,3 és 1,5 mM (1-5)

Pelletbe zárt frakciók IPTG koncentrációi: 0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3 és 1,5 mM (6-14)

A markersáv a jobb oldalon húzódik.

A szolúbilis fázis egyetlen kísérleti paraméter csoport esetén sem eredményezett megfelelő mennyiségű fehérjét. Megoldási lehetőséget nyújthatott volna a fehérje natív konformációjának visszaállítása, melyet azonban a már eredendően is meglévő stabilitási problémából adódóan igyekeztünk elkerülni.

Más konstruktok esetén használt tisztítási kísérleteink megmutatták, hogy az affinitás címkék számának növelésével nő az elúcióval és így a tisztítással kinyerhető fehérjék mennyisége. Tapasztalataink alapján a *Twin-Strep* címkés, illetve *original linker*s változatok között sokszor többszörös szorzó írható le a végső fehérjekitermelés tekintetében. Ebből kiindulva az affinitás címkék számának növelése mellett döntöttünk, mely alapján az N-terminális mellett a C-terminálist is elláttam két-két affinitás címkével. Az így nyert fehérjemintákkal készült LDS-PAGE gélek a 22-23. ábrákon vannak reprezentálva.



22. ábra. hE1k indukciós próbák eltérő hosszúságú expressziós idők mellett I. A gél az indukció során keletkező fehérje pelletbe zárt frakcióját mutatja be az alábbi paraméterek szerint.

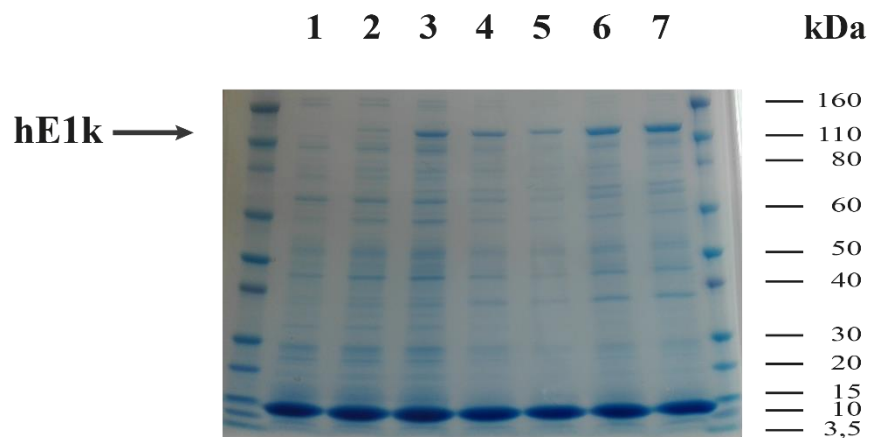
Indukciós pont: OD=0,5

IPTG koncentráció: 0,3 mM

Expresszió hőmérséklete: 20 °C

Expresszió hossza: 0, 1, 3, 5, 7, 9 és 10 h (1-7)

A markersávok a kép szélein húzódnak.



23. ábra. hE1k indukciós próbák eltérő hosszúságú expressziós idők mellett II. A gél az indukció során keletkező fehérje szolúbilis frakcióját mutatja be a 22. ábránál leírtaknak megfelelően. A markersávok a kép szélein húzódnak.

A szolúbilis frakciók továbbra is fennálló viszonylagosan alacsony fehérjetartalma ellenére is méltán bizhattunk az alegység hatékony megtisztításában. Ebből kifolyólag a tisztítás próbája mellett döntöttünk. Mivel az optimalizációs kísérletek csekély eltérést mutattak, a munkafolyamat sebessége felértékelődött. Így az eredeti protokollt alkalmaztam (13. táblázat).

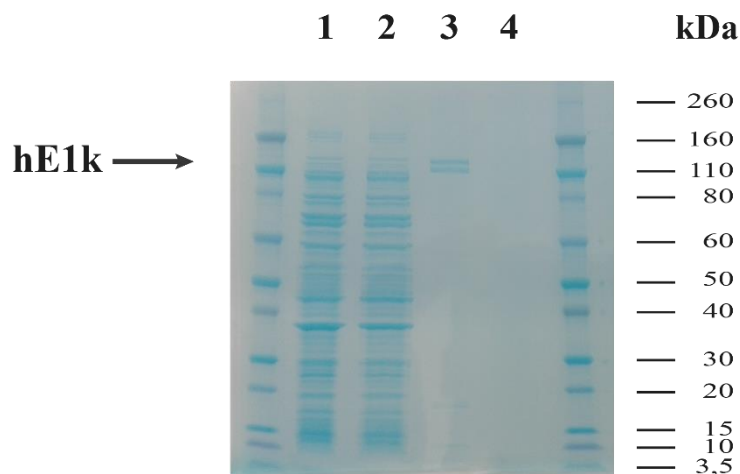
13. táblázat. A hE1k és a hE2k optimális expressziós körülményei

	Indukciós pont (OD érték)	IPTG koncentráció (mM)	Expresszió hőmérséklete (°C)	Expresszió hossza (h)
hE1k	0,5	1	37/25	3
hE2k	0,5	0,3	20	15

4.3.3. A hE1k tisztítása

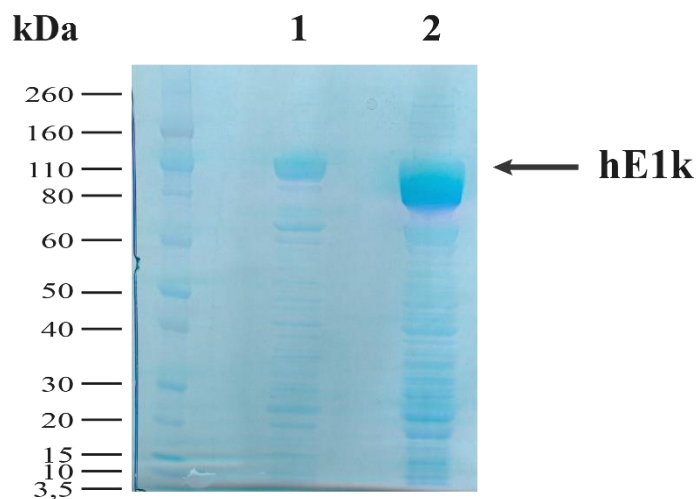
Az alacsony várható hozam okán, a nem specifikusan kötődő szennyezők mennyiségét csökkentendő kevesebb kolonna alkalmazása mellett döntöttünk. Emellett azonban, a fehérje egyedi viselkedése ezen a ponton is megmutatkozott. Az egy kolonnával és a hozzáigazított folyadéktérfogatokkal megtisztított mintával puffercsere és bekonzentráció után nyert gékép meglepő módon kettős tisztítási frakciót mutatott (24. ábra). Ez felvetette egy esetleges szennyező vagy bomlási termék jelenlétét, melyeket

azonban kizárt a tömegspektrometriai analízis. Egyértelmű volt a két frakcióban található fehérjék szekvenciaazonossága. Következtetésünk a két csíkot a hE1k különböző konformációjú és így más mobilitási tulajdonságú vagy koszubsztrátját, a ThDP-t tartalmazó, illetve vesztett változataival azonosította.



24. ábra. A hE1k tisztítása. A 37 °C-on történő előnövesztés után OD=0,5 mellett 25 °C-on indukáltam (1 mM IPTG-vel), 3 órán keresztül. A tisztításhoz a kismértékű kitermelés miatt elegendő volt egyetlen affinitáskromatográfiás oszlopot használnom. Balról jobbra a következő frakciók láthatóak: tisztítatlan frakció (1); „*flow-through*” frakció (2); oszlopon megkötött, eluált, puffercserélt és bekoncentrált minta (3); ultrafiltrációs szűrlet frakció (4). A markersávok a két szélén húzódnak.

Az előállított fehérjéssel elsődleges célom kristályosítás volt, így komoly problémát jelentett az esetlegesen egyszerre jelenlévő két konformer. Ennek okán a fehérje egy új, amerikai együttműködő partnerünk által javasolt protokoll szerinti előállítása mellett döntöttünk. Az így megtisztított homogén, relatíve nagy mennyiségű és tisztaságú fehérjével (25. ábra) megkezdtem kristályosítási kísérleteimet.



25. ábra. A hE1k tisztított és puffercserélt terméke. A 3.4.2. A hexahisztidin címkével rendelkező hE1k fehérjekonstruktt című fejezetben leírtaknak megfelelően tisztított fehérje 2 (1), illetve 13 µl-es (2) mintáit vittem fel LDS-PAGE gélre. A markersáv a bal oldalon húzódik.

Az optimalizált tisztítási protokoll szerint nyerhető fehérjéket kristályosítási és más típusú kísérleteinkben használtuk.

4.3.4. A szolúbilis hdE3 expressziója

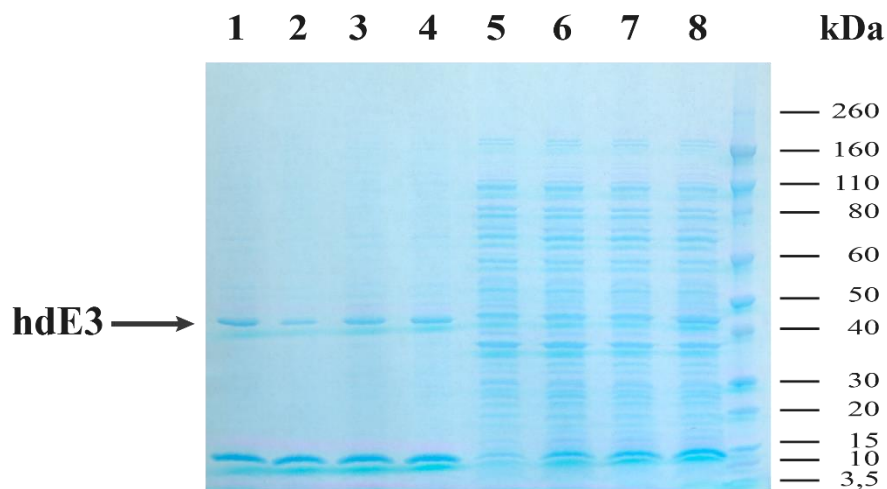
A korábbi optimalizációs kísérletek eredményeire alapozva vizsgálataimat három paraméterre szűkítettem. Az indukciós pontot minden esetben OD=0,5-re rögzítettem. A mátrix méretét csökkentve így az alábbiak kombinációit alkalmaztam.

IPTG koncentráció: 0,5, 1,0 mM

Expresszió hőmérséklete: 12, 20, 25 °C (25 °C-os expresszió esetén 37 °C-on történő – indukció előtti – növesztés után az alprotokollnak megfelelően)

Expresszió hossza: 5 min, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 21 és 28 h

(26. ábra)



26. ábra. hdE3 indukciós próbák. Az LDS-PAGE gél az indukció során keletkező fehérje szolúbilis, illetve pelletbe zárt frakcióit is bemutatja az alábbi paraméterek szerint.

Expresszió hőmérséklete: 25 °C (37 °C-on történő – indukció előtti – növesztés után az alapprotokollnak megfelelően)

Pellet frakciók sorrendben (1-4):

- 0,5 mM IPTG, 2 h expresszió;
- 0,5 mM IPTG, 3 h expresszió;
- 1,0 mM IPTG, 2 h expresszió;
- 1,0 mM IPTG, 3 h expresszió

Szolúbilis frakciók sorrendben (5-8):

- 0,5 mM IPTG, 0 h expresszió;
- 0,5 mM IPTG, 1 h expresszió;
- 0,5 mM IPTG, 2 h expresszió;
- 0,5 mM IPTG, 3 h expresszió

A markersáv a jobb oldalon húzódik.

Sajnos a fehérjék nagyfokú inklúziós testekbe záródásával kellett szembesülnöm az optimalizációs körülménytől függetlenül. A hE1k fehérjével szemben itt már nem volt alternatíva a natív konformáció helyreállítására, elsősorban a később beépítendő stabil izotópok ára miatt. Ezt felismerve minél nagyobb frakciót igyekeztem pelletbe juttatni,

melyet az indukciós hőmérséklet 37 °C-on tartásával, illetve a folyamat 10 óráig történő futtatásával értem el.

4.3.5. A natív konformációjában helyreállított hdE3 tisztítása és szerkezetvizsgálata

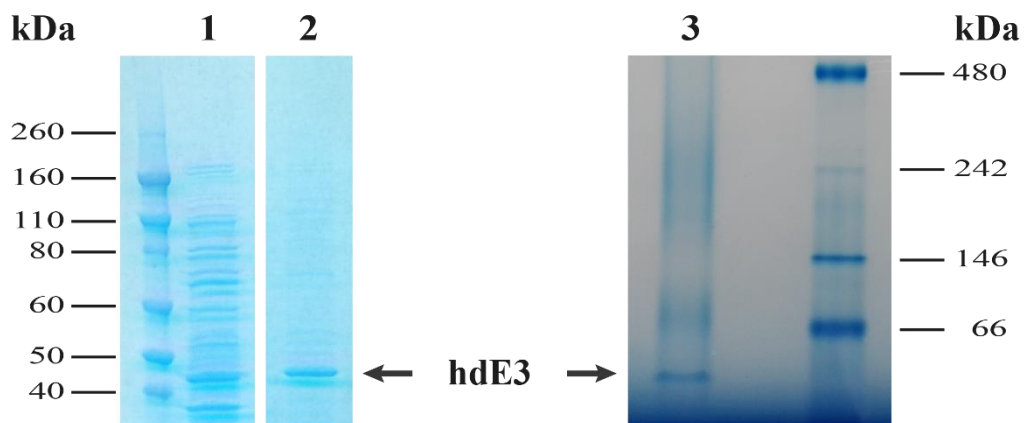
4.3.5.1. Natív konformáció helyreállítása és tisztítás

A hdE3 konstrukt esetén továbbra is fennálló alacsony stabilitás okán a témavezetőm által korábban kidolgozott protokoll [123] részleges módosítása mellett döntöttünk. A fehérjék kitapadási tulajdonságaira alapozva a dialízis lépés helyett direkt kihígításra tértem át, így a megszokottnál jóval nagyobb mintatérfogattal dolgoztam

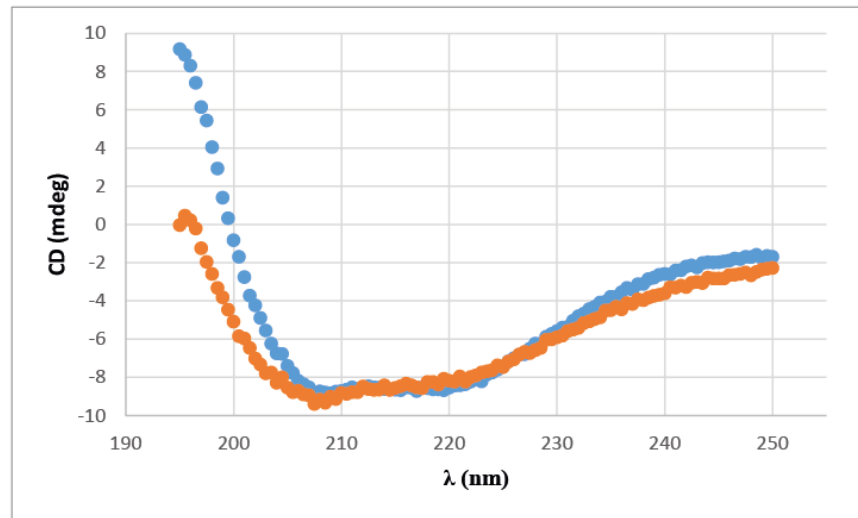
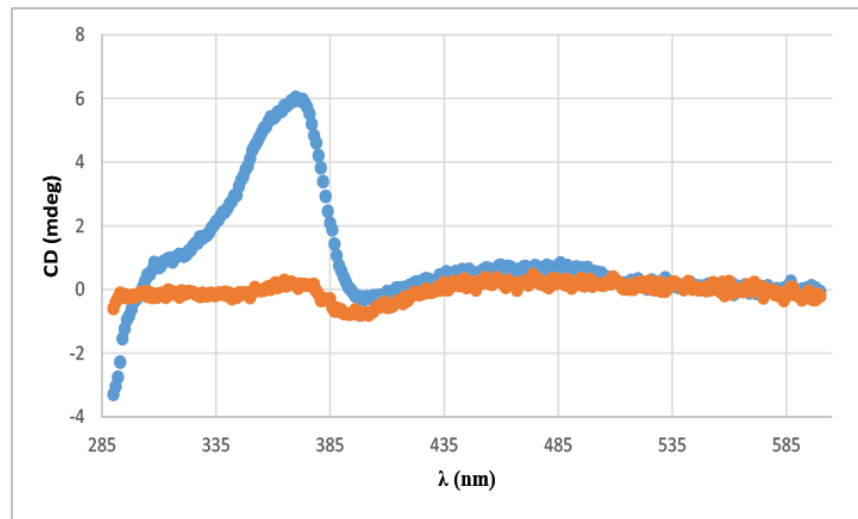
A stabilitási probléma a tisztítás során is fellépett, melytől az FPLC készüléket alaposabb szűréssel védtem meg (azaz az általánosnál többször cseréltem a készülék inline filterét). A keletkező fehérje hőre érzékenységet mutatott, de a kapott koncentráció elegendőnek tűnt NMR-spektroszkópai vizsgálatokhoz.

A minimum médiumban végrehajtott expresszió LDS-PAGE gélelektroforézissel igazolt sikeressége bizonyította fehérjénk előállíthatóságát (27. ábra). A ¹⁵N izotópot tartalmazó ammónium-kloridon és természetes izotópeloszlású glükózon alapuló minimum médiumban felnövekvő, megnyújtott indukciónak kitett kultúrából a fentieknek megfelelően (inklúziós testek kinyerése, natív konformáció visszaállítása, tisztítás) nyert fehérje mintát puffercsere után bekoncentráltam.

A natív konformációjában helyreállított fehérje monomer oligomerizációs státuszát natív gélelektroforézissel (27. ábra), míg megfelelő feltekeredését/konformációját CD-spektropolarimetriával (28. ábra) ellenőriztem.



27. ábra. A **hde3** gélelektroforézis eredményei. Az LDS-PAGE denaturáló gélelektroforézis során a 40 kDa-os fehérje a szolúbilis fázissal összevetve (1) nagy homogenitású frakcióként jelent meg a pelletben (2). Az eredendően dimer hE3 fehérje dimerizációs doménjétől megfosztva natív gélelektroforézis (3) során is monomerként jelentkezett. A markersávok a két gél külső szélein húzódnak.

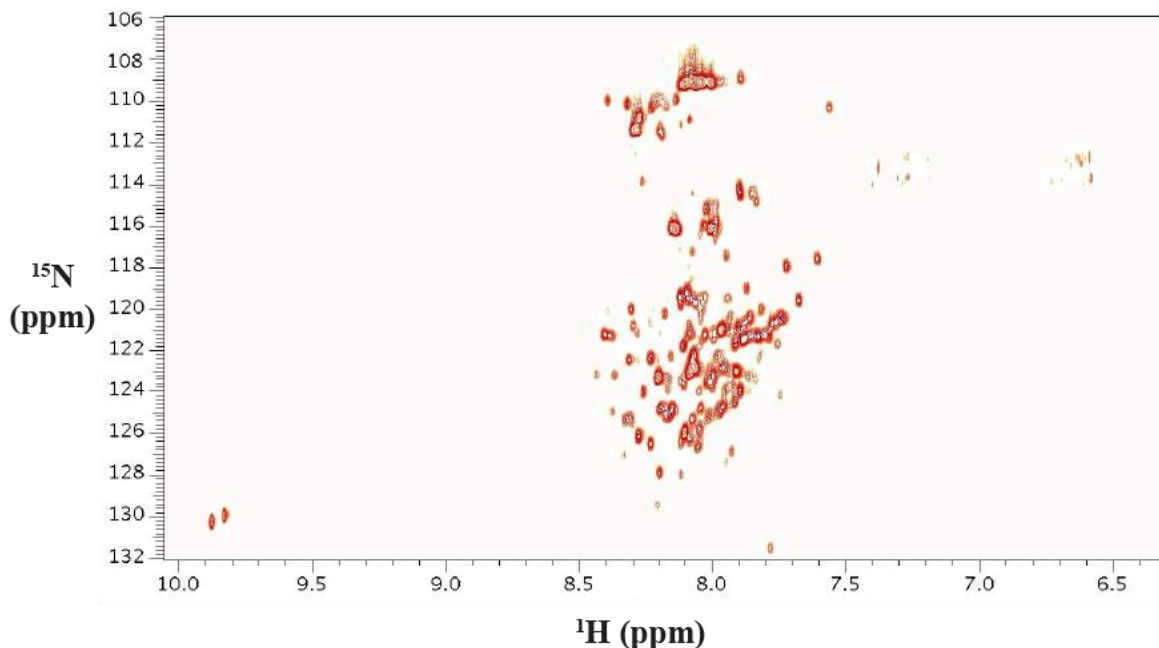
A**B**

28. ábra. A hE3 és a hdE3 CD spektrumai. A. 190-250 nm. A dimerizációs domén deletált fehérje (sárga) spektruma nagyfokú hasonlóságot mutatott a vad típusú fehérje (kék) esetén jelentkezővel. A másodlagos szerkezeti elemeket jellemző régióban meglévő eltérés a deléciós domén hiányának következménye lehet. **B.** 290-600 nm. Az A alábrával azonos jelölés mellett a dimerizációs domén deletált konstrukt a FAD-ra jellemző hullámhossz tartományban jelentős eltérést mutatott.

A CD spektrumok alapján a fehérje megfelelően feltekeredett állapotban volt. A FAD-ra jellemző hullámhossz tartomány pedig azt sugallta, hogy a FAD-kötés jelentősen

meggyengülhetett (vagy teljesen megszűnhetett, esetleg a FAD izoalloxazin markáns szerkezeti átalakuláson is átesett).

A Bradford fehérjeméréssel megállapítottan 0,1 mg/ml koncentrációjú minta alkalmas volt NMR-spektroszkópai mérésekhez. A mintát 7,5 (v/v)%-nyi nehézvízzel kiegészítve hűtött fejes, 800 MHz-es NMR készülékben vizsgáltuk. Előzetes kísérletként egy ^1H - ^{15}N HSQC (gNHSQC) mérést hajtottunk végre (29. ábra).



29. ábra. ^1H - ^{15}N HSQC (gNHSQC) NMR-kísérlet a ^{15}N -jelzett hde3 mintán. A ^{15}N -jelzett fehérjénket 800 MHz-es készülékkel 280 K-en vizsgáltuk. A 0,1 mM koncentrációjú fehérje minta a pufferkomponenseken túl (50 mM K-PO₄, pH=7,3) 7,5 (v/v)% nehézvizet is tartalmazott.

Sajnos még a magas térerejű készülék sem tette lehetővé a megfelelő jeldiszperzációt. A spektrum egyszerűsítése céljából a *Twin-Strep* címke eltávolítása mellett döntöttünk. Ehhez ki kellett dolgoznom annak folyamatát.

4.3.5.2. A *Strep* affinitás címke eltávolítása

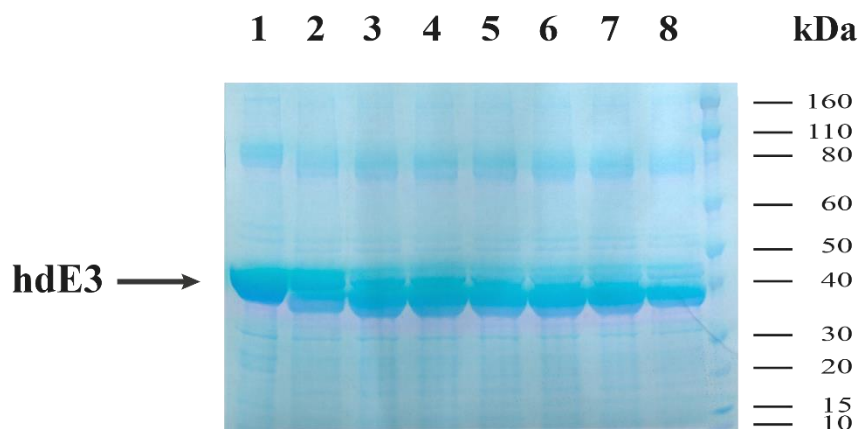
A pET52b(+) plazmid által kódolt HRV 3C proteáz hasítóhely lehetőséget ad az affinitás címkék eltávolítására, melyhez a PierceTM HRV 3C Protease Solution Kit mellett

döntöttünk. Vizsgálataimban (a kit ajánlásait nem figyelmen kívül hagyva) az alábbi paramétereket kívántam optimalizálni.

Hasítási idő: 5 min, 1, 3, 6, 10, 16, 25 és 33 h

Hasítandó fehérje mennyisége: 10, 50, 100, illetve 200 μg (2 nemzetközi egységnek megfelelő HRV 3C proteázra számolva)

(30. ábra)

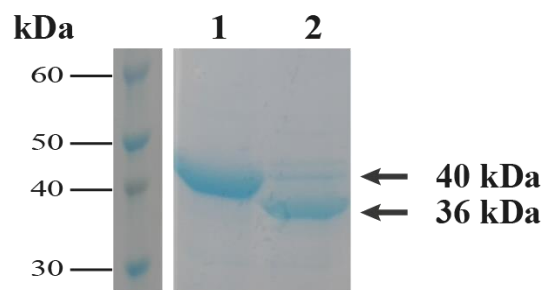


30. ábra. Az affinitás címke lehasításának folyamata. A 4 °C hőmérsékletű reakcióelegy a hde3 fehérje 200 μg -jának oldatán túl a hasítóenzim pufferelt oldatát (1 μl HRV 3C oldat, 10 μl 10X HRV 3C Reaction Buffer 100 μl -re kiegészítve) tartalmazta. Az elegy 5 min, 1, 3, 6, 10, 16, 25, illetve 33 óra (1-8) után vett 10-10 μl -es mintája került a géltre. A markersáv a jobb oldalon húzódik.

Látva hogy a protokoll megváltoztatása nem segít a folyamat hatékonyságán, a 200 μg -nak megfelelő fehérje mintát 16 óra hasításnak tettem ki. Ezentúl meg kellett szabadulnom a továbbra is jelenlévő proteáztól, illetve a levágott, izotóposan jelölt címkétől.

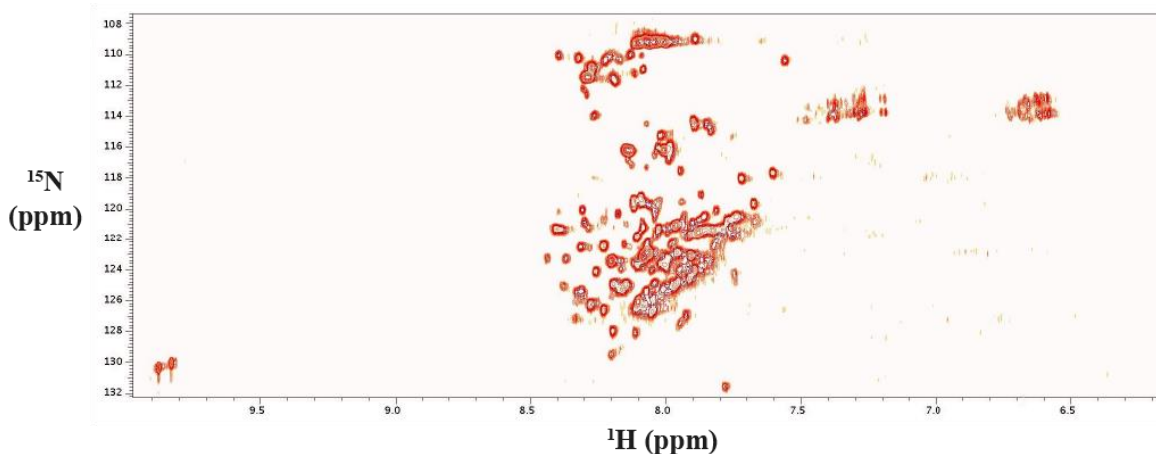
Az előbbit (a kit leírásának megfelelően és mivel GST affinitás címkével lett fuzionáltatva) kihorgonyozott glutationt tartalmazó oszloppal történő centrifugálással távolítottam el. Az utóbbtól a kismértékű kitermelés okán, a fehérje kitapadásának esélyét minimalizálendő az FPLC tisztítórendszer kiterjedt csőhálózata helyett gravitációs alapú tisztítással szabadultam meg.

Az így konstruktjában, illetve mintájában is affinitás címkéjétől elválasztott, ^{15}N -jelölt fehérjét használtam a további NMR-spektroszkópiai vizsgálataimban (31. ábra).



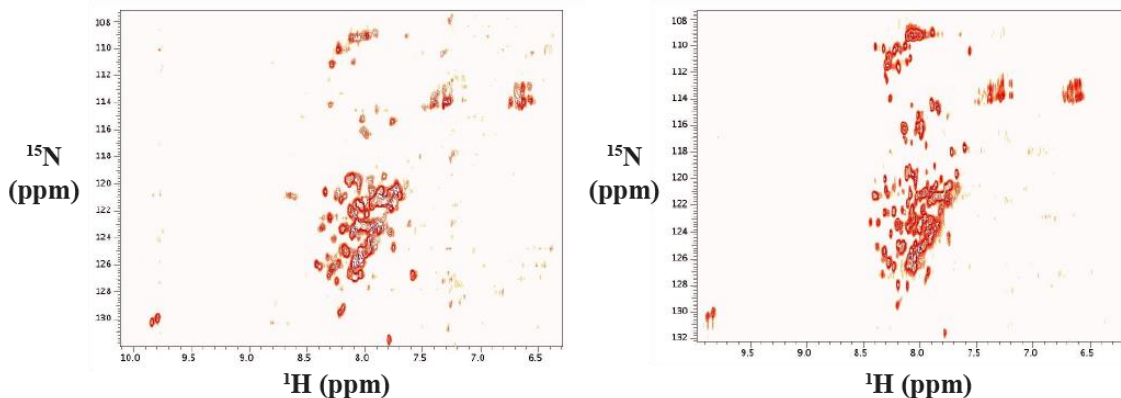
31. ábra. Az affinitás címkéjétől megfosztott hde3 konstrukt. Az affinitás címkét a 40 kDa-os konstrukt tiszta mintájának (1) HRV 3C proteázzal 4 °C-on történő 16 órás kezelésével távolítottam el. Az így létrejött 36 kDa-os fehérjét tartalmazó mintát (2) NMR-kísérletekben használtuk.

A fenti folyamatsor által az NMR spektrum a korábbinál jelentősen nagyobb jelgazdagságot mutatott (32. ábra).



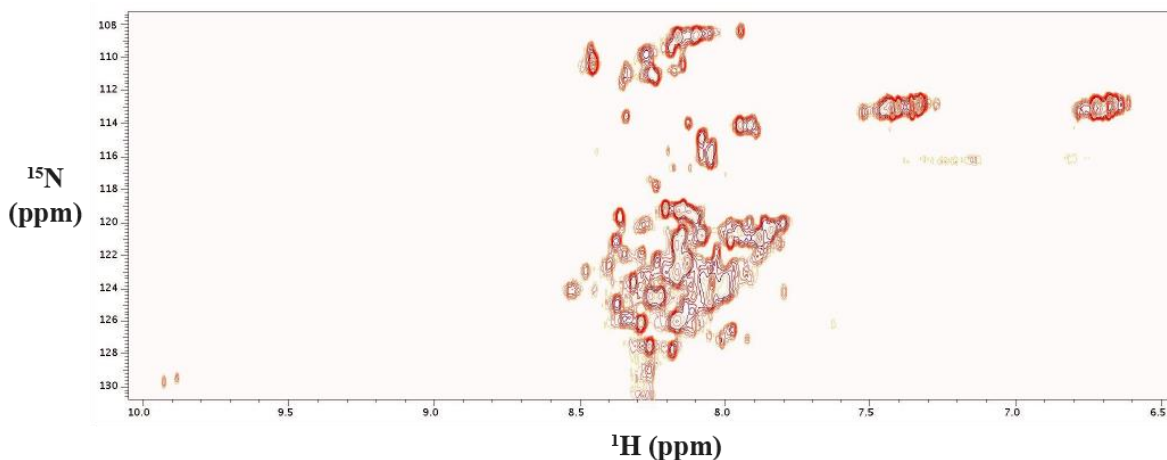
32. ábra. Az affinitás címkéjétől megfosztott hde3 konstrukt ^1H - ^{15}N HSQC (gNHSQC-TROSY) NMR spektruma. Az 50 μM fehérje minta pufferén túl (50 mM K- PO_4 , pH=7,3) 7,5 (v/v)% nehézvizet is tartalmazott. A kísérletet 277 K-en hajtottuk végre.

Azonban még ekkor sem rendelkeztem az aminosavak számához mérten elégséges keresztcsúccsal. Mivel a hőmérséklet jelentős emelésére továbbra sem volt lehetőség, így a jobb jelerősség érdekében a fehérjét savas közegbe helyeztem. Ezt az eredeti puffer 50 mM K- PO_4 , pH=5,0 pufferre való cseréjével értem el (33. ábra).



33. ábra. Az affinitás címkéjétől megfosztott hde3 konstrukt ^1H - ^{15}N HSQC (gNHSQC, illetve gNHSQC-TROSY) NMR spektrumai pH=5,0-nél. Az 50 μM fehérje minta pufferén túl (50 mM K- PO_4 , pH=5,0) 7,5 (v/v)% nehézvizet is tartalmazott. A kísérletet 277 K-en hajtottuk végre.

Emellett az enzim kosubsztrátjának hozzáadásával is igyekeztem tovább javítani a jelminőséget (34. ábra).



34. ábra. Az affinitás címkéjétől megfosztott hde3 konstrukt ^1H - ^{15}N HSQC (gNHSQC) NMR spektruma NAD^+ jelenlétében. Az 50 μM fehérje minta pufferén túl (50 mM K- PO_4 , pH=5,0) 7,5 (v/v)% nehézvizet és 10 mM NAD^+ -ot is tartalmazott. A kísérletet 277 K-en hajtottuk végre.

Sajnos a körülmények ilyen mértékű változtatása sem volt elégséges ahhoz, hogy a fehérje teljes szerkezetének meghatározását elkezdhessük ezzel a technikával.

4.4. A hKGDHk alegységeinek röntgenkristallográfiai analízise

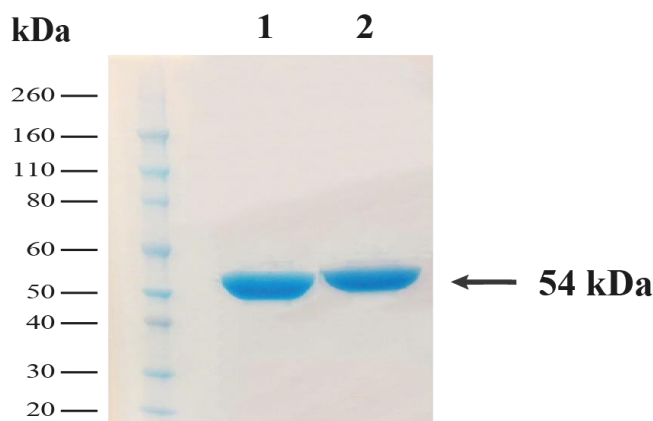
4.4.1. A hE1k fehérje kristályosítási próbái

A hE1k kristályosítási kísérleteibe mindkét tisztítási protokollal előállított mintát bevontam.

A szekvencia mindkét végén *Twin-Strep* címkével ellátott fehérjekonstrukt a Hampton Research oldatsorozataival sajnos csak nagyon alacsony szintű eredményeket adott. Mivel a kristályosíthatóság egy fontos befolyásoló faktora a konformációs homogenitás, így célszerűvé vált egy más típusú konstrukt kísérletekbe való bevonása. A másik konstrukt (hexahisztidin címkével ellátott hE1k konstrukt, a Rutgers egyetemi projektből) esetén némi javulás volt tapasztalható, ám a két legjobb oldatsorozat (*Index* és *Crystal Screen*) eredményei sem mutattak elég ígéretes képet a kristályosodás tekintetében.

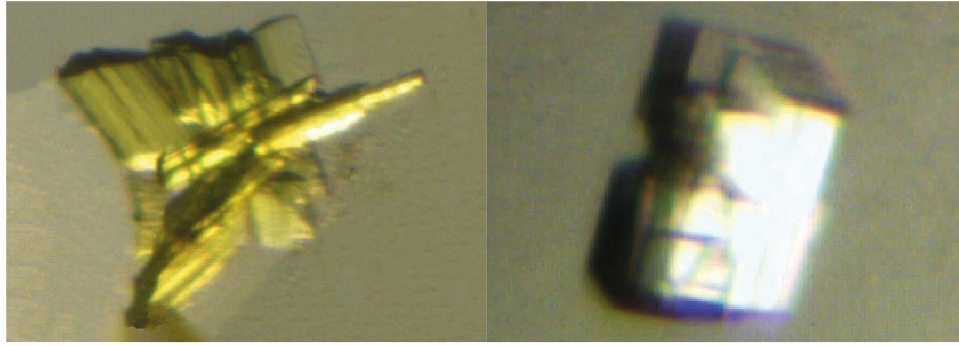
4.4.2. A hE3 mutáns variánsok kristályosítási próbái

Kísérleteinket ezen esetben is a Hampton Research oldatsorozataival kezdtem. A fehérje minták rendkívül magasfokú tisztasága (35. ábra) jelentős mértékben növelte az esélyeket.



35. ábra. Tisztított K37E- (1) és E340K-hE3 (2) fehérje minták. Az LDS-PAGE gél az 54 kDa-os fehérjéken túl bal oldalt markersávot is tartalmaz.

A létrejött kezdeti K37E-hE3 kristályok (36. ábra) minősége sajnos nem volt elégséges szerkezetmeghatározáshoz, ám kiváló alapot jelentett a munkatársaim által folytatott későbbi optimalizációkhoz.



36. ábra. K37E-hE3 kristályok. A kristályok az *Index Screen* 83., illetve 85. számú oldatkörülményei (0,2 M MgCl₂, 25 (w/v)% PEG-3350 – eddig mindkét esetben – és rendre 0,1 M Bis-Tris, pH=6,5, illetve 0,1 M Tris, pH=8,5) mellett jöttek létre.

Az E340K-hE3 esetén alkalmazott kristályosítási próbák csak mikrokristályokhoz vezettek. Ezek szintén jó optimalizációs alapnak bizonyultak.

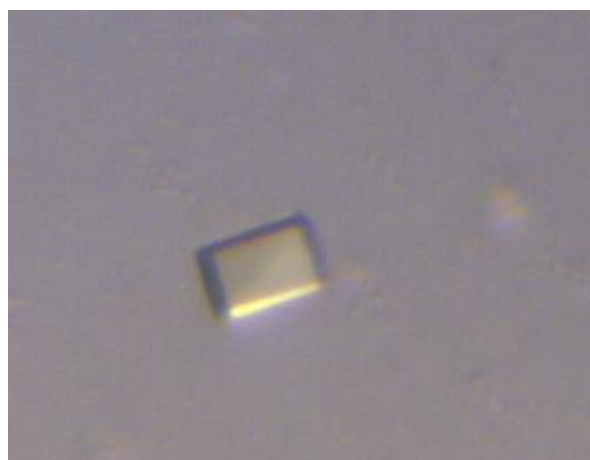
4.4.3. A vad típusú hE3 kristályosítása és röntgenkristallográfiai szerkezete

Egy már több hE3 mutáns fehérje esetén alkalmasnak bizonyuló (14. táblázat), a laboratóriumunkban kifejlesztett optimált oldatsorozattal kezdtem meg a vad típusú változat kristályosítását. A kísérletek (a fehérje koncentrációjának helyes megválasztása után) számos gyengébb minőségű változathoz, valamint a 37. ábrán látható jó minőségű egykristályhoz vezettek.

14. táblázat. A hE3 vad típusú és mutáns változatai esetén laboratóriumunkban született néhány egykristály paraméterei

Változat	Monomer egységek száma az aszimmetria egységben	Precipitáló oldat összetétele		
		Puffer	Só komponens	Kicsapószer komponens
vadtípus	8	0,1 M Bis-Tris, pH 7,45	0,2 M MgCl ₂	25 (w/v)% PEG-3350
R447G	2	0,1 M Hepes, pH 7,5	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2 (v/v)% PEG-400
P453L	8	0,1 M Hepes, pH 7,3	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 (v/v)% PEG-400
R460G	2	0,1 M Hepes, pH 6,9	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2 (v/v)% PEG-400
G194C	2	0,1 M Bis-Tris, pH 6,9	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2 (v/v)% PEG-400
R460G	2	0,1 M Bis-Tris, pH 6,5	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2 (v/v)% PEG-400
vadtípus ^a	2	0,1 M Bis-Tris, pH 6,9	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 (v/v)% PEG-400

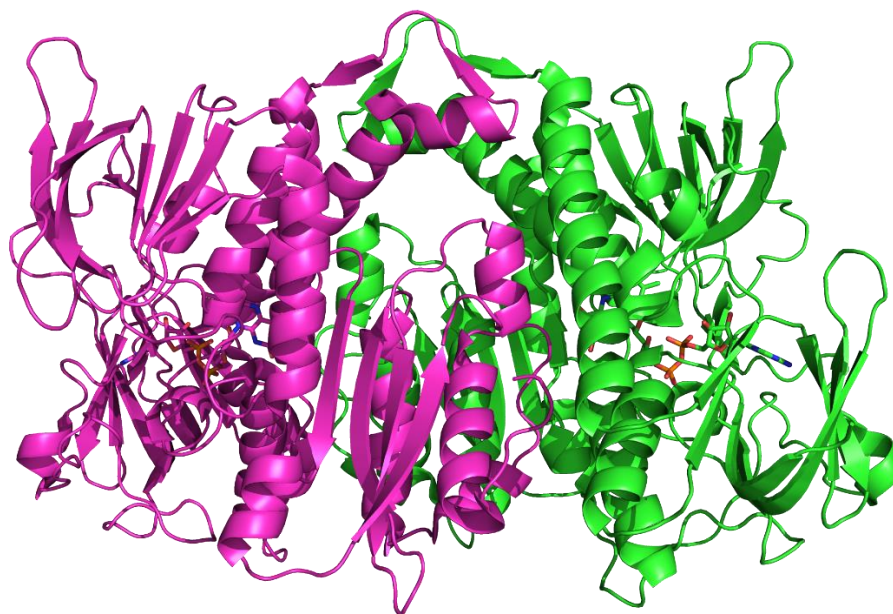
^aa 37. ábrán látható hE3 kristály



37. ábra. A hE3 kristály képe. A kristály egy optimális összetételű oldatban (0,1 M Bis-Tris, pH=6,9, 2 M (NH₄)₂SO₄, 1,5 (v/v)% PEG-400) jött létre.

A fenti kristályból kiinduló szerkezetmegoldás vezetett el a munkacsoportunk által meghatározott, az irodalomban eddig legmagasabb felbontású (1,75 Å) vad típusú hE3 kristályszerkezethez (PDB kód: 6I4Q; 38. ábra). A diffrakciós kísérlet és a szerkezetmegoldás fontosabb lépései, illetve paraméterei a Módszerek fejezetben találhatóak (3.7.2. A vad típusú hE3 röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározása fejezet, illetve 6-8. táblázatok).

Ezen hE3 modell nagy hasonlóságot mutatott az irodalomban megtalálható NAD^+ , illetve NADH ligandummal (koszubsztráttal) komplexált (PDB kód rendre: 1ZMC, illetve 1ZMD [154]), és a szintén a mi laboratóriumunkból származó ligandum nélküli, alacsonyabb felbontású (5NHG [155]) szerkezetekkel (15. táblázat). Jelentős egyszerűsítést jelentett a szerkezetmegoldás során a korábbi nyolc (5NHG szerkezet) helyett két monomer egység jelenléte az aszimmetria egységben. Ez a szerkezet sokkal részletgazdagabb képet mutatott (különösen a dimer belsejében kialakuló $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ -csatornáról) mint az eddigi hE3 szerkezetek. (A részletes elemzés Dr. Szabó Eszter Ph.D. munkája volt.)



38. ábra. hE3-dimer szerkezete. A kialakításban résztvevő két monomer a szalagmodellben zöld és lila színekkel van jelölve. Egy (pálcikamoddellel megjelenített) FAD prosztetikus csoport kötődik egy monomerhez. A széntől eltérő atomok piros (oxigén), kék (nitrogén) és narancssárga (foszfor) színekkel vannak reprezentálva.

15. táblázat. A 6I4Q modell más szerkezetekkel való összevetése^a

Modell	5NHG (ligandum nélküli, laboratóriumunkban megoldott)	1ZMC (NAD ⁺ -komplexált)	1ZMD (NADH-komplexált)
RMSD (C α)	0,309 Å	0,471 Å	0,410 Å

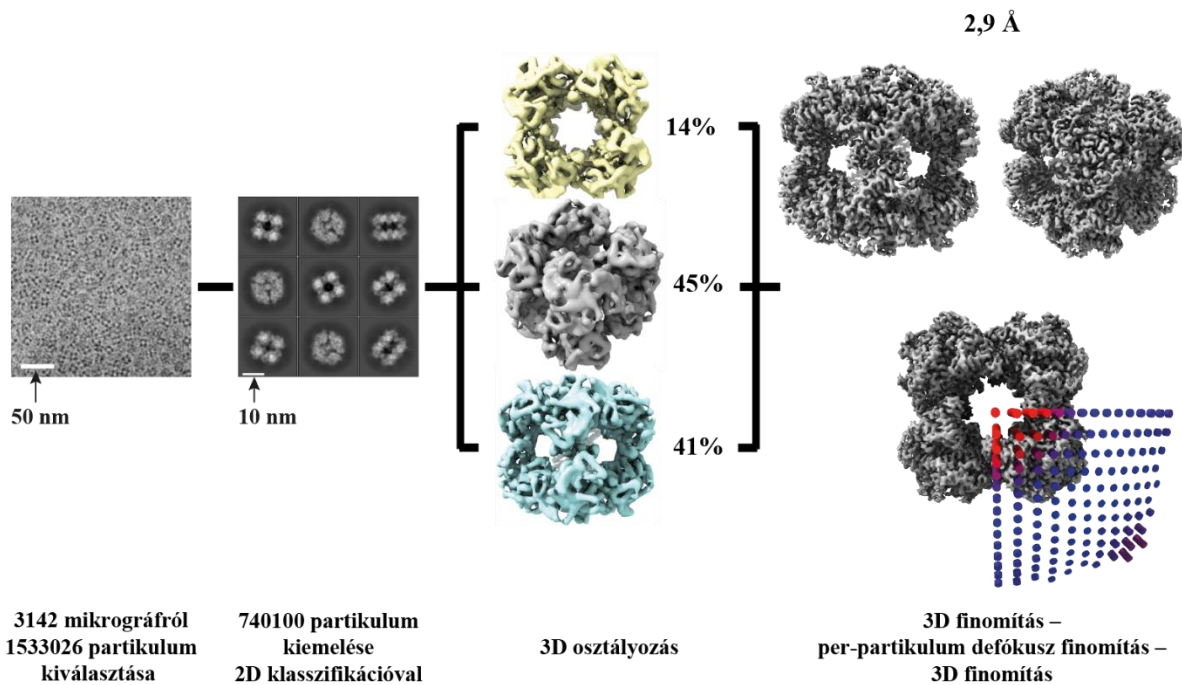
^aA táblázatban szereplő értékek a 6I4Q és a többi modell monomer egységei között megjelenő eltéréseket mutatják.

4.5. A hE2k krio-elektronmikroszkópiai szerkezete és annak analízise

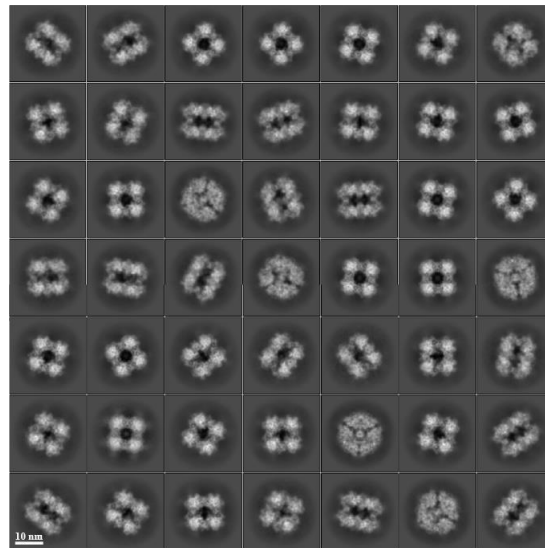
Már az előkísérletek során megszületett képek elővetítették a később megismert szerkezetet. A hE2k multimerjei négyzet alakú képződményekként jelentek meg.

A krio-EM adatgyűjtési kísérlet és a szerkezetmegoldás fontosabb lépései, illetve paraméterei a Módszerek fejezetben olvashatóak (3.8. A hE2k krio-elektronmikroszkópiai szerkezetmeghatározása fejezet, illetve 9-10. táblázatok). Az adatfeldolgozás után egy a tér három irányában szimmetriát mutató kocka alakú test tárult elénk (39-40. ábrák). A 2,9 Å pontosságú denzitás térképen a legmagasabb, 2,5 Å felbontás a nagy rigiditású belső területeken, míg a legkisebb részletgazdagság a csúcsoknál jelentkezett (41. ábra). A nem tömör test üregei a kocka lapjaira nyíltak.

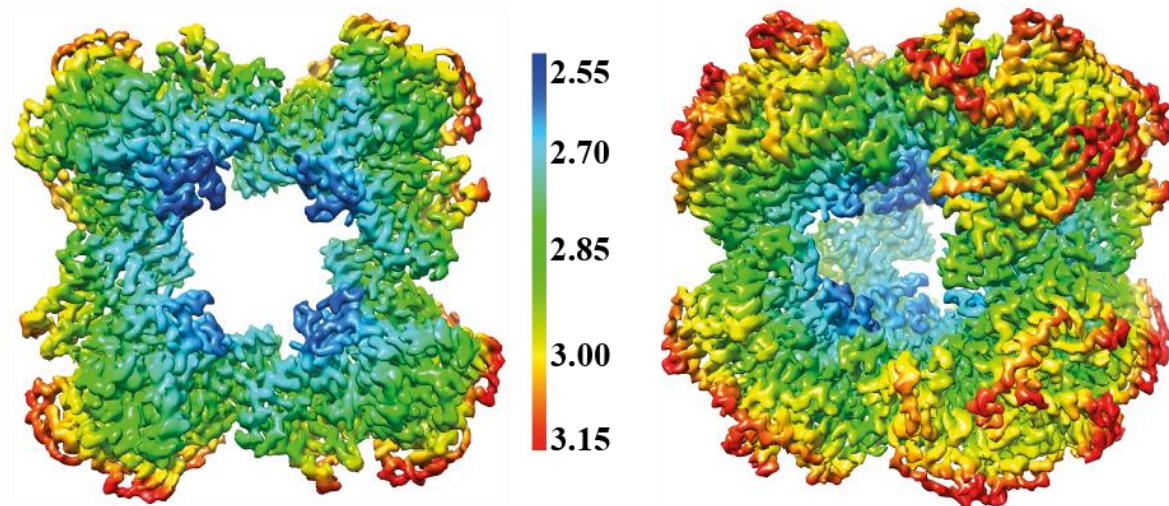
A nagyrészletességű térkép által lehetővé vált a hE2k szekvenciájának beépítése (42. ábra). Ezáltal az aminosavak atomi pontosságú részletességétől egészen a multimer szerkezetig bezárólag lehetőségem adódott a fehérje megismerésére.



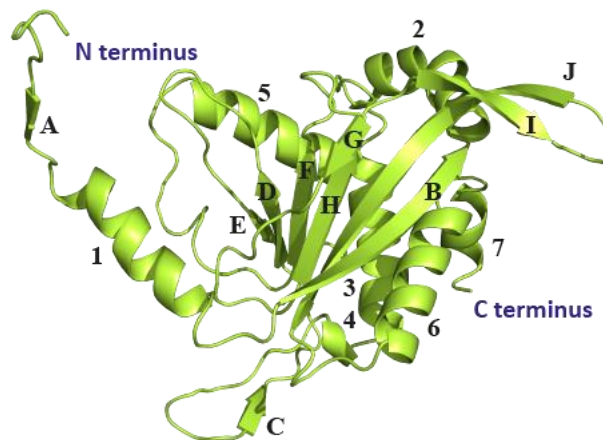
39. ábra. Adatfeldolgozás. A végső térkép 740100 önálló részecske bevonásával készült el. A *Fourier shell correlation*=0,143 kritériumnak megfelelően egy 2,9 Å felbontású térkép keletkezett [156].



40. ábra. Reprezentatív 2D-osztályok a hE2k szerkezetmeghatározása során



41. ábra. A végső hE2k térkép lokális élességei. A színskálán a piros szín jelzi a legkevésbé, míg a kék szín a legjobban meghatározott régiókat.



42. ábra. A hE2k-monomer szerkezete és annak elemei. A hélixek és redők jelölése megfelel az 16. táblázatban leírtaknak. Az N-, illetve C-terminális aminosavak külön is jelölve vannak.

16. táblázat. A hE2k másodlagos szerkezeti elemei. (Ezen táblázat a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Table S2.*)

α -hélixek		β -redők	
H1	Arg162-Ala174	A	Arg157-Lys159
H2	Ser190-His207	B	Met180-Asp188
H3	Met214-Glu227	C	Glu241-Tyr244
H5	Asp275-Arg288	D	Asp249-Ala253
H6	Gly362-Ala375	E	Val264-Arg266
		F	Phe302-Asn306
3_{10} -hélixek		G	Leu313-Gly315
H4	Pro229-Asn232	H	Ala325-His330
H7	Pro379-Leu384	I	Phe333-Ala338
		J	Val343-Asp356

4.5.1. A monomer

Az elektrondenzitás a 151. aminosavtól kezdődően foglalta magába az összesen 386 egységből felépülő fehérjét. Ez döntően a katalitikusan aktív magdomént jelentette, míg a nagyfokú flexibilitást mutató N-terminális szakasz (más rokon fehérjék röntgenkrisztallográfiával megfejtett szerkezetéhez hasonlóan [15, 18, 137, 157]) nem volt látható. A felbontás mértéke az oldalláncok nagypontosságú elhelyezését is lehetővé tette.

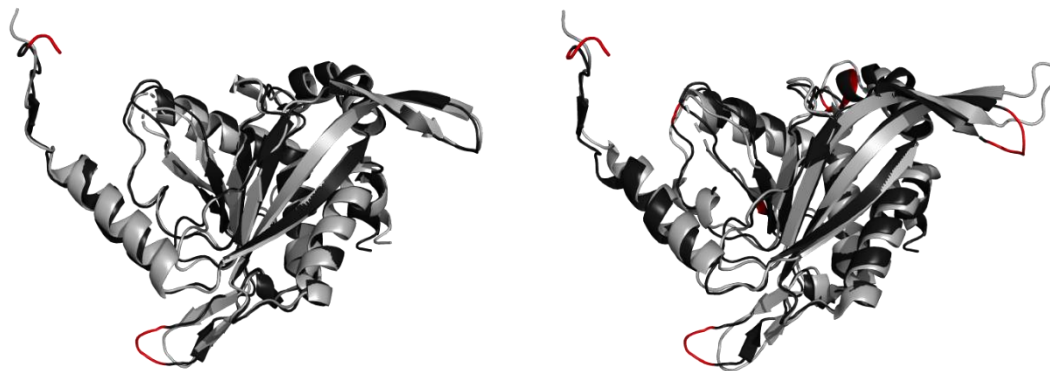
Az alegységet szekvencaanalízisnek és a már ismert szekvenciákkal való összevetésnek alávetve kitűnt, hogy az aciltranszferáz aktivitásért és egyben a szerkezeti alap biztosításáért felelős részt (153-386. aminosavak) sikerült felderítenem. Ezzel szemben az LS kötésért és így az acilgyök szállításáért felelős lipoil domén (LD, 3-77. aminosavak), valamint a perifériás alegységekhez (hE1k és hE3) való kapcsolódásért felelős perifériás alegység-kötő domén (105-173. aminosavak) nagyrésze kívül esett meghatározott szerkezetemen [1, 2, 9-11, 14, 158-161].

A meghatározott monomer szerkezet nagyfokú hasonlóságot mutatott az *E. coli* azonos, illetve a hPDHk hE2p alegységével (43. ábra). A fenti szerkezetek mindegyikére igaz, hogy szekvenciájuk minimum 60%-a besorolható a másodlagos szerkezeti elemek által

meghatározott kategóriákba (ecE2k: 66%, hE2p: 62%, avE2p: 63%). A hE2k esetén ez öt α -hélix, kettő 3_{10} -hélix és tíz β -redő meglétét jelenti (42. ábra, 16. táblázat).

A

B

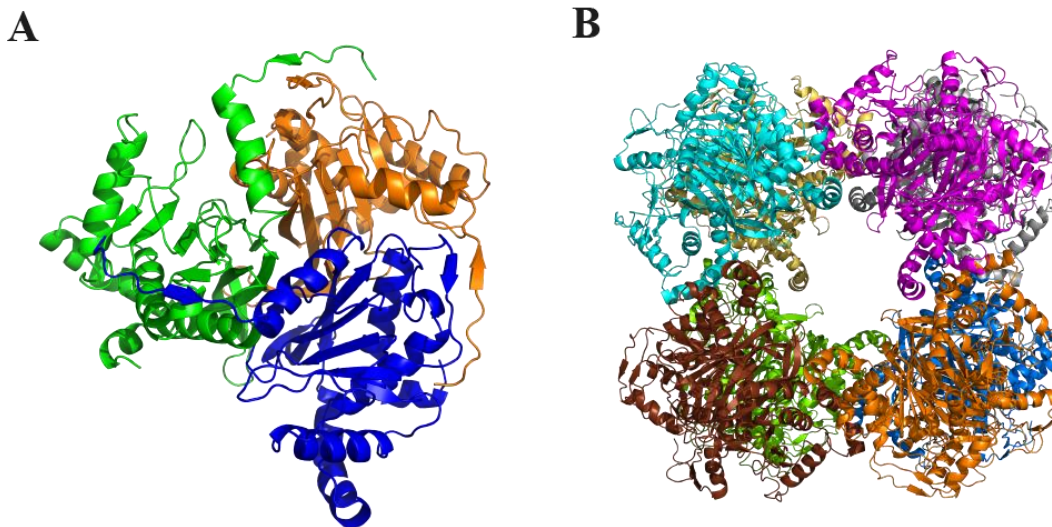


43. ábra. E2 fehérjék magdoménjeinek összevetése. **A.** A hE2k- és az ecE2k-monomerek egymásra illesztése. A világosszürke ecE2k (PDB kód: 1E2O, felbontás: 3 Å, meghatározási módszer: röntgenkristallográfia, aminosavak: 172-404, 233 aminosav) és a sötétszürke hE2k (PDB kód: 6H05, felbontás: 2,9 Å, meghatározási módszer: krio-EM, aminosavak: 151-386, 236 aminosav) szerkezetek nagyfokú hasonlóságot mutatnak ($C\alpha$ -RMSD az ecE2k-ra vetítve: 0,82 Å, 59,8% szekvenciaazonosság a meghatározott régiókra vonatkoztatva). A szignifikáns eltérést mutató régiók (Gly151-Leu152, Asp237-Thr239) a hE2k szekvenciában piros színnel vannak jelölve. **B.** A hE2k- és a hE2p-monomerek szerkezeti összevetése. Kisebb mértékű hasonlóság volt kimutatható a világosszürke hE2p szerkezettel való összehasonlítás során (PDB kód: 6CTO, felbontás: 3,1 Å, meghatározási módszer: krio-EM, aminosavak: 417-647, 231 aminosav; $C\alpha$ -RMSD a hE2p-re vonatkoztatva: 1,07 Å, 32% szekvenciaazonosság a meghatározott régiókra vonatkoztatva). A szignifikáns eltérést mutató régiók (Gly151-Arg153, Lys205-His207, Asp237-Thr239, Ile265, Asn290, Ile339-Lys342) itt is piros színnel vannak kiemelve a hE2k szekvencián.

Kitűnt, hogy a szerkezet belső alapját a β -redők által kialakított csavart lap jelenti, mely a monomer szerkezetet két részre osztja (egyrésről az A, C és G jelű β -redők, valamint az 1. hélix által alkotott csoport, másrésről a többi hélix). A szerkezeti elemek közötti összetartó erőt H-hidak, sóhidak, Van der Waals-kölcsönhatások, valamint π - π interakciók képezik.

4.5.2. Multimerek

A monomerekből szimmetria-operátorok alkalmazásával egy az elektronmikroszkópai képeken már megismert kockaszerkezet rajzolódott ki. A 24 alegységből felépülő üreges kockatest csúcsaiban 3-3 monomer alkotta homotrimerek helyezkednek el (44. ábra). Az így létrejövő homomultimer Oh szimmetriát mutat.



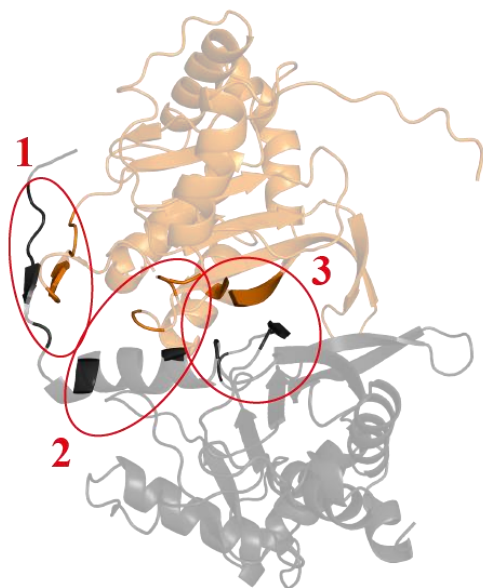
44. ábra. hE2k-multimerek. **A.** A homotrimer szerkezete. A kialakításban résztvevő három monomer különböző színekkel van jelölve. **B.** A homo-24-mer szerkezete. A 8×3 -as szimmetriát mutató képlet a térben kocka alakot vesz fel. A csúcsokat elfoglaló homotrimerek eltérő színekkel vannak jelölve.

A multimer szerkezeten túl az azt kialakító kapcsolati erőket is megvizsgáltam.

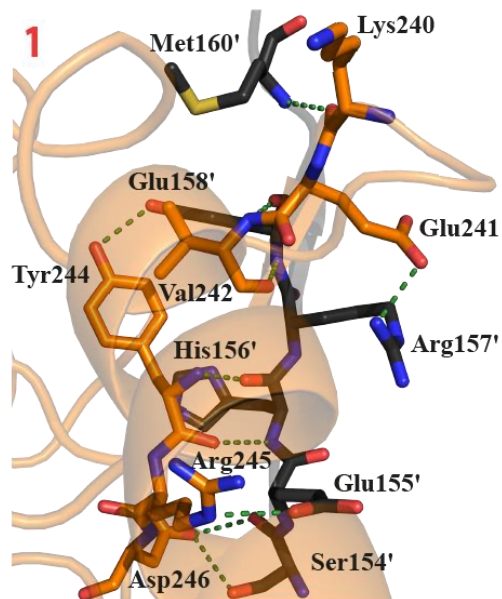
A homotrimerek már önmagukban is egy globuláris szerkezetet vesznek fel, mely legnagyobb kiterjedtségében 79 Å, míg legkisebb kiterjedtségében 43 Å hosszúságú. A 16. táblázatban részletezett másodlagos szerkezeti elemek közül az A, B, C, G és J jelölésű β -redők, valamint az 1. és 6. hélixek vesznek részt a trimereken belül a monomerek közötti kölcsönhatások kialakításában. Ezek a 45. ábrán interakciós pontokként jelennek meg. A körülbelül 14000 Å²-et felölelő monomer felszín 11%-ának elfoglalásával kitűnik, hogy milyen nagy jelentőségük van ezen kapcsolódási pontoknak a belső stabilitás kialakításában.

A fenti érték nagy hasonlóságot mutat a korábban már tárgyalt ecE2k és hE2p szerkezetek trimerformáló felszíneivel.

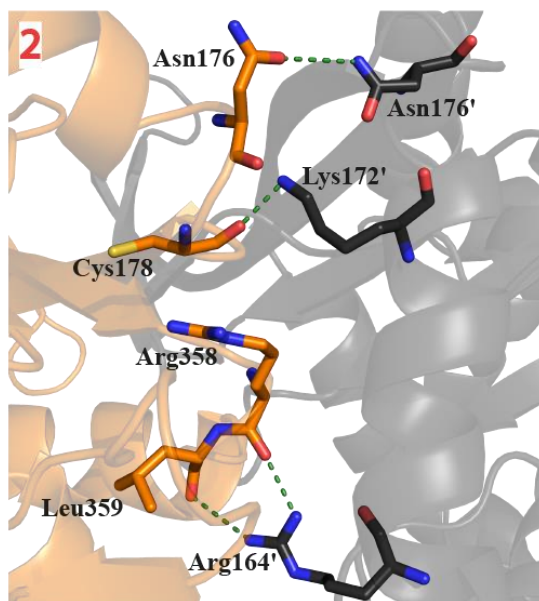
A



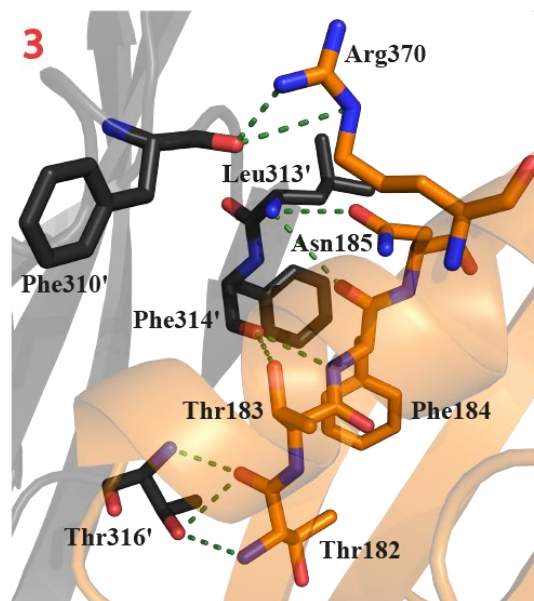
B



C



D



45. ábra. A trimereken belül kialakuló kapcsolatok. A. Két trimeralkotó monomer közötti kapcsolódási pontok. A két szomszédos monomert arany, illetve szürke színek jelölik, míg a legfontosabb szakaszok feketével, illetve narancssárgával szerepelnek. A szalagmodellben reprezentált kapcsolódási pontok piros karikákkal vannak kiemelve és számozva. A számozott régiók részletei a további alábbi ábrákon láthatóak. **B-D.** Interakciós pontok. A két monomer az A panelnek megfelelő színekkel van jelölve. A kötésben résztvevő, a 17. táblázatban külön is részletezett aminosavak pálcikamodelljei feketén és narancssárgán jelennek meg. A széntől eltérő atomok piros (oxigén), kék (nitrogén) és sárga (kén) színekkel, míg az interakciók szaggatott vonalakkal vannak reprezentálva. A szomszédos monomer alegységen szereplő aminosavakat az ' jelöli ki. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure 4.*)

A dihidrolipoamid-aciltranszferázokra általánosan igaz, hogy az általuk alkotott homo- és heterotrimer egységek egymással összekapcsolódva magasabb szintű szerkezeti elemek kialakulását biztosítják. Igyekeztem földéríteni, min alapulnak ezen kapcsolatok.

A hE2k esetén létrejövő, 24 monomer által alkotott kockaszerkezet legnagyobb térbeli kiterjedtségében 169 Å-öt, éleiben pedig 135 Å-öt ölel fel. A belső üreg legkisebb és legnagyobb belső távolságai 55, illetve 84 Å. A trimereknél leírt, β -redők által dominált stabilizáló erővel szemben a 24-mer kialakításában elsősorban a hélixek vesznek részt. A 16. táblázat leírása szerinti 2., 5. és 7. hélixek által kialakított kapcsolódási felszín egy-egy monomer felszínének 8%-át öleli fel. Ez a trimereken belül leírható kapcsolatokhoz hasonlóan erős hasonlóságot jelent a korábban említett E2 szerkezetekkel. A szomszédos monomer egységek között párosával tükrözött, palindrom módon leírható kapcsolati hálózat (46. ábra) a kocka logikáját követve biztosítja a kötetést a minden csúcsban elhelyezkedő trimerek és három megfelelő szomszédos csúcstrimer között. Az így kialakuló kockaélek kötődési pontul szolgálnak a további komplexalkotó alegységek számára.

17. táblázat. A homotrimereken belül kialakuló kapcsolatok^a

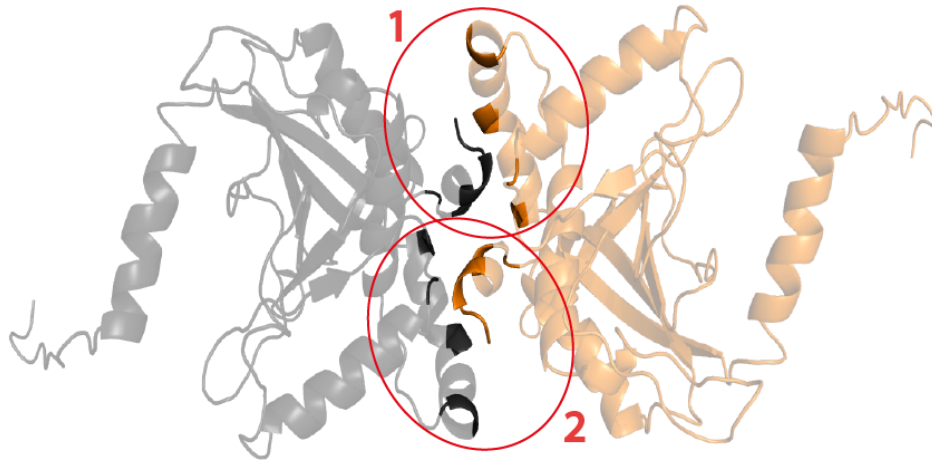
Aminosavak és atomok	Távolság^b (Å)
Ser154(O) – Asp246'(OD2)	3,39
Ser154(OG) – Asp246'(OD2)	3,58
Glu155(OE1) – Arg245'(NE)	3,30
His156(N) – Tyr244'(O)	3,40
His156(O) – Tyr244'(N)	2,96
Arg157(NH1) – Glu241'(OE2)	2,71
Glu158(N) – Val242'(O)	3,44
Glu158(O) – Val242'(N)	3,17
Glu158(OE2) – Tyr244'(OH)	2,94
Met160(N) – Lys240'(O)	3,35
Arg164(NH2) – Arg358'(O)	2,84
Arg164(NH1) – Leu359'(O)	3,39
Lys172(NZ) – Cys178'(O)	2,53
Asn176(OD1) – Asn176'(ND2)	3,40
Thr182(O) – Thr316'(N)	2,93
Thr182(O) – Thr316'(OG1)	3,25
Thr182(N) – Thr316'(OG1)	3,07
Thr183(OG1) – Phe314'(O)	3,33
Phe184(O) – Leu313'(N)	3,38
Phe184(N) – Phe314'(O)	2,95
Asn185(OD1) – Leu313'(N)	2,99
Phe310(O) – Arg370'(NE)	3,50
Phe310(O) – Arg370'(NH1)	2,43

^aA trimereken belüli, eltérő monomerpáronként azonos kölcsönhatások csak egyszer szerepelnek.

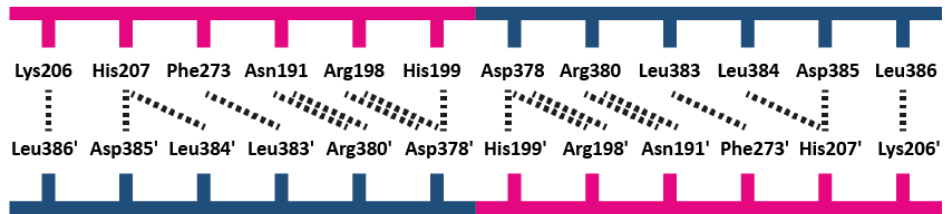
^bAz értékeket a CCP4 szoftvercsomag CONTACT programja biztosította.

(Ezen táblázat a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Table S3.*)

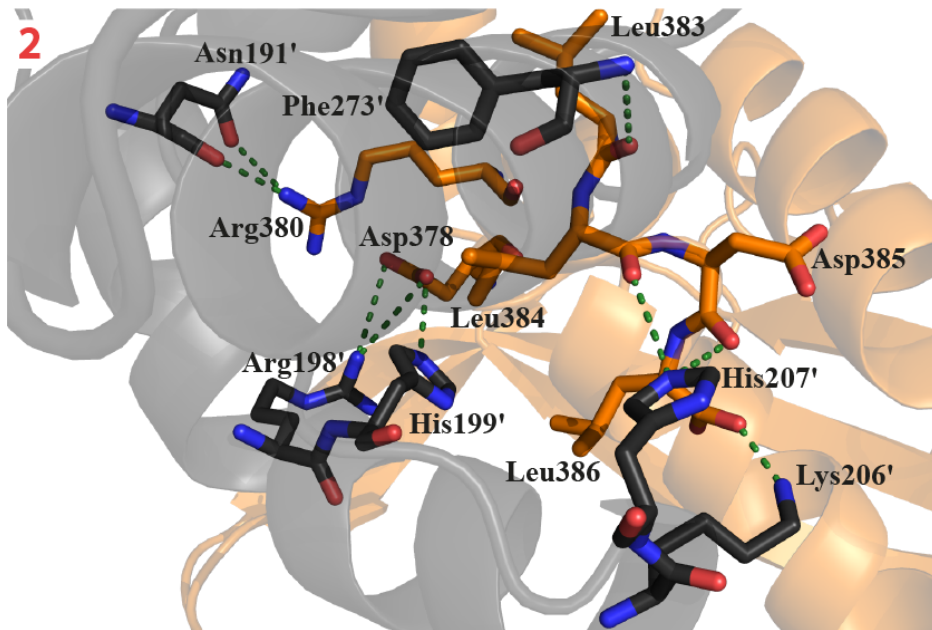
A



B



C



46. ábra. A trimerek között kialakuló kapcsolatok. **A.** Két trimer közötti kapcsolódási pontok. Az ábrázolási mód megegyezik a 45. ábra A paneljénél leírtakkal. **B.** Palindrom módon felépülő két kapcsolódási pont. A kialakuló interakciók szaggatott vonalakkal vannak jelölve. **C.** Az interakciós pontok részletei. Az alábra az A panel mindkét bekarikázott kapcsolódási pontját kinagyítva reprezentálja. Az interakciókban résztvevő, a 18. táblázatban külön is részletezett aminosavak, illetve minden további ábraalkotó a 45. ábra B-D. paneljeinek megfelelően van jelölve. A szomszédos monomer alegységen szereplő aminosavakat az ' jelöli ki. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure 5.*)

18. táblázat. Homotrimerek között kialakuló interakciók^a

Aminosavak és atomok	Távolság ^b (Å)
Asn191(O) – Arg380'(NH1)	2,54
Asn191(OD1) – Arg380'(NH1)	3,12
Arg198(NH1) – Asp378'(OD1)	3,54
Arg198(NH1) – Asp378'(OD2)	3,56
His199(NE2) – Asp378'(OD2)	2,97
Lys206(NZ) – Leu386'(O)	2,32
His207(NE2) – Leu384'(O)	3,38
His207(NE2) – Asp385'(O)	3,10
Phe273(N) – Leu383'(O)	3,39

^aA páronként azonos kölcsönhatások csak egyszer szerepelnek.

^bAz értékeket a CCP4 szoftvercsomag CONTACT programja biztosította.

(Ezen táblázat a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Table S4.*)

A magasabb rendű szerkezetek kialakulásának okát felderítendő megépítettem egy a hE2k-monomerek által létrehozott 60-mer modellt is. Ehhez a megfejtett hE2k-monomer szerkezetet illesztettem be a hE2p esetén szintén krio-EM-mel megoldott elektrontérképbe [158]. (A két szerkezet közötti szekvenciaazonosság a magdomének esetén 32%-os.) A trimereken belül kialakult interakciós hálózatban nem láttam jelentős eltérést a 24-merhez képest, ám a trimerek közötti kapcsolatok száma jelentős csökkenést mutatott (19. táblázat).

A hE2k-24-mer esetén természetes módon létrejövő interakciós hálózat ráadásul nem csak a képzeletbeli 60-merhez képest adott nagyobb kapcsolódási számot, de a többi ismert szerkezetnél (avE2p-24-mer [18], ecE2k-24-mer [137] és hE2p-60-mer [158]) is nagyobb stabilitást sugallt.

19. táblázat. Az E2 fehérjék magdoménjei esetén kialakuló, monomerek közötti kölcsönhatások* [156]

	Trimereken belüli kölcsönhatások száma		Trimerek közötti kölcsönhatások száma	
	H-kötések	Ionpárok	H-kötések	Ionpárok
hE2k (151-386, 24-mer)	22	4	18 ^b	14 ^b
hE2k (151-386, 60-mer ^a)	21	5	4	2
ecE2k (172-404, 24-mer)	16	6	11	4
hE2p (417-647, 60-mer)	18	0	6	2
avE2p (396-638, 24-mer)	21	1	8	0

*Az elemzés a PISA program segítségével készült.

^amesterségesen megalkotott modell

^bA 18. táblázatban közölt adatoktól való eltérés (18+14, illetve 9 interakció) oka a PISA program esetén alkalmazott magasabb peremfeltételi (*cut off*) érték és az ott leírt azonos (palindrom módon megjelenő) kölcsönhatások mindössze egyszeri megjelenítése. A PISA program ezen túl két további interakciót is leírt.

(Ezen táblázat a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Table S5*.)

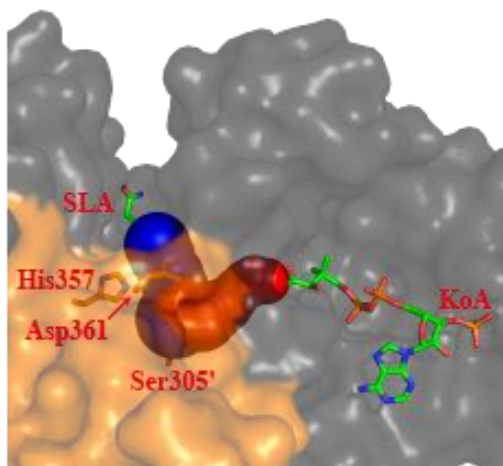
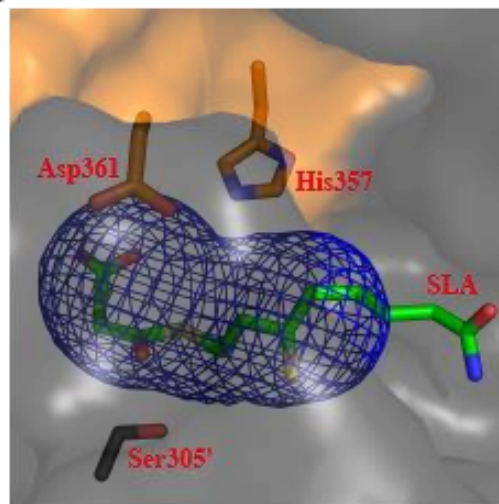
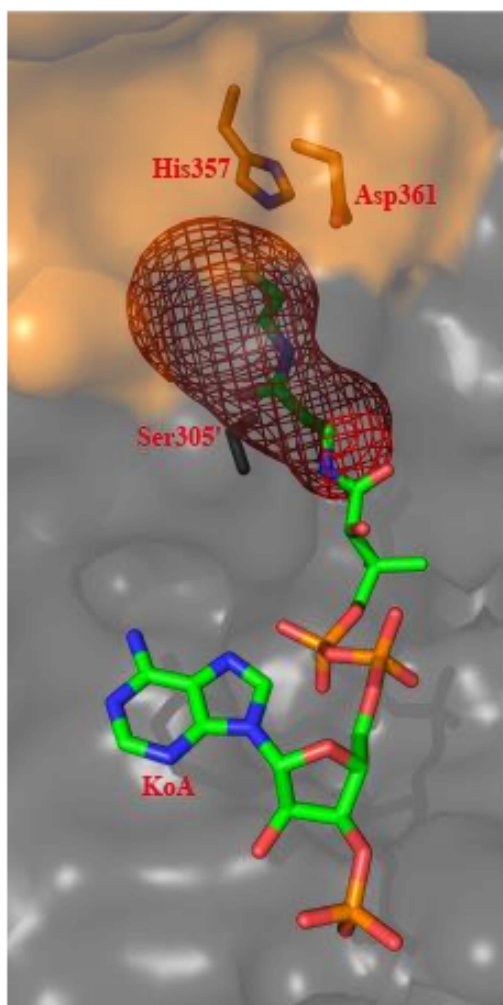
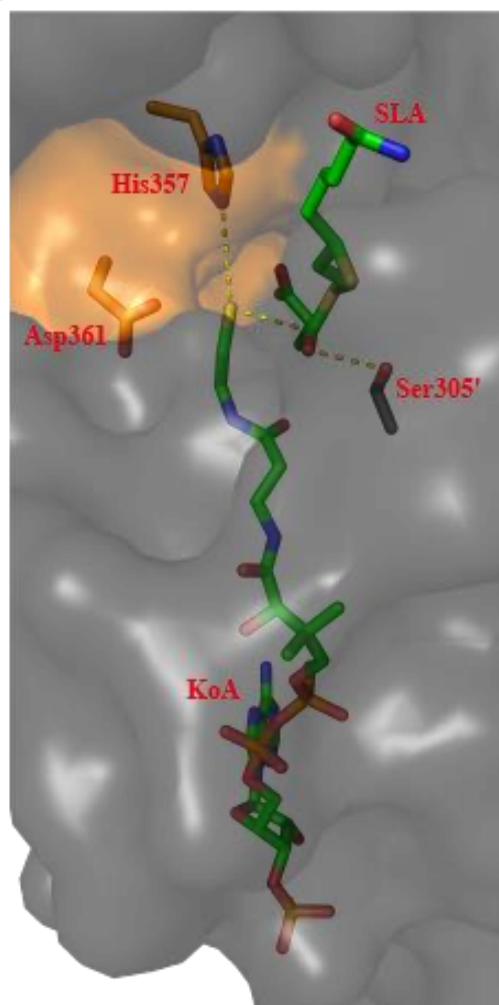
A fentiekén túl érdemesnek tartom megjegyezni, hogy a szerkezetmegoldás 3D osztályozási fázisában megjelent egy különleges, a kockát alkotó 8 trimer szerkezet egyikét nélkülöző csonka kocka változat is. Ez arra utal, hogy a logikus lépéssorozatnak megfelelően a szerkezet felépülése először a trimerek szintjén valósul meg, majd pedig ezek összekapcsolódásával jön létre a teljes kocka.

4.5.3. Az aktív centrum

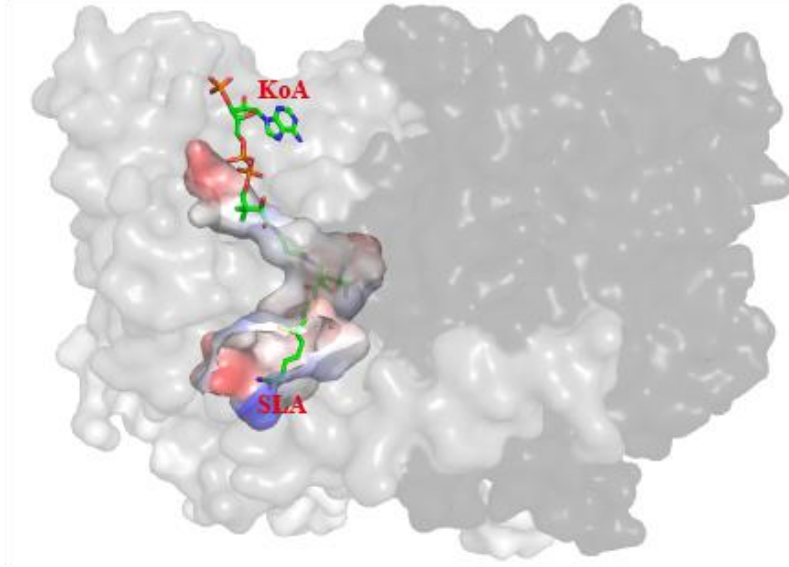
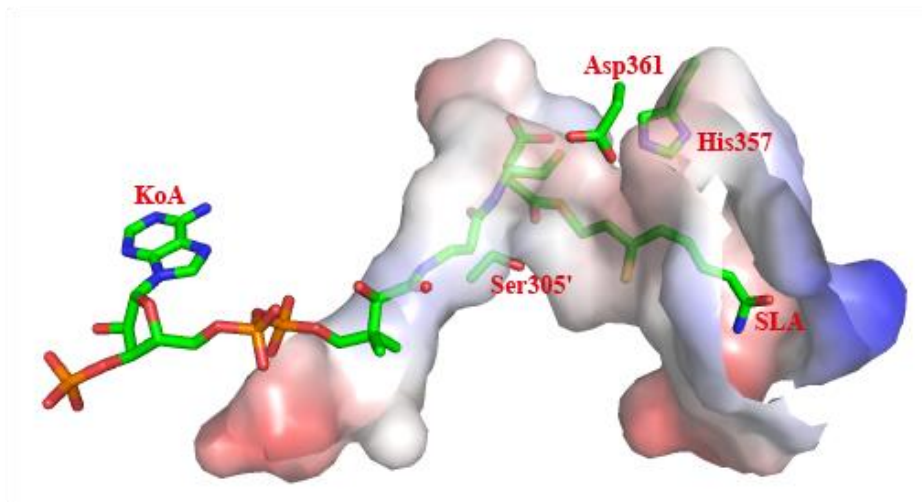
Az avE2p-vel való összehasonlítás alapján azonosítottam az enzimaktivásban kulcsszerepet játszó aminosavakat.

Az enzimes családban jól konzerválódott megfelelő szekvenciaszakaszt megvizsgálva (³⁵⁶DHRXXDG³⁶²) [12] a 357. pozíciót elfoglaló His (His357), valamint az Asp361 és a Ser305' (47-48. ábrák) alkotta katalitikus triádban azonosítottam az aktív centrumot. Legfontosabb szereppel a His357 rendelkezik, mely az Asp361 által kiváltott protonvesztése következtében tudja deprotonálni a csatornahálózaton át befogadott KoA tiolcsoportját [137, 146]. A folyamat eredményeként lép ez a szubsztrát tiolát anionja nukleofil támadásba a szukcinil-DHLA (SLA, a másik szubsztrát) szukcinilcsoportjának karbonil szénatomján. Kijelenthető, hogy a His357 megfelelő pozícióban tartásához elengedhetetlen a két szomszédos aminosav (Asp356 és Arg358) között létrejövő sóhíd, mely a βJ és H6 közötti hurok stabilizálója. A His357 megfelelő tautomerjének kialakulásához elengedhetetlen Asp361 a szomszédos hE2k alegységen elhelyezkedő Arg164'-fal sóhidat kialakítva segíti a protonszívó hatást. Az aktív centrumban harmadikként kulcsszerepet betöltő Ser305' a tetraédes katalitikus intermedier stabilizálásában fontos. (Egy nemrég publikált tanulmány alapján a His357 szerepe szintén ebben van [162].) A fent leírtakat némileg árnyalja, hogy az ecE2k szekvenciában a hE2k-Ser305'-nak megfelelő pozícióban Thr [137], míg az avE2p esetén a hE2k-Asp361-nek megfelelő helyen Asn található [163].

A fenti aminosavak mindegyike egy mindkét irányból átjárható csatornahálózatban helyezkedik el. Az üreget a homotrimerek két, egymással szomszédos monomeregysége alakítja ki (47-48. ábrák). Ez is bizonyítja, hogy az enzimfunkció ellátásához elengedhetetlen az oligomerizáció legalább bizonyos fokú bekövetkezése. A csatorna kialakításában az alábbi másodlagos szerkezeti elemek vesznek részt: βB, βJ, H6, az ezek között lévő kapcsoló régiók, H1', H5', βD'-H', illetve a H2' és H3' közötti kapcsoló régió.

A**B****C****D**

47. ábra. A hE2k-homotrimer szubsztrátszatórnái. A. A két csatornaág és az illeszkedő szubsztrátok. A szubsztrátok végső helyét a szerkezetben a KoA és az SLA energiainimalizáció utáni pozíciója határozta meg. A KoA csak részlegesen lép be a piros színnel jelölt csatornába. Az SLA csatornát kék szín jelöli. A modellgömbök átfedésével leírt csatornahálózat a Caver 3.0 program segítségével megállapított átmérőadatokkal bír. A csatornaképzésben közösen résztvevő monomerek arany és sötétszürke színnel, a katalitikusan fontos aminosavak pálcikamodell ábrázolásban a monomereknek megfelelő narancssárga és fekete színekkel vannak ábrázolva. A széntől eltérő atomok piros (oxigén) és kék (nitrogén) színekkel jelennek meg. A két szubsztrát pálcikamodelljei zöld színben láthatóak, ahol a széntől eltérő, eddig nem említett atomokat sárga (kén) és narancssárga (foszfor) színek jelölik. **B.** Az SLA csatorna. A reprezentálhatóság érdekében a csatorna itt kék hálóként jelenik meg. A többi elem ábrázolása megfelel az A panelnek. **C.** A KoA csatorna. A reprezentálhatóság érdekében a csatorna itt piros hálóként jelenik meg. A többi elem ábrázolása megfelel az A panelnek. **D.** A szubsztrátok és az aktív centrum katalitikusan fontos aminosavai. A kiemelkedően fontos kapcsolatok sárga szaggatott vonallal jelennek meg. A többi elem ábrázolása megfelel az A panelnek. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure 6.*)

A**B**

48. ábra. A csatornahálózat polaritásfelszíne. A. A két csatornaág és szubsztrátjaik. Az oldószer számára elérhető felszínek a szürke szín három (a két monomer és a köztük képződő belső csatornafelszín) árnyalatában mutatkoznak meg. A felszíni polaritás egy választott skála szerint van megjelenítve a programon belül, ahol a piros a negatív, a kék pedig a pozitív polaritást jelöli. A szubsztrátok az 47. ábrának megfelelően vannak reprezentálva. **B.** A csatornahálózat kinagyítása. A szubsztrátok az A panelnek megfelelően vannak megjelenítve. Az aktív centrum aminosavai az 47. ábrának megfelelően, ám zöld színű pálcikamodellben vannak reprezentálva. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure 7.*)

4.5.3. Szubsztrátok megkötése

Az aktív centrum aminosavainak azonosítása után a szubsztrátok kötésében szerepet játszó interakciókat is fel kívántam térképezni. Ehhez analízis alá vettem a teljes, az aktív centrumot is magába foglaló csatornahálózatot és környezetét.

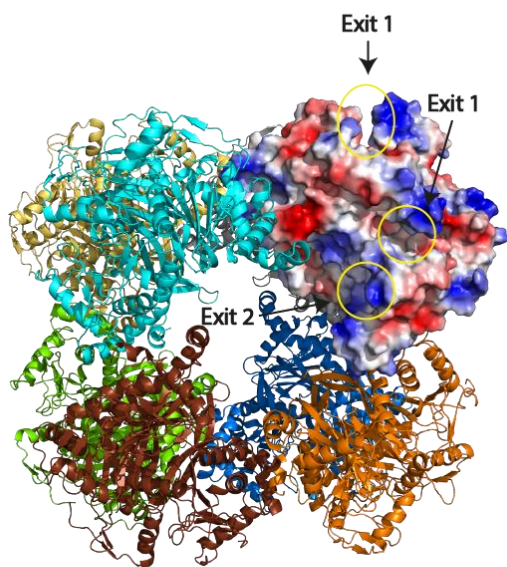
A csatorna két egymásra merőleges szárának bejárata a fehérjefelszínre nyílik [137]. A 4,5 (SLA), illetve 10,2 Å (KoA) hosszúságú csatornaszakaszok átlagos átmérője rendre 2,6 és 1,9 Å. Az SLA a komplex külső felszíne irányából (Exit 1), míg a KoA a magstruktúrába beágyazott, féloldalas pozícióból (Exit 2) közelíti meg az aktív centrumot (49. ábra).

A csatorna belső felületén természetesen számos, a szubsztrátok megkötésében fontos aminosav található. Szekvenciaillesztéseken, illetve a rokon fehérjékkel (ecE2k [137] és avE2p [18, 146]) való összevetéseken alapuló elemzésekkel az alábbi aminosavak szerepe valószínűsíthető a szubsztrátok megkötésében: Arg196', Ser305', Lys210', Ile326, Leu260', Tyr355, Val366, Asn306', Gly307', Ser312', Gly315', His330', Gly362 és Arg363. A jobb megértés és reprezentáció érdekében a két szubsztrátot be is modelleztem a megfelelő csatornába (47-49. ábrák). A modellezéssel kapott térbeli szubsztrátpozíciók alapján az LA kötésében az Asn320'-nak, míg a KoA kötésében a Gly362'-nek, az Arg196'-nak, a Lys210'-nak, az Ala255'-nak, az Asn306'-nak, a Gly307'-nak és a Gly362'-nek lehet döntő szerepe. A szukcinilcsoport megfelelő helyzetben tartásáért a Tyr355, a Ser305' és a Thr316' lehet felelős.

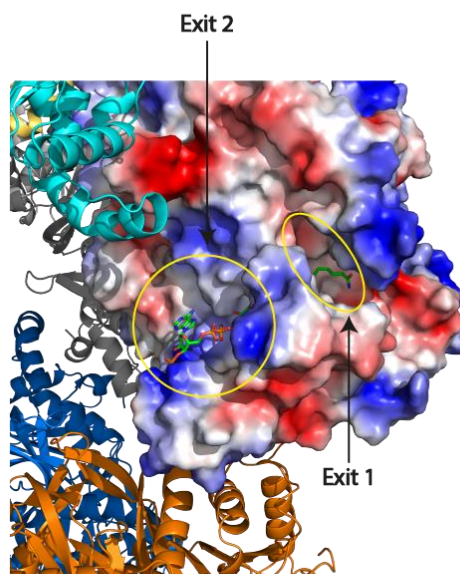
A csatornát töltéssűrűség szerint is megvizsgáltam. A belső felszín, habár helyenként változatos képet mutat, összességében mégis inkább apoláris karakterűnek mondható (48. ábra), amely megfelel a szubsztrátok töltésviszonyainak is. Az Exit 2 melletti fehérje felszín pozitív töltése (49. ábra B és D paneljei) a KoA foszfátcsoportjának megfelelő orientációját hivatott biztosítani. Ez azért elengedhetetlen, mert ezen szubsztrátnak csak bizonyos része hatol be a csatorna belsejébe (47. ábra C panel). Ezzel analóg módon az Exit 1 mellett látható pozitív töltésterület (49. ábra) az SLA csatornába való bejutását segítheti elő. Az aktív centrum környezetében kialakuló pozitív töltésegység a szukcinilcsoport helyi stabilizálásában játszhat szerepet (48. ábra). (Hasonló jelenség írható le az ecE2k, a hE2p és az avE2p szerkezetek esetén is.)

A hE2k magjának felszínén nagy általánosságban töltéskiegyenlítettség látható (49. ábra), ám ez a rokonfehérjékhez képest (hE2p, avE2p és ecE2k) nagyobb polarizáltságot mutat.

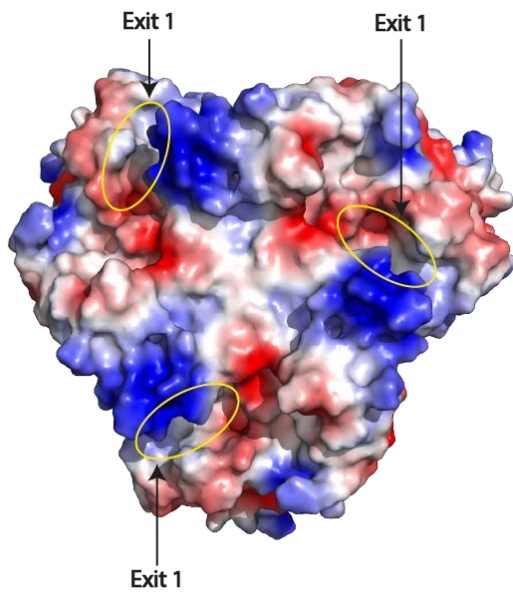
A



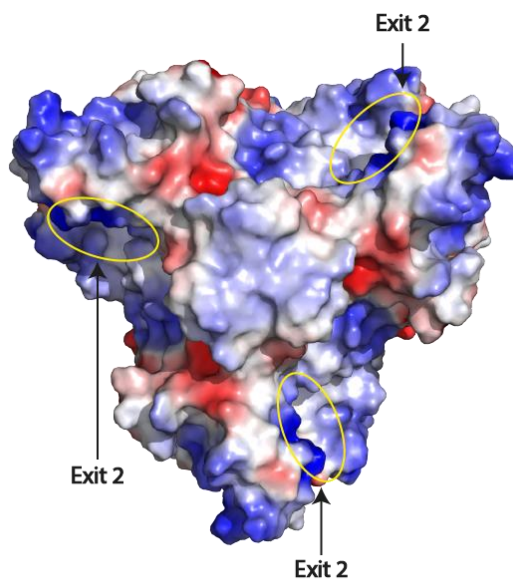
B



C



D



49. ábra. A hE2k polaritásfelszíne. **A.** A 24-mert létrehozó nyolc homotrimer egy példányának polaritásfelszíne. A polaritásfelszín a 48. ábrának megfelelően van reprezentálva. Az Exit 1 és Exit 2 jelölések a homotrimereken belüli szomszédos monomerek által létrehozott csatorna két bejáratát jelölik. A többi homotrimer eltérő színű szalagmodellekként van reprezentálva. **B.** Az Exit 1 és Exit 2 csatornabejáratokra való ráközelítés. A megjelenített szubsztrátok az 47-48. ábráknál leírtaknak, minden más reprezentáció az A panelnek felel meg. **C-D.** A homotrimerek polaritásfelszíne két orientációban. C: a kocka csúcsát kívülről vizsgálva, D: a kocka csúcsát belülről vizsgálva. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure 8.*)

4.5.4. Az adipoil-dihidrolipoamid bekötődése

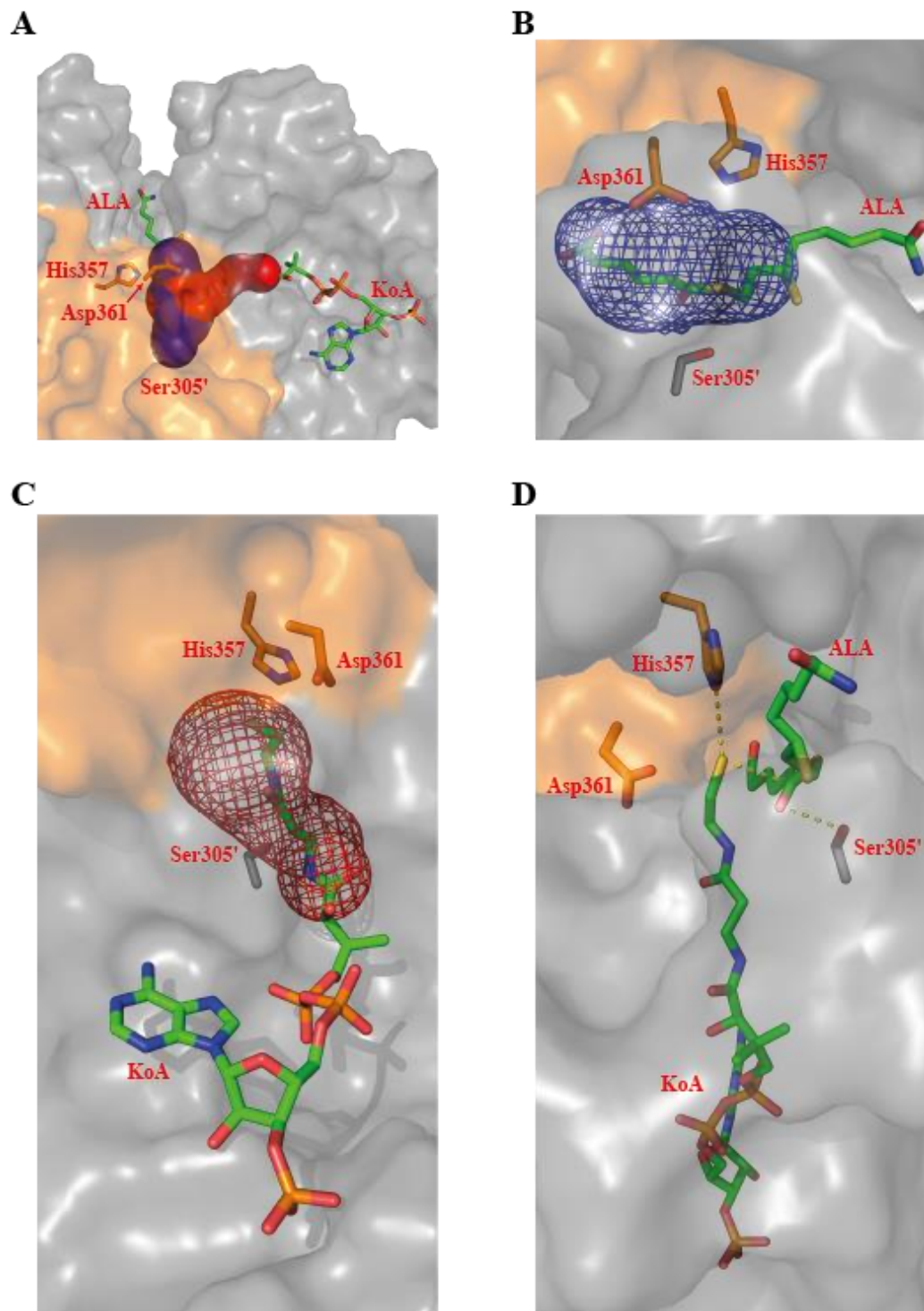
A fenti eredmények sikeres publikálása után [156] Rutgers Egyetemi együttműködő partnerünktől felkérést kaptunk egy másik szubsztrátnak, az adipoil-DHLA-nak (ALA) a csatornában való bemodellezésére. Ezen szubsztrát a hKADHk működése során (az α -ketoglutarát-SLA pár analógiájának megfelelően) alfa-ketopimelátból képződik. (A hKADHk elsődleges szubsztrátja, azaz az alfa-ketoadipát mellett az annál egy metilénsoporttal hosszabb alfa-ketopimelátot is képes átalakítani. Nem közölt adat.)

Megállapítható volt, hogy az egymáshoz hasonló, de két metilénsoportnyi különbséget mutató SLA és ALA a csatorna azonos térhelyeit foglalja el. Az enzimatis reakcióban kulcsszerepet játszó karbonil szénatom és a KoA S8 atomja egymáshoz és a reakcióban szintén résztvevő kulcsaminosavakhoz viszonyítva közel azonos pozíciókban vannak a két szubsztrát esetében (20. táblázat).

20. táblázat. Az SLA és az ALA esetén kiemelt jelentőségű szubsztrát és csatornaalkotó aminosav atomok között felírható távolságok (Å)

	His357-N- KoA-S8	KoA-S8- acil karbonil C	Ser305'-O- acil karbonil C
SLA	4,0	3,1	3,1
ALA	3,7	3,3	2,9

A szubsztrátok pozícióját az 47. ábrához hasonló módon ezen esetben is ábrázoltam (50. ábra).



50. ábra. Az ALA szubsztrát illesztése a hE2k-homotrimer szubsztrátcsatornájába. Az ábra kialakítása és jelölésmódja megegyezik az 47. ábránál leírtakkal. **A.** A két csatornaág és az illeszkedő szubsztrátok. A szubsztrátok végső helyét a KoA és az ALA energiainimalizáció utáni pozíciója határozta meg. A KoA továbbra is csak részlegesen lép be a piros színnel jelölt csatornába. Az ALA csatornát kék szín jelöli. **B.** Az ALA szubsztrátcsatorna. A reprezentálhatóság érdekében a csatorna kék hálóként jelenik meg. **C.** A KoA szubsztrátcsatorna. A reprezentálhatóság érdekében a csatorna piros hálóként jelenik meg. **D.** A szubsztrátok és az aktív centrum katalitikusan fontos aminosavai

4.5.5. Az N-terminális régió

Felismervén, hogy a hE2k fehérje nagy flexibilitással bíró N-terminális részének szerkezete krio-EM-mel nem határozható meg munkatársaimmal más módszerhez folyamodtunk. A CL-MS a fent megnevezett régió belső vizsgálatán túl annak a hE2k többi részéhez való viszonyáról is információt nyújtott (21. táblázat; a kísérletsorozatban keletkezett eredmények egy része már egy másik cikkben korábban publikálásra került [8]).

Az N-terminális részen belüli információk alapján kollégám, Dr. Ozohanics Olivér megalkotta az 1-150. aminosavakat magába foglaló modellszerkezetet. (A modellezés kiindulópontját a rokon szekvenciák PDB adatbázisban elérhető szerkezetei jelentették.) Az I-TASSER algoritmussal képzett szerkezetek közül a keresztkötési adatokkal legjobb korrelációt mutatót választotta ki. Az elsősorban az avE2k alegység N-terminálisán (PDB kód: 1GHJ [138]) alapuló modell (51. ábra) az N-terminális alacsony flexibilitással bíró részére (1-78. aminosavak) magas, míg a nagy flexibilitású C-terminálisára (79-150. aminosavak) alacsonyabb bizonyossággal adta meg a térszerkezetet. Ebből adódóan az LS-kötő Lys (Lys43), illetve az őt körülölelő LD jól modellezett résznek minősül. (A domén avE2k modellel történő összevetése 2,4 Å C α -RMSD értéket ad.)

Kísérletet tettem az N-terminális rész és a magdomén kapcsolatának feltárására is. A 24-98. aminosavak (N-terminális) és a 210-240. aminosavak (magdomén) által meghatározott szakaszok közötti kapcsolat alapján sikerült felrajzolnom a két modell összekapcsolása mellett az N-terminális rész legvalószínűbb térhelyzetét (51. ábra). Ennek alapja az a felismerés volt, mely szerint az eredetileg a monomeren belül elképzelt kapcsolat valójában a trimer két különböző monomerje közötti kapcsolatként valósul meg.

21. táblázat. A hE2k-monomer keresztkötésben érintett aminosavai

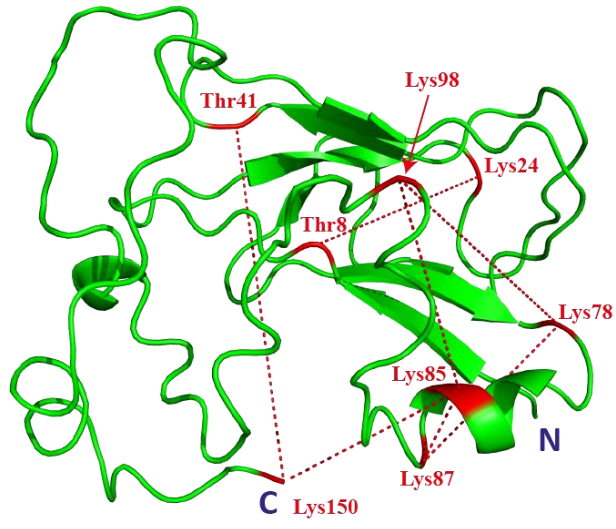
Aminosavak	Mért Cα-Cα távolságok (Å)	Maximális Cα-Cα távolságok^a (Å)
Thr8 – Lys24	18,0	17,8
Thr41 – Lys150	26,8	27,2
Lys78 – Lys87	14,8	27,2
Lys78 – Lys98	22,8	17,8
Lys85 – Lys87	5,7	27,2
Lys85 – Lys98	17,9	17,8
Lys85 – Lys150	14,1	17,8
Lys24 – Lys210 ^b	---	17,8
Thr71 – Thr238'	---	17,8
Thr71 – Lys240'	---	17,8

^a1,1'-karbonilimidazol (17,8 Å) vagy diszukcinimidil-vajsav-urea (27,2 Å) keresztkötő ágensekkel mért maximális aminosav C α -C α távolságok [164, 165]

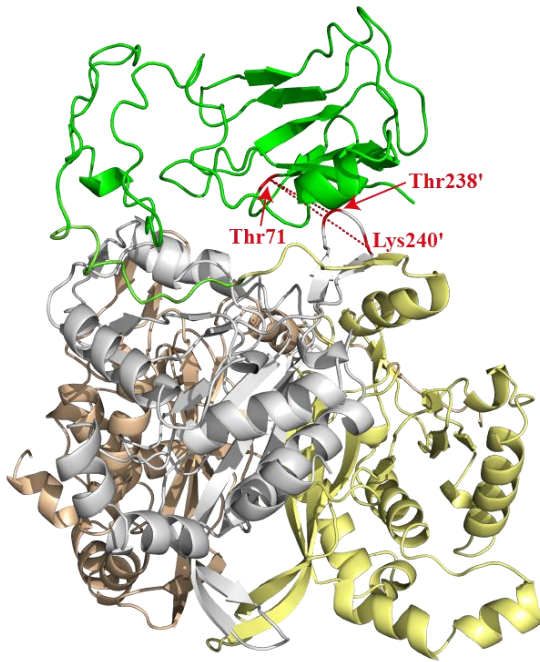
^bEzen keresztkötés nem elégíti ki a modellünket.

(Ezen táblázat a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Table S1.*)

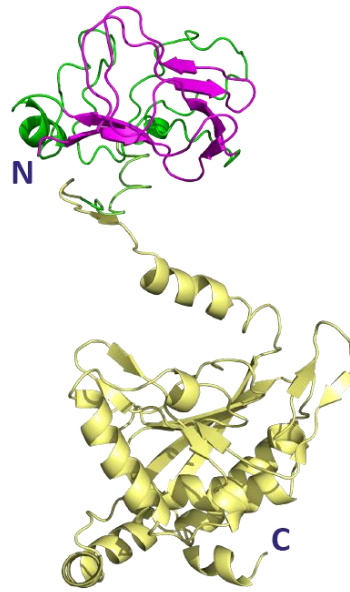
A



B



C



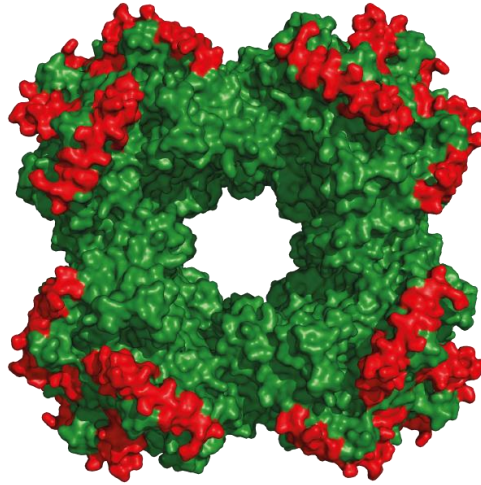
51. ábra. A hE2k nagy flexibilitású N-terminális régiójának modellje. **A.** A CL-MS információk alapján peremfeltételek közé szorított hE2k N-terminális modellszerkezet (1-150). Az N- és C-terminális végeket nagy betűk jelölik. A keresztkötésekben résztvevő aminosavak piros kiemeléssel, míg a keresztkötések maguk szaggatott vonalakkal vannak jelölve. A megfelelő távolságadatok a 21. táblázatban olvashatóak. **B.** A magdomén és a szomszédos monomerhez tartozó N-terminális szegmens között létrejövő keresztkötések. A magdomének sárga, ezüst és bézs színekkel, míg az N-terminális szegmens zölden van jelölve. A keresztkötésekben résztvevő aminosavak és a keresztkötések az A panelnek megfelelően vannak jelölve. A távolságadatok a 21. táblázatban olvashatóak. **C.** A keresztkötéseket legjobban kielégítő teljes hE2k monomer konformációja. A legnagyobb bizonyosságú részek (1-78. aminosavak) lila színnel, míg a többi rész a B panelnek megfelelően van jelölve. A láncterminálisok az A panelnek megfelelően vannak jelölve. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure S6.*)

4.6. A hKGDHk szerkezete

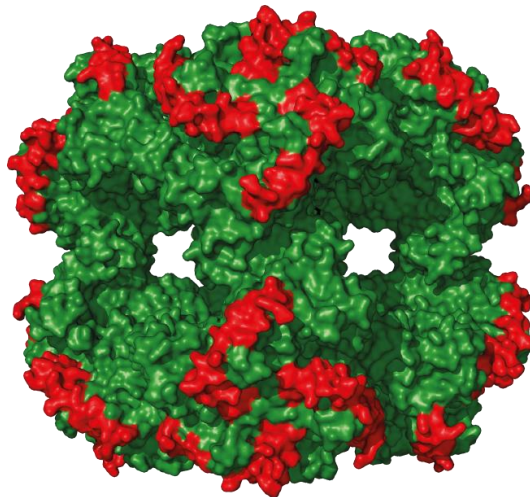
Kísérletet tettem a hKGDHk térszerkezetének leírására is. Ehhez elengedhetetlen volt a KSDHk-khoz kötődő szakirodalom felderítése. A biokémiai, biofizikai és szerkezeti módszerekkel a komplexalkotók sztöchiometriájáról szerzett információkat a 2. táblázat írja le.

A kutatócsoportunk által korábban kollaborációban közölt HDX-MS és a hozzájuk kapcsolódó CL-MS adatok [8] alapján a hE2k fehérje 144. és 173. aminosavak által bezárt szakasza kritikus szereppel bír a hE1k fehérjével való interakcióban. A 150. aminosav előtti rész flexibilitása okán nehezen lokalizálható, ám a 151. és 173. aminosavak által határolt szakasz jól kivehetően a krio-EM-mel meghatározott kocka külső felszínén helyezkedik el. Az 52. ábrán vörös színnel kiemelt aminosavak a kocka csúcsain, illetve élein találhatóak. Ezen tényekből, illetve a rokon E2 alegységek esetén javasolt, élek mentén megvalósuló kötődésekből kiindulva joggal feltételezhető, hogy a hE1k-dimerjei is a hE2k által kialakított kocka éleihez kötődnek.

A



B



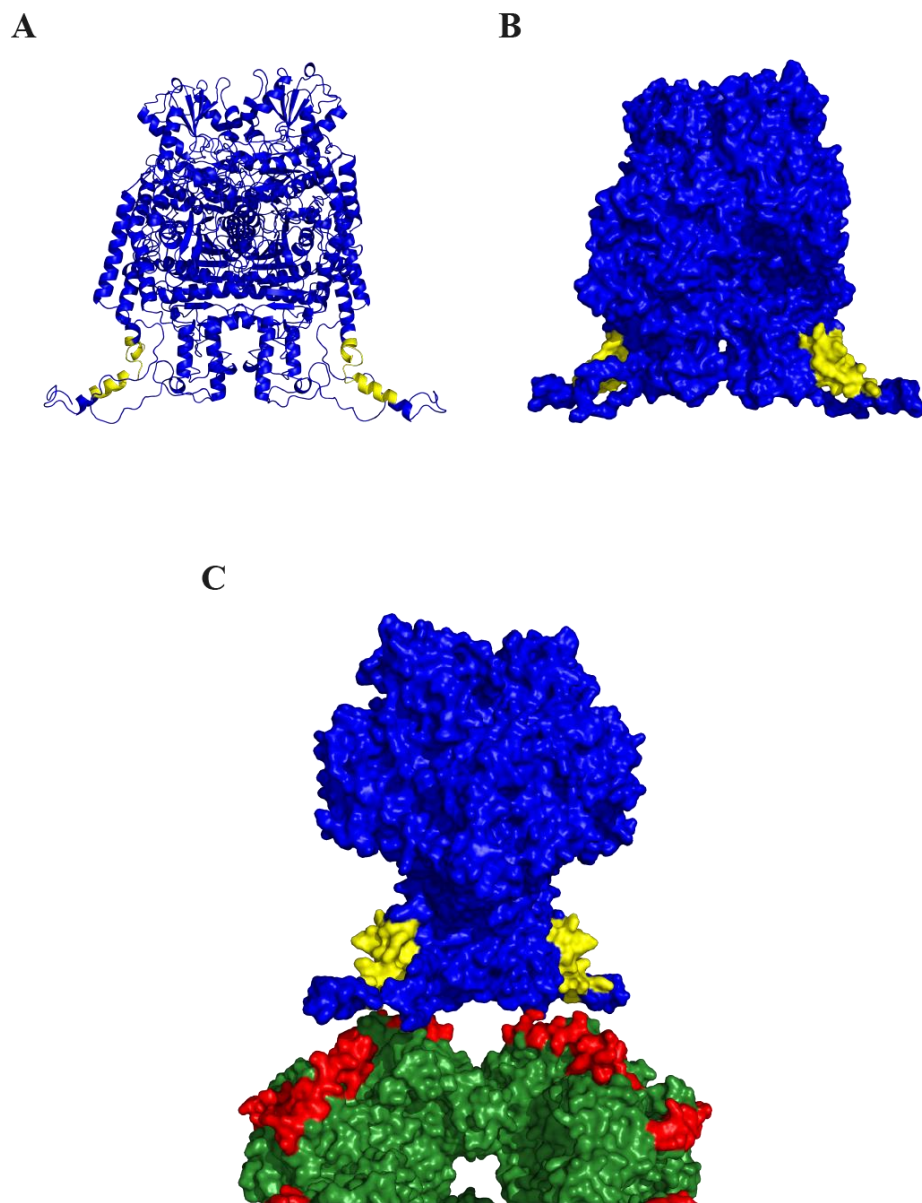
52. ábra. A hE1k kötőhelyek elhelyezkedése a hE2k-24-mer magon HDX-MS alapján. A hE2k fehérjék által létrehozott kocka alakú mag felszíne két orientációban látható (A és B panelek). A hE1k-kötő szegmensek (151-173. aminosavak) piros színnel vannak jelölve, míg a többi rész zöld. A kocka alakú magszerkezet itt nem tartalmazza a modellezett N-terminális régiót (1-150), (részben a jobb áttekinthetőség érdekében) csak az experimentálisan validált koordinátákat jeleníti meg. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure S7*.)

A szerkezeti topológia teljes leírása érdekében Dr. Ozohanics Olivérrel megépítettük a hE1k fehérje dimerjének homológ modelljét is (53. ábra). A fent leírt HDX-MS és a [8]

cikkben rögzített CL-MS adatok a hE1k 18. és 40. aminosavai által határolt szakaszban jelölik meg a hE2k és hE3 kötéséért egyszerre felelős régiót (*dual-subunit-binding domain*, DSBD; 53. ábra). Ugyanezen cikk alapján nincs közvetlen kapcsolódás a hE2k és a hE3 alegységek között, melynek következtében nem jöhet létre hE3 kötés a hE1k jelenléte nélkül. (A hE2k és a hE3 között kialakuló kötés így csak időleges és gyenge lehet.)

Habár a modellekben a DSBD régió térbeli pozíciója nem vetíthető szorosan a hE2k fehérje 151. és 173. aminosavai által határolt régióra, ez betudható a hE1k azon területen meglévő jelentős flexibilitásának. A szerkezetek összeillesztése során kiderült, hogy a kapcsolódást csak egy meghatározott orientációban lehet kialakítani. Ezt az orientációt tovább erősítette a legnagyobb felbontású dimer hE3 szerkezet [166] hE1k-hoz történő kapcsolása.

A hE3 esetén a 35. és 70. aminosavak, illetve a 107. és 145. aminosavak által határolt régiók (mindkettő a kofaktor-kötő régióon belül helyezkedik el) és a 381., valamint 403. aminosavak által bezárt régió (dimerizációs felszín) felelősek a hE1k-hoz való kötődésért. A HDX-MS adatok alapján gyengébb kapcsolat írható le a hE1k-hE3 pár esetén, mint ami az előbbi hE2k-hoz történő kötődésekor jelentkezik. A [8] cikkben megjelent megállapításokat erősítik azon korábbi eredmények, melyek szerint a hE3 komplexhez való kötődése 30-szor gyengébb a hKGDHk esetén, mint a hPDHk-ban [1, 6, 7]. Emellett azonban a három megnevezett peptidszakasz közül csak a 107-145. jelzésű tekinthető racionális kötőhelynek, míg a másik kettő megváltozott deutérium felvételét csak a hE1k-hoz való kötődés által indukált szerkezetváltozásnak tekinthetjük.

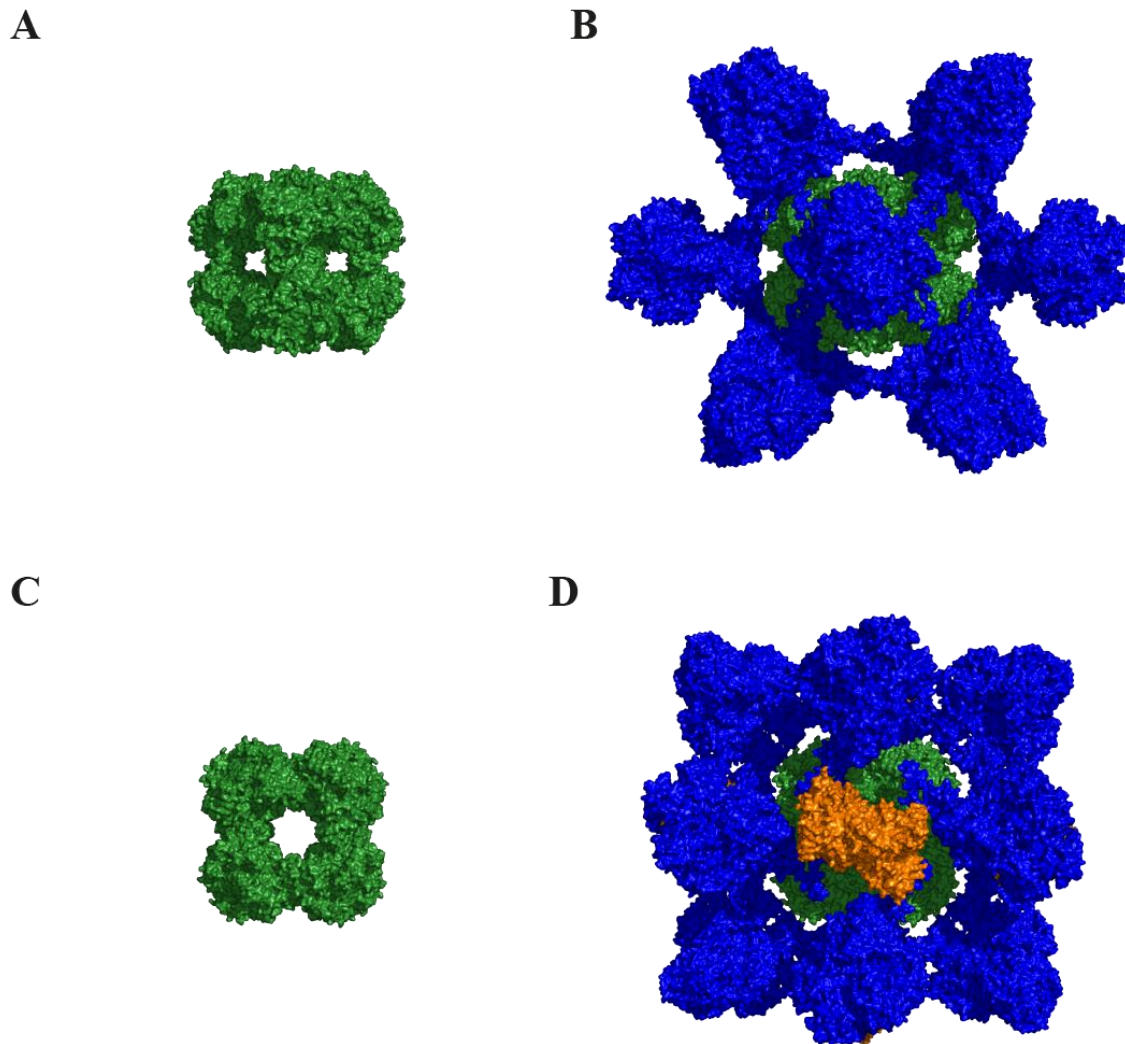


53. ábra. A hE1k-dimer homológia modellje. A-B. A hE1k szalag (A), illetve felszín (B) reprezentációs modelljei. A kettős kötődőmén (DSBD, 18-40. aminosavak) sárga, a fehérje többi része pedig kék színnel van jelölve. **C.** A hE1k és a hE2k fehérjék alegység-kötő helyei. A színezés és a magyszerkezet reprezentáltsága megfelel az A-B panelek, illetve az 52. ábra esetén leírtaknak. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure S9*.)

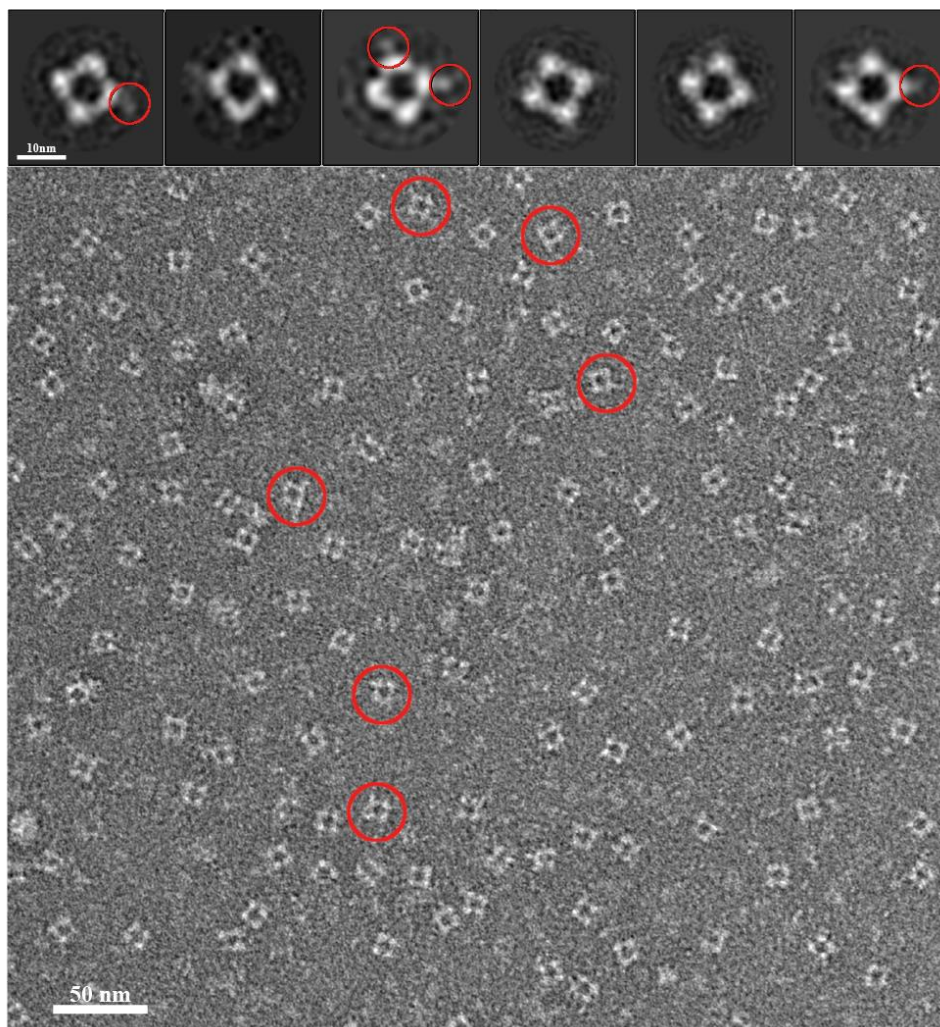
A fenti információkat mérlegelve egy lépésről lépésre kialakuló hKGDHk felépülést feltételezhetünk, melyben előbb az erősebb kötődést jelentő hE1k-hE2k kapcsolat alakul ki és a hE3 csak a már kialakult prekomplexhez kapcsolódik. A hE1k-dimer kocka élekhez való kapcsolódása után, a [8] cikkben leírt hE1k-hE3 kapcsolati hálónak megfelelően a hE3-dimer már csak a kocka lapjain tud bekötődni (54. ábra). A hE3-dimer így számos rokon komplexben leírthoz (2. táblázat) hasonlóan két alternatív (szerkezetileg ekvivalens) pozícióban foglalhatja el a kocka lapjait.

Tekintettel arra, hogy az 54. ábra által bemutatott vélelmezett szerkezeti topológia modell a ma elérhető legjobb minőségű információkra épít, így méltán feltételezhető, hogy modellem a hKGDHk jelenlegi legjobb reprezentációját adja.

Elméletem igazolása érdekében egy negatív festéses kísérletet is elvégeztünk az *in vitro* összeállított komplexszel. A felvételeken jól kivehetőek a kocka alakú képletek, melyeket referencia nélküli 2D osztályozással csoportosítottunk is. A korábbi tisztán hE2k tartalmú mintákhoz képest extradenzitás volt kimutatható. Az 55. ábrán piros színnel kiemelt extradenzitások minden valószínűség szerint a (kocka éleihez kötődő) hE1k-dimerekhez tartoznak. A hE3-dimerek hiányát a korábban már leírt gyengébb kötődésük magyarázhatja.



54. ábra. A hKGDHk felépülése. Az alkotó modellek felszíni reprezentációban vannak megjelenítve. A magképző hE2k zöld, a hE1k kék, míg a hE3 narancssárga színű. A hE2k fehérje nagy flexibiliású N-terminális régiója nincs bemutatva. **A.** A 24 monomerből felépülő hE2k-multimer szerkezete. **B.** A hE1k fehérje 12 homodimerje kötve a magi 24-mer éleire. (A 24-mer orientációja megegyezik az A panelen bemutatottal.) **C.** A 24 monomerből felépülő hE2k-multimer egy másik orientációja. **D.** A teljesen felépült hKGDHk szerkezeti topológiája. A hE1k 12 homodimerje a 24-mer élein, míg a hE3 6 homodimerje a 24-mer lapjain kötődik be. (A 24-mer orientációja itt megegyezik a C panelen bemutatottal.) A modell a Pymol program segítségével manuálisan lett összeállítva. Az alegységek láncaránya és a kapcsolódási mód korábbi (többek között HDX-MS) adatoknak felel meg. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure S8*.)



55. ábra. Az *in vitro* összeállított hKGDHk negatív festéses analízise. A nyers képen az extradenzitást mutató négyzetek (a hE2k-24-merek) piros karikákkal vannak kiemelve. A körülbelül 5-6 nm-es kitüremkedések a referenciafüggetlen 2D-osztályokon szintén piros színnel vannak kiemelve. (Ezen ábra a [156] nyílt hozzáférésű közleményből lett átvéve; *Figure S10.*)

Az 5-6 nm hosszúságban kinyúló extradenzitások némileg kisebbek, mint az általunk a modell alapján várt 10,5 nm-es képletek. Emögött a hE1k-ra jellemző nagyfokú flexibilitás állhat [8, 167]. Ezen állítások végső igazolásához természetesen további, mélyebb vizsgálatok lesznek szükségesek.

5. Megbeszélés

A KSDHk-k vizsgálata az elmúlt években vált újra felkapott témává. Funkcionális [40] és szerkezeti [168] vizsgálatok, összefoglaló művek [111, 169], valamint újonnan született szerkezetek sora [156, 158, 170] (22. táblázat) bizonyítják ezen állítást.

22. táblázat. A hKSDHk alegységek természetes és mutáns változatai. A táblázat a komplexek természetben előforduló normál (vadtípusú) és meghatározott szerkezettel bíró misszensz mutáns változatait írja le. A szerkezetet külön jelölés hiányában röntgenkrisztallográfiai alapon határozták meg. Az Ambrus laboratórium által leközölteket sárga kiemelés mutatja. (forrás: rcsb.org)

Enzim	Változat	PDB
hE1k	vadtípus	-
		6U3J
hE1a	vadtípus	6SY1
		5RVW
		5RVX
		5RVY
		5RVZ
		5RW0
		5RW1
hE2k	vadtípus	
	→ magdomén	6H05*
hE1 α	vadtípus	1DTW
		1V1R
		1U5B
		1WCI
		2BEU
		2BEV
		2BEW
2BFE		

		1DTW
		1V1M
		1V1R
		1V11
		1V16
		1U5B
		1X7W
		1X7X
		1X7Y
		1X7Z
hE1eß	vadtípus	1X80
		1WCI
		2BEU
		2BEV
		2BEW
		2BFB
		2BFC
		2BFD
		2BFE
		2BFF
	vadtípus	
		1K8M [#]
hE2e	→ LD	1K8O [#]
		2COO [#]
		1ZWV [#]
	→ alegység-kötő domén	3RNM

hE1p α	vadtípus	3EXE	
		3EXF	
		3EXG	
		3EXH	
		3EXI	
		6CFO	
	V138M	6CER	
hE1p β	vadtípus	3EXE	
		3EXF	
		3EXG	
		3EXH	
		3EXI	
		6CER	
		6CFO	
hE2p	vadtípus	1FYC [#]	
		1Y8N	
		1Y8O	
		1Y8P	
		2DNE [#]	
		2PNR	
		2Q8I	
		3CRK	
		3CRL	
			3B8K [*]
			→ magdomén
		6H55 [*]	
hE3KF	vadtípus	1ZY8	
		6H60 [*]	
		→ LD	2DNC [#]

			1ZMC
			1ZMD
			IZY8
	vadtípus		2F5Z
			3RNM
			5NHG
			6I4Q
hE3	G194C	kofaktor-kötő régió	6I4P
	P453L	aktív centrum és közeli régió	6I4Z
	G426E		6I4U
	D444V		5J5Z
	I445M	dimerizációs felszín	6I4T
	R447G		6I4S
	R460G		6HG8
			6I4R

*: krio-EM módszerrel meghatározott szerkezet

#: NMR módszerrel meghatározott szerkezet

A hagyományos röntgenkristallográfiai szerkezetek mellett megjelentek a krio-EM alapú modellek is. Az NMR-spektroszkópia főleg az E2 alegységek nagy flexibilitású LD-jeinek megismerésében kínál komoly lehetőséget. Jól látható, hogy a számos eredmény mellett főleg a mutáns változatok esetén vár még sok fehérje szerkezeti leírásra.

Kutatómunkám során igyekeztem minél több komplexet és alegységeiket minél többféle vizsgálatokba bevonni.

5.1. hKGDHk

ROS-képző aktivitásának kimutatása [46] óta kutatócsoportunk vizsgálatainak középpontjában a hKGDHk áll. Célunk, hogy ezen, a citromsavciklusban sebességmeghatározó szereppel bíró komplexről, illetve alegységeiről minél több információt nyerve tudjunk adatokat szolgáltatni. Ezzel a hozzájuk kötődő patológiás

állapotok kezelését kívánjuk megalapozni. Ehhez a vad típusú fehérjéken túl a mutáns variánsokat is vizsgáljuk.

Az utóbbi időben a patológiás működések jellemzésén túl [169, 171] egyre nagyobb hangsúly helyeződik az ezen folyamatok mögött álló szerkezeti alapok megértésére is [166, 168]. Laboratóriumunk bár folytat kinetikai vizsgálatokat [13], legnagyobb energiánkat ma már szerkezetek megfejtésére fordítjuk (14. és 22. táblázatok).

5.1.1. hE3

A számos komplexben betöltött lipoát regeneráló képessége okán legnagyobb figyelem a harmadik alegységre helyeződik. Munkatársam, Dr. Szabó Eszter a H^+/H_2O -csatorna újbóli felismerésével, szerepének tulajdonképpen újrafelfedezésével nagy lendületet adott a mutáns változatok értelmezésének [166].

A komplexekhez kapcsolódó legsúlyosabb betegség, a dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiencia okán kutatómunkámat én is ezen fehérjével kezdtem meg.

5.1.1.1. Expresszió és tisztítás

A fehérjék térszerkezet-vizsgálatainak elengedhetetlen feltétele nagytisztaságú mintáik előállításuk. Ezt a laboratóriumba való érkezésemkor a hKGDHk E3 alegysége esetén egy már kidolgozott protokoll biztosította. Az így nyert vad típusú, illetve mutáns fehérjéimmel azonnal megkezdhettem a konstruktok kristályosítását.

5.1.1.2. A vad típusú fehérje kristályosítása

Az évek során a hE3 fehérje számos mutáns változatának kikristályosítása történt meg [155, 166] (14. és 22. táblázatok). Bár ez a vad típusú fehérje esetén is megvalósult, az ottani 4 dimert magába foglaló aszimmetria egység (PDB kód: 5NHG) nagymértékben nehezítette a mutánsokkal való összevetéseket. Ennek okán egy már bevált oldatsorozattal megpróbáltam és meg is valósítottam ugyanezen fehérje kristályosítását. A mutánsok esetén eleddig is döntően két monomer egységet magába foglaló aszimmetria egységű kristályforma képződött.

5.1.1.3. A vad típusú fehérje szerkezete

A 6I4Q PDB kód alatt meghatározott 1,75 Å felbontású modell a jelenleg legnagyobb részletgazdagságú hE3 szerkezet az irodalomban. Több esetben új szerkezeti információkat biztosított a fehérjével kapcsolatban. Az immáron egyetlen dimer fehérjét tartalmazó aszimmetria egység sokkal könnyebbé tette a patogén mutánsokkal való összevetéseket mind a globális szerkezetre, mind pedig a behatóan vizsgált H^+/H_2O -csatornára nézve.

A H^+/H_2O -csatornában megtalálható két kulcs (fiziológias pH-n töltéssel is rendelkező) aminosav, a Glu332 és az Arg460' esetén az oldalláncok konformációs flexibilitása volt megfigyelhető. Kitűnt, hogy alternatív konformerei révén ez a két aminosav dinamikusan szabályozza a H^+/H_2O -csatorna szűk keresztmetszetének elhelyezkedését, valamint töltéeloszlását.

Dr. Szabó Eszter ezen felismerései, azaz a két említett aminosav korábban nem látott katalitikus szerepe számos más megállapítással egy cikk formájában vált közismertté [166].

5.1.1.4. Mutáns változatok

A fehérjék kristályosításának legnehezebb eleme a megfelelő paraméterek megtalálása. Az általam vizsgált mutánsoknál leírt kristályosítási körülmények kiváló alapot biztosítottak az optimalizációhoz. Ez mind a K37E, mind pedig az E340K mutánsok esetén egykristályok keletkezéséhez vezetett.

Sajnos ezen mutánsoknál a szerkezet megállapítására alkalmas kristályok megszületése még várat magára. (A munkát kutatótársaim fejezik be.) Ezzel szemben a nemrégiben 2,88 Å felbontással meghatározott I318T-hE3 szerkezet esetén a fehérjék keletkezéséhez szükséges plazmid az én munkám eredménye. Ez szolgáltatja alapját egy Nemes-Nikodém Éva tollából a közeljövőben megszülető cikknek.

5.1.1.5. A hdE3 expressziója és tisztítása, NMR-előkísérletek

A dinamikus molekuláris változások vizsgálatának kiváló eszköze az NMR-spektroszkópia, melynek azonban korlátot szab a fehérjék mérete. Az eredetileg dimerként megjelenő ~108 kDa moláris tömegű hE3 alegység így önmagában alkalmatlan lett volna ilyen típusú vizsgálatokra.

Esélyt mutatott a dimerizációs domén eltávolítása, mellyel nyert 40 kDa-os hdE3 fehérje monomerizálódva közelebb került a kívánt mérettartományhoz. A rutinszerűen alkalmazott tisztítási protokollunk azonban itt eredménytelennek bizonyult, mivel a dimerizációs domén deletált alegység túl nagy frakciója került inklúziós testekbe. Ezt belátva a natív konformáció helyreállításának alkalmazása mellett döntöttünk.

A laboratóriumunkban korábban már alkalmazott protokoll módosításával (a dialízis lépés helyetti direkt kihígítással, valamint a tisztítási protokoll ehhez igazításával) sikerült az NMR-kísérletekhez megfelelő mennyiségű és minőségű mintát kinyernem. A jeldiszperzió azonban nem volt elégséges, így egy újabb technika bevonása vált szükségessé.

Az affinitás címke nagyfokú rendezetlenségével képes lehet a teljes fehérje szerkezetét megzavarni, illetve sok extra jelet hoz létre a spektrumban. Az eltávolításával reális lehetőség nyílt a fenti problémák megoldására. Ehhez tesztelés után a HRV 3C proteázra kidolgozott szekvenciahasító PierceTM HRV 3C Protease Solution Kitet alkalmaztam. A lehasítás valamelyest javított a jeldiszperzió és egyszerűsítette a spektrumot is.

A konstrukt instabilitása okán a hőmérséklet emelésére továbbra sem támaszkodhattam, így a tároló oldat savanyításával, illetve a megfelelő egyik koszubsztrát (NAD⁺) hozzáadásával tudtam valamelyest jelentős, de nem elégséges további előrelépést felmutatni. Az elégtelenség okát az alábbiakban látom.

A CD-spektropolarimetriai vizsgálat megmutatta, hogy a dimerizációs domén eltávolítása a másodlagos szerkezeti elemeket zömében nem károsítja. (Az α -hélixekre jellemző, 208 és 222 nm-nél jelentkező negatív, illetve a β -redőknél 210 és 220 nm, valamint 195 és 200 nm között jelentkező negatív és pozitív csúcsok közül csak a legutolsó mutatott valamekkora eltérést.) Emellett azonban valószínűleg jelentősen sérülhetett a fehérje FAD-kötő képessége. (A FAD-ra jellemző, 375 nm körül jelentkező oxidált FAD spektrális ujjlenyomat gyakorlatilag eltűnt.) A FAD jellemző jelének elvesztése arra engedhet következtetni, hogy vagy ténylegesen nagymértékű FAD-vesztés lépett fel, vagy legalábbis a FAD izoalloxazin markáns szerkezetváltozáson esett át. Érdeemes megjegyezni, hogy a PDB adatbázis 1ZMC kristályszerkezetének leírása alapján a dimerizációs domén kiesése a FAD molekula kötésében potenciálisan szerepet játszó 32 aminosav közül mindössze kettőt

érint. Amennyiben a FAD jelentős része tényleg elveszett a fehérjéből, az egy csökkent stabilitású enzimertermék keletkezéséhez vezethetett. Ez lehetett potenciálisan az (egyik) oka annak, hogy eleddig nem tudtam a térszerkezet-vizsgálatokhoz elégséges koncentrációjú fehérje mintát létrehozni. (Az instabil szerkezetű fehérjék általában nagymértékben kicsapódnak.)

A sikert két módon remélhetem. Egyrészt a FAD oldatbeli koncentrációjának növelésével lehet potenciálisan nagyobb stabilitású fehérjeterméket létrehozni. Másrészt a konstrukt oldhatóságának javítása is kínálhat megoldást. Utóbbira több lehetséges út is kínálkozik. Ezek közé tartozik szolubilizáló szerek alkalmazása, a megváltozott izoelektromos pont okán alternatív natív konformáció visszaállítási pH-k kipróbálása, illetve a konstrukt szekvenciájának megváltoztatása a doménhatárok néhány aminosavnyi eltolására (a fehérjeszerkezet stabilizálása céljából). Ezek alkalmazását a jövőben tervezem.

A projekt ennek ellenére is részben sikeresnek mondható, hisz laboratóriumunkban először alkalmaztam az affinitás címke lehasítására alkalmas megfelelő metódust. Emellett bevezettem a laboratóriumban a gravitációs elven megvalósított fehérjetisztítás módszerét is. Az ezen technológiákra kidolgozott protokollok immáron munkacsoportunk laboratóriumi rutinjának részei.

5.1.2. hE2k

Az enzimet kettős, transzporter és enzimátikus funkciója, valamint a hKGDHk-ban betöltött szerkezeti vázképző tulajdonsága teszi igazán fontossá. Az E2 alegységek ilyen sokrétű szerepe miatt a mutációk már önmagunkban meghatározhatják a komplexek működését, mely oka a többi alegységgel összevetve alacsonyabb patogén mutánsszámuknak.

Az utóbbi évtizedekben számos kutatás foglalkozott az E2 alegységek szerkezetével, illetve működésével [18, 146, 158, 172]. Külön kihívást jelentett az E2 fehérjék két, egymástól flexibilitásban jól elkülönülő részéről, valamint az egyéb alegységekkel való kapcsolatokról információt nyerni [173]. Szerkezeti adatokat a teljes alegységről/komponensről egyetlen komplex esetén sem sikerült még kinyerni.

5.1.2.1. Expresszió és tisztítás

A fehérjék heterológ expressziójának sikerességét számos paraméter befolyásolja. A helyes indukciós pont a kultúra életideje és aktuális megkettőződési ideje okán küszöbfeltétel a folyamathoz. A helyes hőmérséklet megválasztása az expresszió sebességén keresztül befolyásolja a feltekeredési folyamatok hatékonyságát, illetve a kicsapódás mértékét inklúziós testekbe. Az indukálószer koncentrációjával, illetve az expressziós idő hosszával a keletkező fehérjék mennyiségét tudjuk befolyásolni.

Ezen paraméterek optimális kombinációjával (13. táblázat), valamint a már rutinszerűen alkalmazott tisztítási módszer alkalmazásával sikerült egy az amerikai együttműködő partnereinkénél [171] egyszerűbb és hatékonyabb előállítási módot kidolgoznom. A szonikálási, kicsapási és dialízis lépések elhagyásával, a nagyobb hatékonyságú *Strep* címke alapú tisztítási rendszernek is köszönhetően rövidebb, kevesebb lépést tartalmazó, kisebb veszteséget termelő és olcsóbb módszer született, mely ráadásul mennyiségében és minőségében is szerkezetvizsgálatra alkalmas mintákat (20. ábra) biztosít.

5.1.2.2. Krio-elektronmikroszkópiai szerkezetmeghatározás

Az előkísérletek során megszületett képek alapján sejthető, a szerkezetmeghatározás alapján pedig megállapított (41. ábra) nagyszimmetriájú struktúra egybevágott a más fajokban E2k-multimer szerkezetekről szerzett információkkal [18, 28, 137, 174, 175] (2. táblázat). Ez az E2-monomerek között feltárt nagy hasonlóság okán még érthetőbbé vált (43. ábra).

A 2,9 Å pontosságú szerkezet a struktúra kialakulásának és fenntartásának okairól is információt nyújtott. Láthatóvá váltak a monomereket és a belőlük létrejövő multimer egységeket összetartó erők. Sőt, a nagyobb stabilitás által magyarázatot találtam a hPDHk esetén leírható pentagonális dodekaéder helyetti kockaszerkezet kialakulására is. Felvázoltam a 24-mer felépülési menetét, melyben a trimerek kialakulásának, illetve térbeli pozíciójának nem csak szerkezetalkotó, de funkcionális szerepe is lehet [173].

A rokon E2 fehérjékkel való szekvenciaösszevetések alapján azonosítottam a katalitikus triád aminosavait (itt: His357, Asp361 és Ser305'), melyek egy két irányból

átjárható csatornahálózatban helyezkednek el. A homotrimerek két, egymással szomszédos monomeregysége által létrehozott üregben a szekvenciaösszevetések lehetőséget adtak a szubsztrátkötésben fontos aminosavak azonosításán túl a szubsztrátként szolgáló molekulák megfelelő bemodellezésére is. Kiderült, hogy a két egymáshoz hasonló, de metilénsoportjaik számában mégiscsak eltérő SLA (a KGDHk reakció köztiterméke) és ALA (a KADHk reakció köztiterméke) a csatorna azonos térhelyeit foglalják el. A kulcsfontosságú aminosavakhoz viszonyítva is közel azonos pozíciókban vannak, ám a második szubsztrát esetén egy sokkal sűrűbben betöltött csatornaállapot jön létre (47. és 50. ábrák). Ebből adódhat a második szubsztrátnál leírt 100-szor kisebb hatékonyságú reakció.

5.1.2.3. Az N-terminális régió

Az E2 fehérjék nagy flexibilitású N-terminális szakaszainak szerkezetéről szabad formában csak az NMR-spektroszkópia [176], illetve komplexált formában a röntgenkristallográfia [177-180] vagy a krio-EM szolgáltatott korábban információt. Munkatársam, Dr. Ozohanics Olivér modellje ezekre kínált alternatívát.

A krio-EM-mel nem megfejthető N-terminális régió két részre bontható. A második, nagy flexibilitású rész, mint egy lánc köti a C-terminálison elhelyezkedő központi maghoz az első, az LD-t tartalmazó szakaszt. Ez, mint egy a lánc végén elhelyezkedő golyó az öt követő szakasz nagy mozgékonyágát kihasználva képes kapcsolatba lépni a komplexet alkotó három alegység aktív centrumaival. Az N-terminális egység és a magi domén között leírható keresztkötések a nagy flexibilitású rész ellenére is felrajzolják valós térbeli helyzetét. Ez a modell tökéletesen kielégíti amerikai partnereinknek a trimereken belüli munkamegosztásról szóló leírását [173].

A fenti eredményeknek köszönhető elsőszerzős cikkem [156] és egy az amerikai partnerünkkel társszerzőként megjelenő cikkünk [181].

5.1.3. hE1k

A homodimerekként megjelenő hE1k és hE1a fehérjék, illetve a heterotetramerekké összeálló hE1p és hE1e alegységek specifikitást meghatározó tulajdonságuk okán érdemelnek külön figyelmet. Az általuk katalizált folyamatokban felszabaduló CO₂ távozásával válik

irreverzibilissé a teljes komplex reakció. Emellett a komplexek felépülésében is fontos szerepük lehet [182-184].

Patológiai szempontból azonban leginkább magas ROS-termelő képességük miatt vetül rájuk figyelem [171]. Részben ez hozta felszínre szerkezeteik megismerésének igényét [37, 170, 185], mely felvetette E1 alegységekre nézve vegyes komplexek létezését is [168].

5.1.3.1. Expresszió és tisztítás

A paraméterek optimális kombinációjával sikerült egy relatíve alacsony kitermelésű, ám nagy tisztaságú mintát eredményező fehérje-előállítási módszert kidolgoznom. Az alegység expressziójának és tisztításának nehézsége konformációs variabilitásában, illetve ThDP tartalmában rejlik. Ennek okán az újonnan létrehozott fehérjekonstruktra kettős tisztítási frakció jelent meg. Ez a bizonyított szekvenciazonosság mellett is kétséget ébresztett későbbi kísérleteink esetleges sikerei iránt.

Ezekre alapozva a fehérjét egy másik laboratóriumból kölcsönzött protokollal [90] is megtisztítottam. Az így nyert minta már alkalmas volt kristályosítási kísérletek végrehajtására.

5.1.3.2. Kristályosítási próbák

A homogén fehérje minta előállítása ugyan komoly eredmény, de végső sikert a szerkezet meghatározása jelentett volna. Az eredménytelenség oka az alegység belső instabilitása lehet. Ez alapvető akadályt állít az E1 alegységek kikristályosodásának. Véleményem szerint a hKGDHk kialakulásának is egyik fontos hajtóereje lehet a hE1k és a hE2k alegységek között kialakuló kötés stabilizáló hatása. (Ezen elméletet alátámasztani látszik laboratóriumunk egy a közelmúltban megjelent cikke [8].)

Ezen gondolatmenetnek megfelelően célszerűnek tartanám a két alegység közös expresszióját és tisztítását. Ezen minták kristályosítási próbái nagyobb eséllyel vezethetnének sikerre. Emellett a fehérje affinitás címkéktől megfosztott konstruktyjának kinyerése és az így kivitelezett új kristályosítási próbák további lehetőségeket rejtenek.

5.1.4. Teljes komplex

Sajnos a mai napig nem sikerült az α -ketosav-dehidrogenáz komplexcsalád bármely tagjának térszerkezetét direkt módon meghatározni. Ennek legvalószínűbb okai a rendkívül nagy méret (MW=4-10 MDa), illetve a perifériásan elhelyezkedő komponensek flexibilitása és esetenként gyenge kötődése [174, 175, 186].

Az expresziós és tisztítási folyamatok optimalizálásával, a három rekombináns alegység birtokában először nyílt lehetőség a teljes hKGDHk vizsgálatára. Annak érdekében, hogy a komplex szerkezetére ésszerű javaslatot tehessek felderítettem a szakirodalomban az adott témában őrzött releváns információkat (2. táblázat).

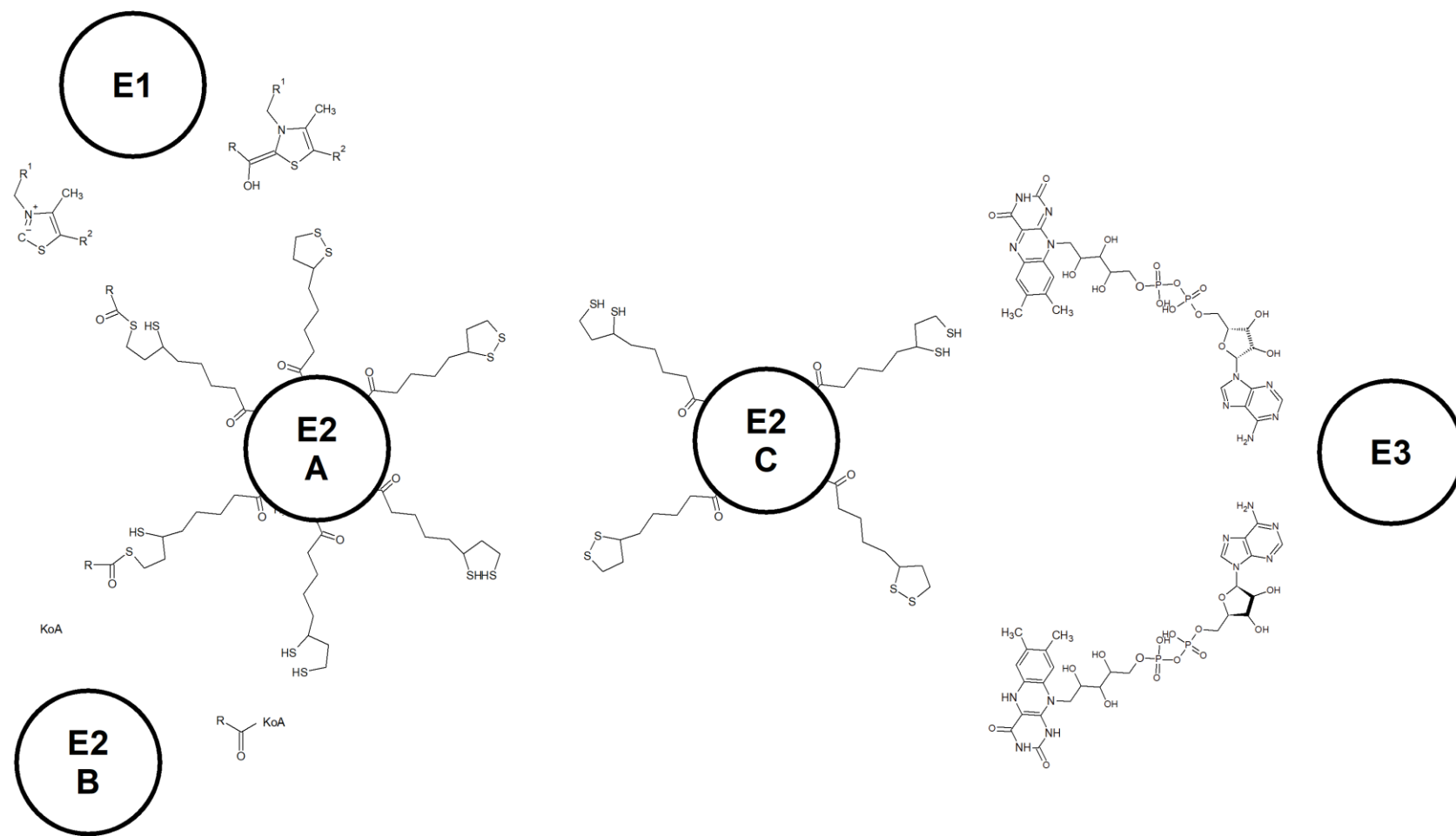
Az ecE1k vizsgálata során az N-terminálisától megfosztott, ám aktív centrumát megőrző konstruktum nem volt képes információt szolgáltatni E2k- és E3-kötő helyeiről [187]. (A *Mycobacterium smegmatis* N-terminális csonkított – az 1-115. aminosavak hiányoznak – E1k fehérjéjének röntgenkristallográfiai szerkezetét szintén meghatározták [167].) Emellett azonban biokémiai adatok az E1k N-terminális szakaszát jelezték az E2k és az E3 kötéséért felelősnek [182-184].

Az E2k fehérje esetén az ecE2k [188] és az avE2k [189] LD-jeinek, illetve az ecE2k csonkolt magjának [137], valamint az ecE2k E3-kötő doménjének térszerkezete volt ismert korábban. A teljes E2 fehérje térszerkezetét nem sikerült meghatározni.

Az E3 fehérje több fajból származó változatai esetén számos alkalommal sikerült meghatározni a teljes szerkezetet [76, 111, 155, 166, 190]. A legnagyobb felbontású modell a 4.4.3. A vad típusú hE3 kristályosítása és röntgenkristallográfiai szerkezete fejezetben leírt szerkezet [166].

A komplex felépülésének leírásakor célszerű az egymást követő lépésekről is értekezni. Meglátásom szerint elsőként a hE2k-trimer egységek összefűződése történhet meg, melyek a kocka struktúra csúcspontjait foglalják el.

A trimerek kialakulásának a szerkezetin túl funkcionális oka is lehet, mely a magi egységből kinyúló, az E2 alegység LS-kötő N-terminálisai között kialakuló munkamegosztáson alapul [173] (56. ábra). A trimer egyik tagja az E1 enzimtől történő acilgyök átvételért, a másik tag az enzimatis funkcióért, míg a harmadik alkotó az első regenerációjáért, végső soron E3 általi önregenerációjáért felel. Ezen gondolatot az E3KF



56. ábra. Az E2-trimer alegységeinek munkamegosztása. Az egy-egy ciklusban ábrázolt szerkezetek az adott enzimekhez kötődő kofaktorok állapotait mutatják. Az E2-trimer A tagja felelős az acilgyök transzportjáért. A B egység aktív centrumával teszi lehetővé az acilgyök KoA-ra kerülését. A trimer harmadik tagja regenerálja az A egységet, önmaga pedig az E3 enzim segítségével nyeri vissza eredeti állapotát. Az E3 alegységhez kötött FAD-ot leszámítva minden ábrázolás megfelel a 3. ábrán látottaknak.

léte is bizonyítja, mely a trimer tagjaként gátolja az alkotók összefekvési pontján létrejövő aktív centrumok kialakulását. Ezzel ellentétben N-terminálisával maga is betölt transzporter-funkciót [159].

Kutatócsoportunk már korábban is javaslatot tett a hKGDHk alegységeinek arányaira. Ezt alegység titrálási kísérletek és enzimaktivitási vizsgálatok alapján a 24:24:12 (2:2:1) arányokban határoztuk meg [13]. (Amerikai partnereink voltak az elsők – ezen kísérlet szükségleteinek megfelelően – akik teljes funkcionalitású hE1k és hE2k fehérjéket állítottak elő rekombináns módon [90].) A fenti arány megegyezik a más emlős szövetekben található KGDHk, illetve a Gram negatív baktériumok PDHk-i esetén leírtakkal (2. táblázat, [2, 10, 16, 18, 34]).

Az általam felrajzolt komplex ennek a javaslatnak minden módon megfelelt, mely meglátásom elsőszerzős cikkemben jelent meg [156].

Teljes bizonyosságot azonban csak egy a maga valóságában megjelenő komplex vizsgálatával lehetne elérni. Ezen kísérletet a cikkem egy bírálója által tett javaslatnak megfelelően végre is kívánjuk hajtani. Ezen, konkrétan a hKGDHk alegységeinek együttes inkubációját követően létrehozott keresztkötéseken munkatársam, Zámbó Zsófia Melinda jelenleg is dolgozik.

5.2. hKADHk

Amerikai együttműködő partnerünk a komplex újra felfedezésével új perspektívát nyitott a területen. A *Dehydrogenase E1 and transketolase domain-containing protein 1* néven is ismert hE1a fehérje a Lys és Trp lebontásában betöltött kulcsszerepén túl saját és a hKADHk-t alkotó egyéb komponensek deficienciái miatt bír nagy jelentőséggel.

Az alegységek szerepének felderítésében kiemelt szereppel bír a természetben előforduló mutáns változatok viselkedésének vizsgálata. Engem tanulmányutam során az ezeket kódoló plazmidok előállítására kértek fel.

5.2.1. hE1a mutáns változatok

Az általam létrehozott plazmidokkal termelt fehérjéket (L234G, Q305H, R455Q, G729R, P773L) enzimműködés vizsgálatoknak vetették alá. A G729R-hE1a fehérje jelentett

alapot a később cikkben manifesztálódó, a hE1a fehérje szerkezet-funkció vizsgálataival foglalkozó kutatómunkának [191].

5.3. Kismolekulás szintézisek

A hKSDHk elégtelenségek kezelésén kutatócsoportunk többféle megközelítéssel is dolgozik.

A térszerkezetek megismerése a betegségek molekuláris szintű okaira kínál magyarázatot. Így a helyes szerkezeti állapot esetleges visszaállításával a probléma gyökerénél lenne lehetőség a megoldásra. A hE3 fehérje esetén szintén felmerült az enzim külső forrású pótlása. Előrehaladott kísérletek folynak egy ilyen fehérjealapú gyógyszer kifejlesztése tekintetében. (Ebben az Ambrus laboratórium is együttműködő partner.)

5.3.1. Az izoliponsav előállítása

Lassíthatja potenciálisan a vonatkozó betegségek progresszióját a ROS képződésének gátlása is. Az exogén módon adott LS ilyen irányban is felhasználható [45], ám alacsony szintű hatásából kiindulva célszerű a molekula analógjaira alapozni egy új terápia kidolgozását.

A gátlásban potenciálisan felhasználható ILS-t nagy tisztaságban előállítva megteremtettük a kutatások új szakaszának, azaz a funkcionális vizsgálatoknak a feltételeit. Ezek végrehajtására a disszertáció anyagának lezárásáig nem volt lehetőség. Emellett további derivatívumok előállításával, illetve ezek funkcionális vizsgálataival érdemes folytatnunk munkánkat.

5.3.2. Az izotópjelölt FAD előállítási protokolljának kidolgozása

A hE3-ról, illetve bizonyos patogén hE3 mutánsokról kiinduló (esetenként emelkedett) ROS-képzés tanulmányozásának egyik fontos lépése volna a FAD molekula patológiás állapotokhoz kötődő térszerkezet-torzulásainak megismerése. Ez a szerkezetvizsgálatokhoz hasonló módon tudna információt szolgáltatni.

A témában korábban publikált kutatások nem tettek kísérletet az alapmolekuláktól végtermékig való teljes szintézisre. Ezért számos cikk eredményeit megvizsgálva

kidolgoztam egy ilyen elméleti reakciósort. Elsősorban a kitermelési adatokra hagyatkozva (ám nem figyelmen kívül hagyva a technikák kivitelezhetőségét és az izotópjelzett alapanyagok beszerezhetőségét) végül nyolc, a fenti céloknak megfelelő lépést sikerült elméleti szinten teljes reakciósorrá kombinálnom.

Az így nyert reakciósor egy a FAD térszerkezet-torzulásait vizsgáló projekt sarokköve lehet. A stabil izotópjelzett molekula birtokában, annak NMR-analízisével kapcsolatot lehetne teremteni a mutánsok esetén mérhető esetenként szignifikánsan emelkedett ROS-képzés és a FAD molekulaszervezeti változásai között. Ez feltárhatná potenciálisan a folyamat esetleges ellensúlyozásának hatékony módját is.

Természetesen komoly akadályt jelenthet az előállításához szükséges jelzett molekulák magas költségigénye, mely a teljes riboflavin mindkét izotópos változata esetén körülbelül egymillió forintnyi alapanyag megvételét kényszerítené ki. Reményeink szerint a jövőben lehetőségünk lesz a projekt megvalósítására.

6. Következtetések

A hKGDHk első és második alegységének, valamint a hE3 fehérje módosított változatának nagytisztaságú mintáját szándékoztam létrehozni. A munka során az alábbi eredményekre és vonatkozó következtetésekre jutottam:

1. A laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott protokoll módosításával és optimalizálásával megvalósítottam a hE1k fehérje expresszióját és tisztítását. Ezzel a hE1k-ra nézve elérhetővé vált egy nagy tisztaságú mintákat eredményező (egyelőre relatíve alacsony kitermelésű) fehérje-előállítási módszer.
2. Ugyanezen protokoll módosításával és optimalizálásával megvalósítottam a hE2k fehérje expresszióját és tisztítását is. Így elérhetővé vált a hE2k szerkezetvizsgálatra alkalmas minőségű mintájának előállítása.
3. A dimerizációs doménjétől megfosztott hE3 fehérje tisztítását nem lehetett a protokoll egyszerű módosításával elérni. Ezen fehérjekonstruktot csak az inklúziós testek formájában megtermelt frakció natív konformációjának helyreállítása után tudtam stabilan és nagyobb mennyiségben szolúbilis formába hozni.

A dimerizációs doménjétől megfosztott hE3 fehérje mintáinak előállítása során szerzett tapasztalatokkal az alábbi következtetést vonhattam le:

4. A Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kitet alkalmazva sikeresen lehasítottam a hE3 fehérje szekvenciájába épített *Twin-Strep* affinitás címkét.

A hE2k krio-elektronmikroszkópai vizsgálata során nyert adatok az N-terminális részre vonatkozó információkkal kiegészítve az alábbi eredményekhez, illetve következtetésekhez vezettek:

5. Meghatároztam a hE2k fehérje katalitikusan aktív magdoménjének atomi szintű (2,9 Å) szerkezetét. Ez az összevetések alapján nagy hasonlóságot mutat a más komplexekben, illetve fajokban előforduló E2 alegységek szerkezetével.

6. Megvizsgáltam a magasabb fokú szerkezeti szerveződési szinteket is. A monomerekből egy kockára emlékeztető multimer szerkezet alakul ki. A kocka csúcspontjaiban homotrimerek találhatóak. Nyolc trimernek az élek mentén történő összekapcsolódása eredményezi a fent felvázolt szerkezetet.
7. A szerkezetmeghatározás 3D osztályozási fázisában megjelent egy csonka kocka változat is. Ezt alapul véve valószínűsítem, hogy a hE2k kockaszerkezet létrejöttének első lépését a trimerek kialakulása jelenti.
8. Számítógépes molekulamodelllezési eljárással megépítettem egy a hE2k-monomerek által létrehozott pentagonális dodekaéder fehérjeszerkezeti modellt (20x3 hE2k láncból felépülő 60-mer). A humán piruvát-dehidrogenáz enzimkompleyre jellemző szerkezetet a valós kockaformával összevetve kijelenthető, hogy a 8x3-as szimmetriájú kockaszerkezet kialakulásának alapja a trimerek közötti kölcsönhatások magasabb számából adódó nagyobb stabilitás.
9. Szekvenciaösszevetések alapján azonosítottam a katalitikus centrumhoz tartozó aminosavakat. Ezek mind egy két (azonos trimerhez tartozó) monomer határfelületén megjelenő csatornában helyezkednek el. Az aktív centrumot a His357 és az Asp361 aminosavak, valamint a szomszédos monomer Ser305' aminosava által kialakított katalitikus triád jelenti.
10. Megvizsgáltam a hE2k alegység számára szubsztrátként funkcionáló szukcinil-, illetve adipoil-dihidrolipoamid lehetséges térbeli helyzetét a fehérjeszerkezeten belül. Modellezési és energiaminimalizálási eredményeim alapján a két szubsztrát (nem meglepő módon, más hasonló (rokon)szerkezetű E2 szubsztrátokhoz hasonlóan – a megfelelő komplexekben) a csatornaszerkezet megfelelő azonos térhelyeit foglalja el. A második szubsztrátnál leírt sokkal kisebb katalitikus hatékonyságú reakció oka az ebben az esetben kialakuló lényegesen sűrűbben betöltött csatornaállapot lehet.

11. Dr. Ozohanics Olivérrel molekulamodelllezési módszerrel megalkottuk a hE2k N-terminális (krio-EM-mel nem vizsgálható) szakaszának modelljét. Kitűnt, hogy a modell két részre bontható, melyben a nagy szerkezeti stabilitású lipoil domén egy flexibilis szakasszal (perifériás alegység-kötő domén egy része) kapcsolódik a központi maghoz.

A hE3 fehérje újbóli kristályosítási kísérletei az alábbi eredményekhez vezettek:

12. A korábban megvalósított nyolc helyett két fehérjemonomer aszimmetria egységbeli jelenlétével hoztam létre a hE3 fehérje vad típusú változatának egykristályát. Ez laboratóriumunkban eddig csak a mutáns változatok esetén történt meg.
13. A szerkezetmeghatározás a fehérje eddigi legmagasabb felbontású (1,75 Å) szerkezetéhez vezetett. Ennek birtokában Dr. Szabó Eszter kollegám az enzim mechanizmus eddig nem ismert aspektusaira volt képes rávilágítani.

Kísérletet tettem a teljes hKGDHk szerkezetéről is információt adni. Ennek során az alábbi következtetéseket vontam le:

14. Elemeztem a hKGDHk rekonstitúciója után gyűjtött HDX- és CL-MS adatokat. Ezek alapján a hE1k fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet éleihez kapcsolódnak.
15. Ugyanezen adatokból kiindulva a hE3 fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet lapjaihoz kapcsolódnak, mely helyet két szerkezetileg ekvivalens pozícióban foglalhatják el.
16. A fenti információk birtokában molekulamodelllezési technikával megépítettem a hKGDHk legvalószínűbb térszerkezeti topológiáját. Ez alapján a komplexet alkotó alegységek láncaránya hE1k:hE2k:hE3=24:24:12.

Célul tűztem ki a hKGDHk alegységeihez kötődő prosztetikus csoportként funkcionáló molekulák laboratóriumi előállítását. Ebből a munkából legfontosabbként az alábbi eredményre és következtetésre jutottam:

17. Szintetikus és enzimatis lépések megfelelő kombinálásával felírtam egy a FAD molekula minden atomjának szelektív stabil izotópos jelölésére alkalmas reakciósort. Ennek alkalmazásával lehetőség nyílik a molekula és a hE3 fehérje közötti kölcsönhatások vizsgálatára oldatbeli NMR-spektroszkópiával.

7. Összefoglalás

Az energiatermelő folyamatokban és a metabolizmus elágazási pontjaiban sebességmeghatározó humán α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek működési zavarai súlyos betegségekhez vezetnek. Így egyre nagyobb hangsúly helyeződik e betegségek molekuláris szintű megértésére és a szerkezeti elváltozások felderítésére.

A fehérjék szerkezeti vizsgálatainak feltétele nagy tisztaságú minták előállítása, így kidolgoztam a humán α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex alegységeinek expresszióját és tisztítását. Az E1 alegység esetén egy relatíve alacsony kitermelésű módszer nagy tisztaságú mintákat eredményezett. Az E2 fehérjénél egy az eddigieknél egyszerűbb és hatékonyabb módon, mennyiségében és minőségében szerkezetvizsgálatra alkalmas minta keletkezett.

A hE2k minta krio-elektornmikroszkópiai vizsgálatokban nyert elsősorban felhasználást. A meghatározott 2,9 Å felbontású modell először engedett betekintést a monomer és multimer szerkezetekbe. Következtetéseket vontam le a kocka felépülésére, illetve a 8x3-as szimmetriájú szerkezet iránti preferenciára vonatkozóan. Azonosítottam a két monomer határfelületén megjelenő csatornahálózatban elhelyezkedő katalitikus centrumot. Azonosítottam a szubsztrátként megjelenő molekulák megkötésében és orientálásában fontos aminosavakat és polaritásfelszíneket. Egy molekulamodellezéssel megalkotott szerkezettel a nagy flexibilitású N-terminális térbeli pozíciójáról is következtetéseket vontam le.

A hE3 mintákat főleg kristályosítási kísérletekben használtam. Ezek az alegység eddigi legmagasabb felbontású (1,75 Å) vad típusú szerkezetéhez vezettek.

A fenti eddigi legjobb felbontású szerkezeteket és az E1 alegység homológ modelljét kötődési adatok alapján térben összekapcsolva kísérletet tettem a komplex szerkezeti topológiájának megállapítására. Az alegységekre vonatkozóan 24:24:12 láncarányt mutató modell nagy hasonlóságot mutat az előkísérletek alapján felvázoltakkal.

A fentiekén túl fontos eredményeket értem el a dimerizációs doménjétől megfosztott hE3 fehérje expressziós és tisztítási protokolljainak optimalizációja, valamint az NMR-kísérletek során. Jelentőséggel bír a hE3 alegység, illetve a humán α -ketoadipát-dehidrogenáz enzimkomplex E1 alegységéhez kötődő számos patogén mutáns kódoló plazmidok megalkotása. Továbbá fontos megemlítenem a FAD molekula stabil izotóposan is jelölhető szintézis-útvonalának kidolgozását, illetve az izoliponsav előállítását is.

8. Summary

As rate determiners of energy production, human α -keto acid dehydrogenase complexes (hKGDHc) cause very severe diseases by dysfunction in the branch points of metabolic pathways. It has raised interest for a better understanding of the molecular background and the revelation of structural basis recently.

The pure protein sample is necessary for structural investigation so I developed the methods for the expression and purification of human α -ketoglutarate dehydrogenase complex subunits. It provided a relatively low-yield but high-quality sample in the case of the E1 subunit. The new method for hE2k, which is simpler and more efficient than the former protocol, provided a high quantity and quality sample for structural investigation.

The hE2k sample was used primarily for structural determination by cryo-electronmicroscopy. The determined 2.9 Å model shed light on the monomeric and multimeric structures for the first time. It gave information about the assembly of and the preference for the 8x3 symmetry. The active center and the embracing channel formed by the interface of two monomers were identified. The most important amino acids and polarity surface for substrate binding and orientation were also identified. A structure based on molecular modeling inspired some significant conclusions about the position of the very flexible N terminal part, as well.

The hE3 sample was used in X-ray crystallography. The single crystal provided structure is the highest resolution model (1.75 Å) of the wild type protein.

The structures described above and the homology model of the E1 component in combination with binding information gave the basis for the structural topology description of the complex. The complex structure, whose subunit ratio is 24:24:12, shows high-level similarity to the hypothetical structure suggested by preliminary experiments.

I have also achieved important results in the case of the dimerization domain deleted E3 construct, considering the optimization of the expression and purification protocols or NMR experiments. The accomplishment achieved by others also raises the importance of my work in the pathogenic mutant plasmid design of the human alpha-ketoadipate dehydrogenase E1 and E3 components. The development of the potential labeling synthesis route for the FAD molecule and the isolipoic acid production also deserves attention.

9. Irodalomjegyzék

- [1] L.J. Reed, R.M. Oliver, The multienzyme alpha-keto acid dehydrogenase complexes, *Brookhaven symposia in biology*, 21 (1968) 397-412.
- [2] L.J. Reed, Multienzyme complexes, *Acc. Chem. Res.*, 7 (1974) 40-46.
- [3] Y. Hiromasa, T. Fujisawa, Y. Aso, T.E. Roche, Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding protein and their capacities to bind the E1 and E3 components, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 6921-6933.
- [4] C.A. Brautigam, R.M. Wynn, J.L. Chuang, D.T. Chuang, Subunit and catalytic component stoichiometries of an in vitro reconstituted human pyruvate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, 284 (2009) 13086-13098.
- [5] M. Smolle, A.E. Prior, A.E. Brown, A. Cooper, O. Byron, J.G. Lindsay, A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 19772-19780.
- [6] L.L. Poulsen, R.T. Wedding, Purification and properties of the a-ketoglutarate dehydrogenase complex of cauliflower mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5709-5717.
- [7] J.D. Erfle, F. Sauer, The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and a-oxoglutarate dehydrogenase complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 178 (1969) 441-452.
- [8] J. Zhou, L. Yang, O. Ozohanics, X. Zhang, J. Wang, A. Ambrus, P. Arjunan, R. Brukh, N.S. Nemeria, W. Furey, F. Jordan, A multipronged approach unravels unprecedented protein-protein interactions in the human 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex, *J. Biol. Chem.*, 293 (2018) 19213-19227.
- [9] M.S. Patel, T.E. Roche, R.A. Harris, *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1996.
- [10] R.N. Perham, Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein, *Biochemistry*, 30 (1991) 8501-8512.

- [11] L.J. Reed, M.L. Hackert, Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 8971-8974.
- [12] R.N. Perham, Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: Catalytic machines for multistep reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 69 (2000) 961-1004.
- [13] A. Ambrus, N.S. Nemeria, B. Torocsik, L. Tretter, M. Nilsson, F. Jordan, V. Adam-Vizi, 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 (2015) 642-650.
- [14] A. Berg, A. deKok, 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain, *Biol. Chem.*, 378 (1997) 617-634.
- [15] N.L. Marrott, J.J. Marshall, D.I. Svergun, S.J. Crennell, D.W. Hough, M.J. Danson, J.M. van den Elsen, The catalytic core of an archaeal 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex is a 42-mer protein assembly, *FEBS J.*, 279 (2012) 713-723.
- [16] H. Yang, P.A. Frey, J.F. Hainfeld, J.S. Wall, Pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*: radial mass analysis of subcomplexes by scanning transmission electron microscopy, *Biophys J.*, 49 (1986) 56-58.
- [17] H.C. Yang, J.F. Hainfeld, J.S. Wall, P.A. Frey, Quaternary structure of pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 16049-16051.
- [18] A. Mattevi, G. Obmolova, E. Schulze, K.H. Kalk, A.H. Westphal, A. de Kok, W.G. Hol, Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex, *Science*, 255 (1992) 1544-1550.
- [19] G.J. Domingo, H.J. Chauhan, I.A. Lessard, C. Fuller, R.N. Perham, Self-assembly and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Bacillus stearothermophilus*, *Eur. J. Biochem.*, 266 (1999) 1136-1146.
- [20] J.L. Milne, D. Shi, P.B. Rosenthal, J.S. Sunshine, G.J. Domingo, X. Wu, B.R. Brooks, R.N. Perham, R. Henderson, S. Subramaniam, Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine, *EMBO J.*, 21 (2002) 5587-5598.
- [21] J.L. Milne, X. Wu, M.J. Borgnia, J.S. Lengyel, B.R. Brooks, D. Shi, R.N. Perham, S. Subramaniam, Molecular structure of a 9-MDa icosahedral pyruvate dehydrogenase

- subcomplex containing the E2 and E3 enzymes using cryoelectron microscopy, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 4364-4670.
- [22] R.A. Frank, J.V. Pratap, X.Y. Pei, R.N. Perham, B.F. Luisi, The molecular origins of specificity in the assembly of a multienzyme complex, *Structure*, 13 (2005) 1119-1130.
- [23] J.K. Stoops, R.H. Cheng, M.A. Yazdi, C.Y. Maeng, J.P. Schroeter, U. Klueppelberg, S.J. Kolodziej, T.S. Baker, L.J. Reed, On the unique structural organization of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 5757-5764.
- [24] C.R. Barrera, G. Namihira, L. Hamilton, P. Munk, M.H. Eley, T.C. Linn, L.J. Reed, α -Keto acid dehydrogenase complexes. XVI. Studies on the subunit structure of the pyruvate dehydrogenase complexes from bovine kidney and heart, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 148 (1972) 343-358.
- [25] S.J. Sanderson, C. Miller, J.G. Lindsay, Stoichiometry, organisation and catalytic function of protein X of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine heart, *Eur. J. Biochem.*, 236 (1996) 68-77.
- [26] Z.H. Zhou, D.B. McCarthy, C.M. O'Connor, L.J. Reed, J.K. Stoops, The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001) 14802-14807.
- [27] T. Wagenknecht, N. Francis, D. DeRosier, Role of excess lipoyl dehydrogenase in reconstituted α -ketoglutarate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun*, 135 (1986) 802-807.
- [28] T. Wagenknecht, N. Francis, D.J. Derosier, α -ketoglutarate dehydrogenase complex may be heterogeneous in quaternary structure, *J. Mol. Biol.*, 165 (1983) 523-539.
- [29] T. Wagenknecht, N. Francis, D.J. DeRosier, J.F. Hainfeld, J.S. Wall, Scanning transmission electron microscopic study of α -ketoglutarate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 877-882.
- [30] A. de Kok, S. Kornfeld, M. Benziman, Y. Milner, Subunit composition and partial reactions of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex of *Acetobacter xylinum*, *Eur. J. Biochem.*, 106 (1980) 49-58.

- [31] V. Bunik, T. Kaehne, D. Degtyarev, T. Shcherbakova, G. Reiser, Novel isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart, *FEBS J.*, 275 (2008) 4990-5006.
- [32] M. Hirashima, T. Hayakawa, M. Koike, Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. II. An improved procedure for the preparation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from pig heart muscle, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 902-907.
- [33] N. Tanaka, K. Koike, M. Hamada, K.I. Otsuka, T. Suematsu, M. Koike, Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. VII. Resolution and reconstitution of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, 247 (1972) 4043-4049.
- [34] G.E. Gibson, L.C. Park, K.F. Sheu, J.P. Blass, N.Y. Calingasan, The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration, *Neurochem. Int.*, 36 (2000) 97-112.
- [35] V.I. Bunik, C. Sievers, Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 5004-5015.
- [36] M.L. Hackert, W.X. Xu, R.M. Oliver, J.S. Wall, J.F. Hainfeld, T.R. Mullinax, L.J. Reed, Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex from bovine kidney: radial distribution of mass determined from dark-field electron micrographs, *Biochemistry*, 28 (1989) 6816-6821.
- [37] A. AEvarsson, J.L. Chuang, R.M. Wynn, S. Turley, D.T. Chuang, W.G. Hol, Crystal structure of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease, *Structure*, 8 (2000) 277-291.
- [38] R. Paxton, P.W. Scislowski, E.J. Davis, R.A. Harris, Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism, *Biochem J.*, 234 (1986) 295-303.
- [39] N.S. Nemeria, G. Gerfen, E. Guevara, P.R. Nareddy, M. Szostak, F. Jordan, The human Krebs cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex creates an additional source of superoxide/hydrogen peroxide from 2-oxoadipate as alternative substrate, *Free Radical Biology and Medicine*, 108 (2017) 644-654.

- [40] N.S. Nemeria, G. Gerfen, P.R. Nareddy, L. Yang, X. Zhang, M. Szostak, F. Jordan, 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 (2018) 136-145.
- [41] F.H. Pettit, S.J. Yeaman, L.J. Reed, Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 4881-4885.
- [42] S.J. Yeaman, The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances, *Biochem J*, 257 (1989) 625-632.
- [43] V. Massey, The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 447-660.
- [44] S. Chaturvedi, A.K. Singh, A.K. Keshari, S. Maity, S. Sarkar, S. Saha, Human Metabolic Enzymes Deficiency: A Genetic Mutation Based Approach, *Scientifica (Cairo)*, 2016 (2016) 9828672.
- [45] A. Ambrus, L. Tretter, V. Adam-Vizi, Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, *J. Neurochem.*, 109 Suppl 1 (2009) 222-229.
- [46] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase, *J. Neurosci.*, 24 (2004) 7771-7778.
- [47] C.L. Quinlan, R.L. Goncalves, M. Hey-Mogensen, N. Yadava, V.I. Bunik, M.D. Brand, The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I, *J. Biol. Chem.*, 289 (2014) 8312-8325.
- [48] V. Adam-Vizi, L. Tretter, The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress, *Neurochem. Int.*, 62 (2013) 757-763.
- [49] A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.A. Starkov, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Mosc)*, 70 (2005) 200-214.
- [50] A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.N. Murphy, A.A. Starkov, Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later, *Biochemistry (Mosc)*, 80 (2015) 517-531.

- [51] R.J. Mailloux, D. Gardiner, M. O'Brien, 2-Oxoglutarate dehydrogenase is a more significant source of O₂(·)/H₂O₂ than pyruvate dehydrogenase in cardiac and liver tissue, *Free Radic. Biol. Med.*, 97 (2016) 501-512.
- [52] A. Rimessi, M. Previati, F. Nigro, M.R. Wieckowski, P. Pinton, Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 81 (2016) 281-293.
- [53] A.A. Starkov, An update on the role of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress, *Mol. Cell Neurosci.*, 55 (2013) 13-16.
- [54] A. Ambrus, B. Torocsik, L. Tretter, O. Ozohanics, V. Adam-Vizi, Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase, *Hum. Mol. Genet.*, 20 (2011) 2984–2995.
- [55] M.D. Brand, Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, 100 (2016) 14-31.
- [56] V. Adam-Vizi, A.A. Starkov, Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts, *J. Alzheimers Dis.*, 20 Suppl 2 (2010) S413-426.
- [57] G.E. Gibson, A. Starkov, J.P. Blass, R.R. Ratan, M.F. Beal, Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1802 (2010) 122-134.
- [58] A.A. Starkov, The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147 (2008) 37-52.
- [59] W. Droge, H.M. Schipper, Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline, *Aging Cell*, 6 (2007) 361-370.
- [60] V.I. Bunik, J.V. Schloss, J.T. Pinto, G.E. Gibson, A.J. Cooper, Enzyme-catalyzed side reactions with molecular oxygen may contribute to cell signaling and neurodegenerative diseases, *Neurochem. Res.*, 32 (2007) 871-891.
- [61] J.M. Cameron, V. Levandovskiy, N. Mackay, J. Raiman, D.L. Renaud, J.T. Clarke, A. Feigenbaum, O. Elpeleg, B.H. Robinson, Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity, *Am. J. Med. Genet. A*, 140 (2006) 1542-1552.

- [62] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360 (2005) 2335-2345.
- [63] L. Tretter, I. Sipos, V. Adam-Vizi, Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease, *Neurochem. Res.*, 29 (2004) 569-577.
- [64] G.E. Gibson, A.E. Kingsbury, H. Xu, J.G. Lindsay, S. Daniel, O.J. Foster, A.J. Lees, J.P. Blass, Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease, *Neurochem. Int.*, 43 (2003) 129-135.
- [65] D.S. Albers, S.J. Augood, L.C. Park, S.E. Browne, D.M. Martin, J. Adamson, M. Hutton, D.G. Standaert, J.P. Vonsattel, G.E. Gibson, M.F. Beal, Frontal lobe dysfunction in progressive supranuclear palsy: evidence for oxidative stress and mitochondrial impairment, *J. Neurochem.*, 74 (2000) 878-881.
- [66] N.M. Anderson, D. Li, H.L. Peng, F.J.F. Laroche, M.R. Mansour, E. Gjini, M. Aioub, D.J. Helman, J.E. Roderick, T. Cheng, I. Harrold, Y. Samaha, L. Meng, A. Amsterdam, D.S. Neuberg, T.T. Denton, T. Sanda, M.A. Kelliher, A. Singh, A.T. Look, H. Feng, The TCA cycle transferase DLST is important for MYC-mediated leukemogenesis, *Leukemia*, 30 (2016) 1365-1374.
- [67] S.P. Burr, A.S. Costa, G.L. Grice, R.T. Timms, I.T. Lobb, P. Freisinger, R.B. Dodd, G. Dougan, P.J. Lehner, C. Frezza, J.A. Nathan, Mitochondrial protein lipoylation and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex controls HIF1alpha stability in aerobic conditions, *Cell Metab.*, 24 (2016) 740-752.
- [68] R.F. Butterworth, A.M. Besnard, Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with alzheimers-disease, *Metab. Brain Dis.*, 5 (1990) 179-184.
- [69] R.F. Butterworth, J.J. Kril, C.G. Harper, Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 17 (1993) 1084-1088.
- [70] I.G. Gazaryan, B.F. Krasnikov, G.A. Ashby, R.N.F. Thorneley, B.S. Kristal, A.M. Brown, Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 10064-10072.

- [71] V. Massey, S. Strickland, S.G. Mayhew, L.G. Howell, P.C. Engel, R.G. Matthews, M. Schuman, P.A. Sullivan, The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36 (1969) 891-897.
- [72] Y. Bando, K. Aki, Mechanisms of generation of oxygen radicals and reductive mobilization of ferritin iron by lipoamide dehydrogenase, *Journal of Biochemistry*, 109 (1991) 450-454.
- [73] A. Shaag, A. Saada, I. Berger, H. Mandel, A. Joseph, A. Feigenbaum, O.N. Elpeleg, Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews, *Am. J. Med. Genet.*, 82 (1999) 177-182.
- [74] S.C. Quinonez, S.M. Leber, D.M. Martin, J.G. Thoene, J.K. Bedoyan, Leigh syndrome in a girl with a novel DLD mutation causing E3 deficiency, *Pediatr Neurol*, 48 (2013) 67-72.
- [75] S.C. Quinonez, J.G. Thoene, Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency, in: R.A. Pagon, Adam, M. P., Ardinger, H. H., et al. (Ed.) *GeneReviews®* [Internet] 1993-2016, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2014, pp. 1-37.
- [76] A. Ambrus, V. Adam-Vizi, Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism, *Neurochem. Int.*, 117 (2018) 5-14.
- [77] T.C. Liu, H. Kim, C. Arizmendi, A. Kitano, M.S. Patel, Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90 (1993) 5186-5190.
- [78] E. Shany, A. Saada, D. Landau, A. Shaag, E. HersHKovitz, O.N. Elpeleg, Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262 (1999) 163-166.
- [79] Y.S. Hong, D.S. Kerr, W.J. Craigen, J. Tan, Y. Pan, M. Lusk, M.S. Patel, Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency, *Hum Mol Genet*, 5 (1996) 1925-1930.

- [80] L. Cerna, L. Wenchich, H. Hansikova, S. Knoch, K. Peskova, P. Chrastina, J. Brynda, J. Zeman, Novel mutations in a boy with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency, *Med Sci Monit*, 7 (2001) 1319-1325.
- [81] O. Grafakou, K. Oexle, L. van den Heuvel, R. Smeets, F. Trijbels, H.H. Goebel, N. Bosshard, A. Superti-Furga, B. Steinmann, J. Smeitink, Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation, *European Journal of Pediatrics*, 162 (2003) 714-718.
- [82] Y.S. Hong, D.S. Kerr, T.C. Liu, M. Lusk, B.R. Powell, M.S. Patel, Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del). Analysis of a family and prenatal testing, *Biochim. Biophys. Acta*, 1362 (1997) 160-168.
- [83] M.H. Odievre, D. Chretien, A. Munnich, B.H. Robinson, R. Dumoulin, S. Masmoudi, N. Kadhom, A. Rotig, P. Rustin, J.P. Bonnefont, A novel mutation in the dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency, *Hum Mutat*, 25 (2005) 323-324.
- [84] Y.S. Hong, S.H. Korman, J. Lee, P. Ghoshal, Q. Qu, V. Barash, S. Kang, S. Oh, M. Kwon, A. Gutman, A. Rachmel, M.S. Patel, Identification of a common mutation (Gly194Cys) in both Arab Moslem and Ashkenazi Jewish patients with dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Possible beneficial effect of vitamin therapy, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26 (2003) 816-818.
- [85] A. Brassier, C. Ottolenghi, A. Boutron, A.M. Bertrand, S. Valmary-Degano, J.P. Cervoni, D. Chretien, J.B. Arnoux, L. Hubert, D. Rabier, F. Lacaille, Y. de Keyzer, V. Di Martino, P. de Lonlay, Dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency: a still overlooked cause of recurrent acute liver failure and Reye-like syndrome, *Mol Genet Metab*, 109 (2013) 28-32.
- [86] E. Quintana, M. Pineda, A. Font, M.A. Vilaseca, F. Tort, A. Ribes, P. Briones, Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) deficiency in a Spanish patient with myopathic presentation due to a new mutation in the interface domain, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33 (2010) S315-S319.
- [87] R. Carrozzo, A. Torraco, G. Fiermonte, D. Martinelli, M. Di Nottia, T. Rizza, A. Vozza, D. Verrigni, D. Diodato, G. Parisi, A. Maiorana, C. Rizzo, C.L. Pierri, S. Zucano, F.

Piemonte, E. Bertini, C. Dionisi-Vici, Riboflavin responsive mitochondrial myopathy is a new phenotype of dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. The chaperon-like effect of vitamin B2, *Mitochondrion*, 18 (2014) 49-57.

[88] Y. Sakaguchi, M. Yoshino, S. Aramaki, I. Yoshida, F. Yamashita, T. Kuhara, I. Matsumoto, T. Hayashi, Dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency - a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction, *European Journal of Pediatrics*, 145 (1986) 271-274.

[89] N. Barak, D. Huminer, T. Segal, Z. Ben Ari, J. Halevy, R.T. Kasper, Lipoamide dehydrogenase deficiency: a newly discovered cause of acute hepatitis in adults, *J. Hepatol.*, 29 (1998) 482-484.

[90] N.S. Nemeria, A. Ambrus, H. Patel, G. Gerfen, V. Adam-Vizi, L. Tretter, J. Zhou, J. Wang, F. Jordan, Human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E1 component forms a thiamin-derived radical by aerobic oxidation of the enamine intermediate, *J. Biol. Chem.*, 289 (2014) 29859-29873.

[91] D.J. Lanska, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency, in, *MedLink Neurology*, 2021.

[92] J. Hagen, H. te Brinke, R.J. Wanders, A.C. Knegt, E. Oussoren, A.J. Hoozeboom, G.J. Ruijter, D. Becker, K.O. Schwab, I. Franke, M. Duran, H.R. Waterham, J.O. Sass, S.M. Houten, Genetic basis of alpha-aminoadipic and alpha-ketoadipic aciduria, *J Inherit Metab Dis*, 38 (2015) 873-879.

[93] H. Przyrembel, D. Bachmann, I. Lombeck, K. Becker, U. Wendel, S.K. Wadman, H.J. Bremer, Alpha-ketoadipic aciduria, a new inborn error of lysine metabolism; biochemical studies, *Clin Chim Acta*, 58 (1975) 257-269.

[94] R.E. Casey, W.A. Zaleski, M. Philp, I.S. Mendelson, S.L. MacKenzie, Biochemical and clinical studies of a new case of alpha-aminoadipic aciduria, *J Inherit Metab Dis*, 1 (1978) 129-135.

[95] A.J. Manders, C.G. von Oostrom, J.M. Trijbels, F.J. Rutten, W.J. Kleijer, alpha-Aminoadipic aciduria and persistence of fetal haemoglobin in an oligophrenic child, *Eur J Pediatr*, 136 (1981) 51-55.

[96] M. Duran, F.A. Beemer, S.K. Wadman, U. Wendel, B. Janssen, A patient with alpha-ketoadipic and alpha-aminoadipic aciduria, *J Inherit Metab Dis*, 7 (1984) 61.

- [97] R.G. Gray, E.M. O'Neill, R.J. Pollitt, Alpha-amino adipic aciduria: chemical and enzymatic studies, *J Inher Metab Dis*, 2 (1980) 89-92.
- [98] C. Vianey-Liaud, P. Divry, J. Cotte, G. Teyssier, alpha-Amino adipic and alpha-keto adipic aciduria: detection of a new case by a screening program using two-dimensional thin layer chromatography of amino acids, *J Inher Metab Dis*, 8 Suppl 2 (1985) 133-134.
- [99] K. Danhauser, S.W. Sauer, T.B. Haack, T. Wieland, C. Stauffer, E. Graf, J. Zschocke, T.M. Strom, T. Traub, J.G. Okun, T. Meitinger, G.F. Hoffmann, H. Prokisch, S. Kolker, DHTKD1 mutations cause 2-amino adipic and 2-oxo adipic aciduria, *Am J Hum Genet*, 91 (2012) 1082-1087.
- [100] T. Takechi, T. Okada, H. Wakiguchi, H. Morita, T. Kurashige, K. Sugahara, H. Kodama, Identification of N-acetyl-alpha-amino adipic acid in the urine of a patient with alpha-amino adipic and alpha-keto adipic aciduria, *J Inher Metab Dis*, 16 (1993) 119-126.
- [101] A.C. Sewell, J. Herwig, H. Bohles, N.G. Abeling, A.H. van Gennip, Normal kynurenine metabolism in 2-oxo adipic aciduria, *J Inher Metab Dis*, 22 (1999) 949-950.
- [102] A.R. Stiles, L. Venturoni, G. Mucci, N. Elbalalesy, M. Woontner, S. Goodman, J.E. Abdenur, New Cases of DHTKD1 Mutations in Patients with 2-Keto adipic Aciduria, *JIMD Rep*, 25 (2016) 15-19.
- [103] H. Pavlu-Pereira, M.J. Silva, C. Florindo, S. Sequeira, A.C. Ferreira, S. Duarte, A.L. Rodrigues, P. Janeiro, A. Oliveira, D. Gomes, A. Bandeira, E. Martins, R. Gomes, S. Soares, I. Tavares de Almeida, J.B. Vicente, I. Rivera, Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: updating the clinical, metabolic and mutational landscapes in a cohort of Portuguese patients, *Orphanet J Rare Dis*, 15 (2020) 298.
- [104] G.K. Brown, L.J. Otero, M. LeGris, R.M. Brown, Pyruvate dehydrogenase deficiency, *J Med Genet*, 31 (1994) 875-879.
- [105] R. Ganesh, N. Suresh, B. Vasuki, K. Narayanan, Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency due to a De Novo Heterozygous Mutation in Exon 7 of PDHA 1 Gene Presenting as Isolated Severe Lactic Acidosis in an Infant, *Indian J Pediatr*, 88 (2021) 88.
- [106] B.H. Le, , L.C. Burrage, Maple syrup urine disease, in, *MedLink Neurology*, 2021.
- [107] J.L. Chuang, R.M. Wynn, C.C. Moss, J.L. Song, J. Li, N. Awad, H. Mandel, D.T. Chuang, Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple

syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 17792-17800.

[108] V.I. Bunik, 2-oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation - Role of the lipoate residues and thioredoxin, *Eur. J. Biochem.*, 270 (2003) 1036-1042.

[109] C. Mottley, R.P. Mason, Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 42677-42683.

[110] E.C. Kooyman, Thiyl radicals, *Pure Appl. Chem.*, 15 (1967) 81-88.

[111] A. Ambrus, An updated view on the molecular pathomechanisms of human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in light of novel crystallographic evidence, *Neurochem. Res.*, 44 (2019) 2307-2313.

[112] L. Remacha, D. Pirman, C.E. Mahoney, J. Coloma, B. Calsina, M. Curras-Freixes, R. Leton, R. Torres-Perez, S. Richter, G. Pita, B. Herraes, G. Cianchetta, E. Honrado, L. Maestre, M. Urioste, J. Aller, O. Garcia-Uriarte, M.A. Galvez, R.M. Luque, M. Lahera, C. Moreno-Rengel, G. Eisenhofer, C. Montero-Conde, C. Rodriguez-Antona, O. Llorca, G.A. Smolen, M. Robledo, A. Cascon, Recurrent Germline DLST Mutations in Individuals with Multiple Pheochromocytomas and Paragangliomas, *Am J Hum Genet*, 104 (2019) 1008-1010.

[113] R.A. Head, R.M. Brown, Z. Zolkipli, R. Shahdadpuri, M.D. King, P.T. Clayton, G.K. Brown, Clinical and genetic spectrum of pyruvate dehydrogenase deficiency: dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) deficiency, *Ann Neurol*, 58 (2005) 234-241.

[114] J. Friedman, A. Feigenbaum, N. Chuang, J. Silhavy, J.G. Gleeson, Pyruvate dehydrogenase complex-E2 deficiency causes paroxysmal exercise-induced dyskinesia, *Neurology*, 89 (2017) 2297-2298.

[115] K.G. Bota A, Wacha A, Ezerarcú fehérjék, in, *Semmelweis Kiadó, Budapest, 2018*, pp. 157-180.

[116] V.G.B. Harmat V, Ezerarcú fehérjék, in, *Semmelweis Kiadó, Budapest, 2018*, pp. 181-201.

[117] B.A. Batta G, Kover K, Martinek T, Perczel A, Toke O, Ezerarcú fehérjék, in, *Semmelweis Kiadó, Budapest, 2018*, pp. 203-256.

[118] K. E, Ezerarcú fehérjék, in, *Semmelweis Kiadó, Budapest, 2018*, pp. 257-276.

- [119] M.A. Avery, H. Pershadsingh, Lipoic acid analogs useful as provitamins and antioxidants, in, France, 2003.
- [120] A. Ambrus, J.J. Wang, R. Mizsei, Z. Zambo, B. Torocsik, F. Jordan, V. Adam-Vizi, 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 (2016) 2098-2109.
- [121] K.M. Joly, G. Mirri, Y. Willener, S.L. Horswell, C.J. Moody, J.H. Tucker, Synthesis of an achiral isomer of lipoic acid as an anchor group for SAM formation on gold surfaces, *J Org Chem*, 75 (2010) 2395-2398.
- [122] J.Z. Yi, N. Nemeria, A. McNally, F. Jordan, R.S. Machado, J.R. Guest, Effect of substitutions in the thiamin diphosphate-magnesium fold on the activation of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* by cofactors and substrate, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 33192-33200.
- [123] A. Ambrus, B. Torocsik, V. Adam-Vizi, Refolding of the human dihydrolipoamide dehydrogenase, *Biochem. Eng. J.*, 45 (2009) 120-125.
- [124] U. Mueller, R. Forster, M. Hellmig, F.U. Huschmann, A. Kastner, P. Malecki, S. Puhlinger, M. Rower, K. Sparta, M. Steffien, M. Uhlein, P. Wilk, M.S. Weiss, The macromolecular crystallography beamlines at BESSY II of the Helmholtz-Zentrum Berlin: Current status and perspectives, *Eur Phys J Plus*, 130 (2015).
- [125] M. Krug, M.S. Weiss, U. Heinemann, U. Mueller, XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS, *J Appl Crystallogr*, 45 (2012) 568-572.
- [126] K.M. Sparta, M. Krug, U. Heinemann, U. Mueller, M.S. Weiss, XDSAPP2.0, *J Appl Crystallogr*, 49 (2016) 1085-1092.
- [127] M.D. Winn, C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G. Leslie, A. McCoy, S.J. McNicholas, G.N. Murshudov, N.S. Pannu, E.A. Potterton, H.R. Powell, R.J. Read, A. Vagin, K.S. Wilson, Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67 (2011) 235-242.

- [128] A. Vagin, A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66 (2010) 22-25.
- [129] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 53 (1997) 240-255.
- [130] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66 (2010) 486-501.
- [131] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66 (2010) 213-221.
- [132] V.B. Chen, W.B. Arendall, 3rd, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66 (2010) 12-21.
- [133] S.Q. Zheng, E. Palovcak, J.P. Armache, K.A. Verba, Y. Cheng, D.A. Agard, MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy, *Nat. Methods*, 14 (2017) 331-332.
- [134] K. Zhang, Gctf: Real-time CTF determination and correction, *J. Struct. Biol.*, 193 (2016) 1-12.
- [135] S.J. Ludtke, P.R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *J. Struct. Biol.*, 128 (1999) 82-97.
- [136] A. Punjani, J.L. Rubinstein, D.J. Fleet, M.A. Brubaker, cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination, *Nat. Methods*, 14 (2017) 290-296.
- [137] J.E. Knapp, D.T. Mitchell, M.A. Yazdi, S.R. Ernst, L.J. Reed, M.L. Hackert, Crystal structure of the truncated cubic core component of the Escherichia coli 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex, *J. Mol. Biol.*, 280 (1998) 655-668.

- [138] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, 25 (2004) 1605-1612.
- [139] D. Piovesan, G. Minervini, S.C. Tosatto, The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks, *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016) W367-374.
- [140] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.*, 372 (2007) 774-797.
- [141] Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, in, 2015.
- [142] X. Robert, P. Gouet, Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, *Nucleic Acids Res.*, 42 (2014) W320-324.
- [143] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, L. Biedermannova, J. Sochor, J. Damborsky, CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures, *PLOS Comput. Biol.*, 8 (2012) e1002708.
- [144] F. Madeira, Y.M. Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, P. Basutkar, A.R.N. Tivey, S.C. Potter, R.D. Finn, R. Lopez, The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Res.*, 47 (2019) W636-W641.
- [145] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol*, 7 (2011) 539.
- [146] A. Mattevi, G. Obmolova, K.H. Kalk, A. Teplyakov, W.G. Hol, Crystallographic analysis of substrate binding and catalysis in dihydrolipoyl transacetylase (E2p), *Biochemistry*, 32 (1993) 3887-3901.
- [147] J.B. Dickey, A.R. Gray., Barbituric acid, *Organic Syntheses*, 18 (1938) 8.
- [148] R. Yanada, Y. Yoneda, M. Yazaki, N. Mimura, T. Taga, F. Yoneda, K. Yanada, Synthesis and reactivities of a novel flavoenzyme model, 5-deazaflavin with C2-symmetry, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8 (1997) 2319-2323.
- [149] M. Iio, T. Shimotokube, H. Omura, Preparation of Some Pentose Oximes, *Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University*, 20 (1975) 1-6.

- [150] R.M. Cresswell, H.C.S. Wood, The Biosynthesis of Pteridines. Part I. The Synthesis of Riboflavin., *Journal of the Chemical Society*, (1960) 4768-4775.
- [151] G.W.E. Plaut, R.A. Harvey, [157] The enzymatic synthesis of riboflavin, *Method Enzymol.*, 18 (1971) 515-538.
- [152] H. Sedlmaier, F. Muller, P.J. Keller, A. Bacher, Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with ¹³C in the xylene ring, *Z Naturforsch C J Biosci*, 42 (1987) 425-429.
- [153] T.V. Mishanina, A. Kohen, Synthesis and application of isotopically labeled flavin nucleotides, *J Labelled Comp Radiopharm*, 58 (2015) 370-375.
- [154] C.A. Brautigam, J.L. Chuang, D.R. Tomchick, M. Machius, D.T. Chuang, Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD(+)/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations, *J. Mol. Biol.*, 350 (2005) 543-552.
- [155] E. Szabo, R. Mizsei, P. Wilk, Z. Zambo, B. Torocsik, M.S. Weiss, V. Adam-Vizi, A. Ambrus, Crystal structures of the disease-causing D444V mutant and the relevant wild type human dihydrolipoamide dehydrogenase, *Free Radical Biology and Medicine*, 124 (2018) 214-220.
- [156] B. Nagy, M. Polak, O. Ozohanics, Z. Zambo, E. Szabo, A. Hubert, F. Jordan, J. Novacek, V. Adam-Vizi, A. Ambrus, Structure of the dihydrolipoamide succinyltransferase (E2) component of the human alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (hKGDHc) revealed by cryo-EM and cross-linking mass spectrometry: Implications for the overall hKGDHc structure, *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1865 (2021) 129889.
- [157] T. Izard, A. Aevarsson, M.D. Allen, A.H. Westphal, R.N. Perham, A. de Kok, W.G. Hol, Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (1999) 1240-1245.
- [158] J. Jiang, F.L. Baiesc, Y. Hiromasa, X. Yu, W.H. Hui, X. Dai, T.E. Roche, Z.H. Zhou, Atomic structure of the E2 inner core of human pyruvate dehydrogenase complex, *Biochemistry*, 57 (2018) 2325-2334.
- [159] S. Prajapati, D. Haselbach, S. Wittig, M.S. Patel, A. Chari, C. Schmidt, H. Stark, K. Tittmann, Structural and functional analyses of the human PDH complex suggest a

"division-of-labor" mechanism by local E1 and E3 clusters, *Structure*, 27 (2019) 1124-1136 e1124.

[160] M.S. Patel, N.S. Nemeria, W. Furey, F. Jordan, The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation, *J. Biol. Chem.*, 289 (2014) 16615-16623.

[161] E. Ishikawa, R.M. Oliver, L.J. Reed, Alpha-Keto acid dehydrogenase complexes, V. Macromolecular organization of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes isolated from beef kidney mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 56 (1966) 534-541.

[162] J. Chakraborty, N.S. Nemeria, E. Farinas, F. Jordan, Catalysis of transthiolacylation in the active centers of dihydrolipoamide acyltransacetylase components of 2-oxo acid dehydrogenase complexes, *FEBS Open Bio*, 8 (2018) 880-896.

[163] J. Hendle, A. Mattevi, A.H. Westphal, J. Spee, A. de Kok, A. Teplyakov, W.G. Hol, Crystallographic and enzymatic investigations on the role of Ser558, His610, and Asn614 in the catalytic mechanism of *Azotobacter vinelandii* dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p), *Biochemistry*, 34 (1995) 4287-4298.

[164] C. Hage, C. Iacobucci, A. Rehkamp, C. Arlt, A. Sinz, The first zero-length mass spectrometry-cleavable cross-linker for protein structure analysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 56 (2017) 14551-14555.

[165] E.D. Merkley, S. Rysavy, A. Kahraman, R.P. Hafen, V. Daggett, J.N. Adkins, Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances, *Protein Sci*, 23 (2014) 747-759.

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

[167] T. Wagner, M. Bellinzoni, A. Wehenkel, H.M. O'Hare, P.M. Alzari, Functional plasticity and allosteric regulation of alpha-ketoglutarate decarboxylase in central mycobacterial metabolism, *Chem Biol*, 18 (2011) 1011-1020.

- [168] N.S. Nemeria, X. Zhang, J. Leandro, J. Zhou, L. Yang, S.M. Houten, F. Jordan, Toward an Understanding of the Structural and Mechanistic Aspects of Protein-Protein Interactions in 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes, *Life (Basel)*, 11 (2021).
- [169] V.I. Bunik, M.D. Brand, Generation of superoxide and hydrogen peroxide by side reactions of mitochondrial 2-oxoacid dehydrogenase complexes in isolation and in cells, *Biol. Chem.*, 399 (2018) 407-420.
- [170] J. Leandro, S. Khamrui, H. Wang, C. Suebsuwong, N.S. Nemeria, K. Huynh, M. Moustakim, C. Secor, M. Wang, T. Dodatko, B. Stauffer, C.G. Wilson, C. Yu, M.R. Arkin, F. Jordan, R. Sanchez, R.J. DeVita, M.B. Lazarus, S.M. Houten, Inhibition and Crystal Structure of the Human DHTKD1-Thiamin Diphosphate Complex, *ACS Chem Biol*, 15 (2020) 2041-2047.
- [171] F. Jordan, N. Nemeria, G. Gerfen, Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase and 2-Oxoadipate Dehydrogenase Both Generate Superoxide/H₂O₂ in a Side Reaction and Each Could Contribute to Oxidative Stress in Mitochondria, *Neurochem. Res.*, 44 (2019) 2325-2335.
- [172] X. Yu, Y. Hiromasa, H. Tsen, J.K. Stoops, T.E. Roche, Z.H. Zhou, Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible N-terminal domains, *Structure*, 16 (2008) 104-114.
- [173] J.Y. Song, F. Jordan, Interchain acetyl transfer in the E2 component of bacterial pyruvate dehydrogenase suggests a model with different roles for each chain in a trimer of the homooligomeric component, *Biochemistry*, 51 (2012) 2795-2803.
- [174] G.E. Murphy, G.J. Jensen, Electron cryotomography of the E. coli pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes, *Structure*, 13 (2005) 1765-1773.
- [175] T. Wagenknecht, R. Grassucci, D. Schaak, Cryoelectron microscopy of frozen-hydrated alpha-ketoacid dehydrogenase complexes from Escherichia coli., *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 22402-22408.
- [176] C.F. Chang, H.T. Chou, J.L. Chuang, D.T. Chuang, T.H. Huang, Solution structure and dynamics of the lipoic acid-bearing domain of human mitochondrial branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 15865-15873.

- [177] M. Kato, J.L. Chuang, S.C. Tso, R.M. Wynn, D.T. Chuang, Crystal structure of pyruvate dehydrogenase kinase 3 bound to lipoyl domain 2 of human pyruvate dehydrogenase complex, *EMBO J*, 24 (2005) 1763-1774.
- [178] M. Kato, J. Li, J.L. Chuang, D.T. Chuang, Distinct structural mechanisms for inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms by AZD7545, dichloroacetate, and radicicol, *Structure*, 15 (2007) 992-1004.
- [179] Y. Devedjiev, C.N. Steussy, D.G. Vassylyev, Crystal structure of an asymmetric complex of pyruvate dehydrogenase kinase 3 with lipoyl domain 2 and its biological implications, *J. Mol. Biol.*, 370 (2007) 407-416.
- [180] C.A. Brautigam, R.M. Wynn, J.L. Chuang, M.T. Naik, B.B. Young, T.H. Huang, D.T. Chuang, 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 (2011) 23476-23488.
- [181] N.S. Nemeria, B. Nagy, R. Sanchez, X. Zhang, J. Leandro, A. Ambrus, S.M. Houten, F. Jordan, Functional Versatility of the Human 2-Oxoadipate Dehydrogenase in the L-Lysine Degradation Pathway toward Its Non-Cognate Substrate 2-Oxopimelic Acid, *Int J Mol Sci*, 23 (2022).
- [182] J.E. Rice, B. Dunbar, J.G. Lindsay, Sequences directing dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) binding are located on the 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1) component of the mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex, *EMBO J*, 11 (1992) 3229-3235.
- [183] R.G. McCartney, J.E. Rice, S.J. Sanderson, V. Bunik, H. Lindsay, J.G. Lindsay, 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 (1998) 24158-24164.
- [184] A.I.A. Al-Alaway, Subunit organisation and assembly of the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex (OGDC), in, 2013.
- [185] M. Kato, R.M. Wynn, J.L. Chuang, S.C. Tso, M. Machius, J. Li, D.T. Chuang, Structural basis for inactivation of the human pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: role of disordered phosphorylation loops, *Structure*, 16 (2008) 1849-1859.

- [186] T. Wagenknecht, R. Grassucci, J. Berkowitz, C. Forneris, Configuration of interdomain linkers in pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* as determined by cryoelectron microscopy, *J. Struct. Biol.*, 109 (1992) 70-77.
- [187] R.A. Frank, A.J. Price, F.D. Northrop, R.N. Perham, B.F. Luisi, Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex, *J. Mol. Biol.*, 368 (2007) 639-651.
- [188] P.M. Ricaud, M.J. Howard, E.L. Roberts, R.W. Broadhurst, R.N. Perham, Three-dimensional structure of the lipoyl domain from the dihydrolipoyl succinyltransferase component of the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 264 (1996) 179-190.
- [189] A. Berg, J. Vervoort, A. de Kok, Solution structure of the lipoyl domain of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*, *J. Mol. Biol.*, 261 (1996) 432-442.
- [190] K. Chandrasekhar, J. Wang, P. Arjunan, M. Sax, Y.H. Park, N.S. Nemeria, S. Kumaran, J. Song, F. Jordan, W. Furey, 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 (2013) 15402-15417.
- [191] X. Zhang, N.S. Nemeria, J. Leandro, S. Houten, M. Lazarus, G. Gerfen, O. Ozohanics, A. Ambrus, B. Nagy, R. Brukh, F. Jordan, Structure-function analyses of the G729R 2-oxoadipate dehydrogenase genetic variant associated with a disorder of l-lysine metabolism, *J. Biol. Chem.*, 295 (2020) 8078-8095.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Nemeria NS, **Nagy B**, Sanchez R, Zhang X, Leandro J, Ambrus A, Houten SM, Jordan F. (2022)

Functional versatility of the human 2-oxoadipate dehydrogenase in the L-lysine degradation pathway toward its non-cognate substrate 2-oxopimelic acid.

Int J Mol Sci 23(15): 8213, **IF: 6,208 (D1)**

Nagy B, Polak M, Ozohanics O, Zambo Z, Szabo E, Hubert A, Jordan F, Novaček J, Adam-Vizi V, Ambrus A. (2021)

Structure of the dihydrolipoamide succinyltransferase (E2) component of the human alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (hKGDHc) revealed by cryo-EM and cross-linking mass spectrometry.

Biochim Biophys Acta Gen Subj 1865(6): 129889, **IF: 4,117 (Q1)**

Zhang X, Nemeria NS, Leandro J, Houten S, Lazarus MB, Gerfen GJ, Ozohanics O, Ambrus A, **Nagy B**, Brukh R, Jordan F. (2020)

Structure-function analyses of the G729R 2-oxoadipate dehydrogenase genetic variant associated with L-lysine metabolism disorder.

J Biol Chem 295(23): 8078-8095., **IF: 5,157 (D1)**

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: 5,101 (D1)**

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Ambrus Attilának. Attila az évek során mind szakmailag, mind pedig emberileg nagyon sokat tett ezen tézis megszületéséért. Nélküle biztosan nem tartanék itt.

Köszönettel tartozom mindazon jelenlegi és korábbi kollégáimnak, akik hozzátettek munkámhoz és akiknek eredményeihez én is hozzájárulhattam. Külön ki kell emelnem Dr. Szabó Esztert, Dr. Xu Zhangot és Dr. Natalia S. Nemeriat, akikkel közösen publikáltunk, valamint Dr. Ozohanics Olivért, Zámbo Zsófia Melindát és Martin Polakot, akik nélkül elsőszerezős cikkem nem születhetett volna meg. Dr. Mirzahosseini Arash-nak, Dr. Törőcsik Beátának és Dr. Hubert Ágnesnek a közös munkáért és a tőlük tanultakért tartozom hálával. Ezen túl szeretnék köszönetet mondani Vass Krisztina Rubinának és Nemes-Nikodém Évának szintén a közös munkáért.

Köszönöm Prof. Frank Jordannek, valamint Prof. Jiří Novačeknek a külföldi tanulmányutak megvalósításáért tett erőfeszítéseiket és támogatásukat.

Köszönettel tartozom Ádám Veronika Professzor Asszonynak, aki a Neurobiokémiai Kutatócsoport vezetőjeként lehetővé tette PhD kutatómunkám megvalósítását.

Szintén köszönettel tartozom Prof. Csanády Lászlónak és Prof. Tretter Lászlónak, akik a Biokémiai Tanszék jelenlegi és korábbi igazgatóiként megteremtették az eredményes munkához szükséges makrokörnyezetet. Emellett szeretnék köszönetet mondani Maróthy Dr. Tóth Erzsébet tanárnőnek, akinek irodáját megosztva a szükséges mikrokörnyezet is megszületett.

A fent leírtakon túl ki kell fejeznem hálámát szűken és tágan értelmezett családomnak, valamint barátaimnak, akik akár erőt adva, akár gondjaimat megosztva segítettek az elmúlt években végigjárt olykor rögös útjaimon.