dc_1766_20

A lipoamid-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex molekuláris patológiája

Akadémiai Doktori Értekezés

(rövid értekezés)

Ambrus Attila

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Semmelweis Egyetem

Budapest

2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3

BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR 5

CÉLKITŰZÉSEK 14

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 15

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK 17

A LADH és a KGDHk ROS-képzésének vizsgálata és gátlása liponsavval 17

A hLADH klinikailag releváns mutánsainak vizsgálata 22

A rekombináns hKGDHk, h(E1k-E2k) alkomplex és hE1k alegység vizsgálata 29

Patogén hLADH mutánsok szerkezetvizsgálata oldatban HDX-MS technikával 35

Betegséget-okozó hLADH variánsok szerkezetvizsgálata röntgenkrisztallográfiával 41

A hKGDHk, valamint E2 komponensének krio-EM- és MS-alapú szerkezetmeghatározása 48

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA 53

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 55

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA 56

IRODALOMJEGYZÉK 57

Rövidítések jegyzéke

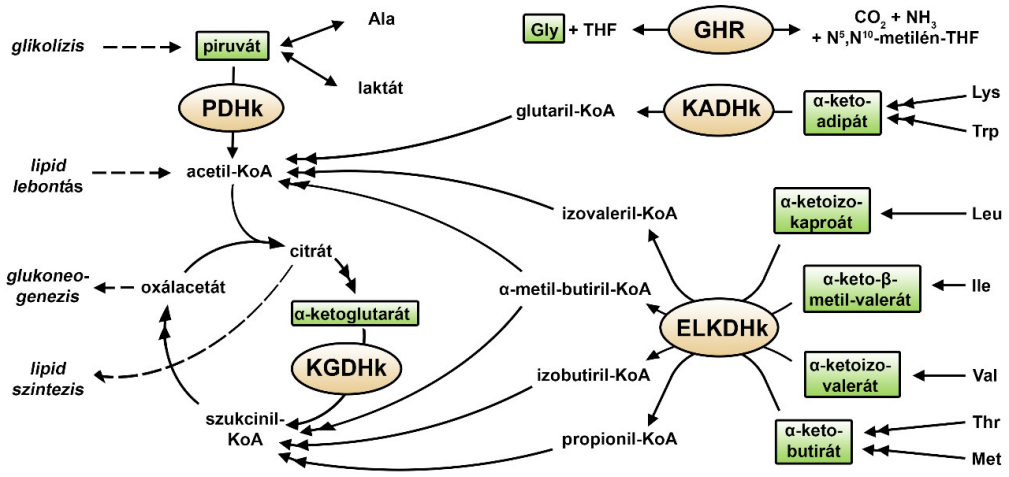
′	(aminosav jelölést követően) szomszédos monomerhez tartozó aminosavat jelöl
av	*Azotobacter vinelandii* eredetű
Bis-Tris	2-[bisz(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)propán-1,3-diol
CD	cirkuláris dikroizmus
CL-MS	(kémiai) keresztkötés-kapcsolt tömegspektrometria [(chemical) *c*ross-*l*inking-coupled *m*ass *s*pectrometry]
cit c	citokróm c
DCPIP	2,6-diklór-fenol-indofenol (2,6-*di*chloro*p*henol*i*ndo*p*henol)
DHE	dihidroetídium
DHLA	dihidrolipoamid
(DH)LADH	(dihidro)lipoamid/lipoil-dehidrogenáz
DHLS	dihidroliponsav ($Lip(SH)_2$-ként is feltüntetésre kerül)
DLD	a hLADH génje
E1	a mitokondriális α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz komplexek α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz/dekarboxiláz alegységei/komponensei
E2	a mitokondriális α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz komplexek (dihidro)lipoamid/lipoil-aciltranszferáz/transzaciláz alegységei/komponensei
E3	a mitokondriális α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz komplexek közös (dihidro)lipoamid/lipoil-dehidrogenáz alegysége/komponense
E3KF	E3-kötő fehérje
ec	*Escherichia coli* (*E. coli*; kólibaktérium) eredetű
ELKDHk	elágazó-(szén)láncú α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz komplex
EM	elektronmikroszkópia
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
GHR	glicin-hasító rendszer
G–M	glutamát + malát
h	humán
HDX-MS	hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (*h*ydrogen/*d*euterium e*x*change *m*ass *s*pectrometry)
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etánszulfonsav
HRP	torma-peroxidáz (*h*orse*r*adish *p*eroxidase)
k	(enzim)komplex, ill. alegységek/komponensek esetében KGDHk alegységek/komponensek jelölése
KADHk	α-ketoadipát/2-oxoadipát-dehidrogenáz komplex
KG	α-ketoglutarát/2-oxoglutarát
KGDHk	α-ketoglutarát/2-oxoglutarát-dehidrogenáz komplex (OGDHk)
KoA	koenzim A
LA	lipoamid
LC	folyadékkromatográfia (*l*iquid *c*hromatography)
LDS-PAGE	lítium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
L-fehérje	a GHR LADH alegysége
LS	liponsav ($LipS_2$-ként is feltüntetésre kerül)
MD	molekuláris dinamika
MS	tömegspektrometria (*m*ass *s*pectrometry)
MSUD	juharszirup vizelet betegség (*m*aple *s*yrup *u*rine *d*isease)
MW	molekulasúly (*m*olecular *w*eight)
NAD^+	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid

NMR	magmágneses rezonancia (*n*uclear *m*agnetic *r*esonance)
p	PDHk alegységek/komponensek jelölése
PDB	Fehérje(szerkezeti) Adatbázis (*P*rotein *D*ata *B*ank)
PDHk	piruvát-dehidrogenáz komplex
PLP	piridoxál-foszfát (*p*yridoxa*l* *p*hosphate)
ROS	reaktív oxigénszármazékok (*r*eactive *o*xygen *s*pecies; ebben a disszertációban kizárólag szuperoxid-aniont, ill. H_2O_2-t jelent)
SEM	középérték standard hibája (*s*tandard *e*rror of the *m*ean)
THF	tetrahidrofolsav
TPP	tiamin-pirofoszfát (*t*hiamine *p*yro*p*hosphate)
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol (*Tris*(hydroxymethyl)aminomethane)
wt	vad-típusú
$\Delta\Psi_m$	membránpotenciál

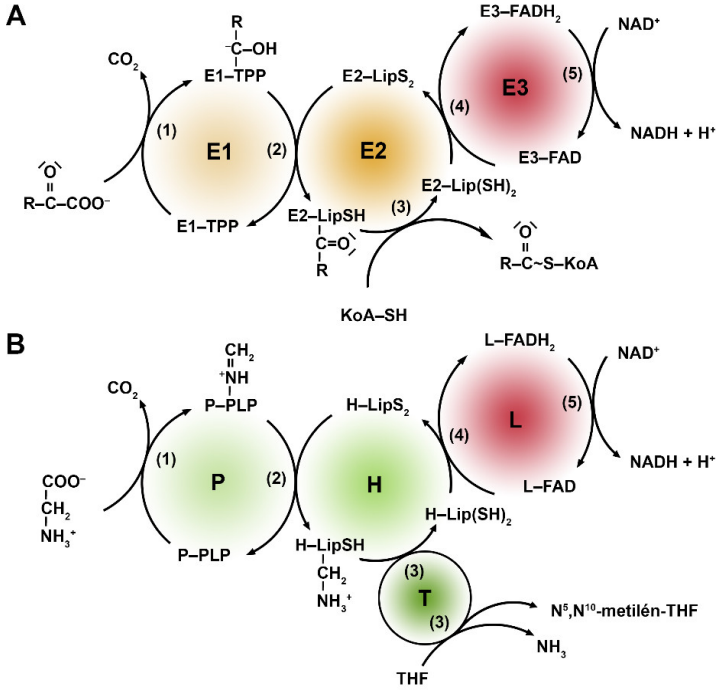
Bevezetés, irodalmi háttér

(Megjegyzés: A téma igen széleskörű (~ 80 évnyi) irodalma és a rövid disszertációs forma miatt csak a legfontosabb eredeti közleményekre hivatkozom itt a szövegben, néhány esetben a megfelelő összefoglaló közleményeket adom mindössze meg, amelyekben az eredeti referenciák megtalálhatóak).

A humán (dihidro)lipoamid/lipoil-dehidrogenáz enzim [h(DH)LADH, hE3 (alegység), EC 1.8.1.4., génje: *DLD*] egy piridin-nukleotid-diszulfid-oxidoreduktáz, melynek elégtelensége/deficienciája egy autoszómális recesszív öröklődésű, ritka genetikai betegség [1-3]. A rendellenesség hordozói a legnagyobb arányban az Ashkenazi zsidó populációban fordulnak elő (1:94-1:110, a G194C-hE3 patogén variánsra nézve; a betegség kialakulási valószínűsége 1:35000-1:48000) [4, 5]. Ebben a disszertációban az aminosavak számozása a 474 aminosavat tartalmazó érett enzimre vonatkozik (a 35 aminosav hosszúságú mitokondriális vezető szekvenciát nem veszi figyelembe). A betegség elsősorban az intenzív metabolizmust folytató, nagy oxigénfelhasználással jellemezhető szöveteket érinti és éppen ezért a vonatkozó klinikai tünetek is elsődlegesen neurológiai és kardiológiai jellegűek, habár a májat érintő funkciózavarok is meglehetősen gyakoriak [1, 6, 7]. A hLADH-deficiencia jellegzetes klinikai fenotípusai: növekedés elmaradása, hipertrófiás kardiomiopátia, enkefalopátia, az izomzat tónustalansága, laktát-acidózis, hipoglikémia, Leigh-szindróma, ataxia, fejlődési rendellenességek, látás-károsodás, mikrokefália, illetve májelégtelenség [1, 5-17]. Noha egyes esetekben a klinikai tünetek csak a felnőttkorban jelentkeznek, sokszor már a neonatális korban is megmutatkoznak és ekkor gyakran korai halállal végződnek [1]. A betegség korai kezdetű formájában gyakran egy hipotóniás csecsemővel találkozik a klinikus és laktát acidózist észlel. A beteg általában az első vagy ismétlődő anyagcsere-dekompenzációja során veszíti életét, míg ha túl is éli ezeket, a fejlődésben visszamaradott lesz, illetve maradandó idegrendszeri károsodásokat (pl. intellektuális deficit, ataxia) szenved [1]. Metabolikus dekompenzációt kiválthat például bármilyen betegség vagy orvosi beavatkozás, de akár kiegyensúlyozatlan táplálkozás is. A betegség diagnózisa a klinikai lefolyás, illetve vonatkozó biokémiai eredmények alapján feltételesen lehetséges, de teljes bizonyosságot csakis a genetikai vizsgálat szolgáltat. Diagnosztikus klinikai biokémiai eredmény lehet a hLADH, illetve a hLADH-t komplexáló mitokondriális α-ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek (α-ketoglutarát/2-oxoglutarát-dehidrogenáz (KGDH/OGDH), piruvát-dehidrogenáz (PDH), α-ketoadipát/2-oxoadipát-dehidrogenáz (KADH) és elágazó-(szén)láncú α-ketosav-dehidrogenáz (ELKDH) komplexek) csökkent működése (enzimaktivitása). A hLADH ezen fenti komplexek közös harmadik alegysége/komponense (hE3). Az említett enzimkomplexek metabolikus szerepét az 1. ábra, míg felépítésük, illetve



1. ábra. A LADH metabolikus szerepe. A LADH enzim az aerob szénhidrát anyagcserében (PDHk), a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusban (annak egy sebességmeghatározó lépésében [18-23]) (KGDHk), illetve aminosavak lebontásában (elágazó szénláncú aminosavak, metionin, treonin – ELKDHk; lizin, triptofán – KADHk; glicin – GHR) játszik meghatározó szerepet [3]. Az ábrán a metabolikus lépéseket nyilak jelölik (a duplafejű nyilak a kettő vagy több lépésben megvalósuló átalakulásokat, míg a kétirányú nyilak a megfordítható folyamatokat jelölik). Az α-ketosav-dehidrogenáz reakciókban NADH és CO_2 is felszabadul, melyek itt nincsennek feltüntetve. Az ábra Dr. Szabó Eszter Ph.D. disszertációjából (2020) lett átvéve.



2. ábra. Az α-ketosav-dehidrogenáz komplexek és a GHR sematikus felépítése, illetve működése. Az α-ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek **(A)** és a GHR **(B)** specifikus szubsztrátjaikon oxidatív dekarboxilezést (míg az előbbiek KoA-kapcsolást is) hajtanak végre. Az új katalitikus ciklust a LADH-alegység teszi lehetővé azáltal, hogy reciklizáltatja a komplexekben kovalensen kapcsolt liponsav kofaktort, melyhez kapcsoltan redukáló ekvivalens (NADH) is termelődik. Az ábrák bemutatják a vonatkozó részreakciókat (1-5) és feltüntetik a reakciókhoz szükséges alegységeket (E1: α-keto/2-oxo-sav-dehidrogenáz/dekarboxiláz, E2: (dihidro)lipoamid/lipoil-aciltranszferáz/transzaciláz, E3: (dihidro)lipoamid/lipoil-dehidrogenáz (LADH, közös alegység), P: Gly-dehidrogenáz/dekarboxiláz, H: "liponsav-kötő (kapcsoló) fehérje", T: aminometil-transzferáz, L: LADH), illetve kofaktorokat (TPP – tiamin-pirofoszfát, $LipS_2$/$Lip(SH)_2$ – oxidált/redukált liponsav, FAD – flavin-adenin-dinukleotid, KoA – koenzim A, PLP – piridoxál-foszfát, THF – tetrahidrofolsav) [3]. Az α-ketosav-dehidrogenáz komplexek alegység-sztöchiometriája fajonként és komplexenként változik [24]. Az ábra Dr. Szabó Eszter Ph.D. disszertációjából (2020) lett átvéve.

működésük összefoglaló sémáját a 2. ábra mutatja be. Ezek az enzimkomplexek a legnagyobb és legbonyolultabb multienzim komplexek közé tartoznak, molekulasúlyuk elérheti akár a 9 MDa-t is (fajtól függően). Emlősökben a PDHk és az ELKDHk a megfelelő E1 alegység foszforilációja (inaktivációja), illetve defoszforilációja (aktivációja) által regulálódik [25, 26], melyhez humán esetben négy PDHk kináz, kettő PDHk foszfatáz, egy ELKDHk kináz és egy ELKDHk foszfatáz áll rendelkezésre [26, 27]. Ezek a kinázok és foszfatázok különböző metabolitokra és hormon szignálokra érzékenyek, amely által a fő enzimkomplexek igen összetett és magasszintű regulációját valósítják meg [26]. Érdekes jelenség, hogy a hKADHk a hKGDHk E2 alegységét használja a funkciójához [28, 29]. A hLADH ELKDHk-ben betöltött szerepe miatt a hLADH/hE3-deficienciát 3-as típusú juharszirup vizelet betegségnek (MSUD-3, maple syrup urine disease type 3), illetve elágazó-szénláncú ketoaciduriának is hívják (MSUD-1 ill. 2: az ELKDHk E1 ill. E2 komponensének (biallélikus) deficienciája). Mivel a hLADH enzim alulműködése egyszerre érinti az összes fenti metabolikus komplexet, a hLADH-elégtelenség általában sokkal súlyosabb tünetekkel jár együtt, mint az izolált enzimkomplex deficienciák. Az ezektől történő differenciál diagnosztika általában könnyű, tekintve, hogy hLADH-elégtelenségben általában mindegyik fenti enzimkomplex jelentős mértékben érintett. A hLADH a glicinhasító-rendszernek (GHR, másnéven: Gly-dekarboxiláz komplex, *reverz* irányban: Gly-szintáz) is része (L-fehérje, lásd az 1. és 2. ábrákat), illetve szabad formában is előfordul (lásd alább). A hLADH-deficiencia érdekes módon viszont a GHR működését általában nem befolyásolja [1, 3]. A disszertáció másik tárgyát, a hKGDHk-t, a metabolikus szerepén kívül az utóbbi években összefüggésbe hozták még a HIF1α stabilizációjával [30], a metabolizmus újraprogramozásával, epigenetikai változásokkal [31], sejtproliferációval, hiszton-szukcinilációval [32], illetve rákbetegségben MYC-mediált leukemogenézissel [33], amely funkciókat szintén befolyásolhatják a hLADH patogén mutációi.

A hLADH-aktivitás csökkenésének a mértéke a klinikai mintákban általában nem korrelál jól a betegek tüneteinek a súlyosságával. Továbbá még a pontos genotipusból sem lehet egyértelműen megjósolni a kórlefolyás karakterisztikáit [6, 7, 14]. Ezért is feltételezhető, hogy egyéb (biokémiai) faktorok is hozzájárulnak a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokhoz. Például, hLADH-deficienciában sem csak kizárólag a hE3 alegység hLADH-aktivitásának csökkenéséből eredhet az α-ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek alulműködése. Mindegyik fenti enzimkomplex alulműködéséhez hozzájárulhat például az is, hogy bizonyos betegséget-okozó hLADH mutánsok – a hLADH-aktivitás részleges elvesztésén felül – még ráadásul csökkent affinitással is kötődnek ezekhez a komplexekhez

[2, 34-37]. Ezzel összefüggésben, a klinikai irodalom is jól megmutatja, hogy néha jelentékenyen nagyobb mértékben csökken a fenti enzimkomplexek aktivitása, mint maga a hLADH aktivitás [6, 7]. Az a tény, hogy a különböző enzimkomplexek aktivitásai ilyenkor eltérő mértékben csökkennek azt valószínűsíti, hogy a kérdéses patogén hLADH mutánsok – csakúgy mint maga a vad típusú hLADH is [38] – más erősséggel kötődnek a különböző komplexekhez [9, 10].

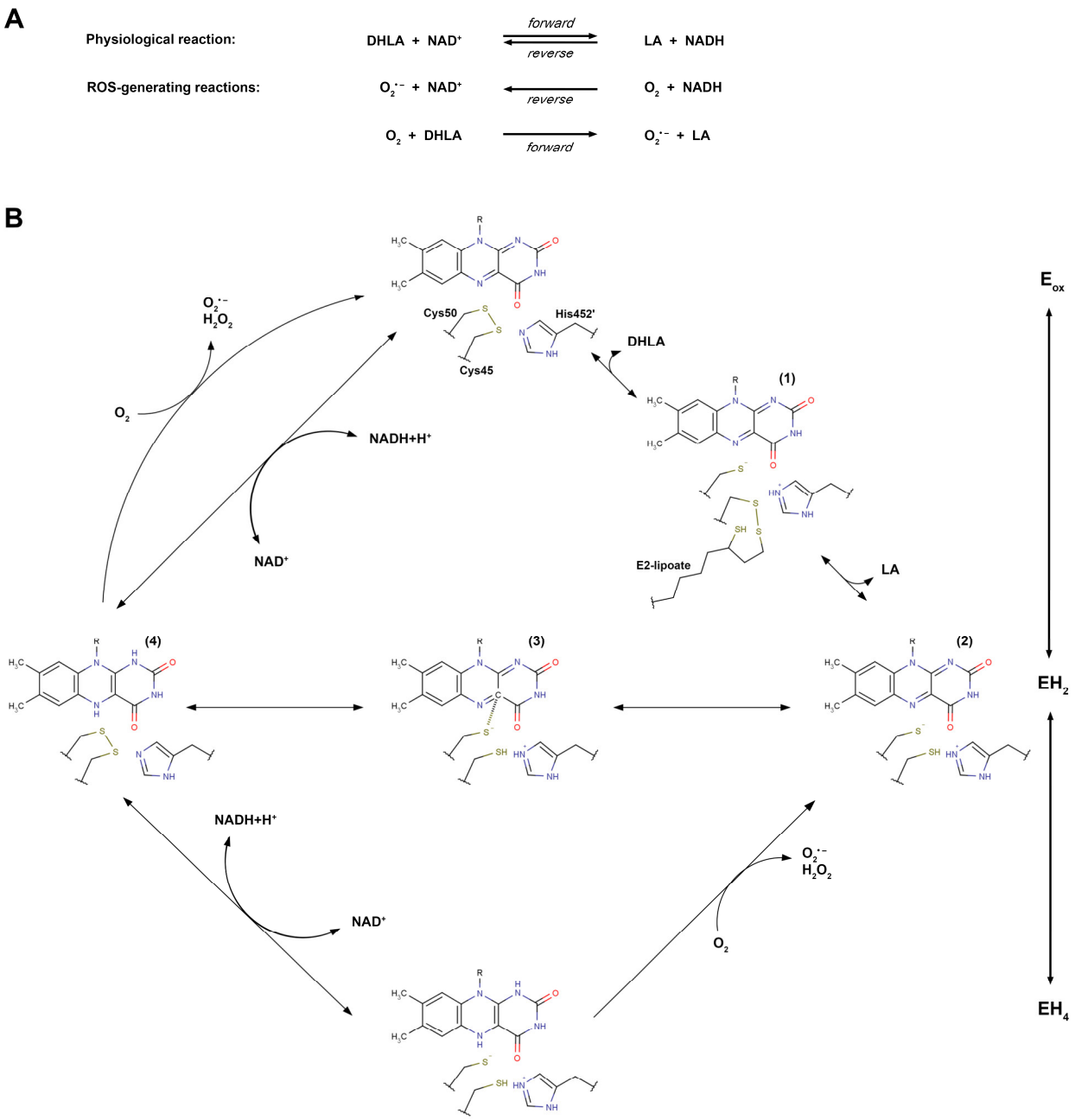
A vonatkozó enzimkomplex-aktivitások csökkenése végülis – akár csak időszakosan is – laktát felszaporodást, emelkedett α-ketoglutarát (KG) szintet (vizeletben), emelkedett elágazó-szénláncú aminosav (Leu, Ile, Val) szintet (plazmában), illetve elágazó-szénláncú ketosav (vizeletben) és/vagy allo-Ile (plazmában) felszaporodást okoz. Gyakran emelkedett transzamináz-, citrullin-, illetve kreatin-kináz-szint is kíséri a betegség lefolyását [1]. A liponsav-metabolizmus defektusai sokszor hasonló klinikai lefolyásúak mint az E3-deficiencia, ott azonban a Gly emelkedett koncentrációja jellemző a különböző testfolyadékokban, amely differenciál-diagnosztikus értékű [39]. A maradék hLADH-aktivitást diagnosztikus célból gyakran mérik fibroblasztokból, limfocitákból, illetve máj vagy izom szövetmintákból [1, 6, 7]. Ezen adatokat sokszor nehéz összevetni *in vitro* – tisztított rekombináns fehérjével mért – adatokkal, *i.* a klinikumban gyakran tapasztalt ún. összetett heterozigóta beteganyag (heterozigóták nem mutatnak tüneteket), *ii.* az alkalmazott – sokszor igen eltérő biokémiai karakterisztikájú (pl. *forward* avagy *reverz* reakcióirányú) – enzimesszék, illetve *iii.* a mért fehérjék eltérő biokémiai (szöveti, illetve tiszta oldat) környezete miatt [3].

Az akut rohamok között a betegek kezelése empirikus alapokon történik, amely figyelembe veszi a vonatkozó enzimkomplexek érintettségét [ELKDHk: elágazó-szénláncú aminosavak, illetve fehérjék bevitelének csökkentése, éheztetés kerülése; KGDHk: nincs elfogadott ajánlás; PDHk: ketogén/zsírdús étrend, tiamin bevitel, diklór-acetát adása (a PDH-kináz gátlására)]. Általában a betegek kapnak még vitaminokat (főleg B2, B7), antioxidánsokat, Koenzim Q10-et, liponsavat, illetve intravénás glükózt az akut epizódok során [1]. Utóbbi esetben elsősorban a metabolikus acidózist kell kontrollálni és a normoglikémiát kell fenntartani, illetve általánosságban egy stabil metabolikus státuszt kell megpróbálni elérni (pontosabb klinikai ajánlásokért, lásd [1]). Nincs elfogadott klinikai protokoll az akut epizódok megelőzésére, mindenesetre megfigyelték, hogy azok frekvenciája a korral általában csökken [1].

A patogén hLADH variánsok eltérő aminosavra (missense) vagy stop kodonra (nonsense) történő váltás, splice hely perturbáció, illetve (kisméretű) kivágódások/beépülések

hatására jönnek létre [6, 7]. Exon vagy a teljes gén kivágódását avagy duplikációját a hLADH-elégtelenség okaként még nem írták le [1] (egy exon kihagyása kombinálódva a leolvasási keret eltolódásával – egy rövidebb fehérjeterméket eredményezve – azonban létrejött egy dokumentált esetben [8]). Az érett hLADH enzimre vonatkozóan 14 betegséget-okozó aminosavcserét (vagy deléciót) írtak le eddig a klinikai szakirodalomban [3] (eredeti referenciákért lásd a klinikai fenotípusokhoz kapcsolódó cikkeket fentebb). A hLADH korábbi röntgenkrisztallográfiás szerkezetvizsgálata megmutatta, hogy a patogén aminosav szubsztitúciók a fehérjeszerkezet három régiójába összpontosulnak: a kofaktor-kötő régióba (pl. I12T, K37E), az aktív centrumba (pl. P453L), illetve a dimerizációs felszínre (pl. E340K, D444V; a hLADH egy nemkovalens, funkcionális/obligát homodimer [MW(monomer)=~50 kDa], melynek fiziológiás aktivitásához mindkét aktív centrumában a szomszédos monomer bizonyos aminosavai is szükségesek) [40]. Az *in vitro*, illetve *in vivo* hLADH-aktivitás csökkenésének a hátterében - a korábbi irodalom szerint – alacsony fehérjeexpresszió, a fehérje kedvezőtlen feltekeredése/stabilitása és gyorsabb lebomlása, kedvezőtlen konformációs változások, a FAD-kofaktor (részleges) elvesztése (mivel az erősen, de nem kovalensen kötődik az enzimhez), kritikus aminosav-interakciók megszűnése, illetve a funkcionális homodimer felbomlása állhat(nak) [14, 40-42].

Amint azt a 2. ábra is már bemutatta, a hLADH-nak az a fiziológiás szerepe az α-ketosav-dehidrogenáz komplexekben, hogy az E2 alegységekhez kovalensen kötött dihidroliponsav (DHLS) kofaktort liponsavvá (LS) oxidálja. Ezáltal a reakció által jöhet csak létre a következő katalitikus ciklus. A 3. ábra bemutatja a LADH katalitikus mechanizmusának főbb elemeit és lépéseit. A LADH képes katalizálni egy- illetve kételektronos reakciókat is, akár alternatív (nem fiziológiás) szubsztrátok/elektron-akceptorok – mint például a 2,6-diklór-fenol-indofenol (DCPIP, ún. diaforáz reakció), Fe^{3+} (ún. elektron-transzferáz reakció), vagy a molekuláris oxigén (O_2, ún. oxidáz reakció) – felhasználásával is (ezekben az esetekben NADH oxidációjának a terhére jönnek létre a reakciók) [3, 42-47]. Érdekes megfigyelés, hogy a diaforáz és az elektron-transzferáz reakciók pH-optimumai meglehetősen savasak (5,6 és 4,8) [42, 45], bár a LADH reakció pH-optimuma is nagyon változó attól függően, hogy melyik katalitikus irányban mérünk, illetve hogy milyen liponsav származékot használunk (5,5-8,3) [42, 45, 48]. Az O_2 esetében az egyelektronos reakció – amelyet a LADH FAD kofaktora tesz lehetővé – létrejöhet mind a *forward* mind pedig a *reverz* katalitikus irányban is (lásd 3. ábra), melyek során mindig szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot -}$) keletkezik [43, 49]. A *reverz* katalitikus irányú szuperoxid-képzés és az elektron-transzferáz reakció analóg mechanizmusúak abban a tekintetben, hogy mindössze egy elektron



3. ábra. Az E3 LADH és ROS-képző reakcióinak egyszerűsített, összefoglaló mechanizmusa. A LADH-reakció ping-pong bi-bi mechanizmusú, amelynek itt csak az ún. reduktív (sebességmeghatározó) félreakciója van részletezve. A FAD (prosztetikus csoport), Cys45-Cys50 (redox-aktív diszulfid-kötés) és a His452′ (katalitikus bázis) az aktív centrum részei, R=ribitil-ADP, E_{ox}=oxidált E3, EH_2 illetve EH_4=két- illetve négy-elektron (által) redukált E3. Az EH_2 állapot egy ún. kevert diszulfid intermedieren (1) keresztül alakul ki és a 2-4 specieszek egyensúlyi keveréke, a töltésátviteli komplex (3) dominanciája mellett. Ditionit ($Na_2S_2O_4$) vagy NADH (és acidikus pH) szükséges az EH_2 további redukciójához (EH_4-állapotba), amely a LADH-reakció teljes gátlását eredményezi. A NAD^+ jelenléte destabilizálja az EH_4 állapotot, ezáltal reaktiválja a LADH aktivitást (ez rámutat a NADH:NAD^+ arány reguláló szerepére az α-ketosav-dehidrogenáz komplexek esetében). Az O_2 egy alternatív elektron-akceptor lehet az EH_2 és az EH_4 állapotban is, mely esetekben szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) keletkezik a FAD kofaktor közreműködésével a primer ROS-képző folyamatban. A NAD^+ jelenléte gátolja a LADH-általi ROS-képzést. Az ábra a Szabó E. és mtsai, *Hum. Mol. Genet.*, 2019 cikkünk S1 ábrája. Eredeti referenciákért lásd [3, 50, 51].

átmenetével járnak. A szuperoxid egy primer reaktív oxigénszármazék (ROS) a fenti folyamatban, amely részleges, spontán diszmutációval/diszproporcionálódással H_2O_2-vé –

egy másik ROS-á − alakul [52-54]. Flavinok és flavoenzimek esetében már korábban leírták, hogy azok képesek az O_2-t (részlegesen) redukálni [49, 53, 55]. A Zn^{2+} képes stimulálni a LADH-általi ROS-képzést, amelynek iszkémia-reperfúzióban, illetve Alzheimer-kórban lehet szerepe, hiszen ezekben az állapotokban a Zn^{2+} koncentrációja megnő [43, 56, 57]. Mivel a LADH multienzim komplexektől függetlenül is létezhet [58-62], illetve szintén megállapítást nyert, hogy a legnagyobb koncentrációban jelenlévő flavoprotein izom és agyi mitokondriumokban [63], ezért ROS-képzése – megfelelő körülmények között – akár önmagában is releváns lehet patológiás szempontból [2, 3]. A LADH szabad formájú előfordulásához az is hozzájárulhat potenciálisan, hogy a KGDHk-hoz és az ELKDHk-hoz sokkal gyengébben kötődik mint a PDHk-hoz [62, 64-66] (ezeket a kötődéseket pedig bizonyos patogén mutációk még tovább gyengíthetik, lásd fentebb). A LADH ROS-képző tulajdonságát rákterápiában is tervezik kihasználni [67]. Leírták, hogy a LADH diaforáz és ROS-képző aktivitásaihoz elsősorban a FAD jelenlétére van szükség az aktív centrumban és így ezekhez az aktivitásokhoz elegendő az enzim monomer formája is [42, 43, 68, 69]. A LADH monomerizációjához meglehetősen extrém kísérleti körülmények szükségesek (apomerizáció, extrém higítás, többszöri fagyasztás-olvasztás, denaturáció, extrém sav- vagy só-koncentráció alkalmazása) [23, 42, 44, 45, 68-71]. A diaforáz aktivitás fokozódását enyhe (patológiás mértékű) savasodásra, illetve egy „mellék" ("moonlighting") proteáz-aktivitás/aktív centrum megjelenését egy dimerizációs felszínt érintő patogén mutáció hatására a LADH dimer (részleges) monomerizációjával magyarázták [41, 42]. Általánosságban is javasolták, hogy a dimerizációs felszínt érintő patogén mutációk úgy hatnak, hogy monomerizációt indukálnak a LADH enzimben [14, 40], bár ezt analitikai ultracentrifugálási eredmények később cáfolták [34]. A LADH enzimre vonatkozóan a fentieken kívűl (diaforáz, proteáz, elektron-transzferáz, oxidáz) különböző fajokban más mellék (moonlighting) funkciókról is beszámol az irodalom (ezekre itt nem térünk ki, de megjegyezzük, hogy potenciálisan ezeket a funkciókat is érinthetik a LADH mutációi) [3, 30, 32, 72-81]. A hLADH kristályszerkezetét már többször meghatározták különböző kísérleti körülmények között (pl. ligandok illetve fehérje-interakciós partner jelenlétében) [34, 37, 38, 40]. A patogén hLADH variánsokat azonban direkt experimentális szerkezetmeghatározó módszerekkel korábban (előttünk) nem vizsgálták.

Az α-ketosav-dehidrogenáz komplexek általi ROS-képzésért is egyértelműen a flavoenzim E3 alegységet lehet felelőssé tenni [82, 83]. A NAD^+ jelenléte gátolja ezekben a komplexekben a ROS-képzést mindkét katalitikus irányban [82]. A hKGDHk-általi ROS-képzés a mitokondriális oxidatív stressz egyik legmarkánsabb (ha nem a legmarkánsabb)

forrása (a többi rokon α-ketosav-dehidrogenáz komplex nem mutat ilyen számottevő mértékű ROS-képzést) [82-87]. A fokozott mitokondriális ROS-termelést az akut iszkémia-reperfúzió szindrómával és krónikus neurodegeneratív betegségekkel hozták különösen szoros összefüggésbe [88, 89]. Érdekes, hogy mindeközben a KGDHk igen érzékeny oxidatív ágensekre [19, 90-92]. A hKGDHk ROS-termelése akkor jelentékenyebb, ha a fiziológiás elektronakceptor, a NAD^+ nem áll elegendő mennyiségben rendelkezésre (a *forward* reakcióban), illetve ha a $NADH/NAD^+$-arány megemelkedik (amely pedig a *reverz* katalitikus irányú ROS-képző E3-reakciót támogatja, lásd fent) [82, 83]. Szignifikáns mértékben emelkedik a $NADH/NAD^+$-arány például iszkémiában, fokozott kalóriabevitel esetén vagy Komplex I elégtelenségben [89]. A KGDHk belső gyökös mechanizmussal történő önreguláció ját is kimutatták az E1 alegységen, amelyben az LS kofaktornak van elsődleges szerepe (tiil gyök képzésén keresztül; ezt a mechanizmust a tioredoxin felfüggeszti) [93, 94]. Az LS-kofaktor H_2O_2-mediált reverzibilis glutationilációja – amely a KGDHk reverzibilis inaktivációjával jár – egy antioxidáns válasznak bizonyult, amely megvédi oxidatív stresszben a KGDHk-t az oxidatív károsodásoktól (pl. a 4-hidroxi-2-nonenáltól, amely a fő lipid-peroxidációs származék és egy nagyon reaktív molekula) [95, 96]. Megjegyzésre érdemes, hogy *Bacillus stearothermophilus* PDHk-E1 (E1p), illetve *E. coli* KGDHk-E1 (E1k) esetében kimutatták, hogy ezen izolált alegységek önmagukban is képesek H_2O_2-t termelni a *forward* katalitikus irányban [97]. Szintén érdekes megfigyelés, hogy a KGDHk reakciónak az enyhe acidózis általános esetben még előnyös is [98-100], bár ez agyszövetben nem igaz (itt pH=7,2-7,4 az optimum) [101]. A KGDHk aktivitásának akár kismértékű csökkenése is energia-deficithez és oxidatív stresszhez vezet, amely egy öngerjesztő kört indít el mélyülő acidózissal, további oxidatív stresszel és anyagcsere deregulációval, végül pedig klinikai tünetekkel [88, 89]. Az izolált KGDHk-elégtelenség tipikus klinikai fenotípusai a következőek: hipotónia, motoros készségek lassulása, progresszív magasvérnyomás betegség, disztonikus mozgás, enkefalopátia, görcsrohamok, májnagyobbodás, kognitív zavarok, metabolikus dekompenzáció és fiatalkori hirtelen halál [1]. A hKGDHk elégtelen működése, illetve ROS képzése számos egyéb betegségben és patológiás folyamatban is szerepet játszik, mint például: hipoxia- illetve glutamát-indukálta agykárosodások, Wernicke-Korsakoff-szindróma, neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kórok), Friedreich-ataxia, iszkémia-reperfúzió szindróma, progresszív szupranukleáris parézis, (sejt)öregedés, csecsemőkori laktát acidózis, különböző neoplasztikus elváltozások, hLADH-elégtelenség, stb. [89]. A hKGDHk-aktivitás fokozására javasolt egyes stratégiák (mint például a szöveti transzglutamináz enzim gátlása), illetve a hKGDHk-általi ROS-képzés

farmakológiai regulációja potenciálisan segíthetik majd a jövőben kiváltképp az öregedéssel összefüggésbe hozható neurodegeneratív betegségek terápiáját [88, 102-105].

Amint fentebb is látható, számos megválaszolatlan kérdés volt/van az irodalomban különösen a LADH-elégtelenség molekuláris patomechanizmusa tekintetében. Kutatásaink során a patomechanizmus kérdéses elemeit céloztuk meg, különös tekintettel a ROS-képzés esetleges szerepére. Fő célunk volt a klinikumban leírt hLADH variánsok nagyfelbontású szerkezeteinek a meghatározása, amelytől azt vártuk, hogy atomi szinten magyarázza majd meg a mutánsok patológiás viselkedését. Munkahipotézisünk szerint pedig, a biokémiai, biofizikai és szerkezeti információk birtokában potenciálisan képesek lehetünk akár farmakológiailag is megcélozni a jövőben a komplex patomechanizmusok egyes elemeit. Ez bizonyos esetekben talán javíthatná ennek az igen súlyos genetikai betegségnek a klinikai lefolyását. A hKGDHk tekintetében pedig célunk volt a komplex-általi ROS-képzés részletes karakterizálása és gátolhatóságának vizsgálata. Ezen felül a komplex szerkezetvizsgálatát is célul tűztük ki farmakológiai regulációs stratégiák jövőbeni szerkezetalapú tervezéséhez.

Megjegyzés: Ez a bevezető elsősorban a hLADH és a hKGDHk patológiás viselkedésére és a vonatkozó aspektusokra fókuszált, nem tárgyalta többek között a LADH enzim különböző fajokban leírt részletes szerkezeteit és azok mechanisztikus aspektusait, illetve a komplexekkel kapcsolatos korai biokémiai eredményeket sem, elsősorban a választott rövid disszertációs forma miatt. A patológiás aspektusok tárgyalásához szükséges vonatkozó információkat az eredmények megbeszélése során ismertetem.

Célkitűzések

1. Rekombináns, tiszta állapotú és funkcionálisan aktív hE1k, hE2k és hE3 alegységek/komponensek előállítása.

2. A hLADH és a hKGDHk ROS-képző aktivitásának részletes vizsgálata. Izolált illetve rekombináns enzimek vizsgálata. A hE1k komponens és a h(E1k-E2k) alkomplex vizsgálata. Összehasonlítás más rokon komplexekkel.

3. A hLADH 14 patogén variánsának előállítása rekombináns módon, tiszta (homogén) formában. A variánsok részletes biokémiai, biofizikai és szerkezeti jellemzése, különös tekintettel a ROS-képző képességre. Javaslattétel a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra.

4. A hE1k és hE2k komponensek szerkezeti jellemzése. A hKGDHk szerkezeti topológiájának meghatározása.

5. Gyógyszerjelölt molekulák tervezése a hLADH-elégtelenség, illetve a hKGDHk/hLADH ROS-képzése tekintetében.

Alkalmazott módszerek

Itt csak a legfontosabb alkalmazott módszereket foglaljuk össze röviden.

A hLADH és betegséget-okozó variánsai előállítására beállítottunk egy periplazmatikus és egy citoszólikus *E. coli* expressziós rendszert is. A periplazmatikus rendszer elméletileg funkcionálisan jobb minőségű fehérjét szolgáltat, míg a citoszólikus rendszer lényegesen nagyobb mennyiségben termeli a fehérjéket, amely pedig szerkezetvizsgálati céljaink miatt vált mindenképpen szükségessé (NMR, kristályosítási próbák). A fehérje-variánsokat a laboratóriumban hoztuk létre standard protokollt követve (QuikChange II kit, Agilent). A vonatkozó expressziós vektorok egy affinitás cimkét (N-terminális Strep-tag) is tartalmaztak, mely segítségével egy lépésben is képesek voltunk megtisztítani a fehérjetermékeinket FPLC kromatográfiát alkalmazva. Az optimalizált tisztítási módszerünkkel kristályosításhoz is megfelelő homogenitást tudtunk elérni. Egy refolding eljárást is kifejlesztettünk az inklúziós testekbe jutott fehérje visszanyerésére. A *forward* illetve *reverz* LADH reakciót NADH keletkezésén illetve fogyásán keresztül mértük spektrofotometriásan (340 nm). A KGDHk, illetve PDHk *forward* katalitikus irányú, teljes reakciókat szintén NADH keletkezésén keresztül mértük. Szuperoxid-termelést részlegesen acetilált cit c (spektrofotometriás módszer, 550 nm) vagy dihidroetídium (fluorimetriás módszer, 470/600 nm [gerjesztés/emisszió]) alkalmazásával detektáltunk. A cit c esszé meglehetősen kis érzékenységű, ezért azt legtöbbször csak pH=6,3-on alkalmaztuk, mivel ezen a pH-n a vizsgált enzimjeink – pH=7,3-hoz képest többszörösen – emelkedett ROS-képzést mutatnak. H_2O_2-t torma-peroxidáz (*h*orse*r*adish *p*eroxidase, HRP) jelenlétében Amplex-Red alkalmazásával detektáltunk (fluoreszcens rezorufin keletkezik, 550/585 nm [gerjesztés/emisszió]). A ROS-képzés során – az általunk vizsgált enzimek esetében – az elsődleges termék a szuperoxid, a H_2O_2 a szuperoxidból részleges, spontán diszmutációval/diszproporcionálódással keletkezik. A LADH enzim mind a *forward* mind pedig a *reverz* irányú reakcióban képes ROS-t termelni (lásd fent). A szakirodalom viszont metodikai okokból – a DHLS pro-oxidáns volta miatt, amit a ROS-detektáló rendszerekben kifejt [97], továbbá korábbi nehéz beszerzése avagy szintézise miatt is – szinte kizárólag a *reverz* reakciót alkalmazza, így ezt a módszert követtük mi is. A KGDH illetve PDH komplexek esetén mindkét irányú reakcióban képesek voltunk ROS-termelést detektálni a fenti módszerekkel. Kalibrált gélszűrés kromatográfiával kapcsolt nanoLC-MS technikát alkalmaztunk a hLADH és patogén variánsai monomerizációjának vizsgálatára. Távoli-UV cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiát használtunk a patogén hLADH variánsok globális szerkezeti változásainak detektálására. A patogén hLADH mutánsok esetében a - nem

kovalens módon kötött - FAD prosztetikus csoport (részleges) elvesztését úgy vizsgáltuk, hogy hőkezeléssel denaturáltuk a fehérjéket, majd kalibrált módon mértük a felszabadult FAD mennyiségét 455 nm-en. Minthogy az NMR technika, illetve kezdetben a kristályosítás alkalmazása sem volt célravezető a patogén hLADH variánsok szerkezetvizsgálata tekintetében, molekuláris dinamika (MD) szimulációkat hajtottunk végre (X-PLOR-NIH program, szuperszámitógépes kapacitás) az összes (14) patogén hLADH variánsra vonatkozóan. Ezen eredményeket csak nagyon röviden említi ez a disszertáció, mindössze összehasonlításban a későbbi experimentális szerkezeti adatokkal. Szintén a szerkezeti információkhoz próbáltunk közelebb kerülni – akkor még kristályszerkezeti adatok hiányában – a hidrogén-deutérium-csere (HDX-) MS technika alkalmazásával, mellyel a 10 legjobban expresszálódó patogén hLADH variánst tudtuk megvizsgálni. A módszer oldatfázisban, nem-kriogén hőmérsékleten, illetve peptid-szinten mutatta meg a mutációk hatására bekövetkező fehérjesszerkezeti/dinamikai változásokat. Sokéves munka gyümölcse volt, hogy sikeres kristályosítást tudtunk végrehajtani – a berlini szinkrotron munkatársainak segítségével – számos betegséget-okozó hLADH variáns esetében, amelyből eddig hét nagyfelbontású szerkezetünk született. A kristályosítást minden esetben ülőcsepp technikával végeztük, illetve a kristályosítási körülményeket részletesen optimalizáltuk. A Helmholtz-Zentrum Berlin BESSY II röntgen-szinkrotronjában végeztük a diffrakciós méréseinket. A szerkezetszámításokat − a molekuláris helyettesítés technikáját alkalmazva − és az eredmények analízisét magunk végeztük (némi kollaborációban a berlini kollégákkal). Krio-EM méréseinket a brno-i Krio-EM centrumban végeztük, kollaborációban az ottani kollégákkal. Ezen technikával a hKGDHk-E2 komponens szerkezetét vizsgáltuk. Kémiai keresztkötéssel kapcsolt MS (CL-MS) és molekulamodellezés technikákat is felhasználtunk a hKGDHk-E2 komponens teljes szerkezetének megoldása céljából, mivel bizonyos flexibilis régiók nem voltak láthatóak a krio-EM technika számára. Az experimentális adatok hibaszámításánál általában a középérték standard hibájával (standard error of the mean, S.E.M.) számoltunk, míg a statisztikai szignifikancia megállapításához mindig kétmintás t-próbát végeztünk (eltérő varianciát feltételezve, legalább $p \leq 0{,}05$ szignifikancia szint mellett).

Eredmények és megbeszélésük

(Megjegyzés: Minden cikk összefoglalójában a tárgyaláshoz legfontosabb néhány ábrát mutatom mindössze be a cikkből a terjedelmi korlát miatt.)

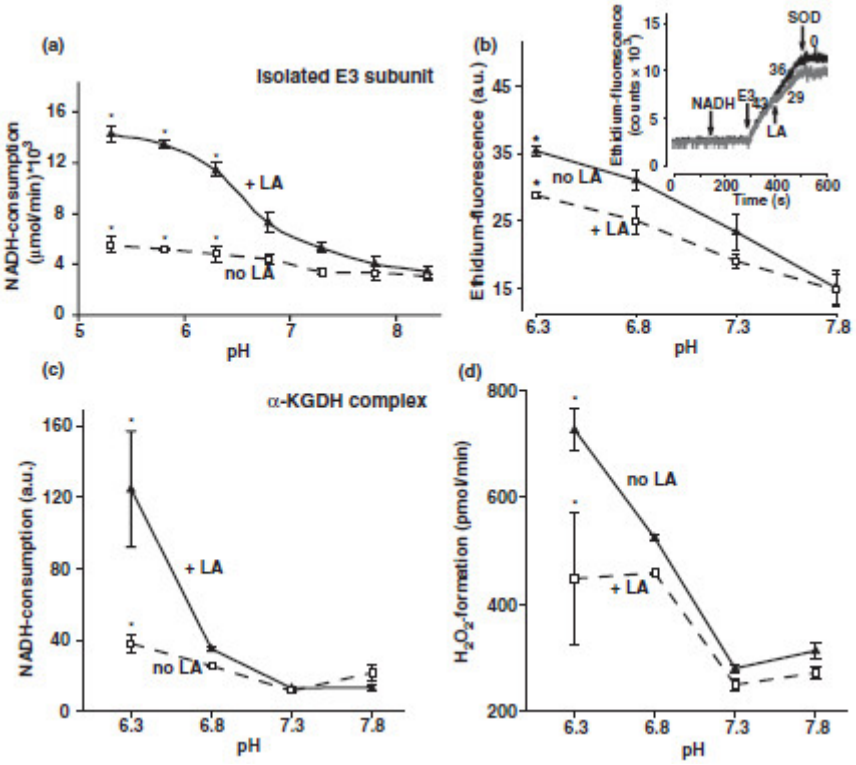
A LADH és a KGDHk ROS-képzésének vizsgálata és gátlása liponsavval

(Ambrus A[#], Tretter L[#], Adam-Vizi V, Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, *J. Neurochem.* 109(S1): 222-229 (2009) ([#]=megosztott első szerzők))

Jelen tanulmány célja a kutatócsoport KGDHk-val kapcsolatos korábbi vizsgálatainak kiterjesztése volt. Elsődleges célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az izolált KGDHk és LADH ROS-képzésének pH-függését mind a *forward*, mind pedig a *reverz* katalitikus irányú reakciókban. Szerettük volna megvizsgálni továbbá, hogy az exogén LS képes-e gátolni a KGDHk és a LADH ROS-képző aktivitását. Ellenőrizni szerettük volna szintén azt − az irodalmi adatot − , hogy képes-e tényleg a LADH enyhén (patológiásan releváns) savas közegben monomerizálódni és ezáltal fokozni a diaforáz/ROS-képző aktivitását. Ezen célok mellett számos más fontos megfigyelést is tettünk.

A legtöbb korábbi biokémiai és biofizikai adat a sertésszív LADH enzimmel mérődött, amely azért releváns mégis, mivel 95% szekvenciahomológia van a sertés és a humán ekvivalensek között [106]. Ebben a tanulmányban mi is a sertésszív LADH-t alkalmaztuk, illetve a KGDHk is ebből a forrásból származott.

A LADH diaforáz-aktivitásának pH-optimuma alacsonyabb (savasabb, pH=5,8) mint a fiziológiás aktivitásé [42, 45, 48]. pH=5,8-on végzett dinamikus fényszórás és analitikai ultracentrifugálás (szedimentáció) eredmények alapján azt javasolták, hogy ebben az enyhén savas közegben a LADH-dimer (részlegesen) disszociált és ez stimulálhatta a diaforáz aktivitást [42]. A pontosabb szedimentációs eredményeket azonban *reverz* micellákban, illetve oktánban mérték, amely szerintünk potenciálisan indukálhatja a nemkovalens LADH dimer (legalább részleges) monomerizációját. Ezeknek az előzetes eredményeknek a tükrében meg kívántuk vizsgálni, hogy fiziológiásan és – a pH tekintetében – patológiásan releváns oldatkörnyezetben ténylegesen történik-e akár csak részleges monomerizáció is a LADH enzim esetében. Kalibrált méretkizárásos kromatográfiával (gélszűrés) azt találtuk, hogy sem 7,8-as, sem pedig 5,8-as pH-n nincs detektálható mértékű monomerizáció (Fig. S1 [cikkben]). Az eredményeket 1D ^{1}H NMR és DOSY-NMR adataink is megerősítették. Ez azt jelenti, hogy a pH-csökkenés hatására fokozódó diaforáz/ROS-képző (utóbbit lásd lentebb) aktivitás belső szerkezeti vagy mechanisztikus változásnak köszönhető és nem pedig monomerizációnak.



4. ábra (Fig. 1). A liponsav (az ábrán "LA" [*l*ipoic *a*cid]) hatása a pH függvényében a NADH fogyásra (a,c) és a ROS képzésre (b,d) LADH (a,b) illetve KGDHk (c,d) esetében a reverz reakcióban. A NADH-fogyást fotometriásan (a) illetve fluorimetriásan (c) mértük. (b) A szuperoxid-képzést DHE-fluoreszcenciával detektáltuk; a beágyazott ábrán egy nyers kísérleti eredmény látható. (c) és (d) esetében ugyanabban a mintában parallel mértünk NADH-, illetve rezorufin-fluoreszcenciát (utóbbit az Amplex-Red/HRP-alapú rendszerben H_2O_2 detektálása céljából). Részletes kísérleti információért lásd az ábraaláírást a cikkben.

A fenti irodalmi adattal összhangban azt találtuk, hogy a LADH *reverz* katalitikus irányú ROS-képzése is – csakúgy mint a diaforáz-aktivitás – fokozódott savasabb pH-n (4/b. ábra). pH=6,3-ig mértünk savas irányban, mivel az irodalom még ennyire alacsony pH-t is leírt iszkémiás agyban (6,26±0,03 (n=12) [107]), amely állapotban a $NADH/NAD^+$ arány emelkedett és ez támogatja a LADH és a KGDHk *reverz* katalitikus irányú ROS képzését (lásd fent). A pH csökkentésével az exogén módon adott LS egyre jobb inhibítorrá vált a ROS-képző reakcióban, míg ezzel párhuzamosan jelentősen nőtt a NADH-fogyasztás (4/a. ábra). Ez arra utal, hogy az exogén LS a LADH szubsztrátjaként vett részt a ROS-képzés gátlásában (versenyzett az O_2-vel), ami által még egy potenciálisan erős antioxidánst is termelt (DHLS, bár ennek a molekulának van pro-oxidáns tulajonsága is bizonyos körülmények között, lásd később). Ez a gátlási pH-profil egybevág azzal, hogy az LS részvételével a *reverz* LADH reakció pH optimuma 5,5 [48]/5,9[45] (míg lipoamiddal ez 7,0 [42]/6,5[45, 48], illetve összehasonlításként a *forward* reakció pH optimuma dihidrolipoamiddal 8,3[48]/7,9[45]). Mivel a LADH létezik [58-62] és potenciálisan ROS-t is termelhet a komplexektől függetlenül is - kiváltképp acidózisban (lásd fent) -, illetve a

legnagyobb koncentrációban jelenlévő flavoprotein izom és agyi mitokondriumokban [63], ezért ROS-képzésének gátlása a megfelelő patológiás állapotokban (lásd a Bevezető részt) terápiás szempontból is hasznos lehet. A szabad/exogén formában alkalmazott LS és DHLS antioxidáns hatású molekulák, amelyek hatékony redox regenerátorai is endogén antioxidánsoknak [108]. Az LS képes átjutni a vér-agy gáton és potenciálisan neuroprotektív hatást fejthet ki [109]. Patkányokon végzett kísérletekben LS és DHLS hatására tényleg csökkent a ROS-képzés és javultak a mitokondriális funkciók [110]. A kanadai illetőségű Cyclica, Inc. gyógyszerfejlesztő céggel nemrég megállapodás született, hogy a közeli jövőben a hLADH ROS-képzésére pH-függő módon szelektív gátlószereket kezdünk el fejleszteni együttműködésben. Ezekkel a gyógyszerjelölt molekulákkal az LS-nél nagyobb hatékonyságot próbálunk majd elérni, bár az egyik molekuláris kiindulópont maga az LS lesz.

A KGDHk *reverz* katalitikus irányban a LADH-hoz többnyire hasonlóan viselkedett mind a ROS-képzés, mind pedig az ehhez kapcsolt NADH-fogyasztás pH-függése tekintetében (4/c,d. ábra). A ROS-képzés gátlása szempontjából azonban eltérés mutatkozott abban, hogy itt csak a legalacsonyabb pH-n volt számottevően érzékelhető az LS gátló hatása. Ebből potenciálisan arra is lehet következtetni, hogy a magasabb pH értékeken az LS nem fért hozzá a saját szubsztrát-csatornájához – a LADH aktív centruma felé vezető úton –, mivel az be van csatornázva a komplexen belül [111], de az alacsonyabb pH-n ez potenciálisan jobban lehetségessé vált. Ez utóbbi azért jöhetett létre esetleg, mert a savasodás tovább gyengíthette az E3 alegység amúgy is gyenge kötődését a komplexhez [62, 64, 65] (mivel ez a gyenge kapcsolat igen könnyen fel is bontható [23, 62, 112]). Az hogy ennek nem volt számottevően érzékelhető hatása a *forward* reakcióra (pH=6,3-on, lásd Fig. 2 [cikkben]) magyarázható azzal, hogy az alfa-ketosav-dehidrogenáz komplexekben a sebességmeghatározó lépés az E1 reakció [111, 113, 114], tehát egy valamennyivel gyengébben kötött (ritkábban felkapcsolódott) E3 alegység mellett is működhet nagyjából változatlan sebességgel a KGDHk (ez már kevésbé lehet igaz bizonyos patogén mutánsok esetében, ahol ennél valószínüleg sokkal nagyobb mértékű az E3 alegység disszociációja, lásd fent a Bevezető részt). Mindez a koncepciónk mindazonáltal még experimentálisan igazolandó. Az eredmények alapján megállapítható azonban, hogy acidózisban – a LADH mellett – a KGDHk *reverz* katalitikus irányú ROS-képzése is gátolható LS-sel. A gátlás alapja pedig valószínüleg újfent az E3 *reverz* LADH reakciójának aktiválódása az exogén LS hatására.

A KGDHk *forward* katalitikus irányú ROS-képzését vizsgálva (Fig. 2 [cikkben]) megállapítottuk, hogy az nem függött számottevő mértékben a pH-tól. Amikor NAD^+-dal gátoltuk – bármelyik vizsgált pH-n – ezt a ROS-képzést, LS adása nem okozott további

gátlást. A NAD^+ hatására ily módon kialakuló NADH-produkciót azonban gátolta az LS hozzáadása (minden alkalmazott pH-n). Ha az LS-t adtuk először, szintén tapasztaltunk ROS-képzés gátlást, melynek mértéke nem függött jelentékenyen a pH-tól. Így egy pH-n (7,3) megvizsgáltuk a koncentráció-függést is és azt találtuk, hogy 2 mM LS hatására a NADH-képzés 90%-kal, míg a ROS-képzés 70%-kal csökkent. Az LS – nagyjából pH-független módon – hasonló mértékben gátolta a fiziológiás (NADH-képző) és ROS-képző aktivitásokat, amely egy közös elektrontranszport-útvonalra utal a komplexen belül. Mivel – pH>6,8 esetén legalábbis – a KGDHk *reverz* katalitikus irányú ROS-képzése nem volt gátolható azonos koncentációjú LS-sel, a *forward* irányban az LS gátlóhelyének az E1k-E2k-alkomplexen kell elhelyezkednie. Korábban leírták, hogy a PDHk-t az LS mindkét enantiomerje gátolta az E2p alegységen hatva [115, 116]. A KGDHk és PDHk közötti szerkezeti és mechanisztikus hasonlóságokat figyelembe véve azt javasoljuk, hogy a KGDHk *forward* irányú katalitikus aktivitásait az LS az E2k alegységen támadva gátolja. Az LS – nem antioxidáns étrendkiegészítőként történő hanem – potenciális terápiás (relative nagy mennyiségű) alkalmazását kérdőjelezhetné meg elvileg az tény, hogy a LADH és a KGDHk acidózisban tapasztalt fokozott *reverz* katalitikus irányú ROS-képzése mellett szintén gátolja a PDHk és KGDHk normál (*forward* katalitikus irányú) enzimatikus aktivitását is. Mindazonáltal, például hipoxiában/iszkémiában – ahol laktát acidózis is jelen van – az emelkedett $NADH/NAD^+$ arány már eleve gátolja az α-ketosav-dehidrogenáz komplexeket és a KGDHk domináns aktivitása ekkor a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzés, tehát a terápiás-dózisú LS ilyenkor nem gátolná tovább a mitokondriális energiatermelést, a mitokondriális ROS-képzést/oxidatív stresszt azonban potenciálisan csökkenthetné.

Tengerimalac agyból preparált izolált mitokondriumokat felhasználva meg kívántuk vizsgálni milyen hatással van az LS a mitokondriális oxigénfogyasztásra (respiráció) illetve teljes ROS-termelésre. KG mint légzési szubsztrát jelenlétében, 2 mM LS 20%-kal csökkentette a State 3 respirációt (+ADP), míg a State 2 respiráció (nincs ADP) kissé felgyorsult (Table 1 [cikkben]). Glutamát+malát (G-M)-támogatott mitokondriumokban gyakorlatilag hasonló adatokat kaptunk, a State 3 esetben volt kissé nagyobb mértékű a gátlás. Ezen adataink jól korreláltak az irodalommal (HepG2 sejtek, 4 mM S-LS, 25%-os piruvát-anyagcsere gátlás, R-LS-nek nem volt hatása [115]). A mitokondriális ROS-termelés tekintetében sajnos nem kaptunk megbízható adatokat az Amplex-Red/HRP detektáló rendszerrel, a keletkező DHLS pro-oxidáns volta miatt (keresztreakció a HRP-vel, amely végül szuperoxidot eredményez és elfedi a valós effektust [97, 117, 118]; ezért használtunk DHE-t az 4/b. ábra kísérletében is), a DHE-esszé pedig itt túlságosan érzéketlen volt. A fenti

adatokkal összhangban, az LS-sel történő előinkubáció depolarizációt indukált a mitokondriumokban (Fig. 3 [cikkben]; G-M: lassú, KG: gyors és nagyon szignifikáns). Amint várható volt ADP csökkentette a $\Delta\Psi_m$ értékét, kivéve amikor KG volt a légzési szubsztrát és LS is jelen volt, mert ott már eleve nem volt mérhető $\Delta\Psi_m$. A kísérletek végén adott szétkapcsolószer megszüntette a $\Delta\Psi_m$-et. A depolarizáció illetve a légzésgátlás újabb bizonyítékok voltak a KG oxidációjának gátlására LS jelenlétében. A G-M-támogatott mitokondriumokkal nyert eredményeket az LS malát- illetve glutamát-dehidrogenázokra kifejtett gátló hatásával lehet megmagyarázni [119, 120].

A kísérleteket Dr. Tretter Lászlóval közösen terveztük meg és hajtottuk végre, kevés technikusi segítséggel. A cikk első verzióját közösen írtuk Dr. Tretter Lászlóval, míg a végső formátumot Dr. Ádám Veronika segítségével hoztuk létre.

A hLADH klinikailag releváns mutánsainak vizsgálata

(Ambrus A, Torocsik B, Tretter L, Ozohanics O, Adam-Vizi V, Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase, *Hum. Mol. Genet.* 20(15): 2984-2995 (2011) és még közlésre váró eredmények alapján)

Ebben a munkában célunk volt a hLADH 14 patogén variánsának előállítása rekombináns módon, tiszta (homogén) formában. Szintén meg kívántuk valósítani a patogén variánsok részletes biokémiai és biofizikai jellemzését *in vitro*, különös tekintettel a ROS-képző képességre.

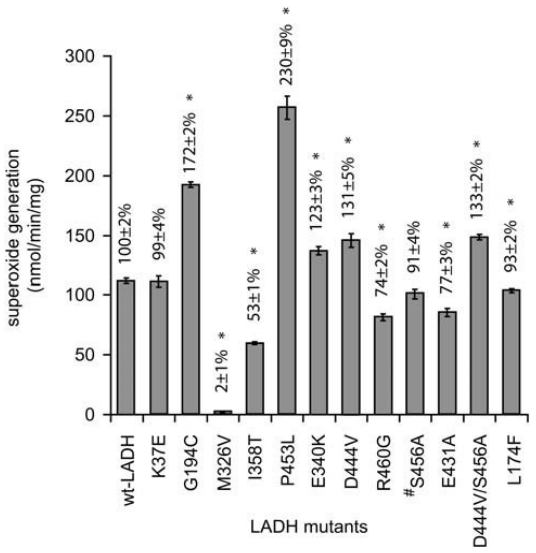
E. coli-ban – egy általunk kidolgozott és optimalizált periplazmatikus expressziós rendszerben, JM83 sejteket és pASK-IBA6C expressziós plazmidot felhasználva [121] – kifejeztünk 12 hLADH variánst (Fig. S2 [cikkben]) és a vad típusú hLADH-t. Ehhez az alapplazmid mutagenezisét a QuikChange II kit-tel végeztük el (a felhasznált primer szerkvenciákat a Table S1 [cikk] tartalmazza). A tisztítást – egy korábban optimalizált protokollunk alapján [121], FPLC affinitás-kromatográfiával – egy lépésben el tudtuk végezni és teljesen homogén fehérjetermékeket kaptunk (Fig. S1 [cikkben]). A mindössze nyolc aminosavnyi N-terminális affinitás-cimkét (Strep-tag) nem volt szükséges levágnunk a funkció teljesfokú megörzése érdekében [121]. Mind DNS- (szekvenálás), mind pedig fehérje-szinten (MS) ellenőriztük a mutációk sikeres bevitelét. A klinikailag releváns mutánsok mellett megvizsgáltunk még egy humán agyban mindössze mRNS szinten azonosított variánst (L174F, EMBL#:AB209703), illetve három másik mutánst (az egyik dupla mutáns) is, amelyek vagy gátolják (S456A, E431A), vagy részben reaktiválják (D444V/S456A) a hLADH proteolitikus mellék-aktivitását [41].

Igen fontos volt ebben a munkában, hogy pontos fehérjekoncentrációkat tudjunk mérni, ezért a Bradford-módszert [122] állítottuk be erre a célra, hiszen a 280 nm-es klasszikus fehérjemérést zavarta a FAD prosztetikus-csoport jelenléte (illetve sokszor különböző mértékű koordinációja a fehérjéhez, lásd alább). Megerősítettük mi is experimentálisan, hogy a Bradford-mérés hullámhosszán (595 nm) a FAD nem nyel el fényt egyáltalán [71].

A vad-típusú enzim funkcionális épségének ellenörzése céljából, meghatároztuk annak enzimkinetikai paramétereit a *reverz* katalitikus irányban ($K_{M,NADH}$=45,34±1,83 μM, $K_{M,LAM}$=1,379±0,056 mM, V_{max}=18152±731 $\mu mol*min^{-1}*\mu mol(enzim)^{-1}$), amelyek hasonlóaknak adódtak az irodalmi adatokhoz [43, 48, 71, 123, 124]. Mivel az irodalomban sokszor különböző körülmények között meghatározott katalitikus aktivitások vannak közölve a patogén mutánsok tekintetében, célunk volt, hogy egy egységes protokoll alapján

határozzuk meg ezeket az értékeket, először az irodalomban, a jobb összehasonlíthatóság érdekében (Fig. 1 [cikk]). A *forward* katalitikus irányban a G194C- és L174F-hLADH variánsok kivételével minden mutáns specifikus aktivitása csökkent a hLADH-hoz képest, általában különböző mértékben, a várakozásnak megfelelően. Az M326V- és P453L-hLADH variánsok gyakorlatilag teljesen elveszítették a katalitikus képességüket (ez a P453L mutáns esetében teljes összhangban van az irodalommal [125]). A *reverz* katalitikus irányban is a legtöbb esetben csökkentek a specifikus aktivitások, azonban itt két mutáns esetében (L174F-, K37E-hLADH) még szignifikáns mértékű aktivitás-növekményt is tapasztaltunk, illetve másik két variáns esetében (G194C-, D444V/S456A-hLADH) nem találtunk (szignifikáns mértékű) változást. Az egyes mutánsokra vonatkoztatva elmondható, hogy a legtöbb ténylegesen patogén mutáns esetében hasonló volt a két katalitikus irányban a változás mértéke (a kivétel a K37E-hLADH volt), míg a többi mutánsnál érdekes módon ez egyik esetben sem volt igaz. Amellett, hogy az *in vitro* nyert aktivitás adatokat – a Bevezetőben részletezett okok miatt – számottevő fenntartás mellett szabad csak direkt módon összevetni a klinikai riportokban leírt adatokkal, megállapíthatjuk, hogy a fenti adatok több esetben jó összhangban voltak a klinikai értékekkel. Ki kell emelni azonban a G194C-hLADH variánst – amely egy igen jól dokumentált mutáns, nagy esetszámmal [3] –, hiszen ebben az esetben nem találtunk egyik katalitikus irányban sem szignifikáns mértékű változást, amely viszont ellentétben van a klinikai adatokkal.

A hLADH mutánsok szuperoxid-képzését (részlegesen) acetilált cit c redukcióján keresztül mértük pH=6,3-on a *reverz* katalitikus irányban (5. ábra). A D444V-, G194C-,

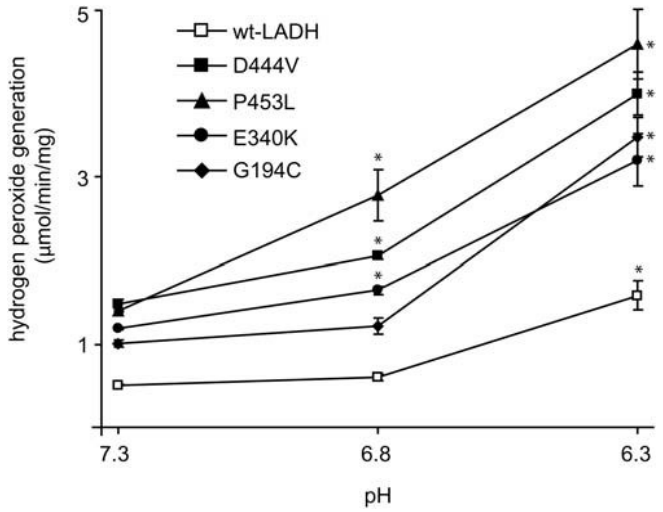


5. ábra (Fig. 2 [cikkben]) A hLADH variánsok ROS-képzése. A szuperoxid-képzést (részlegesen) acetilált cit c redukcióján keresztül mértük a *reverz* katalitikus irányban spektrofotometriásan (pH=6,3, 550 nm). A cit c és a szuperoxid közötti reakció sztöchiometriája 1:1. Részletes kísérleti információért lásd az ábraaláírást a cikkben.

P453L-, E340K- és D444V/S456A-hLADH variánsok esetében a ROS-képző kapacitás szignifikáns mértékű fokozódását találtuk a vad-típusú enzimhez képest. A többi mutánsnál vagy nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű változást, vagy különböző mértékű csökkenést detektáltunk a ROS-képzés intenzitásában. Hogy ellenőrizzük, illetve megerősítsük a fenti – patológiásan potenciálisan fontos – eredményeinket, újabb expressziót és tisztítást hajtottunk végre a fenti – fokozott ROS-képzést mutató – patogén mutánsok, illetve a hLADH esetében (mivel a D444V/S456A dupla mutáns nem valódi patogén mutáns, ezért ROS-képzését nem vizsgáltuk tovább). Karakterizálás (LDS-PAGE, MS) után, ezeket a fehérjepreparátumokat is megmértük a cit c esszével, amely azonos konklúziót szolgáltatott mind a négy patogén mutáns esetében (bár tapasztalható volt eltérés az első preparátumokhoz képest): G194C: 171±4%, E340K: 153±0%, D444V: 188±2%, P453L: 254±4% (n=3, minden esetben). Ezeknél a mutánsoknál egy független másik módszerrel – az Amplex-Red/HRP rendszerrel – is megmértük a ROS-képzés sebességét, de itt már pH-függést is vizsgáltunk minden enzim esetében (6. ábra). A (rekombináns) hLADH savasodás hatására – pH=7,3 és 6,3 között körülbelül háromszorosára – fokozódó ROS-képzést mutatott, a természetes forrásból izolált (sertés-szív) enzimhez hasonlóan (lásd 4/b. ábra). Ez az arány megvalósult a vizsgált mutánsok esetében is, amely azt mutatja, hogy a már eleve fokozott ROS-képzésük (a vad típushoz képest, pH=7,3-on) alacsony pH-n még tovább fokozódik. Érdekes megfigyelni, hogy míg pH=6,8-on a hLADH nem mutat szignifikáns ROS-képzés növekedést pH=7,3-hoz képest, addig a D444V-, E340K- és P453L-mutánsok fokozódó ROS-képzést mutatnak már ekkora mértékű pH-változás hatására is. Ez azt mutatja, hogy ezen mutánsok esetében a ROS-képző képesség pH-érzékenysége is megnőtt a vad-típusú enzimhez képest. A vonatkozó szubsztitúciók elhelyezkedése a fehérjén belül (Fig. S2 [cikkben]) nem mutatott nyilvánvaló összefüggést a ROS-képzést stimuláló hatással: két aminosavcsere a dimerizációs felszínen (D444V, E340K), egy az aktív centrumban (P453L), egy pedig a kofaktor-kötő régióban (G194C) helyezkedik el. Más aminosavcserék ezekben a régiókban azonban nem növelték a ROS-képző kapacitást. A ROS-képzést fokozó mutánsok esetében, a *forward* és *reverz* maradék LADH aktivitások szempontjából sem mutatkozott meg egy közös/hasonló mintázat (Table 1 [cikkben]). Ha a ROS-képző aktivitásokat arányosítjuk a maradék *forward* illetve *reverz* aktivitásokkal, egyértelműen megállapítható, hogy ezek a mutánsok – nem meglepő módon, de itt most kvantitatíve is kimutatva – extra ROS-képző kapacitásra tettek szert a normál katalitikus aktivitások rovására. A legnagyobb effektust a P453L mutáns szolgáltatta, a maradék *forward* katalitikus aktivitással azonos mértékű ROS-képző aktivitást mutatva be. Ez azt jelenti, hogy ez a szubsztitúció egy meghatározó mértékben ROS-képzésre

specializálódott enzimet hozott létre a hLADH-ból. Ennek a mutánsnak a klinikai manifesztációja nagyon súlyos, még akkor is amikor egy sokkal kevésbé destruktív másik mutációval kombinálódik (a klinikumban vizsgált beteg P453L/K37E összetett heterozigóta volt) [17, 126]. Az itt kimutatott nagymértékben megnőtt ROS-képző kapacitás hozzájárulhat a vonatkozó molekuláris patomechanizmushoz és potenciálisan súlyosbíthatja a mutáció klinikai manifesztációját. Ez a megállapítás érvényes a másik három érintett patogén hLADH mutáns esetében is. A G194C mutáns esetében kiemelendő körülmény azonban, hogy a fiziológiás aktivitás teljes megtartása mellett nőtt meg a ROS-képző kapacitás. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy itt az érintett betegek általában enyhébb tüneteket tapasztalnak, melyek sokszor csak későbbi életkorban jelentkeznek (talán pont akkor, amikorra a ROS károsító hatásai az évekkel kritikus mértékben felhalmozódtak) [1-3]. Fenti eredményeink felvetik egy antioxidáns terápia esetleges hasznosságát az érintett betegek kezelésében.

A fenti eredményeket mintegy megerősítette, hogy később mások kimutatták, a D444V, E340K és G194C mutánsok – az R460G és R447G mutánsokkal együtt – oxidative károsították a KGDHk és a PDHk LS-kofaktorát élesztő modellben. Ugyanilyen hatást tapasztaltak humán D444V homozigóta fibroblasztokban is [127]. Ismert tény, hogy az LS-kofaktor oxidatív behatásokra igen érzékeny (lásd a Bevezető részt, illetve [89, 95, 128, 129]).



6. ábra (Fig. 3 [cikkben]). A hLADH mutánsok pH-függő H_2O_2-képzése. A H_2O_2-képzés sebességét az Amplex-Red/HRP-alapú fluoreszcens detektáló rendszerrel mértük. Az Amplex Red és a H_2O_2 közötti reakció sztöchiometriája 1:1. A statisztikai szignifikancia számítása a pH=7,3-on mért adatokhoz képest történt. Részletes kísérleti információért lásd az ábraaláírást a cikkben.

A fokozott ROS-képzést mutató mutánsok, illetve a K37E-hLADH esetében (ahol már ismert volt a FAD részleges elvesztése az irodalomból), megvizsgáltuk a fehérjéhez kötött

FAD mennyiségét (lásd Alkalmazott módszerek). Igen nagy pontossággal sikerült meghatároznunk/ellenőriznünk az irodalomból már régről ismert adatot, hogy a LADH monomerenként egy FAD molekulát köt (1,01±0,017). Ez az eredmény validálta is az experimentális módszerünket. Az E340K- (0,99±0,027 FAD/monomer), illetve D444V-hLADH (0,95±0,024 FAD/monomer) nem veszített számottevő mértékben a prosztetikus csoportjából. A P453L- (0,66±0,047 FAD/monomer), G194C- (0,72±0,011 FAD/monomer), illetve K37E-hLADH (0,67±0,048 FAD/monomer; irodalmi érték: 0,76 FAD/monomer [130]) viszont jelentékeny mértékben veszített FAD-ot. A hLADH egy korábbi kristályszerkezete [40] alapján megállapították, hogy monomerenként legalább 36 aminosav oldallánc játszik szerepet a FAD kötésében. Ebben a tekintetben érdekes, hogy akár egyetlen aminosavnak – amely nem is feltétlenül volt közvetlen kapcsolatban a FAD-dal (mint pl. a G194) – a szubsztitúciója is igen markáns hatást gyakorolhat a FAD kötésére. Ez a megfelelő patogén szubsztitúciók kiterjedtebb és távolható szerkezeti hatásaira utal. A FAD részleges (~30%-nyi) elvesztése a P453L, G194C, illetve K37E mutánsok esetében csak megnehezíti a fokozott, illetve megtartott ROS-képzés megmagyarázását, mivel közvetlenül a FAD-on keresztül valósul meg a LADH ROS-képzése (lásd a Bevezető részt). Mivel a mutációk által indukált szerkezeti változások modulálhatják a FAD szerkezetét, dinamikai tulajdonságait, környezetét és hozzáférhetőségét, illetve ezeken keresztül akár a redox-potenciálját is, ezért könnyen elképzelhető, hogy a FAD reakcióképességének növekedése adott esetben – akár túl is – kompenzálhatja a FAD-veszteség mennyiségi hatását. Másrészről, a FAD-tartalom csökkenése a P453L-hLADH esetében viszont direkt módon is hozzájárulhatott a markáns LADH-aktivitás-vesztéshez. A FAD-tartalomra eddig nem vizsgált mutánsok analízise folyamatban van. A FAD-tartalom patológiás csökkenésének, illetve a terápiás-célú FAD-pótlás hatásainak további vizsgálata mindenképpen indokolt, mivel már az irodalom is említ FAD-pótlásra jól reagáló betegeket (az egyik ilyen beteg G194C homozigóta volt [11], amely FAD-vesztéssel jár (lásd fent), míg a másik beteg G426E/I40Lfs*4 összetett heterozigóta volt [8] (a második mutáció exon kihagyást, illetve leolvasási keret eltolódást okozott), melyre vonatkozóan még egyetlen laboratórium sem vizsgálta a FAD-tartalom esetleges csökkenését).

Távoli-UV-CD spektroszkópiával – amely alkalmas fehérjék globális szerkezeti változásainak a detektálására – azt találtuk, hogy a rekombináns hLADH a sertés enziméhez nagyon hasonló CD spektrális ujjlenyomatot adott (>95% szekvencia-homológia) [131], amely igaznak bizonyult más fajokból származó LADH enzimekkel történő összehasonlításban is [132]. Amikor CD spektroszkópia segítségével a vizsgált patogén

mutánsokat vetettük össze a hLADH-val, azt tapasztaltuk, hogy egyik esetben sem volt releváns eltérés a globális konformációban. A Fig. 4 [cikkben] mutatja be azokat az eseteket, ahol kismértékű változás azért detektálható volt, míg a Fig. S3 [cikkben] gyűjtötte össze azokat az eredményeket, ahol gyakorlatilag nem volt változás a spektrális ujjlenyomatban. A fokozott ROS-képzést mutató mutánsok közül egyedül a G194C mutáns esetében detektáltunk kismértékű változást a CD-ujjlenyomatban (Fig. 4 [cikkben]). A fenti eredmények azt jelzik, hogy a megváltozott katalitikus aktivitások – amelybe beleértem a ROS-képző aktivitást is – mögött nincs radikális globális konformációváltozás avagy a feltekeredés (folding) nagymértékű elvesztése egyik vizsgált patogén mutáns esetében sem. Ez valamennyire egyébként logikus is a legtöbb mutáns esetében – a fiziológiás aktivitás tekintetében legalábbis –, hiszen egy még mindig jelentős maradék enzimaktivitás mögött kell, hogy a fehérjeszerkezet, illetve a katalitikus apparátus nagyrészben ép maradjon. A megváltozott funkciók mögött tehát inkább finomszerkezeti változásokat kell keresnünk, a vizsgált mutánsok esetében legalábbis. A CD-ujjlenyomatra eddig nem vizsgált mutánsok analízise folyamatban van.

Kalibrált méretkizárásos kromatográfiával (pH=6,8, Fig. 5 [cikkben]) és az eluátumok további ("kíméletes"-ionizációjú) nanoLC-MS analízisével (Fig. S4 [cikkben]), az itt vizsgált dimerizációs felszínt érintő patogén mutánsok, illetve a P453L-hLADH (mint egy másik típusú mutánsra referencia) esetében azt találtuk – irodalomi feltételezésekkel [8, 14, 40, 41] ellentétben, illetve analitikai ultracentrifugálási eredményekkel [34] összhangban –, hogy ezen fehérjék egyike sem mutat számottevő mértékű monomerizációt. A D444V- és R460G-hLADH mutatott gyakorlatilag elhanyagolható intenzitású, de potenciálisan a monomer formának megfelelő kromatográfiás csúcsot, amely – az effektus nagyságát illetően is – összhangban van egy korábbi hasonló D444V-hLADH-t vizsgáló kísérlettel az irodalomban [41]. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált dimerizációs felszínt érintő patogén mutánsokban a különböző katalitikus (LADH, diaforáz, ROS-képző, proteáz) aktivitások – specifikus [127] – modulációját nem a monomerizáció okozza. A monomerizációra eddig nem vizsgált mutánsok analízise folyamatban van.

A feltételezett proteolitikus mellékreakció szempontjából létrehozott mutációk hatásait nem értelmezem itt részleteiben, mivel mára már azt gondoljuk, hogy a Babady és mtsai. által publikált alapkísérlet/effektus nagy valószínűséggel kisérleti hiba (pl. proteáz szennyezés) eredménye lehetett. Mindazonáltal a D444V/S456A dupla mutáns ROS-képző képessége (133%) jól validálja a D444V-re kapott értéket (131%).

A fenti eredmények afelé mutattak, hogy valamilyen szerkezetvizsgálati módszerrel tudunk csak közelebb kerülni a vonatkozó molekuláris patomechanizmusok részleteihez. A fenti funkcionális eredmények további értelmezését is a szerkezeti adatok fényében fogom megadni a disszertáció későbbi részeiben.

A fenti cikk megjelenése után jóval, de megvalósult a maradék hat patogén hLADH mutáns funkcionális analízise is, amelyet itt alább összegzek, de szintén a szerkezeti eredmények alapján fogok később értelmezni (ezen adatok még mind közlés előtt állnak, részben azért, mert meg szeretnénk néhányat ismételni, illetve ki is kívánjuk őket egészíteni enzimkinetikai adatokkal, lásd alább). A hat patogén mutáns a következő százalékos eltéréseket adta *forward, reverz,* illetve ROS-képző katalitikus aktivitások tekintetében a hLADH-val összevetve (*=statisztikailag szignifikáns eltérés, $p<0,05$): I12T (107±2, 198±20*, 72±2*), I318T (105±5, 89±3, 87±1*), G101del (5±0*, 12±1*, 4±15*), G426E (110±2*, 36±1*, 67±2*), R447G (69±1*, 55±4*, 83±1*), I445M (77±2*, 16±2*, 83±2*).

Számos patogén mutáns esetében van enzimkinetikai adat (K_M, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_M) is az irodalomban [133-138]. Mind a 14 patogén hLADH mutáns részletes – azonos kísérleti protokoll alapján megvalósított – kinetikai analízise a közeljövőben megtörténik a mi laboratóriumunkban is. Jelenleg a vad-típusú hLADH-val van folyamatban a módszer beállítása egy nagypontosságú műszerre. A ping-pong bi-bi mechanizmus pontos kinetikai analízise egyáltalán nem triviális feladat experimentálisan [139], a Jelöltnek a fenti cikkben – egy korábbi műszert használva – számottevő erőfeszítésébe került, hogy a hLADH kinetikai analízisét elvégezze.

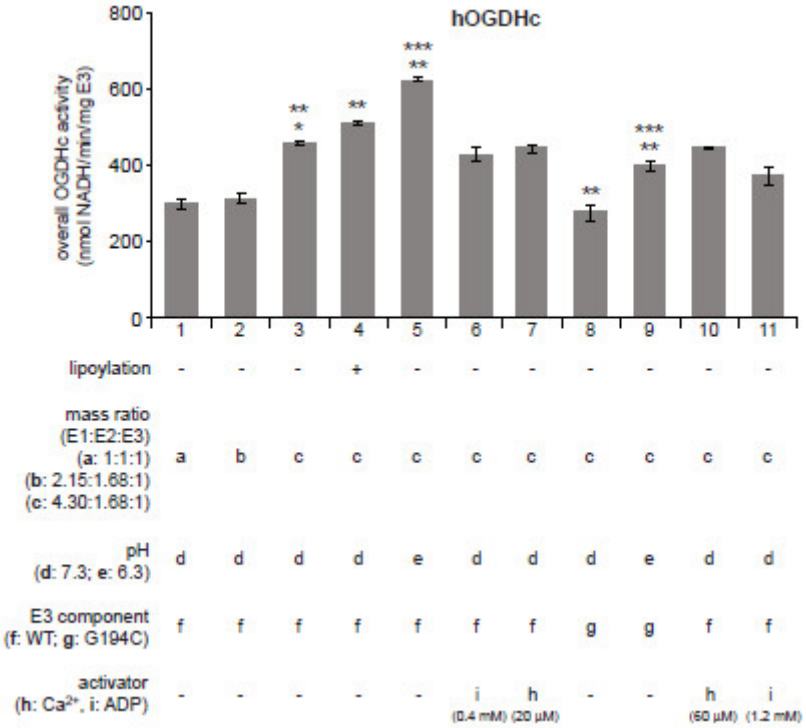
A fenti munkában a mutagenezist Dr. Törőcsik Beáta, az MS méréseket Dr. Ozohanics Olivér, míg az Amplex-Red/HRP méréseket Dr. Tretter László végezte. A többi összes kísérletet a Jelölt végezte, bár a fehérjetisztításban Mattias Nilsson TDK hallgató alkalomszerűen segédkezett. A cikket a Jelölt írta, melynek végső formája Dr. Ádám Veronika segítségével született meg. A közlésre váró eredmények jóval későbbről Dr. Szabó Eszter poszt-dok, Nemes-Nikodém Éva Ph.D. hallgató és Vass Rubina TDK hallgató kísérleteiből származnak.

A rekombináns hKGDHk, h(E1k-E2k) alkomplex és hE1k alegység vizsgálata
(Ambrus A, Nemeria NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V, Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components, *Free Radic. Biol. Med.* 89: 642-650 (2015))

Ebben a munkában összeépítettük *in vitro* a funkcionális hKGDHk-t, illetve E1-E2 alkomplexét rekombináns, tisztított alegységekből és vizsgáltuk a katalitikus tulajdonságokat a fiziológiás, illetve ROS-képző aktivitások tekintetében. Mindezt szintén megtettük három másik rokon komplex esetében is (*E. coli* KGDHk [ecKGDHk], ecPDHk, hPDHk) és összehasonlítottuk a különböző komplexeket, amely alapján következtetéseket vontunk le az α-ketosav-dehidrogenáz komplexek működésével kapcsolatban. Ebben az összefoglalóban elsősorban a hKGDHk tekintetében született eredményekre koncentrálok, a többi komplexre vonatkozó részletes eredmények a cikkben lesznek csak megtalálhatóak.

A négy komplexet korábban optimalizált protokoll [140] alapján építettük össze, a megfelelő alegységeket különböző sztöchiometrikus arányokban alkalmazva. A protokoll röviden a következő: a megfelelő (rekombináns, tisztított) E2 és E3 alegységeket kell először összepipettázni, majd 25 ^{o}C-on együtt inkubálni 1 órán keresztül, majd ezután adjuk csak hozzá a megfelelő E1 alegység preparátumot és inkubálunk további 10 percig. A fent említett alkalmazott különböző alegység-arányok az irodalomban korábban felvetett – és néhol vitatott – különböző értékek voltak mindegyik komplex esetében [24]. Elsősorban azért vannak néha különböző komplex sztöchiometriák leírva az irodalomban az egyes komplexek esetében, mert általában természetes forrásból – több lépésben – izolált komplexekre vonatkozóan írtak le korábban ilyen jellegű ajánlásokat, és a különböző tisztítási protokollok néha különböző mértékben "mostak le" alegységeket a komplexekről [82, 83, 141-146]. Célunk volt tisztázni – a rekombináns, tiszta alegységek birtokában, egy egyszerű aktivitásmérésen keresztül –, hogy melyik irodalomban ajánlott sztöchiometrikus arány adja a legnagyobb aktivitást és ezáltal melyik össszetétel jellemezheti legjobban az adott komplexet. A különböző funkciójú, illetve az eltérő evolúciós szerveződési szinteken megjelenő azonos funkciójú α-ketosav-dehidrogenáz komplexeket sokszor különböző összetétel jellemzi [24]. A komplexek katalitikus aktivitásait ezután különböző fiziológiásan, illetve patológiásan releváns kísérleti körülmények között – beleértve a *forward*, illetve *reverz* katalitikus irányokat is – vizsgáltuk és következtetéseket vontunk le a pH (acidózis), a lipoilációs-státusz, illetve releváns effektorok (például Ca^{2+}, ADP) hatásával kapcsolatban. A két humán komplexet összeépítettük a legelterjedtebb patogén hLADH mutáns (G194C-hLADH) felhasználásával is

és megvizsgáltuk, hogy a teljes komplex szintjén az hogyan fejti ki a hatását. A legfontosabb általános konklúzióink a különböző komplexek összehasonlítása tekintetében a következőek voltak: *i.* mind a négy komplex képes volt ROS képzésére, bár eltérő intenzitással, *ii.* a hPDHk – némileg meglepő módon, az irodalommal látszólag ellentétben (lásd a Bevezető részt) – szignifikánsan gyorsabban termelt ROS-t a hKGDHk-hoz viszonyítva, amikor a közös hE3 alegység egységnyi tömegére számoltuk a ROS-képző aktivitásokat, *iii*. kizárólag a h(E1k-E2k) alkomplex, illetve a hE1k alegység képzett szignifikáns mértékű ROS-t, ez az aktivitás a többi megfelelő rokon entitások esetében nem volt számottevő, *iv*. a G194C-hLADH beépítése a hPDHk-ba, illetve hKGDHk-ba mindkét esetben csökkentette a teljes komplex aktivitásokat, a hKGDHk esetében viszont a *reverz* katalitikus irányban fokozta a ROS-képést, *v*. megállapítottuk a kérdéses alegység-sztöchiometriák közül mindegyik vizsgált komplexre vonatkozóan a legvalószínűbb összetételt (ez a hKGDHk esetében 24 hE1k : 24 hE2k : 12 hE3-nak adódott, lásd alább).



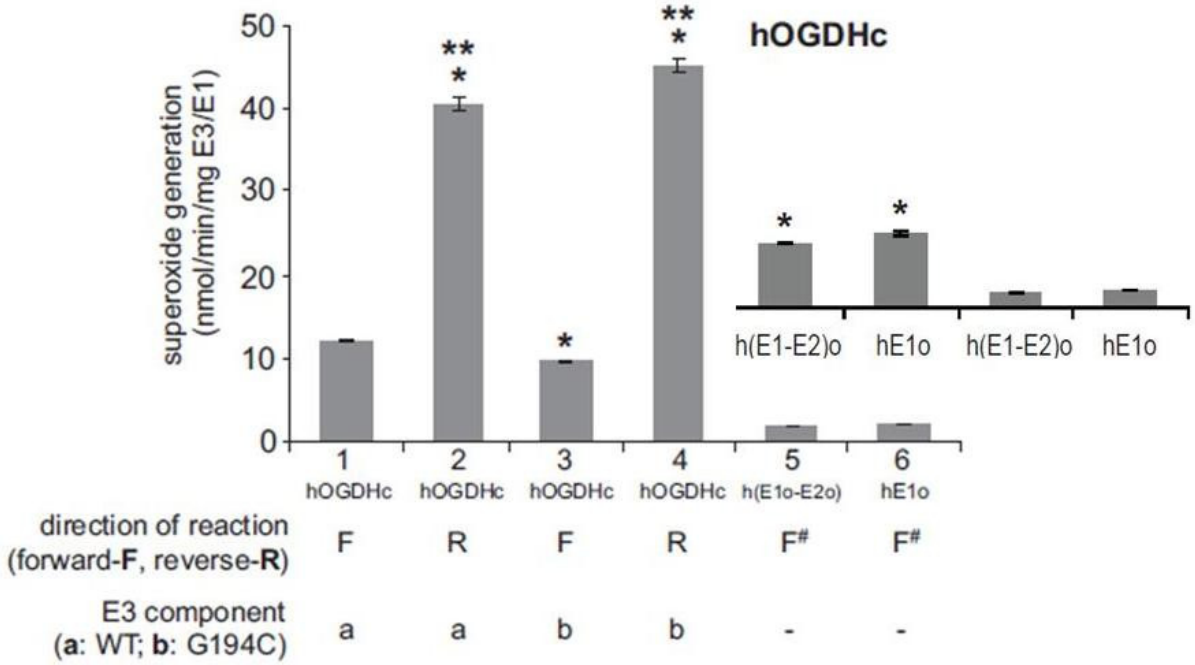
7. ábra (Fig. S4 [cikkben]) Az *in vitro* összeépített hKGDHk (hOGDHc az ábrán) teljes aktivitásának vizsgálata különböző körülmények között. Statisztikailag szignifikáns eltérést találtunk ($p<0,05$ mellett) az 1. oszlophoz képest a 3. oszlopban (*, de a 2. oszlopban nem), a 3. oszlophoz viszonyítva a 4., 5., 8. és 9. oszlopokban (**; de a 6., 7., 10. és 11. oszlopokban nem), illetve az 5. és 9. oszlopok között (***). Részletes kísérleti körülményekért lásd az ábraaláírást a cikkben.

Ezen felül specifikusan a hKGDHk-val kapcsolatban a következőkben leírt megállapításokat tettük még. Az emlős KGDH komplexek szerkezet és reguláció tekintetében

nagyban hasonlítanak a prokarióta analógokhoz [22, 23, 99, 106, 147-151], viszont amiben eltérnek tőlük az az, hogy pozitív regulációt szenvednek el Ca^{2+} és ADP hatására (csökken általuk a KG K_M-je) [106, 147, 152, 153]. 100 μM-nál magasabb Ca^{2+}-koncentráció viszont már gátolta a patkány agyból izolált enzimet [101], illetve az is ismert, hogy az AMP nem aktiválja a komplexet [82, 106, 147, 154, 155]. Korábban a következő alegység-sztöchiometriákat javasolták az emlős KGDHk-kal kapcsolatban: 1:1:1,5 [100], 1:1,2:1,4 [142], illetve 1:1:0,5 [94]. Ezek közül az első kettőnek nincs különösebb racionalitása, ha figyelembe vesszük az eddig megismert szerkezeti topológiákat ebben az enzimcsaládban [24]. Irodalmi megfontolások alapján, a harmadik javaslat mellett még a 0,5:1:0,5 (vagy 1:2:1, illetve 12:24:12) sztöchiometria jöhetne esetleg szóba, amely meg is valósul például az ecKGDHk esetében (lásd cikk).

Amint az a 7. ábrán látható, különböző (tömeg)arányban adott alegységek esetén változik a teljes komplex aktivitása. Az 1:1:1 tömegarány egy egyszerű, tradicionális arány az irodalomban, ezt is tesztelni szerettük volna, bár nincs értelmes kapcsolata a moláris sztöchiometrikus aránnyal. A 4,3:1,68:1 tömegarány felel meg az 1:1:0,5 (vagy 24:24:12) mól/alegység-aránynak, míg a 2,15:1,68:1 tömegarány reprezentálja a 12:24:12 alegység-arányt. Amint látható az ábrán, a 24:24:12 összetételű komplex adta a legnagyobb mértékű aktivitást. Az eredmények alapján azt javasoljuk tehát – összhangban a [94]-es referenciában leírt adattal –, hogy a hKGDHk összetétele 24 hE1k : 24 hE2k : 12 hE3. Ezen komplexnek sikerült tovább javítani az aktivitását a hE2k további lipoilálásával. Ezt egy lipoil-ligáz reakcióval értük el, amelyet akkor szoktak alkalmazni ha azt feltételezik, hogy a rekombináns fehérjéhez nem kapcsolódik sztöciometrikus arányban az LS kofaktor, például a fehérje nagymennyiségű termeltetése következtében. Érdekes, hogy sem a Ca^{2+}-nak, sem pedig az ADP-nek itt nem tudtuk kimutatni az aktivitást stimuláló hatását, az irodalmi adatokkal ellentétben (lásd fent). A G194C-hLADH mutánssal összeépített hKGDHk-nak mindkét vizsgált pH-n számottevően csökkent az aktivitása a vad-típusú komplexhez képest. Ez azt mutatja, hogy bár nem tudtunk erre a mutánsra nézve kimutatni aktivitás-esést izolált formájában, a hKGDHk-ba beépülve mégis negatívan hat ez a mutáns a komplex teljes aktivitására. Az is elképzelhető, hogy a G194C-hLADH részben disszociál a hKGDHk-ról.

A hKGDHk, illetve a h(E1k-E2k) alkomplex ROS-képzése tekintetében az alábbiakat állapítottuk meg. A 24:24:12-es alegység-összetételű hKGDHk fiziológiás (*forward* katalitikus irányú) aktivitásának mindössze 1,9%-a volt a mért – szintén *forward* katalitikus



8. ábra (Fig. 4 [cikkben]) Az *in vitro* összeépített hKGDHk (hOGDHc az ábrán), a h(E1k-E2k) alkomplex (h(E1o-E2o) az ábrán), illetve a hE1k alegység (hE1o az ábrán) ROS-képzésének vizsgálata. A specifikus ROS-képző aktivitásokat a hE3 mennyiségére vonatkoztattuk, kivéve az 5. és 6. oszlopok esetében (#-vel jelölve), ahol a hE1k mennyiségével számoltunk. A beágyazott ábrán (amely a cikkben nem szerepel) a ROS-képző aktivitásokat a sztöchiometrikus mennyiségű (de jelen nem lévő) hE3-ra vonatkoztattuk az első két oszlopban (lásd szöveg), míg a 3. és 4. oszlopok megegyeznek a főábra 5. és 6. oszlopaival (a jobb összehasonlíthatóság végett). Statisztikailag szignifikáns különbségek jelölése: az 1. oszlophoz képest (*), míg a 2. és 4. oszlopok között (**) ($p<0,05$). F illetve R: *forward* illetve *reverz* katalitikus irányok. A pH minden esetben 6,598 volt. A h(E1k-E2k) és hE1k esetében ugyanannyi hE1k, illetve hE2k volt jelen mint a hKGDHk esetében. Részletes kísérleti körülményekért lásd az ábraaláírást a cikkben.

irányú – ROS-képző aktivitás (szubsztráttelítés mellett, az alkalmazott kísérleti körülmények között, lásd 8. ábra). Látható, hogy a rekombináns komplex esetében is szignifikánsan nagyobb a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzés intenzitása (a *forward* katalitikus irányhoz képest, hasonlóan a sertés-szív enzimhez [82]). A többi vizsgált rokon komplextől eltérően, a hKGDHk h(E1k-E2k) alkomplexe, illetve hE1k alegysége önmagában is képes volt szignifikáns mértékben ROS-t termelni a *forward* katalitikus irányban. Az adatok mélyebb elemzése azt mutatta, hogy ez a két entitás majdnem akkora mértékben képes ROS-t képezni mint a teljes hKGDHk, amennyiben a hKGDHk-ban jelenlévő hE3 mennyiségére vonatkoztatjuk a mért aktivitás értékeket (lásd a 8. ábrán a beágyazott ábrát). A hE1k ROS-képzését tovább karakterizáltuk egy kapcsolódó együttműködési projektben (erről a cikkről a disszertációban nem számolok be, mivel ez elsősorban az együttműködő partner munkája volt) [156]. A G194C-hLADH mutáns hKGDHk-ba történő beépítésével a ROS-képző kapacitás szignifikánsan (21,5%-kal) csökkent a *forward* katalitikus irányban, míg a *reverz*

katalitikus irányban 11,3% (szignifikáns mértékű) emelkedést találtunk. A G194C-hLADH-ra itt kapott – fiziológiás, illetve ROS-képző teljes komplex aktivitás – adatok jobban megmagyarázzák a vonatkozó klinikai tüneteket, mint az izolált mutáns hE3 alegységre kapott adatok (lásd az előző cikk összefoglalását).

Fontos megemlíteni, hogy ez a cikk írta le először az ecPDHk és ecKGDHk ROS-képző tulajdonságát. Ezáltal nagy valószínüséggel általánosan is elmondható, hogy valamilyen mértékben minden α-ketosav-dehidrogenáz komplex képes ROS-t termelni – már csak a közös E3 alegység miatt is, ahol a ROS-képzés megvalósul – és ez a funkció konzerválódott az evolúcióval. Ennek a funkciónak az esetleges fiziológiás, illetve patológiás szerepét természetesen a jövőben tisztázni szükséges különböző fajokban (ahol ennek a funkciónak a szerepe felmerül), hiszen a szabadgyök/ROS-képzésnek szerepet tulajdonítottak már – a direkt patológiás hatásain felül [88, 89, 157-159] – a fenti enzimkomplexek önregulációjában [94], szignál-transzdukcióban (pl. transzkripciós faktorok általi regulációban) [88, 160, 161], illetve a sejtszintű védelemben (pl. citotoxikus limfociták által) [162] is. Az hogy *in vitro* – adott kísérleti körülmények között – milyen mértékben képes ROS-t termelni egy adott komplex, erősen modulálódhat *in vivo* az elérhető szubsztrát, illetve kofaktor koncentrációk függvényében fiziológiás, illetve patológiás körülmények között. Efelett természetesen az adott komplex fizikai mennyisége – a transzkripciós reguláción keresztül – és regulációs mechanizmusai is befolyásolják a komplex által megvalósuló ROS-képzés mértékét, illetve ennek hozzájárulását a teljes mitokondriális ROS-képzéshez [85]. Más izolált ROS-képző enzimekkel (pl. Komplex I, Komplex II, dihidroorotát-dehidrogenáz) összehasonlítva az állapítható meg, hogy a hKGDHk hasonló nagyságrendben képezett ROS-t, habár nyilván az alkalmazott esszé körülmények különbözőségei nem teszik lehetővé a mért értékek rigorózus direkt összehasonlítását [163-166]. Ugyanez igaz az *in vitro* és *in situ/in vivo* eredmények direkt összevethetőségével kapcsolatban is [167]. Egy megbízhatóbb összehasonlítás azt mutatja – izolált patkány izom mitokondriumban –, hogy az *in situ* ROS-képző képesség/kapacitás a KGDHk, PDHk (~fele), ELKDHk (~negyede), Komplex I (I_F hely, ~nyolcada) sorrendben csökken [85]. Érdekes megjegyezni, hogy ebben a tanulmányban azt találták, hogy a magas $NADH/NAD^+$-arány nem elegendő körülmény *in situ* a magas ROS-képzési sebességhez, ahhoz szükséges a megfelelő komplexek specifikus szubsztrátjainak jelenléte is. Ennek a jelenségnek a tisztázása fontos lehet a vonatkozó *in vivo* relevanciák pontosabb meghatározása szempontjából.

Evolúció-szintű különbségre utal, hogy az ecKGDHk E1-E2 alkomplexe, illetve E1 komponense nem termel szignifikáns mértékben ROS-t, a hKGDHk megfelelő entitásaival

ellentétben. Ez felveti ezeknek a funkcióknak a specifikus – elsősorban patológiás – szerepét a magasabbrendű organizmusokban. A hE1k-általi ROS-képzésnek akkor lehet patológiás szerepe, ha a hKGDHk sztöchiometrikus összetétele sérül és a hE1k feleslegben van jelen a mitokondriumban [156, 168-173]. A h(E1k-E2k)-általi ROS-képzésnek pedig akkor lehet szerepe, amikor a hE3 nincs sztöchimetrikus arányban jelen avagy az eleve gyenge kapcsolat a hE3 alegységgel [62, 64, 65] potenciálisan tovább gyengül például bizonyos hE3 patogén mutánsok [34-37] és/vagy acidózis [141] által. Azt javasoljuk, hogy az utóbbi esetekben – és amennyiben elegendő KG, illetve megfelelően magas $NADH/NAD^+$-arány van jelen – a h(E1k-E2k) alkomplex (a *forward* katalitikus irányban) és a disszociált hE3 (avagy megfelelő patogén mutánsa, a *reverz* katalitikus irányban) együtt igen számottevő mennyiségű ROS termelésére lehet képes patológiásan releváns körülmények között. A Scheme 1 [cikkben] összefoglalja a hKGDHk-n belül megjelenő különböző ROS-képző helyeket és (javasolt) mechanizmusokat [40, 43, 49, 156]. A h(E1k-E2k) esetében itt még nem javasoltunk mechanizmust a hE2k-n, de ezt megtettük egy későbbi összefoglaló közleményünkben [3].

A cikkben – a Fig. 4/S4-hez hasonló formában – bemutatjuk még az ecPDHk (Fig. 1/S1), ecKGDHk (Fig. 2/S2) és hPDHk (Fig. 3/S3) esetében nyert kapcsolódó adatokat is. A Table 1 [cikkben] összegyűjti az optimális sztöchiometria mellett mért teljes komplex (*forward)*, illetve ROS-képző (*forward*/*reverz*) aktivitásokat.

Ez a munka a Jelölt Fulbright munkája volt a Rutgers Egyetemen. A fehérjék − a hLADH és patogén G194C mutánsa kivételével − mind a Frank Jordan laborból származtak (néhány tisztított alegységet, illetve vektort a Jordan labor is más együttműködő partnereitől szerzett be). Az összes mérést a cikkben a Jelölt végezte, illetve a cikket is a Jelölt írta. Ezután a munka után elkészítettük a saját hE1k és hE2k vektor konstruktjainkat is és sikeresen expresszáltuk, illetve tisztítottuk is ezeket a fehérjéket. Mi más expressziós rendszert használunk - ezen fehérjék esetében is - mint a Jordan labor, a Strep-tag affinitás-kromatográfia előnyeit szem előtt tartva.

Patogén hLADH mutánsok szerkezetvizsgálata oldatban HDX-MS technikával

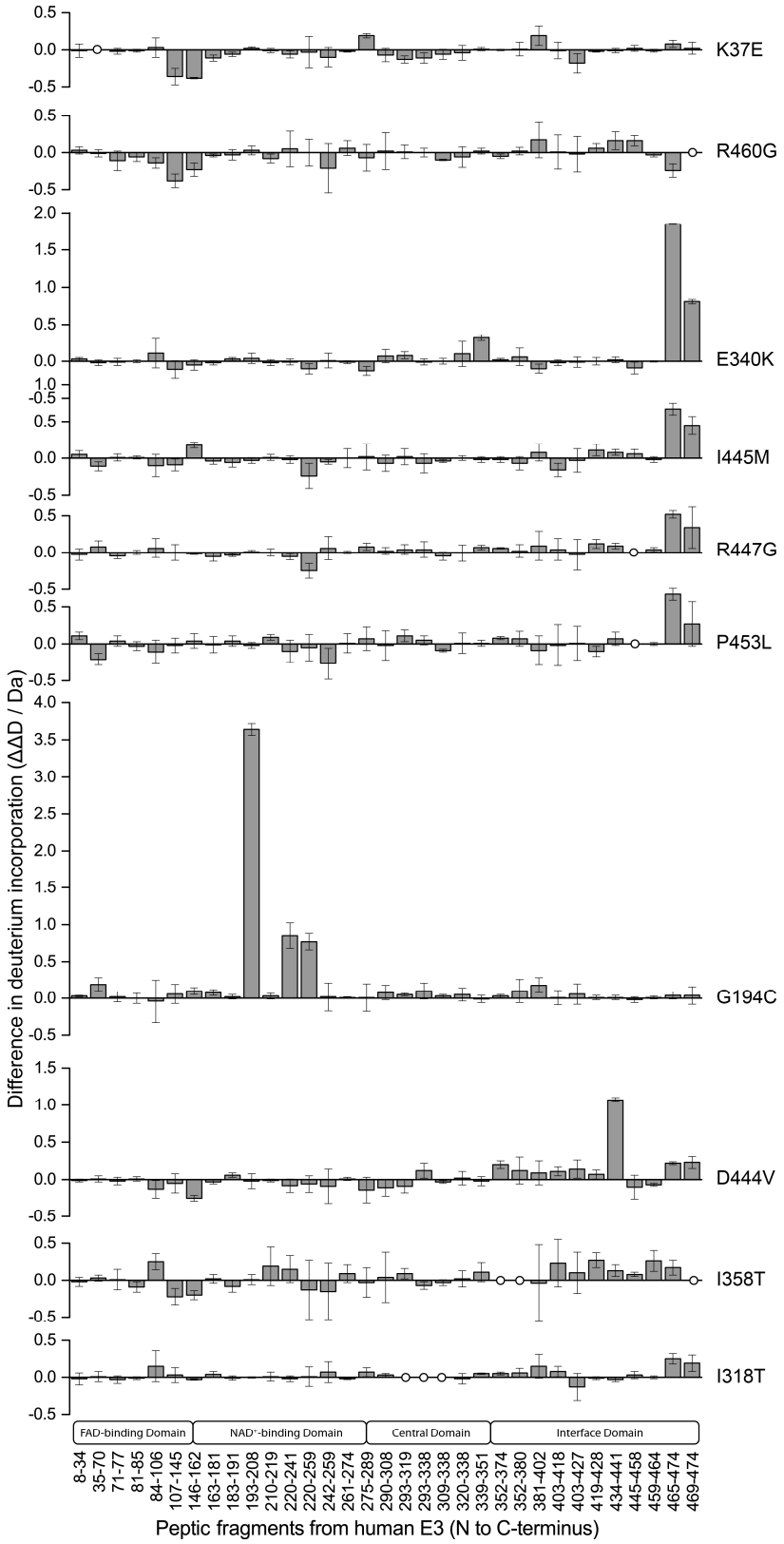
(Ambrus A[#], Wang J[#], Mizsei R[#], Zambo Z, Torocsik B, Jordan F, Adam-Vizi V, Structural alterations induced by ten disease-causing mutations of human dihydrolipoamide dehydrogenase analyzed by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry: Implications for the structural basis of E3 deficiency, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 1862: 2098-2109 (2016) ([#]=megosztott első szerzők))

A Jelölt sokat – több együttműködő laboratóriumban (BME, ELTE, Richter, Firenze, Pittsburgh), különböző térerőkön (500-950 MHz proton frekvencián) – próbálkozott azzal, hogy az általa korábban magas szinten művelt NMR spektroszkópiát [174-181] tudja felhasználni a vad-típusú, illetve mutáns hLADH fehérjék vizsgálatára. Sajnos a legkorszerűbb készülékekkel sem sikerült megfelelő jeldiszperzitást elérnünk, így az NMR technika helyett más szerkezetvizsgálati módszert kellett választanunk. A nyilvánvaló másik lehetőség a röntgenkrisztallográfia volt. Szintén kollaborációban (ELTE, Pittsburgh) megpróbáltunk kikristályosítani néhány patogén hLADH mutánst, illetve a hLADH-t. Bár kristályokat sikerült nyernünk, azonban a diffrakciós adatok nem voltak alkalmasak szerkezetelemzésre egyik esetben sem. Bár nem adtuk fel és próbálkoztunk továbbra is kristályosítással is, elvégeztük az összes ismert patogén hLADH mutáns molekuláris dinamikai (MD) szimulációját. Az eredményeket két közlemény foglalja össze [182, 183], de mivel a konklúziókat részben felülírták a későbbi experimentális eredmények, ezért ezt a két cikket ebben a disszertációban nem ismertetem. Ezután egy modern, indirekt, experimentális szerkezetvizsgálati módszert is kipróbáltunk, amely a hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS) névre hallgat. Ezt a módszert is több együttműködésben (KKKI, Arizonai Egyetem) próbáltuk már megvalósítani – saját műszerünk ugyanis akkor még nem volt –, mire a Rutgers Egyetemen sikeres méréseket tudtunk végül végrehajtani (későbbi/mostani poszt-doktorunk, Ozohanics Olivér – akkor Ph.D. hallgató a KKKI-ban és együttműködő partnerünk – segített technikailag beállítani a módszert a külföldi partnernél). A HDX-MS alkalmas – többek között – a térszerkezet megváltozásának a detektálására oldatfázisban (saját összefoglaló metodikai közleményünk: [184]). Ezt úgy éri el, hogy összehasonlítja a vad-típusú és mutáns fehérjéket oldatfázisú deutérium(D)-csere/beépülés szempontjából. Ahol ebben eltérés mutatkozik a fehérjén belül, ott a mutáció hatására megváltozott szerkezeti dinamika/oldószer-hozzáférés jelentkezett. A D-cserét fiziológiásan releváns oldatkörülmények között lehet vizsgálni intakt fehérjék felhasználásával. A D-csere lezajlása után limitált proteolízisnek vetjük alá a fehérjéket és vizsgáljuk a képződött peptideket D-beépülés szempontjából (peptid-szintű felbontás). A módszer legnagyobb

kihívása a nemkívánt D-csere visszaszorítása a peptidek analízise során, amelyet a közeg számottevő savanyításával, illetve a hőmérséklet csökkentésével érnek el.

Először a periplazmatikus expressziós rendszer alternatíváját kerestük nagyobb fehérjehozam elérése céljából. Számos expressziós rendszert kipróbáltunk míg a pET-52b(+)/BL21(*DE3*) *E. coli* expressziós rendszer mellett döntöttünk (a kipróbált expressziós rendszerekről Mizsei Réka Ph.D. disszertációja (2021) emlékezik meg röviden). Ez a rendszer továbbra is beépít a fehérjetermékbe egy N-terminális Strep-tag-et, amelyet itt sem távolítottunk el a tisztítás után. A hLADH génjét kodon-optimalizált módon (DNA2.0, Inc., Menlo Park, CA, USA) építettük be. A mutagenezist a korábbival azonos módon hajtottuk végre (lásd a 2011-es *Hum. Mol. Genet.* cikkünk összefoglalóját). A fehérje-expressziót és a feldolgozás lépéseit részletesen optimalizáltuk (lásd cikk). A periplazmatikus rendszernél bemutatott végső tisztasági/homogenitási szintet itt is sikerült elérnünk (nem mutatunk gélt a cikkben erről). Míg a periplazmatikus rendszerből nagyon kevés (mindössze ~120 μg/L) nagytisztaságú fehérjét nyertünk ki, addig az új rendszerrel a kitermelés megsokszorozódott (akár több mg/L is lehet, főleg a dupla Strep-tag (Twin-Strep-tag) alkalmazása mellett). Néhány patogén mutáns (G101del, I12T, M326V, G426E) esetében így sem tudtunk elég fehérjekoncentrációt elérni a HDX-MS méréshez, így a 14 patogén hLADH mutánsból tíz esetében tudtunk sikeres analízist végrehajtani. A fenti négy patogén mutáns esetében kipróbáltuk az összes lehetséges kodon-szinonimát, mégsem sikerült megfelelő kitermelést elérnünk.

A HDX-MS kísérletek körülményeinek optimalizálása után, maguk a HDX kísérletek 10 mM KH_2PO_4, 50 mM KCl, 2 μM FAD, 99,9% D_2O, pD=7.0 pufferben (végső D_2O tartalom: 94,9%), egyetlen (3 min) csereidő alkalmazásával történtek 25 ^{o}C-on. A cserefolyamatot azonos térfogatú 0 ^{o}C-os 0,2 M KH_2PO_4-oldat (pH=2,6) hozzáadásával állítottuk le, majd injektáltuk a mintákat az LC-MS rendszerbe, ahol az online proteolízis (pepszinnel) és az elválasztás történt. Az MS mérések után azonosítottuk a proteolitikus peptideket és meghatároztuk a deutérium-beépülés mértékét, amely információt hordoz a fehérjeszerkezetről. Referenciaként deutérium-mentes közegben is elvégeztünk minden analízist. Minden kísérletet háromszor hajtottunk végre. 33 peptidet választottunk ki analízisre a hLADH szekvenciája alapján, amely 95% szekvencia-lefedettséget biztosított (Fig. S1 [cikkben]). Efelett néhány mutáció-specifikus peptidet is felhasználtunk az analízishez (Table S1 [cikkben]). A Fig. 1 [cikkben, oszlopdiagrammal] és Fig. 2 [cikkben, kristályszerkezeti modellen] bemutatja a hLADH deutérium-beépülési mintázatát, amely alapján megállapíthatóak voltak az eleve dinamikusabb vagy oldószer számára jobban elérhető



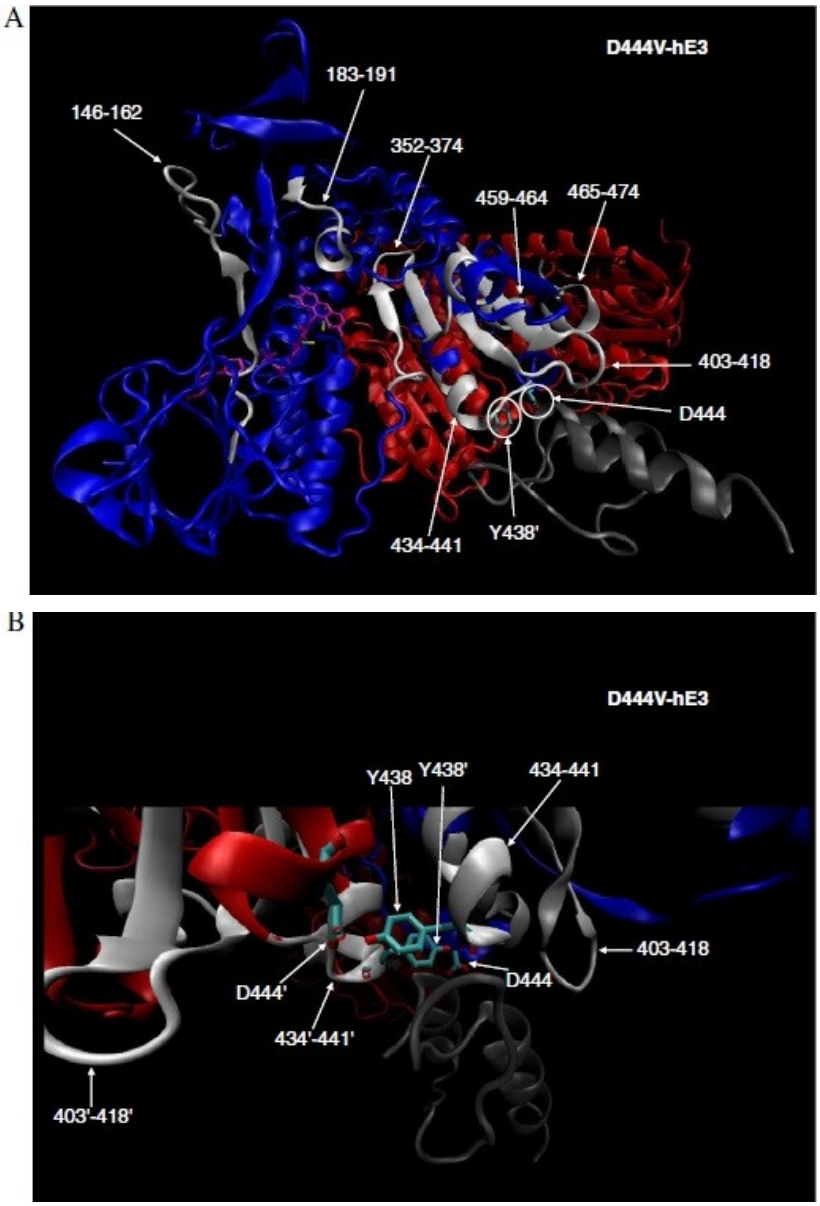
9. ábra (Fig. 3 [cikkben]). A vizsgált patogén mutánsok hLADH-val szemben mért differenciális D-beépülési mintázatai (a megfelelő numerikus adatok a Table S2-ben [cikkben] találhatóak). ΔΔD: D-beépülés különbsége (mutáns-vad típus). Az eredmények három párhuzamos mérésnek az átlagát reprezentálják (±S.D.).

(pl. 81-85, 275-289, 339-351), illetve rigidebb vagy oldószer elöl elzártabb (pl. 434-441, 459-464) fehérjerégiók. A 9. ábra (Fig. 3 [cikkben]) bemutatja a tíz vizsgált mutáns hLADH-val szemben mért differenciális D-beépülési mintázatait (a numerikus adatokat a Table S2 [cikkben] tartalmazza). Amint az látható, a patogén mutációk nem csak a szubsztitúciók közvetlen környezetében, hanem a fehérjeszerkezet távolabbi részeiben is okoztak szerkezeti perturbációkat. A hLADH négy doménból áll, ezek a FAD-kötő (Ala1-Gly149), NAD^+/NADH-kötő (Ser150-Pro282), központi (Phe283-Asp350) és dimerizációs (Tyr351-Phe474) domének (lásd a 2019-es *Hum. Mol. Genet.* cikkünk Fig. S2. ábráját) [40]. A HDX-MS eredmények azt mutatják, hogy D-beépülés tekintetében egyik mutáns esetében sem volt markáns változás a dimerizációs doménben a hLADH-hoz képest. Ez megerősíti korábbi eredményeinket, miszerint nem történik monomerizáció a patogén hLADH mutációk hatására (az erre eddig vizsgált mutációk esetében legalábbis).

A következőkben egy reprezentatív mutáns (D444V-hLADH) esetében mutatom be az adatok részletes elemzését és a levont legfontosabb következtetéseket. A D444V-hLADH variáns LADH aktivitása rekombináns fehérje felhasználásával a kontroll 80 [127], 35 [185], 100 [34], illetve 90% [41]-ának adódott (különböző esszé körülmények között). Ugyanez egy homozigóta beteg izom-homogenizátumában 15% volt, amellett, hogy a fehérje immunreaktivitása 10%-ra csökkent [14]. Az utóbbi vizsgálatban a hKGDHk 2%, míg a hPDHk 0% aktivitást mutatott a kontrollhoz képest. A mutánst rekombináns hPDHk-ba építve 15% teljes komplex aktivitást kaptak a kontrollhoz viszonyítva [34]. Ugyanebben a közleményben azt is kimutatták, hogy annak ellenére, hogy a mutáció hatására elvész az Asp444 és Tyr438′ (′=másik monomer) aminosavak közötti H-kötés, monomerizáció nem történik, a hE3 kötődése a hPDHk-hoz (annak E3-kötő fehérjéjéhez [E3KF]) azonban érdekes módon megszűnik. A D444V-hLADH volt az egyik olyan mutáns, amely fokozott ROS-képzést (130%) mutatott a *reverz* katalitikus irányban a hLADH-hoz képest (lásd a 2011-es *Hum. Mol. Genet.* cikkünk összefoglalóját), illetve oxidatíve károsította a PDHk és KGDHk LS kofaktorát élesztő modellben (erre a mutánsra az utóbbi effektust humán homozigóta fibroblasztban is kimutatták) [127].

A hLADH korábbi kristályszerkezete [40] alapján megállapítottuk, hogy az általunk kimutatott hét megváltozott dinamikájú peptid (lásd 10. ábra [Fig. 4 a cikkben]) közül három (146–162, 183–191, 352–374) közvetlen szerepet játszik a hLADH FAD-kötésében, amely potenciálisan magyarázhatja a korábban tapasztalt 5% FAD-vesztést a D444V-hLADH mutánsban [185]. A fenti három peptid a FAD izoalloxazin gyűrűjének *re* oldalához esik közel, ahol a NAD^+/NADH-kötés történik. A NADH-kötő (összesen 13, az 1ZMD [PDB ID-

jú] hLADH szerkezet [40] alapján), illetve NAD^+-kötő (szintén összesen 13, az 1ZMC hLADH szerkezet [40] alapján) aminosavak közül rendre öt (38%), illetve kettő (15%) a fenti három peptidben lokalizálódik, amely a NAD^+/NADH-kötés esetleges perturbációjára utal a mutánsban. Nem találtunk viszont megváltozott dinamikájú peptidet az izoalloxazin-gyűrű *si* oldalán, ahol a katalitikus diszulfid-cserehely és az LS-kötő zseb/csatorna található.



10. ábra (Fig. 4 [cikkben]) A D444V-hLADH patogén mutánsban HDX-MS technikával kimutatott megváltozott dinamikájú peptidek elhelyezkedése a hLADH-E3KF szerkezetben (PDB ID: 1ZY8 [37]). A hLADH monomerek kékkel, illetve pirossal vannak színezve (rendre a G és H láncok az 1ZY8 szerkezetben), a FAD lila színű, az E3KF E3-kötő doménje (44 aminosav, 130–173, N lánc az 1ZY8 szerkezetben) szűrke színű, a fontos aminosavak karikázva vannak, a kén atomok (az aktív-centrum Cys-ekben) sárga színűek, a megváltozott dinamikájú peptidek pedig fehér/halvány szűrke színűek és a szekvencia-tartományuk meg van adva. A megváltozott dinamikájú peptidek csak a G láncban vannak feltüntetve, a jobb áttekinthetőség kedvéért. B. Nagyított reprezentáció, amelyben mind a két monomeren fel vannak tüntetve a megváltozott dinamikájú peptidek. További információkért lásd az ábraaláírást a cikkben.

A másik négy érintett peptid messzebb helyezkedik el az aktív centrumtól (a szubsztitúciós helyhez közelebb lokalizálódik). Ezért a D444V-hLADH esetében a HDX-MS eredmények alapján a LADH-aktivitás csökkenéséért, illetve a fokozott ROS-képző tulajdonságért elsősorban a 146–162, 183–191, 352–374 peptidekben bekövetkező szerkezeti változások tehetők felelőssé, amelyek tehát a hLADH nukleotid-kofaktor interakcióit érintik elsősorban.

A két ismert hLADH-E3KF kristályszerkezet alapján [34, 37], az Asp444-hLADH, illetve Tyr438′-hLADH aminosavak (lásd fent) rendre öt, illetve hét közvetlen kontaktust létesítenek az E3KF E3-kötő doménjével. A D444V-hLADH mutánsban az Asp444-hLADH megfelelő eredeti oldallánc kontaktusai természetesen elvesznek. Ezen felül a mutáció indukálja a 434–441 peptid szerkezeti/dinamikai változását is (lásd 10/B. ábra), amely érintheti a Tyr438 interakcióit is (a hLADH dimerben a Tyr438-Tyr438′-pár egy fontos hidrofób felületet is biztosít az E3KF kötődéséhez (lásd 10/B. ábra) [34, 37]). A fenti peptid további interakciós partnereket is tartalmaz az E3KF számára (Gly439, Glu437) [34, 37], amelyek szerkezete/dinamikája szintén perturbálódhat a mutáció következtében. A 403–418 peptid szintén érintett a dinamikai változások tekintetében (lásd 10/B. ábra) és tartalmaz két E3KF interakciós partnert is (Thr412, Asp413) [34, 37]. A fenti szerkezeti/dinamikai effektusok alátámasztják az E3KF-iránti affinitás elvesztését (lásd fent).

A többi vizsgált mutánsra kapott eredmények elemző diszkussziója és a vonatkozó ábrákat (Fig. S2-10) lásd a cikkben. Megjegyzésre érdemes, hogy a HDX-MS és MD szimulációs adatok közötti legjobb korrelációk a K37E-, G194C-, P453L-, R460G-, és I445M-hLADH variánsok esetében jöttek létre.

Ebben a közleményben Mizsei Réka Ph.D. hallgató munkája volt a nagyobb hozamú expressziós rendszer beállítása, illetve a mutánsok expressziója és tisztítása. Az expresszió és tisztítás egy későbbi szakaszában Zámbó Zsófia TDK hallgató is részt vett. A mutagenezist újfent Dr. Törőcsik Beáta végezte. A HDX-kísérleteket Junjie Wang végezte a Rutgers Egyetemen (Frank Jordan munkacsoport). A Jelölt amellett, hogy irányította minden résztvevő munkáját, elvégezte az összes nyers eredmény részletes analízisét és értékelését, illetve megírta a cikket. Az adatanalízisben kis mértékben Mizsei Réka is részt vett. Jelenleg is folyamatban van a saját HDX-box-unk tesztelése a nemrég vásárolt MS készülékünkön. A módszer egyedül a mi laboratóriumunkban (lesz) elérhető egyelőre az országban és két együttműködő partnert máris érdekel (ELTE, Richter).

Betegséget-okozó hLADH variánsok szerkezetvizsgálata röntgenkrisztallográfiával

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

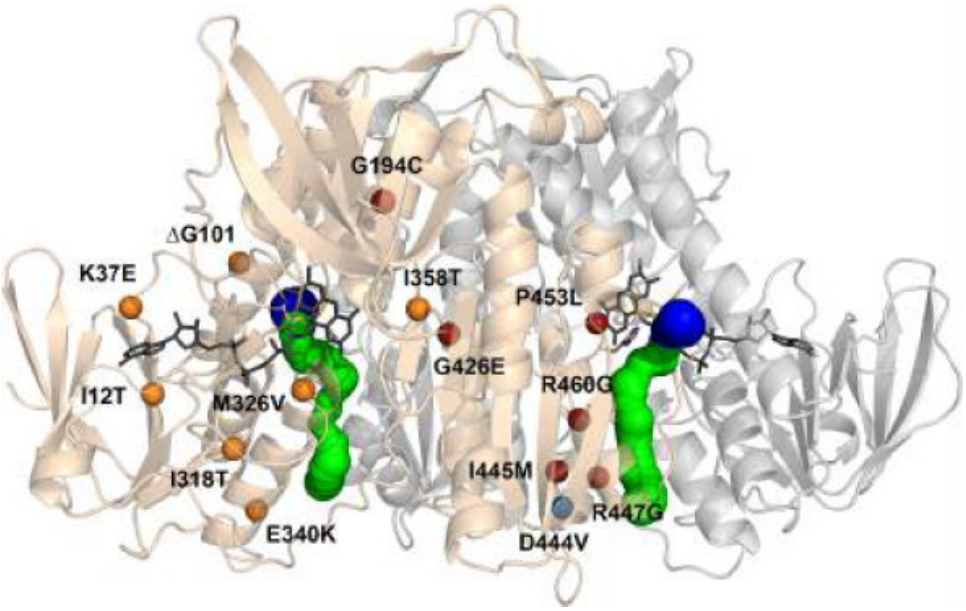
2. Szabo E, Wilk P, Nagy B, Zambo Z, Bui D, Weichsel A, Arjunan P, Torocsik B, Hubert A, Furey W, Montfort WR, Jordan F, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A, Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants,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

Ebben a munkában az volt a célunk, hogy röntgenkrisztallográfiás módszerrel meghatározzuk a hLADH betegséget-okozó variánsainak nagyfelbontású szerkezeteit. A szerkezeti információk birtokában a hLADH-deficiencia molekuláris hátterét kívántuk jobban feltérképezni.

A fehérjék előállításához a HDX-MS projektben létrehozott expressziós és tisztítási protokollt használtuk. A kristályosítási próbákat ülőcsepp gőzdiffúziós módszerrel végeztük. Kiindulásként a kereskedelemben (Qiagen, Hampton Research [HR]) beszerezhető kristályosítási tesztoldat-sorozatokat próbáltuk meg alkalmazni. Az I445M-, G426E-, illetve R447G-hLADH mutánsok esetében a HR-Crystal I tesztsorozat 39. oldatkörülménye (2 M $(NH_4)_2SO_4$, 2 (v/v)% PEG-400, 0,1 M Hepes, pH=7,5) vezetett sikeres kristályosításhoz (itt további optimalizálásra nem is volt szükség a sikeres adatgyűjtéshez). A hLADH esetében a HR-Index 83.-85. kondíciókat optimalizáltuk tovább a sikeres kristályosításhoz és adatgyűjtéshez (0,2 M $MgCl_2$, 25 (m/v)% PEG-3350, 0,1 M Bis-Tris, pH=7,45). A G194C-, P453L-, illetve R460G-hLADH mutánsok esetében a HR-Crystal I 39. kondíciójának (lásd fent) kismértékű módosításai vezettek eredményre (G194C-hLADH: 2 M $(NH_4)_2SO_4$, 2 (v/v)% PEG-400, 0,1 M Bis-Tris, pH=6,9; P453L-hLADH: 2 M $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 (v/v)% PEG-400, 0,1 M Hepes, pH=7,3; R460G-hLADH: 2 M $(NH_4)_2SO_4$, 2 (v/v)% PEG-400, 0,1 M Bis-Tris, pH=6,5). A D444V-hLADH sikeres kristályosításához a Qiagen NeXtal pHClear II tesztoldat-sorozat (kizárólag) Na/K-foszfát-tartalmú kondícióit optimalizáltuk tovább (sikeres oldatkörülmény: 1,6 M Na/K-PO_4, pH=8,1). Csakis a hLADH (Parabar 10312) és a D444V-hLADH (1,8 M Na/K-PO_4, pH=7,5, 20 (v/v)% glicerin) esetében használtunk krio-védőoldatot. A kristályokat folyékony nitrogénben tároltuk az adatgyűjtésig. A diffrakciós adatgyűjtés 100 K hőmérsékleten a berlini Helmholtz-Zentrum Berlin-ben (BESSY II szinkrotron, BL14.1 munkaállomás) történt. Az adatok elsődleges feldolgozását az XDSAPP 2.0 szoftverrel végeztük. A fázisproblémát molekuláris helyettesítéssel oldottuk meg (Molrep program, kiindulási modell: hLADH [PDB ID: 1ZMD, „A" monomer] [40]). A szerkezetfinomítás első lépése egy merev test finomítás volt (CCP4, Refmac5 program).

Ezután a további finomítás (Refmac5, illetve phenix.refine programok) már modellépítéssel (Coot program) együtt (iterálva) történt. A szerkezetek validálására a Molprobity programot használtuk. Az atomi koordinátákat feltöltöttük a Fehérjeszerkezeti Adatbázisba (Protein Data Bank, PDB): hLADH [PDB ID: 5NHG és 6I4Q], D444V-hLADH [5J5Z], P453L-hLADH [6I4Z], G194C-hLADH [6I4P], R460G-hLADH [6I4R], R447G-hLADH [6I4S], I445M-hLADH [6I4T], illetve G426E-hLADH [6I4U]. A szerkezetek jellemző paramétereit a Table 1.-ben foglaltuk össze (1. és 2. cikk). A mutáns szerkezeteket a 6I4Q PDB ID-jú hLADH szerkezethez hasonlítottuk. A szerkezetek illesztéséhez a ProFit programot használtuk. A fehérje-interakciók vizsgálatához a PISA és a CONTACT (CCP4) programokat használtuk. A fehérjecsatornák tulajdonságait a Caver Analyst 2.0 programmal vizsgáltuk. A szerkezetek és a fehérjefelszíni polaritás-térképek megjelenítésére a PyMol programot használtuk.

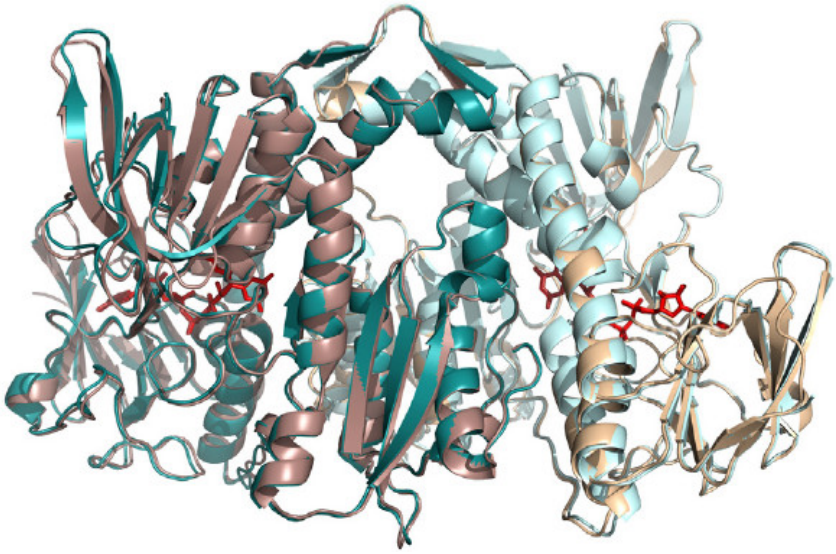
Egyik általunk meghatározott hLADH szerkezet sem tartalmaz ligandumot vagy más fehérjepartnert. A két új vad-típusú szerkezet alapvetően nem változtatta meg eddigi ismereteinket az enzimszerkezettel, illetve a katalitikus mechanizmussal kapcsolatban. Mindazonáltal az eddigi legnagyobb (1,75 Å) felbontású hLADH szerkezet (PDB ID: 6I4Q) felfedett néhány olyan részletet, amely fontos lehet a katalitikus mechanizmus szempontjából.



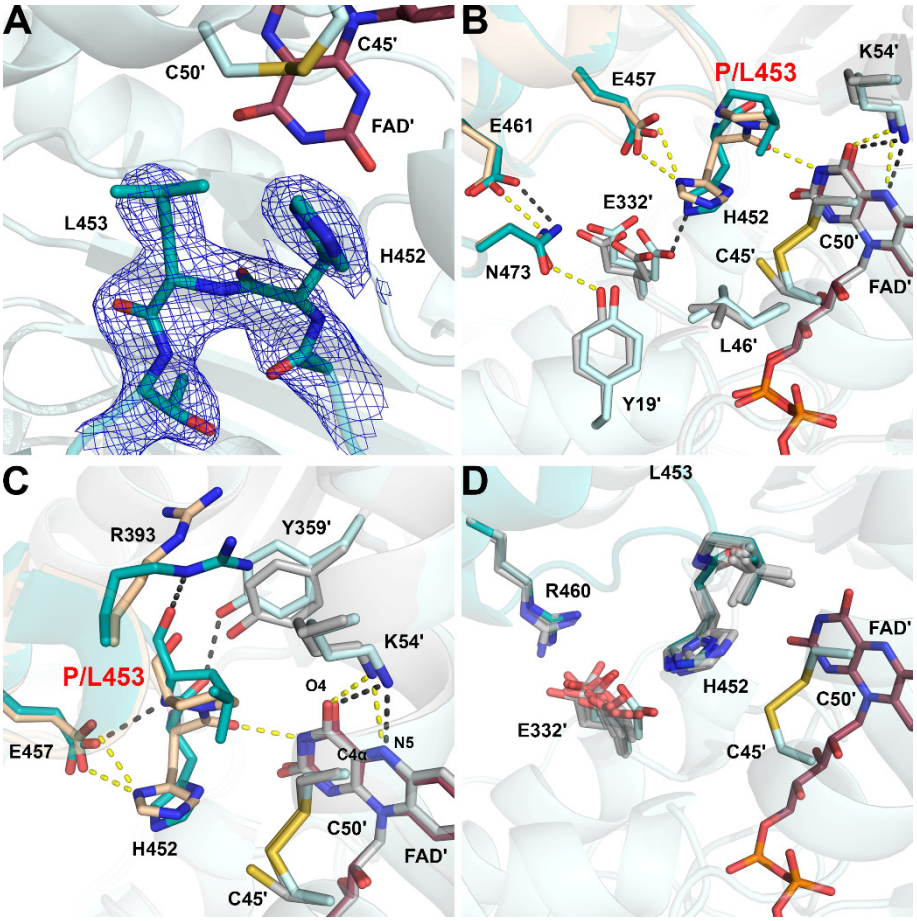
11. ábra (Fig. 1. a 2. cikkben) A hLADH 1,75 Å felbontású szerkezete (PDB ID: 6I4Q) a 14 patogén szubsztitúciós hely feltüntetésével. A szubsztitúciós helyek csak az egyik monomerben vannak jelölve. A gömbök a Cα atomokat jelölik a megfelelő aminosavakban a következő színkódolás szerint: a 2. cikkben vizsgált mutánsok − piros, az 1. cikkben vizsgált mutáns − kék, nem vizsgált mutánsok: narancssárga. A (DH)LS-kötő és H^+/H_2O csatornák rendre kék és zöld színűek. A hLADH A és B monomerjei rendre bézs és szürke színűek. A FAD prosztetikus-csoport, a Cys45-Cys50 diszulfid-kötés és a His452' aminosav pálcikamodellel van bemutatva. További részletekért lásd az ábraaláírást a cikkben.

A (DH)LS-kötő csatornára közel merőlegesen találunk egy másik fehérjecsatornát is (H^+/H_2O-csatorna), amely potenciálisan H_2O molekulák, illetve H^+/H_3O^+ ionok számára jelenthet ki(/be)vezető utat az aktív centrumból(/ba) (lásd a 3. ábrát a LADH mechanizmusával kapcsolatban, a 11. ábrát és a Fig. 3.-at az 1. cikkben) [186, 187]. Ebben a csatornában két aminosav (Glu332, Arg460′) oldalláncának figyeltük meg a konformációs flexibilitását. A jelenlévő alternatív konformerek dinamikusan szabályozzák a H^+/H_2O-csatorna geometriáját, illetve felszíni polaritását (Fig. 3. a 2. cikkben). A másik hLADH szerkezetben (2,27 Å felbontás, PDB ID: 5NHG) pedig azt vettük észre, hogy a hPDHk-E3KF/hELKDHk-E2-kötő felszín flexibilis szerkezetű (Fig. 2. és 4. az 1. cikkben, illetve Fig. S4 a 2. cikkben).

A vizsgált betegséget-okozó szubsztitúciók különböző funkcionális régiókat érintettek a fehérjében: a G194C a NAD^+/NADH-kötő domént, a P453L az aktív helyet, a D444V, G426E, I445M, R460G és R447G pedig a dimerizációs felszínt (lásd 11. ábra, illetve Fig. 2. a 2. cikkben). Az általunk meghatározott szerkezetek felbontás értékei 1,44 és 2,34 Å között változtak. Amint azt már fentebb említettem, a mutáns szerkezeteket általában a nagyobb felbontású (részletgazdagabb) hLADH szerkezettel hasonlítottuk össze. Amint azt korábban az indirekt szerkezeti információk (CD, HDX-MS) is megmutatták, globális szerkezetváltozás egyik vizsgált patogén mutáns esetében sem jött létre (12. ábra, Fig. S2. az 1. cikkben, illetve Table 2. és Fig. S6 a 2. cikkben). A legnagyobb szerkezeti eltérést a P453L-hLADH mutáns esetében tapasztaltuk. Az aminosavcsere itt közvetlenül a katalitikus bázis (His452) mellett



12. ábra (Fig. 1. az 1. cikkben). A D444V-hLADH és hLADH (5NHG) szerkezetek összehasonlítása szerkezetillesztéssel. A mutáns szerkezet barna színű, míg a vad-típusú szerkezet (A és B láncok) kék színű (két színárnyalat jelzi mindkét fehérjében az összetartozó monomereket). A FAD piros pálcikamodellel van reprezentálva (a mutáció nem indukált változást a FAD szerkezetében).



13. ábra (Fig. 4. a 2. cikkben). A P453L-hLADH szerkezete. (A) A $2mF_o$-DF_c-típusú kihagyásos elektronsűrűségi térkép (1,5σ, Ala451-Thr454) megerősíti a Leu453 jelenlétét, illetve a His452-Leu453 peptidkötés *transz* orientációját (FAD: pirosaslila, A monomer: zöldeskék, B monomer: világoskék). **(B, C)** Az aktív hely környezete (B monomer) a P453L-hLADH (zöldeskék/világoskék, FAD: pirosaslila, H-híd: szaggatott szürke vonal) és a hLADH (6I4Q; bézs/szürke, FAD: bézs, H-híd: szaggatott sárga vonal) egymásra illesztett szerkezetei által van reprezentálva. **(D)** A Leu453, His452, Arg460 és Glu332′ aminosav-oldalláncok konformációs flexibilitását a P453L-hLADH nyolc egymásra illesztett monomere mutatja be.

jön létre. Megfigyelhető volt a mutánsban, hogy a His452-Leu453 peptidkötés *transz* orientációjú (13. ábra). Mivel a megfelelő His452-P453 peptidkötés a hLADH-ban *cis* orientációjú, ezért nem meglepő, hogy a katalitikus bázis pozíciója, illetve konformációja lényegesen eltér a két szerkezetben. Funkcionálisan lényegesnek tartott interakciók eliminálódtak a His452 szerkezeti perturbációja miatt: a His452 (C=O) − FAD′ (N[3]H) H-híd és a His452 − Glu457 sóhíd sem jött létre a mutánsban (Table S1 és S2 a 2. cikkben, illetve a FAD-atomok nomenklatúrájáért lásd a Fig. S5.-öt a 2. cikkben). Eltéréseket tapasztaltunk a hLADH-hoz képest a FAD izoalloxazin gyűrűjének környezetében is. A legmarkánsabb változás az volt, hogy az Arg393 oldallánca számottevő mértékben elmozdult a FAD′ és a Lys54′ irányába. Efelett, az LS-kötő zseb és a H^+/H_2O-csatorna is perturbálódott szerkezetileg, ami befolyásolhatja az aktív hely hozzáférhetőségét. Ez a patogén hLADH mutáns gyakorlatilag teljesen elveszítette a LADH aktivitását a korábbi eredmények szerint

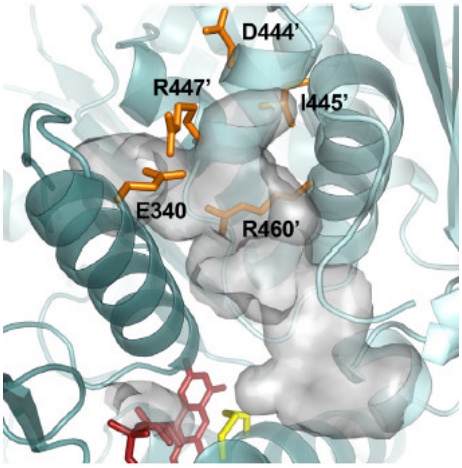
(lásd a 2011-es *Hum. Mol. Genet*. cikkünk összefoglalóját). Ez a fenti eredmények alapján nem meglepő, hiszen az aktív hely szerkezete számottevő mértékben perturbálódott ebben a variánsban. A felfedett szerkezeti változások modulálhatják a (DH)LS szubsztrát kötődését, illetve deprotonálódását (a His452 által). A fokozott ROS-képző kapacitás vélhetően a FAD-ot érintő szerkezeti változásoknak köszönhető. Ezek a szerkezetváltozások potenciálisan modulálhatják a FAD redox-potenciálját is. A fokozott ROS-képzés mechanizmusát ezen szerkezeti eredmények alapján a jövőben tovább fogjuk vizsgálni.

A G194C szubsztitúció kismértékű változást indukált csak a hLADH szerkezetében (Fig. 5. és S3. a 2. cikkben). A patogén aminosavcsere egy konzervált α-hélixben (Val188-Gly201) jön létre. Ez a hélix részt vesz a NAD^+/NADH-kötőhely (azon belül is a nikotinamid-kötőhely) kialakításában. Azt találtuk, hogy a patogén szubsztitúció nem indukált szerkezetváltozást a nikotinamid-kötő aminosavakban, csak a közvetlen környezetében levő aminosav oldalláncokban. Nem találtunk eltérést az aktív helyben, a FAD szerkezetében (vagy az azt stabilizáló interakciókban), illetve az LS-kötő csatornában sem a hLADH-hoz képest. A H^+/H_2O-csatornával kapcsolatban azt az egy megfigyelést tettük, hogy az Arg460 elveszítette a konformációs flexibilitását. Az indukált szerkezeti változások csekély mértéke – amely nem érintette a közeli kofaktor-kötő aminosavakat – jó összhangban van a megtartott enzimaktivitással. A fokozott ROS-képzés mechanizmusának felderítése további vizsgálatokat igényel.

A G426E patogén aminosavcsere a dimerizációs felszínt érinti, a nikotinamid-kötőhelyhez relative közel (Fig. 9. és S3. a 2. cikkben). A Glu426 a patogén mutánsban két másik glutamát (Glu427, Glu363) közé ékelődik be. A vad-típusú szerkezetben jelenlévő Glu363-Arg393′, illetve Glu427-Arg393′ sóhidak sztérikus okokból nem tudtak létrejönni a mutáns szerkezetben, helyettük itt egy Glu426-Arg393′ kölcsönhatás volt észlelhető. A mutáció által közvetlenül érintett térrészben a Glu426 jelenléte számottevő mértékű töltéseloszlás-változást, illetve konformációs dinamikát is indukált: a Glu363, illetve Glu426 oldalláncok alternatív konformációkat vettek fel, amelyek (sztérikus okokból) egymással „kapcsoltak” voltak. Habár a NAD^+/NADH-kötőhely közelében jöttek létre a fenti szerkezeti változások, a hLADH-hoz viszonyítva nem mutattak szerkezeti perturbációt a kofaktor-kötő aminosavak. A G194C-hLADH-hoz hasonlóan, itt sem találtunk számottevő eltérést az aktív helyben, az LS-kötő zsebben, illetve a FAD-interakciókban a hLADH-hoz képest. A H^+/H_2O-csatorna tekintetében mindössze elhanyagolható szerkezeti eltéréseket találtunk. A mutáns LADH aktivitása a *reverz* katalitikus irányban csökkent, míg a *forward* katalitikus irányban

kismértékben emelkedett. Ezen mutáns esetében a molekuláris patomechanizmust még tovább szükséges vizsgálnunk.

Az R460G, D444V és R447G betegséget-okozó szubsztitúciók hatására elsődleges effektusként megszünt egy-egy intermonomer interakció (rendre Fig. 6. a 2. cikkben, Fig. 2. az 1. cikkben, illetve Fig. 7. a 2. cikkben). Az I445M patogén szubsztitúció a dimerizációs felszín hidrofób aminosavakban gazdag területét érintette (Fig. 8. a 2. cikkben). A kristályszerkezetek megmutatták, hogy az aktív centrumhoz vezető H^+/H_2O-csatorna környezetében lokalizálódik mind a négy aminosavcsere (illetve az E340K szubsztitúció is, lásd 11. és 14. ábrák).



14. ábra (Fig. 5. az 1. cikkben). Patogén szubsztitúciós helyek a H^+/H_2O-csatorna környezetében. A hLADH H^+/H_2O-csatornájának belső felszíne van megjelenítve (PDB ID: 5NHG, A-B dimer). A FAD és a redox-aktív Cys45-Cys50-pár rendre piros és sárga színű (pálcikamodell).

A részletes analízis azt is megmutatta, hogy az egyes patogén szubsztitúciók különböző mértékben modulálják a H^+/H_2O-csatorna fizikai tulajdonságait (polaritását és/vagy geometriáját). Az R460 és R447 aminosavak a hLADH-ban fiziológiás pH-n töltéssel rendelkeznek és a H^+/H_2O-csatorna integritásában kulcsszerepet játszanak. Ezen aminosavak szubsztitúciója a H^+/H_2O-csatorna lokális tágulását, illetve megnövekedett negatív polaritását okozta. Az I445M-, D444V- és R460G-hLADH mutánsokban az Arg460 és Glu332 oldalláncok − a hLADH-tól eltérően − nem mutattak konformációs flexibilitást: a D444V-hLADH mutánsban az Arg460′[A] és Glu332[B], az I445M-hLADH mutánsban pedig az Arg460′ [B] és Glu332[A] konformerek voltak jelen. Az R460G-hLADH mutánsban − az Arg oldallánc hiánya mellett − mindössze a Glu332[A] konformer volt megfigyelhető. Az R447G-, D444V- és R460G-hLADH mutánsok esetében efelett − egy-egy stabilizáló sóhíd eliminálódása révén − a H^+/H_2O-csatornát határoló Leu327′-Gly344′ α-hélix C-terminális szakaszának kismértékű elmozdulása is megfigyelhető volt (a D444V-hLADH tekintetében

lásd még: Fig. 3., S3. és S4. az 1. cikkben). Az I445M-, R460G-, R447G- és D444V-hLADH mutánsokban sem az aktív hely geometriájában, sem pedig a NAD^+/NADH- vagy FAD-kötő aminosavak konformációjában nem találtunk számottevő mértékű eltérést a hLADH-hoz képest. A fenti négy patogén szubsztitúció közös jellemzője, hogy mindegyikük igen számottevő LADH-aktivitás-csökkenéssel jár együtt (kivétel az I445M-hLADH *forward* katalitikus irányú LADH-aktivitása). Ezt a kristályszerkezetek alapján a H^+/H_2O-csatorna szerkezeti perturbációja okozhatja. A megszűnt interakciókból, illetve az aminosavcserék lokalizációjából következően további − α-hélixek dipólus-momentumai által közvetített, illetve megváltozott dinamikából eredő −hatások is feltételezhetőek, amelyek potenciálisan modulálhatják a His452 katalitikus bázis pK értékét, illetve a FAD prosztetikus-csoport redox-potenciálját.

Ez a munka Dr. Szabó Eszter Ph.D. projektje volt elsősorban, bár sok más kolléga is hozzájárult az eredményekhez. A projekt kezdeti szakaszában a Jelölt állította elő és kristályosította a fehérjéket (a korai, pittsburgh-i kollaboráció idején). Később a saját laborunkban a rengeteg kristályosítási próba kivitelezésében és az ehhez szükséges fehérjetisztításokban Dr. Szabó Eszter Ph.D. hallgató mellett részt vett még Mizsei Réka, Zámbó Zsófia, Dr. Nagy Bálint (mind Ph.D. hallgatók), Dr. Hubert Ágnes poszt-dok és Bui Dávid TDK hallgató. A többi társszerző a cikkekben a külföldi együttműködő laborokban dolgozik. Ők mind a projekt különböző szakaszaiban segítették (több szinten) ezt a nem kevés kihívással terhelt kutatási feladatot. A Jelölt a munka irányítása mellett részt vett az eredmények analízisében és a cikkek megírásában, illetve meghatározott egy kristályszerkezetet is (PDB ID: 6HG8, R460G-hLADH; a cikkben egy ennél nagyobb felbontású szerkezet szerepel).

A hKGDHk, valamint E2 komponensének krio-EM- és MS-alapú szerkezetmeghatározása

(Nagy B, Polak M, Ozohanics O, Zambo Z, Szabo E, Hubert A, Jordan F, Novacek J, Adam-Vizi V, Attila 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(6): 129889 (2021))

Ezen munka fő célja a hKGDHk E2 alegységének/komponensének (dihidrolipoamid-szukciniltranszferáz, hE2k, mechanizmus: Scheme S1. [cikkben]) szerkezetmeghatározása volt. A 2,9 Å felbontású krio-EM adatokat MS eredményekkel is kiegészítettük, így lehetőség nyílt nem csak a krio-EM-mel fel nem deríthető hE2k részek, de a teljes hKGDHk (topológia-szintű) szerkezetanalízisére is.

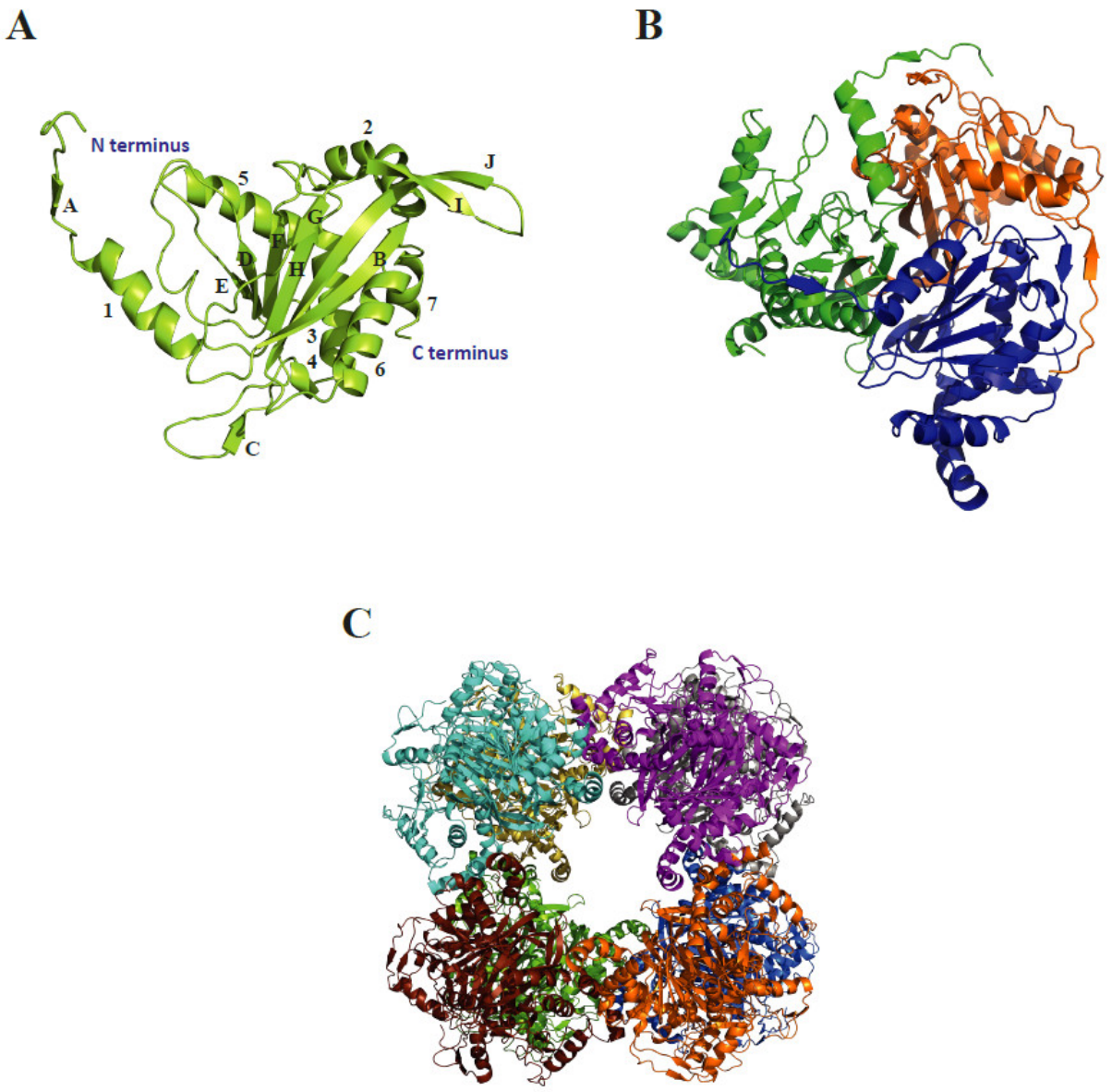
A vizsgálatokhoz felhasznált fehérjemintákat a korábban már kidolgozott expressziós és tisztítási protokoll [188] aktualizált és az adott fehérjére optimalizált változatával hoztuk létre. A fehérje ebben az esetben egy N-terminális dupla Strep-tag (Twin-Strep-tag) affinitás címkét tartalmazott (ezzel mégnagyobb hozamot sikerült elérnünk). A minták minőségét LDS-PAGE-val (Fig. S1A [cikkben]), illetve MS-sel igazoltuk.

A mérésekhez elengedhetetlen elővizsgálatokat (negative-stain EM, Fig. S1B. [cikkben]) Magyarországon, míg a főkísérleteket (krio-EM, Fig. 1., 2., S2, illetve Table 1. [cikkben]) nemzetközi együttműködésben valósítottuk meg (Magyarországon nincs még jelenleg krio-EM készülék). A krio-EM felvételek a Közép-európai Technológia Intézetben (a brnói Central European Institute of Technology-ban), míg az MS adatok a Rutgers Egyetemen készültek, a laborunk munkatársainak közreműködésével.

A hE2k alegység ilyen magasszintű felbontását a rendkívül nagy partikulumszám biztosította. A denzitásba való szekvenciabeillesztés feltétele a megfelelő mértékű rigiditás, melynek az enzim N-terminális vége azonban nem felelt meg. Emellett is komoly eredmény volt a 236 aminosavat magába foglaló magdomén és egy rövid kötőszakasz atomi pozícióinak meghatározása (Fig. S3. [cikkben]). A monomer szerkezet mind másodlagos szerkezeti elemeiben, mind pedig globálisan nagyfokú hasonlóságot mutatott a más fajokból származó E2 alegységekkel (pl. ecE2k), illetve a hPDHk-ban található megfelelő alternatívával (hE2p; Fig. S4. [cikkben]). A monomer alegységek szerkezetén túl leírtuk az identikus alegységekből felépülő trimereket és a teljes 24-mert is (lásd 15. ábra).

Az atomi-szintű kapcsolatok felderítése érdekében a szerkezeteket mélyreható analízisnek vetettük alá. Ennek során azonosítottuk a magasabb rendű multimerek kialakulásában kulcsszerepet játszó aminosavakat (Fig. 4. és 5., illetve Table S3. és S4. [cikkben]). Figyelemre méltó tény, hogy míg az E2 trimerek a hKGDHk esetén kocka alakot

(8 trimer), addig a hPDHk esetén pentagonális dodekaédert (20 timer) képeznek. Célunk volt ezen magasabb rendű struktúrák kialakulásának okát is felderíteni. Megállapítottuk, hogy a hKGDHk esetén a kocka alak kialakulásának oka a nagyobb belső stabilitás kell legyen, melyet adatokkal is alátámasztottunk (Table S5. [cikkben]).



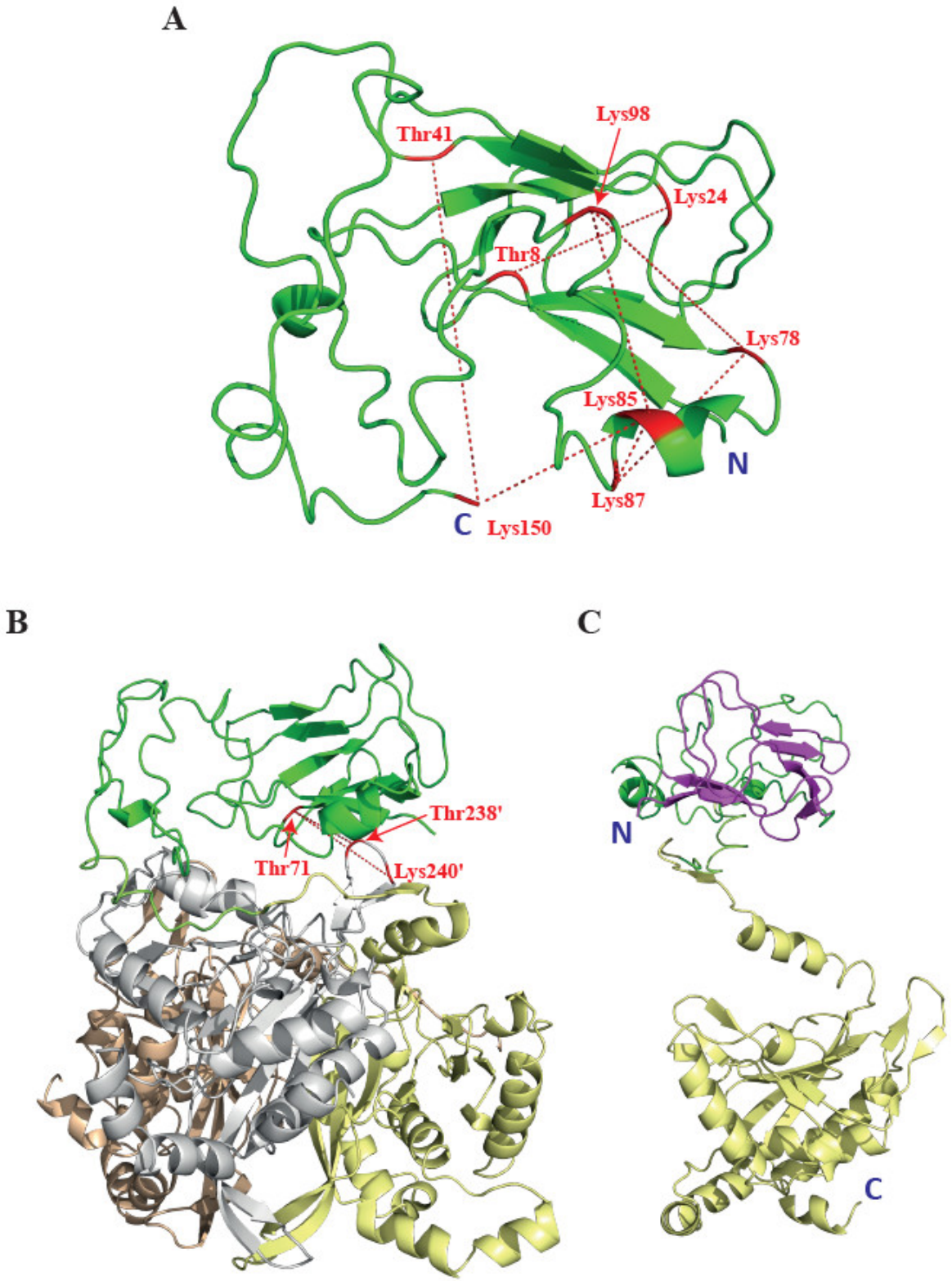
15. ábra (Fig. 3. [cikkben]) A hKGDHk E2 alegységének monomer és multimer szerkezetei. A. A 2,9 Å felbontású térkép megadta a 386 aminosavat felölelő szekvencia 236 aminosavának pozícióját. Az N-termánálistól C-terminálisig jelölt szekvencián belül betűkkel (β-redők) és számokkal (α-hélixek) láthatóak a másodlagos szerkezeti elemek (lásd még: Table S2. [cikkben]). B-C. A monomerekből felépülő magasabb rendű (trimer, illetve 24-mer) szerkezetek. Az alkotó monomerek eltérő színnel vannak jelölve. További részletekért lásd az ábraaláírást a cikkben.

Az analízis lehetőséget teremtett az enzimaktivitás (Scheme S1. [cikkben]) szempontjából legfontosabb aminosavak, illetve szekvenciaszakaszok azonosítására is. Az

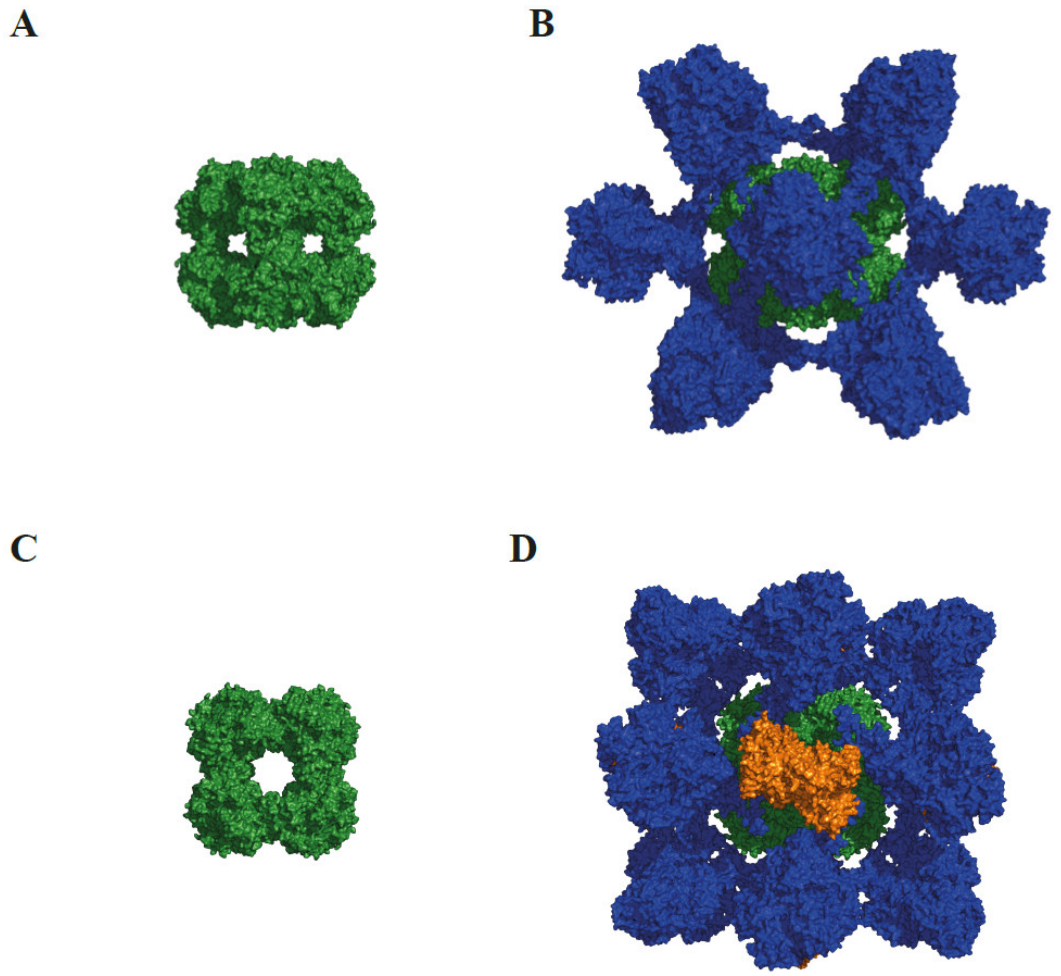
aktív centrum nagyfokú egyezőséget mutatott az E2 fehérjék megfelelő szakaszaival (Fig. 6. [cikkben]) [189]. A további nagyjelentőségű aminosavak azonosításán túl leírtuk a katalitikus aktivitáshoz elengedhetetlen csatornahálózatot, illetve kötőfelszíneket is (Fig. 6. [cikkben]). Ezek szerepét töltéseloszlásuk is megerősítette (Fig. 7. és 8. [cikkben]). Az *Azotobacter vinelandii* E2p (avE2p) alegységből – annak kristályszerkezeti adataiból [190] – kiindulva (Fig. S5. [cikkben]) a szubsztrátok (KoA és szukcinil-lipoát) helyzetét és kötési módjait is modelleztük (Fig. 6. [cikkben]).

Ugyanezen módszert (molekulamodellezés) használtuk fel az MS-sel nyert adatok értelemezéséhez is. A kétféle kémiai keresztkötő ágens segítségével kimért távolságadatokból kiindulva (Table S1. [cikkben]) modelleztük a krio-EM számára láthatatlan N-terminális régió szerkezetét (lásd 16. ábra). Az avE2k megfelelő szegmensén [191] alapuló szerkezet magyarázatot adott a fehérjeszakasz működésére. Eszerint a 150 aminosavnyi szekvencia első fele felelős az N-terminális enzimatikus, lipoil-domén funkciójáért, míg a második nagy flexibilitású rész az előbbi pozícióba helyezéséért.

Hosszú ideje vizsgálat tárgya az α-ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexeket alkotó alegységek belső aránya, illetve a teljes komplexek szerkezeti topológiája (Table S6. [cikkben]). A kérdés megválaszolásának legkézenfekvőbb módját az alkotóegységek mindegyikét tartalmazó minták (krio-EM) adatfelvétele jelentené. Erre magunk is kísérletet tettünk, ám az E1 és E2 alegységek összekapcsolódását jelző negatív festéses képeket (Fig. S10. [cikkben]) leszámítva (egyelőre) nem jártunk sikerrel. Ennek egyik oka az E3 alegység komplexhez való gyengébb kapcsolódása lehet (lásd fent). Korábbi − együttműködésben publikált MS − adatainkra támaszkodva [192], ismervén az alegységek közötti kapcsolatokat biztosító fehérjerészeket (Fig. S7. és S9. [cikkben]), megalkottuk a hKGDHk legvalószínűbb szerkezeti topológiáját. A 17. ábrán látható szerkezeti topológia az E1 és E2 alegységek tekintetében jó egyezést mutat a korábban készített negatív festéses képünkkel. Feltételezésünk szerint a komplex felépülése az alábbi sorrendben mehet végbe. Első lépésben az alegységek magasabb rendű szerkezetbe való rendeződése következhet be (E1, E3: dimerképzések, E2: trimer, majd ezekből 24-mer képzés), melyet az E1 és E2 alegységek összekapcsolódása után az E3-dimerek asszociációja tehet teljessé. Az ábrázolt arány (E1:E2:E3=24.24:12) megfelel korábbi enzimaktivitáson alapuló javaslatunknak [193].



16. ábra (Fig. S6 [cikkben]) A hE2k fehérje N-terminális régiója. A. Az avE2k ismert szerkezetén alapuló modell. A keresztkötések kialakításában résztvevő aminosavakat és a köztük kialakuló kapcsolatokat piros színnel jelöltük. A fehérjerészlet N- és C-terminálisai a megfelelő betűkkel vannak jelölve. B. Az N-terminális szakasz kapcsolata a trimer szomszédos magdoménjével. Az N-terminális és a szomszédos magdomén között kialakuló keresztkötések és az ezekben résztvevő aminosavak piros színnel vannak jelölve. C. Az N-terminális szakasz nagyobb (belső) stabilitással bíró szekvenciaszakasza. A nagyobb (belső) stabilitású rész (1-78. aminosavak) lila színnel van jelölve. További részletekért lásd az ábraaláírást a cikkben.



17. ábra (Fig. S8 [cikkben]) A hKGDHk valószínűsített szerkezeti topológiája. Az alábrákon a fehérjék felszínei láthatóak. A., C. A kockaszerkezetet (8x3-as szimmetriát) mutató hE2k 24-mer két orientációban. B. Az E1 (kék) és E2 (zöld) alegységekből létrejövő komplex (h(E1k-E2k) alkomplex). D. A teljes hKGDHk szerkezeti topológiája (E3: narancssárga). Lásd még: Fig. 9. [cikkben]. További részletekért lásd az ábraaláírást a cikkben.

A fehérjeexpressziós és tisztítási protokollt Dr. Nagy Bálint (Ph.D. hallgató) optimalizálta. A különböző típusú adatfelvételekben Dr. Hubert Ágnes (poszt-dok), Zámbó Zsófia (Ph.D. hallgató), illetve Dr. Ozohanics Olivér (poszt-dok) vettek részt a laborunk részéről. A nyers experimentális adatok feldolgozását Dr. Nagy Bálint, Dr. Ozohanics Olivér és Martin Polak (Ph.D. hallgató Brno-ban) végezte. A nyert szerkezeti adatok analízisét, illetve értelmezését Dr. Nagy Bálint, Dr. Ozohanics Olivér és a Jelölt közösen végezték. A Jelölt a projekt irányítása mellett a cikk megírásában is részt vett.

Számos biofizikai és biokémiai módszert alkalmazva, mi jellemeztük eddig a legnagyobb részletességgel az irodalomban a betegséget-okozó hLADH mutánsokat és a hKGDHk molekulát. Az első (majd a második és eddig utolsó) összefoglaló közleményt is mi írtuk a betegséget-okozó hLADH mutánsok témájában. A laboratórium együttműködésben indította el az első farmakológiai projektet a hLADH-elégtelenség potenciális jövőbeli terápiája tekintetében. A projektben együttműködő partnerek a Cyclica, Inc. (Toronto, ON, Kanada; együttműködési szerződés), a Lev Therapeutics (Westport, CT, USA), a University of Iowa (Iowa City, IA, USA) és a Children's Hospital of Philadelphia (Philadelphia, PA, USA; együttműködési szerződés).

A disszertációhoz kapcsolódó új tudományos eredmények összefoglalása

1. Az exogén liponsav acidózisban gátolja a KGDHk és a LADH *reverz* katalitikus irányú ROS képzését. Ez a megfigyelés specifikus ROS-képzés inhibítorok jövőbeli fejlesztésének lehet majd az alapja.

2. Mind a 14 betegséget-okozó hLADH variánst előállítottuk rekombináns módon nagytisztaságú formában, illetve mindet jellemeztük is *forward* és *reverz* katalitikus irányú enzimaktivitás és *reverz* katalitikus irányú ROS-képző kapacitás szempontjából. Számos variánst további biofizikai és biokémiai módszerekkel is megvizsgáltunk. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy a hLADH négy betegséget-okozó mutációja szignifikánsan fokozta a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzést és annak pH-érzékenységét. Ez a jelenség részét képezheti a vonatkozó molekuláris patomechanizmusoknak, illetve a többnyire igen súlyos klinikai tüneteknek.

3. A *forward* katalitikus irányú ROS-termelő képesség tekintetében a hKGDHk E1 komponense, illetve E1-E2 alkomplexe összemérhető a teljes hKGDHk-el. Ezen jelenségeknek E2- illetve E3-elégtelenségben patológiás relevanciája lehet. Azon patogén hLADH mutánsok esetében, ahol csökken a mutáns kötődési affinitása a multienzim komplexekhez, a hKGDHk-E1-E2 alkomplex általi *forward* katalitikus irányú ROS-képzés szignifikánsan hozzájárulhat a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokhoz és a klinikai tünetekhez.

4. Krio-EM, CL-MS és molekulamodellezés technikák együttes alkalmazásával meghatároztuk a hKGDHk E2 komponensének szerkezetét. A hKGDHk ezen komponensére vonatkozóan eddig egyáltalán nem volt szerkezeti információ az irodalomban. Utóbbiból kifolyólag, a szerkezetet igen részletesen jellemeztük is.

5. Meghatároztuk a hKGDHk alegység-sztöchiometriáját, amely 24:24:12-nek adódott. Ezt az eredményt, valamint a fenti (krio-EM, CL-MS és molekulamodellezési) és kollaborációban mért HDX-MS szerkezeti adatokat is felhasználva – először az irodalomban – javaslatot tettünk a teljes multienzim komplex szerkezeti topológiájára. Tekintve, hogy a hKGDHk egy citrát-köri enzim, illetve az egyik legfontosabb – ha nem a legfontosabb – eleme a

mitokondriális ROS-képzésnek, az eredmény (a 4. ponttal együtt) kiemelt jelentőséggel bír, többek között potenciális jövőbeli farmakológiás reguláció tekintetében is.

6. Tíz betegséget-okozó hLADH variánsra vonatkozóan meghatároztuk a peptid-szintű molekulaszerkezeti/dinamikai változásokat oldatban, 25 ^{o}C-on, HDX-MS technikával és javaslatot tettünk a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra. Ezen experimentális adatok jól kiegészítik a későbbi krisztallográfiai adatokat, amelyek esetén – a kriogén vizsgálati hőmérséklet, illetve a kristálypakolódás miatt – bizonyos szerkezeti mozgások és eltérések potenciálisan másként is modulálódhattak, mint fiziológiásan releváns(abb) körülmények között.

7. Hét betegséget-okozó hLADH variánsnak meghatároztuk a nagyfelbontású kristályszerkezetét, illetve – a fenti HDX-MS adatokat is figyelembe véve – a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra is javaslatot tettünk. Meghatároztuk a hLADH eddigi legnagyobb felbontású kristályszerkezetét is. A hLADH katalitikus mechanizmusa, illetve bizonyos betegséget-okozó hLADH variánsok molekuláris patomechanizmusai tekintetében fényt derítettünk egy ezidáig kevéssé vizsgált ún. H^+/H_2O-csatorna szerepére. A szerkezeti adatok megteremtik az esetleges jövőbeli farmakológiás reguláció alapját.

Köszönetnyilvánítás

Szakmai életem során számos kiváló tanárral és kutatóval volt szerencsém találkozni illetve együtt dolgozni. Mindenekelőtt, a debreceni Erdey-Grúz Tibor Vegyipari Technikum elkötelezett és kiválóan felkészült tanárainak mondok köszönetet. Külön szeretném kiemelni Dr. Ling Jolán† versenyfelkészítő tanárnőmet, aki igen sokat adott nekem szakmailag és nagy hatással volt rám. Ezután számos kiváló tanárral és kutatóval volt lehetőségem megismerkedni a Kossuth Lajos Tudományegyetemen (Debrecen) vegyész-szakos hallgatóként is, de a legnagyobb hatással Beck Mihály†, Bányai István, Köver Katalin and Batta Gyula professzorok voltak rám, akiknek ezúton is köszönöm mindazt, amit kaptam tőlük. Külön köszönet illeti Fésüs László professzort – Ph.D. témavezetőmet – a Debreceni Egyetemen a sok támogatásért és lehetőségért. Jacquelyn Gervay-Hague, Danzhou Yang, William Montfort and Laurence Hurley professzorok szintén köszönetet érdemelnek, amiért poszt-doktorként kiváló szakmai tapasztalatokban részesültem általuk az Arizonai Egyemen. Nem lehetnék hálásabb Ádám Veronika professzor asszonynak, aki a Semmelweis Egyetemen felépített számomra egy laboratóriumot az USA-ból való hazatérésem után és minden elképzelhető módon támogatott az utóbbi 15 évben. Sosem fogom elfelejteni és hálás vagyok az együtt töltött órákért a laborban, a javaslatokért, a támogatásért és a szakmai illetve személyes beszélgetésekért Tretter László professzornak szintén a Semmelweis Egyetemen. Sok köszönet illeti még Dr. Manfred S. Weiss-t, Dr. Piotr Wilk-et (Helmholtz-Zentrum Berlin) és William Furey professzort (University of Pittsburgh) is, a krisztallográfiában nyújtott támogatásukért. Külön kiemelném Dr. Manfred S. Weiss-t, akinél volt szerencsém már doktoranduszként is egy hónapot eltölteni és aki akkor egy életre elegendő motivációval látott el a makromolekuláris szerkezetvizsgálat szépségei tekintetében. Frank Jordan professzor - együttműködő partnerünk a Rutgers Egyetem-ről – amióta ismerem követendő példa számomra és hálás vagyok minden támogatásáért, amit az évek során adott nekem és a laboratóriumnak. Szerencsés vagyok, hogy olyan kiváló hallgatókkal dolgozhattam együtt az évek során mint Mizsei Réka, Zámbó Zsófia, Szabó Eszter, Nemes-Nikodém Éva, Vass Krisztina, Mattias Nilsson, Ozohanics Olivér és Nagy Bálint, akiknek köszönöm a lelkiismeretes munkát és azt, hogy minden nap jó volt bemenni Hozzájuk a laborba. Végül, de egyáltalán nem utolsó sorban, köszönöm édesanyámnak és feleségemnek Évának a sok szeretetet, motivációt, támogatást és türelmet – nélkülük ez fentebb mind bizonyosan nem jöhetett volna létre.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények listája

1. Ambrus A[#], Tretter L[#], Adam-Vizi V, Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, *J. Neurochem.* 109(S1): 222-229 (2009) ([#]=megosztott első szerzők)

2. Ambrus A, Torocsik B, Tretter L, Ozohanics O, Adam-Vizi V, Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase, *Hum. Mol. Genet*. 20(15): 2984-2995 (2011)

3. Ambrus A, Nemeria NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V, Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components, *Free Radic. Biol. Med.* 89: 642-650 (2015)

4. Ambrus A[#], Wang J[#], Mizsei R[#], Zambo Z, Torocsik B, Jordan F, Adam-Vizi V, 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: 2098-2109 (2016) ([#]=megosztott első szerzők)

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

6. 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, Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants, *Hum. Mol. Genet*. 28(20): 3339-3354 (2019)

7. Nagy B, Polak M, Ozohanics O, Zambo Z, Szabo E, Hubert A, Jordan F, Novaček J, Adam-Vizi V, Ambrus A, 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, *BBA – Gen. Subj*. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129889 (2021)

Irodalomjegyzék

[1] S.C. Quinonez, J.G. Thoene, Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency, in: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya (Eds.) GeneReviews® 1993-2020, University of Washington, Seattle (WA), 2014, pp. 1-37.
[2] 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.
[3] 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.
[4] S.A. Scott, L. Edelmann, L. Liu, M.J. Luo, R.J. Desnick, R. Kornreich, Experience with Carrier Screening and Prenatal Diagnosis for 16 Ashkenazi Jewish Genetic Diseases, Hum. Mutat., 31 (2010) 1240-1250.
[5] 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.
[6] 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.
[7] J.M. Cameron, V. Levandovskiy, N. MacKay, J. Raiman, D.L. Renaud, J.T.R. 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, 140A (2006) 1542-1552.
[8] 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.
[9] 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, J. Inherit. Metab. Dis., 33 (2010) S315-S319.
[10] M.H. Odievre, D. Chretien, A. Munnich, B.H. Robinson, R. Dumoulin, S. Masmoudi, N. Kadhom, A. Rötig, 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.
[11] 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, J. Inherit. Metab. Dis., 26 (2003) 816-818.
[12] 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, Eur. J. Pediatr., 162 (2003) 714-718.
[13] L. Cerna, L. Wenchich, H. Hansiková, S. Kmoch, K. Peskova, P. Chrastina, J. Brynda, J. Zeman, Novel mutations in a boy with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency, Med. Sci. Monitor, 7 (2001) 1319-1325.
[14] 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, Biochem. Biophys. Res. Commun., 262 (1999) 163-166.
[15] 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-Mol. Basis Dis., 1362 (1997) 160-168.
[16] Y.S. Hong, D.S. Kerr, W.J. Craigen, J. Tan, Y.Z. 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.
[17] 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. USA, 90 (1993) 5186-5190.
[18] K.F. Sheu, J.P. Blass, The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, in: Oxidative/Energy Metabolism in Neurodegenerative Disorders, vol. 893, New York Acad Sciences, New York, 1999, pp. 61-78.
[19] 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.
[20] R.G. Hansford, Control of mitochondrial substrate oxidation, Curr. Top. Bioenerg., 10 (1980) 217-278.
[21] J.C.K. Lai, J.M. Walsh, S.C. Dennis, J.B. Clark, Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain isolation and characterization, J. Neurochem., 28 (1977) 625-631.
[22] L.J. Reed, Multienzyme complexes, Acc. Chem. Res., 7 (1974) 40-46.

[23] V. Massey, The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex, Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 447-460.
[24] B. Nagy, M. Polak, O. Ozohanics, Z. Zambo, E. Szabo, A. Hubert, F. Jordan, J. Novaček, 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.
[25] R.A. Harris, J.W. Hawes, K.M. Popov, Y. Zhao, Y. Shimomura, J. Sato, J. Jaskiewicz, T.D. Hurley, Studies on the regulation of the mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase complexes and their kinases, Adv Enzyme Regul, 37 (1997) 271-293.
[26] L.J. Reed, Z. Damuni, M.L. Merryfield, Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation, Curr Top Cell Regul, 27 (1985) 41-49.
[27] 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.
[28] N.S. Nemeria, G. Gerfen, L.Y. Yang, X. Zhang, F. Jordan, Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan degradation pathways from studies in vitro, Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg., 1859 (2018) 932-939.
[29] N.S. Nemeria, G. Gerfen, P.R. Nareddy, L.Y. 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.
[30] 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.
[31] R. Vatrinet, G. Leone, M. De Luise, G. Girolimetti, M. Vidone, G. Gasparre, A.M. Porcelli, The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in cancer metabolic plasticity, Cancer Metab, 5 (2017) 3.
[32] Y. Wang, Y.R. Guo, K. Liu, Z. Yin, R. Liu, Y. Xia, L. Tan, P. Yang, J.H. Lee, X.J. Li, D. Hawke, Y. Zheng, X. Qian, J. Lyu, J. He, D. Xing, Y.J. Tao, Z. Lu, KAT2A coupled with the alpha-KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase, Nature, 552 (2017) 273-277.
[33] 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.
[34] C.A. Brautigam, R.M. Wynn, J.L. Chuang, M. Machius, D.R. Tomchick, D.T. Chuang, Structural insight into interactions between dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) and E3 binding protein of human pyruvate dehydrogenase complex, Structure, 14 (2006) 611-621.
[35] Y.-H. Park, M.S. Patel, Characterization of interactions of dihydrolipoamide dehydrogenase with its binding protein in the human pyruvate dehydrogenase complex, Biochem. Biophys. Res. Commun., 395 (2010) 416-419.
[36] M.S. Patel, L.G. Korotchkina, S. Sidhu, Interaction of E1 and E3 components with the core proteins of the human pyruvate dehydrogenase complex, J. Mol. Catal. B-Enzym., 61 (2009) 2-6.
[37] E.M. Ciszak, A. Makal, Y.S. Hong, A.K. Vettaikkorumakankauv, L.G. Korotchkina, M.S. Patel, How dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein binds dihydrolipoamide dehydrogenase in the human pyruvate dehydrogenase complex, J. Biol. Chem., 281 (2006) 648-655.
[38] 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.
[39] F. Tort, X. Ferrer-Cortes, A. Ribes, Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects, J. Inherit. Metab. Dis., 39 (2016) 781-793.
[40] 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.
[41] N.E. Babady, Y.P. Pang, O. Elpeleg, G. Isaya, Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (2007) 6158-6163.
[42] N.L. Klyachko, V.A. Shchedrina, A.V. Efimov, S.V. Kazakov, I.G. Gazaryan, B.S. Kristal, A.M. Brown, pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state - Response to mitochondrial matrix acidification, J. Biol. Chem., 280 (2005) 16106-16114.
[43] 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.

[44] J.F. Kalse, C. Veeger, Relation between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. I. Relation between diaphorase and lipoamide dehydrogenase activities upon binding of FAD by the apoenzyme, Biochim. Biophys. Acta, 159 (1968) 244-256.
[45] V. Massey, The identity of diaphorase and lipoyl dehydrogenase, Biochim. Biophys. Acta, 37 (1960) 314-322.
[46] F.B. Straub, Isolation and properties of a flavoprotein from heart muscle tissue, Biochem J, 33 (1939) 787-792.
[47] H.S. Corran, D.E. Green, F.B. Straub, On the catalytic function of heart flavoprotein, Biochem J, 33 (1939) 793-801.
[48] S. Ide, T. Hayakawa, K. Okabe, M. Koike, Lipoamide dehydrogenase from human liver, J. Biol. Chem., 242 (1967) 54-&.
[49] Y. Bando, K. Aki, Mechanisms of generation of oxygen radicals and reductive mobilization of ferritin iron by lipoamide dehydrogenase, J. Biochem., 109 (1991) 450-454.
[50] E. Szabó, A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz patogén mutánsainak szerkezetanalízise (Ph.D. értekezés), in, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2020.
[51] 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.
[52] B.H.J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, A.B. Ross, Reactivity of HO2/O2$^-$ radicals in aqueous-solution, Journal of Physical and Chemical Reference Data, 14 (1985) 1041-1100.
[53] I. Fridovich, Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 44 (1975) 147-159.
[54] D. Behar, G. Czapski, J. Rabani, L.M. Dorfman, H.A. Schwarz, Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical, J. Phys. Chem., 74 (1970) 3209-3213.
[55] 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, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36 (1969) 891-897.
[56] A.M. Brown, B.S. Kristal, M.S. Effron, A.I. Shestopalov, P.A. Ullucci, K.F.R. Sheu, J.P. Blass, A.J.L. Cooper, Zn2+ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, J. Biol. Chem., 275 (2000) 13441-13447.
[57] I.G. Gazaryan, V.A. Shchedrina, N.L. Klyachko, A.A. Zakhariants, S.V. Kazakov, A.M. Brown, Zinc Switch in Pig Heart Lipoamide Dehydrogenase: Steady-State and Transient Kinetic Studies of the Diaphorase Reaction, Biochemistry (Mosc), 85 (2020) 908-919.
[58] Z.H. Jiang, Q.Y. Chen, T.J. Harrison, G.J. Li, X.Y. Wang, H. Li, L.P. Hu, K.W. Li, Q.L. Yang, C. Tan, Z.L. Fang, Hepatitis B Virus Core Promoter Double Mutations (A1762T, G1764A) Are Associated with Lower Levels of Serum Dihydrolipoyl Dehydrogenase, Intervirology, 59 (2016) 1-7.
[59] L.J. Yan, N. Thangthaeng, N. Sumien, M.J. Forster, Serum Dihydrolipoamide Dehydrogenase Is a Labile Enzyme, J Biochem Pharmacol Res, 1 (2013) 30-42.
[60] A. Constantinescu, U. Pick, G.J. Handelman, N. Haramaki, D. Han, M. Podda, H.J. Tritschler, L. Packer, Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes, Biochem. Pharmacol., 50 (1995) 253-261.
[61] L.J. Reed, M.L. Hackert, Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases, J. Biol. Chem., 265 (1990) 8971-8974.
[62] L.J. Reed, R.M. Oliver, The multienzyme alpha-keto acid dehydrogenase complexes, Brookhaven Symp. Biol., 21 (1968) 397-412.
[63] W.S. Kunz, F.N. Gellerich, Quantification of the content of fluorescent flavoproteins in mitochondria from liver, kidney cortex, skeletal muscle, and brain, Biochemical Medicine and Metabolic Biology, 50 (1993) 103-110.
[64] 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.
[65] 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.
[66] 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. USA, 75 (1978) 4881-4885.
[67] A. Dayan, G. Fleminger, O. Ashur-Fabian, Targeting the Achilles' heel of cancer cells via integrin-mediated delivery of ROS-generating dihydrolipoamide dehydrogenase, Oncogene, (2019) In Press.
[68] C.S. Tsai, D.M. Templeton, A.J. Wand, Multifunctionality of lipoamide dehydrogenase: Activities of chemically trapped monomeric and dimeric enzymes, Arch. Biochem. Biophys., 206 (1981) 77-86.
[69] J. Visser, C. Veeger, Relations between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. 3. Protein association-dissociation and the influence on catalytic properties, Biochim. Biophys. Acta, 159 (1968) 265-275.

[70] L. Sahlman, C.H. Williams, Titration studies on the active sites of pig heart lipoamide dehydrogenase and yeast glutathione reductase as monitored by the charge transfer absorbance, J. Biol. Chem., 264 (1989) 8033-8038.
[71] V. Massey, Q.H. Gibson, C. Veeger, Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase), Biochem. J., 77 (1960) 341-351.
[72] T. Hallstrom, M. Uhde, B. Singh, C. Skerka, K. Riesbeck, P.F. Zipfel, Pseudomonas aeruginosa Uses Dihydrolipoamide Dehydrogenase (Lpd) to Bind to the Human Terminal Pathway Regulators Vitronectin and Clusterin to Inhibit Terminal Pathway Complement Attack, PLoS One, 10 (2015).
[73] T.K. Tyagi, P. Ponnan, P. Singh, S. Bansal, A. Batra, F. Collin, F. Guillonneau, D. Jore, S.A. Patkar, R.K. Saxena, V.S. Parmar, R.C. Rastogi, H.G. Raj, Moonlighting protein in Starkeyomyces koorchalomoides: Characterization of dihydrolipoamide dehydrogenase as a protein acetyltransferase utilizing acetoxycoumarin as the acetyl group donor, Biochimie, 91 (2009) 868-875.
[74] E. Pankotai, Z. Lacza, M. Muranyi, C. Szabo, Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosyl)ation: Potential role for alpha-ketoglutarate dehydrogenase, Mitochondrion, 9 (2009) 159-164.
[75] P. Hudson, T.S. Gorton, L. Papazisi, K. Cecchini, S. Frasca, S.J. Geary, Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in Mycoplasma gallisepticum through in vivo screening of transposon mutants, Infection and Immunity, 74 (2006) 931-939.
[76] M. Herbert, A. Kraiss, A.K. Hilpert, S. Schlor, J. Reidl, Aerobic growth deficient Haemophilus influenzae mutants are non-virulent: Implications on metabolism, International Journal of Medical Microbiology, 293 (2003) 145-152.
[77] K. Kee, L.M. Niu, E. Henderson, A Tetrahymena thermophila G4-DNA binding protein with dihydrolipoamide dehydrogenase activity, Biochemistry, 37 (1998) 4224-4234.
[78] A.J. Richard, H. Hang, J.M. Stephens, Pyruvate dehydrogenase complex (PDC) subunits moonlight as interaction partners of phosphorylated STAT5 in adipocytes and adipose tissue, J Biol Chem, 292 (2017) 19733-19742.
[79] G. Sutendra, A. Kinnaird, P. Dromparis, R. Paulin, Trevor H. Stenson, A. Haromy, K. Hashimoto, N. Zhang, E. Flaim, Evangelos D. Michelakis, A Nuclear Pyruvate Dehydrogenase Complex Is Important for the Generation of Acetyl-CoA and Histone Acetylation, Cell, 158 (2014) 84-97.
[80] K.C. Hung, N.T. Nguyen, Y.L. Sun, S.L. Huang, Bio-Fenton reaction involved in the cleavage of the ethoxylate chain of nonionic surfactants by dihydrolipoamide dehydrogenase from Pseudomonas nitroreducens TX1, Sci Rep, 9 (2019) 6827.
[81] N.R. Glasser, B.X. Wang, J.A. Hoy, D.K. Newman, The pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes of Pseudomonas aeruginosa catalyze pyocyanin and phenazine-1-carboxylic acid reduction via the subunit dihydrolipoamide dehydrogenase, J. Biol. Chem., 292 (2017) 5593-5607.
[82] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase, J. Neurosci., 24 (2004) 7771-7778.
[83] A.A. Starkov, G. Fiskum, C. Chinopoulos, B.J. Lorenzo, S.E. Browne, M.S. Patel, M.F. Beal, Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species, J. Neurosci., 24 (2004) 7779-7788.
[84] 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.
[85] 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.
[86] Q.L. Shi, H. Xu, W.A. Kleinman, G.E. Gibson, Novel functions of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease, Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis., 1782 (2008) 229-238.
[87] A.I. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.A. Starkov, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, Biochemistry-Moscow, 70 (2005) 200-214.
[88] 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-Mol. Basis Dis., 1802 (2010) 122-134.
[89] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress, Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci., 360 (2005) 2335-2345.
[90] L. Tretter, V. Adam-Vizi, Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress, J. Neurosci., 20 (2000) 8972-8979.
[91] C. Chinopoulos, L. Tretter, V. Adam-Vizi, Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase, J. Neurochem., 73 (1999) 220-228.

[92] U. Andersson, B. Leighton, M.E. Young, E. Blomstrand, E.A. Newsholme, Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide, Biochem. Biophys. Res. Commun., 249 (1998) 512-516.
[93] 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.
[94] 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.
[95] A.L. McLain, P.A. Szweda, L.I. Szweda, Alpha-Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor, Free Radical Res., 45 (2011) 29-36.
[96] M.A. Applegate, K.M. Humphries, L.I. Szweda, Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid, Biochemistry, 47 (2008) 473-478.
[97] R.A.W. Frank, C.W.M. Kay, J. Hirsi, B.F. Luisi, Off-pathway, oxygen-dependent thiamine radical in the Krebs cycle, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 1662-1668.
[98] S.C. Gupta, E.E. Dekker, Evidence for the identity and some comparative properties of alpha-ketoglutarate and 2-keto-4-hydroxyglutarate dehydrogenase activity, J. Biol. Chem., 255 (1980) 1107-1112.
[99] J.G. McCormack, R.M. Denton, The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, Biochem. J., 180 (1979) 533-544.
[100] 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.
[101] J. Lai, A. Cooper, Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors, J. Neurochem., 47 (1986) 1376-1386.
[102] S.J. Mcconoughey, Z. Niatsetkaya, K. Karpisheva, A.J.L. Copper, B.F. Krasnikov, M.F. Bael, R.R. Ratan, Inhibition of transglutaminase 2 increases the transcription of key mitochondrial proteins in cells expressing mutant huntingtin, Soc. Neurosci., 642 (2008) 10.
[103] L. Fesus, M. Piacentini, Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions, Trends Biochem.Sci., 27 (2002) 534-539.
[104] A.V. Artiukhov, A.V. Graf, V.I. Bunik, Directed regulation of multienzyme complexes of 2-oxo acid dehydrogenases using phosphonate and phosphinate analogs of 2-oxo acids, Biochemistry-Moscow, 81 (2016) 1498-1521.
[105] Q.L. Shi, H. Xu, H.Q. Yu, N.W. Zhang, Y.Z. Ye, A.G. Estevez, H.T. Deng, G.E. Gibson, Inactivation and Reactivation of the Mitochondrial alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex, J. Biol. Chem., 286 (2011) 17640-17648.
[106] K.F.R. Sheu, J.P. Blass, The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, in: Oxidative/Energy Metabolism in Neurodegenerative Disorders, vol. 893, New York Acad Sciences, New York, 1999, pp. 61-78.
[107] L. Csiba, W. Paschen, K.A. Hossmann, A topographic quantitative method for measuring brain-tissue pH under physiological and pathophysiological conditions, Brain Res., 289 (1983) 334-337.
[108] L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, Free Radical Bio. Med., 19 (1995) 227-250.
[109] O. Tirosh, C.K. Sen, S. Roy, M.S. Kobayashi, L. Packer, Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its positively charged amide analogue, Free Radical Bio. Med., 26 (1999) 1418-1426.
[110] T.M. Hagen, R.T. Ingersoll, J. Lykkesfeldt, J.K. Liu, C.M. Wehr, V. Vinarsky, J.C. Bartholomew, B.N. Ames, (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate, Faseb J., 13 (1999) 411-418.
[111] M.J. Danson, A.R. Fersht, R.N. Perham, Rapid intramolecular coupling of active sites in the pyruvate dehydrogenase complex of Escherichia coli: mechanism for rate enhancement in a multimeric structure, Proc Natl Acad Sci U S A, 75 (1978) 5386-5390.
[112] V. Bunik, A.H. Westphal, A. de Kok, Kinetic properties of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from Azotobacter vinelandii - Evidence for the formation of a precatalytic complex with 2-oxoglutarate, Eur. J. Biochem., 267 (2000) 3583-3591.
[113] S.K. Akiyama, G.G. Hammes, Elementary steps in the reaction mechanism of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from Escherichia coli: kinetics of acetylation and deacetylation, Biochemistry, 19 (1980) 4208-4213.
[114] D.E. Waskiewicz, G.G. Hammes, Elementary steps in the reaction mechanism of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex from Escherichia coli: kinetics of succinylation and desuccinylation, Biochemistry, 23 (1984) 3136-3143.
[115] Y.S. Hong, S.J. Jacobia, L. Packer, M.S. Patel, The inhibitory effects of lipoic compounds on mammalian pyruvate dehydrogenase complex and its catalytic components, Free Radical Bio. Med., 26 (1999) 685-694.

[116] S. Loffelhardt, C. Bonaventura, M. Locher, H.O. Borbe, H. Bisswanger, Interaction of alpha-lipoic acid enantiomers and homologs with the enzyme components of the mammalian pyruvate-dehydrogenase complex, Biochem. Pharmacol., 50 (1995) 637-646.
[117] L. Tretter, A. Ambrus, Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria, Methods Enzymol, 547 (2014) 199-223.
[118] C. Mottley, R.P. Mason, Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid, J. Biol. Chem., 276 (2001) 42677-42683.
[119] H. Yanagawa, F. Egami, Effects of asparagusate and lipoate on enzymes of tricarboxylic-acid cycle and related metabolic pathways, J. Biochem., 78 (1975) 1153-1160.
[120] M. Foster, J.H. Harrison, Lipoic acid inhibition of mitochondrial malate dehydrogenase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 64 (1975) 528-534.
[121] A. Ambrus, B. Torocsik, V. Adam-Vizi, Periplasmic cold expression and one-step purification of human dihydrolipoamide dehydrogenase, Protein Expr. Purif., 63 (2009) 50-57.
[122] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
[123] Y.C. Wang, S.T. Wang, C. Li, W.H. Liu, P.R. Chen, L.Y. Chen, T.C. Liu, The role of N286 and D320 in the reaction mechanism of human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) center domain, J. Biomed. Sci., 14 (2007) 203-210.
[124] J.K. Reed, Studies on the kinetic mechanism of lipoamide dehydrogenase from rat liver mitochondria, J. Biol. Chem., 248 (1973) 4834-4839.
[125] M.M. Lanterman, J.R. Dickinson, D.J. Danner, Functional analysis in Saccharomyces cerevisiae of naturally occurring amino acid substitutions in human dihydrolipoamide dehydrogenase, Hum. Mol. Genet., 5 (1996) 1643-1648.
[126] Y. Sakaguchi, M. Yoshino, S. Aramaki, I. Yoshida, F. Yamashita, T. Kuhara, I. Matsumoto, T. Hayashi, Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency - a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction, Eur. J. Pediatr., 145 (1986) 271-274.
[127] R.A. Vaubel, P. Rustin, G. Isaya, Mutations in the Dimer Interface of Dihydrolipoamide Dehydrogenase Promote Site-specific Oxidative Damages in Yeast and Human Cells, J. Biol. Chem., 286 (2011) 40232-40245.
[128] H.A. Sadek, K.M. Humphries, P.A. Szweda, L.I. Szweda, Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion, Arch. Biochem. Biophys., 406 (2002) 222-228.
[129] E. Cabiscol, E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, J. Ros, Oxidative stress promotes specific protein damage in Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem., 275 (2000) 27393-27398.
[130] T.C. Liu, L.G. Korotchkina, S.L. Hyatt, N.N. Vettakkorumakankav, M.S. Patel, Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its side-directed mutants, J. Biol. Chem., 270 (1995) 15545-15550.
[131] A.H. Brady, S. Beychok, Circular dichroism of reduced and oxidized mammalian lipoamide dehydrogenase, J. Biol. Chem., 246 (1971) 5498-&.
[132] A.M.G. Visser, W.J.H. van Berkel, A. de Kok, Changes in secondary structure and flavin microenvironment between Azotobacter vinelandii lipoamide dehydrogenase and several deletion mutants from circular dichroism, Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics, 1229 (1995) 381-385.
[133] H. Kim, Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Arg-447 to Gly) in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase of Patients with Neurological Deterioration, Journal of the Korean Chemical Society-Daehan Hwahak Hoe Jee, 60 (2016) 88-92.
[134] L. Yuan, H. Kim, Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Ile-358 to Thr) in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase of a Patient with Leigh Syndrome, Bull. Korean Chem. Soc., 33 (2012) 1445-1446.
[135] H. Kim, Characterization of Two Naturally Occurring Mutations (Gly-101 Deletion and Glu-340 to Lys Substitution) in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase of a Patient with Metabolic Acidosis, Bull. Korean Chem. Soc., 33 (2012) 2477-2478.
[136] L. Yuan, H. Kim, Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Arg-460 to Gly) Close to FAD in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase, Bull. Korean Chem. Soc., 31 (2010) 3511-3512.
[137] L. Yuan, Y.J. Cho, H. Kim, Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Ile-12 to Thr) Close to Prosthetic Group FAD in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase, Bull. Korean Chem. Soc., 30 (2009) 777-778.
[138] L. Yuan, Y.-J. Cho, H.-J. Kim, Characterization of Two Naturally Occurring Mutations Close to Cofactors in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase, Bull. Korean Chem. Soc., 29 (2008) 2327-2328.
[139] J.R. Florini, C.S. Vestling, Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems, Biochim. Biophys. Acta, 25 (1957) 575-578.

[140] 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.
[141] A. Ambrus, L. Tretter, V. Adam-Vizi, Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid, J. Neurochem., 109 (2009) 222-229.
[142] 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.
[143] 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.
[144] A. de Kok, A.H. Westphal, Hybrid pyruvate dehydrogenase complexes reconstituted from components of the complexes from Escherichia coli and Azotobacter vinelandii, Eur. J. Biochem., 152 (1985) 35-41.
[145] T. Wagenknecht, N. Francis, D.J. Derosier, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex may be heterogeneous in quaternary structure, J. Mol. Biol., 165 (1983) 523-539.
[146] K. Koike, M. Hamada, N. Tanaka, K.I. Otsuka, K. Ogasahara, M. Koike, Properties and subunit composition of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase, J. Biol. Chem., 249 (1974) 3836-3842.
[147] S. Strumilo, Short-term regulation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by energy-linked and some other effectors, Biochemistry-Moscow, 70 (2005) 726-729.
[148] N. Tanaka, K. Koike, K. Otsuka, M. Hamada, K. Ogasahara, Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. 8. Properties and subunit composition of the pig heart lipoate succinyltransferase, J. Biol. Chem., 249 (1974) 191-198.
[149] C.M. Smith, J. Bryla, J.R. Williamson, Regulation of mitochondrial alpha-ketoglutarate metabolism by product inhibition at alpha-ketoglutarate dehydrogenase, J. Biol. Chem., 249 (1974) 1497-1505.
[150] N. Tanaka, K. Koike, M. Hamada, K.I. Otsuka, T. Suematsu, M. Koike, Mammalian a-keto acid dehydrogenase complexes. VII. Resolution and reconstitution of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, J. Biol. Chem., 247 (1972) 4043-4049.
[151] P.B. Garland, Some kinetic properties of pig-heart oxoglutarate dehydrogenase that provide a basis for metabolic control of the enzyme activity and also a stoicheiometric assay for coenzyme A in tissue extracts, Biochem. J., 92 (1964) 10C-12C.
[152] Y.V. Kiselevsky, S.A. Ostrovtsova, S.A. Strumilo, Kinetic characterization of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes from human heart, Acta Biochim Pol, 37 (1990) 135-139.
[153] J.G. McCormack, R.M. Denton, Effects of calcium-ions and adenine-nucleotides on the activity of pig-heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex Biochem. J., 180 (1979) 533-544.
[154] R.M. Denton, J.G. McCormack, On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria, FEBS Letters, 119 (1980) 1-8.
[155] R.M. Denton, D.A. Richards, J.G. Chin, Calcium ions and the regulation of NAD+-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues, Biochem. J., 176 (1978) 899-906.
[156] 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.
[157] C. Chinopoulos, V. Adam-Vizi, Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology - Novel aspects of an enduring theme, Febs J., 273 (2006) 433-450.
[158] V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, Trends in Pharmacological Sciences, 27 (2006) 639-645.
[159] V. Adam-Vizi, Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources, Antioxid. Redox Signal., 7 (2005) 1140-1149.
[160] A.A. Starkov, The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling, Ann N Y Acad Sci, 1147 (2008) 37-52.
[161] P.S. Brookes, Mitochondrial production of oxidants and their role in the regulation of cellular processes, in: G.E.G.a.G. Dienel (Ed.) Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology, vol. 5, 2007.
[162] D. Martinvalet, P.C. Zhu, J. Lieberman, Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, Immunity, 22 (2005) 355-370.
[163] I. Siebels, S. Drose, Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates, Biochim Biophys Acta, 1827 (2013) 1156-1164.
[164] L. Kussmaul, J. Hirst, The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria, Proc Natl Acad Sci U S A, 103 (2006) 7607-7612.
[165] H.R. McLennan, M. Degli Esposti, The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species, J Bioenerg Biomembr, 32 (2000) 153-162.
[166] G. Lakaschus, M. Loffler, Differential susceptibility of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase to Brequinar Sodium (NSC 368 390) in vitro, Biochem Pharmacol, 43 (1992) 1025-1030.

[167] A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.N. Murphy, A.A. Starkov, Mitochondrial ROS metabolism: 10 Years later, Biochemistry-Moscow, 80 (2015) 517-531.
[168] M.D. Diaz-Munoz, S.E. Bell, K. Fairfax, E. Monzon-Casanova, A.F. Cunningham, M. Gonzalez-Porta, S.R. Andrews, V.I. Bunik, K. Zarnack, T. Curk, W.A. Heggermont, S. Heymans, G.E. Gibson, D.L. Kontoyiannis, J. Ule, M. Turner, The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response, Nature Immunology, 16 (2015) 415-425.
[169] M. Dumont, D.J. Ho, N.Y. Calingasan, H. Xu, G. Gibson, M.F. Beal, Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition, Free Radic. Biol. Med., 47 (2009) 1019-1027.
[170] Q.L. Shi, H.L. Chen, H. Xu, G.E. Gibson, Reduction in the E2k subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex has effects independent of complex activity, J. Biol. Chem., 280 (2005) 10888-10896.
[171] G.E. Gibson, H. Zhang, K.F.R. Sheu, N. Bogdanovich, J.G. Lindsay, L. Lannfelt, M. Vestling, R.F. Cowburn, alpha-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation, Ann. Neurol., 44 (1998) 676-681.
[172] M. Cruts, H. Backhovens, G. Vangassen, J. Theuns, S.Y. Wang, A. Wehnert, C.M. Vanduijn, T. Karlsson, A. Hofman, R. Adolfsson, J.J. Martin, C. Vanbroeckhoven, Mutation analysis of the chromosome 14q24.3 dihydrolipoyl succinyltransferase (dlst) gene in patients with early-onset Alzheimer-disease, Neuroscience Letters, 199 (1995) 73-77.
[173] K. Nakano, C. Takase, T. Sakamoto, S. Nakagawa, J. Inazawa, S. Ohta, S. Matuda, Isolation, characterization and structural organization of the gene and pseudogene for the dihydrolipoamide succinyltransferase component of the human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, Eur. J. Biochem., 224 (1994) 179-189.
[174] A. Ambrus, I. Banyai, M.S. Weiss, R. Hilgenfeld, Z. Keresztessy, L. Muszbek, L. Fesus, Calcium binding of transglutaminases: A Ca-43 NMR study combined with surface polarity analysis, J. Biomol. Struct. Dyn., 19 (2001) 59-+.
[175] A. Ambrus, D. Chen, J.X. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, D.Z. Yang, Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution, Nucleic Acids Res., 34 (2006) 2723-2735.
[176] A. Ambrus, D. Chen, J.X. Dai, R.A. Jones, D.Z. Yang, Solution structure of the biologically relevant g-quadruplex element in the human c-MYC promoter. implications for g-quadruplex stabilization, Biochemistry, 44 (2005) 2048-2058.
[177] A. Ambrus, D. Yang, Diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of DNA secondary structural elements, Anal Biochem, 367 (2007) 56-67.
[178] M. Palczewska, P. Groves, A. Ambrus, A. Kaleta, K.E. Kover, G. Batta, J. Kuznicki, Structural and biochemical characterization of neuronal calretinin domain I-II (residues 1-100) - Comparison to homologous calbindin D-28k domain I-II (residues 1-93), Eur. J. Biochem., 268 (2001) 6229-6237.
[179] J.X. Dai, T.S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R.A. Jones, D.Z. Yang, An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution, J. Am. Chem. Soc., 128 (2006) 1096-1098.
[180] J.X. Dai, C. Punchihewa, A. Ambrus, D. Chen, R.A. Jones, D.Z. Yang, Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation, Nucleic Acids Res., 35 (2007) 2440-2450.
[181] J.X. Dai, A. Ambrus, L.H. Hurley, D.Z. Yang, A Direct and Nondestructive Approach To Determine the Folding Structure of the I-Motif DNA Secondary Structure by NMR, J. Am. Chem. Soc., 131 (2009) 6102-+.
[182] A. Ambrus, V. Adam-Vizi, Molecular dynamics study of the structural basis of dysfunction and the modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic mutants of human dihydrolipoamide dehydrogenase, Arch. Biochem. Biophys., 538 (2013) 145-155.
[183] A. Ambrus, R. Mizsei, V. Adam-Vizi, Structural alterations by five disease-causing mutations in the low-pH conformation of human dihydrolipoamide dehydrogenase (hLADH) analyzed by molecular dynamics – Implications in functional loss and modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic hLADH forms, Biochem. Biophys. Reports, 2 (2015) 50-56.
[184] O. Ozohanics, A. Ambrus, Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry: A Novel Structural Biology Approach to Structure, Dynamics and Interactions of Proteins and Their Complexes, Life (Basel), 10 (2020).
[185] 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.
[186] A. de Kok, A. Berg, W. van Berkel, A. Fabisz-Kijowska, A. Westphal, F. van den Akker, A. Mattevi, W.G.J. Hol, The pyruvate dehydrogenase complex from Azotobacter vinelandii, in: K. Yagi (Ed.) Flavins and Flavoproteins, Walter de Gruyter, Nagoya, Japan, 1993, pp. 535-544.

[187] A. de Kok, W.J.H. van Berkel, Lipoamide dehydrogenase, in: M.S. Patel, T.E. Roche, R.A. Harris (Eds.) Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes, Birkhäuser, Basel, 1996, pp. 53-70.
[188] 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.
[189] R.N. Perham, Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: Catalytic machines for multistep reactions, Annu. Rev. Biochem., 69 (2000) 961-1004.
[190] 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.
[191] 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.
[192] 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.
[193] 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.