

A HUMÁN DIHIDROLIPOAMID-DEHIDROGENÁZ DEFICIENCIA MOLEKULÁRIS PATOMECHANIZMUSA

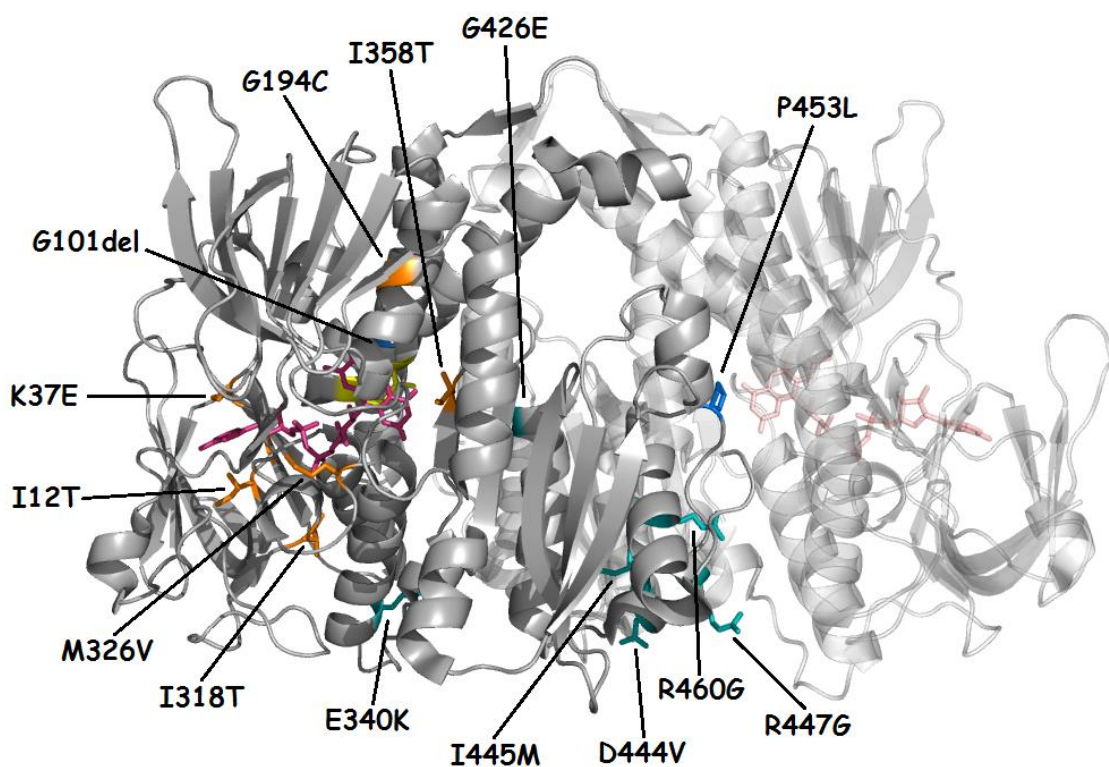
Szabó Eszter és Ambrus Attila

***MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport, Orvosi Biokémiai Intézet,
Semmelweis Egyetem***

Bevezetés

A humán (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (hLADH) enzim deficienciája egy ritka, autoszómális recesszív öröklődésű genetikai kórkép [1, 2]. Az askenázi zsidó populációban a leggyakoribb a betegség megjelenése (~1:40000), elsősorban egy bizonyos aminosavcsere miatt (Gly194Cys), amelynek az előfordulási aránya az érintett népességben megközelítőleg 1:100 [3]. A hLADH a metabolizmusban nélkülözhetetlen szerepet játszó mitokondriális α -ketosav-dehidrogenáz (α -ketoglutarát-dehidrogenáz (KGDH), piruvát-dehidrogenáz (PDH) és elágazó-szénláncú α -ketosav-dehidrogenáz (ESzKDH)) komplexek közös harmadik alegysége (hE3), illetve a glicinhasító-rendszernek (GHR) is része [1]. Az enzim diszfunkciója elsősorban az intenzív metabolizmust folytató, nagy oxigénfelhasználású szöveteket érinti és ebből kifolyólag a klinikai képet döntően a neurológiai és kardiológiai tünetek határozzák meg, bár a máj funkciózavarai is meglehetősen gyakoriak [2]. Jellemző fenotípusok a növekedés elmaradása, fejlődési rendellenességek, enkefalopátia, az izomzat tónustalansága, májelégtelenség, laktát-acidózis, hipoglikémia, Leigh-szindróma, hipertrófiás kardiomiopátia, látás-károsodás, ataxia és a mikrocefália [2, 4, 5]. A tünetek gyakran már nagyon korán (sokszor a neonatális periódusban) jelentkeznek, míg bizonyos patogén mutációk esetén csak a felnőttkorban fejlődik ki a betegség. A diagnózisban meghatározó szerepet játszik - a releváns kórtörténet mellett - a hE3 alegységet tartalmazó enzimkomplexek csökkent aktivitásainak kimutatása [2]. Gyakori emellett a hE3 saját enzimaktivitásának

diagnosztikus célú mérése is fibroblasztokból, limfocitákból, illetve máj- és izomszövet mintákból [4]. Biztos diagnózis ugyanakkor csak a hE3-at kódoló *dld* gén genetikai variációinak (pl. patogén mutációinak) kimutatása után állítható fel. Mindezidáig 14 betegséget okozó aminosavcserét (vagy deléció) írtak le a klinikai irodalomban (eredeti referenciákért lásd: [1]), melyek a hE3 kristályszerkezetének ismeretében csoportosíthatóak aszerint, hogy az enzimszerkezet mely funkcionálisan meghatározó részét érintik: az Ile12Thr, Lys37Glu, Gly194Cys, Ile318Thr, Met326Val, Ile358Thr aminosavcserék a kofaktor-kötő régiókban, a Gly101del, Pro453Leu módosulások az aktív centrumban, míg a Glu340Lys, Gly426Glu, Asp444Val, Ile445Met, Arg460Gly és Arg447Gly cserék a homodimerizációs felszínen jönnek létre [6] (1. ábra).



1. ábra. A hE3 homodimer szerkezete a patogén aminosav-szubsztitúciók feltüntetésével. A betegséget okozó aminosavcserék elhelyezkedése a vad típusú enzim (PDB kód: 1ZMD) egyik monomerjében, funkcionális régióként eltérő színekkel van feltüntetve (aktív centrum: sötétkék, kofaktor-kötőhely: narancssárga, dimerizációs felszín: zöldeskék). A FAD prosztetikus csoport pálcikamodellje rózsaszín, míg az aktív centrumban lévő ciszteinek sárga színűek. Az ábrán az aminosavak egybetűs kódjait alkalmaztuk (az ábra zsúfoltságának elkerülése érdekében).

A betegség kezelésére jelenleg mindössze egy étrendi megkötésekkel alapuló, empirikus, kombinációs megközelítés lehetséges, amely esetenként antioxidánsok és vitaminok adásával egészíthető ki [2]. Akut epizódok során a legfontosabb a metabolikus acidózis kezelése és a normoglikémia fenntartása, a rohamok sikeres megelőzésére azonban jelenleg nincs elfogadott klinikai protokoll egyik típusú E3-deficienciában sem [2].

Az E3-deficiencia molekuláris patomechanizmusa

Az α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexekben az E3-komponens az E2 alegységhez kovalensen kötött dihidroliponsav (DHLS) liponsavvá (LS) történő oxidációjáért felel (LADH-aktivitás). Ehhez az aktivitáshoz FAD prosztetikus csoport, két redox-aktív Cys, egy His bázis (mind az aktív centrumban) és NAD^+ kosubsztrát (mint elektronakceptor) jelenléte is szükséges. Az izolált patogén hE3 variánsok LADH-aktivitása – különböző mértékben – csökkent (a vadtypushoz képest), mind a fiziológiás (*forward*), mind pedig a fordított irányú (*reverz*) reakcióban (ez utóbbi esetben a NADH szolgál elektrondonorként a modellvegyületként alkalmazott LS, vagy lipoamid redukciójához) [7]. Az általános tendenciától eltérést mutat a Gly194Cys-hE3 mutáns gyakorlatilag változatlan aktivitása és a Lys37Glu-hE3 variáns emelkedett *reverz* irányú aktivitása (csökkent *forward* irányú aktivitás mellett) [7]. A betegekből származó mintákban mérhető LADH-aktivitás-csökkenés mértéke azonban többnyire nem korrelál a tünetek súlyosságával [4]. Feltételezhető tehát, hogy egyéb súlyosbító mechanizmusok is hozzájárulnak a patogenezishez. Az eddigi eredmények alapján ilyen mechanizmus lehet potenciálisan a hE3 egyes patogén variánsainak megnövekedett reaktív oxigénszármazék (ROS) képző aktivitása (különösen acidózisban, amely E3-deficienciában nagyon gyakori) [7, 8], a hE3-mutánsokat tartalmazó enzimkomplexek disszociációja [9-13] (acidózisban akár még kifejezettebben [14]) és a

hKGDH komplex (hKGDHk) tekintetében az esetleges disszociáció után visszamaradó E1-E2 alkompex erőteljes ROS termelése [15].

ROS-képzés

A hKGDHk rendkívül érzékeny az oxidatív behatásokra, ugyanakkor az általa termelt ROS a mitokondriális oxidatív stressz egyik legjelentősebb forrása [16-19]. A hKGDHk ROS-termelő aktivitása akkor kerül előtérbe, amikor a fiziológiás elektronakceptor, a NAD^+ nem áll rendelkezésre kellő mennyiségben (a *forward* reakcióban), vagy ha a NADH/NAD^+ -arány megemelkedik (amely pedig a ROS-képző *reverz* E3-reakciót támogatja) [14, 15, 18, 19] (2. ábra). A NADH/NAD^+ -arány számottevően megemelkedik például iszkémia, Komplex I elégtelenség vagy fokozott kalóriabevitel esetén [20-22]. A hKGDHk ROS-képzése az E3 alegységen keresztül valósul meg mindkét katalitikus irányban és az irodalomban a komplex szuperoxid- ill. H_2O_2 -termelését detektálják (a szuperoxid az elsődleges termék, a H_2O_2 pedig spontán diszmutációval (diszproporcionálódással) keletkezik a szuperoxidból) [15, 18, 19]. Érdekes módon a hPDHk ugyanezen aktivitása, a hE3 jelenléte ellenére, *in vivo* körülmények között sokkal kevésbé szignifikáns [15-17, 19, 23]. Az izolált hE3 szintén mindkét irányú (*forward* és *reverz*) reakcióban képes elvileg ROS-t termelni, a szakirodalom azonban - metodikai okok miatt [14, 24] - kizárólag a *reverz* reakció tanulmányozásáról számol be [7, 14, 15, 25].

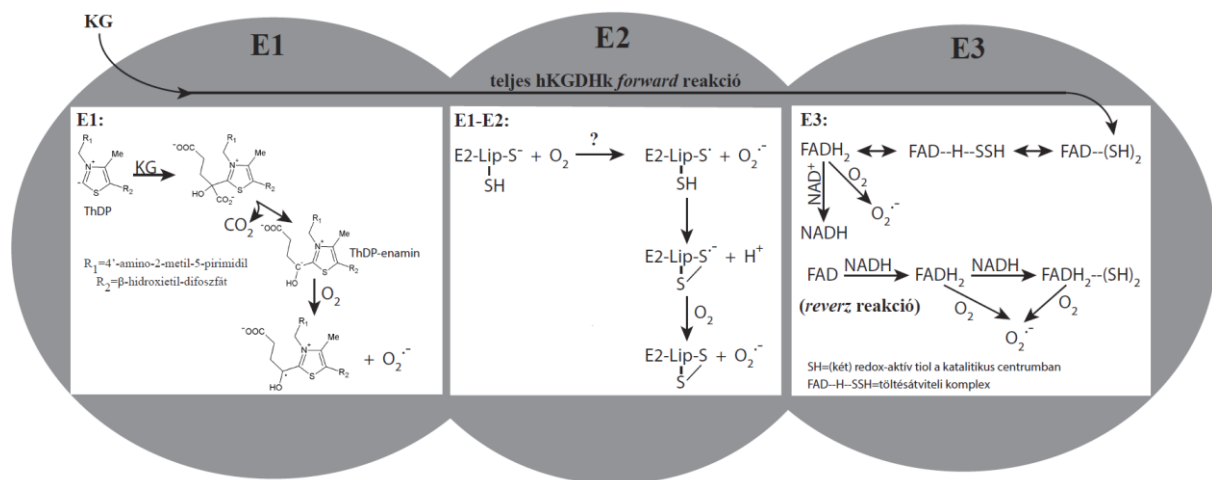
Kis mértékű acidózis kedvez a fiziológiás KGDHk-reakciónak [15], kivéve az agyban, ahol a pH-optimum 7,2 és 7,4 közötti [26]. Emellett azonban az E3 ún. diaforáz-aktivitása - különböző szerves és szervetlen kismolekulás elektronakceptorok NADH (és E3) általi redukciója meglehetősen savas pH-optimum mellett -, illetve az ezzel analóg mechanizmusú *reverz* irányú ROS-képző aktivitása is fokozódik savas körülmények között [14, 27, 28]. A hKGDHk általi ROS-képzés sebessége

ugyancsak megnő acidózisban, de csak a *reverz* reakcióban [14]. A hE3 ROS-képzését a Zn^{2+} is fokozza, amelynek az iszkémia-reperfúzióban, illetve Alzheimer-kórban lehet jelentősége, ahol a Zn^{2+} megnövekedett koncentrációban van jelen [25]. Ezzel ellentétben az LS gátolja a *reverz* irányú ROS-képzést mind a hKGDHk, mind pedig a hE3 esetén, azonban csak acidózisban ($pH < 6,8$) [14]. Az LS a KGDHk *forward* irányú ROS-képzését is gátolja, bár ebben az esetben az E2 alegységen hat egy eltérő mechanizmussal [14].

Egyes betegséget okozó hE3-mutánsok ROS-termelő képessége - és annak pH-érzékenysége is - megnövekedett a vad típusú enzimhez képest (Asp444Val-, Glu340Lys-, Pro453Leu- és Gly194Cys-hE3; a 14 eddig leírt patogén mutáns közül eddig nyolc vizsgálata történt meg) [7]. Az említett Asp444Val-, Glu340Lys- és Gly194Cys-hE3 variánsokról, valamint az Arg460Gly- és Arg447Gly-hE3 mutánsokról élesztő modellben kimutatták továbbá, hogy az E2-kötött LS kofaktor oxidatív károsodását okozzák a KGDHk és a PDHk enzimkomplexekben (Asp444Val-homozigóta betegből származó fibroblasztokban ugyanez a hatás volt megfigyelhető [8]). A ROS-termelő aktivitás fokozódása mellett a megfelelő mutánsok LADH-aktivitása általában - a várakozásnak megfelelően - kisebbnek adódott a kontrollhoz (hE3) képest. Érdekes jelenség, hogy a Pro453Leu-hE3 variáns fiziológiás aktivitása csaknem teljes egészében elveszett, míg ezzel szemben a Gly194Cys-hE3 mutánsban a LADH-aktivitás gyakorlatilag nem károsodott [7]. A Pro453Leu szubsztitúció esetében súlyos klinikai képről számoltak be [29, 30], amelyhez feltehetően hozzájárul a megfelelő hE3 variáns erősen fokozott ROS-termelő képessége is [7]. A Gly194Cys aminosavcsere által kiváltott E3-deficienciára ezzel szemben inkább a tünetek felnőttkori megjelenése a jellemző [3, 31], amely összhangban van a megtartott LADH-aktivitás mellett megemelkedett ROS-termelő kapacitással (a fokozott oxidatív stressz okozta károsodások valószínűleg akkumulálódnak a betegekben a korábbi, tünetmentes életévek során [7]). Fontos megállapítás, hogy a

patogén aminosav-szubsztitúció lokalizációja nem mutat összefüggést a ROS-termelő képességgel [7].

Amennyiben a komplex-kötött hE3 mennyisége szuboptimális (pl. E3-deficiencia vagy acidózis esetén - ez utóbbi körülményben valószínűsítik a hE3 affinitásának csökkenését a hKGDHk-hez [14], amely összhangban van azzal, hogy az E3 kötődése eleve meglehetősen gyenge a komplexen belül [32-34]), a hKGDHk E1-E2 alkompexe ugyancsak képes lehet számottevő mennyiségben ROS-t termelni [15].



2. ábra. A hKGDHk E1-, E1-E2- és E3-alegységei/alkomplexei, illetve a teljes hKGDHk által katalizált szuperoxid-képzés javasolt mechanizmusai. A szuperoxid mellett diszmutációval keletkezett H_2O_2 is kimutatható minden esetben a fenti rendszerekben. A szabad E1 alegységen szuperoxid a viszonylag stabil, enzim-kötött enamin O_2 általi oxidációjával keletkezik. Az E1-E2 alkompex szuperoxid-képzése valószínűleg az E2-alegységhez kötött redukált liponsav részvételével valósul meg (a mechanizmus részletei még tisztázásra várnak). A szabad, illetve komplexben levő hE3 - forward és reverz irányú - ROS-képzésében a FAD proszтетikus csoport kitüntetett szerepet játszik az ábrán feltüntetett mechanizmusok szerint. KG: α -ketoglutarát, ThDP: tiamin-difoszfát, Lip: E2-kötött liponsav, FAD: flavin-adenin-dinukleotid, NAD^+/NADH : nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált, ill. redukált forma).

A jelenség *in vitro* körülmények között az izolált alegységekből rekonstitúcióval létrehozott hKGDHk E1-E2 alkompexe esetén volt megfigyelhető, másik három hasonló módon létrehozott komplex (hPDHk, *E. coli* KGDHk, *E. coli* PDHk) E1-E2 alkompexeire nem volt jellemző [15]. A mechanizmus hátterében a DHLS pro-oxidáns sajátossága feltételezhető (az E2-kötött DHLS - E3-katalizált oxidáció hiányában - molekuláris oxigénnel reagálva potenciálisan szuperoxidot képezhet, lásd 2. ábra) [35-37]. Azon patológiás körülmények között tehát, amikor a hE3 vagy

annak betegséget okozó mutánsai részben vagy teljesen disszociálnak a hKGDHk-ról, nem csak a szabad vagy még komplex-kötött hE3 ill. mutánsai lehetnek képesek ROS-képzésre (elsősorban a *reverz* reakcióban), hanem egyidőben, tőlük függetlenül a visszamaradó E1-E2 alkomplesz is termelhet számottevő mennyiségben ROS-t a *forward* reakcióban, amennyiben az α -ketoglutarát szubsztrát megfelelő koncentrációban rendelkezésre áll [1].

Érdekes módon a hKGDHk E1 alegysége is képes ROS-termelésre (lásd 2. ábra). Ennek mértéke - más α -ketosav-dehidrogenáz komplexek E1 alegységeivel történő összehasonlításban - erősen szignifikánsnak bizonyult *in vitro* kísérletben [15, 38]. A hKGDHk E1 alegységének ROS-képző aktivitása patológiás jelentőséggel bírhat például E2-deficienciában [39-45].

Az E3 alegység disszociációja az érintett enzimkomplexekről

E3-deficienciában az E3 alegységet tartalmazó α -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek diszfunkciója nem csak a LADH-aktivitás csökkenéséből eredhet. A hPDHk alulműködéséhez például nagy valószínűséggel hozzájárul az is, hogy egyes patogén hE3 variánsok (Glu340Lys-, Asp444Val-, Arg447Gly-, Arg460Gly-, Lys37Glu-, Pro453Leu-hE3) a hPDHk-ben jelenlevő E3-kötő fehérjéhez (E3KF) csökkent affinitással kötődnek [10, 11, 13]. Ugyanez feltételezhető a hE3-E3KF-komplex kristályszerkezetei [12, 13] és hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS) eredmények alapján további három variáns esetében (Ile318Thr-, Ile358Thr-, Ile445Met-hE3) [9]. Klinikai eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az E3-deficienciában előforduló betegséget okozó aminosavcserék a hE3 hKGDH- és hESzKDH-komplexekre vonatkoztatott kötődési állandóit is befolyásolják [46, 47].

Szerkezeti változások

1. Monomerizáció

Az E3 alegység egy nem-kovalens, funkcionális (obligát) homodimert alkot, amelyben a fiziológias aktivitáshoz mindkét aktív centrumban a szomszédos monomer meghatározott aminosavai is szükségesek [6]. A dimerizációs domént érintő aminosav-szubsztitúciók esetén a patogenitás elsődleges okának a homodimer monomerizációját feltételezték korábban [6, 48]. Extrém kísérleti körülmények között – pl. erősen savas közegben vagy apomerizáció, fagyasztás-olvasztás ciklusok, nagymértékű hígítás, denaturáció, magas sókoncentráció, ill. kémiai módosítások hatására [27, 28, 49-54] – valóban megfigyelhető a hE3-dimer disszociációja, miközben a felszabaduló monomerek diaforáz-aktivitása megmarad [50, 51] (a diaforáz-aktivitáshoz a FAD prosztetikus csoport szükséges elsősorban, a szomszédos monomer interakciója nem [27, 51]). Ebből kifolyólag a patológiás körülmények között fellépő acidózis, valamint a dimerizációs felszín érintő egyes mutációk okozta diaforáz/ROS-képző aktivitás növekedés hátterében is a hE3 monomerizációját és annak szerkezeti következményeit feltételezték [27, 55]. Számos biokémiai/biofizikai módszerrel – analitikai ultracentrifugálás, kalibrált gélszűrés, nano-LC MS, 1D ^1H és DOSY-NMR spektroszkópia – bizonyították azonban, hogy sem a patológiásan releváns acidózis, sem pedig az eddig vizsgált betegség-
okozó dimerizációs felszín mutációk nem vezetnek a dimer disszociációjához [7, 13, 14]. Később molekuláris dinamika (MD) szimulációk, majd HDX-MS analízis eredmények ugyancsak ezt a megfigyelést támasztották alá [9, 56, 57]. Ezen cikk szerzői rendelkeznek nagyfelbontású kristályszerkezettel a vad típusú hE3 és öt patogén variánsa tekintetében (amelyből négy a dimerizációs domént érinti; közlésre előkészítés alatt), mely adatok szintén megerősítik a fenti konklúziókat.

2. A FAD prosztetikus csoport részleges elvesztése

Egy hE3 monomer egy FAD molekulát, mint prosztetikus csoportot köt erős, de nem-kovalens kölcsönhatások által [6]. A hE3 kristályszerkezete alapján monomerenként legalább 36 aminosav oldallánc játszik szerepet a FAD stabilizálásában [6]. A patogén aminosav-szubsztitúciók távolra ható szerkezeti változások révén képesek befolyásolni a FAD-kötést és ezáltal a mutánsok FAD-tartalmát és enzimaktivitását [6, 7, 9, 58]. Az eddig vizsgált hE3-variánsok FAD tartalma (mol FAD/1 mol hE3 monomer egységben kifejezve): Pro453Leu-hE3 (0,66), Gly194Cys-hE3 (0,72), Glu340Lys-hE3 (0,99), Asp444Val-hE3 (0,95), Lys37Glu (0,76 ill. 0,67) [7, 58]. HDX-MS analízis alapján megállapítást nyert, hogy az egyes mutációk fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásai a FAD-kötésben szerepet játszó aminosavak változó százalékát érintette (lásd alább) [9].

3. A hE3 finomszerkezetében bekövetkező változások

Kizárva annak lehetőségét, hogy a patogén mutációk a hE3 dimer disszociációját eredményeznék, a mutánsokban megfigyelt funkcionális eltérések okai egyéb szerkezeti változásokban keresendők. A hE3 és számos patogén variánsa cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszópiával történő összehasonlítása során szignifikáns eltérések nem voltak kimutathatóak a globális konformációban [7, 58]. A patogén aminosav-szubsztitúciók okozta enzimaktivitás-csökkenés, valamint a korábban említett négy variánsban mutatkozó fokozott ROS-termelő aktivitás finomszerkezeti okainak felderítésére az eddigi egyedüli kísérletes eredmények egy tíz patogén mutánson elvégzett HDX-MS analízisből származnak [9]. A HDX-MS technika révén vizsgálható, hogy milyen mértékben képes a deutérium beépülni a vad típusú vagy egy mutáns enzim egyes peptidszakaszaiba. A kísérletet a fiziológias állapotot közelítő oldatkörülmények között is el lehet végezni. Összehasonlítva a vad típusú ill. egy mutáns enzimben mért deutérium-beépüléseket, információt

nyerhetünk a különböző peptidszakaszok dinamikájában és oldószer általi hozzáférhetőségében bekövetkező, mutáció okozta változásokról. Az eredményekből fény derült arra, hogy a vizsgált tíz patogén mutáns mindegyikében számos FAD-kötésben résztvevő aminosavakat tartalmazó peptidszakasz hozzáférhetősége és/vagy dinamikája megváltozott, amely magyarázatul szolgálhat az egyes hE3 variánsokban tapasztalt FAD-vesztésre és összefüggésbe hozható a megváltozott enzimaktivitásokkal. Szintén HDX-MS adatok alapján valószínűsíthető, hogy a Gly194Cys- és Pro453Leu-hE3 mutánsok esetében a fokozott ROS-termelés hátterében az LS-kötő zsebben, a FAD izoalloxazin-gyűrűjének *si* oldalán bekövetkező szerkezeti változások állnak. A Glu340Lys-hE3 esetében egy LS-kötő zsebhez közeli peptidszakasz (275-289) elmozdulása, ill. a FAD izoalloxazin-gyűrűjének megváltozott konformációja/reaktivitása stimulálhatja a ROS-képző aktivitást. Nem volt ugyanakkor kimutatható az LS-kötőhely érintettsége az Asp444Val szubsztitúció esetében, az erősödő szuperoxid-képzésnek más mechanizmus által kell megvalósulnia, feltehetőleg a FAD prosztetikus csoport érintettségével. Bizonyos aminosav-szubsztitúciók esetében (Glu340Lys, Asp444Val, Arg447Gly, Arg460Gly, Lys37Glu, Ile318Thr, Ile358Thr, Ile445Met) kimutatható volt ezen felül egyes, hPDHk-E3KF-vel való interakcióban szerepet játszó peptidfragmensek [12, 13] megváltozott mozgékonyága is. Ennek köszönhetően szerkezetalapú bizonyítást nyertek korábbi disszociációs állandó mérések eredményei öt patogén mutáns esetében (lásd fent).

Munkacsoportunkban tovább folyik a betegséget-okozó hE3 variánsok, ill. a hE1 és hE2 komponensek biokémiai, biofizikai és szerkezeti analízise a humán E3-deficiencia molekuláris patomechanizmusainak minél pontosabb megértése és potenciális farmakológiai támadáspontok kijelölése céljából.

Terápiás konklúziók

A fokozott ROS-termelő kapacitással rendelkező patogén hE3 variánsok és a hKGDHk E1-E2 alkomplexe általi szignifikáns ROS-termelés tekintetében ténylegesen indokolt lehet egy kiegészítő antioxidáns-terápia alkalmazása is a humán E3-deficiencia bizonyos típusainak kezelése során. Kifejezetten hatásosnak bizonyulhat a liponsav antioxidáns adása, mivel az direkt módon gátolhatja a patogén hE3 mutánsok ROS-termelését, elsősorban az E3-deficienciát általában kísérő acidózisban. Flavinok adása ugyancsak ésszerű terápiás lehetőség lehet azon mutációk esetében, amelyek a hE3 FAD-tartalmának csökkenéséhez vezetnek, ehhez azonban mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* körülmények között vizsgálni szükséges a szóban forgó mutáns enzimek flavinpótlásra adott válaszát. A jövőben terápiás megoldást jelenthetne a vad típusú hE3-mal végzett ún. enzimhelyettesítő-terápia, melynek hatékonyságára vonatkozóan biztató eredmények születtek egér-modellben és humán sejtek vizsgálatakor [59-63].

Irodalomjegyzék

- [1] Ambrus, A., Adam-Vizi, V. (2017) Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism. *Neurochemistry International*, , **in press**.
- [2] Quinonez, S.C., Thoene, J.G., (2014), Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency, in: R.A. Pagon, Adam, M. P., Ardinger, H. H., et al. (Ed.) GeneReviews® [Internet] 1993-2016, *Seattle (WA): University of Washington, Seattle*, pp. 1-37.
- [3] Shaag, A., Saada, A., Berger, I., Mandel, H., Joseph, A., Feigenbaum, A., Elpeleg, O.N. (1999) Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *American Journal of Medical Genetics*, **82: (2)** 177-182.

- [4] Quinonez, S.C., Leber, S.M., Martin, D.M., Thoene, J.G., Bedoyan, J.K. (2013) Leigh Syndrome in a Girl With a Novel DLD Mutation Causing E3 Deficiency. *Pediatric Neurology*, **48: (1)** 67-72.
- [5] Cameron, J.M., Levandovskiy, V., MacKay, N., Raiman, J., Renaud, D.L., Clarke, J.T.R., Feigenbaum, A., Elpeleg, O., Robinson, B.H. (2006) Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **140A: (14)** 1542-1552.
- [6] Brautigam, C.A., Chuang, J.L., Tomchick, D.R., Machius, M., Chuang, D.T. (2005) Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD(+)/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *J. Mol. Biol.*, **350: (3)** 543-552.
- [7] Ambrus, A., Torocsik, B., Tretter, L., Ozohanics, O., Adam-Vizi, V. (2011) Stimulation of reactive oxygen species generation by disease-causing mutations of lipoamide dehydrogenase. *Human Molecular Genetics*, **20: (15)** 2984–2995.
- [8] Vaubel, R.A., Rustin, P., Isaya, G. (2011) Mutations in the Dimer Interface of Dihydrolipoamide Dehydrogenase Promote Site-specific Oxidative Damages in Yeast and Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **286: (46)** 40232-40245.
- [9] Ambrus, A., Wang, J.J., Mizsei, R., Zambo, Z., Torocsik, B., Jordan, F., Adam-Vizi, V. (2016) Structural alterations induced by ten disease-causing mutations of human dihydrolipoamide dehydrogenase analyzed by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry: Implications for the structural basis of E3 deficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1862: (11)** 2098-2109.
- [10] Park, Y.-H., Patel, M.S. (2010) Characterization of interactions of dihydrolipoamide dehydrogenase with its binding protein in the human pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **395: (3)** 416-419.
- [11] Patel, M.S., Korotchkina, L.G., Sidhu, S. (2009) Interaction of E1 and E3 components with the core proteins of the human pyruvate

dehydrogenase complex. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **61: (1-2)** 2-6.

[12] Ciszak, E.M., Makal, A., Hong, Y.S., Vettaikorumakankauv, A.K., Korotchkina, L.G., Patel, M.S. (2006) How dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein binds dihydrolipoamide dehydrogenase in the human pyruvate dehydrogenase complex. *Journal of Biological Chemistry*, **281: (1)** 648-655.

[13] Brautigam, C.A., Wynn, R.M., Chuang, J.L., Machius, M., Tomchick, D.R., Chuang, D.T. (2006) Structural insight into interactions between dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) and E3 binding protein of human pyruvate dehydrogenase complex. *Structure*, **14: (3)** 611-621.

[14] Ambrus, A., Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *Journal of Neurochemistry*, **109:** 222-229.

[15] Ambrus, A., Nemeria, N.S., Torocsik, B., Tretter, L., Nilsson, M., Jordan, F., Adam-Vizi, V. (2015) Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. *Free Radical Biology and Medicine*, **89:** 642-650.

[16] Mailloux, R.J., Gardiner, D., O'Brien, M. (2016) 2-Oxoglutarate dehydrogenase is a more significant source of O₂·-/H₂O₂ than pyruvate dehydrogenase in cardiac and liver tissue. *Free Radical Biology and Medicine*, **97:** 501-512.

[17] Quinlan, C.L., Goncalves, R.L., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V.I., Brand, M.D. (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. *Journal of Biological Chemistry*, **289: (12)** 8312-25.

[18] Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience*, **24: (36)** 7771-7778.

- [19] Starkov, A.A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, **24**: (36) 7779-7788.
- [20] Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, **27**: (12) 639-645.
- [21] Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360**: (1464) 2335-2345.
- [22] Adam-Vizi, V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**: (9-10) 1140-1149.
- [23] Fisher-Wellman, K.H., Gilliam, L.A.A., Lin, C.T., Cathey, B.L., Lark, D.S., Neuffer, P.D. (2013) Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. *Free Radical Biology and Medicine*, **65**: 1201-1208.
- [24] Tretter, L., Ambrus, A. (2014) Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria. *Methods Enzymol*, **547**: 199-223.
- [25] Gazaryan, I.G., Krasnikov, B.F., Ashby, G.A., Thorneley, R.N.F., Kristal, B.S., Brown, A.M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: (12) 10064-10072.
- [26] Lai, J., Cooper, A. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, **47**: (5) 1376-86.
- [27] Klyachko, N.L., Shchedrina, V.A., Efimov, A.V., Kazakov, S.V., Gazaryan, I.G., Kristal, B.S., Brown, A.M. (2005) pH-dependent substrate

preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state - Response to mitochondrial matrix acidification. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: (16) 16106-16114.

[28] Massey, V. (1960) The identity of diaphorase and lipoyl dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **37**: 314-322.

[29] Liu, T.C., Kim, H., Arizmendi, C., Kitano, A., Patel, M.S. (1993) Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: (11) 5186-5190.

[30] Sakaguchi, Y., Yoshino, M., Aramaki, S., Yoshida, I., Yamashita, F., Kuhara, T., Matsumoto, I., Hayashi, T. (1986) Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency - a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction. *European Journal of Pediatrics*, **145**: (4) 271-274.

[31] Hong, Y.S., Korman, S.H., Lee, J., Ghoshal, P., Qu, Q., Barash, V., Kang, S., Oh, S., Kwon, M., Gutman, A., Rachmel, A., Patel, M.S. (2003) Identification of a common mutation (Gly194Cys) in both Arab Moslem and Ashkenazi Jewish patients with dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Possible beneficial effect of vitamin therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **26**: (8) 816-818.

[32] Poulsen, L.L., Wedding, R.T. (1970) Purification and properties of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex of cauliflower mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **245**: 5709-5717.

[33] Erfle, J.D., Sauer, F. (1969) The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and α -oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **178**: 441-452.

[34] Reed, L.J., Oliver, R.M. (1968) The multienzyme α -keto acid dehydrogenase complexes. *Brookhaven Symp. Biol.*, **21**: 397-412.

[35] Bunik, V.I., Sievers, C. (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur. J. Biochem.*, **269**: (20) 5004-5015.

- [36] Mottley, C., Mason, R.P. (2001) Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **276: (46)** 42677-42683.
- [37] Kooyman, E.C. (1967) Thiyl radicals. *Pure and Applied Chemistry*, **15: (1)** 81-88.
- [38] Nemeria, N.S., Ambrus, A., Patel, H., Gerfen, G., Adam-Vizi, V., Tretter, L., Zhou, J., Wang, J., Jordan, F. (2014) Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex E1 Component Forms a Thiamin-derived Radical by Aerobic Oxidation of the Enamine Intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, **289: (43)** 29859-29873.
- [39] Heggermont, W.A., Papageorgiou, A.P., Quaegebeur, A., Deckx, S., Carai, P., Verhesen, W., Eelen, G., Schoors, S., van Leeuwen, R., Alekseev, S., Elzenaar, I., Vinckier, S., Pokreisz, P., Walravens, A.S., Gijssbers, R., Van Den Haute, C., Nickel, A.G., Schroen, B., van Bilsen, M., Janssens, S., Maack, C., Pinto, Y.M., Carmeliet, P., Heymans, S. (2017) Inhibition of MicroRNA-146A and Overexpression of its Target Dihydrolipoyl Succinyltransferase Protect Against Pressure-Overload Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction. *Circulation*.
- [40] Diaz-Munoz, M.D., Bell, S.E., Fairfax, K., Monzon-Casanova, E., Cunningham, A.F., Gonzalez-Porta, M., Andrews, S.R., Bunik, V.I., Zarnack, K., Curk, T., Heggermont, W.A., Heymans, S., Gibson, G.E., Kontoyiannis, D.L., Ule, J., Turner, M. (2015) The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nature Immunology*, **16: (4)** 415-425.
- [41] Dumont, M., Ho, D.J., Calingasan, N.Y., Xu, H., Gibson, G., Beal, M.F. (2009) Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *Free Radical Biology and Medicine*, **47: (7)** 1019-1027.
- [42] Shi, Q.L., Chen, H.L., Xu, H., Gibson, G.E. (2005) Reduction in the E2k subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex has

effects independent of complex activity. *Journal of Biological Chemistry*, **280: (12)** 10888-10896.

[43] Gibson, G.E., Zhang, H., Sheu, K.F.R., Bogdanovich, N., Lindsay, J.G., Lannfelt, L., Vestling, M., Cowburn, R.F. (1998) alpha-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Annals of Neurology*, **44: (4)** 676-681.

[44] Cruts, M., Backhovens, H., Vangassen, G., Theuns, J., Wang, S.Y., Wehnert, A., Vanduijn, C.M., Karlsson, T., Hofman, A., Adolfsson, R., Martin, J.J., Vanbroeckhoven, C. (1995) Mutation analysis of the chromosome 14q24.3 dihydrolipoamide succinyltransferase (dlst) gene in patients with early-onset Alzheimer-disease. *Neuroscience Letters*, **199: (1)** 73-77.

[45] Nakano, K., Takase, C., Sakamoto, T., Nakagawa, S., Inazawa, J., Ohta, S., Matuda, S. (1994) Isolation, characterization and structural organization of the gene and pseudogene for the dihydrolipoamide succinyltransferase component of the human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *European Journal of Biochemistry*, **224: (1)** 179-189.

[46] Quintana, E., Pineda, M., Font, A., Vilaseca, M.A., Tort, F., Ribes, A., Briones, P. (2010) Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) deficiency in a Spanish patient with myopathic presentation due to a new mutation in the interface domain. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **33: S315-S319**.

[47] Odievre, M.H., Chretien, D., Munnich, A., Robinson, B.H., Dumoulin, R., Masmoudi, S., Kadhom, N., Rötig, A., Rustin, P., Bonnefont, J.P. (2005) A novel mutation in the dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency. *Human Mutation*, **25: (3)** 323-324.

[48] Shany, E., Saada, A., Landau, D., Shaag, A., HersHKovitz, E., Elpeleg, O.N. (1999) Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **262: (1)** 163-166.

- [49] Sahlman, L., Williams, C.H. (1989) Titration studies on the active sites of pig heart lipoamide dehydrogenase and yeast glutathione reductase as monitored by the charge transfer absorbance. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: (14) 8033-8038.
- [50] Tsai, C.S., Templeton, D.M., Wand, A.J. (1981) Multifunctionality of lipoamide dehydrogenase: Activities of chemically trapped monomeric and dimeric enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**: (1) 77-86.
- [51] Visser, J., Veeger, C. (1968) Relations between conformations and activities of lipoamide dehydrogenase. 3. Protein association-dissociation and the influence on catalytic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, **159**: (2) 265-275.
- [52] Kalse, J.F., Veeger, C. (1968) 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**: (2) 244-56.
- [53] Massey, V., Gibson, Q.H., Veeger, C. (1960) Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase). *Biochem. J.*, **77**: 341-51.
- [54] Massey, V. (1960) The composition of the ketoglutarate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **38**: 447-460.
- [55] Babady, N.E., Pang, Y.P., Elpeleg, O., Isaya, G. (2007) Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: (15) 6158-6163.
- [56] Ambrus, A., Mizsei, R., Adam-Vizi, V. (2015) Structural alterations by five disease-causing mutations in the low-pH conformation of human dihydrolipoamide dehydrogenase (hLADH) analyzed by molecular dynamics – Implications in functional loss and modulation of reactive oxygen species generation by pathogenic hLADH forms. *Biochemistry and Biophysics Reports*, **2**: 50-56.
- [57] Ambrus, A., Adam-Vizi, V. (2013) Molecular dynamics study of the structural basis of dysfunction and the modulation of reactive oxygen

species generation by pathogenic mutants of human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **538: (2)** 145-155.

[58] Liu, T.C., Korotchkina, L.G., Hyatt, S.L., Vettakkorumakankav, N.N., Patel, M.S. (1995) Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its side-directed mutants. *Journal of Biological Chemistry*, **270: (26)** 15545-15550.

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

[60] Lin, B.Y., Kao, M.C., Sci, N.Y.A., Therapeutic applications of the TAT-mediated protein transduction system for complex I deficiency and other mitochondrial diseases, *Mitochondrial Research in Translational Medicine* 2015, pp. 17-28.

[61] Rapoport, M., Salman, L., Sabag, O., Patel, M.S., Lorberboum-Galski, H. (2011) Successful TAT-mediated enzyme replacement therapy in a mouse model of mitochondrial E3 deficiency. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, **89: (2)** 161-170.

[62] Papadopoulou, L.C., Tsiftoglou, A.S. (2011) Transduction of Human Recombinant Proteins into Mitochondria as a Protein Therapeutic Approach for Mitochondrial Disorders. *Pharmaceutical Research*, **28: (11)** 2639-2656.

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



Szabó Eszter a Semmelweis Egyetemen szerezte gyógyszerész diplomáját 2014-ben, azt megelőzően három évben Köztársasági Ösztöndíjban részesült. Doktori munkáját 2015 óta a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetében, az MTA-SE Neurobiokémiai Munkacsoportban végzi Ambrus Attila témavezetésével. Nem sokkal PhD-tanulmányai megkezdése után két hónapos külföldi tanulmányúton vett részt a Helmholtz-Zentrum Berlin kutatóintézet Makromolekula Krisztallográfia csoportjában, melynek során megismerkedhetett a röntgenkrisztallográfia alapjaival. Doktori témája a humán α -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex E3 alegysége patogén mutánsainak röntgenkrisztallográfiás szerkezetmeghatározása.



Ambrus Attila a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézetének adjunktusa, az MTA-SE Neurobiokémiai Munkacsoportban tudományos főmunkatárs, végzettségét tekintve okleveles vegyész. A Debreceni Egyetemen a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezte doktori munkáját, doktori értekezését 2001-ben védte meg. Az Arizonai Egyetemen volt posztdoktori ösztöndíjas 2000 és 2006 között, ahol fehérje- és nukleinsav-szerkezetkutatással foglalkozott. A Semmelweis Egyetemen érdeklődésének középpontjában a humán α -ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex által katalizált ROS-képzésnek, illetve a humán E3-deficiencia betegség molekuláris patomechanizmusának a vizsgálata áll. Fontosabb szakmai elismerései: kétszeri Bolyai Ösztöndíj, Bolyai Plakett, Fulbright Ösztöndíj, EMBO Ösztöndíj ("short-term"), Merit Díj (SE).