

A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz betegséget okozó variánsainak és a szangvinarin-kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek szerkezetvizsgálata

Doktori tézisek

Mizsei Réka

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Gáspári Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Noszál Béla, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bodor Andrea, PhD., egyetemi adjunktus

Dr. Mészáros Tamás, PhD., egyetemi docens

Budapest
2020

BEVEZETÉS

A dolgozat központi kérdése, hogy mi a kapcsolat a molekulák szerkezete, dinamikája, a közöttük kialakuló kölcsönhatások, valamint az azokból felépülő makroszkopikus rendszerek viselkedése között. Doktori munkám során a témák megválasztását az motiválta, hogy gyakorlati példákon keresztül szerezzek rálátást a biokémiában alkalmazott szerkezetvizsgálati módszerek erősségeire és korlátaira.

A dolgozat két fő részből áll, az első részben szerves kismolekulák – a szangvinarin és a kukurbituril – zárványkomplexeit vizsgáltuk, míg a második részben egy összetett szerepet betöltő enzim fehérje – a humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz – betegséget okozó variánsainak szerkezeti sajátosságait tárgyalják.

A szangvinarin (SA), egy természetes eredetű benzo[c]fenantridin alkaloid, mely felhasználását elsősorban sejtkárosító hatásának köszönheti: baktérium- és gombaölő, gyulladáscsökkentő, helyi érzéstelenítő, valamint hatékony rákellenes szer. Alkalmazásában kihívást jelent, hogy a SA lúgos kémhatásra, valamint oxidációra érzékeny vegyület. Együttműködőink, Dr. Biczók László laboratóriumában

felismerték fel, hogy a kukurbituril, mint hordozóközeg jelentősen fokozza a SA stabilitását. A kukurbit[n]uril (CBn) család tagjai n db glükouril-csoportból felépülő makrociklusos vegyületek., melyek hajlamosak zárványkomplexek kialakítására. A zárványkomplex képző – más néven gazda – molekulák olyan makrociklusos vegyületek, melyek üreges szerkezetüknek köszönhetően a vendégmolekulákkal stabil, nem kovalens kölcsönhatások kialakítására képesek, így a vendégmolekulát részben vagy egészben elzárják a külvilágtól. Munkám megkezdésekor nem rendelkezünk információval a SA-CB7 zárványkomplexek sztöchiometriájáról és a komplexek szerkezetéről.

A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hE3) egy flavin-diszulfid-oxidoreduktáz; mely a cukrok és aminosavak anyagcseréjében játszik fontos szerepet. A hE3 a mitokondriumban található α -ketosav-dehidrogenáz komplex család tagjainak közös alkotóeleme; valamint a glicin-hasító rendszernek is alegysége. Az izolált LADH a dehidrogenáz aktivitása mellett, a változatos elektronakceptorok felhasználásával diaforázként és oxidázként is működhet, valamint proteolitikus aktivitást is mutathat. Kevés ismert arról,

mi szabályozza a hE3 változatos szerepei közötti egyensúlyt; azonban az egyértelmű, hogy akár egy-egy aminosav mutációja is képes felborítani azt, ahogyan ezt láthatjuk a dihidrolipoamid-dehidrogenáz-elégtelenség esetén. Tizennégy klinikai jelentőségű hE3 variánst mutattak ki napjainkig, amik dihidrolipoamid-dehidrogenáz-elégtelenséghez vezettek, melyeknek leggyakoribb korai tünetei a hipotónia, elsavasodás és az elágazó láncú aminosavak vérben való felszaporodása. Munkánk megkezdése előtt kísérleti információ nem állt rendelkezésre a hE3 variánsok szerkezetéről, a dihidrolipoamid-dehidrogenáz-elégtelenség szerkezeti patomechanizmusára vonatkozó ismereteink biokémiai, biofizikai esszékre és a vad típusú hE3 kristályszerkezeteire szorítkoztak. Ezek a tanulmányok feltárták, hogy a hE3 és variánsai 100 KDa méretű funkcionális homodimert képeznek, a monomerek katalitikus zsebében egy-egy FAD helyezkedik el.

CÉLKITŰZÉSEK

A szangvinarin (SA) és kukurbit[7]uril (CB7) zárványkomplexeinek jellemzése. A szangvinarin gyakorlati alkalmazhatóságával kapcsolatban kémiai instabilitása jelent kihívást, azonban a zárványkomplex-képző hajlamáról ismert CB7 adagolása jelentősen megnöveli a SA stabilitását. Fel kívántuk tárni, hogyan fejt ki a CB7 a stabilizáló hatását úgy, hogy zárványkomplex képződése során a SA molekula egészét mérete miatt nem tudja egy CB7 leárnyékolni. Az irodalmi példákat áttekintve számos kérdés merült fel a két molekula kölcsönhatásával kapcsolatban: Vajon megtörténik-e a beágyazódás, vagy csak ionos kölcsönhatás alakul ki a SA⁺ és a CB7 karboxil-csoportjai közt? Van-e a SA⁺-nak kedvezményezett fele a zárványkomplex képződés során vagy mindkét vége hasonló valószínűséggel ágyazódik be? Kialakulnak-e magasabb szerveződésű, makromolekuláris szerkezetek is az oldatban? Munkám során a gazda- és vendégmolekulák közötti kölcsönhatás szerkezeti feltárását biológiailag releváns, alacsony koncentrációjú, vizes oldatokban kívántam kivitelezni. NMR spektroszkópiás méréseket terveztem, melyek lehetővé teszik az oldatban kialakuló

komplexek méretének, sztöchiometriájának és orientációjának feltárását, valamint az egyes specieszek közti egyensúlyi állandók meghatározását.

Az E3-elégtelenség fehérjeszerkezeti értelmezése. Doktori munkám során célul tűztem ki a hE3 fehérje 14 ismert patogén variánsának előállítását és szerkezeti sajátosságainak vizsgálatát. A szerkezeti munka előkészítő lépéseként a laboratóriumunkban korábban kidolgozott fehérje előállítási és tisztítási eljárás továbbfejlesztése volt a célom.

A patogén hE3 variánsok fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását két irányból közelítettem meg: célom volt a hE3 variánsok oldatszerkezetének és dinamikájának feltárása hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriával (HDX MS), valamint a hE3 variánsok kristályosítása és kristályszerkezetének megismerése.

A D444V-hE3 variáns sikeres kristályosítása után célom volt a kristály diffrakciós képességének javítása, annak fagyasztására szolgáló optimális krio-védőoldat megtalálása, a diffrakciós adatgyűjtés és az előzetes adatfeldolgozás, valamint modellépítés.

MÓDSZEREK

A dolgozat első felében a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) módszer oldatfázisú alkalmazására mutatok egy példát. Az NMR spektroszkópiát nemcsak mint szerkezetigazolásra alkalmas kísérleti módszert alkalmaztuk, hanem az oldatban található kismolekulák közötti kölcsönhatások termodinamikáját és a kialakuló szupramolekuláris szerkezetek méretét is jellemeztük. Az NMR-rel meghatározott molekulaméret közvetlenül összevethető volt a molekulamodellezésből származó értékekkel. Eredményeink kiegészítették az együttműködőink által fotokémiai módszerekkel meghatározott kinetikai paramétereket, amelyeket figyelembe véve egy dinamikus egyensúlyban lévő komplex rendszer modelljét állítottam fel.

Tanulmányunk a fehérjék oldatszerkezetének vizsgálatára a hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriát alkalmazta. Ez a mérés technika az előzőhöz hasonlóan a makromolekula oldatbéli dinamikus viselkedéséről ad felvilágosítást. A munka során nemcsak egy konkrét fehérje, a humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hE3) mutációk hatására bekövetkező szerkezetváltozását követtük, hanem a konkrét szerkezeti példán

keresztül értelmeztük, hogy mely ismert szerkezeti és dinamikai paraméterek játszanak fontos szerepet a hE3 egyes amid protonjainak cseresebesség profiljának kialakításában.

A dolgozatban alkalmazott harmadik nagyműszeres technika a fehérje kristályosítás és egykristály röntgenkrisztallográfia. A hE3 variánsok kristályosítási kísérleteit bemutatva számos manuális és gépekkel segített kristályosítási eljárásról tesztek említést, valamint tárgyalom, hogyan hozható összefüggésbe a fehérjék termikus stabilitása és kristályképző hajlandósága. A dolgozatban röviden ismertetem a D444V-hE3 patogén variáns kristályszerkezetének meghatározását is.

Doktori kutatásom során lehetőségem volt elsajátítani az alapvető molekuláris biológiai eljárásokat, mit a fehérje variánsok előállítása rekombináns DNS technikával prokarióta rendszerben, fehérje elválasztás affinitás kromatográfiával és gélelektroforézis módszerekkel, fehérjék olvadási hőmérsékletének meghatározása termofluor mérésekkel.

EREDMÉNYEK

1. NMR spektroszkópiával kimutattam, hogy a SA és CB7 1:1 és 1:2 molarányú zárványkomplexekeket is kialakít.
2. ^1H NMR-rel mért koncentrációarányok alapján meghatároztam a SA:CB7 elegyben a 1:2-komplexbéfeződési egyensúlyi állandó értékét $K_2 = \frac{[1:2]}{[1:1][CB7]} = 2900 \text{ L/mol}$
3. Koncentráció és hőmérsékletfüggő ^1H NMR vizsgálatokkal, valamint ^1H - ^1H NOESY mérések alapján igazoltam, a SA:CB7 zárványkomplexekek geometriáját. A legfontosabb szerkezeti felismerés az, hogy a SA I-gyel jelölt végének beágyazódása kedvezményezett a CB7 üregébe.
4. ^1H DOSY NMR mérésekkel közelítőleg meghatároztam az 1:1 és 1:2 SA:CB7 zárványkomplexekek látszólagos hidrodinamikai sugarát ($7,5 \pm 0,7 \text{ \AA}$; $8,6 \pm 0,8 \text{ \AA}$), ezzel alátámasztottuk, hogy a 1:2 komplex nagyobb a 1:1-nél, azonban csak 15%-kal haladja meg azt, ami összhangban áll a molekulamodellekben látott kompakt 1:2 komplex szerkezettel.
5. A patogén hE3 variáns fehérjék bakteriális kultúrában való előállításai és affinitás kromatográfiás tisztítási eljárását optimalizáltam.

6. A hE3 oldatbeli dinamikáját és egyes peptid szegmenseinek oldószerhozzáférhetőségét hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriával (HDX MS) határoztuk meg. A korábban közölt kristályszerkezettel összhangban a dimer központi magját képező (261-274, 434-441, 459-464 aminosavak közti peptid szakasz) szegmensek esetében nem volt kimutatható deutérium csere. A felületi, szigorú másodlagos struktúrával nem jellemezhető régiók deutériumcsere százaléka kiemelkedő (275-289, 339-351). Meglepő a kristály szerkezetben szorosan pakolt, a monomerek közt 6 hidrogén kötést létesítő 81-85 peptidszakasz kiemelkedő mobilitása. Javasoljuk, hogy ennek a régiónak a mobilitása fontos szerepet játszik a ligandum felvételben.

7. Értelmeztük a hE3 tíz patogén mutánsának a fehérje szerkezetére és dinamikájára való hatását HDX MS módszerrel. Az egyes mutánsok egyéni deutériumcsere mintázatot mutattak, de egyik esetben sem volt lényeges változás a dimerizációs felület deutériumfelvételében. Négy mutáns (I318T, E340K, I445M, R447G és P453L) esetén megnövekedett mobilitást tapasztaltunk a C terminális régióban, ami azért érdekes, mert ez a fehérjeszakasz a kristályszerkezetben visszahajlik stabil magot képező dimerizációs régióba. A G194C mutáció hatása a

NAD⁺/NADH kötőfelületen kimutatható. A D444V az egyetlen variáns, mely mutációt körülvevő régióban idéz elő jelentős változásokat. A K37C, R460G, I358T variánsok esetén kis mértékű, a fehérje egészére kiterjedő változások voltak megfigyelhetőek.

8. Termofluor vizsgálatokkal meghatároztuk a hE3 olvadási hőmérsékletét 55 különböző fehérjék oldatban tartására gyakran használt oldószer körülmény között. A fehérje kiemelkedő termostabilitást mutatott, átlagos olvadási hőmérséklete 88.44°C-nak adódott, melyet a magas sótartalom és alacsony kémhatás jelentősen csökkentett (54.50°C, 50 mM nátrium citrát pH 5.0 250 mM NaCl); míg a legnagyobb termostabilitást a (89.50 °C) 50 mM PIPES pH 6.7 pufferben mutatta. Mindezek a vizsgálatok előkészítették a fehérjekristályosítási körülmények kidolgozását.

9. Az hE3 patogén variánsainak olvadási hőmérséklete az oldószer függvényében hasonló tendenciákat mutatott, mint a vad típus. A P453L mutáns átlagos olvadási hőmérséklete jelentősen alacsonyabb a vad típusnál (64.5°C), a többi variánsra is kis mértékű csökkenés jellemző. Ebből a megfigyelésből arra következtettünk, hogy a mutációk destabilizálják a fehérje harmadlagos szerkezetét.

10. Kikristályosítottam a D444V-hE3 patogén mutánsát. Molekuláris helyettesítés módszerével javaslatot tettem a D444V-hE3 variáns szerkezetére, mely a vad típuséhoz hasonló szerkezetet mutatott. A 1,84 Å felbontású D444V-hE3 kristály az ortorombos $P2_12_12$ tércsoportban kristályosodott, az elemi cella paraméterei $a=118,04$; $b=168,94$; $c=61,28$ Å voltak.

KÖVETKEZTETÉSEK

A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek felhasználási lehetőségei

Számos tanulmány foglalkozott azzal, hogyan befolyásolja a CBn-lal történő zárványkomplekképződés a vendégmolekulák protonálódását, azonban tanulmányunk volt az első példa az irodalomban, mely bemutatta, hogy a zárványkomplekképződés védelmet jelent a nukleofil támadás ellen. Ezzel együtt munkánk fontos eredménye, hogy jelentős növekedést sikerült elérnünk a SA vendégmolekula fotostabilitásában. A CB7 biokompatibilitásának köszönhetően nemcsak a SA stabilizálására, hanem a SA alapú gyógyszerek bejuttatására is alkalmas adalékanyag lehet. Az utóbbi években számos megoldást láttunk a CBn funkcionálására, amely a gyógyszermolekulák irányított célba juttatásának lehetőségét hordozza magában, továbbá a pH csökkentésével SA irányított leadása is megvalósítható a zárványkomplexeiből.

Munkán különösen a szerkezeti kémikusok figyelmét keltette fel; idézettségének nagy részét annak köszönheti, hogy példát mutat egy olyan vendégmolekula:CBn rendszerre, melyben mind az 1:1, mind az 1:2 komplex egyszerre

megfigyelhető, azokoknak szerkezete és affinitása jól karakterizált. A tanulmányunk szemlélteti azt is, hogy a CBN affinitása a vendégmolekulákhoz milyen érzékeny az apró szerkezeti módosításokra. A SA egy közel szimmetrikus molekula, melyben a pozitív töltés egy aromás gyűrűrendszer közepén helyezkedik el. A SA két felének különböző hosszából eredő aszimmetriája viszont több mint három nagyságrend eltérést eredményez a két molekularészlet affinitásában a CB7-hez. A CBN zárványkomplexek affinitásának elméleti számítása a mai napig kihívást jelent, különösen erőforrásigényes a töltéssel rendelkező vendégmolekulák kezelése. A kísérleti megfigyeléseink modellrendszerként szolgálhatnak a vendéggazdamolekula rendszerekre kidolgozott molekuláris modellezési algoritmusok továbbfejlesztésében.

A hE3-elégtelenség értelmezésében történt előrelépések

Munkám több irányból is megközelíti a betegséget okozó hE3 variánsok patomechanizmusának szerkezeti értelmezését. A HDX MS módszerrel végzett vizsgálatok alapot szolgáltatnak a hE3 variáns fehérjék oldatbéli dinamikájának értelmezéséhez, amely elősegítheti annak az értelmezését, hogy a hE3 milyen dinamikai változások során fejt ki a hatását,

együttműködve a további fehérjékkel a multienzim komplexekben; és ezek a kölcsönhatások hogyan sérülhetnek a mutációk hatására. A hE3 szerkezeti dinamikájának ismerete elősegítheti továbbá azoknak hE3-at megcélzó kismolekuláknak a tervezését, melyek később gyógyszerként is szolgálhatnak. A kristályosítási próbák során szerzett tapasztalataim további hE3 variánsok kristályosítását és szerkezetmegoldását segítette elő, így az egyre növekvő számú nagyfelbontású hE3 variáns kristályszerkezetek ismeretében, lehetőség nyílik a mutációk szerkezeti hatásának modellezésére. A mutáns hE3 kristályszerkezetek alapvető kiegészítő információkat szolgáltathatnak a későbbiekben a hE3 molekuláris kölcsönhatásait vizsgáló további módszerek számára, mint a krio-elektron mikroszkópia, Förster-típusú rezonáns energiaátadás vagy az NMR spektroszkópia.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. Ambrus A¹, Wang J¹, **Mizsei R**¹, 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

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE 1862: 11 pp. 2098-2109. (2016)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

¹Megosztott első szerzők

IF: 5,476

2. 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 RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 124 pp. 214-220. (2018)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 5,657

3. Ambrus A, **Mizsei R**, Adam-Vizi V

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 pp. 50-56. (2015)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

4. Miskolczi Z, Megyesi M, Tarkanyi G, **Mizsei R**, Biczok L
Inclusion complex formation of sanguinarine alkaloid with
cucurbit[7]uril: inhibition of nucleophilic attack and
photooxidation

ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY9: 4 pp.
1061-1070. (2011)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 3,696

II. Egyéb –nem az értekezés témájában megjelent –eredeti közlemények:

5. Ágg B, Császár A, Szalay-Bekő M, Veres DV, **Mizsei R**,
Ferdinandy P, Csermely P, Kovács IA

The EntOptLayout Cytoscape plug-in for the efficient
visualization of major protein complexes in protein–protein
interaction and signalling networks

BIOINFORMATICS35: 21 pp. 4490-4492. (2019)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 5,61

6. Kovács IA, **Mizsei R**, Csermely P

A unified data representation theory for network visualization,
ordering and coarse-graining

SCIENTIFIC REPORTS 5 Paper: 13786, 10 p. (2015)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 5,228

7. Pálmai M, Naszályi Nagy Lívía, Mihály J, Varga Z, Tárkányi
G, **Mizsei R**, Szigyártó IC, Kiss T, Kremmer T, Bóta A

Preparation, purification, and characterization of aminopropyl-
functionalized silica sol

JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE

390: 1 pp. 34-40. (2013)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 3,552

8. Tárkányi G, Németh K, **Mizsei R**, Tőke O, Visy J, Simonyi M, Jicsinszky L, Szemán J, Szente L

Structure and stability of warfarin-sodium inclusion complexes formed with permethylated monoamino- β -cyclodextrin

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 72 pp. 292-298. (2013)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 2,829

9. Kubinyi M, Varga O, Baranyai P, Kállay M, **Mizsei R**, Tárkányi G, Vidóczy T

Metal complexes of the merocyanine form of nitrobenzospyran: Structure, optical spectra, stability

JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE 1000: 1-3 pp. 77-84. (2011)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 1,634

10. Németh K, Tárkányi G, Varga E, Imre T, **Mizsei R**, Iványi R, Visy J, Szemán J, Jicsinszky L, Szente L, Simonyi M

Enantiomeric separation of antimalarial drugs by capillary electrophoresis using neutral and negatively charged cyclodextrins

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 54: 3 pp. 475-481. (2011)

Folyóiratcikk/Szakcikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 2,967

11. **Mizsei Réka**

Módosított élelmiszerek

KÉMIAI PANORÁMA 5 pp. 14-17. (2011)

Folyóiratcikk/Ismertetés (Folyóiratcikk)/Ismeretterjesztő