

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

Doktori téziszfüzet

**Dr. Nagy Bálint**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető:

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

Hivatalos bírálók:

Dr. Király Róbert, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Hegedűs Tamás, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csala Miklós, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Harmat Veronika, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Keszler Gergely, PhD, egyetemi docens

Budapest

2022

## Bevezetés

Az  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplexek (KSDHk-k) kulcsszerepet töltenek be a sejtek energiatermelő és metabolikus folyamataiban. Katalitikus reakcióikban  $\alpha$ -ketosavak oxidatív dekarboxilezése során acil-koenzim-A (acil-KoA) és  $\text{CO}_2$  keletkezik, melyet nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) redukciója kísér.

A reakciók pontos végbemeneteléhez legalább három komplexalkotó (E1, E2, E3) összehangolt működése szükséges. A szakirodalom az alegységek faji eredetét (pl.: humán, h) és szubsztrát-specifitását (pl.:  $\alpha$ -ketoglutarát, k) kisbetűkkel jelöli.

Az enzimek sorszámuk sorrendjében egyre csökkenő szubsztrátspecifitást mutatnak. Míg a névadó E1 alegységek (E1p: piruvát-dehidrogenáz, E1k:  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz, E1a:  $\alpha$ -ketoadipát-dehidrogenáz, E1e: elágazó szénláncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz) komplexenként eltérnek, addig az E2 alegységeket (E2p: dihidrolipoamid-acetiltranszferáz, E2k/a: dihidrolipoamid-szukciniltranszferáz, E2e: dihidrolipoamid-aciltranszferáz) részben, az E3 alegységet (dihidrolipoamid-dehidrogenáz) pedig teljes mértékben megosztják.

A specifitásban elsőrangú felelősséggel bíró E1 alegység tiamin-difoszfát (*thiamine diphosphate*, ThDP) koenzime révén a szubsztrátot dekarboxilálja. A  $\text{CO}_2$  felszabadulása által irreverzibilis folyamat során keletkező  $\alpha$ -hidroxialkil-egység végül acilcsoportként kapcsolódik az E2 alegységhez kovalensen kötött lipoamidhoz (LA). A nagy mozgékonyaságú N-terminális rész által szállított acilcsoport végül az E2 enzim aktív centrumában helyeződik KoA-ra. Ez az LA dihidrolipoamiddá (DHHLA) történő redukcióját vonja maga után.

Az E2 alegység regenerációját az E3 enzim biztosítja. A DHHLA reoxidációja során az elektronok az E3 enzim redox-aktív cisztein aminosavain és a flavin-adenin-dinukleotidon (FAD) keresztül végső soron a  $\text{NAD}^+$ -ra kerülnek.

Az E1 és E3 jelölésű perifériás alegységek az E2 fehérje 24 vagy 60 kópiája által képzett szabályos maghoz kötődhetnek ki. A három enzimaktivitással bíró alapalkotó alegység számos arányú megjelenését írták le. A különbségek számos okból adódhatnak, biztos információt csak az eddig meg nem született komplett komplex szerkezetmeghatározások szolgáltatathatnának.

A metabolikus enzimdeficienciák az emberi betegségek egy egyre fokozódó figyelmet nyerő csoportját jelentik. A betegségek hátterében a sejtek metabolizmusában résztvevő enzimek, így például a KSDHk-k szerzett vagy öröklött hiánya, ill. elégtelen működése áll. A fent leírt megoszlásoknak megfelelően míg az E3 alegység működési zavara minden komplexre kihat, az első két komponens hibája komplexspecifikusan indukál patogén folyamatokat.

A KSDHk-kat a metabolizmus elágazási pontjaiban elfoglalt helyükből adódó kitétetten fontos enzimaktivitásokon túl reaktív oxigénszármazék (*reactive oxygen species*, ROS) képző képességük is kiemeli. Az általuk képzett szuperoxid-anionok és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulák komoly tényezőt jelentenek a mitokondriális oxidatív stresszben. Legnagyobb ROS-képző kapacitása révén a humán  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (hKGDHk) kiemelt figyelmet érdemel.

Az enzimdeficienciák legtöbbször az érett enzimek mutáns változataiban manifesztálódnak. A mutációk okozta betegségek kezelésének elengedhetetlen feltétele a patológiás állapotok molekuláris hátterének megértése. A „tér szerkezet és funkció egysége” elvnek megfelelően ez lehetséges a természetes (vad típusú) és mutáns változatok szerkezeteinek meghatározása után összevetéssel. A több száz vagy akár ezer aminosavból felépülő fehérjék atomi felbontású megismerését ma három technika biztosítja.

Legszélesebb körű elismertséggel a röntgenkristallográfia bír. A fehérjekristályokban periodikusan ismétlődő molekulák atomjairól szórt röntgensugárzás detektálásával, az intenzitás adatok alapján felállítható egy térszerkezeti térkép. Ez az elektronokról való szóródás

okán elektronsűrűségi térképként jelenik meg, melybe a szekvencia ismeretében beépíthető a teljes fehérje. Ennek megfelelően a technika alapja a néhány tized mm-es egykristályok létrehozása, melyhez szükséges optimális oldatkörülmények megtalálása még manapság is próbálgatáson alapul. Természetesen jó kiindulópontot jelent a még alacsonyabb minőségű kristályokat tartalmazó körülmények, valamint más hasonló szerkezetű fehérjék esetén sikeresnek bizonyult oldatok optimalizálása. Problémát jelentenek a mozgékony régiók, melyek nem, vagy csak a natívtól eltérő állapotban kristályosíthatók.

Ezek térszerkezetének meghatározásához kínál alternatívát a magmágneses rezonancia (*nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroszkópia. A főleg a páratlan rendszámú vagy tömegszámú izotópok atomjainak mágneses tulajdonságán alapuló technika alkalmazásakor a parányi rúd-mágnesekként viselkedő magspinek elektromágneses besugárzással egy alacsonyabb energiájú állapotból magasabba kerülnek. Ennek megszüntével az eredeti állapotba visszatérve egy tekercsben az adott atomokra jellemző frekvenciájú jelet produkálnak. Mivel a kiváltott jel erősen függ a kémiai, ill. térbeli kapcsolatoktól, a detektált jel alapján lehetséges az aminosavak szekvencián belüli azonosítása, valamint egymáshoz viszonyított térbeli helyzetük meghatározása is. A jelszolgáltató atomok számának növekedése azonban egyrészt a jeleket kiszélesíti, másrészt pedig a spektrumot nagyon sűrűvé teszi. Így tipikusan 10-30 (esetleg 50) kDa jelenti az NMR-spektroszkópiával meghatározható felső molekulatömeg határt. Emellett is azonban nagy előnyt jelent az oldatfázisban való vizsgálhatóság, mely a dinamikus kísérletekkel komoly motivációt jelent ilyen irányú mérésekre.

Harmadik, jelenleg legdinamikusabban fejlődő alternatívát a krio-elektronmikroszkópia (krio-EM) jelent. Az izzó katódról az anód irányába kilépő elektronok egy a folyékony nitrogén hőmérsékletén tartott mintán áthaladva transzmissziós képet adnak. Az elektronok a fehérjékkel eltérő orientációkban találkoznak, így a képek is eltérő

orientációkat mutatnak be. Kellően nagy partikulumszám esetén nagyszámú orientáció, tehát gyakorlatilag a részecske minden oldalú képe megjelenik. Az egy-egy orientációhoz tartozó több tízezer kép átlaga által kiadott orientációs vetületekből végül felállítható a részecske 3D szerkezete. A leginkább a röntgenkrisztallográfiához hasonló technika esetén egyértelmű előny a kristályosítás lépésének kiesése, mely rendkívüli mértékben gyorsítja meg a szerkezetek megismerését. Ez ráadásul kifejezetten előnyös lehet komplexek esetén, melyeknél egyszerre több részecske, ill. a konjugátumok között kialakuló kapcsolatok stabilitása kell fennálljon. Továbbra is probléma azonban a nagy flexibilitású részek detektálhatatlansága.

A patológiás háttér megértésének egy másik megoldását a kismolekulák szolgáltatják, melyekkel végzett vizsgálatok eredményei gyógyászati szempontból is jelentőséggel bírnak.

Mivel nyilvánvaló összefüggés mutatható ki a hKGDHk-hoz kapcsolódó ROS-képzés és bizonyos patológiás állapotok között, kézenfekvő ennek gyógyászati kihasználása. A liponsav gátló hatása melletti alacsony hatékonysága és aspecificitása okán alkalmatlan erre a feladatra. Felvetül azonban a molekula módosított változatainak, így az izoliponsavnak (ILS) potenciális alkalmazása.

Szintén figyelmet érdemel a hE3 fehérje FAD-tartalma és specifikus aktivitása közötti kapcsolat. A mutáns változatok esetén a FAD redoxpotenciáljában esetlegesen fellépő változások kapcsolatban kell álljanak az izoalloxazin gyűrű és más molekularészek térszerkezet-torzulásaival. Ennek vizsgálatára kínál lehetőséget a változások dinamikus követését is lehetővé tevő NMR-spektroszkópia. Ezen technika alkalmazásának alapfeltétele azonban a prosztetikus csoport részleges vagy teljes izotópjelölése, melyhez a magas költségek okán a leghatékonyabb előállítási módot kell kidolgozni.

## **Célkitűzések**

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

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

Céljaimat így az alábbi pontokban foglaltam össze.

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

## **Módszerek**

### **Kismolekulás szintézisek**

Az ILS előállítása a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetével kollaborációban valósult meg. Az irodalomból megismert 5 lépéses szintézist céljainknak és eszközkészletünknek megfelelően módosítottuk. Így az eredeti anyagmennyiségek megközelítőleg 25%-ával dolgoztunk.

### **Pontmutációs konstruktok létrehozása**

A hE3 vad típusú szekvenciáját kódoló plazmid vektorból (pET52b(+)) rövid oligonukleotidokkal (Sigma-Aldrich) és a QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kittel képeztünk mutánsokat. A TOP10 típusú *E. coli* sejtek kultúrájában felszaporított plazmidokat előbb a QIAprep Spin Miniprep csomag alkalmazásával, majd pedig a folyamatot ismételve a QIAprep Spin Midiprep csomag segítségével nyertük ki. Az új szekvenciát az LGC cég ellenőrizte.

A hE1a vad típusú szekvenciáját kódoló plazmid vektorból (pET22b(+)) rövid oligonukleotidokkal (Integrated DNA Technologies) és a QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kittel képeztünk mutánsokat. Az XL10-Gold típusú *E. coli* sejtek kultúrájában felszaporított plazmidokat a Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System protokolljának megfelelően izoláltuk. Az új szekvenciák analízisét a Rutgers Egyetem magánlaboratóriuma végezte.

### **Fehérjeexpresszió és -tisztítás**

A *Strep* affinitás címkével rendelkező hE1k, hE2k és hE3 fehérjekonstruktok esetén az izolált telepekből létrehozott 100 ml-es sejt kultúrákat 7-szer 700 ml-re oltottuk át. Az alapprotokoll szerint 0,5-es optikai denzitás (OD) értéknél, izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, 1 mM) hozzáadásával 3 órán át, 25 °C-on folyó expressziót a sejtek centrifugálással történő összegyűjtése követi. A negatív szelekciót minden lépésben ampicillin biztosítja. A sejtek

feltárása B-PER lízispufferben, lizozim, Halt proteáz inhibitor koktél és Univerzális Nukleáz jelenlétében, Potter-homogenizátor segítségével történik. A sejttörmeléktől centrifugálással és filteres szűréssel, míg a biotinilált fehérjéktől avidinnal szabadulunk meg. Az FPLC készülékkel történő fehérjetisztítást a *Strep* affinitás címke és a kolonnákban kötött *Strep-Tactin* között kialakuló affinitás kapcsolat biztosítja. Az oszlopok ekvilibrációja és mosása W pufferrel (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8), elúciója E pufferrel (desztiobiotin tartalmú W puffer), regenerációja R pufferrel (hidroxi-azofenil-benzoészav tartalmú W puffer), a regeneráló eltávolítása pedig W pufferrel történik. A mintákat végül Amicon Ultracel ultrafiltráló centrifugális csövekben koncentrálnak és puffercseréljük.

A folyamatok során a hE1k, a hE2k és a hE3 alegységek megfelelő hajtogatódása sorrendben  $MgCl_2$  és ThDP, liponsav, ill. FAD jelenlétét igényelte. A megfelelő exogén kofaktor(oka)t a hE3 esetén csak a sejtek feltárása során, a második alegységnél csak az expresszió során (a kovalens kapcsolódás miatt), míg a hE1k fehérjénél ugyanezen lépéstől kezdve mindig alkalmazni kellett.

A hexahisztidin ( $His_6$ ) címkével rendelkező hE1k fehérjekonstrukció esetén a glicerinben tárolt sejtekből kiindulva 200 ml-es sejtkultúrákat 4-szer 800 ml-re oltottuk át. Az IPTG hozzáadásával 15 órán át, 25 °C-on folyó expressziót a sejtek centrifugálással történő összegyűjtése követte. A negatív szelekciót minden lépésben ampicillin biztosította. A sejtek feltárása Triton X-100 tartalmú lízispufferben, DNáz I, és mikrokokkális nukleáz jelenlétében ismétlődő szonikálási lépésekkel történt. A végül hozzáadott sztreptomycin-szulfát mellett is megképződő csapadéktól és sejttörmeléktől centrifugálással szabadultunk meg. A (gravitációs elven megvalósított) fehérjetisztítást a szekvenciába kódolt  $His_6$  címke és a kolonna ágazatában lévő Ni-kelát közötti kapcsolat biztosította. Az oszlopok ekvilibrációja és mosása mosópufferrel (50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , pH=7,5, 0,3 M KCl, 0,25 mM ThDP, 2 mM



MgCl<sub>2</sub>), a specifikusan kötődő szennyezők eltávolítása alacsonyabb (45 mM), míg az elúció magasabb (300 mM) koncentrációjú imidazol tartalmú mosópufferrel, míg a regeneráció ismét mosópufferrel történt. Az eluátumban található imidazoltól dialízissel szabadultunk meg. A mintákat végül Amicon Ultracel ultrafiltráló centrifugális csövekben koncentráltuk és puffercseréltük. Csakúgy mint az előző esetben, a hE1k megfelelő hajtogatódása MgCl<sub>2</sub> és ThDP jelenlétét igényelte.

A *Strep* affinitás címkével rendelkező fehérjekonstruktoknál általánosan leírtaktól eltérően a dimerizációs domén nélküli (deletált) hE3 (hdE3) fehérjekonstrukt esetén minimum médiumos fehérjeexpresszió valósult meg. A jelöletlen glükózt, <sup>15</sup>N izotóp tartalmú ammónium-kloridot, ásványi anyagokat, ill. vitamin-alapanyagokat tartalmazó minimum médiumon felnövekedett kultúrából sejtfeltárást követően a pellettömeget gyűjtöttük össze. A Triton X-100 melletti diszpergálásokkal és centrifugálással egy nagy tisztaságú, többnyire fehérjéket tartalmazó, fehér massa (inklúziós test frakció) keletkezett. A fehérje reszuszpendálását egy guanidin-HCl és ditiotreitolt (DTT) tartalmú oldattal, míg a natív konformáció visszanyerését az első oldatnak egy nagyobb térfogatú, magas FAD és DTT tartalmú oldatba való csepegtetésével értük el. A keletkezett nagy térfogatú minta tisztítását a *Strep* affinitás címkével rendelkező fehérjekonstruktoknál leírtakhoz hasonlóan hajtottuk végre. Az affinitás címke eltávolítását a Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kit protokolljának megfelelően a konstrukta épített hasítóhelyet kihasználva értük el. A jelenlévő glutation-S-transzferáz címkéjű proteázt GST affinitáskromatográfiás mátrixszal való centrifugálással, a leválasztott címkéket gravitációs affinitáskromatográfiás oszlop segítségével távolítottuk el.

Az NMR-előkísérletekre a Richter Gedeon Nyrt, Szerkezetkutató Osztályán került sor. A fehérje korlátozott stabilitása okán a méréseket alacsony hőmérsékleten (277, ill. 280 K)

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

### **Röntgenkristallográfiai szerkezetmeghatározás**

A gözdiffúziós ülcsepp módszer (a nyitott platformon ülő fehérje és kristályosító oldatok 1:1 arányú cseppelegeye zárt térben a gőztérben keresztül érintkezik a vele egyensúlyba kerülő rezervoár kristályosító szer oldatával) alkalmazásával, a Hampton Research cég által forgalmazott oldatsorozatokkal elért kezdeti sikerekből kiindulva egykristályaimat a körülmények optimalizálásával értem el. A kihalászás után folyékony nitrogénbe mártva tárolt vad típusú hE3 kristályok röntgendiffrakciós vizsgálatai a Helmholtz-Zentrum Berlin kutatóintézetben (BESSY II részecskegyorsító) zajlottak.

A hE3 vad típusú változatánál a fázisprobléma feloldása molekuláris helyettesítéssel (CCP4, Molprep) történt. A szerkezetfinomítás során a merev test finomítást (CCP4, Refmac5) az egymást iteratív módon követő finomítási lépések követték (Coot, Phenix). Az alternatív oldalláncok, ill. funkciós csoportok a modellépítés/finomítás végső szakaszában alternatív konformereként lettek bemodellezve (Coot). Validálásra a Molprobit programot használtuk. A kész szerkezet a térszerkezeti adatbankba (*Protein Data Bank*, PDB) 6I4Q kóddal lett feltöltve.

### **Krio-elektronmikroszkópiai szerkezetmeghatározás**

A hE2k mintákról készített negatív festéses képek az MTA Energiatudományi Kutatóközpontjában, míg a szerkezetmeghatározáshoz használt krio-EM felvételek a Central European Institute of Technology-ban (Brno) készültek. Az utóbbi adatokat 300 kV gyorsítófeszültséggel dolgozó Titan Krios típusú

transzmissziós elektronmikroszkópba kapcsolt Falcon II típusú direkt detektoron gyűjtötték. Az elmozdulást MotionCor2 szoftverrel korrigáltuk, míg a kontraszt transzfer függvény paramétereit Gctf alkalmazásával határoztuk meg. A Cryosparc v2 segítségével kivitelezett automatikus részecske szűréshez az EMAN2 szoftvercsomag e2boxer programjában választottunk ki mintákat. Ezek 2, ill. 3D osztályozása és 3D finomítása után (740100 részecske) született meg a magdomén 2,9 Å felbontású térképe.

A 60%-os szekvenciaazonosságú *E. coli* analóggal végzett merevtest illesztést (Chimera) követően aminosavak cseréjével (Coot) tettük a szerkezetet a humán szekvenciának megfelelővé. A Phenix programmal végrehajtott valós térű finomítások, valamint lokális optimalizációk ismétlődő ciklusai (Coot) után született meg a végső térszerkezet, amely validálását a Molprobity program biztosította. A modellt az *Electron Microscopy Data Bank*be töltöttük fel, mely ezt a saját rendszerében alkalmazott kódján (EMD-0108) túl a PDB adatbázisban (6H05) is rögzítette.

Az N-terminális szakasz, kémiaiailag keresztkötött tömegspektrometriai (*chemical cross-linking-coupled mass spectrometry*, CL-MS) alapú modelljét munkatársam alkotta meg. Ezt szintén keresztkötési távolságadatok alapján illesztettük a krio-EM szerkezetemhez (Chimera).

A magasabb fokú szerveződési egységeket felépítő monomerek távolságadataihoz a Ring 2.0, a PISA és a CONTACT/CCP4, míg a másodlagos szerkezeti elemek, ill. a csatornahálózat elemzéséhez az ENDscript és a Caver 3.0 programokat használtuk. A humán  $\alpha$ -ketoglutarát- és  $\alpha$ -ketoamid-dehidrogenáz komplexek szubsztrátjainak (szukcinil-dihidrolipoamid – SLA – és KoA, ill. adipoil-dihidrolipoamid – ALA – és KoA) dokkolásához használt molekulák kiindulási pozíciói az *A. vinelandii* E2p alegységének PDB fájljaiból származtak. A fehérje rögzítése mellett végbement energiainimalizáció a Chimera programban történt.

## **A hKGDHk szerkezeti topológiájának meghatározása**

Az általam röntgenkrisztallográfiával meghatározott hE3 (6I4Q) és a krio-EM-mel megfejtett hE2k (6H05) szerkezeteket, ill. a kollégám által létrehozott E1 alegység homológ modellt használtam fel a teljes komplex szerkezeti leírásához. Az alapot korábbi hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (*hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*, HDX-MS) és CL-MS mérések adatai jelentették. A kapcsolódási adatok alapján a PyMol programban építettem fel a teljes komplexet.

## **Eredmények**

### **Kismolekulás szintézisek**

Az ILS szintézisét a protokoll kismértékű módosításával hajtottuk végre. A 25%-os kitermeléssel előállított nagytisztaságú anyagot dimetil-szulfoxidban oldottuk fel.

A FAD molekula előállítására totálszintetikus és enzimátikus lépéseket ötvözve egy új típusú, izotópjelölésre alkalmas protokoll született. A nyolc egymástól független publikáció kombinációjával leírt reakciósor a FAD teljes  $^{13}\text{C}$ , ill.  $^{15}\text{N}$  jelölésére lehetőséget teremt. A kiindulási anyagokra nézve 20-30%-os végső kitermelésű folyamatsor szelektív jelölésre is alkalmas.

### **Pontmutációs konstruktok létrehozása**

Mind a hE3, mind pedig a hE1a esetén számos patogén mutáns változatot kódoló expressziós plazmidot hoztam létre. Ezek további projektekben kerültek felhasználásra, az így született eredmények egy része pedig publikálásra.

### **A hKGDHk természetes és módosított alegységeinek expressziója és tisztítása**

A hE3 fehérjére rutinszerűen alkalmazott protokoll adta az alapját a további alegységek megtisztításának. Vizsgálataimat négy paraméterre terjesztettem ki, melyek kombinációjaként létrejövő mátrix legjobb esetét tekinttem az optimális expressziós körülménynek.

A hE2k fehérje esetén az indukciós pontot, az IPTG koncentrációt, az expresszió hőmérsékletét, valamint hosszát vizsgálva találtam meg az optimális expressziós körülményeket (OD=0,5, 0,3 mM IPTG, 20 °C és 3 h). Mivel a tisztítási protokoll nem igényelt módosítást, így az expressziót követően nagy tisztasággal sikerült a hE2k fehérje mintáját előállítanom.

A hE1k fehérje esetén a négy paraméter optimalizálása a címkék számának növelésével sem eredményezett megfelelő mennyiségű

fehérjét. Az optimalizációs kísérletekben tapasztalt csekély eltérések okán végül az eredeti protokollt használtam, mely kettős tisztítási frakcióhoz vezetett. Ezeket MS analízis alapján a hE1k különböző konformációjú és így más mobilitási tulajdonságú vagy koszubsztrátját, a ThDP-t tartalmazó, ill. veszített változataival azonosítottuk. Ennek okán a fehérje egy új, amerikai együttműködő partnerünk által javasolt protokoll szerinti előállítás mellett döntöttünk.

A hdE3 fehérje esetén már csak három paraméter (IPTG koncentráció, expresszió hőmérséklete és hossza) hatásait vizsgáltam. Minden esetben a fehérjék nagyfokú inklúziós testekbe záródásával kellett szembesülnöm, így a natív konformáció helyreállítása mellett döntöttünk. A korábban már kidolgozott protokollhoz képest kisebb módosítást hajtottam végre (a dialízis lépés helyett direkt kihígítás). A stabilitási probléma a tisztítás során is fellépett, melytől az FPLC készüléket alaposabb szűrővel védtem meg. A nyert fehérje mintát puffercsere után bekoncentráltam. A hőre érzékenységet mutató fehérje monomer oligomerizációs státuszát natív gélelektroforézissel, míg megfelelő feltekeredését/konformációját CD-spektropolarimetriával ellenőriztem. A CD spektrumok alapján a fehérje megfelelően feltekeredett, ám a FAD-kötés jelentősen meggyengülhetett.

Az NMR-kísérletben (gNHSQC) tapasztalt alacsony jeldiszperzió okán a címke eltávolítása mellett döntöttünk. Ehhez tesztelés után a HRV 3C proteázra kidolgozott szekveniahasító Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kitet alkalmaztam. Az NMR spektrum (gNHSQC-TROSY) a korábbinál jelentősen nagyobb jelgazdagsága mellett sem rendelkezem az aminosavak számához mérten elégséges keresztcsúccsal. Mivel a hőmérséklet jelentős emelésére nem volt lehetőség, így a jobb jelerősség érdekében a fehérjét savas közegbe helyeztem, valamint koszubsztrátját (NAD<sup>+</sup>) is oldatához adtam. Az új spektrumok (gNHSQC, ill. gNHSQC-

TROSY) sem engedték meg azonban, hogy elkezdhessük a fehérje teljes szerkezetének meghatározását.

### **A hKGDHk alegységeinek röntgenkristallográfiai analízise**

A hE1k kristályosítási kísérleteibe mindkét tisztítási protokollal előállított mintát bevontam, ám a két legjobb oldatsorozat eredményei sem mutattak elég ígéretes képet a kristályosodás tekintetében.

A hE3 mutáns variánsok esetén nyert eredmények (K37E és E340K) kiváló alapot jelentettek a munkatársaim által folytatott későbbi optimalizációkhoz.

A vad típusú hE3 esetén az optimalizációs kísérletek számos gyengébb minőségű változat mellett egy jó minőségű egykristályt eredményeztek. Ez vezetett el a munkacsoportunk által meghatározott, az irodalomban eddig legmagasabb felbontású (1,75 Å) vad típusú hE3 kristályszerkezethez (PDB kód: 6I4Q). A modell sokkal részletgazdagabb képet mutatott (különösen a dimer belsejében kialakuló H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O-csatornáról) mint az eddigi hE3 szerkezetek. (A részletes elemzés munkatársam elsőszerzős cikkében lett közzéve.)

### **A hE2k krio-elektronmikroszkópiai szerkezete és annak analízise**

A krio-EM vizsgálat során nyert adatok feldolgozása után egy a tér három irányában szimmetriát mutató kocka alakú test rajzolódott ki. A nem tömör test üregei a kocka lapjaira nyíltak.

A hE2k szekvenciájának beépítésével a denzitás térkép a 151. aminosavtól kezdődően foglalta magába a fehérjét, mely az aciltranszferáz aktivitásért és egyben a szerkezeti alap biztosításáért felelős részt jelenti. A 2,9 Å felbontású, öt α-hélixet, kettő 3<sub>10</sub>-hélixet és tíz β-redőt magába foglaló monomer szerkezet (PDB kód: 6H05) nagyfokú hasonlóságot mutat más E2-monomerek magdoménjeivel.

A 24 alegységből felépülő üreges kockatest csúcaiban 3-3 monomer alkotta homotrimerek helyezkednek el. A multimer szerkezeteket vizsgálva fény derült a trimereken belül, ill. között

kialakuló kapcsolódást biztosító interakciós pontokra (3-3, ill. 2-2 monomerpáronként), valamint a kötésekben résztvevő aminosavakra és atomokra. A hE2k-monomerekből mesterségesen megépített 60-mer modellben leírható kevesebb kölcsönhatással magyarázatot adtam a humán piruvát-dehidrogenáz komplexre jellemző pentagonális dodekaéder helyetti kockaszerkezet kialakulására is.

Azonosítottam az enzimaktivásban kulcsszerepet játszó (katalitikus triád: His357, Asp361, Ser305'), valamint az ezeket támogató aminosavakat. (Az ' szimbólum a szomszédos monomer alegységben lévő aminosavat jelöli.) Felderítettem az ezeket magába foglaló, két trimeralkotó monomer határfelületén létrejövő csatornahálózatot is.

A humán  $\alpha$ -ketoglutarát- és  $\alpha$ -ketoadipát-dehidrogenáz komplexek szubsztrátjait a csatornahálózatba modellezve szintén azonosítottam az ezek megkötésében és orientálásában fontos aminosavakat és polaritásfelszíneket. (A hE2k magjának felszínén nagy általánosságban töltéskiegyenlítettség látható, ám a teljes felszín a rokonfehérjékhez képest mégis nagyobb polarizáltságot mutat.) Megállapítható volt, hogy az egymáshoz szerkezetileg hasonló, de két metilénsoportnyi különbséget mutató SLA és ALA szubsztrátok a csatorna azonos térhelyeit foglalják el. A második esetben leírt sokkal sűrűbben betöltött csatornaállapotból adódhat a tapasztalt 100-szor kisebb hatékonyságú reakció.

A nagy flexibilitása okán krio-EM-mel nem detektálható N-terminális régió (1-150. aminosavak) CL-MS alapú modelljét is a magdoménhez illesztettem. Az elsősorban az acilgyök szállításáért felelős lipoil domén (3-77. aminosavak) tekintetében jól modellezett szerkezet (szintén keresztkötési adatok alapján) a homotrimer egy másik monomer egységéhez közeli térhelyzetet foglal el.



## **A hKGDHk szerkezete**

A hE3 és a hE2k fenti, az irodalomban eddig leírt legjobb felbontású szerkezeteit az E1 alegység homológ modelljével kiegészítve, valamint HDX- és CL-MS adatokat alapul véve javaslatot tettem a teljes komplex szerkezeti topológiájára is. A különböző alegységeken belül a kötésben résztvevő régiókat egymással szembe fordítva jutottam azon következtetésekre, melyek alapján a hE1k fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet éleihez, míg a hE3 fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet lapjaihoz kapcsolódnak. Az utóbbi dimerek így helyüket két szerkezetiileg ekvivalens pozícióban foglalhatják el. Az ezen logika mentén felépített modellben (laboratóriumunk korábbi eredményeinek megfelelően) a komplexet alkotó alegységek láncaránya hE1k:hE2k:hE3=24:24:12.

Elméletem igazolása érdekében egy negatív festéses EM kísérletet is elvégeztünk a tisztított minták felhasználásával *in vitro* összeállított komplexszel. Ez a hE1k-dimerek esetén támogatta elképzelésemet. A hE3-dimereket valószínűleg a gyengébb kötődés okán nem tudtam azonosítani.

A fenti eredményeket elsőszerzős cikkemben és egy az amerikai partnerünkkel társszerzőként megjelenő cikkünkben publikáltuk.

Tézisem alapját így összességében négy angol nyelven írt közlemény képezi.

## Következtetések

1. A laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott protokoll módosításával és optimalizálásával megvalósítottam a hE1k fehérje expresszióját és tisztítását. Ezzel a hE1k-ra nézve elérhetővé vált egy nagy tisztaságú mintákat eredményező (egyelőre relatíve alacsony kitermelésű) fehérje-előállítási módszer.
2. Ugyanezen protokoll módosításával és optimalizálásával megvalósítottam a hE2k fehérje expresszióját és tisztítását is. Így elérhetővé vált a hE2k szerkezetvizsgálatra alkalmas minőségű mintájának előállítása.
3. A hdE3 fehérje tisztítását nem lehetett a protokoll egyszerű módosításával elérni. Ezen fehérjekonstruktot csak az inklúziós testek formájában megtermelt frakció natív konformációjának helyreállítása után tudtam stabilan és nagyobb mennyiségben szolúbilis formába hozni.
4. A Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kitet alkalmazva sikeresen lehasítottam a hdE3 fehérje szekvenciájába épített *Twin-Strep* affinitás címkét.
5. Meghatároztam a hE2k fehérje katalitikusan aktív magdoménjének atomi szintű (2,9 Å) szerkezetét. Ez az összevetések alapján nagy hasonlóságot mutat a más komplexekben, ill. fajokban előforduló E2 alegységek szerkezeteivel.
6. Megvizsgáltam a magasabb fokú szerkezeti szerveződési szinteket is. A monomerekből egy kockára emlékeztető multimer szerkezet alakul ki. A kocka csúcspontjaiban homotrimerrek találhatóak. Nyolc trimernek az élek mentén történő összekapcsolódása eredményezi a fent felvázolt szerkezetet.

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

11. Dr. Ozohanics Olivérrel molekulamodelllezési módszerrel megalkottuk a hE2k N-terminális (krio-EM-mel nem vizsgálható) szakaszának modelljét. Kítűnt, hogy a modell két részre bontható, melyben a nagy szerkezeti stabilitású lipoil domén egy flexibilis szakasszal (perifériás alegység-kötő domén egy része) kapcsolódik a központi maghoz.
12. A korábban megvalósított nyolc helyett két fehérjemonomer aszimmetria egységbeli jelenlétével hoztam létre a hE3 fehérje vad típusú változatának egykristályát. Ez laboratóriumunkban eddig csak a mutáns változatok esetén történt meg.
13. A szerkezetmeghatározás a fehérje eddigi legmagasabb felbontású (1,75 Å) szerkezetéhez vezetett. Ennek birtokában Dr. Szabó Eszter kollegám az enzim mechanizmus eddig nem ismert aspektusaira volt képes rávilágítani.
14. Elemeztem a hKGDHk rekonstitúciója után gyűjtött HDX- és CL-MS adatokat. Ezek alapján a hE1k fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet éleihez kapcsolódnak.
15. Ugyanezen adatokból kiindulva a hE3 fehérje által kialakított homodimerek a kockaszerkezet lapjaihoz kapcsolódnak, mely helyet két szerkezetileg ekvivalens pozícióban foglalhatják el.
16. A fenti információk birtokában molekulamodelllezési technikával megépítettem a hKGDHk legvalószínűbb térszerkezeti topológiáját. Ez alapján a komplexet alkotó alegységek láncaránya hE1k:hE2k:hE3=24:24:12.
17. Szintetikus és enzimatiszus lépések megfelelő kombinálásával felírtam egy a FAD molekula minden atomjának szelektív stabil izotópos jelölésére alkalmas reakciósort. Ennek alkalmazásával lehetőség nyílik a molekula és a hE3 fehérje közötti kölcsönhatások vizsgálatára oldatbeli NMR-spektroszkópiával.

## **Saját publikációk jegyzéke**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Szabo E, Wilk P, **Nagy B**, Zambo Z, Bui D, Weichsel A, Arjunan P, Torocsik B, Hubert A, Furey W, Montfort WR, Jordan F, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A. (2019)

Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants.

Hum Mol Genet 28(20): 3339-3354., **IF: 5,101 (D1)**