

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

Doktori értekezés

**Mizsei Réka**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományok 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

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	0
1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	8
Irodalmi előzmények .....	10
A szangvinarin gyógyászati jelentősége és alkalmazásának korlátai.....	10
A zárványkomplex-képző kukurbituril szerkezeti bemutatása és gyakorlati alkalmazásai .....	12
A dihidrolipoamid-dehidrogenáz (E3) szerepe, szerkezete és genetikai rendellenességei.....	14
Az alkalmazott vizsgálati módszerek ismertetése, azok információtartalma és korlátai ..	20
NMR spektroszkópia.....	20
Hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometria (HDX MS).....	26
Fehérje egykristály röntgenkristallográfia.....	29
Termofluor mérések .....	32
3. Célkitűzések .....	34
A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek jellemzése.....	34
Az E3-elégtelenség fehérjeszerkezeti megközelítése .....	35
4. Módszerek .....	38
Anyagok.....	38
Fehérjeelőállítás és -tisztítás .....	38
NMR .....	41
HDX MS .....	42

Röntgenkristallográfia.....	44
Termofluor mérések.....	51
5. Eredmények.....	52
A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexei .....	52
A szabad CB7 és SA <sup>1</sup> H NMR spektroszkópiája .....	52
CB7 és SA arány változtatásának hatása a <sup>1</sup> H NMR spektrumra.....	54
CB7 és SA által képzett komplexek cserefolyamatainak azonosítása .....	56
A patogén hE3 variánsok előállításának és tisztításának optimalizálása.....	65
A mutáció hatása a fehérjekitermelésre.....	69
A hE3 és patogén variánsainak HDX MS vizsgálata.....	70
A hE3 szekvencia gyors deutérium cserét mutató peptid részleteinek azonosítása.....	70
Mutációk hatása a hE3 HDX mintázatára .....	76
A patogén hE3 variánsok kristályosítási próbái .....	77
Kristályosítást előkészítő tesztek.....	77
A D444V-hE3 variáns kristályosításának kidolgozása .....	82
A D444V-hE3 diffrakciós adatgyűjtése .....	85
6. Megbeszélés .....	86
A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexei .....	86
Specieszek azonosítása.....	88
A zárványkomplekképződést elősegítő kölcsönhatások .....	88
Szerkezetigazolás .....	91
Kihívások.....	92
A hE3 variánsok előállítása .....	93
A hE3 HDX mintázatának szerkezeti megfontolásai .....	94

A patogén hE3 variánsok kristályosíthatósága .....	99
Kristályosodást befolyásoló tényezők a patogén hE3 variánsok esetén.....	99
A diffrakciós adatok felbontásának finomítása a D444V-hE3 variáns esetén .....	101
A nagyfelbontású D444V-hE3 szerkezet .....	102
7.    Következtetések és kitekintés.....	104
A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek felhasználási lehetőségei .....	104
A hE3-elégtelenség értelmezésében várható előrelépések .....	105
8.    Összefoglalás.....	110
9.    Summary .....	111
10.   Irodalomjegyzék.....	112
11.   Saját publikációk jegyzéke.....	142
A dolgozat tárgyához kapcsolódó közlemények.....	142
További közlemények.....	143
12.   Köszönetnyilvánítás .....	144

## 1. Rövidítések jegyzéke

(HRV)3C	3C típusú humán rhinovírus
Amp	ampicillin
B faktor	krisztallográfiai atomi mozgástényező, hőmérsékleti faktor
BCKDHc	elágazó szénláncú $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex
CB7	kukurbit[7]uril
CBn	kukurbit[n]uril
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
<i>D</i>	diffúziós együttható
d6-DMSO	mindhat hidrogén pozícióban deuterált dimetil-szulfoxid
del	aminosav deléción
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY
E1	$\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex család "első", a dekarboxilációért és liponsav redukálásáért felelős enzimeinek összefoglaló jele
E2	$\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex család "második", acil-csoport koenzim-A-ra történő transzportját ellátó enzimeinek összefoglaló jele
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav

ESI	elektrospray ionizáció (ElectroSpray Ionization)
F <sub>1</sub>	indirekt dimenzió, a kétdimenziós NMR mérésekben
F <sub>2</sub>	direkt dimenzió, a kétdimenziós NMR mérésekben
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FT	Fourier transzformáció
GCS	glicin hasító rendszer
<i>g</i> HMBC	mágneses térgradiens segített heteronukleáris többkötéses korrelációs NMR kísérlet (Gradient Selected Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)
<i>g</i> HSQC	mágneses térgradiens segített heteronukleáris egykötéses korrelációs NMR kísérlet (Gradient Selected Heteronuclear Single Quantum Correlation)
HDX	hidrogén-deutérium cserefolyamat
<i>h</i> E3	humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz, az $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex család "harmadik", közös alegysége
HPLC	nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
<i>J</i>	csatolási együttható
K	kémiai egyensúlyi állandó
LB	Luria-Bertani táptalaj

M	koncentráció mértékegysége, g/dm <sup>3</sup>
<i>m/z</i>	tömeg-töltés arány
maxD	peptid részlet cserélhető főláncbéli amid protonjainak száma
MS	tömeg spektrometria (Mass Spectrometry)
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMR	mágneses magrezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	nukleáris Overhauser effektus (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	NOE mérésére alkalmas NMR kísérlet (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
OD600	600 nm-en mért optikai sűrűség érték
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	Fehérje Adatbázis (Protein Data Bank, <a href="http://www.rcsb.org/">http://www.rcsb.org/</a> )
PDHc	Piruvát-dehidrogenáz komplex
<i>pKa</i>	a savi disszociációs állandó negatív tízes alapú logaritmus
r.m.s.d.	standard deviáció (root-mean-square deviation)
ROESY	Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
ROS	reaktív oxigénszármazék (Reactive Oxygen Species)
SA	szangvinarin
SA <sup>+</sup>	szangvinarin imínium kation

SAOH	szangvinarin alkanolamin formája
SDS-PAGE	Na-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis
$T$	hőmérséklet
$T_m$	fehérje olvadási hőmérséklete
TOCSY	(Total Correlation SpectroscopY)
Tris-Cl	2-amino-2-(hidroximetil)propán-1,3-diol hidroklorid
WT	vad típusú fehérjeszekvencia
$\alpha$ KGDHc	$\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex
$\Delta D$	deuterálás okozta abszolút tömegnövekedés
$\Delta D\%$	deutérium beépülési százalék
$\Delta\Delta D$	a fehérje variáns $\Delta D$ értékének eltérése a referencia, vad típusétól
$\varepsilon$	moláris abszorpciós együttható
$\delta$	kémiai eltolódás



## 2. 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. Ez a felvetés foglalkoztatott a kémiai tanulmányaim megkezdése óta. Doktori munkám során a témák megválasztását az motiválta, hogy gyakorlati példákon keresztül szerezzek rálátást a biokémiában alkalmazott szerkezetvizsgálati módszerek erősségeire és korlátaira.

A dolgozat első felében a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) módszer oldatfázisú alkalmazására mutatok egy példát. Ebben a fejezetben 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.

A második tanulmány a hidrogén-deutérium csere tömegspektrometria fehérjeszerkezet vizsgálatban alkalmazását tárgyalja. 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.

A dolgozat egyes tanulmányait szerkezeti kémiai problémák gyakorlati fontosságú kérdéseinek kísérleti körüljárása motiválta. A munka jelentős részét képezte a tudományos kérdésselvetés és az annak megfelelő mérési, valamint adatelemzési módszerek megválasztása; ennek a folyamatába adok bevezetést a későbbi fejezetekben, azonban nincs módomb kitérni az említett technikák további alkalmazási lehetőségeire; valamint nem teszek említést a szerkezetvizsgálatban rutinszerűen alkalmazott további műszeres eljárásokról.

## Irodalmi előzmények

A következő fejezetek a dolgozat tárgyát képező szerves kismolekulák – a szangvinarin és a kukurbituril –, valamint egy összetett szerepet betöltő enzim fehérje – a humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz – élettani jelentőségét és szerkezeti sajátosságait tárgyalják.

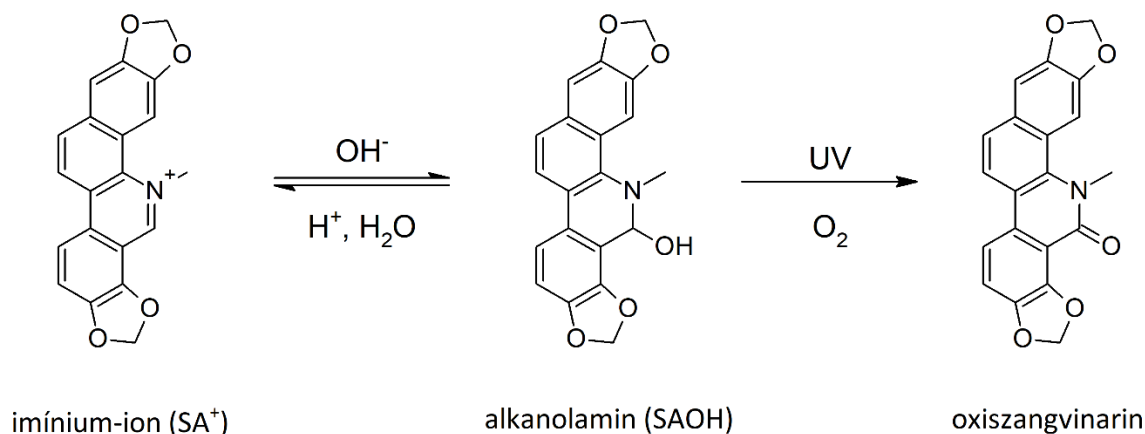
Bevezetést nyerünk a szangvinarin alapú gyógyszerek oldhatóságának és instabilitásának problémájába; majd a kukurbituril bemutatásán keresztül megismerjük az első munkánk alapját képező hipotézist, hogy a zárványkomplex képzés megoldást nyújt a fenti kihívásra. Emellett további kérdéseket vetek fel a két molekula komplexének szerkezetével és sztöchiometriájával kapcsolatban.

Az irodalmi áttekintés második részében egy változatos feladatokat ellátó enzim a dihidrolipoamid-dehidrogenáz élettani szerepébe adok betekintést, majd részletesebben kitérünk a szerkezeti sajátosságaira. A dolgozat későbbi fejezeteiben a tudományos érdeklődésem központjában a vad típusú enzim betegséghez vezető variánsai által a fehérjeszerkezetben és dinamikában bekövetkezett változásokat elemzem. Munkánk megkezdése előtt kísérleti információ nem állt rendelkezésre a variánsok szerkezetéről, a bevezetésben az *in vitro* és *in vivo* funkcionális vizsgálatok tapasztalatait foglalom össze.

## A szangvinarin gyógyászati jelentősége és alkalmazásának korlátai

A szangvinarin (SA), egy természetes eredetű benzo[c]fenantridin alkaloid, mely széleskörű felhasználását elsősorban sejtkárosító hatásának köszönheti: baktérium- és gombaölő, gyulladáscsökkentő, helyi érzéstelenítő, valamint hatékony rákellenes szer.(1–3) A pozitív töltésű imínium-ion forma (SA<sup>+</sup>) biológiai aktivitását három fő tényezőre vezetik vissza: kötődik a nukleinsavakhoz(2,4–7), károsítja a sejtmembránt és a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-

iontranszportot(8–10), illetve fokozza a mitokondriális reaktív oxigénszármazék (ROS) képződését(11–15). A semleges alkanolamin (SAOH) forma könnyebben áthatol a sejtmembránon(16), ami a gyógyszermolekula eloszlását segíti; emellett szelektíven kötődik bizonyos fehérjékhez, mint például az albuminhoz(17,18).



**1. ábra** A sangvinarin oldatában egyensúly alakul ki az imínium-ion és az alkanolamin alak között, melynek irreverzibilis a fotooxidációja. A SA<sup>+</sup> formában a 6-os helyzetű szénatomnak alacsony a  $\pi$  elektronsűrűsége, pozitívan polározott, így fogékony a hidroxid-ion nukleofil támadására. A SAOH alak fény hatására, szinglet gerjesztett állapotba kerül, és a gerjesztett forma irreverzibilisen oxidálódik oxisangvinarinná.

Alkalmazásában kihívást jelent, hogy a SA lúgos kémhatásra, valamint oxidációra érzékeny vegyület. Vizes oldatában reverzibilis, pH-függő egyensúly alakul ki az imínium és az alkanolamin (SAOH) alak közt (1. ábra).(19–24) Az SAOH forma a domináns pH=7,14 felett (saját méréseink és (19–24)), mely fény hatására, oxigén jelenlétében egy biológiailag inaktív vegyületté, az oxisangvinarinná alakul át.(24,25)

Munkánk során olyan biokompatibilis hordozóközeg kidolgozását tűztük ki célul, mely egyrészt elősegíti a SA<sup>+</sup> forma oldatban tartását, másrészt gátolja annak a degradációját a SAOH képződés visszaszorításával, illetve az oxidációra hajlamos OH-csoport

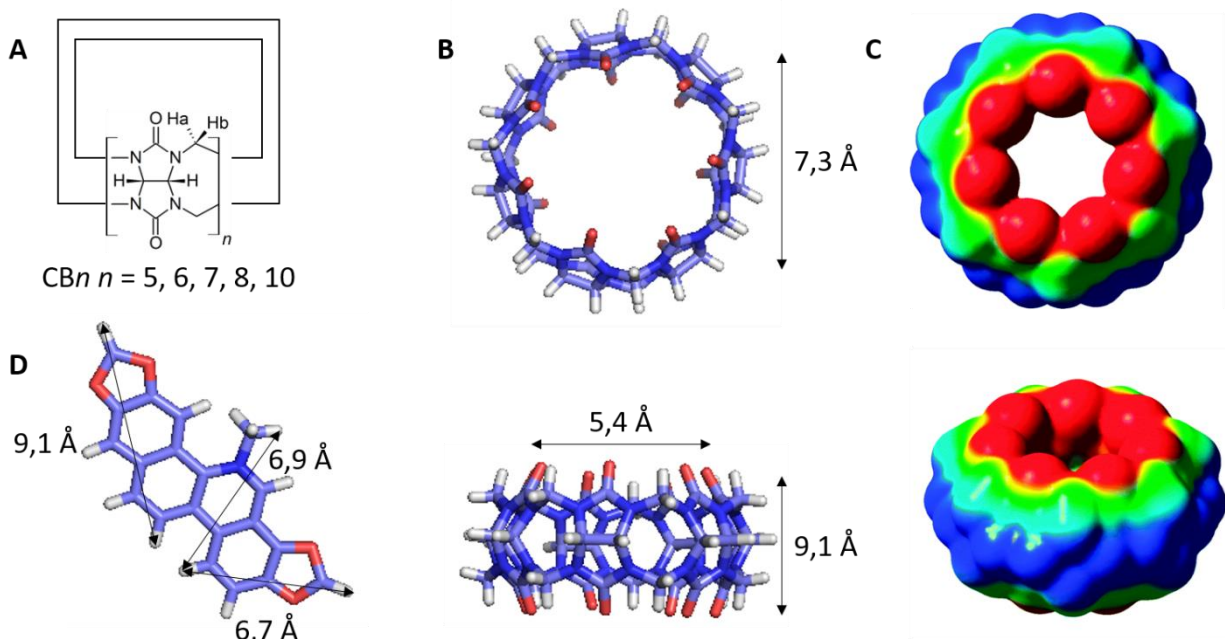
leárnyékolásával. Erre a molekuláris csomagolási feladatra a következő fejezetben bemutatott kukurbiturilt alkalmaztuk. A kukurbiturillal való zárványkomplekképződés gyakorlati alkalmazhatóságát együttműködőink, Dr. Biczók László laboratóriumában ismerték fel és vizsgálták, a mi célunk a kialakult komplexek szerkezeti és dinamikai elemzése volt.

### A zárványkomplex-képző kukurbituril szerkezeti bemutatása és gyakorlati alkalmazásai

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.(26) A zárványkomplex képződés elősegíti a gyógyszerek célbajuttatását, stabilizálását, oldatban tartását és kontrollált leadását, de számos élelmiszerkémiai és analitikai alkalmazása is ismert.(27–32) Ezek a makrociklusok fontos alkotóelemei a molekuláris méretű gépezeteknek, melyek kifejlesztését a 2016. évi kémiai Nobel díjjal ismerték el.(33) Legismertebb gazdamolekulák az apoláris vendégmolekulák megkötésére alkalmas ciklodextrinek; illetve az elsősorban ionokat komplexáló kalixarének és koronaéterek.(34) Ezekkel a gazdamolekulákkal összehasonlítva a továbbiakban tárgyalt kukurbiturilok előnye, hogy mind apoláris, mind pozitívan töltött vendégmolekulák megkötésére képesek.

A kukurbit[n]uril (CBn) család tagjai n glükouril-csoportból felépülő makrociklusos vegyületek (2. ábra).(35–37) A szintézisük alapjául szolgáló, glükouril és formaldehid kondenzációs reakcióját már 1904-ben leírták(38), de a fő termék, a CB6, szerkezetének felfedezése 1981-ig váratott magára.(39) A CBn mind szilárd, mind oldat fázisban nagy fokú szimmetriával jellemezhető: n fogású szimmetria tengellyel és egy erre merőleges

tükörsíkkal rendelkeznek. A CB7 gazdamolekula a CBn család többi tagjához hasonlóan 9,1 Å magasságú; a 7,3 Å átmérőjű ürege 5,4 Å átmérőjű bejáraton keresztül hozzáférhető.(40) A CB7 karbonil-csoportokkal körülvett pereme negatívan polározott, míg az ürege apoláris kölcsönhatások kialakítására képes, ahogyan ezt az 2. ábra C részén bemutatott molekuláris elektronpotenciál eloszlás is szemlélteti.



**2. ábra** A kukurbit[n]uril (CBn) család tagjainak szerkezete, az  $^1\text{H}$  NMR-ben megjelenő metin és a két nemekvivalens metilén proton kiemelésével(A); a CB7 szerkezete: magassága, üregének és peremének átmérője a CCDC 141409 azonosítójú(41) szerkezet felhasználásával(B); a molekuláris elektrosztatikus potenciál felszín szemléltetése a CB7 esetén (piros -, kék +); a  $\text{SA}^+$  vendégmolekula méretei a PDB 3nx5 azonosítójú(42) szerkezet felhasználásával.

Az elektronszerkezeti sajátosságának köszönhetően a CB7 apoláris molekulák, illetve pozitívan töltött ionok megkötésére és oldatban tartására alkalmas.(43) A CBn család szerves

kismolekulák felé mutatott specificitása a megcélzott vendégmolekula alakjától és töltéseloszlástól függően hangolható. Az ideális célvegyületek a pozitív töltésüknek köszönhetően ionos kölcsönhatásba lépnek a CB7 peremével, másrészt megfelelő méretüknek köszönhetően az apoláris üreget optimálisan ki tudják tölteni. A CBn család kismolekulák felé mutatott affinitása a fehérjekémiában referenciaként számon tartott  $10^{-15}$  M<sup>-1</sup> disszociációs együtthatójú avidin – biotin kölcsönhatást is meghaladhatja.(44) A CBn *nem-zárvány típusú*, koordinatív kötések kialakítására is képes a negatívan polározott pereme felhasználásával.(37) Ezek a kölcsönhatások - hidrónium ion és egyszerű fémionok koordinációjának képessége – biztosítja a CBn nemvárt jó vízoldhatóságát, ami tovább fokozható a pH vagy az ionerősség növelésével. Emellett a koordinációs-képesség a CBn komplexek magasabb szintű, szupramolekuláris szerveződésének a lehetőségét is magában hordozza; ezzel a tulajdonsággal reakciók regio- és sztereospecificitásának irányításában, molekuláris gépezetek elemeinek összekapcsolásában, láncok, illetve gyűrűk kialakításában is részt vehet.(45)

A dihidrolipoamid-dehidrogenáz (E3) szerepe, szerkezete és genetikai rendellenességei

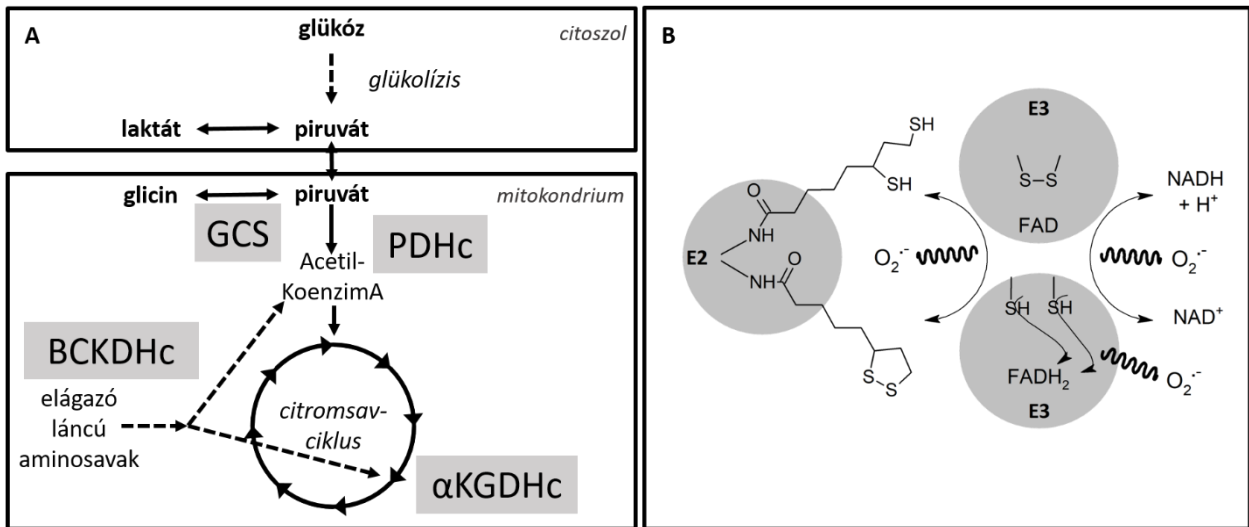
A *humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hE3) egy flavin-diszulfid-oxidoreduktáz; mely a cukrok és aminosavak anyagcseréjében játszik fontos szerepet.*(46) A hE3 a mitokondriumban található  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex család három tagjának a piruvát-dehidrogenáz, az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz és az elágazó szénláncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexeknek a közös alkotóeleme; valamint a glicin-hasító rendszernek is alegysége (3. ábra A).(47) A fenti négy enzimkomplex összetett szerkezetű, típustól függően 42-132 fehérje egységből álló szupramolekuláris szerkezetet alkot, amit három kulcs enzim épít fel: E1, E2 és E3. Míg az E3 egy közös összetevő, az E1 és E2 minden enzim komplexben különböző fehérjéket jelöl. A szupramolekuláris komplexek

szerkezetének feltárása napjainkban is folyamatban van, de általánosan elmondható, hogy a E2 által képezett oligomer alkotja a szabályos központi magot, melyhez az E1 és az E3 nemkovalens módon kötődik, ezeken az alegységeken felül esetenként egyéb kötőfehérjék is stabilizálják a komplexeket.(48–61)

Az enzimkomplexek a megfelelő  $\alpha$ -ketosavak oxidatív dekarboxilációját katalizálják. A dekarboxilációt az E1 egység végzi, ami az E2 egységhez kovalensen kötődő lipoamid (LA) kofaktor dihidrolipoamiddá való redukciójával jár. Az hE3 szerepe a LA oxidatív regenerálása, ezzel az enzimkomplex felkészítése a következő katalitikus ciklusra.(62) A 3/B ábra szemlélteti, hogy az oxidációt az E3 az intramolekuláris diszulfid kötése és a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) prosztetikus csoportja közreműködésével végzi. Az így felvett két elektront az E3 a hozzá lazán kötődő nikotinamid-adenin-dinukleotidnak (NAD) adja le, ezzel NADH-t termelve, amit a mitokondrium általános redox háztartása regenerál.

A hE3 a fenti enzimkomplexek működésétől függetlenül, további szerepeket is betölt a szervezetünkben; a fent említett reakció megfordítottját is katalizálja, ekkor a dihidroliponsavat és a NADH-t, alakítja át dihidrolipoamiddá és NAD<sup>+</sup>-dá.(63) A hE3 diaforáz aktivitással is bír, azaz a NADH-t képes oxidálni számos elektronakceptor segítségével (O<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup>,(64) NO(65), ubikinon(66,67), stb.). A fenti reaktivitásnak következtében a hE3 a legjelentős szerepet játszik a mitokondrium reaktív oxigénszármazék (ROS) képződésében is. A keletkező ROS-t normál körülmények között a szervezet antioxidáns rendszerei eliminálják.(47,62,68,69) A szabad formában előforduló hE3 proteolitikus aktivitását az utóbbi éveken azonosították, ezekben a kísérletekben egy a vasháztartásban fontos mitokondriális fehérje, a frataxin lebontását katalizálta.(70)





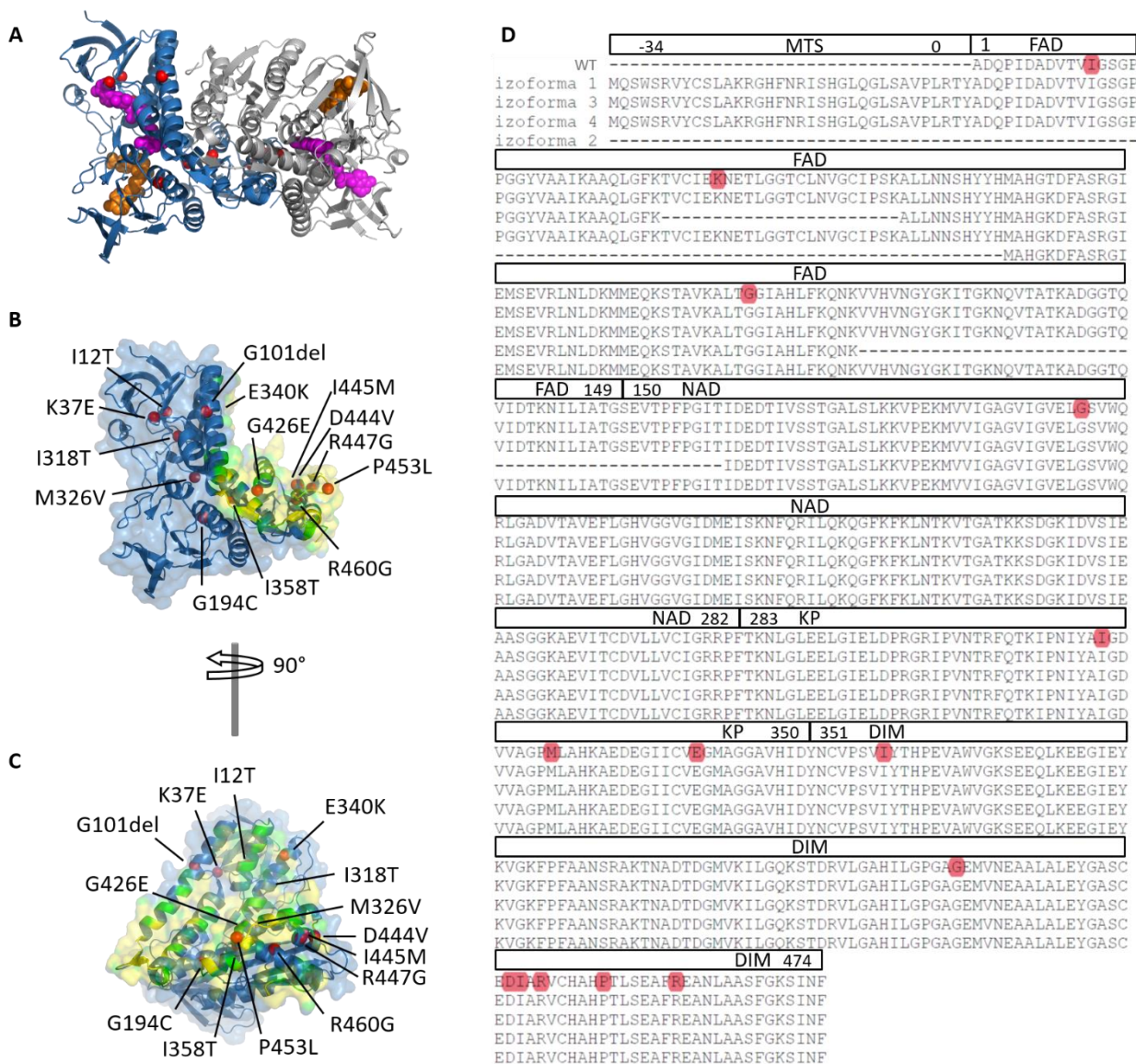
**3. ábra** A glicin-hasító rendszer (GCS), a piruvát-dehidrogenáz komplex (PDHc), az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex ( $\alpha$ KGDHc) és az elágazó láncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex (BCKDHc) anyagcserében betöltött szerepének áttekintése (A). A hE3 közös alkotóeleme mind a négy összetett enzimkomplexnek, melyekben a dihidrolipoamid reoxidálásáért felelős (B).

*A vad típusú hE3 kristályszerkezetében és oldatban is 100 kDa méretű funkcionális homodimert képez, ami kétfogású nem-krisztallográfiai szimmetriával jellemezhető.*(71) A monomerek katalitikus zsebében egy-egy FAD prosztetikus csoport helyezkedik el, valamint a hE3 monomeregységként egy NAD<sup>+</sup>/NADH megkötésére képes (4. ábra, A). A dimerben két intramolekuláris diszulfid híd kötés található a C45-C50 aminosav között, ezek képezik a két 15 Å mély katalitikus üreg központi elemét, melynek kialakításához mindkét monomeregység aminosavai hozzájárulnak. A FAD segíti elő a katalitikus elektrontranszportot az izoalloxazin gyűrűjének *si* oldalán elhelyezkedő diszulfid híd, és a *re* oldalán található NAD kötőhely között. A hE3 öt fő szerkezeti egységére utalunk majd a továbbiakban: a mitokondriumba történő transzportot irányító szekvenciára (MTS, -34 - 0 aminosavak); a FAD-kötő (FAD, 1-149 aminosavak), NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő (NAD, 150-182 aminosavak), központi (KP, 283-350 aminosavak) és dimerizációs (DIM, 351-474 aminosavak) doménekre. Az MTS a mitokondriumban levágásra kerül és nem része az érett

enzimnek. A 4. ábra B panelje mutatja az érett, 474 aminosavból álló vad típusú (WT) hE3 aminosav szekvenciáját, és a későbbiekben tárgyalt betegséget-okozó mutációs helyeket, a megfelelő számozással.(72)

*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.*(73–98) A hE3-at a hetedik kromoszómán elhelyezkedő DLD gén kódolja.(99) A DLD 14 exonból épül fel; de a fehérjét kódoló mRNS poszttranszkripciós módosítása következtében (alternatív splicing) nem minden esetben tartalmazza az összes exon szakaszt, ennek következtében egy egészséges személyen belül négy vad típusú fehérje izoforma megjelenésére számíthatunk. Tizennégy klinikai jelentőségű DLD gén variánst mutattak ki napjainkig, amelyek dihidrolipoamid-dehidrogenáz-elégtelenséghez vezetnek(81), a mutációk - a K37E kivételével - mindegyik fehérje izoforma aminosav szekvenciáját érintik. A genetikai rendellenesség csak homozigóta formában vezet tünetekhez, amelyek kialakulásának valószínűségét 1:35000 és 1:48000 közöttire teszik világszerte, de előfordulása ennél sokkal gyakoribb az askenázi zsidó közösségben, akik a G194C variánst 1:94 valószínűséggel hordozzák.(91)

A rendellenesség egyértelműen csak szekvenálással azonosítható,(79,91) bár jelentős előre lépések történtek a vérképből és vizeletből való felismerésére.(77,100–108) A leggyakoribb korai tünetei a hipotónia, elsavasodás és az elágazó láncú aminosavak vérben való felszaporodása. Az anyagcsere felborulása hullámokban jelentkezik, ami sokszor csecsemőkori elhaláláshoz vezet. A betegség későbbi fázisában visszamaradott szellemi és mozgás fejlődéssel, idegrendszeri-, szív- és májkárosodással járhat.(81,89,98)



**4. ábra** A hE3 funkcionális homodimer felépítése (A): monomer A (kék), monomer B (szürke), NAD (narancssárga), FAD (lila). A 14 egyedi patogén variáns mutációk helyét piros gömbök szemléltetik a monomer A egységen (B). A dimerizációs felület bemutatásához a monomer A egységet az előző két ábrához képest  $-90^\circ$ -kal elforgattuk az ábrán jelölt tengely körül; a monomer B-től mért távolságot sárga (4 Å), illetve zöld (5 Å) szín mutatja (C). A hE3 négy ismert izoformájának aminosav szekvenciája (D). Az első sor mutatja be a vizsgálatunk során vad típusnak nevezett hE3 aminosav szekvenciát az egyes strukturális egységek megnevezésével és aminosav számozásával; a piros árnyékolás jelzi a patogén mutációs pontok elhelyezkedését. A kísérleteink során használt vad típusú fehérje (WT), és

annak variánsai nem tartalmazták a mitokondriumba történő transzportot irányító szekvenciát (MTS); csupán az érett enzimre jellemző FAD kötő (FAD), NAD kötő (NAD), központi (KP) és dimerizációs (DIM) doménekből épültek fel.

Korábbi tanulmányok a hE3 mutációk által okozott szerkezeti és funkcionális következményeket négy szempont szerint jellemezték: az hE3 variánsok oxidatív stresszre gyakorolt hatása,(95,109–113) a hE3 dimer disszociációja,(112,114,115) a FAD prosztetikus csoport elvesztése,(71,93,112,116,117) valamint rendelkezésre állnak az egyes mutációk szerkezetre gyakorolt hatását feltáró molekuladinamikai modellek.(118,119) Izolált fehérjék vizsgálata feltárta, hogy a D444V-, E340K-, P453L- és G194C-hE3 reverz katalitikus működése emelkedett ROS képződéssel jár.(112) Élesztő modellben a D444V-, E340K-, G194C-, R447G-, és R460G-hE3 variánsok a KGDHc and PDHc komplexekben található LA kofaktor oxidatív károsodását okozták; ugyanez volt megfigyelhető a D444V-hE3 mutáció esetén humán homozigóta fibroblasztban.(120) Mindezek a megfigyelések összhangban állnak azzal, hogy maga a vad típusú hE3 is szerkezeti átalakuláson megy át a kémhatás savasodásával (pH 5,5–6,8), ami az elsődleges enzimaktivitásának csökkenésével és a ROS képzésének növekedésével jár.(92,109–111,113)

A hE3 nemkovalens homodimer szerkezet szükséges az enzimátikus működéshez.(114,115) Ma már bizonyított, hogy még a dimerizációs felületen elhelyezkedő mutációk sem vezetnek a hE3 monomerizációjához,(54,111,112) azonban a pontos szerkezeti változások feltárása várat magára. Bizonyos hE3 variánsok csökkent FAD kötőképességét még a nem FAD-kötő régióban elhelyezkedő aminosav mutációk esetén is megfigyelték; egy monomeregységre vonatkoztatva a P453L 0,66 mol, G194C 0,72 mol , E340K 0,99 mol, D444V 0,95 mol(112), K37E 0,76-0,67 (121), illetve 0,67 mol(112) FAD-ot tartalmaz. A molekuladinamikai szimulációk nem tudtak lényeges szerkezeti különbségeket feltárni a hE3 patogén variánsai és a vad típusú fehérje között,(113,119) munkánk megkezdésekor kísérleti szerkezeti információ nem állt rendelkezésre a patogén hE3 variánsokról.

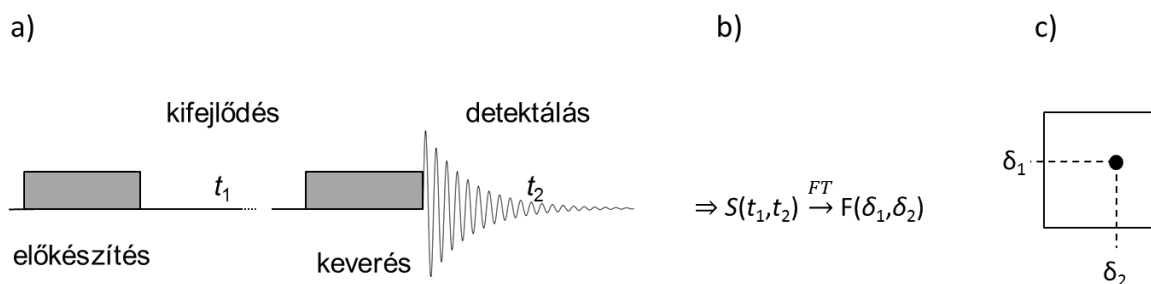
## Az alkalmazott vizsgálati módszerek ismertetése, azok információtartalma és korlátai

### NMR spektroszkópia

A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia oldatok és szilárd anyagok szerkezetének és dinamikus tulajdonságainak vizsgálatára alkalmas módszer.(122,123) Mágneses tér jelenlétében a mintát alkotó nemnulla spinnel rendelkező atommagok mágneses energiaszintjei felhasadnak. Az NMR mérés során az energiaszintek közötti átmeneteket gerjesztjük és a relaxáció során kibocsájtott rádiófrekvenciás hullámokat rögzítjük. A frekvenciát a vizsgált atommag minősége és a vizsgált mag által érzékelt mágneses térerősség határozza meg. A mágneses térerősség a spektrométerre jellemző mennyiség, amelyet a vizsgált atommag kémiai környezete milliomodrésnyi mértékben befolyásolja, így hordoz *a mért NMR jel frekvenciája információt a kémiai szerkezetről*. Az adott atommagra vonatkozó referencia frekvenciától való eltérést nevezzük kémiai eltolódásnak, melyet hagyományosan a referencia frekvenciára normálva ppm ( $10^{-6}$ ) egységben fejezünk ki. A kémiai eltolódás mellett az oldat NMR spektroszkópia további megfigyelhető mennyiségei az NMR jel lecsengését befolyásoló spin-spin és spin-rács relaxációs idők a kémiai kötések által közvetített homo- és heteronukleáris skaláris csatolási állandók és a spin keresztrelaxációs (NOE) effektus. Ezek a mennyiségek további információt hordoznak az oldott molekula méretéről, mozgékonyágáról, alakjáról, a molekuláris konformációs sokféleségéről, a konformációs-csere sebességéről, az atomok kémiai kapcsolódásának sorrendjéről és az atomok térbeli közelségéről. Változatos információtartalma mellett az oldat NMR spektroszkópia fő korlátja a kis érzékenysége, ami miatt nagy mintamennyiség, illetve az NMR aktív magok dúsítása válhat szükségessé. Az NMR nem ad felvilágosítást a konfigurációra vonatkozóan; illetve makromolekulák esetén a vizsgálható legnagyobb moláris tömeg értéket 70 kDa körül szokták meghatározni.

*Az NMR spektroszkópiai vizsgálatok egyik meghatározó lépése a **jelhozzárendelés**, melynek fontos eszközei a homonukleáris, illetve a heteronukleáris **többszörös mérések**.*

A hagyományos kétdimenziós NMR pulzusszekvenciák vázlatát az 5. ábra mutatja be. (122,124) A mért adatsor két idő jellegű ( $t_1$  és  $t_2$ ) változó függvénye, melyek kettős Fourier transzformációjával nyerhető a frekvencia-dimenziójú kétdimenziós NMR spektrum. A hagyományos kétdimenziós NMR kísérlet az *skaláris csatolást vagy spinkeresztrelaxációt felhasználva* mágnesszettség átvitelt hoz létre a kölcsönható NMR-aktív magok között. A kétdimenziós spektrumban megjelenő keresztcsúcs a rezonanciafrekvenciákhoz tartozó atomok közötti kémiai kötésre (pl.: HSQC, HMBC) vagy térbeli közelségre (pl.: NOESY, ROESY) utal. Az előbb említett technikák elsősorban a jelhozzárendelésben és szerkezetmeghatározásban nyújtanak segítséget. Munkánk során további kétdimenziós méréseket is használtunk, melyek fizikaikémiai paraméterek meghatározására alkalmasak. Ezek az NMR technikák nem két kémiai eltolódás dimenzió mentén bontják fel a spektrális információt, hanem a kémiai eltolódásokat egyéb fizikaikémiai paraméter, mint a diffúziós együttható függvényében ábrázolják, ez utóbbira példa a későbbiekben tárgyalt DOSY kísérlet.



**5. ábra** A hagyományos kétdimenziós NMR mérések felépítése (a). Az első „előkészítés” szakaszban egy vagy több rádiófrekvenciás pulzust felhasználva gerjesztjük a mintát. A gerjesztés hatására kialakult mágnesszettséget  $t_1$  ideig szabadon hagyjuk kifejlődni. A keverési szakaszt pulzusok sorozata építi fel, melyek a kifejlődött spektrális információ (koherenciákat) a detektált magon mérhető mennyiséggé alakítja. A detektálás során a jelet a második időparaméter,  $t_2$  függvényében rögzítjük. A mérést további  $t_1$  értékekkel megismételjük. A két idő típusú változó függvényében felvett adatsort,  $S(t_1, t_2)$  Fourier transzformációval alakítjuk frekvencia függő mennyiséggé  $F(\delta_1, \delta_2)$  (b). A  $F(\delta_1, \delta_2)$  függvény

nagy abszolút intenzitású értékei, a keresztcsúcsok, sajátos kapcsolatra utalnak a  $\delta_1$  és  $\delta_2$  rezonanciafrekvenciájú mag között. A kapcsolat jellegét az előkészítés és keverési idő alatt leadott pulzusok határozzák meg. (Az ábra (122–124) nyomán.)

### *Dinamikus NMR jelenség vizsgálata*

A dinamikus NMR mérések alkalmasak az egyensúlyi állandók, reakciósebességi együtthatók és ezek hőmérséklet függése révén termodinamikai paraméterek meghatározására.(125) A mintában zajló dinamikus jelenségeknek a hatása - sebességüktől függően - más és más módon jelenik meg az NMR spektrumokban.(126,127) A változások sebességét az „NMR időskálákkal” szoktuk összevetni. Az idő jellegű megfigyelhető fizikai mennyiségeknek (relaxációs idők, rotációs korrelációs idő) „NMR időskálája” az értéküknek felel meg, míg a frekvencia jellegű mennyiségek (csatolási állandók, kémia eltolódások) reciprokának nagyságrendje utal az NMR időskálájukra. Az NMR paraméterekre legszembetűnőbb hatással a velük egy időskálán zajló folyamatok vannak: a lényegesen gyorsabb mozgásoknak az időátlaga befolyásolja a mérhető mennyiséget, míg a lassabb mozgások nem okoznak kimutatható változást. Azokban a kémiai reakciókban, melyek órák vagy napok alatt zajlanak le - tehát egy teljes NMR méréshez képest hosszú időt vesznek igénybe – a reaktánsok koncentrációváltozása spektrumok ismételt felvételével és integrálásával követhető. A jelintenzitás változása a többi spektroszkópiánál megszokott módon elemezhető.

A rövidebb időskálájú folyamatok vizsgálata kémiai egyensúlyban lévő elegyekben zajlik. A *relaxációs* folyamatokra ( $T_1$ ) a másodperc-századmásodperc alatt zajló változások vannak befolyással, ezek cseresebességi együtthatójának meghatározására a szeletív inverzió felépülés (SIR) és a NOESY mérés alkalmas.

A *spektrális* (kémiai eltolódás) időskála közelítőleg a ms –  $\mu$ s tartományba esik, értékét a vizsgált állapotokhoz tartozó rezonanciák különbsége határozza meg. A spektrális

időskálával összemérhető sebességű átalakulások jelentős hatással vannak a spektrum megjelenésére és a jelek félértékszélességére, ebben a tartományban a jelalak analízis módszere hatékonyan alkalmazható a reakciósebességi együttható meghatározására.

A *Larmor precesszió* időskálája (ns) egy határt képez, az ennél gyorsabb molekuláris mozgások nem oldhatók fel NMR-rel. Ezért nem jelennek meg az oldat spektrumokban a rotamerek, a kémiai eltolódás anizotrópiája (CSA) és a dipól-dipól csatolás. Mindebből az is következik, hogyha ezek a mozgások lassabbak a vizsgált rendszerben (szilárd anyagok, folyadékkristályok), akkor a fenti jelenségek megfigyelhetővé válnak.

### *Diffúziós NMR spektroszkópia*

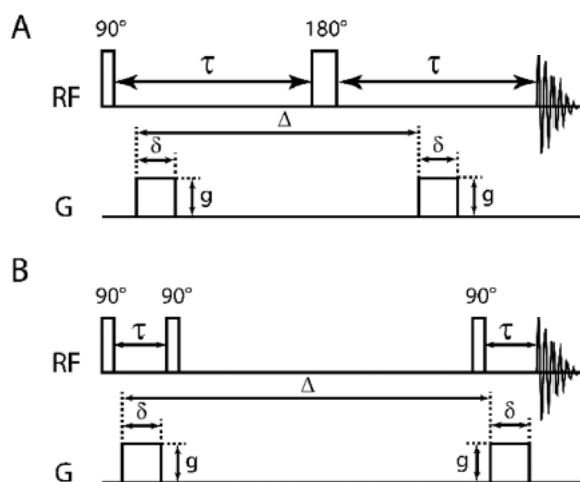
A **diffúziós NMR** (*DOSY: Diffusion Ordered Spectroscopy*)(128,129) *spektroszkópiával a vizsgált minta egyes komponenseinek a translációs diffúziós együtthatója (D) határozható meg.* A diffúziós NMR legközismertebb alkalmazási példái az MRI képalkotási technikák az orvostudományban, de hasznos eszköze az élettani- és szövetvizsgálatoknak, valamint a geológia és a nanotechnológia számára is.(130–133) A kémián belül az translációs diffúziós együttható értéke fontos információt szolgáltat a molekuláris szerveződésről és az oldatbéli szerkezetről; érzékenyen tükrözi a molekulán belüli szerkezeti változásokat, a kötődési és asszociációs folyamatokat.(134) Lehetővé teszi az összetett elegyek komponenseinek méret szerinti szelektív vizsgálatát (NMR kromatográfia(135–137)), azok fizikai szétválasztása nélkül. Hatékony eszköz a makromolekulák moláris tömegének vagy aggregációs fokának meghatározására.(138) A solvatációfok közeg- és konformációfüggő változása tanulmányozható a segítségével.(139) A molekulák közötti kölcsönhatások jelenléte nem csupán bizonyítható, hanem az affinitás mértéke összehasonlíthatóvá is válik, valamint a jelentős méretkülönbséget eredményező cserefolyamatok esetén meghatározható az asszociációs állandó értéke.(140)



A DOSY kísérletek két-, vagy esetenként többdimenziós mérések, melyek összetett minták NMR jelkészleteit azok diffúziós együtthatója szerint bontják fel. A DOSY pulzusszekvenciák fontosabb elemeit a 6. ábrán ismertetem. A mérés két fő lépésből áll, először kódolja a molekulák mintában elfoglalt helyzetét, majd adott diffúziós idő elteltével kiolvassa az elmozdulásukat. Az anyagáramlás mértékének meghatározását az teszi lehetővé, hogy a mérés során a minta hossz tengelye mentén gradiens pulzusokkal inhomogén mágneses teret hozunk létre. A maximális jelintenzitást ( $I_0$ ) akkor kapjuk, ha a gradiens pulzust nullára állítjuk. A gradiens erősség ( $G$ ) vagy a gradiens idő ( $\delta$ ) fokozatos növelésével a jelintenzitás ( $I$ ) exponenciális csökkenése figyelhető meg, melynek a translációs diffúziós együtthatótól ( $D$ ) való függését a Stejskal-Tanner egyenlet(141) a következőképpen közelíti:

$$I = I_0 \exp(-D\gamma^2\sigma^2G^2\delta^2\Delta),$$

ahol  $\gamma$  a vizsgált mag giromágneses tényezője;  $\sigma$  a gradiens pulzus alakfüggvénye;  $\Delta'$  korrigált diffúziós idő, ami függ az alkalmazott pulzusszekvenciától és a gradiens pulzusok alakjától. A közelítés homogén gömbökre ad egzakt eredményt.



**6. ábra** A DOSY NMR pulzusszekvenciák általános vázlata. Felül (A) a spin echo (SE) szekvencián, míg alul (B) a stimulált echo (STE) szekvencián alapuló eljárást mutatjuk be. Az első lépés mindkét esetben, hogy egy  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás (RF) pulzussal gerjesztjük a mintát. Az ezt követő gradiens pulzus a minta hossz tengelye ( $z$ ) mentén változó

mágneses teret hoz létre, ami a spinek fáziseltolódáshoz vezet. A  $\Delta$  diffúziós idő alatt a molekulák szabadon mozognak, de megőrzik az eredeti térbeli helyzetüknek megfelelő fázisukat. A következő gradiens pulzus előjele az elsőével ellentétes; célja, hogy megszüntesse a z tengely mentén kialakult fáziseltolódást mindazokban a spinekben, amik nem mozdultak el a  $\Delta$  idő alatt. Ezek a „helyben maradt” spinek járulnak hozzá a detektálható jelhez.

A mérés nehezen kivitelezhető alacsony viszkozitású, a szobahőmérséklettől jelentősen eltérő hőmérsékletű oldatokban, valamint minden olyan esetben, amikor számottevő a konvekció. A technika pontossága sokat fejlődött az árnyékolt gradiens tekercsek elterjedésével, valamint a konvekció mérséklésére szánt kapilláris és Shigemi NMR csövek bevezetésével.(142) A pulzusszekvenciákban is számos fejlesztés jelent meg: a  $T_1$ -hez képest alacsony  $T_2$ -vel jellemezhető makromolekulák esetén a stimulated echo-n (STE)(143) alapuló mérések terjedtek el; konvekció kompenzált kísérleteket(144–146) dolgoztak ki; és az indukált örvényáramokat mérséklő szüneteket (LED: longitudinal eddy-current delay)(147) iktattak be a gradiens pulzusokat követően. Mindezeknek a korrekcióknak köszönhetően a relaxációs időn, illetve rotációs korrelációs időn alapuló mérésekkel összehasonlítva a DOSY az egyik legmegbízhatóbb NMR technika molekulaméret meghatározására, különösen pontos jelhozzárendelés hiányában.

A diffúziós együttható meghatározására alkalmas mérések információt hordoznak a molekula méretéről(148), azonban a molekulaméret jellemzésére a különböző elven alapuló mérés technikák eltérő mennyiségeket használnak. A dolgozatban a hidrodinamikai és a girációs sugarakat ( $R_H$ ,  $R_G$ ) használom.  $R_H$  annak a szilárd gömbnek a sugara, amely az adott közegben a molekulával azonos diffúziós együtthatóval írható le. Az  $R_H$ -t határozza meg az általunk is alkalmazott DOSY NMR kísérlet, továbbá a dinamikus fényszórás és a méretkizárásos kromatográfia. Az adatelemzés során leggyakrabban alkalmazott közelítés a

Stokes-Einstein-féle leírás(149), mely a diffúziós együttható ( $D$ ) és a  $R_H$  között a következő összefüggést állítja fel:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D},$$

ahol  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\eta$  az oldószer dinamikus viszkozitása.

Az  $R_G$  az egyes atomoknak a molekula tömegközéppontjától mért távolságának tömeg súlyozott szórása:

$$R_G^2 = \sum_{i,j,k} \sum_{a=1}^N \frac{m_a}{M} (r_{ai}^2 - R_i^2),$$

ahol  $r_a$  jelöli az atom térbeli koordinátáit,  $m_a$  a tömegét.  $M$  a moláris tömeg  $M = \sum_{a=1}^N m_a$  és  $R$  a tömegközéppont koordinátái  $R = \frac{1}{M} \sum_{a=1}^N m_a r_a$ . Az  $R_G$  értékét a molekulamodellezés során közvetlenül számítottam, kísérleti meghatározására alkalmas technikák a kisszögű röntgenszórás, kisszögű neutronszerzés és nagyobb részecskék esetén ( $> 10$  nm) a statikus fényszórás.

Az  $\frac{R_G}{R_H}$  arány a molekula alakjára jellemző tényező. Egyenletes tömegeloszlású, tömör gömbre  $\frac{R_G}{R_H} = \sqrt{\frac{3}{5}}$ . Burchard(150) megmutatta, hogy ez az érték nagy pontossággal igaz gömbszerű molekulákra és polimerekre is.

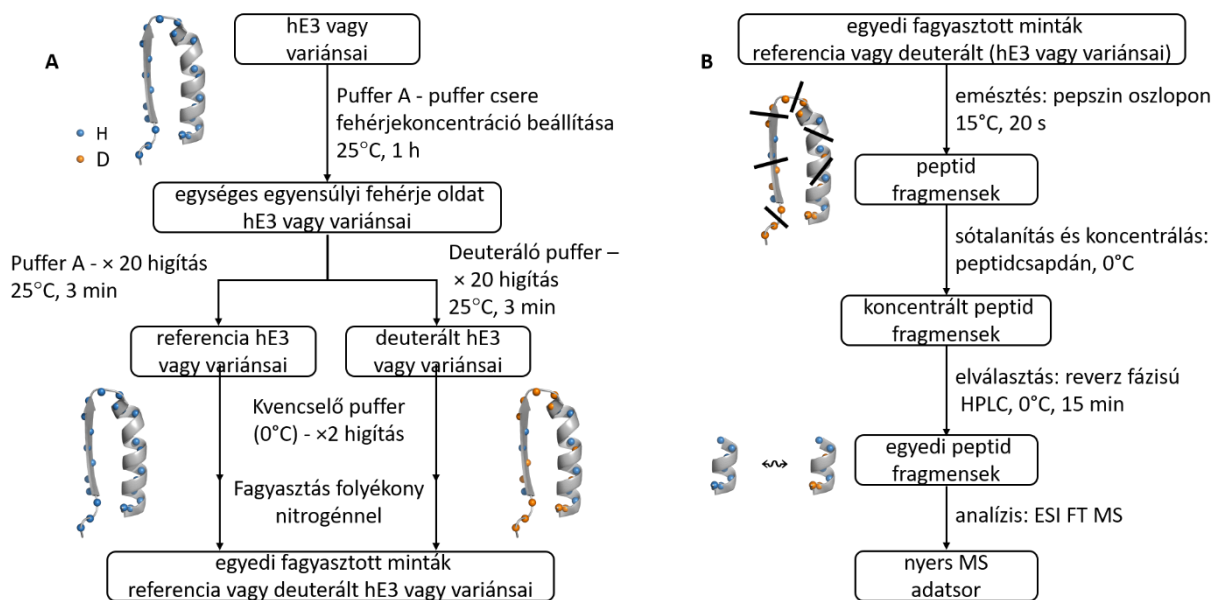
### Hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometria (HDX MS)

A hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometria (HDX MS) rutinszerűen alkalmazott technológia a fehérjék szerkezetének és dinamikájának vizsgálatában.(151–153)

Különösen hasznos módszerek bizonyult a fehérje feltekeredés,(154) a fehérje oligomerizáció,(155,156) a fehérje-fehérje,(157) a fehérje-DNS,(158) a fehérje-kismolekula(159) és fehérje-membrán(160) kölcsönhatások feltárásában.

A deuterált oldószernek kitett fehérjében mért hidrogén-deutérium csere mértéke a fehérje főláncbéli amid protonjainak környezetéről szolgáltat információt. Az amid protonok gyorsan cserélődnek deutériumra, ha oldószernek kitett, rendezetlen vagy mozgékony szerkezeti elemekben találhatóak. A lassú csere oldószerrel elzárt, szabályos másodlagos szerkezettel jellemezhető vagy szerkezeti vízmolekulákhoz erősen kötött régiókra utal. Emellett meghatározó tényező az adott aminosav minősége, a környező aminosavak szterikus és elektrosztatikus hatása, a pH és a hőmérséklet, amit a körültekintő kísérlettervezésnél, referenciák kiválasztásánál és az eredmények interpretálásánál fontos figyelembe venni.

A hidrogén - deutérium cserét fehérjék szerkezetének jellemzésére az 1950-es években kezdték el alkalmazni,(161) a csere sebességét ekkoriban trícium és sűrűség gradiens oszlop segítségével határozták meg, majd az 1980-90-es években az NMR spektroszkópia volt a vezető detektálási mód.(162) A HDX MS előnye a kis mintaigény (5-100 pmol) és a mintelőkészítés és elemzés automatizálhatósága (kapcsolt technikák). Mi a HDX MS rendszernek egy házi építésű változatát használtuk a Rutgers Egyetemen.(57,163) Az eljárás fő lépései a deutérium csere, a csere pillanatszerű megállítása, a fehérje emésztése hűtött mintafeldolgozó rendszerben, a peptid fragmensek elválasztása az alacsony hőmérsékletű magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC), majd a peptid szakaszok pontos tömegének meghatározása tömegspektrometriával (7. ábra). A nem-deuterált referencia mintákat a fenti eljáráshoz hasonlóan készítettük elő azzal a kivétellel, hogy minden puffer D<sub>2</sub>O helyett H<sub>2</sub>O-t tartalmazott.



**7. ábra** A hidrogén-deutérium csere kísérlet kivitelezése (A); a minta feldolgozás és a csere mértékének detektálása (B)

A kiértékelés folyamán a deuterált és nem-deuterált minták pepszines emésztése során keletkező peptideket megfeleltettük egymásnak és minden egyes beazonosítható bomlástermékre kiszámítottuk a köztük lévő abszolút tömegkülönbséget ( $\Delta D$ ). A deutérium beépülési százalékot ( $\Delta D\%$ ) - a vissza irányú cserefolyamatot elhanyagolva - a következő egyenlet alapján számítottuk:

$$\Delta D\% = \Delta D / (\max D \times 1,0063 \times 0,949) \times 100\%$$

ahol 1,0063 a deutérium ( $^2\text{H}$ ) és a prócium ( $^1\text{H}$ ) közötti tömeg különbség; 0,949 a  $\text{D}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O}$  arány a deuteráló pufferben. A fehérje főlánc cserélhető hidrogénatomjainak a számát ( $\max D$ ) a következő módon határoztuk meg: a láncot felépítő összes aminosav száma kivéve a prolinokat és az első kettő N-terminális aminosavat. (164–166) A peptidláncban található prolinnak nincs cserélhető amid protonja. Az N terminális aminosav nitrogénhez között protonjainak és az azt megelőző aminosav amid hidrogénjének cseresebessége olyan gyors, hogy ezek a protonok a mintafeldolgozás során pillanatszerűen visszacszerélődnek

hidrogénre. Hasonló okok miatt nem mérjük a C-terminális karboxil-csoporthoz és a poláris oldalláncokhoz kötött hidrogének hozzájárulását.

Minden mutáns esetén a vad típusú fehérjétől való szerkezeti eltérést a  $\Delta\Delta D$  értékkel jellemeztük:

$$\Delta\Delta D = \Delta D_{\text{mutáns}} - \Delta D_{\text{vad típus}}$$

A  $\Delta\Delta D$  azt mutatja meg, hogy az adott mutánsban az adott peptidszakasz flexibilitása, lokális környezete milyen mértékben tér el a vad típusétól. A HDX MS méréseink során nem értünk el aminosav-szintű felbontást; a szerkezeti információ felbontását az emésztés során keletkezett peptidok hossza és átfedései befolyásolják. Hosszabb emésztés rövidebb peptidszakaszokat, tehát pontosabb szerkezeti információt jelent, azonban ekkor fokozódik a mellékreakciók lehetősége is.

### Fehérje egykristály röntgenkristallográfia

Röntgenkristallográfiával a szabályos kristályokat alkotó atomok és molekulák szerkezete vizsgálható.(167) A röntgensugarak szóródnak az egyes atomok elektronfelhőjén és azok szabályos elrendeződése következtében jellegzetes diffrakciós mintázat jelenik meg a kristály mögött lehelyezett detektoron. A szóródó röntgensugarak szóródási szögét és intenzitását elemezve meghatározható az elektroneloszlás a kristály elemi cellájában. Az elektroneloszlást alapul véve az atomok átlagos helyzete, kémiai kötések és az adott szerkezeti elem rendezetlensége is meghatározható.

Az első fehérje kristályszerkezeteket az 1940-es években határozták meg,(168,169) ma több, mint százezer egyedi kristályszerkezet áll rendelkezésre a Protein Data Bank (PDB) adatbázisban.(42) Az egykristály kristallográfia akár  $10^{-10}$  m (Å) nagyságrendű felbontással képes meghatározni az atomok helyzetét, a helyzet bizonytalanságát, illetve a kötőszöveget.

A technika különös erőssége, hogy az abszolút konfiguráció meghatározására is alkalmas. A hE3 patogén variánsainak szerkezeti vizsgálatára azért választottuk ezt a módszert, mert kis szerkezeti változások is jól követhetőek, mint például a hidrogén-kötések átrendeződése, az aktív centrum átrendeződése vagy a FAD prosztetikus csoport konformációjának megváltozása, mely tényezők fontosságára a korábbi molekuladinamikai szimulációk utaltak.(116,119)

A módszer alkalmazása során azonban figyelembe kell vennünk annak korlátait. Kihívást jelent a mintaelőkészítés, hiszen a fehérje minták kristályosítása nehezen tervezhető folyamat. A diffrakciós adatok elemzése során bizonytalanságot jelenthet az egyes atomok kémiai minőségének azonosítása, különösen igaz ez a hasonló elektronsűrűségű fémionok minőségének meghatározására. A nyert kristályszerkezet értelmezése során figyelembe kell vennünk, hogy a fehérjéről a kristálypakolás általbefolyásolt, átlagolt szerkezettel rendelkezünk; a további konformációk, valamint az oldatbéli dinamikai viselkedés feltárásához egyéb módszerek kombinált alkalmazása szükséges. A továbbiakban a fehérjekristallográfia főbb lépéseit ismertem.

A *kristályosítás* során fokozatosan csökkentjük a fehérje oldhatóságát, ezzel ösztönözve a diffrakcióra alkalmas kristályok kiválását.(170–174) A nagyrendezetségű kristályszerkezet kialakulása a legkritikusabb tényező, ami meghatározza a szerkezeti adatok felbontását. A kristály szabályosságát elősegíti, ha növekedése lassan zajlik, illetve nagy tisztaságú, megfelelően feltekeredett, homogén fehérjeoldatból indulunk ki. A kristályképződést az oldhatóság csökkentésével váltjuk ki, aminek fokozatossága a fehérje oldat és a kristályosító puffer közötti fizikai korlát beiktatásával biztosítható; leggyakrabban a két oldat csak a gőztéren keresztül érintkezik (ülő csepp, függő csepp módszerek), de a két oldat közötti anyagcsere tovább lassítható olajréteg vagy agaróz (kapilláris módszer) beiktatásával.(172,174) A kristályképződés két lépésre osztható: az első lépés a nukleáció, melynek során az első néhány száz molekula szabályos elrendeződést kezd felvenni, míg a második lépés a kristály növekedés. A diffrakciós mérésekhez megfelelő méretű, különálló kristályra van szükség; ehhez kevés kristály mag képződését szeretnénk elérni, amelyek nagyra növekednek. A kristály minősége a rutinszerűen a kristályosító oldat összetételének

optimalizálásával javítható, de a két kristályosítási lépést esetenként érdemes beoltással kettéválasztani, amely során a kristály növekedését biztosító oldatba kristálymagokat, - vagy egyéb nukleációt elősegítő alkotóelemet - kívülről juttatjuk be.(175) A megfelelő kristályosítási körülmények nehezen jósolhatóak, gyakran száz vagy ezer körülmény kipróbálása szükséges. Munkánk során az optimális pH tartomány, kicsapószer és sótartalom feltérképezésére a közvetlen kristályosítási próbák mellett a következő alfejezetben tárgyalt termofluor méréseket is alkalmaztuk.

*A **krisztallográfiai adatgyűjtés** során egy kristályról a diffraktométerrel néhány száz képet rögzítünk, a felvételek között a kristályt egy tengely körül kis lépésközzel elforgatjuk.*(176,177) A diffraktométer főbb részei a sugárforrás, az optika (monokromatizálás és fókuszálás), a goniométer, a kristály elhelyezkedését követő kamera, a direktsugárfogó és a detektor. A kristályokat a mérés előtt egy hurokra rögzítjük és folyékony nitrogénnel lefagyasztjuk, mivel a fagyasztás a kristály roncsolódását okozhatja, azt előzetesen egy krio-védőoldatba áztatjuk. A goniométer segítségével pozícionáljuk és forgatjuk el a kristályt a sugárforrás előtt. A mérés során krio gázok biztosítják az alacsony hőmérsékletet (~100 K), ez a hőmozgást és a kristály sugárzás hatására bekövetkező roncsolódását is csökkenti. A kristályszerkezet felbontásának fizikai határát a sugárforrás hullámhossza és annak monokromatikussága határozza meg. A fehérjekrisztallográfiában a hullámhossz optimuma 1 Å körül van, ez finom felbontást biztosít, de még nem hat jelentősen kölcsön az anyaggal. Egy felvétel elkészítésének hosszát, illetve a kristály diffrakcióra alkalmas életideje alatt felvehető képek számát a röntgensugárzás fluxusa határozza meg. Itt mutatkozik meg a szinkrotron sugárforrás előnye a házi katódsugárcsöves készülékekkel szemben, hiszen legalább egy nagyságrenddel nagyobb a fluxusa, valamint nagy stabilitású, összetartó, fókuszált sugárzást biztosít. A kristályról szóródó sugarakat a detektor érzékeli, a számítógépes adatfeldolgozórendszer digitalizálja és tárolja. A detektor védelmét szolgáló direktsugárfogó nyeli el a mintán közvetlenül áthaladó, nagy intenzitású sugárzást.

*A **szerkezetmegoldás** célja a kétdimenziós diffrakciós képek felhasználásával egy háromdimenziós elektronsűrűség térkép előállítás.*(178–181) Az egykristály mintáról felvett szórási mintázat sajátossága, hogy minden mért reflexió pontja információt hordoz a



mintában található összes atom minőségéről és koordinátájáról; a szerkezeti információ visszafejtésének fő lépései a reflexiók indexelése, a fázisprobléma megoldása, majd a modellépítés és -finomítás. Az indexelés során információt kapunk a kristály legkisebb ismétlődő egységének, az elemi cellának a méretéről és a kristály forma szimmetriacsoportjáról. A szimmetria ismeretében a kristályról különböző elfordulásban felvett különálló képek egy adathalmazként elemezhetőek.

A krisztallográfiai adatfeldolgozás legnagyobb kihívása a fázisprobléma megoldása.(182) Egy monokromatikus elektromágneses hullám leírásához az amplitúdó és fázis ismerete szükséges. A fénydetektorok az adott helyen beeső sugárzás intenzitását rögzítik, azonban nem szolgáltatnak információt a fázisról. A fázis és az amplitúdó együttes ismeretében a diffrakciós képből a kristályszerkezet egy Fourier transzformációval előállítható lenne. A fázisprobléma megoldására a nehézatom helyettesítésen, molekuláris helyettesítésen és az anomális diszperzió alapuló módszereket dolgozták ki, illetve a szubangström felbontású adatok esetén direkt iteratív módszerek alkalmazása is lehetségessé válik. Napjainkban az adatelemzésre felhasználóbarát szoftverek állnak a szerkezeti biokémikusok rendelkezésére.(42,183,184)

### Termofluor mérések

A termofluor kísérlet egy kis anyag igényű és nagy áteresztőképességű módszer a fehérjék olvadási hőmérsékletének ( $T_m$ ) meghatározására.(185–188) A  $T_m$  az az érték, amelyen a hőmérséklet növelése hatására megjelenő denaturálódott fehérje és a megfelelően feltekeredett fehérje azonos mennyiségben vannak jelen az oldatban. A termofluor mérés során egy fluorofór hidrofób kismolekula segítségével mutatjuk ki a denaturálódott fehérje jelenlétét az oldatban. Ideális esetben, alacsony hőmérsékleten a fluoreszcencia nem mérhető, mivel a vizes közegben oldott fehérje feltekeredett állapotban van és nem

találhatóak rajta olyan hidrofób felszínek, amellyel a fluorofór kölcsönhatásba tud lépni. A hőmérséklet fokozatos emelésével a fehérje olvadásnak indul, és a hidrofób régiók hozzáférhetővé válnak. A fluorofór ekkor már képes kötődni a fehérjéhez és ezzel a fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnövekszik.

A termofluor - vagy más néven differenciális pásztázó fluorimetria(187) - méréseket kezdetben kismolekulás gyógyszerjelöltek fehérjekötődésének gyors és széleskörű tesztelésére fejlesztették ki,(185–187) de a későbbiekben széles felhasználási területet nyert a fehérje-ligandum(189–191) fehérje-fehérje(192) kölcsönhatások és a fehérje stabilitás(185,187,193–195) vizsgálatában is. A megnövekedett hőstabilitás csökkenti a fehérje flexibilitását, ezzel elősegítve a konformációs homogenitást,(188,196,197) ami mind a fehérje termelést(198), mind a kristályképződés hatékonyságát(191,198,199) jelentősen megnövelheti. A megfelelő kristálynövekedést befolyásoló tényezők a fehérjeminta tisztasága, kémiai és konformációs homogenitása és stabilitása.(174) Mivel a  $T_m$  információt hordoz a fehérjeszerkezetet összetartó elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások erősségéről, a termofluor mérésekkel könnyen feltérképezhető az adott fehérje szempontjából optimális pH, ionerősség, továbbá hagyományos adalékok stabilitásra gyakorolt hatása.

### 3. Célkitűzések

#### A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek jellemzése

A bevezetésben ismertettem, hogy a szangvinarin gyakorlati alkalmazhatóságával kapcsolatban kémiai instabilitása kihívásokat jelent. Együtműködőink Dr. Biczók László laboratóriumában felismerték, hogy a zárványkomplex-képző hajlamáról ismert kukurbit[7]uril (CB7) jelentősen növeli a szangvinarin (SA) stabilitását. Fel kívántuk tájni, 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<sup>+</sup> és a CB7 karboxil-csoportjai közt? Van-e a SA<sup>+</sup>-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.

Munkám első célkitűzése a SA és CB7 zárványkomplexeinek szerkezeti jellemzése volt, ehhez az elegy <sup>1</sup>H NMR spektrumának jelhozzárendelését kívántam kivitelezni. Ezt követően titrálós kísérleteket terveztem, melyek során az <sup>1</sup>H NMR spektrum változásait követve kívántuk meghatározni, hogy a SA molekula mely végének beékelődése kedvezményezett a CB7 üregébe.

Az előzetes titrálós kísérletek során felismertük, hogy CB7 feleslegében a SA - CB7 elegyben három  $^1\text{H}$  NMR jelkészlet is elkülönül. A három species összetételének és szerkezetének jellemzésére, a titrálós kísérleteket a molekulaméret feltárására alkalmas kétdimenziós diffúziós NMR mérésekkel és molekulamodellezéssel kívántuk kiegészíteni.

A három  $^1\text{H}$  NMR jelkészlettel jellemezhető elegyben zajló egyensúlyi folyamatok termodinamikai jellemzésére hőmérsékletfüggő  $^1\text{H}$  NMR és a kémiai cserefolyamatok kimutatására alkalmas, kétdimenziós  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY méréseket terveztünk.

### Az E3-elégtelenség fehérjeszerkezeti megközelítése

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(200) továbbfejlesztése volt a célom. Az optimalizálás során a nagyobb fehérje mennyiségek reprodukálható előállítását tűztük ki; a megnövekedett mintamennyiséghez a feltárási és tisztítási eljárás lépéseit is felülvizsgáltuk. A fehérjeszintézis növelésében három fő faktort kívántunk módosítani: az expressziós vektor kodonoptimalizált változatait kívántuk felhasználni, kéméletes sejtfeltárási eljárások tesztelésével terveztük a megfelelően feltekeredett fehérje mennyiséget növelni és az affinitás kromatográfiás tisztítás lépéseit is terveztük felülvizsgálni az alkalmazott affinitás-címke (tag) és annak lehetséges kölcsönhatásai, valamint a kromatográfiás oszlop összeállítása szempontjából. A sejtek feltárása során a hőfejlődéssel járó szonikálásról megfelelő, kereskedelmi forgalomban kapható detergensre kívántunk áttérni. Az egylépéses affinitás kromatográfiás tisztítási eljárás során felül kívántuk vizsgálni a különböző típusú affinitás-tag-ek és oszlopok hatékonyságát.

Munkám során a hE3-elégtelenség szerkezeti patomechnizmusát kívántam értelmezni. A patogén hE3 variánsok fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását két irányból közelítettem meg: célom volt a hE3 variánsok oldatbéli dinamikájának feltárása hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriával (HDX MS), valamint a variánsok kristályszerkezetének megismerése.

Vizsgálataink során a hE3 patogén mutánsainak hidrogén-deutérium csere (HDX) mintázatát kívántuk összehasonlítani egymással és az egészséges fenotípushoz tartozó vad típusú fehérjével. A munka első lépéseként a vad típusú hE3 oldatbéli szerkezetének értelmezését terveztük. A hE3 HDX mintázatát meghatározó paraméterek feltérképezése után a hE3 variánsok mintázatában mutatkozó eltéréseket kívántuk értelmezni és azokat a biológiai funkcióvesztéssel kapcsolatba hozni. Előzetes molekuladinamikai szimulációk arra utaltak,(118,119) hogy a vizsgált mutációk befolyásolják a hE3 oldatbéli dinamikáját, melynek a finom megváltozása is fontos hatással lehet az oldatban spontán kialakuló dimer szerkezet összetartására, a katalitikus aktivitásra, valamint a hE3 enzimkomplexeiben a fehérjepartnerekkel való kölcsönhatásra.

Munkám másik lényegi törekvése a hE3 variánsok krisztallográfiás vizsgálatainak előkészítése volt. A kristályosítási próbák megkezdése előtt fel kívántam térképezni, mely tényezők finomítása segítheti elő a hE3 variánsok kristályosíthatóságát, a kristályok diffrakciós képességét, illetve egy variánsra kidolgozott eljárás, milyen mértékben vihető át a továbbiakra. A kristályosítás előkészítéseként részletesen vizsgálni kívántam a hE3 variánsok oldatbéli stabilitását, azok olvadási hőmérsékletének összevetésével. Fel kívántam tártani a szerkezeti stabilitás hőmérséklet, kémhatás és ionerősség függését termofluor mérések segítségével. Az egyes variánsok és a vad típus hőstabilitásának összevetéséből következtetni kívántunk a mutációk hatására bekövetkező molekuláris stabilitás csökkenésre, illetve a fehérjére jellemző szimmetrikus homodimer szerkezet esetleges fellazulására; az optimális pH és ionerősség tartomány meghatározásával pedig a kristályosítási körülmények megválasztását terveztük elősegíteni.

A D444V-hE3 variáns sikeres kristályosítási tesztjei után célom volt a kristály diffrakciós képességének javítása, annak fagyasztására szolgáló optimális krio-védőoldat megtalálása, a diffrakciós adatgyűjtés és az előzetes adatfeldolgozás, valamint modellépítés. A vad típusú hE3 és a D444V variáns szerkezetek összevetése Dr. Szabó Eszter doktori munkájának tárgyát képezi.

## 4. Módszerek

### Anyagok

Szangvinarin-kloridot a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk és további tisztítás nélkül használtuk fel. Vizes oldatának koncentrációját spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a 328 nm-en értelmezett  $\varepsilon = 30700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  moláris abszorpciós együttható felhasználásával. A kukurbit[7]urilt kísérleteinkhez Dr. Anthony I. Day biztosította, melyet felhasználás előtt napokig vákuum alatt szárítottunk.

Az NMR és HDX MS mérések során használt deuterált oldószereket (d6-DMSO, 99,9% D<sub>2</sub>O) Sigma-Aldrich Kft.-től, illetve a Cambridge Isotope Laboratories-től (Tewksbury, MA, USA) vásároltuk.

A biokémiai pufferek összetevőit molekuláris biológiai tisztaságú, proteáz mentes formában a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be.

### Fehérjeelőállítás és -tisztítás

A következő fehérjeelőállítási és -tisztítási módszer a laboratóriumunkban korábban kidolgozott periplazmatikus expressziós eljárás(200) citoszol alapúvá alakításával készült. A módosítás során a sejtfeltárás, az indukciós idő, az expressziós hőmérséklet és a nagyobb fehérjemennyiség miatt az affinitás tag és a kromatográfiás módszer optimalizálását végeztük el, ennek a részleteire a dolgozatban nem térünk ki. Az optimalizált eljárást az alábbiakban ismertetjük.

### Expressziósvektor létrehozása

Annak érdekében, hogy fokozzuk *Escherichia coliban* a fehérjetermelést, az alkalmazott génszekvenciák kodonoptimalizált változatát használtuk. A 474 aminosavól álló hE3 fehérjét kódoló DNS szekvencia kodonoptimalizált változatát a DNA2.0, Inc. (Newark, CA, USA) állította elő. A dolgozatban használt hE3 variáns fehérjék N-terminális régióját egy további Strep-tag szekvenciával bővítettük ki, ami lehetővé teszi az affinitás kromatográfiás tisztítást. Annak érdekében, hogy a tag enzimatikusan lehasítható legyen, az expressziós termékek a tag és a hE3 fehérjeszakasz között egy (HRV) 3C proteolitikus hasítási helyet tartalmaztak. Az ilyen módon megtervezett inszertet az ampicillin rezisztenciát biztosító pET-52b(+) vektorba (Novagen, Madison, WI, USA) Dr. Törőcsik Beáta klónozte. A patogén variánsokat a vad típusú vektort felhasználva, hely-specifikus mutagenézissel Dr. Törőcsik Beáta állította elő, QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) segítségével. A mutációkat kódoló primereket a QuikChange Primer Design (Agilent, Santa Clara, CA, USA) programmal terveztük és a IBA Lifesciences-től (Göttingen, Németország) vásároltuk. A mutáció meglétét minden esetben DNS szekvenálással igazoltuk (Agowa GmbH, Berlin, Németország).

### Fehérje expresszió és tisztítás

Az előállított hE3 aminosavszekvenciája a következő: ASWSHPQFEKGALEVLFGPGADQPIDADVTVIGSGPGGYVAAIKAAQLGFKTVCI EKNETLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHGTDFA SRGIEMSEVRLNLDKMM EQKSTAVKALTGGIAHLFKQNKVVHVNGYGKITGKNQVTATKADGGTQVIDTKNI LIATGSEVTPFPGITIDEDTIVSSTGALS LKKVPEKMVVIGAGVIGVELGSVWQRLG ADVTAVEFLGHVGGV GIDMEISKNFQRILQKQGFKFLN TKVTGATKKSDGKIDV SIEAASGGKAEVITCDVLLVCIGRRPFTKNL GLEELGIELDPRGRIPVNTRFQTKIPNI YAIGDVVAGPMLAHKA EDEGIICVEGMAGGAVHIDYNCVPSVIYTHPEVAWVGKS EEQLKEEGIEYKVGKFPFAANSRAKTNADTDGMVKILGQKSTDRVLGAHILGPGA GEMVNEAALALEYGASCED IARVCHAHPTLSEAFREANLAASFGKSINF, a Strep-tag-et, majd az azt követő (HRV) 3C hasítási szekvenciát aláhúzás jelöli; az aminosavak számozásánál ezt a részt nem vettük figyelembe. A hE3 14 patogén variánsa egy-egy



aminosavban tér el a fenti szekvenciától (P453L-, G194C-, M326V-, D444V-, R460G-, R447G-, I445M-, I318T-, K37E-, I12T-, E340K-, I358T-, G426E-, G101del-hE3).

Az expressziós vektort BL21(DE3) *Escherichia coli* vonalba (Novagen, Madison, WI, USA) transzformáltuk és 0,1 mg/mL ampicillin (Amp) tartalmú Luria-Bertani-agar (LB-agar) lemezre szélesztettük. Ezt 18-24 órán keresztül, a telepek megjelenéséig 37°C-on inkubáltuk. Az éjszakai kultúra tápoldatát LB-ből és 0,1 mg/mL ampicillinből (LB-Amp) készítettük és egy különálló teleppel oltottuk be, majd rázóinkubátorban 37°C -on és 200 rpm rázatás mellett 18 órán át szaporítottuk. Az éjszakai kultúrát ötvenszeresére hígítottuk 5 l friss LB-Amp oldatban és 37 °C -on, 200 rpm rázatás mellett szaporítottuk. Amikor a kultúra elérte az OD<sub>600</sub> ~ 0,5 600 nm-en mért optikai sűrűség értéket, a fehérje expressziót 1 mM végső koncentrációjú izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk, és további 3 órán át 25 °C-on folytattuk. A sejteket 6500 rpm-es sebességgel 4 °C-on 15 percen keresztül centrifugálással ülepítettük és a pelletet -20 °C-on fagyasztva tároltuk. Az 5 l tápoldatból keletkezett baktériumok teljes mennyiségét 120 mL B-PER (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) sejt lízis reagenssel tártuk fel 24 mg lizozim, 1,2 ml EDTA mentes Halt proteáz inhibitor koktél (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) és 12 µl Universal Nuclease (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) jelenlétében. A sejteket dörzshomogenizátor segítségével oszlattuk el, majd 4 °C-on 30 percig kevertettük. A lizátumot 30 percig centrifugáltuk (15000 g, 4 °C), majd a felülúszóhoz 70 µl 20 mM FAD-ot adtunk, hogy a kofaktorként szolgáló FAD feleslegét folyamatosan fenntartsuk. Az oldathoz 33 µl 50 mg/ml avidint (IBA Lifesciences, Göttingen, Németország) is adagoltunk, mely a szennyezésként jelen lévő természetesen biotinilált fehérjéket maszkolja, megakadályozva azok kötődését az affinitás kromatográfiás oszlophoz.

Az affinitás kromatográfiás elválasztást egy AKTA Purifier 10 UPC FPLC rendszer (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) segítségével 5 ml Strep-Tactin Macrorep FPLC oszlopon (IBA Lifesciences, Göttingen, Németország) végeztük a csoport által már korábban közölt protokoll alapján.(200) A nagytisztaságú fehérje mintákat 10-15 mg/ml-re koncentráltuk (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, MWCO=30 kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Németország), miközben a szükség szerint puffer cserét is végrehajtottuk, majd folyékony nitrogénnel gyorsfagyasztottuk és -80°C-on tároltuk. A fenti eljárással a vad

típusú fehérjét, valamint annak 10 variánsát sikerült nagy mennyiségben és tisztaságban előállítani, négy variáns (G101del, I12T, M326V, G426E) ismételt előállítási kísérletei mind mennyiségi, mind tisztasági szempontból elégtelennek bizonyultak, ezért ezeknek a mutánsoknak a teljes körű vizsgálata nem vált lehetővé munkámban.

## NMR

Az NMR méréseket 400 MHz és 600 MHz  $^1\text{H}$  rezonancia frekvenciájú (9.4 T és 14.4 T) NMR spektrométereken (Varian, Palo Alto, CA, USA) folyadék üzemmódban végeztük. Az oldat mintákat 5 mm-es átmérőjű NMR csövekbe töltöttük. A deuterált vizes ( $\text{D}_2\text{O}$ ) oldószer 7 v/v% deuterált dimetil-szulfoxidot tartalmazott ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Az  $^1\text{H}$  spektrumokat a  $\text{DMSO-d}_6$  belső standard maradvány proton jelére referáltunk ( $\delta_{1\text{H}}(\text{DMSO}) = 2,50$  ppm). Az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban a szangvinarin protonok jelhozzárendelését kukurbit[7]uril mentes oldatban végeztük el: a kétdimenziós, heterokorrelációs hosszú hatótávolságú  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  J-csatolásra optimalizált gHMBC, valamint az egydimenziós homonukleáris dipoláris csatoláson alapuló egydimenziós  $^1\text{H}$  ROESY módszerekkel. A ROESY kísérletekhez szükséges formázott pulzusokat a Pbox szoftverrel (Varian, Palo Alto, CA, USA) terveztük meg. A szangvinarint és kukurbit [7] urilt tartalmazó komplex szerkezeti és dinamikai jellemzésére a kétdimenziós homonukleáris dipoláris csatoláson alapuló  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY kísérleteket használtuk, a keverési időt 0,05-0,4 s közé állítottuk be. Az oldószerelnyomást az egydimenziós  $^1\text{H}$  NMR spektrumokban a gyári PRESAT szekvenciával biztosítottuk. Az oldatok koncentrációja 0,4-1 mM között volt. A spektrumokat a VnmrJ 2.2C szoftver (Varian, Palo Alto, CA, USA) segítségével elemeztük és jelenítettük meg. A méréseket 10 °C-on, illetve az eredmények részben megjelölt hőmérsékleteken végeztük.

A diffúziós együtthatót  $^1\text{H-DOSY}$  NMR kísérletekkel határoztuk meg.(129,201,202) A mágneses térgradienst a 60 Gauss/cm Z-gradiens kapacitású Performa IV XYZ gradiens erősítővel állítottuk elő. A diffúziós együttható és a térerősség gradiens közötti kalibrációt 5 v/v% szacharóz  $\text{D}_2\text{O}$  25 °C-os oldatán végeztük el ( $D = 5.22 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Az oldatok alacsony koncentrációja miatt konvekció kompenzációt nem tartalmazó Dbppste pulzusszekvenciát alkalmaztunk, a diffúziós szünet 50 ms volt, a 8 különböző gradiens pulzus erőssége négyzetes lépésközzel 1 és 50 Gauss/cm között változott és minden gradiens erősségnél 256  $^1\text{H}$  tranzienszt vettünk fel. A DOSY csomagot (Varian, Palo Alto, CA, USA) használtuk a mérés kivitelezéséhez és a megjelenítéshez.

A SA:CB7 komplexek méretének és alakjának jellemzését DOSY NMR és molekuladinamikai modellezés alapján végeztem el. A hidrodinamikai sugarat ( $R_H$ ) a bevezetésben bemutatott  $R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$  egyenlet alapján számítottuk. Az oldószer (7% DMSO, 10 °C) dinamikai viszkozitásaként 2,509 cP-t használtam, amit a 0%, 10%, 20% és 25%-os DMSO vizes oldatának 10°C-on mért viszkozitásértékeinek(203) lineáris interpolációjával határoztam meg ( $R^2 = 0.9985$ ). A molekulamodellezésre szemiempirikus RM1 módszerrel a HyperChem8.0 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA) programcsomagot használtuk. Kiindulási szerkezetekként a SA(7) és CB7(40) kristályszerkezeteit használtuk (PDB 3nx5, CCDC 141409). Az  $R_G$  értékét a kristályszerkezetek és a modellek atomkoordinátáiból saját készítésű Python programmal számítottam a bevezetésben ismertetett  $R_G^2 = \sum_{i,j,k} \sum_{a=1}^N \frac{m_a}{M} (r_{ai}^2 - R_i^2)$  egyenlet alapján. Ugyanez a program az atomkoordinátákra a legkisebb négyzetek elve alapján ellipszoid felületet illesztett:  $\frac{(x-x_0)^2}{a^2} + \frac{(y-y_0)^2}{b^2} + \frac{(z-z_0)^2}{c^2} = 1$ , ahol  $x_0, y_0, z_0$  a középpont koordinátái, míg  $a, b, c$  az ellipszoid tengelyei.

## HDX MS

A Hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriai (HDX MS) méréseket a korábban közölt protokollokat követve végeztük el.(163)(57) Mind a 11 fehérje variáns (hE3 és annak 10 patogén mutánsa: K37E-, G194C-, I318T-, E340K-, I358T-, D444V-, I445M-, R447G-, P453L- és R460G-hE3) oldószerét puffer A-ra cseréltük (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 50 mM KCl, 2 μM FAD). Puffer A segítségével 40 μM-os törzsoldatokat készítettünk és 25 °C-on egy órán át pihentettük azokat, hogy a minták elérjék az egyensúlyi állapotot.

A deutérium-csere-reakció kezdetén 2 μl fehérje törzsoldatot 38 μl deuteráló oldattal (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM KCl, 2 μM FAD, 99.9% D<sub>2</sub>O, pD 7.0) hígítottunk, a végső oldat nehésvíz tartalma 94.9% D<sub>2</sub>O volt. A pD meghatározása során a pH-mérő által kijelzett értékhez 0.40-et adtunk. A reakciót 3 percig folytattuk 25 °C-on, majd pillanatszerűen megállítottuk azt. Ennek eléréséhez a reakcióelegy 30 μL-éhez azonos térfogatú jéghideg kvencs puffert (0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.6) adtunk, a mintákat folyékony nitrogénnel gyorsfagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk. Minden egyes fehérje variánshoz a nem-deuterált referencia vegyületet a fentihez hasonlóan állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy a deuteráló oldat helyett puffer A-t használtunk.

Az analízis során a fagyasztott mintákat pillanatszerűen felolvasztottuk és jéghideg fecskendő segítségével a 20 μl-es, hűtött mintahurokba töltöttük azokat. Közelítőleg 20 pmol fehérje mintát 0.3 ml/perc áramlási sebességű 0.1 v/v% hangyasav oldattal immobilizált pepszin oszlopra (15 °C, Poroszyme Immobilized Pepsin Cartridge, 2.1 mm × 30 mm, (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) vittünk és a 20 másodpercig emésztettük azt. A terméket hőcserélővel 0 °C-ra hűtöttük, majd peptid csapdán (Michrom peptide MacroTrap, 3 × 8 mm, Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) koncentráltuk és sóalanítottuk. A peptid elegyet reverz fázisú C18 HPLC kromatográfiás oszlopon (Agilent Poroshell 300SB- C18, 2.1 mm × 75 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 15 perc, 0,2 ml/perc, 0°C, 0.1 v/v% hangyasav oldat) 2–40% acetonitril gradienst alkalmazva választottuk el.

Az elektro spray ionizációs (ESI) mintabevitelt 5 perccel az elúció megkezdése után indítottuk el és összesen 10 percig folytattuk az adatokat tömegspektrometriával elemeztük. A tömegspektrométer beállításai a következők voltak: ESI+ mód; kapilláris feszültség: 4500

V; spray shield: 4000 V; szárító gáz hőmérséklete: 190 °C; tömegtartomány: 400-2000 m/z, felvételi sebesség: 0.5 scan/s. Minden kísérletet háromszor megismételtünk meg. A spektrumokat a Bruker Daltonics DataAnalysis 4.0 (Bruker, Billerica, MA, USA) szoftver segítségével értékeltük. Az egymásnak megfelelő deuterált és nem-deuterált peptid fragmenseket a DXgest program(204) segítségével azonosítottuk, a túrérséghatárt <1.5 ppm-re állítottuk. Az adott fragmens cserélhető főláncbéli amid protonjainak számának (maxD) meghatározásakor a peptidet felépítő aminosavak számából kivontuk a prolinok számát, valamint két N-terminális aminosavat.(164,165) A deutérium beépülési százalékot a  $\Delta D\% = \Delta D / (\max D \times 1.0063 \times 0.949) \times 100\%$  egyenlet alapján számoltuk, elhanyagolva a visszacserélődés mértékét. 1.0063 a relatív atom tömeg különbség a deutérium és a hidrogén (prócium) között, míg 0,949 a D<sub>2</sub>O/(D<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O) arány a deuteráló oldatban. Az ábrákat az Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA) segítségével készítettük.

A HDX értékekkel összefüggésbe hozott fizikai paraméterek elemzését a hE3 aminosav szekvenciája és az 1zmc PDB azonosítójú kristályszerkezete alapján végeztük el a mért fehérje fragmensekre nézve. A másodlagos szerkezettel nem rendelkező régiókat a DSSP(205,206) programmal azonosítottuk és azok arányát számítottuk az egyes peptid fragmensekre. A kristályszerkezet alapján a flexibilis régiók azonosítására az amid nitrogének B faktorainak átlagát határoztuk meg minden fragmens belüli. A lehetséges hidrogén kötések számát, melyeket az amid hidrogének a fehérje főláncával vagy az oldalláncokkal alakíthatnak ki a kristályszerkezet elemzésével határoztuk meg.

### Röntgenkristallográfia

A D444V-hE3 variáns kristályosítási körülményeit az 1. táblázat foglalja össze. A fehérjeminta tisztaságát és homogenitását SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük, a fehérjeszekvencia helyességét MS módszerrel igazoltuk. A megtisztított fehérjeminták

elúciós pufferét fehérje tárolóoldatra cseréltük (ld. 1. táblázat) 30 kDa pórusméretű centrifugális koncentrátort alkalmazva. A fehérjekoncentrációt Bradford módszer(207) szerint határoztunk meg. A fehérjét további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

Kristályosítás előtt a felengedett fehérjeoldatot homogenizáltuk, majd centrifugálással és szűréssel szabadultunk meg minden esetleges aggregátumtól. A végső fehérjekoncentrációt Nanodrop 1000 spektrofotométerrel (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ellenőriztük. A 96-lyukú kristályosító tálcákat Crystal Gryphon (Art Robins Instruments, Sunnyvale, CA, USA) kristályosító robot segítségével töltöttük fel. Az előzetes tesztek során 24-lyukú kristályosító tálcába manuálisan 500 µl kristályosító oldatot adagoltunk, majd a fedőlemezen a fehérje oldat és a kristályosító oldat változó térfogatarányú cseppjeit (0.5-2 µl) elegyítettük (függő csepp módszer).

A legnagyobb felbontású D444V-hE3 kristályszerkezet adatgyűjtésének paramétereit a 2. táblázat foglalja össze. Minden tesztelt kristályról előzetesen kettő 90°-kal elforgatott diffrakciós képet vettünk fel, amit az XDS programcsomaggal(208,209) processzáltunk, majd a BEST(210,211) programmal terveztük meg a legrövidebb adatgyűjtési időre optimalizált adatgyűjtési stratégiát (elforgatási szög lépésköze, elforgatási szögtartomány, szkennelési sebesség és detektor távolság).

**1. táblázat** D444V-hE3 kristályosítási körülményei

Módszer	ülő csepp
Kristályosító tálca típusa	Intelli 94-well, standard
Hőmérséklet	293 K
Fehérje koncentráció	40 mg/ml <sup>a</sup>
A fehérje tárolóoldat összetétele	100 mM Tris-Cl pH 8.00, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
A kristályosító oldat összetétele	1,5-1,9 M Na/K <sub>2</sub> -foszfát puffer pH: 6,99-8,10 <sup>b</sup>
A kristályosító csepp összetétele	0,3 µl:0,15 µl = fehérje:kristályosító oldat
A kristályosító oldat térfogata	70 µl
A krio-oldat összetétele	20 v/v% glicerin a kristályosító oldatban oldva

---

<sup>a</sup> 280 nm-en mért abszorbancia alapján; Nanodrop 1000

<sup>b</sup> Az oldatok pH-ját 2 M-os NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> és 2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oldatok megfelelő arányú elegyítésével állítottuk be, majd az adott kémhatású oldatok fokozatos hígításával fedtük le az 1,5 – 1,9 M-os koncentrációtartományt. A puffer oldatok kémhatása nem változott a hígítás hatására.

**2. táblázat** Adatgyűjtés és feldolgozás

Röntgen forrás megnevezése (beamline)	BESSY 14.1 beamline, Helmholtz-Zentrum Berlin (Berlin-Adlershof, Németország)
Röntgensugárzás hullámhossza	0,91841 Å
Detektor	Pilatus 6M
Kristályok darabszáma	1
Hőmérséklet	100 K
Kristály-detektor távolság	323,725 (324,20) nm
Egyedi képek közötti elforgatási szög	0,1°
Teljes elforgatási szög	180°
Képenkénti besugárzási idő	1,4 s
Felbontás (külső héj)	48,34-1,59 (1,68-1,59) Å
Tércepoport	P21212
Elemi cella paraméterei	11793 Å, 168,81 Å, 61,19 Å
Mozaicitás	0,078°
Összes mért reflexiók száma (külső héj)	856021
Egyedi reflexiók száma (külső héj)	163597
Multiplicitás (külső héj)	5,23
Teljesség (külső héj)	99,1 (97,5) %



Átlagos jel/zaj viszony $\langle I/\sigma(I) \rangle$ (külső héj)	13,73 (1,48)
Mérés R-faktora (külső héj)	8,6 (105,0) %
B-faktor a Wilson-féle ábrázolás szerint	26,63 Å <sup>2</sup>

**3. táblázat** Szerkezetfinomítás

Módszer	molekuláris helyettesítés (a modell PDB kódja: 1ZMC)
Alkalmazott programcsomag (verzió)	REFMAC (5.8.0073)
Felbontási határai	48,338 – 1,588 Å
Teljesség	99,14 %
Adatlevágás	nincs
Reflexók száma	163590 (kiolvasott)
munka adatkészlet	11397
teszt adatkészlet	161488
Krisztallográfiai R-faktor ( $R_{\text{cryst}}$ )	0,1798%
Szabad R-faktor ( $R_{\text{free}}$ )	0,2078%
Diffrakciós pontossági index Cruickshank szerint (DPI)	0,0727 Å
Atomok száma	7733
fehérje	7139
ionok	6
ligandumok	146
H <sub>2</sub> O	442
Standard eltérés (r.m.s.)	0,0211

kötések	2,0868 Å
Átlagos <i>B</i> -faktor	24,60
fehérje	44,77 Å <sup>2</sup>
ionok	47,70 Å <sup>2</sup>
ligandumok	21,31 Å <sup>2</sup>
H <sub>2</sub> O	29,12 Å <sup>2</sup>
Eloszlás a Ramachandran térképen	
a legkedvezőbb $\phi/\psi$ régióban	96,52%
a megengedett $\phi/\psi$ régióban	3,27%

## Termofluor mérések

A termofluor kísérleteket a MyiQ™ Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) valós idejű, egy színcsatornás PCR készüléken végeztük. A vizsgálandó oldószerekből (lásd 7. táblázat) 20-20 µl-t 96-lyukú PCR tálcákba (Bio-Rad, Hercules, CA, USA vagy Roche, Indianapolis, IN, USA) töltöttünk -80°C-on fagyasztva tároltuk felhasználásig. Az 5000×SYPRO Orange DMSO-s oldatát (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vízzel százszorosára hígítottuk és ezt a munkaoldatot legfeljebb néhány órán át 4 °C-on, sötétben tároltuk. A PCR tálcán minden körülményhez 2.5 µl munkaoldatot és 2.5 µl fehérjeoldatot (végső koncentráció ~50 µM) adtunk. A tálcákat átlátszó fóliával lefedtük (Optical Quality Sealing Tape, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 2 percig 4000 rpm sebességgel centrifugáltuk, majd 2 órán át 4 °C-on állni hagytuk.

A PCR készülékben a tálcákat 4 °C-ról 0,5°C lépésközzel, 1 °C/perc sebességgel 95 °C-ra melegítettük. A készülék fedelét állandó 105°C-on tartottuk, hogy elkerüljük a kondenzációt. Az oldatok fluoreszcencia változását folyamatosan követtük, a gerjesztő fény hullámhossza 492 nm, míg a detektált hullámhossz 516 nm volt. Miután a minta elérte a 95 °C-ot, a hőmérsékletet a fent leírtakhoz hasonlóan fokozatosan 4°C-ra csökkentettük és a hűtési görbéket is felvettük. A  $T_m$  olvadási hőmérsékletként a szigmoidális jellegű fényintenzitás / hőmérséklet hűtési és fűtési görbék inflexiós pontját használtuk, amelyet a görbék második deriváltjának zéruspontjából határoztunk meg.

## 5. Eredmények

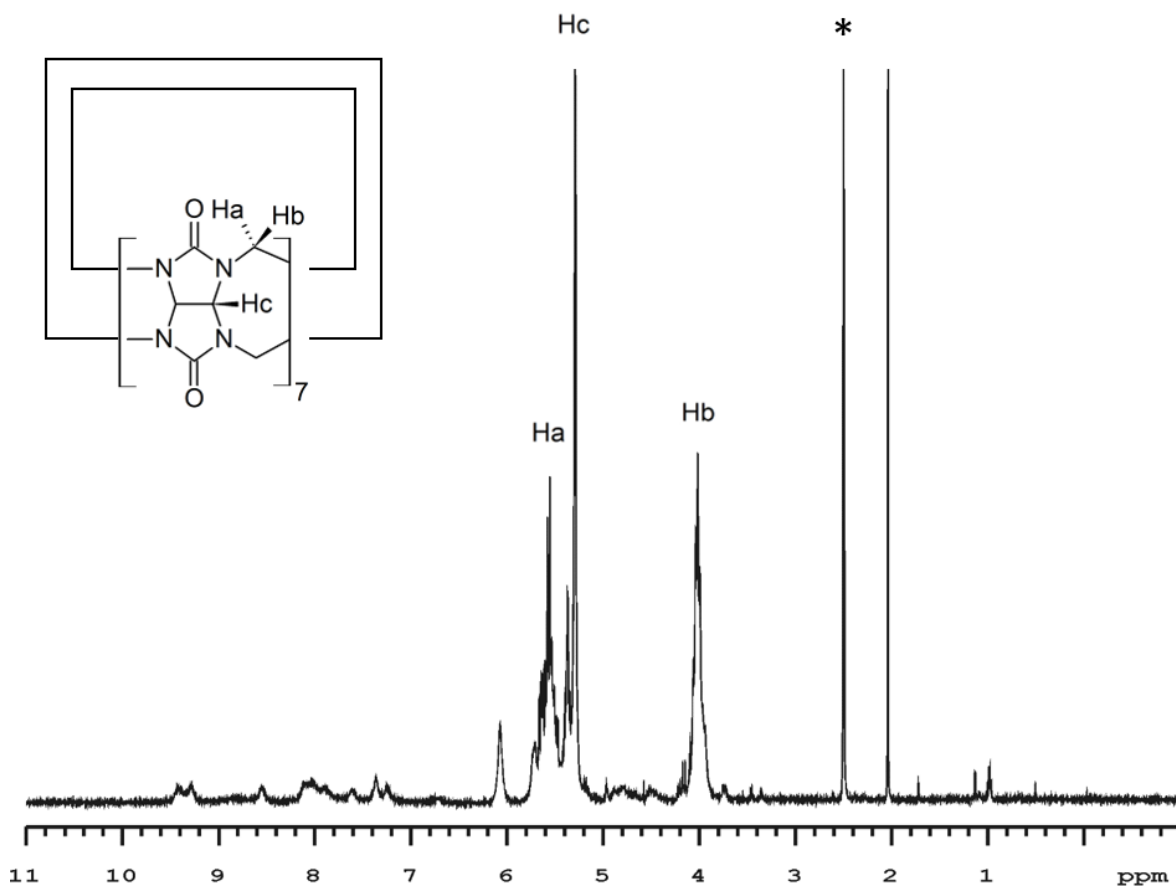
### A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexei

A 8. ábra mutatja a SA és CB7 szobahőmérsékletű 1:1 mólarányú oldatának  $^1\text{H}$  NMR spektrumát; a vízhez tartozó maradék oldószer jelet (4,77 ppm) a presat szekvenciával nyomtuk el. A létrejövő komplex szerkezetének feltárása során kihívást jelentett, hogy szobahőmérsékleten rezonanciák jelentősen elszélesednek, ezért a későbbiekben alacsonyabb mérési hőmérsékletet és változó SA:CB7 arányú oldatokat használtunk. A kémiai csere jellemzésére kétdimenziós  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY mérést, míg a kialakuló specieszek méretének meghatározására a DOSY kísérletet alkalmaztuk.

### A szabad CB7 és SA $^1\text{H}$ NMR spektroszkópiája

*A szabad CB7 oldat  $^1\text{H}$  NMR spektrumában csak 3 azonos intenzitású rezonancia jelenik meg a molekula nagyfokú szimmetriájának köszönhetően: a metin protonoknak megfelelő szinglet (5,3 ppm), valamint a két nem ekvivalens metilén proton dublett párja. A CB7 szimmetria tengelyével közel párhuzamos (a, 5,6 ppm) és a kifelé mutató (b, 4,0 ppm) protonok geminális helyzetüknek megfelelő csatolási állandóval ( $J = 15,6$  Hz) és nagy kémiai eltolódás különbséggel jellemezhetőek, mely a szomszédos karbonil-csoportok árnyékoló hatásának anizotrópiájára vezethető vissza. Mindhárom proton a CB7 külső felszínén helyezkedik el, így a zárványkomplex képződés nem okoz jelentős változást a CB7  $^1\text{H}$  NMR spektrumában, így annak értelmezésétől a későbbiekben eltekintünk. Emellett, a kifelé mutató CB7 protonoknak a vendégmolekulától mért távolsága meghaladja a 6 Å-öt, így nem*

tudtuk alkalmazni az intermolekuláris  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  keresztrelaxáció alapuló NOESY vagy ROESY kísérleteket a zárványkomplex szerkezetének jellemzésére.



**8. ábra A**  $\text{SA}^+$  és CB7 1:1 molarányú szobahőmérsékletű  $\text{D}_2\text{O}$  oldatának  $^1\text{H}$  NMR spektrumában a jelek elszélesednek és nem alkalmasak a kölcsönhatás szerkezeti feltárására. (0,4-0,4 mM; \*7% DMSO,  $\delta_{\text{H}}^{\text{DMSO}} = 2,50$  ppm; 298K)

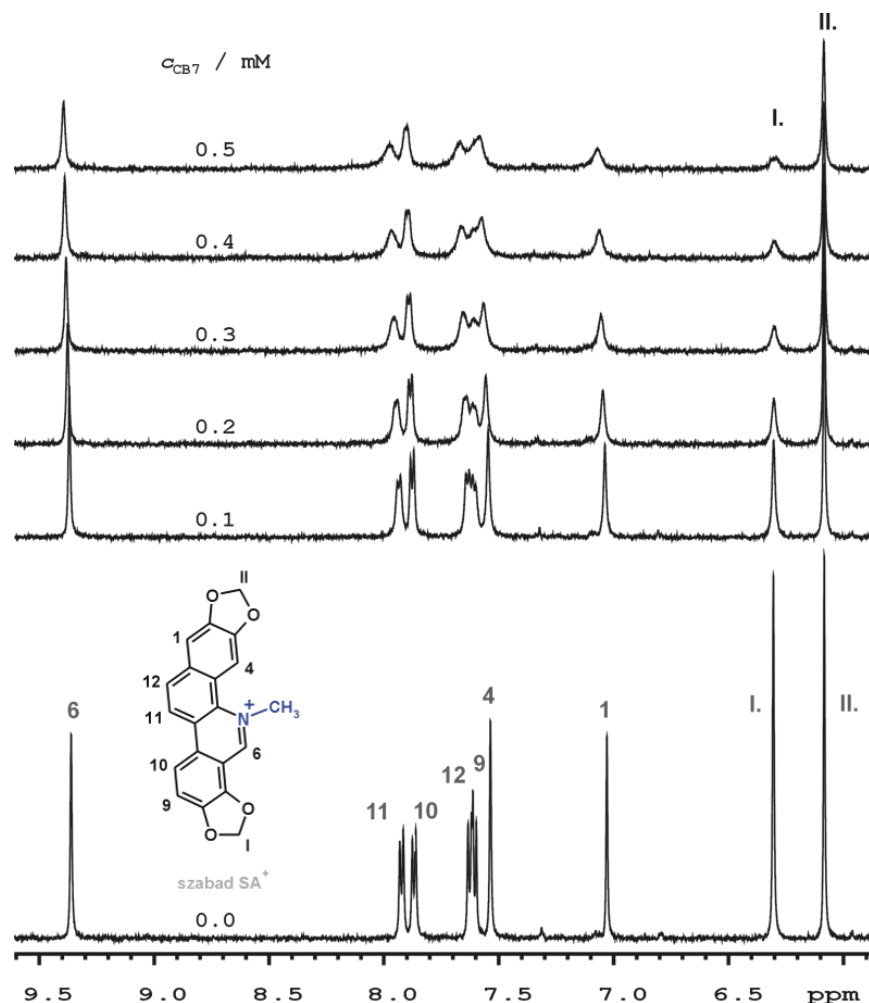
A *szabad SA* oldat szobahőmérsékletű  $^1\text{H}$  NMR spektruma éles jelkészlettel rendelkezik, melyben minden molekularészlet egyedileg azonosítható. A SA  $^1\text{H}$  NMR jelhozrendelését  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  egy és többkötéses skaláris csatolásra érzékeny gHSQC és gHMBC, valamint a térközelségeket igazoló  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  egydimenziós ROESY kísérletekkel

végeztük el. Az elektronegatív heteroatomok jelenléte miatt az alifás protonok magas kémiai eltoldással jellemezhetők: a metil-csoport (2,0 ppm) és a két metilén-csoport (6,1 ppm; 6,3 ppm) szingletként jelenik meg a spektrumban; az aromás régió jelhozzárendelését a 9. ábra tartalmazza.

### CB7 és SA arány változtatásának hatása a $^1\text{H}$ NMR spektrumra

A 9. ábra szemlélteti, hogyan változik a SA  $^1\text{H}$  NMR spektrumának aromás régiója fokozatos CB7 adagolás hatására 283 K-en. A rezonanciák jelentősen elszélesednek, különösen a SA I. metilén proton jelének eltűnését figyelhetjük meg, amelyet később kapcsolatba hozunk a SA:CB7 1:1 zárványkomplex keletkezésével.

A 10. ábra a CB7 oldatnak SA-nal történő titrálása során rögzített  $^1\text{H}$  NMR spektrumokat mutatja; az ábra felső részén a tiszta SA<sup>+</sup> oldat D<sub>2</sub>O-ban mért spektruma található, mint referencia. Az alsó spektrumokon az 1:10 és 1:5 közötti SA:CB7 koncentrációarálynál egy (kék) jelkészlet figyelhető meg, amely lényegesen eltér a tiszta SA oldat spektrumától. Ezt a jelkészletet a későbbiekben a SA:CB7 1:2 zárványkomplexnek felleltettük meg. A CB7 üregébe ágyazott I és II metilén protonok erősen árnyékolttá válnak és a 4-5 ppm-es tartományba tolódtak el a rezonanciáik, ahol átfednek az oldószer és a CB7 jeleivel; ezért hiányoznak a bemutatott spektrumtartományból. A komplexképződés hatására az 1 és 9 protonok árnyékoltsága is megnövekszik. Mindez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy a vendégmolekula mindkét vége egy-egy CB7 makrociklusba ágyazódott. A 11 és 12 protonok árnyékoltsága csökken a szabad SA-hoz képest, amit a CB7 karbonil-csoportjaihoz viszonyított elhelyezkedésükkel magyaráztunk.



**9. ábra** A SA titrálása CB7-ral  $^1\text{H}$  NMR spektrum aromás régióján bemutatva. (4 mM SA;  $\text{D}_2\text{O}$  \*7% DMSO,  $\delta_{\text{IH}}^{\text{DMSO}} = 2.50$  ppm; 283 K). A CB7-et nem tartalmazó, szabad SA jelhozzárendelését az alsó spektrum tartalmazza.

Az 1:3 SA:CB7 koncentrációránynál egy második (zöld) jelkészlet jelenik meg a spektrumban, ezt a későbbiekben a SA:CB7 1:1 arányú komplexként azonosítottuk. A zöld és kék jelkészletek között kis eltérést mutatkozik a SA 6, 9, 10, 11, 12, rezonanciái esetén, a zöld jelkészlet szisztematikusan alacsonyabb rezonancia frekvenciáknál jelenik meg. A SA molekula II. oldalán elhelyezkedő 1, 9 és a II. metilén protonok kémiai eltolódása jelentősen különbözik a zöld és a kék jelkészletek között. A zöld jelkészletben a II metilén protonoknak



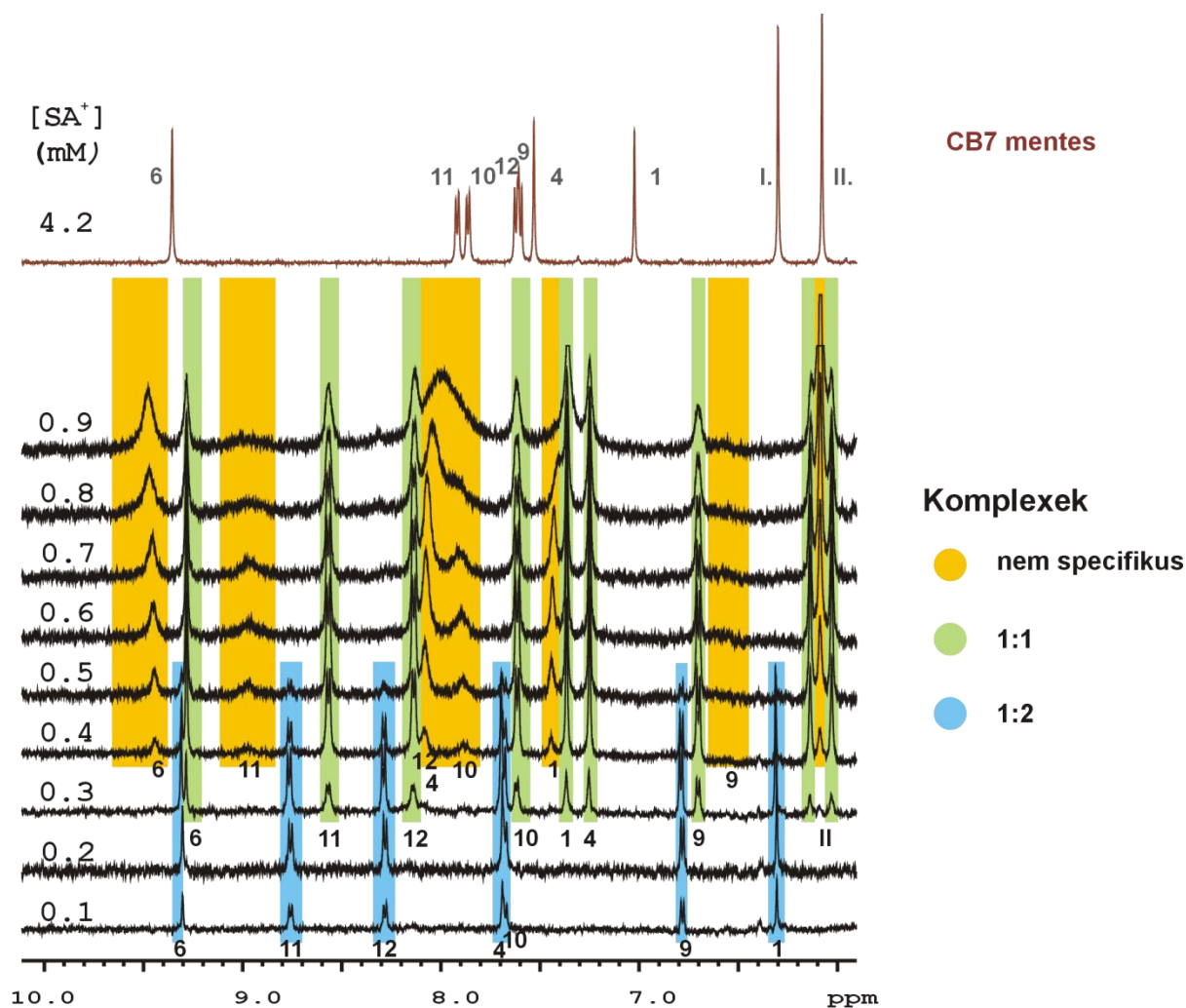
két kiszélesedett jel felel meg 6,1 ppm körül, melyeknek a kémiai eltolódása a SA-hoz hasonló. A geminális II. metilén protonok kémiai inekvivalenciája arra utal, hogy diasztereotóp környezetbe kerültek a komplexképződés hatására,(212) azonban a két proton közötti kétkötéses csatolási állandó nem olvasható le a spektrumból ( $J < 2$  Hz).

Tovább növelve az SA<sup>+</sup> koncentrációt eleinte az 1:1-es komplexhez tartozó rezonanciák intenzitásnövekedése figyelhető meg, majd egy harmadik (sárga) jelkészlet tűnik fel a spektrumban. A három jelkészlet egymás mellett a koncentrációarányok egy szűk tartományában figyelhető meg, amelyben a későbbiekben a kétdimenziós spektroszkópiai vizsgálatainkat is végeztük. A kiszélesedő, sárga jelkészlet nem jellemezhető egyetlen molekuláris szerkezettel. A rendszer koncentráció és hőmérséklet függése arra utal, hogy a sárga rezonanciák a szabad forma és a vele gyors csere állapotában lévő gyengén kötött asszociátumok átlagolt jelkészlete. Itt jelenhetnek meg a SA<sup>+</sup> és CB7 kis energiagáttal jellemezhető, nem kizárólag zárványkomplex típusú asszociátumai, valamint a SA<sup>+</sup>-SA<sup>+</sup> típusú kölcsönhatások is összetettebbé teszik a képet (lásd 19. ábra felül). Összefoglalóan erre a jelkészletre nem specifikusan kötött SA<sup>+</sup>-ként fogunk utalni, megkülönböztetendő az 1:2 és 1:1 komplexek lassú kémia csere állapotában lévő rezonanciáitól.

#### CB7 és SA által képzett komplexek cserefolyamatainak azonosítása

Az előző fejezetben bemutattuk, hogy a különböző koncentráció arányú SA:CB7 elegyek egyedi jelkészletekhez járulnak hozzá az <sup>1</sup>H NMR spektrumban. Ebben a fejezetben az oldatot alkotó egyes specieszek szerkezeti, kinetikai, termodinamikai és hidrodinamikai jellemzését mutatjuk be. A három jelkészlet asszignációját a szabad SA-ból kiindulva végeztük el, majd az egyes jelek egymásnak való megfeleltetését két független módszerrel is igazoltuk: hőmérséklet-függő és <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY méréseket végeztünk. Továbbá becslést adtunk az oldatban zajló cserefolyamatok sebességéről és meghatároztuk az egyensúlyi

állandókat. A megfigyelt specieszek szerkezetének és a SA:CB7 arány igazolása végett, az egyes jelkészletekhez tartozó specieszek hidrodinamikai sugarát  $^1\text{H}$  DOSY mérésekkel határoztuk meg. A zárványkomplexek szerkezetének szemléltetésére szemiempirikus számításokat végeztünk, majd a modellek hidrodinamikai sugarát összevetettük a kísérleti értékekkel.

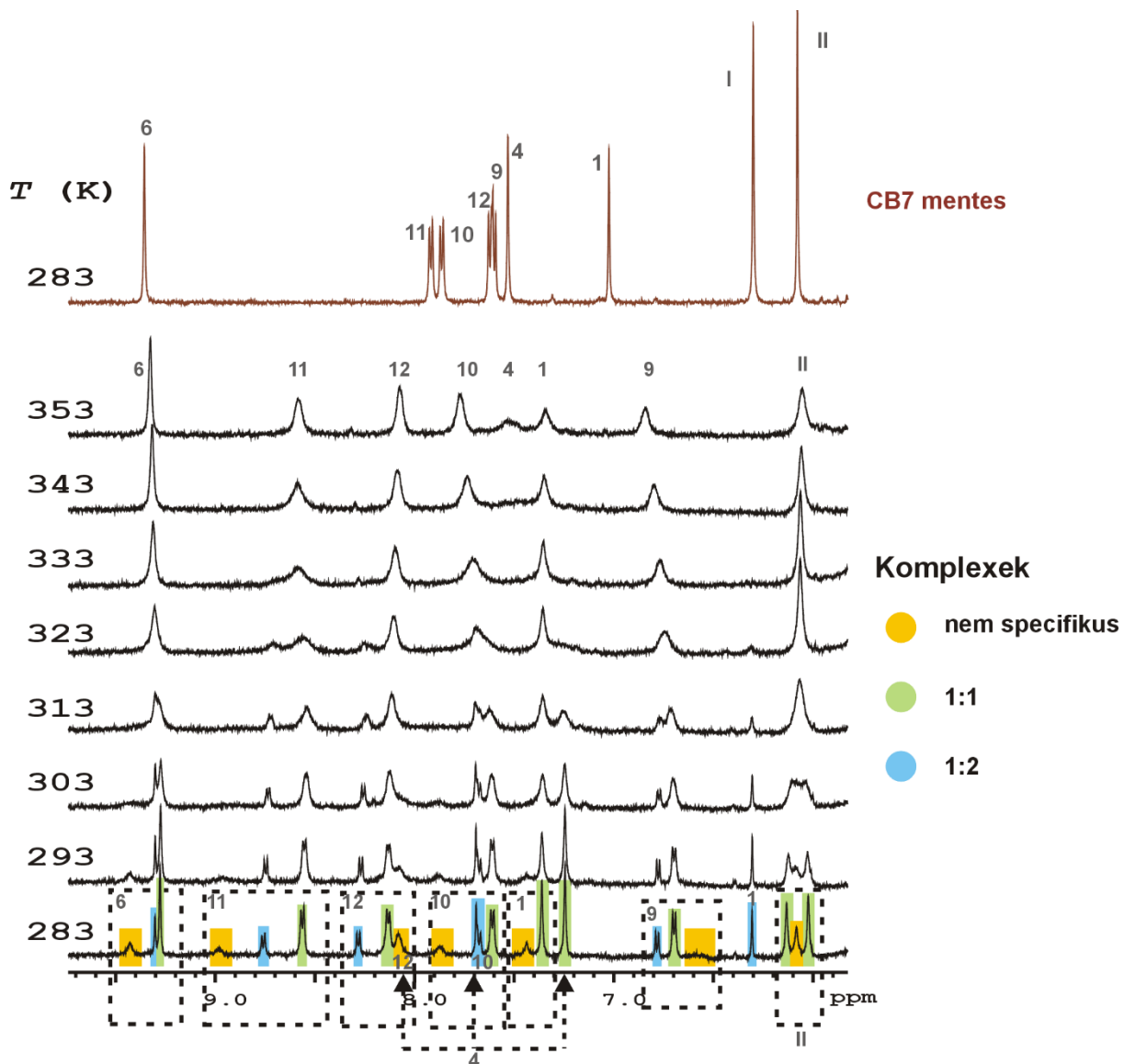


**10. ábra** CB7 titrálása SA-nal a  $^1\text{H}$  NMR spektrum aromás régióján bemutatva. ( $\text{D}_2\text{O}$  \*7% DMSO,  $\delta_{\text{IH}}^{\text{DMSO}} = 2,50$  ppm; 283K). A CB7 koncentrációját állandóan tartottuk (1 mM), a SA koncentrációját a bal oldalon tüntettük fel. A legfelső sorban referenciaként a CB7

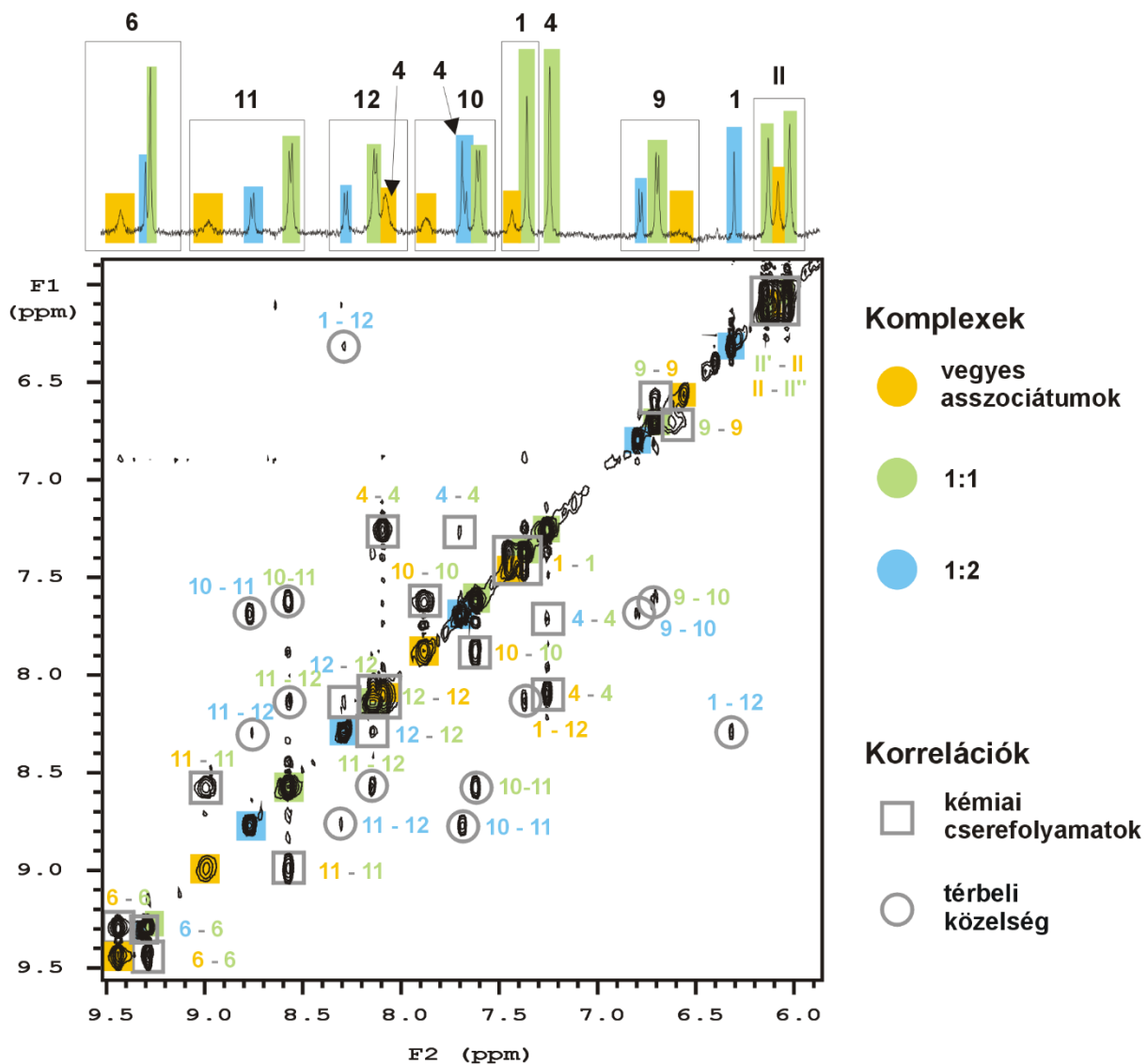
mentes SA spektrumot ábrázoltuk. A jelkészletek színezése a 19. ábrán ismertetett molekuláris modelleknek felel meg.

*A 11. ábra mutatja be, hogyan változik a **hőmérséklet** emelése hatására a SA:CB7 elegy  $^1\text{H}$  NMR spektruma. Az alkalmazott oldatösszetétel (0,43 mM SA és 1 mM CB7) mellett alacsony hőmérsékleten három jelkészlet jelenik meg. A hőmérséklet emelése hatására a különböző specieszekben az egymásnak megfelelő SA protonok rezonanciái összeolvadnak, 333 K felett egy jelkészlet figyelhető meg a  $^1\text{H}$  NMR spektrumban. Ez a jelkészlet azonban lényegesen eltér a szabad SA oldatában mérttől. Az oldat ismételt hűtése és melegítése során azonos spektrális képet kaptunk, tehát az oldatban zajló folyamatok reverzibilisek, nem mutatható ki degradáció.*

Az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektrumban megjelenő keresztcsúcsok egyszerre hordoznak információt a molekulák térszerkezetéről és a közöttük zajló cserefolyamatok sebességéről. A 12. ábrán körrel kiemelt keresztcsúcsok egy adott specieszen belül, a molekula dinamikus térszerkezetében egymáshoz térben közel elhelyezkedő protonoktól származnak, így a jelhozzárendelésben voltak a segítségünkre. A négyzettel jelölt keresztkorrelációk a mérés keverési ideje alatt zajló kémiai cserefolyamatok következtében jelennek meg a spektrumban; ezek két speciesz egymásnak megfelelő protonjai közt jelentkeznek. A cserefolyamatok jól megfigyelhetőek a sárga és zöld, valamint a zöld és kék jelkészletek között, azonban a sárga és kék jelkészlet között a csere elhanyagolható. A változó keverési idővel felvett  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY mérések alkalmasak a cseresebességi együtthatók meghatározására is, mi azonban az erőforrások hiányában az egyensúlyi rendszer termodinamikai jellemzését végeztük el gyorsabb módszerekkel.



**11. ábra** A hőmérséklet változtatásának hatása a  $^1\text{H}$  NMR spektrum aromás régiójára a 0,43 mM SA és 1 mM CB7 elegyben. ( $\text{D}_2\text{O}$  \*7% DMSO,  $\delta_{1\text{H}}^{\text{DMSO}} = 2,50$  ppm) A legfelső sorban referenciaként a CB7 mentes SA spektrumot ábrázoltuk. A hőmérséklet emelése hatására egymással összeolvadó jeleket szaggatott vonallal jelöltük, ezek azonos kémiai helyzetű protonoknak felelnek meg a különböző specieszekben.



**12. ábra** A 0,43 mM SA - 1 mM CB7 elegy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektrumának aromás régiója. ( $\text{D}_2\text{O}$  \*7% DMSO,  $\delta_{1\text{H}}^{\text{DMSO}} = 2.50$  ppm; 263K;  $t_{\text{mix}} = 0.1$  s) A legfelső sorban referenciaként a CB7 mentes SA  $^1\text{H}$  NMR spektrumát ábrázoltuk. A keresztcsúcsok kétféle folyamatból erednek a spektrumban: a nagy intenzitású keresztcsúcsok kémiai cserefolyamatok során fejlődtek ki, ezek a SA különböző specieszekben található, azonos helyzetű protonjai között jelennek meg (□). A NOE típusú keresztcsúcsok egy specieszen belül fejlődnek ki a térben közel elhelyezkedő protonok között (○).

A **komplexbépződés egyensúlyi állandóit** három független módszerrel határoztuk meg: a 11. ábrán látható koncentrációfüggő NMR spektrumokat felhasználva állapítottam meg az egyensúlyi állandókat (4. táblázat), továbbá abszorpciós és fluoreszcencia spektroszkópiával együttműködőink – dr. Biczók László, dr. Miskolczy Zsombor és dr. Medgyesi Mónika – is vizsgálták a rendszer termodinamikai és kinetikai paramétereit. Az összehasonlítás során figyelembe kell vennünk, hogy az egyes méréseket különböző koncentráció tartományokban végeztük: NMR méréseket 0,1-1 mM, az abszorpciós spektrumokat 10-100  $\mu\text{M}$ , míg a fluoreszcencia spektrumokat 0,5-2  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományokban rögzítettük. A spektrofluorimetriás mérések során csak a szabad SA és CB7, valamint az 1:2 és 1:1 komplexek jelenétét vettük figyelembe; elhanyagoltuk a SA komplexeken kívüli további gyenge kölcsönhatásait, amit az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban sárga jelkészlet képvisel. Az asszociációs egyensúlyi állandókat a következőképpen definiáltuk:

$$K_1 = \frac{[1:1]}{[SA][CB7]}$$

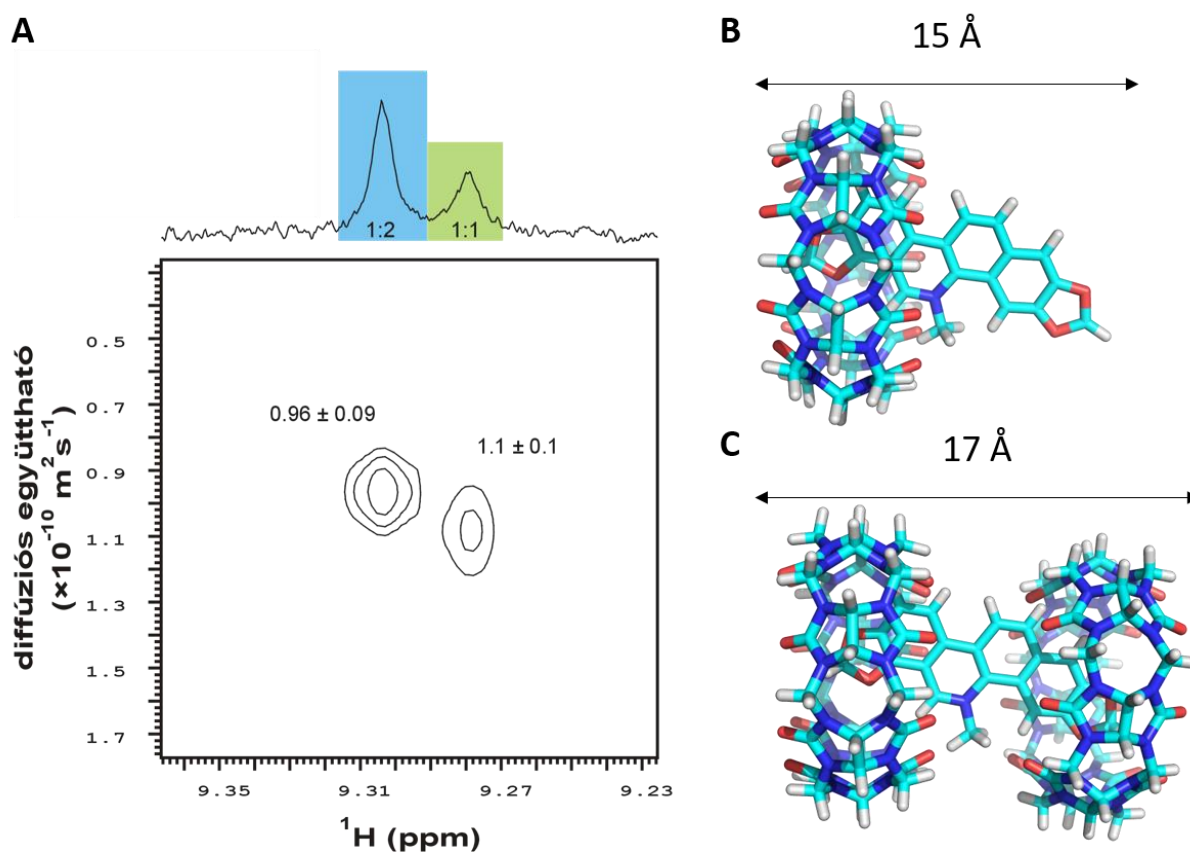
$$K_2 = \frac{[1:2]}{[1:1][CB7]}$$

**4. táblázat** A komplexképződési egyensúlyi állandók értéke a SA és CB7 elegyben.

	$K_1 / \text{M}^{-1}$	$K_2 / \text{M}^{-1}$
abszorpciós spektrum (490 nm, 298K)	$10^6$	1000
fluoreszcencia spektrum (558 nm, 298K)	$1,4 \cdot 10^6$	1000
koncentráció függő NMR (283K)	<sup>c</sup>	2900

<sup>c</sup> Nem mért mennyiség

Az NMR spektrumokban megjelenő jelkészletek alapján meghatározott koncentrációarányok és az ebből számított  $K_2$  jó egyezést mutat az abszorpciós és fluoreszcencia spektrumokkal nyert értékekkel. A  $K_1$  meghatározására nem volt lehetőség az NMR technikával, hiszen a szabad SA mennyisége nem határozható meg a spektrumokból, ez a sárga jelkészletnek csak egy részét képezi.



**13. ábra** A 0,3 mM SA - 1 mM CB7 elegy  $^1\text{H}$  DOSY spektrumának a SA 6-os protonjára vonatkozó részlete ( $\text{D}_2\text{O}$ , \*7% DMSO,  $\delta_{1\text{H}}^{\text{DMSO}} = 2,50$  ppm; 283K). (A) A meghatározott transzlációs diffúziós együttható ( $D$ ) értékét mutatja be az ábra mindkét specieszre. A két SA:CB7 zárványkomplex szemiempirikus számításokkal nyert molekulamodellje (B: 1:1; C: 1:2)

**5. táblázat** A SA-CB7 elegyben kimutatott specieszek méretének összehasonlítása. A bal oldalon szerepel a  $^1\text{H}$  DOSY mérésekből meghatározott translációs diffúziós együttható ( $D$ ) és a belőle számított hidrodinamikai sugár ( $R_h$ ). A jobb oldalon a kristályszerkezetekből (SA, CB7), illetve a molekulamodellekből (1:1, 1:2) származtatott atomkoordináták alapján meghatározott girációs sugarat ( $R_g$ ; merev gömb közelítés) tüntettük fel, melyből az  $R_h$  értékét a szilárd gömb közelítéssel számítottuk ki. Az atomkoordinátákra illesztett forgási ellipszoid tengelyeinek hosszát a, b és c oszlopok ismertetik.

$^1\text{H}$ DOSY		Kristályszerkezet* / molekulamodell** alapján					
$D / 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	$R_h / \text{Å}$	$R_g / \text{Å}$	$R_h / \text{Å}$	$a / \text{Å}$	$b / \text{Å}$	$c / \text{Å}$	
		$(R_g/0,775)$					
CB7		5,498*	7,08*	6,7355*	6,2502*	3,5569*	
SA		4,119*	5,31*	19,1501*	1,1257*	NAN	
1:1	$1,1 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,7$	5,33**	6,88**	9,6992**	6,3470**	4,0623**
1:2	$0,96 \pm 0,09$	$8,6 \pm 0,8$	7,283**	9,40**	14,1202**	7,4716**	4.2723**

A 13. ábra mutatja be a 0,3 mM SA és az 1 mM CB7 elegy  $^1\text{H}$  DOSY spektrumának részletét. A zöld színű jelkészletre számított translációs diffúziós együttható ( $1,1 \pm 0,1$ )  $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  szignifikánsan meghaladja a kék jelkészletét, ( $0,96 \pm 0,09$ )  $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . A diffúziós együtthatókból - a Stokes-Einstein-féle, szilárd gömbökre vonatkozó közelítést felhasználva (lásd Bevezetés) - számított hidrodinamikai sugarakat ( $R_h$ ) a 5. táblázatban tüntettük fel. A DMSO 7%-os vizes oldatának dinamikai viszkozitás értékét  $10^\circ\text{C}$ -on az irodalmi adatok(203) extrapolációjából határoztam meg (2.509 cP). A mért  $R_h$  értékek összhangban állnak az 1:1 és 1:2 összetételű SA:CB7 zárványkomplexek szemempirikus számításokkal nyert molekulamodelljeivel. Az 1:1 és 1:2 komplexek energiaminimalizált szerkezetét összehasonlítva az 1:1 komplexben a SA I.-es vége mélyebben ül az üregben. Az 1:2 modell szerint - a SA aszimmetriáját követve - a két gazdamolekula egymás felett elcsúsztatva helyezkedik el és hossz tengelyük kis szöget zár be egymással ( $< 10^\circ$ ). A girációs sugár ( $R_g$ ) közelítésmentesen számolható az egyes modellekből, amit saját készítésű programmal



végeztem el. Az  $R_g$  ismeretében az  $R_h$  értéke megbecsülhető, és ez közvetlenül összevethető a mérési adatokkal. Az  $R_h$  számítása során a merev gömb közelítéssel éltünk.(150) A merev gömb közelítés ellenőrzése végett az atomkoordinátákra forgási ellipszoidot illesztettünk és az 5. táblázatban foglaltuk össze az ellipszoidok három tengelyének hosszát. Az 5. táblázat mutatja a szabad SA és CB7 kristályszerkezetéből számított  $R_g$  és  $R_h$  értékeket is. A zárványkomplekképződés során nem mérhető jelentős méretnövekedés; a naiv várakozással ellentétben az 1:1 komplex kompaktabbnak bizonyult, mint a szabad CB7.

### A patogén hE3 variánsok előállításának és tisztításának optimalizálása

A szerkezeti vizsgálatok előkészítéseként egy egységes fehérjeelőállítási és tisztítási protokoll kidolgozása volt a célunk, mely a variánsok többségét megfelelő mennyiségben és minőségben szolgáltatja. A munkám megkezdése előtt megjelent, a hE3 nagytisztaságú előállítását leíró közleményt vettük alapul(200), melyhez képest az előállított oldható fehérje mennyiség növelése érdekében végeztünk módosításokat. A legfontosabb fejlesztést az jelentette, hogy a korábban alkalmazott periplazmatikus fehérje expressziós eljárást citoszolikusá változtattuk, ennek során az expressziós vektort, *E. coli* gazdasejt vonalat, illetve a sejtfeltárási eljárást módosítottuk. Továbbá, a citoszolikus eljárás következtében várható szennyező fehérjék mértékének növekedése miatt felülvizsgáltuk az alkalmazott affinitás kromatográfiás tisztítási eljárást is.

A korábban közölt hE3 előállítási eljárás(200) a pASK-IBA6C (IBA GmbH, Goettingen, Németország) expressziósvektor-plazmidot használta, ennek megváltoztatására a citoszolikus fehérjeexpresszióra való áttérés során két fő szempontból is szükség volt: Egyrészt, a pASK-IBA6C segítségével előállított fehérje irányítottan, az *E. coli* periplazmájába választódik ki. A pASK-IBA6C plazmidról a tetraciklin promóter (*tet*, közepesen erős promóter) segítségével indítható be a transzkripció (amely translációban/fehérjeexpresszióban folytatódik) anhidrotetraciklin adására; a terméket a periplazmába az ompA szignálszekvencia irányítja, ami a transzlokáció során eltávolításra kerül a rekombináns fehérjéről. Másrészt, a pASK-IBA6C plazmid a klóramfenikol-acetiltranszferáz enzimet is kódolja (Cam<sup>R</sup>), mely az *E. coli* citoszoljában szaporodik fel, ezzel szennyezve a citoszolikus eljárást. A pASK-IBA6C a Cam<sup>R</sup> gén segítségével klóramfenikol antibiotikum rezisztenciát biztosít a gazdasejtnek. Mindezeket figyelembevéve a széles körben elterjedt pET expressziós rendszer egyik típusára, a pET-52b(+) (Novagen, Madison, WI, USA) expressziós plazmidra tértünk át. A pET-52b(+) a pASK-IBA6C-hez hasonlóan kódolja az affinitás kromatográfiánál használni kívánt Strep-tag-et, valamint a (HRV) 3C proteolitikus hasítási helyet. Azonban a pET rendszere a T7 promótert (erős promóter) használja, így a fehérjeexpresszió izopropil-β-D-1-

tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukálható. A fehérjekitermelés optimalizálása során az indukció időzítését, az alkalmazott IPTG koncentrációt, valamint a fehérje expresszió hosszát is felülvizsgáltunk. A tesztek során a tápoldatból közvetlenül vettünk mintákat és az expresszáldott fehérje mennyiségét Na-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) követtünk a területen elterjed eljárás szerint.(213) A pET-52b(+) vektor ampicillin (Amp) rezisztenciát biztosít a gazdasejtnek a  $\beta$ -laktamáz kódoló *amp<sup>R</sup>* gén segítségével. A  $\beta$ -laktamáz nem szaporodik fel a gazdasejtben, azt az *E. coli* a tápoldatba választja ki, ezzel fokozatosan lebontva a tápoldat Amp tartalmát. Mi keresztfertőzés jelét nem tapasztaltuk, az Amp pótlását a 3 órán át folytatott expresszió során nem láttuk szükségesnek. A plazmid megváltoztatásával együtt a fehérjéket kódoló DNS szekvenciák kodonoptimalizált változataira tértünk át. A kodonoptimalizálást a hE3-ra nézve a DNA2.0 Inc. (Newark, CA, USA) végezte el, míg a variánsok szekvenciáit ennek módosításával Dr. Törőcsik Beáta tervezte meg. A nehezen előállítható hE3 variánsok esetén több kodon szinonimát is teszteltünk, ami egyik esetben sem okozott további javulást a kitermelésben.

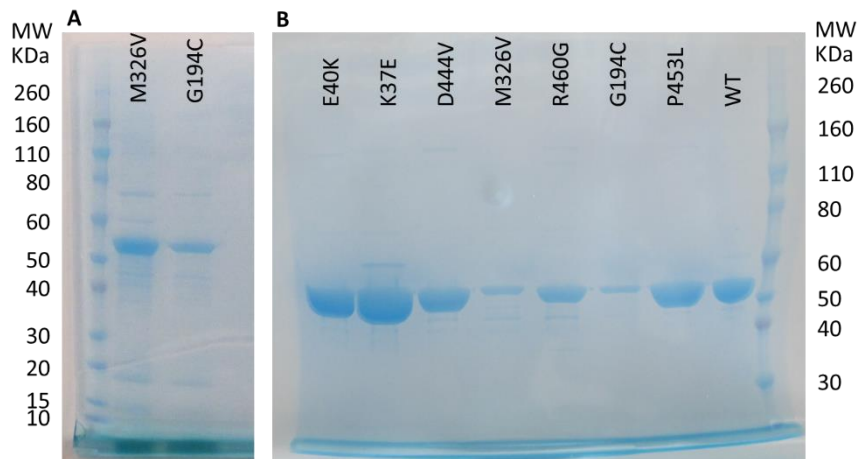
Az expressziós JM83 *E. coli* vonalat a BL21(DE3)-ra módosítottuk. A korábban alkalmazott pASK-IBA6C plazmid minden *E. coli* vonallal kompatibilis volt, mert a fehérjetermelés közvetlenül indukálható anhidrotetraciklinnel. Azonban minden pET-52b(+) plazmidkonstrukt által kódolt rekombináns fehérje előállításához olyan módosított *E. coli* vonal szükséges, amely hordozza T7 RNS-polimerázt. A T7 RNS-polimeráz a T7 bakteriofág természetes promótere, 5-ször erősebb, mint az *E. coli* baktérium konszenzus promótere, ezért nagymértékű és specifikus expressziót biztosít. A DE3 *E. coli* vonalak genomjába fág-fertőzéssel juttatták be a T7 RNS-polimeráz génjét, melyet a lacUV5 promóter szabályoz. Indukció során, az IPTG hatására megkezdődik a T7 RNS-polimeráz termelése, ami beindítja a rekombináns fehérjét kódoló gén transzkripcióját. A DE3-típusú *E. coli* vonalak három változatát teszteltünk a BL21(DE3)-t, a Rosetta-gami B(DE3)-t és a Rosetta-gami 2(DE3)-t. Ezeket azért választottuk, mert megnövekedett fehérjestabilitást ígérnek: mindegyikből hiányzik a *lon* és a *ompT* proteáz, melyek lebonthatnák a termelődött fehérjét. A Rosetta-gami B(DE3) és a Rosetta-gami B2(DE3) a hagyományos BL21(DE3) sejtvonallal laktóz permeáz hiányos változatai, melyekben a rekombináns fehérjetermelés sebessége arányos az

IPTG koncentrációval. A lassabb fehérjetermelés esetenként kedvező lehet a fehérje oldhatósága, illetve az aktivitása szempontjából. A diszulfid kötéseket tartalmazó hE3 szempontjából a Rosetta-gami B(DE3) és a Rosetta-gami B2(DE3) vonal további előnye, hogy *trxB/gor* mutációkat hordoznak, melyek előnyösek a diszulfid kötéseket tartalmazó fehérjék expressziója során. Az expresszió teljesítménye nem mutatott jelentős változást a három sejtvonaltól, így a széles körben alkalmazott BL21(DE3) vonalat választottuk.

A korábbi affinitás kromatográfiás eljárás lépéseinek felülvizsgálatát két szempontból végeztük el: a célfehérjénk leghatékonyabb kinyerését céloztuk meg, miközben a szennyezők arányát alacsonyan kívántuk tartani. Rekombináns fehérjeszekvenciáinkban Strep-tag alapú affinitás tag-eket alkalmaztunk, melyek a kromatográfiás oszlophoz kémiaiilag kapcsolt Strep-Tactin fehérjéhez nagy affinitással kötődnek. A Strep-Tactin a sztreptavidin fehérje módosított verziója. A 8 aminosav hosszúságú Strep-tag (WSHPQFEK)(214) és a Strep-Tactin kölcsönhatás a természetben előforduló,(215) közismerten az egyik legnagyobb affinitású, avidin és biotin közötti kölcsönhatást másolja. A biotin kismolekula (B<sub>7</sub> vitamin) szabad formában és fehérjékhez kötődve is előfordul a természetben. Ez alapján fennállt a lehetősége annak, hogy az affinitás kromatográfiás lépés után a mintáink fő szennyezőit az *E. coli*-ből származó természetesen biotinilált fehérjék fogják képezni. A 14. ábra A részén látható két alacsony kitermeléssel előállított - így szennyezőket nagyobb arányban tartalmazó - M326V és G194C hE3 variáns SDS-PAGE gélképe. A legerősebb sávokat a célfehérjék adják, amelyek a hE3 monomer molekulatömegénél (53 kDa) jelennek meg. Emellett ~5-10 %-os jelintenzitással számos szennyező fehérje jelenlétét is tapasztaltuk. Azzal a feltételezéssel élünk, hogy a szennyezők nagy része biotinilált fehérje, melyek biotin tartalma avidin hozzáadásával maszkolható (a biotin-avidin/sztreptavidin, illetve a Strep-tag-Strep-Tactin interakciók páronként specifikusak, a keresztaffinitások kb. két nagyságrenddel kisebbek, mint az eredeti értékek). Figyelembe véve a kimutatott szennyezést mértékét és azt az irodalmi adatot, hogy 1 L telített *E. coli* tápoldatban ~1,75 µg biotin jelenlétére számíthatunk,(216,217) az affinitás kromatográfiás lépés előtt a *E.coli* sejtlyázátumhoz 330 µg avidint adtunk 1 L tápoldatra vonatkoztatva. A Strep-tag-konjugált fehérje, ha köt is avidint, elengedi azt, amikor majd a

kolonnán ~100-szoros affinitással kötődik a Strep-Tactin-hoz, így ez a lépés nem csökkenti a fehérje kitermelést. A 14. ábra B része az M326V és G194C variások avidin jelenlétében tisztított preparátumainak SDS-PAGE képét mutatja. Ezzel a módosítással a szennyeződés mértékét még a legrosszabb kitermelésű hE3 variánsok esetén is ~2% alá tudtuk szorítani. Teszteknek vetettük alá a Strep-tag-hez hasonló, Twin-Strep-tag-gel ellátott rekombináns fehérjék affinitás kromatográfiás viselkedését is. A Twin-Strep-tag kétszer tartalmazza a 8 aminosav hosszúságú specifikus szekvenciát, aminek következtében megnövekedett affinitást figyeltünk meg az oszlophoz. A megnövekedett affinitás hátránya azonban, hogy a kromatográfiás elúciós csúcs ellaposodott, térfogata 2 mL-ről 20 mL-re növekedett, ezzel meghosszabbítva az elúciót követő koncentrált, illetve puffercserét. A Twin-Strep-tag alkalmazásától a fenti okok miatt munkám során eltekintettem.

A kitermelést tovább javította a kromatográfiás állófázis térfogatának pontos beállítása, illetve a kromatográfiás átfolyó oldatban megjelenő célfehérje esetén, az oldat ismételt affinitás kromatográfiás tisztítása. A variánsok sorozatos előállítása során 3 db 5 mL-es Strep-Tactin oszlop soros kapcsolásával értük el az ideális 15 mL állófázis térfogatot. A fehérjetisztaság megtartása érdekében, valamint vegyszer- és időtakarékosági szempontokból nem forgattuk vissza a kromatográfiás átfolyó oldatot.



**14. ábra** A megtisztított hE3 variánsok SDS-PAGE képe. A fehérjetisztaság szemléltetése avidin mentes körülmények között (A), valamint néhány reprezentatív hE3 variáns fehérjehozamának és tisztaságának bemutatása a véglegesített protokoll alapján (B).

Minden variánsból az 1L tápoldatból nyerhető teljes fehérjemennyiség 0,04%-át alkalmaztuk. A redukáló körülmények között előkészített, legalább 10 percig 70 °C-on inkubált mintákban a hE3 variánsok a monomernek megfelelő 53 kDa molekulatömegnél jelennek meg. A szennyezés mértékének becslésénél fontos volt figyelembe venni, hogy az inkubációs idő csökkentésével a dimernek megfelelő molekulatömegnél található sáv vált egyre dominánsabbá, annak ellenére, hogy a természetes dimer szerkezet nem tartalmaz intermonomer diszulfid kötéseket.

#### A mutáció hatása a fehérjekitermelésre

A fehérjeelőállítási eljárás lépéseinek állandóan tartása ellenére az egyes hE3 variánsok hozama jelentős ingadozást mutatott. A 14. ábra B részén található SDS-PAGE-en bemutatott reprezentatív hE3 variánsoknak megfelelő sávok intenzitás arányai a valós fehérjekitermelési arányokat tükrözik. A G101del-, I12T-, M326V- és G426E-hE3 variánsok kitermelési százalékos értékei lényegesen elmaradtak a többi 10 variánsétól, amelyet ismételt próbálkozások, illetve mutációt hordozó aminosav kodonjának további módosítása sem oldott meg. A 10 magasabb kitermelésű fehérjéből 1 L LB tápoldatra vonatkoztatva a kitermelés 0,2 és 1 mg között változott, míg a négy nehezen termelődő variáns 0,05 mg/L körüli kitermelést mutatott. Ez a kitermelés növekedés jelentős javulást jelentett a periplazmatikus eljáráshoz képest, amellyel ~120 µg/L hE3 előállítása volt lehetséges.(200)

A dolgozat későbbi fejezeteiben bemutatott szerkezetvizsgálati eljárásokhoz készített fehérjeminták egységesen a Módszerek fejezetben bemutatott eljárással készültek.

### A hE3 és patogén variánsainak HDX MS vizsgálata

A 15. ábra mutatja be a hE3 pepszines emésztése után azonosított, és az összehasonlító vizsgálataink során felhasznált 33 peptid részletet, melyek átfedésekkel a teljes szekvencia 95%-át képviselik; az átlagos peptidhossz 19 aminosav. A patogén mutánsokból származó peptid részleteket a 6. táblázatban soroltuk fel, ezeknek a szekvenciái csak a feltüntetett esetekben mutattak eltérést a hE3-tól.

### A hE3 szekvencia gyors deutérium cserét mutató peptid részleteinek azonosítása

A hE3 hidrogén-deutérium csere (HDX) térkép reprodukálhatóságának mértékét több, különböző időpontban előállított fehérje párhuzamos elemzésével becsültük meg. A hibahatáron belüli reprodukálhatóság eléréséhez a tárolási körülményeket egységesítettük. Az előzetes kísérletek megmutatták, hogy az egy hétig 4°C-on tárolt hE3 deutérium beépülése különbözik a gyorsfagyasztott és a kísérlet megkezdéséig -80°C-on tároltétól. Az oldatban tárolt minták deutérium felvétele megnövekedett a 146-162 és a 459-474 aminosav tartományban. Ezt a jelenséget fokozatos FAD veszteséssel magyaráztuk, és a továbbiakban reprodukálható eredményeket értünk el, ha a mintákat FAD feleslegben és -80°C-on fagyasztva tároltuk. A HDX nem volt érzékeny az N-terminális régió elé beépített tag minőségére (Strep-tag, His-tag), a későbbi kísérletekben kizárólag a Step-tag-et használtunk.

A D Q P I D A D V T V I G S G P G G Y V A A I K A A Q L G F K T V C I E K N E T L G G T C L N V G C  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

I P S K A L L N N S H Y Y H M A H G K D F A S R G I E M S E V R L N L D K M M E Q K S T A V K A L T  
 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

G G I A H L F K Q N K V V H V N G Y G K I T G K N Q V T A T K A D G G T Q V I D T K N I L I A T G S  
 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150

E V T P F P G I T I D E D T I V S S T G A L S L K K V P E K M V V I G A G V I G V E L G S V W Q R L  
 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200

G A D V T A V E F L G H V G G V G I D M E I S K N F O R I L O K Q G F K F K L N T K V T G A T K K S  
 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250

D G K I D V S I E A A S G G K A E V I T C D V L L V C I G R R P F T K N L G L E E L G I E L D P R G  
 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300

R I P V N T R F Q T K I P N I Y A I G D V V A G P M L A H K A E D E G I T C V E G M A G G A V H I D  
 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350

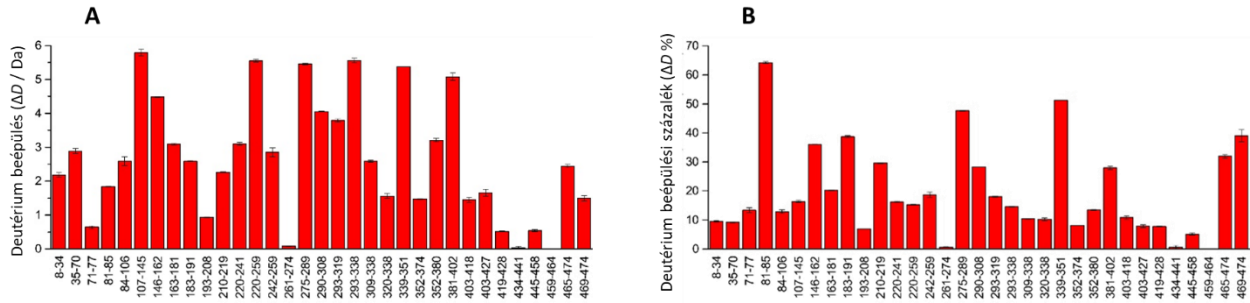
Y N C V P S V I Y T H P E V A W V G K S E E O L K E E G I E Y K V G K F P F A A N S R A K T N A D T  
 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400

D G M V K I L G Q K S T D R V L G A H I L G P G A G E M V N E A A L A L E Y G A S C E D I A R V C H  
 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450

A H P T L S E A F R E A N L A A S F G K S I N F  
 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474

**15. ábra** A hE3 szekvenciájának lefedettsége peptikus peptidekkel a HDX MS kísérletek során. A kék szakaszok a hE3 pepszines bontása után tizenkét párhuzamos kísérlet mindegyikében tömegspektrometriával kimutatott peptidek szekvenciáját mutatják. A peptid szakaszok a 474 aminosavból álló szekvenciából 452 aminosavat fednek le az összesen.





**16. ábra** A hE3 deutérium felvétele. A vízszintes tengely a pepszines emésztés során keletkezett peptid szakaszokat ábrázolja; a feltüntetett aminosav számozás a 4. ábra szerinti WT szekvenciának felel meg. A függőleges tengely az egyes peptid szakaszok tömegnövekedését (A), illetve deutérium beépülési százalékát (B) mutatja a Bevezetésben ismertetett összefüggések szerint. A hibahatárok három párhuzamos mérés szórását mutatják.

A 16. ábra mutatja, hogyan változik a hE3 amid protonjainak deutériumcserére való hajlandósága az aminosav szekvencia mentén. A legnagyobb deutérium felvétellel a 81-85, 339-351 és a 275-289 aminosavak által határolt régiók voltak jellemezhetőek. A hE3 dimer központi magját képező 261-274, 434-441 és 459-464 aminosavak közti peptid szakaszok esetében a jelen módszerrel nem volt kimutatható mértékű deutérium csere. A módszer természetéből adódóan aminosav szintű felbontást nem sikerült elérni a pepszines emésztés során, de a peptidszakaszok átfedése egyes régiók részletesebb elemzésére is lehetőséget adott. A kiemelkedő deutérium cserét mutató 275-289 szakasz után fokozatos lecsengés figyelhető meg: a 290-338 aminosav régió átfedő peptidjei az aminosav sorszámmal csökkenő deutérium csere mértéket mutatnak. Az aminosav sorszámmal növekedő deutérium csere mértékre a 352-380 és a C-terminálist tartalmazó 465-474 szakaszok esetén látunk példát. A 220-259 és a 403-428 aminosavak közötti átfedő peptidszakaszok a régió átlagos deutériumcsere-százalékával voltak jellemezhetőek, így egybefüggő szerkezeti elemnek bizonyultak.

**6. táblázat** A hE3 és patogén variánsainak pepszines emésztését követően tömegspektrometriával azonosított peptid szakaszok. A vad típusú fehérje (WT) esetében a deutérium beépülés mértékét az abszolút tömegnövekedéssel ( $\Delta D$ ) mutatjuk be. A variánsok deutérium beépülésének WT-től való eltérését ( $\Delta\Delta D$ ) tartalmazza a táblázat. Az adatok hibáját tizenkettő (WT), illetve három (variánsok) párhuzamos mérés szórás értékeként tüntettük fel.

Peptidek			mmaxD <sup>4</sup> Da	Eltérés a deutérium beépülés mértékében ( $\Delta\Delta D$ / Da)										
Helyzet	Variánsok	Aminosav szekvencia		WT	K37E	G194C	I318T	E340K	I358T	D444V	I445M	R447G	R453L	R460G
8-34	Mind	DVTVIGSGPGGYVAAIKAAQLGFKTVC	24	2.18 ± 0.01 ± 0.03	± -0.02 ± 0.03	± -0.02 ± 0.03	± -0.02 ± 0.01	± -0.01 ± 0.05	± -0.03 ± 0.11	± 0.03 ± 0.07	± 0.09 ± 0.01	± 0.08 ± 0.02	± 0.06 ± 0.02	± 0.05 ± 0.05
35-70	Kivéve K37E	IEKNETLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHGKD (diszulfid)	33	2.89 ± 0.07	± 0.19 ± 0.09	± 0.01 ± 0.07	± -0.02 ± 0.04	± 0.03 ± 0.04	± 0.01 ± 0.04	± -0.11 ± 0.06	± 0.08 ± 0.08	± -0.21 ± 0.08	± -0.01 ± 0.05	
	K37E	IEENETLGGTCLNVGCIPSKALLNNSHYHMAHGKD (diszulfid)	33											
71-77	Mind	FASRGIE	5	0.64 ± 0.04	± -0.02 ± 0.04	± -0.03 ± 0.07	± -0.01 ± 0.05	± 0.01 ± 0.05	± -0.02 ± 0.14	± 0.01 ± 0.05	± -0.05 ± 0.04	± 0.04 ± 0.07	± -0.11 ± 0.13	
81-85	Mind	VRLNL	3	1.84 ± 0.01	± -0.01 ± 0.02	± -0.01 ± 0.02	± 0.00 ± 0.02	± -0.09 ± 0.07	± 0.01 ± 0.03	± 0.01 ± 0.02	± 0.00 ± 0.03	± -0.03 ± 0.06	± -0.06 ± 0.06	
84-106	Mind	NLDKMMEQKSTAVKALTGGIAHL	21	2.59 ± 0.13	± 0.03 ± 0.13	± -0.04 ± 0.29	± 0.15 ± 0.21	± 0.11 ± 0.20	± 0.25 ± 0.11	± -0.13 ± 0.12	± -0.10 ± 0.15	± 0.06 ± 0.13	± -0.11 ± 0.16	± -0.14 ± 0.07
107-145	Mind	FKQNKVVHVNGYGKITGKNQVTATKADGGTQVIDTKNIL	37	5.79 ± 0.10	± -0.36 ± 0.11	± 0.06 ± 0.13	± 0.03 ± 0.10	± -0.11 ± 0.12	± -0.22 ± 0.11	± -0.05 ± 0.13	± -0.09 ± 0.08	± 0.00 ± 0.11	± -0.02 ± 0.10	± -0.38 ± 0.09
146-162	Mind	IATGSEVTPFPGITIDE	13	4.48 ± 0.01	± -0.38 ± 0.01	± 0.10 ± 0.05	± -0.03 ± 0.01	± -0.05 ± 0.07	± -0.20 ± 0.06	± -0.25 ± 0.04	± 0.18 ± 0.04	± -0.02 ± 0.01	± 0.04 ± 0.10	± -0.23 ± 0.09
163-181	Mind	DTIVSSTGALSLLKKVPEKM	16	3.09 ± 0.02	± -0.11 ± 0.04	± 0.08 ± 0.04	± 0.04 ± 0.04	± -0.02 ± 0.03	± 0.02 ± 0.06	± -0.03 ± 0.03	± -0.04 ± 0.04	± -0.06 ± 0.06	± -0.01 ± 0.11	± -0.04 ± 0.02

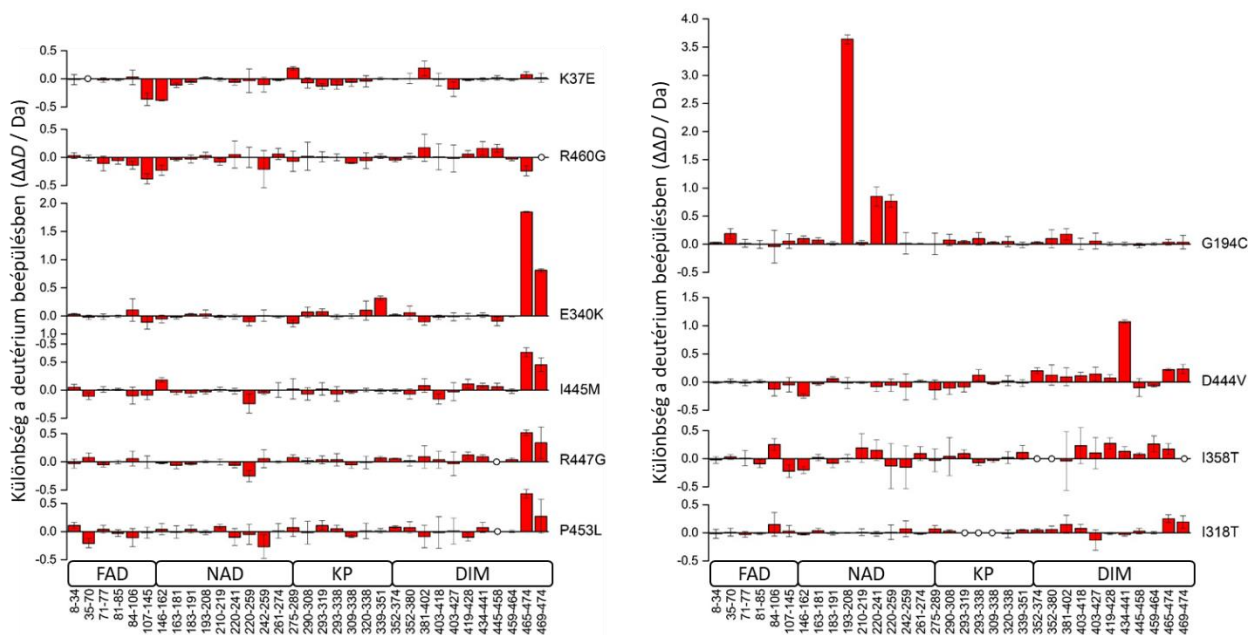
<sup>4</sup> A peptidek első két aminosavának (szürke) deutérium beépülés mértékének jellemzésére nem alkalmas az enzimatisz emésztéssel kombinált HDX MS módszer, így azokat a cserélhető protonok meghatározásánál (maxD) figyelmen kívül hagytuk.

183-191	Mind	VIGAGVIGV	7	2.59 ± -0.06 ± 0.02	± -0.01 ± 0.03	± -0.08 ± 0.06	± -0.06 ± -0.04	± 0.04	± -0.03	±				
				0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.08	0.03	0.06	0.02	0.07	0.07
193-208	Kivéve G194C	LGSVWQRLGADVTAVE	14	0.93 ± 0.02 ±	0.00 ± 0.04	± 0.01 ± -0.02	± -0.03 ± 0.01	± -0.02 ± 0.03	± 0.01 ± -0.02	± 0.03 ± 0.06				
	G194C	LCSVWQRLGADVTAVE	14					3.64 ±						
								0.08						
210-219	Mind	LGHVGGVGID	8	2.26 ± -0.01 ± 0.03	± 0.01 ± -0.02	± 0.19 ± -0.01	± 0.01 ± 0.00	± 0.09 ± -0.08	± -0.08 ±					
				0.01	0.03	0.04	0.06	0.04	0.26	0.02	0.04	0.05	0.04	0.06
220-241	Mind	MEISKNFQRILOKQGFKFLNT	20	3.10 ± -0.06 ± 0.85	± -0.02 ± -0.01	± 0.15 ± -0.08	± -0.02 ± -0.06	± -0.10 ± 0.05	±					
				0.04	0.05	0.17	0.04	0.04	0.18	0.09	0.05	0.04	0.15	0.24
220-259	Mind	MEISKNFQRILOKQGFKFLNTKVTGATKKSDBGKIDVSIE	38	5.55 ± -0.03 ± 0.77	± 0.01 ± -0.10	± -0.13 ± -0.06	± -0.24 ± -0.25	± -0.05 ± 0.00	±					
				0.04	0.21	0.11	0.13	0.07	0.40	0.11	0.17	0.10	0.18	0.18
242-259	Mind	KVTGATKKSDBGKIDVSIE	16	2.85 ± -0.10 ± 0.02	± 0.07 ± 0.01	± -0.15 ± -0.09	± -0.05 ± 0.06	± -0.27 ± -0.21	±					
				0.13	0.13	0.19	0.14	0.10	0.38	0.23	0.03	0.16	0.21	0.33
261-274	Mind	ASGGKAEVITCDVL	12	0.08 ± -0.02 ± 0.01	± -0.02 ± -0.01	± 0.09 ± 0.01	± 0.00 ± 0.00	± 0.01 ± 0.06	±					
				0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.12	0.02	0.13	0.02	0.13	0.10
275-289	Mind	LVCIGRRPFTKNLGL	12	5.46 ± 0.19 ± 0.01	± 0.07 ± -0.13	± -0.03 ± -0.14	± 0.02 ± 0.08	± 0.07 ± -0.07	±					
				0.02	0.03	0.19	0.06	0.06	0.20	0.17	0.18	0.05	0.16	0.18
290-308	Mind	EELGIELDPRGRIPVNTRF	15	4.05 ± -0.07 ± 0.08	± 0.03 ± 0.07	± 0.04 ± -0.11	± -0.07 ± 0.02	± -0.02 ± 0.02	±					
				0.01	0.09	0.10	0.02	0.09	0.34	0.11	0.11	0.05	0.20	0.25
293-319	Kivéve I318T	GIELDPRGRIPVNTRFQTKIPNIYAIG	22	3.79 ± -0.13 ± 0.05	±	0.08 ± 0.09	± -0.09 ± 0.02	± 0.04 ± 0.11	± 0.01 ± 0.09					
	I318T	GIELDPRGRIPVNTRFQTKIPNIYATG	22	0.05	0.05	0.02		0.05	0.07	0.09	0.11	0.07	0.08	0.09
293-338	Kivéve I318T	GIELDPRGRIPVNTRFQTKIPNIYAIGDVVAGPMLAHKAEDGEIIC	40	5.56 ± -0.11 ± 0.10	±	-0.01 ± -0.07	± 0.12 ± -0.07	± 0.04 ± 0.05	± 0.00 ± 0.06					
	I318T	GIELDPRGRIPVNTRFQTKIPNIYATGDVVAGPMLAHKAEDGEIIC	40	0.07	0.07	0.11		0.04	0.05	0.10	0.13	0.11	0.06	0.06
309-338	Kivéve I318T	QTKIPNIYAIGDVVAGPMLAHKAEDGEIIC	26	2.59 ± -0.06 ± 0.03	±	0.00 ± -0.03	± -0.03 ± -0.04	± -0.05 ± -0.09	± -0.10 ± 0.01					
	I318T	QTKIPNIYATGDVVAGPMLAHKAEDGEIIC	26	0.03	0.07	0.02		0.04	0.04	0.02	0.02	0.06	0.02	0.01
320-338	Mind	DVVAGPMLAHKAEDGEIIC	16	1.56 ± -0.04 ± 0.05	± -0.02 ± 0.10	± 0.02 ± 0.02	± 0.00 ± -0.01	± 0.01 ± -0.06	±					
				0.07	0.10	0.09	0.07	0.17	0.11	0.09	0.03	0.11	0.14	0.14
339-351	Kivéve E340K	VEGMAGGAVHIDY	11	5.38 ± 0.01 ± -0.01	± 0.05 ±	0.11 ± -0.02	± -0.02 ± 0.07	± 0.01 ± 0.02	±					
	E340K	VKGMAGGAVHIDY	11	0.00	0.02	0.05	0.01		0.13	0.06	0.04	0.03	0.04	0.04
								0.32 ±						
								0.04						

352-374	Kivéve I358T	NCVPSVIYTHPEVAWVGKSEEQL	19	1.47 ± 0.00 ± 0.03 ± 0.05 ± 0.02 ±	0.20 ± -0.02 ± 0.06 ± 0.08 ± -0.05 ±
	I358T	NCVPSVTYTHPEVAWVGKSEEQL	19	0.01 0.01 0.02 0.02 0.02	0.05 0.04 0.01 0.02 0.03
352-380	Kivéve I358T	NCVPSVIYTHPEVAWVGKSEEQLKEEGIE	25	3.21 ± 0.01 ± 0.10 ± 0.06 ± 0.06 ±	0.12 ± -0.07 ± 0.02 ± 0.07 ± 0.02 ±
				0.05 0.09 0.16 0.06 0.12	0.18 0.09 0.09 0.10 0.05
381-402	Mind	YKVGKFPFAANSRAKTNADTDG	19	5.08 ± 0.19 ± 0.18 ± 0.15 ± -0.10 ± -0.04 ± 0.09 ± 0.08 ± 0.09 ± -0.09 ± 0.17 ±	0.11 0.13 0.10 0.16 0.06 0.52 0.16 0.12 0.20 0.20 0.24
403-418	Mind	MVKILGQKSTDRVLGA	14	1.45 ± -0.01 ± 0.01 ± 0.08 ± -0.02 ± 0.23 ± 0.11 ± -0.16 ± 0.04 ± -0.02 ± 0.01 ±	0.07 0.11 0.10 0.07 0.04 0.32 0.06 0.09 0.15 0.28 0.23
403-427	Mind	MVKILGQKSTDRVLGAHILGPGAGE	22	1.66 ± -0.18 ± 0.06 ± -0.13 ± -0.01 ± 0.10 ± 0.14 ± -0.03 ± -0.03 ± 0.01 ± -0.02 ±	0.10 0.13 0.14 0.18 0.07 0.28 0.12 0.16 0.21 0.23 0.24
419-428	Mind	HILGPGAGEM	7	0.52 ± -0.02 ± 0.01 ± -0.01 ± 0.00 ± 0.27 ± 0.07 ± 0.11 ± 0.12 ± -0.10 ± 0.06 ±	0.01 0.01 0.03 0.02 0.05 0.10 0.06 0.08 0.06 0.07 0.06
434-441	Mind	LALEYGAS	6	0.04 ± -0.01 ± 0.01 ± -0.03 ± 0.02 ± 0.13 ± 1.07 ± 0.08 ± 0.09 ± 0.07 ± 0.16 ±	0.03 0.03 0.03 0.03 0.04 0.08 0.03 0.04 0.04 0.09 0.12
445-458	Kivéve I445M, P453L, R447G	IARVCHAHPTLSEA	11	0.54 ± 0.02 ± -0.02 ± 0.03 ± -0.09 ± 0.08 ± -0.10 ±	0.16 ± 0.07
	I445M	MARVCHAHPTLSEA	11		0.06 ± 0.06
	R447G	IAGVCHAHPTLSEA	11		
	P453L	IARVCHAHPTLSEA	12		
446-458	I445M	ARVCHAHPTLSEA	10		
459-464	Kivéve R460G	FREANL	4	-0.02 -0.01 ± 0.01 ± 0.00 ± 0.00 ± 0.26 ± -0.07 ± -0.02 ± 0.04 ± 0.00 ±	± 0.02 0.02 0.02 0.02 0.01 0.14 0.02 0.04 0.03 0.02
	R460G	FGEANL	4		-0.03 ± 0.03
465-474	Mind	AASFGKSINF	8	2.44 ± 0.08 ± 0.04 ± 0.25 ± 1.85 ± 0.17 ± 0.22 ± 0.67 ± 0.52 ± 0.67 ± -0.24 ±	0.05 0.05 0.05 0.07 0.01 0.10 0.02 0.08 0.05 0.08 0.09
469-474	Mind	GKSINF	4	1.49 ± 0.02 ± 0.04 ± 0.19 ± 0.81 ± -0.02 ± 0.23 ± 0.45 ± 0.34 ± 0.27 ± 0.03 ±	0.08 0.08 0.12 0.11 0.03 0.06 0.08 0.12 0.28 0.30 0.05

## Mutációk hatása a hE3 HDX mintázatára

A 17. ábra mutatja, hogy a patogén hE3 variánsok hidrogén-deutérium csere képessége mennyiben tér el a vad típusétól. Az egyes peptid szakaszokra vonatkozó részletes adatokat a 6. táblázatban gyűjtöttük össze. A HDX módszerrel tíz patogén hE3 variánst vizsgáltunk, a G101del, I12T, M326V, G426E mutánsokat nem sikerült megfelelő mennyiségben, reprodukálhatóan előállítani ezekhez a kísérletekhez.



**17. ábra** A vizsgált patogén hE3 variánsok deutériumfelvételének eltérése a vad típusú fehérjétől. A vízszintes tengely a pepszines emésztés során keletkezett peptid szakaszok aminosav számozását, illetve az azoknak megfelelő doméneket ábrázolja: FAD kötés (FAD), NAD<sup>+</sup> / NADH kötés (NAD), központi (KP) és dimerizációs (DIM) domén. A  $\Delta\Delta D$ -t a Módszerekben ismertetettek szerint számítottuk, a hibahatár a három-három párhuzamos mérés szórását mutatja. Üres karikával azokat a szekvenciákat jelöltük, melyeket nem tudtunk azonosítani az adott variánsban.

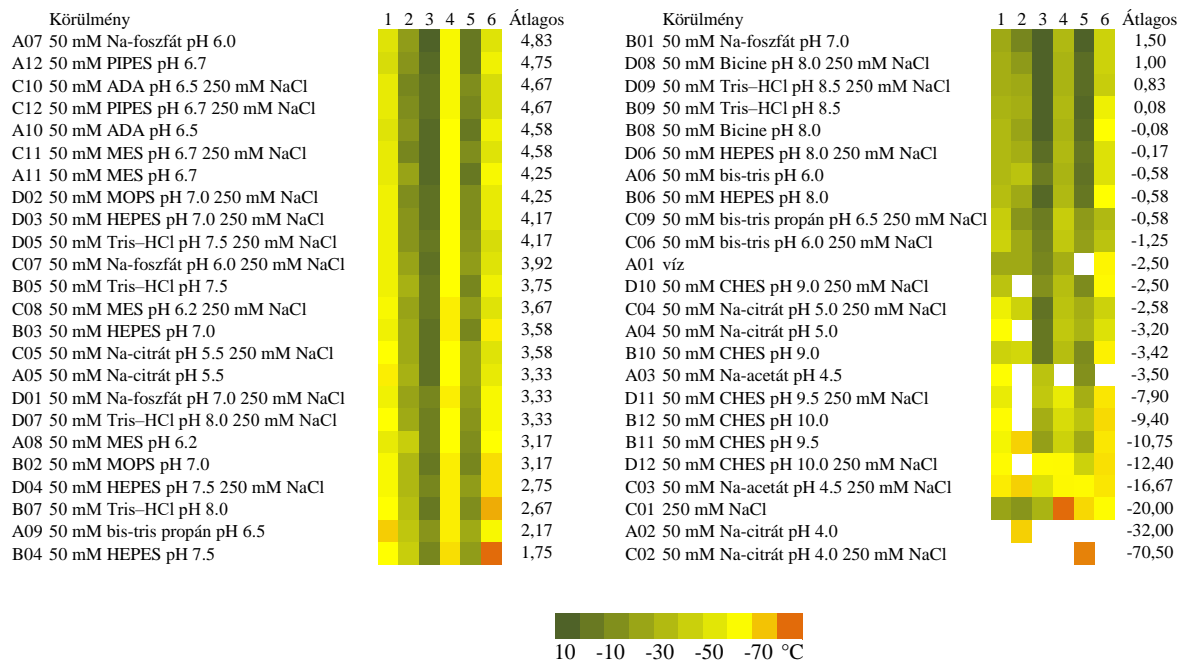
A hE3 variánsok egyedi deutériumcsere mintázatot mutattak, melyeket tulajdonságaik alapján négy csoportba osztottunk. A G194C mutáció hatása a legkiemelkedőbb, ez a NAD<sup>+</sup> / NADH kötő felületet érinti. A K37E és R460G variánsokra csökkent deutérium felvétel jellemző a FAD kötő régióban. Négy variáns (E340K-, I445M-, R447G- és P453L-hE3) esetén azt figyelhetjük meg, hogy a C-terminális régió (peptid 465-474, 469-474) deutérium felvétele jelentősen megnövekszik a mutáció következtében. Az I318T, I358T és D444V hE3 mutánsok esetén kis mértékű, elsősorban a dimerizációs doménre kiterjedő változások voltak megfigyelhetőek. Az a naiv várakozás, hogy a mutáció helyét magában foglaló peptidszakasz mutat jelenős változásokat a deutérium felvételben csak a G194C és a D444V variánsok esetén valósult meg. A variánsok deutériumcsere mintázata minden esetben megegyezett a vad típusú hE3-mével központi domén területén.

#### A patogén hE3 variánsok kristályosítási próbái

##### Kristályosítást előkészítő tesztek

Előzetes kristályosítási teszteknek a vad típusú fehérjét és annak 12 betegséget okozó variánsát vettem alá. Az előzetes kristályosítási tesztek célja az volt, hogy kis mintamennyiséget és gyors szűrővizsgálatokat felhasználva felmérjem, hogy az egyes kristályosodást befolyásoló tényezők mely tartományai lesznek optimálisak a diffrakcióra alkalmas kristályok képződése szempontjából. Meghatároztam a fehérjék szerkezeti stabilitását, a minta homogenitását, az optimális fehérjekoncentráció tartományt, a kristályosítás kivitelezésének módját és az affinitás tag eltávolításának hatását.

**7. táblázat** A hE3 variánsok olvadási hőmérsékletének eltérése a fehérje tároló pufferben mért értékhez képest (1: vad típus, 87,5 °C; 2: P453L, 64,5 °C; 3: D444V, 75,0 °C; 4: K37E, 88,5 °C; 5: E340K, 77,0 °C; 6: R460G, 74,5 °C). Az utolsó oszlop a 6 variáns átlagos eltérését mutatja °C-ban kifejezve. A hőértékeknek megfelelő skálát az alsó sor tartalmazza, az anomális viselkedésű vagy nem mérhető értékek fehérrel vannak jelölve.



A kristályosodást befolyásoló egyik kiemelten fontos tényező a fehérjék szerkezeti stabilitása, a szerkezeti stabilitás hőmérséklet, kémhatás és ionerősség függése, melyet azok olvadási hőmérsékletének ( $T_m$ ) változásán keresztül követtem a termofluor módszer segítségével. Hat hE3 variáns  $T_m$  értékét határoztam meg a fehérje tároló pufferben, melyek a következők voltak: vad típus: 87,5 °C; P453L: 64,5 °C; D444V: 75,0 °C; K37E: 88,5 °C; E340K: 77,0 °C; R460G: 74,5 °C. A 7. táblázat mutatja be  $T_m$  érték pH- és ionerősségfüggését. A hat fehérje  $T_m$  értéke hasonló függést mutatott az oldószerkörülmények változtatásától, ami összhangban állt azzal, hogy a variánsok csak egy-egy aminosavban térnek el a vad típustól. Az utolsó oszlopban bemutatott átlagos  $T_m$

változások mértékét vettük alapul a kristályosítási tesztek megtervezésénél. A körülmények változtatása hatására csak kis mértékű olvadási hőmérséklet emelkedést tudtunk elérni, néhány esetben jelentős csökkenést tapasztaltunk, míg egyes körülmények közvetlenül denaturálták a fehérjéket és nem volt az olvadási hőmérséklet meghatározható. A pH 8,00-as kémhatású tároló pufferhez képest legnagyobb pozitív eltérést azok a körülmények mutatták, melyeknek pH-ja 6,00 és 7,00 között volt. A pH 9,50 felett és a pH 5,00 alatti kémhatású körülmények között jelentősen csökkent az olvadási hőmérséklet, avagy teljesen mérhetetlenné vált. A NaCl koncentráció nem látszott befolyásolni az olvadási hőmérsékleteket vizsgált 0 – 250 mM tartományban.

**8. táblázat** A kristályosítási próbákhoz megfelelő fehérjekoncentráció tartomány meghatározása a hE3 példáján.

koncentráció mg/mL	PCT A1/B1	PCT A2/B2	Következtetés
5	tiszta	tiszta	híg
10	tiszta	tiszta	híg
20	tiszta	finomszemcsés kicsapódás	optimális
40	tiszta	finomszemcsés kicsapódás	optimális
60	amorf, nagy mennyiségű kicsapódás	amorf, nagy mennyiségű kicsapódás	koncentrált

A kristályosítás megkezdése előtt meggyőződtem a minták szerkezeti stabilitásáról és homogenitásáról. A fehérje minták összetételét redukáló SDS-PAGE segítségével igazoltuk. A 18/A ábra reprezentálja az átlagos mintatisztaságot felhasználás előtt a D444V-hE3 variánsának példáján keresztül. A hE3 monomernek megfelelő molekulatömeg (53 kDa) kétszeresénél megjelenő sáv a hE3 homodimernek tudható be, ami eltűnik, ha mintaelőkészítés során a magas hőmérsékletű (70°C) denaturációs lépést a protokoll szerinti



2 percről 10 percre növeltük. Az oldatokban esetlegesen előforduló aggregátumoktól szűrővel, majd felhasználás előtt ultracentrifugálással szabadultunk meg.

A kristályosítás szempontjából optimális fehérjekoncentráció-tartományt a hE3 fehérje esetén határoztuk meg a PTC (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) teszt segítségével. A gyártó által javasolt 5-20 mg/mL koncentrációtartományt kibővítettük 40 mg/mL-ig, ettől eltekintve mindenben a gyártó javaslatai szerint jártunk el. A 8. táblázat mutatja be a megfigyeléseinket, amelyek alapján a 20-40 mg/mL koncentrációtartományt ítéltük optimálisnak.

A kristályosítási módszer megválasztása kritikus a kristálynövekedés, annak mikroszkóp alatti követhetősége, a kristályosítóoldat tárolása és a kristályok kinyerése szempontjából. A hE3 és D444V variánsa esetén az ülőcsepp, a függőcsepp, a kapilláris és az olajfilmmel elválasztott kristályosítási módszereket próbáltam ki a PEG I és PEG II (Qiagen, Venlo, Hollandia) kristályosító tesztoldat 96-96 különböző körülményét felhasználva. Az olajfilmmel elválasztott kristályosítási módszert azért próbáltuk ki, mert várhatóan rendezettebb kristálpakolást eredményez, mint a hagyományos gőzdiffúziós módszerek. A rendezettebb kristályszerkezet azért valószínűsítettük, mert ez a kísérleti elrendezés lassabb kristálynövekedést biztosít, hiszen a fehérjeoldatot és a kristályosító oldatot, nemcsak a légtér, hanem a kristályosító oldatot fedő olajréteg is elválasztja egymástól, így az oldatot közötti diffúzió lassabb. Várakozásaink ellenére ezt a technikát hamar elvetettük, mert összeállításuk, kezelésük és mozgatásuk komoly körültekintést igényelt, továbbá nem is sikerült kristályokat megfigyelnünk ezzel a technikával.

A kapilláris módszerrel azonban sikeresen állítottunk elő fehérjekristályokat. A gélbeszűrő kapilláriskristályosítás előnye, hogy a kapillárisba juttatott fehérjetároló puffer és a kristályosító puffer körülményei között fokozatos gradiens alakul ki a kapilláris hossza mentén, míg a két oldat közötti keveredési folyamatot agaróz gél lassítja le, amelybe a kapillárisokat beszűrjük, majd fölé a kristályosító oldatot rétegezzük. Hasznos kísérleti tapasztalat volt megfigyelni a kapilláris mentén sorban végig haladva, hogyan jelenik meg a kicsapódott fehérje, az apró kristályok, majd az egyre szabályosabb és nagyobb méretű

egy kristályok, ezt a pontot követően a kristályok szabályossága száma és mérete csökkent, majd eltűntek a kristálygócok. A technika jellegéből adódóan nagyobb fehérjemennyiséget igényel, az optimális kristályosítási körülmények meghatározása és a kísérlet reprodukálhatósága nehézkes, a kristályosítás és kristálynövekedés követése nem automatizálható. A kapillaris átmérője korlátot szab a kristály méretének, melynek növelése tovább fokozza az eredetileg is nagy mintaigényt. A kapillarisok, melyeket mi használtunk 0,5 és 1 mm közötti átmérőjűek voltak, mely 15 -50  $\mu\text{L}$  fehérjeoldat felhasználását tette szükségessé, ami lényeges hátrány a 0,1-0,2  $\mu\text{L}$ -t használó ülőcsepp módszerhez képest. A kristályok kinyerése a kapillarisokból a diffrakciós mérésekhez ügyességet igényel, amivel én nem jártam sikerrel.

Az ülő- és függőcsepp módszereket használtam rutinszerűen a későbbiekben. Az ülőcsepp módszer automatizálhatósága és kis mintaigénye miatt bevett eszközöm volt a szélesebb körű kristályosítási próbák kivitelezéséhez, míg az ülőcsepp módszert az előzetes próbák során ígéretesnek kiválasztott körülmények körüljárására használtam. A körülmények finomítása során a pH, az ionerősség és a kicsapószer mennyiségében tettem csekély mértékű, fokozatos változtatásokat, továbbá kristálybeoltással is próbálkoztam.

Számítógépes előrejelzéssel és a D444V variáns on elvégzett kis számú teszttel megvizsgáltuk, hogy az affinitás tag eltávolítása megnövelné-e a kristályosítási tesztek hatékonyságát. Az XtalPred webszerver(218) az aminosav szekvenciát alapul véve tesz becslést a kristályosíthatóság mértékére; előrejelzése szerint az affinitás tag nem okoz lényeges eltérést a hE3 és a D444V-hE3 kristályosodási valószínűségében, a tag-et tartalmazó (1-es, illetve 4-es kristályosítási osztály) és nem tartalmazó variánst (1-es, illetve 1-es kristályosítási osztály) is az jól kristályosodó kategóriába sorolja. A gyakorlati kísérletekben sem tapasztaltunk minőségi javulást a tag eltávolítása után a D444V-hE3 variáns esetén.

## A D444V-hE3 variáns kristályosításának kidolgozása

A D444V-hE3 variáns tisztaságát SDS-PAGE-gyel ellenőriztük (18/A ábra), míg a mutáció jelenlétét az aminosav szekvenciában tömegspektrometriával igazoltuk (18/B ábra). A D→V mutációt hordozó VLGAHILGPGAGEMVNEAALALEYGASCEVIAR peptidrészt jelenlétét négy párhuzamos kísérlet is 100%-ban igazolta, míg a VLGAHILGPGAGEMVNEAALALEYGASCEVIAR peptidszekvencia jelenlétét csak a hE3-at tartalmazó referencia esetén sikerült kimutatni. A mutációt nem hordozó fennmaradó 64 peptikus peptidrészt azonos tömegspektrometriás viselkedést mutatott a D444V-hE3 és a referencia hE3 esetén. A 18. ábra C-L részei szemléltetik a D444V-hE3 variáns az ülőcepp módszerrel végzett kristályosítási próbáinak néhány reprezentatív kísérletét. A 12 további hE3 variánshoz hasonlóan, az előzetes kristályosítási próbákat az alábbi egyenként 96 körülményt tartalmazó oldatkészlettel végeztük el: PEG I, PEG II, JCSG Core Suites, NeXtal, Index HT, PEGRx HT, Wizard Classic 1 és 2.

Mikrokristályok képződését tapasztaltuk az alábbi körülmények esetén:

1,5-1,9 M Na/K-foszfát; pH 7,00-8,10

0,1 M Na-acetát; 0,2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 M HEPES pH 7,50; 25 m/V% PEG4000

0,2 M NaSCN; 20 m/V% PEG3350

0,2 M KSCN; 20 m/V% PEG3350

Vékony; tűs kristályok jelentek meg az alábbi körülmények esetén:

0,2 M KCl; 20 m/V% PEG3350

0,2 M NaSCN; 20 m/V% PEG3350

0,2 M KSCN; 20 m/V% PEG3350

0,1 M Na-HEPES pH 7,50; 25 m/V% PEG1000

0,1 M TRIS-HCl pH 8,50; 25 m/V% PEG2000

0,1 M HEPES pH 7,50; 24 m/V% PEG1000

0,1 M Na-acetát; 0,1 M MES pH 6,50; 30 m/V% PEG2000

0,1 M HEPES pH 7,50; 20 m/V% PEG4000; 10 v/v% i-PrOH

Mikrokristályok jelentek meg az alábbi oldatokban beoltás után:

0,19 M Li-citrát; 20 m/V% PEG3350

0,19M Li-citrát; 20 m/V% PEG3350; 4 v/v% pentaeritritol-etoxilát

0,19 M  $[\text{NH}_4]_2/[\text{NH}_4]_3$ -citrát

0,2 M KCl; 20 m/V% PEG3350

0,1 M HEPES pH 7,50; 25 m/V% PEG1000

0,1 M Na-acetát; 0,1 M MES pH 6,50; 30 m/V% PEG2000

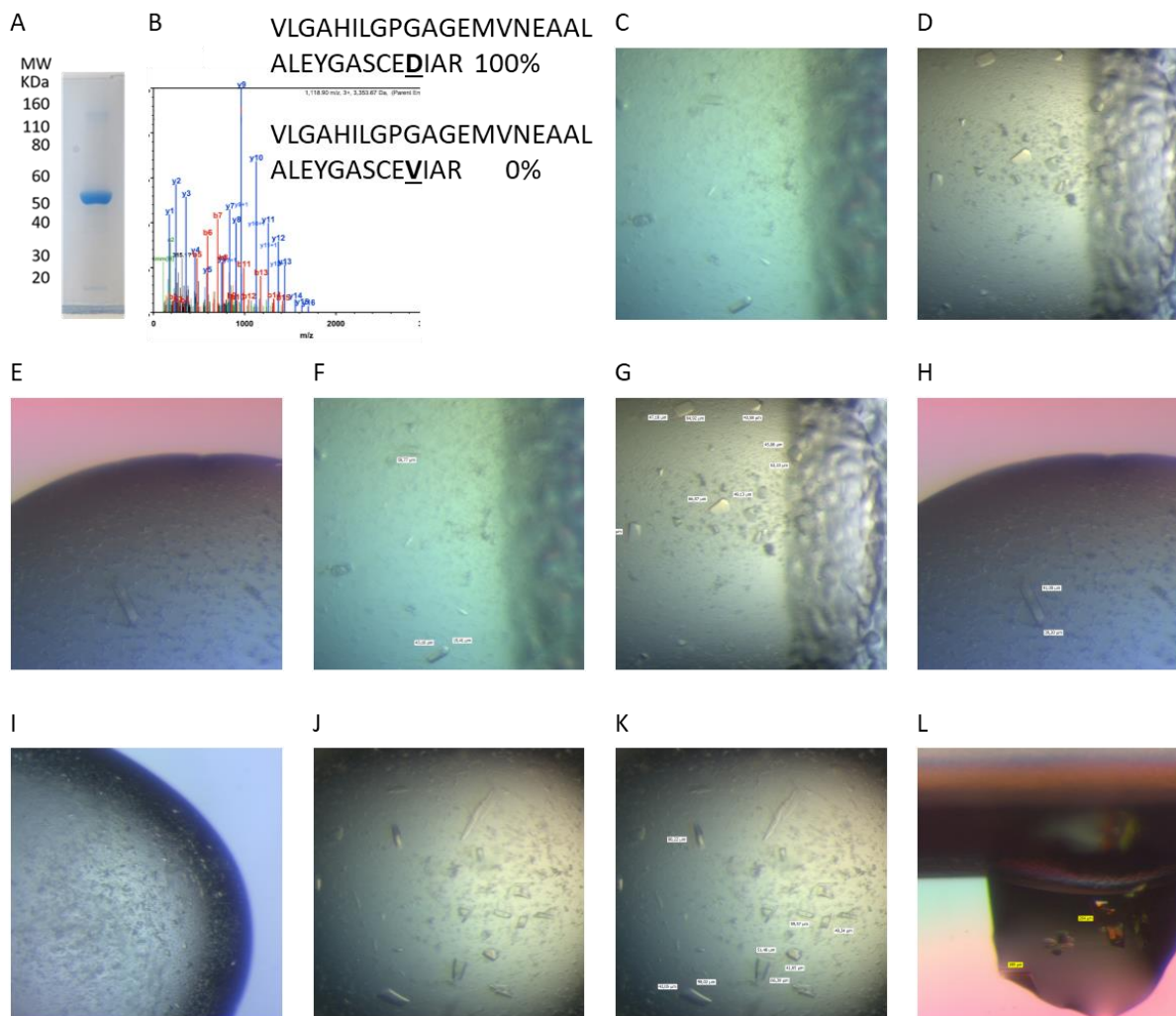
0,1 M HEPES pH 7,5; 20 m/V% PEG4000; 10 v/v% i-PrOH

Diffrakcióra alkalmas kristályokat függőcsepp módszerrel a Na/K-foszfát puffer kristályosító oldat körülményeinek finomításával nyertünk. Az optimális koncentráció tartomány 1,5-1,9 M között volt, míg az optimális kémhatás pH 6,99-8,10 között. A legjobb felbontású diffrakciós képet az 1,6 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 8,10 esetén nyertük. Ismételt kísérletekben a fehérjeoldatba a hE3 funkciója szempontjából fontos ligandumokat (lipoamid, liponsav, FAD,  $\text{NAD}^+$ , NADH) 200× ekvivalensű 10%-os DMSO oldatát adalékoltuk, de ez nem javította a kristályosodás mértékét.

A kristályokat krio-védőoldatba áztattuk azok fagyasztását megelőzően. Az etanol, Paratone-N és glicerin krio-védőoldatok hatékonyságát vizsgáltam meg, melyeket 10, 15, 20, 25 és 30 v/v%-os koncentrációban oldottunk az adott kristály kristályosító oldatában. Az etanol és Paratone-N esetén a kristályok nagy része eltört vagy oldódni kezdett az 5 perc alatt tartott áztatási idők során, a glicerin alkalmazása esetén viszont a kristályok megőrizték alakjukat. A legjobb felbontású diffrakciós képeket a 20 v/v% glicerin krio-oldatokkal nyertük.

Azonos körülmények közül gyűjtött D444V-hE3 kristályokat fagyasztás előtt fehérje funkciója szempontjából fontos ligandumok (lipoamid, liponsav,  $\text{NAD}^+$ , NADH; ×200 ekvivalens 10% DMSO-ban oldva) oldatába áztattuk. Ezzel a módszerrel kívántuk a kosubsztátok ( $\text{NAD}^+$ , NADH) és a model-szubsztátok (lipoamid, liponsav) kötődésének szerkezeti részleteit értelmezni, de egyik esetben sem tudtunk a kismolekuláknak

beazonosítható elektronsűrűséget megfigyelni. Az áztatási időt fokozatosan 10 percről 30 percre majd 2 órára növelve a kristályok diffrakciós képessége jelentősen csökken.



**18. ábra** A D444V-hE3 variáns karakterizálása és kristályosításának folyamata. (A) A kiindulási minta tisztaságát igazoló SDS-PAGE gékép; (B) a mutáció jelenlétét igazoló MS adatsor; (C-L) reprezentatív mikrokristályok a PEG I és PEG II kristályosítási próbák felhasználásával.

### A D444V-hE3 diffrakciós adatgyűjtése

A D444V-hE3 kristályok tesztelését és a diffrakciós adatgyűjtést a BL14.1 szinkrotron sugárforrással végeztük a Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) kutatóintézetben. Minden D444V-hE3 variáns kristály az ortorombos  $P2_12_12$  tércsoportban tartozott, a legjobb esetben 1,84 Å felbontást sikerült elérnünk. Az elemi cellában két monomer egység volt megtalálható, mérete a következőnek adódott:  $a = 118,04$ ,  $b = 168,94$ ,  $c = 61,28$  Å. Az aszimmetrikus egységben található két monomert A és B láncként jelöltünk. Az A és B láncok nemkrisztallográfiai kétfogású szimmetrával voltak jellemezhetőek, és az A-B egység megfelelt az oldatban feltételezett funkcionális homodimer szerkezetének. A korábban meghatározott hE3 szerkezeteknek megfelelő domének azonosíthatóak voltak a D444V-hE3 variánsban is. A FAD kötő (1-149) régió mindkét monomerben teljes betöltöttséggel tartalmazta a FAD molekulát. A NAD kötő régió (150-282) szerkezete hasonlóan adódott az irodalomban találhatóhoz, azonban a mi kristályszerkezetünk nem tartalmazta a FAD-nál gyengébben kötődő  $NAD^+/NADH$ -t. Ezeknek a kofaktoroknak a hiányától eltekintettünk, hiszen az irodalomban nem találtak lényegi eltérést a  $NAD^+$ -dal, illetve a  $NADH$ -val komplexált hE3 szerkezetek között, és a szerzőknek egyik kofaktor setén sem sikerült teljes betöltöttséget elérniük. A D444V-hE3 szerkezetét a 5J5Z kód alatt helyeztük el a PDB adatbázisban. A D444V mutáció szerkezeti hatásai dr. Szabó Eszter doktori munkájának tárgyát képezik.

## 6. Megbeszélés

A molekuláris kölcsönhatások szerkezeti finomhangolhatóságának jelentőségére láttunk példákat a dolgozatban. Mind a zárványkomplex képző szangvinarin és kukurbituril rendszer, mind a szervezetünkben multienzim komplexek részeként előforduló, homodimert alkotó hE3 viselkedését a molekuláris kölcsönhatások határozzák meg.

### A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexei

A SA és CB7 kölcsönhatásait vizsgálva egy sokoldalú rendszert ismerhettünk meg, aminek vizsgálatában a változatos technikák jól kiegészítették egymást. Ebben a fejezetben bemutatom az NMR spektroszkópiás méréseimből levont szerkezeti és termodinamikai következtetéseimet, ezeket összevetem az együttműködőink – dr. Biczók László, dr. Miskolczy Zsombor és dr. Medgyesi Mónika – által rögzített abszorpciós és fluoreszcencia mérések eredményeivel, illetve az irodalomban található további megfigyelésekkel. Az együttműködésünk során meghatározott fizikaikémiai paramétereket a 9. táblázatban foglaljuk össze.

Munkánk korai fázisában dr. Biczók László kutatócsoportja fotokémiai módszerekkel vizsgálta a kukurbit[7]uril (CB7) hatását a  $SA^+/SAOH$  egyensúlyra (1. ábra). Feltárták, hogy az egyensúlyi állandó több, mint 3 nagyságrenddel változott meg hatszoros mennyiségű CB7 jelenlétében, a  $SA^+$  forma keletkezését elősegítve. Ez a jelentős változás feltehetően az ionos és apoláris kölcsönhatás együttes jelenlétével magyarázható a pozitívan töltött  $SA^+$  és a CB7 között, mely erősebb affinitáshoz vezet és ezáltal eltolja a  $SA^+/SAOH$  egyensúlyt a  $SA^+$  képződésének irányába. Kimutatták továbbá, hogy az SA oldatában, erősen lúgos

körülmények között (pH 12,8) domináns alkanolamin (SAOH) forma fotooxidációjának mértékét a CB7 felére csökkenti. Az SAOH speciesz jelenlétével nem kellett számolnunk az NMR mérések körülményei közt (pH  $\approx$  6), amit az is igazol, hogy a H-6 protonrezonancia könnyen azonosítható volt minden spektrumban.

### 9. táblázat A SA és CB7 elegyben feltárt fizikaikémiai paraméterek

	SA	1:1	1:2
molekularészlet mágneses árnyékolása		I. vég árnyékolása csökken	I. és II. végek árnyékolása csökken
$D$ , öndiffúziós együttható ( $^1\text{H}$ DOSY NMR)		$(0,96 \pm 0,09)10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	$(1,1 \pm 0,1)10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$
$R_g$ , girációs sugár (modell)	4.1187 Å	5.3313 Å	7.2833 Å
$R_h$ , hidrodinamikai sugár (modell / $^1\text{H}$ DOSY NMR)	5,3145 / - Å	6,8791 / 7,5 Å	9,3978 / 8,6 Å
$\epsilon$ , moláris abszorpciós együttható (490 nm)		3400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	5000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
fluoreszcencia spektrum maximuma	604 nm	556 nm	556 nm
$I_F/I_F(\text{SA})$ , SA-ra vonatkoztatott fluoreszcenciaintenzitás arány (558 nm)	1	17,7	16,0
$\tau$ , fluoreszcencia élettartam	2,3 ns	17,5 ns	17,5 ns
$\text{p}K_{\text{SAOH}}$	$7,14 \pm 0,04$	10,83	
fotooxidáció		csökkent	



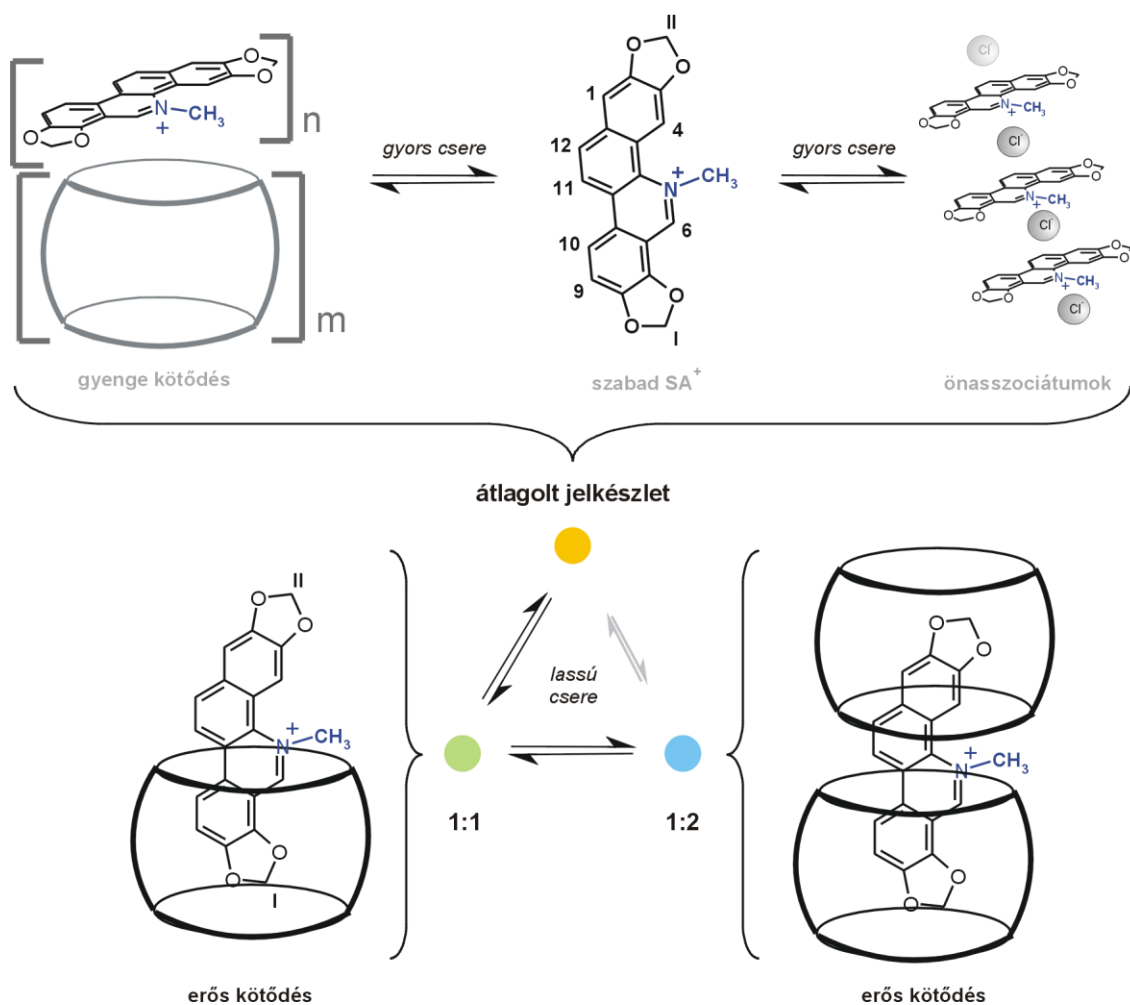
## Specieszek azonosítása

A SA és CB7 kölcsönhatását vizsgálva, kísérleti tapasztalataink alapján a 19. ábrán látható modellt állítottuk fel. Vizsgálati körülményeink közt oldatban két domináns, nagy stabilitási állandóval jellemezhető zárványkomplex volt megfigyelhető. Az 1:1 sztöchiometriájú komplex keletkezését az irodalmi előzmények alapján is vártuk,(219) itt az elsődleges kérdésünk az volt, hogy a szangvinarin ( $SA^+$ ) molekula melyik részletének a bekötődése kedvezményezett. Újdonságot az jelentett, hogy egy másik speciesz - az 1:2 vendég:gazda összetételű asszociátum - is keletkezhet. A szabad SA formához képes 1:1 komplex képződése jelentős változásokkal jár az abszorpciós és fluoreszcencia spektrumban; azonban az 1:1 és 1:2 komplex spektruma nem megkülönböztethető ezekkel a módszerekkel.(219,220) A  $^1H$  NMR spektroszkópia fontos eszköz volt az 1:2 komplex kimutatásában és szerkezetének vizsgálatában. A két stabil zárványkomplex mellett egy harmadik, jelkésztet is megfigyeltünk az  $^1H$  NMR spektrumokban, ezek a rezonanciák a mérési körülményeink közt a gyors csere állapotában lévő specieszekhez tartoztak, amely részben a szabad – csak az oldószerrel kölcsönható –  $SA^+$  molekulának tulajdonítható, de az elszélesedő, és hőmérsékletváltozásra érzékeny jelkésztet arra utalt, hogy a szabad SA állapot további, változatos nonspecifikus kölcsönhatásokban vehet részt CB7-ral. Ebben a jelkésztetben jelenhet meg a kevésbé kedvezményezett II végével zárványkomplexet képező SA, illetve egyéb nem-zárvány típusú komplexek a SA és a CB7 között.

## A zárványkomplekképződést elősegítő kölcsönhatások

A vizsgált komplexek szerkezetének értelmezése során figyelembe kellett vennünk a zárványkomplekképződést kiváltó kölcsönhatások szerepét. A két fontos tényező, ami hatással van a zárványkomplekképződés gyakorlati jelentőségére: a komplex affinitása és a

szelektivitása.(221,222) A szelektivitást a kötőhelyek összetettsége és hozzáférhetősége befolyásolja. A szelektivitás jelentősen növekedik, ha a vendégmolekula több független kötőhellyel is kapcsolatba tud lépni, amit a CB7 esetén a hidrofób üreg és a negatívan polározott perem képvisel. A három fő folyamat, amelyek befolyásolják a gazda és vendégmolekula affinitását, azaz a zárványkomplexbépződés energetikáját: a gazda és vendégmolekula közötti közvetlen kölcsönhatások, a vendégmolekula deszolvatációja és a CBn üregének vízvesztése, valamint a CB7-hez koordinálódott kationok elvesztése.(223–227) A CBn apoláris üregét kitöltő vízmolekulák magas energiájú állapotban vannak, jelentős entalpia felszabadulással jár, amikor a vendégmolekula bekötődése kihajtja őket az üregből és a többi vízmolekulával lépnek kölcsönhatásba.(223,224) A CB7-SA kölcsönhatás elemzése során figyelembe kell vennünk, hogy a CB7 ürege egy sajátos környezetet jelent a vendégmolekuláknak. Az üreg alacsony polaritása az *n*-oktanol oldószerrel összemérhető; polarizálhatósága 0,12, míg látszólagos törésmutatója  $1,10 \pm 0,12$ , ami közel áll a gáz fázishoz.(228) Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően a vendégmolekulák beágyazódása hatására megnövekedett fluoreszcencia élettartam és az abszorpciós spektrumban hipszokróm eltolódás várható. A CB7 ürege a mágneses árnyékolás csökkenését okozza, ami a kémiai eltolódás csökkenésével jár az NMR spektrumban; azonban a CB7 pereme közelében a karbonil-csoportok árnyékoló hatása válik dominánssá. A karbonil-csoportok negatív polarizációjának köszönhetően a CB7 kationok megkötésére alkalmas, emellett a SA:CB7 1:2 komplex képződése során le kell győzni a két CB7 molekula pereme közötti taszítást. Mind a kísérleti, mind az elméleti vizsgálatok során körültekintést igényel a zárványkomplexek megkülönböztetése a nem zárvány típusú koordinációtól, valamint a kedvezményezett zárványkomplex sztöchiometriájának értelmezése.(222)



**19. ábra** A SA és CB7 elegyben <sup>1</sup>H NMR spektroszkópiával megfigyelt specieszek. A zöld jelkészlet ahhoz az 1:1 komplexhez tartozik, amelyben a SA I vége helyezkedik el a CB7 üregében. A kék jelkészlet az 1:2 SA:CB7 komplexhez tartozik, melyben a SA mindkét vége zárványkomplexet képez. A harmadik, sárga jelkészlet a szabad SA-hoz és az azzal gyors cserében lévő egyéb SA:CB7 asszociátumokhoz tartozik, melyeknek a szerkezetét nem tudtuk felbontani ennek a vizsgálatnak a során.

## Szerkezetigazolás

Az 1:1-es speciesz esetén a zárványkomplex-képződés csak részleges, mivel a CB7 makrociklus magassága mindössze 0,91 nm.(37,229) A SA<sup>+</sup> I benzodioxol része ágyazódik be a gazdamolekula apoláris üregébe, valamint egy erős vonzó kölcsönhatás lép fel a pozitív töltésű nitrogéntartalmú heterociklusos molekularészletet és a CB7 negatívan polározott karbonil oxigénjei között. A SA<sup>+</sup> II régiójának komplexálódása kedvezőtlenebb, mivel az N-metil-csoport térkitöltése miatt távol tartja a vendégmolekula pozitív töltésű részletét a makrociklus karbonil-csoportokkal övezett peremétől, így az elektrosztatikus kölcsönhatás nem tudja megfelelőképpen stabilizálni a komplexet. A felrajzolt 1:1-es összetételű zárványkomplex modellt a kémiai eltolódások elemzése is alátámasztja. A I metilén rezonanciája az alacsonyabb kémiai eltolódás értékek felé tolódik el, ahol átfed az oldószer és a CB7 intenzív jeleivel. Továbbá a modell szerint az üregben elhelyezkedő 9 és 10 protonok árnyékolása is csökken. A II metilén-csoport geminális protonjai a komplexképződés hatására diasztereotóp környezetbe kerülnek és kémiaailag inekvivalenssé válnak,(212) azonban a kémiai eltolódásuk nem tér el lényegesen a szabad SA formáétól.

A SA:CB7 1:2 komplexben a nitrogéntartalmú heterociklus pozitív töltése kölcsönhat mindkét gazdamolekula negatívan polározott karbonil-csoportokból álló peremével. A két CB7 perem között azonban taszítás lép fel, valamint a pozitív töltésért való versengést sztérikus tényezők is befolyásolják, így az 1:2-es komplexben az SA<sup>+</sup> I-gyel jelölt vége nincs olyan mélyen beágyazva, mint az 1:1-es komplexben. Az NMR mérések is alátámasztják, hogy az 1:2 komplexben a 9 és 10 protonokon kisebb a kémiai árnyékolás csökkenés figyelhető meg, valamint a molekula modellekben is megfigyelhető a fenti különbség az 1:1 és 1:2-es komplexek között. Az 1:2 komplex sztöchiometriáját a koncentráció függő mérések sugalmazták, amit a SA mindkét végén megfigyelt kémiai árnyékolás csökkenés is megerősített. Az <sup>1</sup>H DOSY mérések alátámasztották, hogy 1:2 komplexként azonosított két jelkészlet nagyobb méretű, mint az 1:1 komplex. A kiértékelés során a merev gömb modellt alkalmaztuk, ami a méretet egy látszólagos hidrodinamikai sugárral írja le. Az 1:2 és az 1:1

komplexek látszólagos hidrodinamikai sugara szignifikánsan különbözik, azonban a n csak 15% növekedést mutatkozott az 1:2 komplex javára, ami összhangban áll az 1:2 komplex molekulamodellekben látott kompakt szerkezetével.

Az  $^1\text{H}$  NMR-ben megfigyelt jelkészletek közötti kémiai cserefolyamatok alátámasztása elengedhetetlen volt a szerkezetigazolás szempontjából és előkészítette a rendszer kinetikai elemzését. A hőmérsékletfüggő  $^1\text{H}$  NMR vizsgálatok igazolták, hogy a három jelkészlethez tartalmazó specieszek reverzibilisen egymásba alakíthatóak, nem kémiai reakciónak köszönhető a kémiai eltolódás különbség. Az ismételt melegítési és hűtési ciklusok nem okoztak megfigyelhető változást az oldatban. Ez a kísérlet azt is bizonyította, hogy melegítéssel nem csupán kiűzzük a vendégmolekulát az üregből, hanem a kémiai eltolódás időskálához képest gyors csere állapotába kerül a rendszer a legmagasabb hőmérsékleten is. A legmagasabb hőmérsékleten, 353 K-en, ugyan egy éles jelkészlet volt megfigyelhető, de a kémiai eltolódások lényegesen eltértek a szabad  $\text{SA}^+$  oldatában azonos hőmérsékleten mérttől (az adatot nem mutatjuk). A  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY mérések a cserefolyamatok egyes lépéseinek igazolását teszik lehetővé. A kémiai csere következtében kifejlődő keresztcsúcsok mutatták, hogy az 1:2 komplex első lépésben egy CB7 leadásával 1:1 komplexszé alakul, majd az 1:1 komplex egy CB7 leadására vagy felvételére is képes; az 1:2 komplex esetén a két CB7 közel egyidejű leadása nem jellemző, a csere mértékét szemlélteti a 19. ábrán a nyilak mérete.

## Kihívások

Az NMR mérésekben szokatlanul alacsony koncentrációt nemcsak a  $\text{SA}^+$  gyenge oldhatósága indokolta, hanem törekedtünk arra is, hogy a körülményeket a spektrofluorometriás és abszorpciós mérésekkel összevethető módon válasszuk meg. A híg oldatok alkalmazása jelentős érzékenységsökkenést okozott, ami hosszú mérésidőt

eredményezett, ezért különösen ügyelnünk kellett a műszer- és oldatstabilitásra, valamint nehézkessé vált a többdimenziós mérések kivitelezése. A gazda—vendég kapcsolatok atomi szintű feltárását a kukurbiturilok azon szerkezeti sajátossága is nehezítette, hogy a CB7 CH és CH<sub>2</sub> hidrogénjei mind a molekula külső felületén helyezkednek el, így az üregben kötött vendégmolekulával <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NMR korrelációkat nem mutatnak.

### A hE3 variánsok előállítása

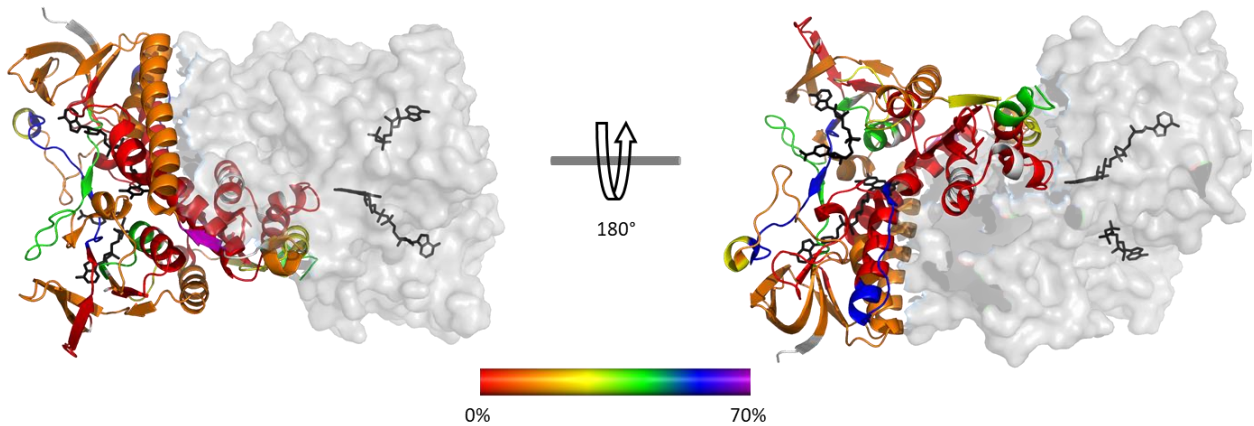
Továbbfejlesztettem a hE3-ra kidolgozott előállítási eljárást a hE3 variánsokon végzett szerkezeti kutatásaink előkészítéseként. Áttérve a citoszolikus alapú expresszióra, 10 mutáns és a vad típus kitermelésében a korábban használt periplazmatikus expresszióhoz képest legalább 20-szoros kitermelés növekedést értünk el, miközben finoman beállított affinitás kromatográfiás eljárással fenntartottuk a minták nagyfokú tisztaságát. Az optimalizált eljárás 2 munkanapot vesz igénybe és reprodukálható minőségű fehérjét szolgáltat.

Feltételezzük, hogy a G101del-, I12T-, M326V- és G426E-hE3 variánsok alacsony kitermelése mögött fehérjeszerkezeti sajátosságok rejlenek meg, hiszen ezek a variánsok is csak egy-egy aminosavban térnek el a vad típusú szerkezettől, és a problémás mutációkat hordozó kodonoknak összes lehetséges szinonimáját is teszteltük. A fenti mutációk valószínűleg nehezítik a variánsok megfelelő feltekeredését, vagy szerkezeti instabilitáshoz, végső soron azok kicsapódásához vezetnek. Mindezek a tapasztalatok hozzájárulhatnak az érintett mutációk által okozott hE3 rendellenességek értelmezéséhez.

### A hE3 HDX mintázatának szerkezeti meggondolásai

A hidrogén-deutérium csere (HDX) mérések értelmezése körültekintést igénylő feladat. Az amid protonok HDX sebességének vizsgálata elterjedt módszer a fehérjék szerkezeti változásainak feltárásában, ennek ellenére nem létezik egységesen elfogadott algoritmus, amely kapcsolatot teremt HDX mintázat, valamint az oldatbéli szerkezet és dinamika között. (165,230–232) Abban egyetértés van a területen, hogy a HDX mértékét két tényező befolyásolja elsősorban: az amid protonok vízhozzáférhetősége; valamint az amid proton hidrogén kötésének felszakításához szükséges energia. A jelenős vízhozzáférhetőség nemcsak a molekula felületén elhelyezkedő aminosavakra jellemző, hanem gyors csere jellemezheti a gyakori konformációs változásoknak kitett, valamint az oldószer csatornák közelében elhelyezkedő protonokat is. Az amid protonok erős hidrogénkötés donorok, ezeket a kötések a környező aminosavakkal, a megkötött kismolekulákkal, valamint a szerkezetiileg kötött vízmolekulákkal alakítják ki. A HDX létrejöttéhez a hidrogén kötés felszakadása szükséges.

A hE3 HDX mintázatát a kristályszerkezetre vetítve a 20. ábra szemlélteti. Megfigyeltük, hogy a dimer oldószer által könnyen hozzáférhető régióiban is találhatóak cserétől védett peptid szakaszok, és összességében is igaz, hogy a kristályszerkezet egyszerű szemrevételezésével a mérési adatok nehezen magyarázhatóak. Nem volt okunk azt feltételezni, hogy jelentős szerkezeti eltérés lenne a fehérje oldat- és kristályszerkezete között, ezért az aminosav szekvenciát és a kristályszerkezetet felhasználva az irodalomban megemlített szerkezeti jellemzők alapján becsültük a hE3 peptid szakaszainak HDX hajlamát. A mért HDX értékekkel a legerősebb antikorrrelációt az amid proton közelében lévő hidrogén kötés akceptorok száma, az adott peptidszakasz erősen rendezett szerkezeti elemekben (alfa-hélix, béta-redő) való részvétele, valamint a dimer oldószer által hozzáférhető felületétől távol elhelyezkedő amid hidrogének aránya mutatta. Arra következtettünk, hogy ezeknek a tényezőknek az együttes hatása indokolta a kiemelkedően magas vagy alacsony deutérium beépülési százalékot.

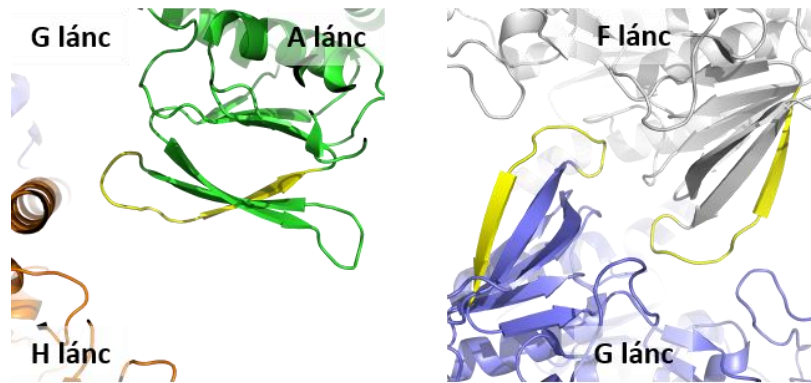


**20. ábra** A deutérium beépülési százalék hőterképes megjelenítése a hE3 dimer egyik monomer egységén, a másik monomer egység által kitöltött teret szürke felület jelöli, a FAD-ot és NAD-ot pálcika ábra jeleníti meg (1zmc PDB kódú szerkezet, A és B lánc).

A deutérium cserére hajlamos 81-85 aminosavak által határolt régió, az oldószer által leghozzáférhetőbb részén helyezkedik el a hE3 dimernek, és az amid hidrogének az oldószerrel alakítanak ki hidrogén kötések. A hasonlóan magas cserével jellemezhető 275-289 aminosavak által határolt régió a kristályszerkezetben kötött NAD-dal alakít ki hidrogén kötések. A NAD-ról irodalmi adatok alapján tudjuk(71), hogy oldatban gyengén kötött, és a mi rendszerünkben nem volt megtalálható, így ezt az üreget oldószer töltötte ki. A magas cserét mutató 339-351 aminosavak által határolt régióban a másodlagos szerkezettel nem rendelkező szerkezeti egységek arányának mérőszáma volt kiemelkedően magas, ez határozhatta meg a hatékony cserét az oldószerrel. Három fehérjeszakasz nem mutatott cserét a kísérleti körülmények között, ezek közül kettőnek a védettsége (434-441; 459-464) minden vizsgált mérőszám szerint indokolható, míg a 261-274 aminosavak által határolt szakasz kiemelt védettségét nem tudjuk a bevezetett mérőszámokkal megmagyarázni. A hE3-ről közzé tett kristályszerkezeteket a 10. táblázat foglalja össze. Ezeket vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a kristályrácsban az egymáshoz szorosan illeszkedő dimer egységek

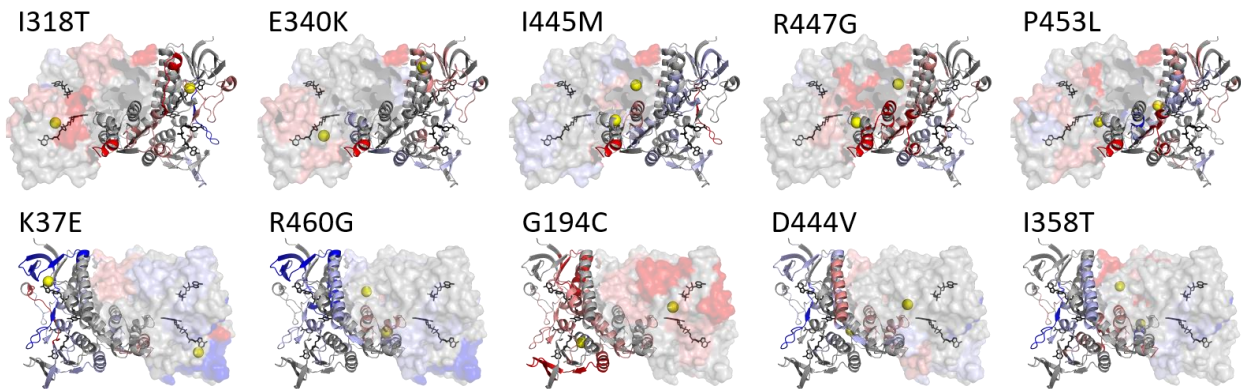


kis felületen hatnak kölcsön egymással. A 261-274 aminosavak által képzett kar minden esetben hasonlóan kinyújtott állapotú ( $\text{RMSD} < 0,2$ ) és egy fontos eleme a dimereket összetartó kölcsönhatásnak (21. ábra). Mérési adataink egyik lehetséges magyarázata az, hogy a cserefolyamat körülményei között, híg oldatban, kölcsönható partner hiányában a 261-274 kar visszahúzódik, így több homomolekuláris hidrogén kötést alakít ki és a felületi kitettsége is csökken. Egy másik oldatban előforduló konformer létezésével összhangban vannak főláncbéli atomok magas B faktor értékei a 261-274 kar területén; továbbá az, hogy a 3nm PDB azonosítójú, 2,4 Å felbontású szerkezet B és D láncában 261-264 aminosavak megfelelő elektronsűrűség nem volt megtalálható. A 261-274 peptid szakasznak a HDX értékei nem változtak az általunk vizsgált mutációk hatására.



**21. ábra** A hE3 261-274 peptidszakasza (sárga) által kialakított kapcsolatok fontos szerepet töltenek be a kristályrácsot összetartó erőkből (PDB: 1ZMC). Az elemi cellát felépítő funkcionális dimer egységeket (A-B; C-D; E-F; G-H lánc párok) számos másodlagos kémiai kötés tartja össze, míg a dimer egységek közötti kis kölcsönhatási felület egyik legfontosabb eleme a 261-274 kar, melynek a két jellemző konformációját mutatjuk. A 261-274 kar kinyújtott konformációjú szerkezetét figyelhetjük meg az eddig közzé tett 6 db hE3 szerkezetben, és ez a peptidszakasz minden esetben a kristályrácsot összetartó fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában játszik szerepet. A HDX adatok alapján azonban azt feltételezzük, hogy ez a kar híg oldatokban visszahúzódik, ezzel kevésbé oldószerkitetté válik és kölcsönhatásait intramolekulárisan alakítja ki.

A hE3 patogén mutánsainak hidrogén-deutérium csere mintázata karakterisztikus eltérést mutatott a vad típushoz képest. Az egy-egy aminosavra kiterjedő mutációk nemcsak a közvetlen környezetükben, hanem a fehérje számos távolabbi régiójában is előidézték mérhető változásokat. Fontos még azt megjegyeznünk, hogy a dimerizációs felületen egyik mutáns esetén sem volt megfigyelhető jelenős növekedés a deutérium beépülésben, ami további bizonyítékot szolgáltat arra a megfigyelésünkre, hogy a mutációk nem idézik elő a homodimer jelentős mértékű monomerizációját.



**22. ábra** A hE3 patogén variánsainak hidrogén-deutérium csere mintázatának eltérése a vad típustól ( $\Delta\Delta D$ ). A pozitív irányú, az adott érték szórását meghaladó mértékű eltérést rózsaszínnel, a szórás háromszorosát meghaladó mértékű eltérést pirossal jelöltük; a negatív eltérést hasonlóan világos-, illetve sötétkékekkel ábrázoltuk.

A 22. ábra mutatja be a mutánsok és a vad típus hidrogén-deutérium csere mértéke közötti különbséget a hE3 kristályszerkezetére vetítve. Az adatok igazolják, hogy a betegséget okozó mutációk a fehérjeszerkezet széles tartományában okoztak eltéréseket, nemcsak a helyettesített aminosav közvetlen közelében fejtették ki hatásukat. Ez a megfigyelés akkor is igaz, ha a teljes homodimer térbeli szerkezetét figyelembe vesszük.

Négy variáns (E340K-, I445M-, R447G- és P453L-hE3) esetén az figyelhetjük meg, hogy a C-terminális régió (465-474, 469-474) oldószerkitettsége és flexibilitása növekszik meg jelentősen a mutáció következtében. A szimmetrikus homodimer szerkezetben mindkét C-terminális régió részben a dimerizációs felületbe ágyazódva helyezkedik el, aminek a mobilitását nagymértékben befolyásolja a dimer nyitottsága és a monomerek összehangolt mozgása. Könnyen értelmezhető, hogy az E340(K) és R447(G) aminosavak mutációja hasonló szerkezeti és konformációs változásokat idéztek elő, hiszen ez az aminosav pár a hE3 kristályszerkezetében a két monomer közötti, a dimert összetartó, egyik hidrogén kötést alakítja ki. Mindkét esetben a mutáció jelentős mértékű szterikus, valamint elektronikus változást is előidéz a C-terminális közvetlen közelében. A szubsztitúció helye a I445M- és az P453L-hE3 variánsokban szekvenciálisan közel esik a leginkább befolyásolt C-terminális régióhoz. Ezen aminosav helyettesítések következtében az új oldallánc alakja különbözik, azonban a helyettesítés nem okoz számottevő méret- vagy töltésbeli változást. A hE3 kristályszerkezetében a P453 és a H452 közt cisz-peptid kötés található, ami feltételezéseink szerint a P453L-hE3 mutánsban transz konfigurációt vesz fel. Ennek a feltételezett változásnak a biológiai jelentőségét Kim és Patel részletes biokémiai vizsgálatai is alátámasztják, melyek kimutatták, hogy a H452 aminosav fontos szerepet játszik a hE3 katalitikus működésében.(233)

A G194C szubsztitúció kiemelkedő eltérést okoz a hE3 deutérium felvevőképességében a helyettesített aminosav szekvenciális környezetében, illetve a NAD<sup>+</sup>/NADH kötő régióban. A jelenség azzal magyarázható, hogy a G194 aminosav egy  $\alpha$ -hélixben helyezkedik el, amelynek az erősen rendezett szerkezetét a nagyméretű, poláris cisztein oldallánc megzavarhatja.

A D444V-hE3 variáns hidrogén-deutérium csere térképe kiemelkedő szerkezeti változásokra utal különösen a szubsztitúcióhoz szekvenciálisan közeli régiókban. Ez az eredmény annak tükrében értelmezhető, hogy a hE3 szimmetrikus homodimer kristályszerkezetében az egyik monomer egység D444 és a másik monomer egység Y438' aminosavai hidrogén kötést alakítanak ki, amire a szubsztitúció után már nincs lehetőség. Ez a mutáció a szerkezeti és dinamikai változásokat idéz elő a másik monomer szekvenciálisan

közeli Y438 aminosavának környezetében is; ezzel fokozva a C-terminális régió flexibilitását. A K37E-, az R460G- és az I358T-hE3 variánsok esetén a finom szerkezeti változások voltak megfigyelhetőek a fehérjeszerkezet számos területén, amelynek értelmezése részletesebb elemzést és további módszerek, mint a röntgenkristallográfia bevonását igényelte. A csoportunk későbbi közös erőfeszítéseinek eredményeként a hE3 variánsok többségének nagyfelbontású kristályszerkezete már elérhető,(234,235) az első publikált D444V-hE3 szerkezethez(234) vezető utat tárgyalja ez a dolgozat.

### A patogén hE3 variánsok kristályosíthatósága

A hE3 kristályszerkezete és kristályosítási körülményei már több, mint 10 éve ismertek voltak a munkám megkezdése előtt (a referenciákat a 10. táblázat foglalja össze), ennek ellenére a patogén hE3 variánsok kristályosítása nem járt sikerrel. Ez motivált arra, hogy a kristályosítás próbák megkezdése előtt részletesen körüljárjam, mely tényezők finomítása segítheti elő a hE3 variánsok kristályosíthatóságát, a kristályok diffrakciós képességét, illetve egy variánsra kidolgozott eljárás milyen mértékben vihető át a továbbiakra.

### Kristályosodást befolyásoló tényezők a patogén hE3 variánsok esetén

Az elérhető kristályosítási körülmények és eljárások száma egyre csak növekszik, de továbbra is a legfontosabb korlátozó tényező a mintamennyiség marad. Ezt a szempontot figyelembe véve a kristályosítási tesztek megkezdése előtt felülvizsgáltam a fehérjék szerkezeti stabilitását, a minta homogenitását, az optimális fehérjekoncentráció tartományt,

a kristályosítás kivitelezésének módját és az affinitás tag eltávolításának jelentőségét. Eredményeink alapján, -mintát és további eljárási lépéseket spórolva- megállapodtunk az affinitás tag-et tartalmazó variánsoknál, az automatizálható ülőcsepp és a könnyen finomítható függőcsepp módszerek kombinációjánál.

A fehérjék olvadási hőmérséklete ( $T_m$ ) azok másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemeinek hőstabilitásáról szolgáltat információt az adott oldószerkörülmények között. A humán fehérjék  $T_m$ -e  $25^\circ\text{C}$  és  $113^\circ\text{C}$  közötti tartományban várjuk, de többnyire nem haladják meg sokkal a testhőmérsékletet; ez alapján a hE3 variánsok mindegyike nagy hőstabilitásúnak mondható, amely összhangban áll azzal, hogy a hE3-ban nagy, 60 % feletti, a rendezett másodlagos szerkezeti elemeinek az aránya.(206) A hE3 szerkezetben a fehérje külső felszínén elhelyezkedő K37E variáns kivételével az öt vizsgált patogén mutáció csökkenést okozott a hE3 hőstabilitásában, a legkifejezettebb csökkenést a dimerizációs felületen található P453L szubsztitúció esetén figyeltük meg. A hőstabilitás oldószerfüggését vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a fehérjék pH 6,00-7,00 között voltak a legnagyobb hőstabilitásúak, de a tárolópuffer pH 8,00 körülményei között sem maradt el a hőstabilitás ettől lényegesen, az ionerősség kis mértékű változtatása nem befolyásolta a hőstabilitást. A fenti megfigyelések általános érvényűek voltak mindegyik vizsgált hE3 variáns esetén.

A fehérjeoldatok szűrésével és mikrocentrifugálásával a minta nagy fokú homogenitását sikerült elérni, amit az is mutatott, hogy a kristálygócok képződését sok esetben beoltással tudtuk csak elősegíteni. Az előzetes kristályosítási próbák során a két hét után tisztán maradt cseppeket minden esetben beoltottuk; az esetek 15%-ban a beoltás kristályosodási jelenségeket idézett elő. Az előzetes tesztek alapján meghatározott 20-40 mg/mL optimális fehérjekoncentráció tartomány alsó részét tudtuk sikeresen használni a variánsok tesztelése során, a 40 mg/mL koncentráció a körülmények több, mint 50 %-ában kicsapódáshoz vezetett.

10. táblázat A PDB adatbázisban elérhető hE3 szerkezetek összefoglalása

PDB kód	tércsoport	hE3 láncok száma az elemi cellában	felbontás	kofaktor	fehérje partner	referencia
1ZMC	P 21 21 2	8	2,53 Å	NAD <sup>+</sup>	-	Brautigam, C.A. et al., 2005
1ZMD	P 21 21 2	8	2,08 Å	NADH	-	Brautigam, C.A. et al., 2005
1ZY8	P 21 21 21	10	2,59 Å	-	hE3 kötő fehérje	Ciszak, E.M. et al., 2006
2F5Z	P 21 21 21	10	2,18 Å	-	hE3 kötő fehérje	Brautigam, C.A. et al., 2006
3RNM	P 1 21 1	4	2,40 Å	-	humán dihidrolipoamid transzaciláz kötő doménje	Brautigam, C.A. et al., 2011
5J5Z*	P 21 21 2	2	1,84 Å	-	-	Szabo, E. et al. 2018

\*D444V-hE3 variáns

#### A diffrakciós adatok felbontásának finomítása a D444V-hE3 variáns esetén

Annak érdekében, hogy nagyfelbontású és információ gazdag kristályszerkezeteket nyerjünk a diffrakcióra alkalmas kristályok minőségét két módon próbáltuk befolyásolni: egyrészt a 20°C-on növelt kristályok fagyasztásához használt krio-védőoldat minőségét vizsgáltuk felül; másrészt a NAD<sup>+</sup> és NADH kosubsztrátok, valamint a liponsav és lipoamid modelszubsztrátok kristályszerkezetbe való bejuttatását kíséreltük meg. A diffrakciós kísérlet során a kristályok 100 K-re történő hűtése csökkenti a hőmozgást, és ezzel javítja a

diffrakciós kép felbontását, azonban a kristályok fagyasztása jelentősen ronthatja azok szerkezetét. A fehérjekristályok 60% körüli mennyiségű kristályvizet tartalmaznak, ami fagyasztás során jeget képezhet, ezzel ronthatja a kristályszerkezetet; a krio-védőoldat ezt a folyamatot kívánja megakadályozni. Az adott kristálynak megfelelő krio-védőoldat megtalálása tapasztalati úton történik, ennek során fénymikroszkóp alatt, szemmel követtem, hogy a hagyományosan használt oldatok közül melyek okoznak roncsolódást a kristályszerkezetben, vagy oldják fel azt. A kipróbált körülmények közül a 20 v/v% glicerin volt egyértelműen a legkedvezőbb minden hE3 variáns esetében. A fehérje működése szempontjából fontos kofaktorok, illetve ligandumok jelenléte kristályban nemcsak a szerkezeti adatok információtartalmát növeli, hanem esetenként a szerkezetet is stabilizálja, ezzel javítva a felbontást. Ezt két módon próbáltuk elérni egyrészt együttkristályosítással, másrészt a diffrakcióra alkalmas kristályok ligandum oldatba történő áztatásával. A hE3 által nem kovalens módon, de szorosan kötött FAD proszretikus csoport minden esetben jól megfigyelhető volt, de a további kismolekuláknak megfelelő elektronsűrűségeket nem sikerült feloldanunk. A 10. táblázatban ismertetem, hogy a  $\text{NAD}^+$ , illetve a  $\text{NADH}$  kötődési módját már korábban vizsgálták a vad típusú hE3 kristályszerkezetében, azonban egyik esetben sem sikerült a kismolekulák teljes egészének megfelelő elektronsűrűséget megfigyelni, illetve jelentős szerkezeti különbséget kimutatni a  $\text{NAD}^+$ -ot és a  $\text{NADH}$ -t tartalmazó fehérjeszerkezet között. Ezen tapasztalatok alapján későbbiekben a patogén hE3 variánsok kristályosítása során eltekintettünk  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , illetve további modellszubsztrátok kötődésének vizsgálatától.

#### A nagyfelbontású D444V-hE3 szerkezet

A korábban rendelkezésre álló vad típusú hE3-at tartalmazó kristályszerkezeteket a 10. táblázat foglalja össze. A munkámban tárgyalt D444V-hE3 variánssal minden korábbi közölt hE3 variánsnál nagyobb felbontású szerkezetet sikerült elérnem. A D444V-hE3

szerkezet részletes elemzését, a többi variánssal és a vad típusú hE3-mal való összevetését dr. Szabó Eszter végezte el. Az én előzetes szerkezetfinomítási munkám alapján egyértelműen tudtam igazolni a D444V mutáció jelenlétét a kristályszerkezetben, felismerhető volt továbbá, hogy az aszparaginsav valinra való cseréjé következtében megszűnt a homodimer másik monomeregységének Y438 aminosavjával kialakított hidrogénkötés; azonban a teljes D444V-hE3 és a korábban közölt vad típusú hE3 főláncok által meghatározott szerkezetek között nem láttam nagyobb eltérést, mint, ami a hE3 szerkezetek elemi celláiban az egyes fehérjeláncok között volt megfigyelhető. A D444V-hE3 kristályosításának finomítása során szerzett tapasztalatok hasznos alapot szolgáltattak a hE3 további variánsainak röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározásában.



## 7. Következtetések és kitekintés

### A szangvinarin és kukurbit[7]uril zárványkomplexeinek felhasználási lehetőségei

Számos tanulmány foglalkozott azzal, hogyan befolyásolja a CBn-lal történő zárványkomplekképződés a vendégmolekulák protonálódását,(236–243) 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(244–246) köszönhetően nemcsak a SA stabilizálására, hanem a SA alapú gyógyszerek bejuttatására is alkalmas adalékanyag lehet. Az utóbbi években számos megoldást láttunk a CBn funkcionálására,(247–250) amely a gyógyszermolekulák irányított célba juttatásának lehetőségét hordozza magában.(244,251,252) Ebben a tanulmányban bemutattuk továbbá, hogy a pH csökkentésével SA irányított leadása is megvalósítható a zárványkomplexeiből. A CB7 specifitása és affinitása a SA iránt gyógyszeranalitikai és farmakokinetikai jelentőséggel bír; hiszen CB7 felhasználásával spektrofluorimetriás módszerekkel akár 0,03 ng/ml SA is kimutatható vérből, illetve vizeltből.(219)

Munkánk idézettségének nagy részét (több, mint 70 független hivatkozás) annak köszönheti, hogy példát mutat egy olyan vendégmolekula:CBn rendszerre, melyben mind az 1:1, mind pedig az 1:2 komplex is megfigyelhető, azokoznak 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

ciklodextrinek zárványkomplexeinek affinitási állandóit megfelelő pontossággal számító szemiempirikus eljárások rendelkezésre állnak,(253) azonban a CBn zárványkomplexek affinitásának számítása a mai napig kihívást jelent,(254,255) különösen erőforrásigényes a töltéssel rendelkező vendégmolekulák kezelése. A kísérleti megfigyeléseink modellrendszerként szolgálhatnak a vendég-gazdamolekula rendszerekre kidolgozott molekuláris modellezési algoritmusok továbbfejlesztésében.

### A hE3-elégtelenség értelmezésében várható előrelépések

A hE3-elégtelenségre nem kínál gyógymódot a modern orvostudomány, ezen genetikai betegségnek a kezelése csak tüneti jellegű és annak hatékonysága az egyénenként változó. A gyógymód kidolgozásában kihívást jelent, hogy kevés dokumentált eset áll rendelkezésre; egyik hE3 variáns esetén sem éri el a tizet a részletesen leírt esetek száma, és ezek a páciensek változatos, az egyedi helyzetüknek megfelelő kezelést kaptak. Állatmodelleken végzett kísérleteket nem közöltek napjainkig. Az *in vivo* és *in vitro* kísérletek tapasztalatait a 11. táblázat foglalja össze. A potenciális gyógyszermolekulák megtalálása után további technikai nehézséget jelent majd, hogy a hE3 aktivitást célzó készítményeket irányítottan a mitokondriumba kell eljuttatni.

A hE3-rendellenesség összetettségét indokolja, hogy a hE3 enzim változatos szerepet tölt be szervezetünkben: dihidrolipoamid-dehidrogenáz aktivitása mellett, melyet a mitokondriális  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex család és a glicin hasító rendszer tagjaként tölt be, diaforáz és proteolitikus aktivitással is rendelkezik. Az eddigi *in vitro* és *in vivo* megfigyelések arra utalnak, hogy az egyes mutációk a hE3 fehérjében annak szerepeit különbözőképpen befolyásolják, ami a hE3-elégtelenség változatos tüneteinek vezet. A területen dolgozók együttes erőfeszítése révén a páciensek egyedi genetikai térképének ismeretével a számukra leghatékonyabb terápia gyors beállítása válhat lehetővé.

A hE3 variánsokat érintő szerkezeti és dinamikai vizsgálataink további értelmezését elősegíti majd, ha a hE3-at tartalmazó multienzimkomplexeinek felépítéséről, a benne egymáshoz kapcsolódó fehérjék atomi szintű szerkezetéről részletesebb ismeretek álnak majd rendelkezésre. Legkevesebbet a glicin hasító rendszerben fellépő fehérje-fehérje kölcsönhatásokról tudunk, ez az enzim rendszer nem vesz fel állandó szupramolekuláris szerkezetet, hanem a mitokondrium belső membránjához lazán kötődő enzimkomponensek kölcsönhatása révén fejt ki hatását.(256,257) Az enzimrendszert felépítő központi H- és T-fehérjék közötti párkölcsönhatásról kristályszerkezet áll rendelkezésre,(258) illetve a H- és P- fehérjék közötti kölcsönhatásban fontos aminosavakat biokémiai vizsgálatokkal tárták fel.(259,260) A fenti enzimkomponensek és az E3 között azonban specifikus kölcsönhatást eddig nem sikerült kimutatni.(261)

Az alfaketosav-dehidrogenáz enzimkomplexek közül a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex (PDC) szerkezetéről vannak legrészletesebb ismereteink. A humán PDC komplex magját képező dodekaéder csúcaiban hE2p trimerek helyezkednek el,(59) így az összesen 60 E2p fehérjét tartalmaz. A hE2p maghoz az enzimaktivással nem bíró, stabilizáló funkciójú E3 kötő fehérjéből (E3BP) 12 kapcsolódását figyelték meg E3 hiányában, míg 20 E3BP jelenlétét írták le hE3 felesleg esetén. A hE2p és a E3BP közötti kölcsönhatásról más fajokon szerzett ismereteink alapján homológia modellek készültek;(48,58–60,262) a legelfogadottabb modell szerint az E3BP a hE2p trimerekből kiszorít legfeljebb egy hE2p egységet és annak a helyére épül be.(59) A hE3 és hE1p fehérjék az oktaédes mag a lapjai felett helyezkednek el, ahol a hE2p hosszú linkerekkel elválasztott hE1p-kötő és lipoil doménje segítségével stabilizálja a az hE1p-t, míg a E3BP szintén rendelkezik egy hosszú karral, melynek a végén elhelyezkedő domén a hE3 megkötésére szolgál.(58) A hE3 és a E3BP által képzett komplexről atomi szintű kísérleti információk állnak rendelkezésre.(54,55) A hE2p és E3BP hosszú karjai fontos szerepet játszhatnak a katalitikus folyamat során a hE2p és hE3 dinamikus elhelyezésében, mely közben a hE3 további kölcsönhatásba léphet a hE1p-vel és hE2p-vel, azonban erről az ismereteink hiányosak.(58)

A  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz és az elágazó láncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz enzimkomplexeiket is a PDC-hez hasonló, sokrétű fehérje-fehérje kölcsönhatás hálózat tartja össze. A humán  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex szerkezetéről még nem alakult ki egységes képünk; a humán elágazó láncú  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz magja 24 saját E2 típusú fehérjéből épül fel, mely nem kovalensen csatlakozik 12 E1  $\alpha_2\beta_2$  típusú tetramerhez és 6 E<sub>3</sub> homodimerhez.

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 oldatbeli dinamikájának értelmezéséhez, amely elősegítheti annak az értelmezését, hogy a hE3 milyen dinamikai változások során fejt ki a hatását, együttműködve a további fehérjékkel a multienzim komplexeiben; 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.

**10. táblázat** A vizsgált patogén hE3 variánsok biokémiai tulajdonságai.\*

variáns	domén	$\Delta$ polaritás	$\Delta$ heteroatom	rekonstruált fehérje(komplex) enzimaktivitása	ex vivo és in vivo enzimaktivitás	ROS	FAD	E3BP $K_d$	megjegyzés
K37E	FAD	pn	0	hLADH 20% (262), 75% (121), 70% (112) hLADH: 91% (262), 10% (54), 18-22% (112), 29% (74), 40% (120); hPDHc NM(54);	élesztő: (263) hLADH 92%, hPDHc 88%, hKGDHc 68%; páciens fibroblaszt (heterozigóta a P453L variánssal együtt): hLADH 6% (94)	100% (112)	76% (121), 67% (112)	$\times 1.7$ (54)	
R460G	NAD	p0	-7	hLADH 64-71%, 0,2%, 100%, 89%, 71%; hPDHc 38%	heterozigóta páciens minták (a másik allélon nonszensz mutációt hordoz): (89,90,98) hLADH 1,5-14%, hKGDHc 20%, hPDHc 11-26%	74% (112)		$\times 10000$ (54,262)	R460 sóhidat képez az E333' aminosavval(71)
E340K	KP	np	0	hLADH 64-71%, 0,2%, 100%, 89%, 71%; hPDHc 38%	klinikai minták: (83) hLADH 3-11%, hPDHc 12-14%, hKGDHc 1-6%; (heterozigóta az M326V variánssal együtt): (76) hLADH 3-14%, hPDHc 3-44%; (heterozigóta az I12T variánssal együtt): (89) hLADH 9%, hPDHc 25%, hBCKDHc 62%	123% (112)	99% (112)	NM(54,262)	E340 sóhidat képez az R447' aminosavval(71); E3BP-kötőfelületen helyezkedik el(54,55)
I445M	DIM	00	0		klinikai minták: (96,98) hLADH NM, hPDHc 13-97%				E3BP(54,55) és hSBD(49)-kötő felületen helyezkedik el
R447G	DIM	p0	-7	hLADH 92% (54), 54% (120); hPDHc 28% (54)	klinikai minták: (88) hLADH 20%, hPDHc 63%, hKGDHc 0%, hBCKDHc 56%		PDHc és KGDHc LA kofaktor oxidatív károsodása élesztőben(120)	$\times 250$ (54)	E3BP(54,55) és hSBD(49)-kötő felületen helyezkedik el
P453L	DIM	00	-1	hLADH 4-9% (112)	élesztő: hLADH NM(79); hPDHc NM(79); páciens fibroblaszt (heterozigóta a K37E variánssal együtt): hLAD 6% (94)	230% (112)	66% (112)	$\times 4$ (262)	cisz peptid kötés az aktív centrumban P453 és H452 között(71)
G194C	DIM	00	2	hLADH 100% (112), 75% (73), 47% (120); hPDHc 29% (113);	fibroblaszt, limfociták vagy izom: hLADH 6,5-30% (75,78,79,91); hKGDHc 2-44% (78,89); hPDHc 10,5-100% (78,79,89)	172% (112,113)	72% (112)		leggyakoribb variáns, a géngyakoriság 1:94 az askenázi zsidó közösségben(91)

D444V	DIM	n0	-1	hKGDHc 61%(113) rekombináns: hLADH 80%(120), 35%(112), 100%(54), 90%(70); hPDHc 15%(78) hLADH	páciens izom homogenizátum: hLADH 15%(54), hKGDHC 2%(54), hPDHc 0%(54)	130%(112)	95%(112)	NM(54)	D444 és Y438' hidrogén kötést létesít a dimer felületen(71), részt vesz a E3BP(54,55) és a hSBDb(49) megkötésében
I358T	DIM	00	-1	100%(85), 30- 41%(112)	klinikai minták (heterozigóta egy intron mutánssal együtt):(264) hLADH 29%, hPDHc 14-100%	53%(112)			
I318T	KP	00	-1		klinikai minták (heterozigóta a G101del variánssal együtt):(98) hLADH 9-29%, hPDHc 80%, hBCKDHc 24%, hKGDHc 107%				

\*A mutációk a hE3 homodimer FAD kötő (FAD), NAD<sup>+</sup> kötő (NAD), központi (KP) és dimerizációs doménjén (DIM) helyezkednek el (4.ábra). A mutáció hatására a megváltozhat az aminosav polaritása (pl. pozitívból negatívva: pn, az apoláros aminosavat 0 jelöli); valamint az oldalláncokat felépítő heteroatomok száma ( $\Delta$ heteroatom). A megtisztított, rekombináns fehérjék, illetve az ezekből a fehérjékből rekonstituált komplexek az enzimaktivitás értékeit külön oszlopban tüntettük fel az élő sejtek, illetve azok homogenizátumaiból mért enzimaktivitástól (hLADH: humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz, hPDHc: humán piruvát-dehidrogenáz komplex, hBCKDHc humán  $\alpha$ -ketosav-dehidrogenáz komplex, hGCS humán glicin hasító rendszer, hKGDHc humán  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex aktivitás). A variánsokról kimutatták, hogy befolyásolják a hE3 reaktív oxigénszármazék képző képességét, és esetenként FAD veszteséghez vezetnek. A hE3 enzimkomplexekhez való kötődésének mechanizmusáról hiányosak az információink, azonban a ismert, hogy a hE3-at a hPDHc magjához E3 kötő fehérje (E3BP) rögzíti; a hBCKAc- ben nincs az hE3-ra specializálódott kötő fehérje, hanem a komplex magját képező humán dihidrolipoamid transzamiláz (hE2b) alegység kötő doménje (hSBDb) felelős ezért a szerepért. A százalékok és szorzófaktorok a vad típusra vonatkoztatott értéket mutatják, NM pedig a nem mérhető aktivitást.

## 8. Összefoglalás

A szangvinarin (SA) egy biológiailag aktív benzofenantridin alkaloid, melynek a kukurbit[7]urillal (CB7) képzett zárványkomplexeit vizsgáltuk oldatfázisú NMR spektroszkópiával. Koncentráció- és hőmérsékletfüggő  $^1\text{H}$  NMR mérésekkel három specieszt párhuzamos jelenlétét bizonyítottuk, melyeket a SA:CB7 1:1, illetve 1:2 molarányú zárványkomplexeznek és a nem specifikusan kötött SA-nak felleltettünk meg. Kétdimenziós homonukleáris NMR eljárásokkal és molekula-modellezéssel jellemeztük a zárványkomplexekek geometriáját. A modellekből meghatározott hidrodinamikai sugarak összhangban állnak a diffúziós NMR-rel mért értékeinkkel. A SA imínium formája ( $\text{SA}^+$ ) stabil és specifikus 1:1 sztöchiometriájú zárványkomplexezt képez a CB7-tel ( $K=1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), a második CB7 megkötésének egyensúlyi állandója három nagyságrenddel alacsonyabb. A SA pK-ja az 1:1 komplexben 3,69 egységgel magasabb, így a CB7 gátolja az oxidációra hajlamos SAOH forma keletkezését, ezzel növeli a SA fotostabilitását. A CB7 származékok nemcsak a SA molekula stabilizálására alkalmasak, hanem a gyógyászati célból történő irányított célbajuttatására, majd pH-függő felszabadítására is.

A humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz (hE3) patogén mutációi súlyos metabolikus betegséghez, az E3-elégtelenséghez, vezetnek. Az E3-elégtelenség szív-, ér- és idegrendszeri tüneteket, gyakran csecsemőkori elhalálozást okoz. 14 betegséghez köthető aminosav mutációt ismerünk, azonban ezekről kísérleti szerkezeti információ nem állt eddig rendelkezésre. Munkámban hidrogén-deutérium csere tömegspektrometriával (HDX MS) elemzem tíz patogén hE3 mutáció hatását a hE3 homodimer oldatszerkezetére. A vad típusú hE3 HDX mintázata összhangban áll a korábban közölt kristályszerkezetekkel, azzal a kivétellel, hogy a 261-274 kar a kristályszerkezetben kinyújtott állapotban található, ezzel elősegíti a kristálypakolódást; a HDX adatok arra utalnak, hogy a kar oldatban zártabb szerkezetű. Ismertetem a hE3 variánsok előállításának, tisztításának és előzetes kristályosítási próbáinak eredményeit. Bemutatom a dimerizációs felületet érintő D444V-hE3 mutáns kristályosításának és diffrakciós adatgyűjtésének lépéseit. Az  $1,84 \text{ \AA}$  felbontású kristály az ortorombos  $P2_12_12$  tércsoportban kristályosodott, az elemi cella paraméterei  $a=118,04$ ;  $b=168,94$ ;  $c=61,28 \text{ \AA}$  voltak. A bemutatott szerkezeti információk és kísérleti eljárások elősegítik az E3-elégtelenség molekuláris mechanizmusának feltárását.

## 9. Summary

The inclusion of sanguinarine (SA), a biologically active natural benzophenanthridine alkaloid, in cucurbit[7]uril (CB7) was studied by NMR in aqueous solution. Three species, the 1:1, 1:2 SA:CB7 inclusion complexes and the non-specifically bound SA, were detected by concentration and temperature dependent  $^1\text{H}$  NMR. We characterized the geometry of the inclusion complexes using two-dimensional homonuclear NMR and molecular modelling. The hydrodynamic radii calculated from the models are in line with our diffusion NMR results. The iminium form of sanguinarine ( $\text{SA}^+$ ) was found to produce stable and specific 1:1 inclusion complex with CB7 ( $K=1.0\times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). With a second CB7 molecule a 1:2 complex was also formed, whose binding constant is 3 orders of magnitude smaller. CB7 increases the photostability of SA by impeding the oxidation sensitive SAOH production *via* shifting the pK of SA by 3.69 units upon the 1:1 complex formation. Confinement in CB7 is useful not only for stabilizing, but also for drug delivery and pH-controlled release of SA.

Pathogenic mutations of the human dihydrolipoamide dehydrogenase (hE3) lead to a severe metabolic disease termed E3-deficiency. It usually involves cardiological and neurological symptoms and often cause premature death. 14 disease-causing amino acid substitutions of hE3 have been reported, however, high-resolution experimental structures have not been characterized. Here, I describe the structural alterations in hE3 caused by ten pathogenic mutations using hydrogen-deuterium-exchange mass spectrometry. I also show that the hE3 solution structure is consistent with the previously reported crystal structures of the wild type hE3 homodimer, apart from the 261-274 loop. We propose that the openness of the 261-274 loop is caused by crystal packing, and that the loop might be less exposed in solution. I report the optimization protocols of the expression, purification and crystallization screening of the hE3 variants. I describe the crystallization and X-ray diffraction experiments of the D444V homodimer interface mutant of hE3. The crystal belonged to the orthorhombic space group  $P 2_1 2_1 2$ , with unit-cell parameters  $a=118.04$ ,  $b=168.94$ ,  $c=61.28 \text{ \AA}$ , and diffracted to  $1.84 \text{ \AA}$  resolution. The structural information and experimental protocols presented here provide guidelines for studying the molecular pathogenesis of the disease-causing hE3 mutants.



## 10. Irodalomjegyzék

1. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. (2010) Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*, 29: 405–434.
2. Bhadra K, Kumar GS. (2011) Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: binding aspects and implications for drug design. *Med Res Rev*, 31: 821–862.
3. Das M, Khanna SK. (1997) Clinicoepidemiological, toxicological, and safety evaluation studies on argemone oil. *Crit Rev Toxicol*, 27: 273–297.
4. Maiti M, Das S, Sen A, Das A, Kumar GS, Nandi R. (2002) Influence of DNA structures on the conversion of sanguinarine alkanolamine form to iminium form. *J Biomol Struct Dyn*, 20: 455–464.
5. Adhikari A, Hossain M, Maiti M, Suresh Kumar G. (2008) Energetics of the binding of phototoxic and cytotoxic plant alkaloid sanguinarine to DNA: Isothermal titration calorimetric studies. *J Mol Struct*, 889: 54–63.
6. Sen A, Maiti M. (1994) Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochem Pharmacol*, 48: 2097–2102.
7. Ferraroni M, Bazzicalupi C, Bilia AR, Gratteri P. (2011) X-Ray diffraction analyses of the natural isoquinoline alkaloids Berberine and Sanguinarine complexed with double helix DNA d(CGTACG). *Chem Commun*, 47: 4917–4919.
8. Cala PM, Nørby JG, Tosteson DC. (1982) Effects of the plant alkaloid sanguinarine on cation transport by human red blood cells and lipid bilayer membranes. *J Membr Biol*, 64: 23–31.
9. Janovská M, Kubala M, Šimánek V, Ulrichová J. (2010) Interaction of sanguinarine and

its dihydroderivative with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicol Lett*, 196: 56–59.

10. Tandon S, Das M, Khanna SK. (1993) Effect of sanguinarine on the transport of essential nutrients in an everted gut sac model: Role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Nat Toxins*, 1: 235–240.
11. Pallichankandy S, Rahman A, Thayyullathil F, Galadari S. (2015) ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine. *Free Radic Biol Med*, 89: 708–720.
12. Gu S, Yang XC, Xiang XIY, Wu Y, Zhang YU, Yan XYU, Xue YAN, Sun LK, Shao GG. (2015) Sanguinarine-induced apoptosis in lung adenocarcinoma cells is dependent on reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress. *Oncol Rep*, 34: 913–919.
13. Han MH, Kim G-Y, Yoo YH, Choi YH. (2013) Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett*, 220: 157–166.
14. Chang M-C, Chan C-P, Wang Y-J, Lee P-H, Chen L-I, Tsai Y-L, Lin B-R, Wang Y-L, Jeng J-H. (2007) Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol Appl Pharmacol*, 218: 143–151.
15. Rahman A, Thayyullathil F, Pallichankandy S, Galadari S. (2016) Hydrogen peroxide/ceramide/Akt signaling axis play a critical role in the antileukemic potential of sanguinarine. *Free Radic Biol Med*, 96: 273–289.
16. Schmeller T, Latz-Brüning B, Wink M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44: 257–266.
17. Hossain M, Khan AY, Suresh Kumar G. (2011) Interaction of the anticancer plant

- alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin. *PLoS One*, 6: e18333.
18. Hossain M, Khan AY, Suresh Kumar G. (2012) Study on the thermodynamics of the binding of iminium and alkanolamine forms of the anticancer agent sanguinarine to human serum albumin. *J Chem Thermodyn*, 47: 90–99.
  19. Jones RR, Harkrader RJ, Southard GL. (1986) The Effect of pH on Sanguinarine Iminium Ion Form. *J Nat Prod*, 49: 1109–1111.
  20. Absolínová H, Jančář L, Jančářová I, Vičar J, Kubáň V. (2009) Acid-base behaviour of sanguinarine and dihydrosanguinarine. *Cent Eur J Chem*, 7: 876–883.
  21. Maiti M, Nandi R, Chaudhuri K. (1983) The effect of pH on the absorption and fluorescence spectra of sanguinarine. *Photochem Photobiol*, 38: 245–249.
  22. Šimánek V, Preininger V. (1977) Pseudobase Formation from Quaternary Pyridinium, Quinolinium and Isoquinolinium Cations. *Heterocycles*, 6: 475–497.
  23. Janovská M, Kubala M, Šimánek V, Ulrichová J. (2009) Fluorescence of sanguinarine: fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Anal Bioanal Chem*, 395: 235–240.
  24. Das A, Nandi R, Maiti M. (1992) Photophysical property of sanguinarine in the excited singlet state. *Photochem Photobiol*, 56: 311–317.
  25. Kumar GS, Das A, Maiti M. (1997) Photochemical conversion of sanguinarine to oxysanguinarine. *J Photochem Photobiol A Chem*, 111: 51–56.
  26. Cram DJ. (1983) Cavitands: organic hosts with enforced cavities. *Science*, 219: 1177–1183.
  27. Ghosh I, Nau WM. (2012) The strategic use of supramolecular pKa shifts to enhance the bioavailability of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 764–783.
  28. Deshayes S, Gref R. (2014) Synthetic and bioinspired cage nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine*, 9: 1545–1564.

29. Cragg PJ, Sharma K. (2012) Pillar[5]arenes: fascinating cyclophanes with a bright future. *Chem Soc Rev*, 41: 597–607.
30. Guo D-S, Liu Y. (2014) Supramolecular Chemistry of p -Sulfonatocalix[ n ]arenes and Its Biological Applications. *Acc Chem Res*, 47: 1925–1934.
31. Sharma N, Baldi A. (2014) Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Deliv*, 23: 1–19.
32. Lay S, Ni X, Yu H, Shen S. (2016) State-of-the-art applications of cyclodextrins as functional monomers in molecular imprinting techniques: a review. *J Sep Sci*, 39: 2321–2331.
33. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2016 - Molecular Machines (2016) *Cl Chem R Swedish Acad Sci*, 50005: 1–14.  
<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/advanced-chemistryprize2016-1.pdf>  
(hozzáférés dátuma: 2020. 01. 01.)
34. Lehn J-M. (2017) Supramolecular chemistry: Where from? Where to? *Chem Soc Rev*, 46: 2378–2379.
35. Masson E, Raeisi M, Kotturi K. (2018) Kinetics Inside, Outside and Through Cucurbiturils. *Isr J Chem*, 58: 413–434.
36. Isaacs L. (2009) Cucurbit[n]urils: From mechanism to structure and function. *Chem Commun*, 6: 619–629.
37. Lagona J, Mukhopadhyay P, Chakrabarti S, Isaacs L. (2005) The cucurbit[n]uril family. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44: 4844–4870.
38. Behrend R, Meyer E, Rusche F. (1905) I. Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd. *Justus Liebig's Ann der Chemie*, 339: 1–37.
39. Freeman WA, Mock WL, Shih NY. (1981) Cucurbituril. *J Am Chem Soc*, 103: 7367–7368.

40. Kim J, Jung I-S, Kim S-Y, Lee E, Kang J-K, Sakamoto S, Yamaguchi K, Kim K. (2000) New Cucurbituril Homologues: Syntheses, Isolation, Characterization, and X-ray Crystal Structures of Cucurbit[*n*]uril (*n* = 5, 7, and 8). *J Am Chem Soc*, 122: 540–541.
41. The Cambridge Crystallographic Data Centre. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/> (hozzáférés dátuma 2015. 11. 19.)
42. Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/> (hozzáférés dátuma: 2020. 01. 01.)
43. Assaf KI, Nau WM. (2015) Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chem Soc Rev*, 44: 394–418.
44. Rekharsky M V, Mori T, Yang C, Young HK, Selvapalam N, Kim H, Sobransingh D, Kaifer AE, Liu S, Isaacs L, Chen W, Moghaddam S, Gilson MK, Kim O, Inoue Y. (2007) A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy - Entropy compensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20737–20742.
45. Kim K. (2002) Mechanically interlocked molecules incorporating cucurbituril and their supramolecular assemblies. *Chem Soc Rev*, 31: 96–107.
46. Carothers DJ, Pons G, Patel MS. (1989) Dihydrolipoamide dehydrogenase: Functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases. *Arch Biochem Biophys*, 268: 409–425.
47. Berg A, de Kok A. (1997) 2-Oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain. *Biol Chem*, 378: 617–634.
48. Wang J, Kumaran S, Zhou J, Nemeria NS, Tao H, Kakalis L, Park Y-H, Birkaya B, Patel MS, Jordan F. (2015) Elucidation of the Interaction Loci of the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex E2·E3BP Core with Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 and Kinase 2 by H/D Exchange Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, 54: 69–82.
49. Brautigam CA, Wynn RM, Chuang JL, Naik MT, Young BB, Huang T-H, Chuang DT.

- (2011) 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: 23476–23488.
50. Gu Y, Zhou ZH, McCarthy DB, Reed LJ, Stoops JK. (2003) 3D electron microscopy reveals the variable deposition and protein dynamics of the peripheral pyruvate dehydrogenase component about the core. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7015–7020.
51. Milne JLS, Wu X, Borgnia MJ, Lengyel JS, Brooks BR, Shi D, Perham RN, Subramaniam S. (2006) Molecular structure of a 9-MDa icosahedral pyruvate dehydrogenase subcomplex containing the E2 and E3 enzymes using cryoelectron microscopy. *J Biol Chem*, 281: 4364–4370.
52. Stoops JK, Baker TS, Schroeter JP, Kolodziej SJ, Niu XD, Reed LJ. (1992) Three-dimensional structure of the truncated core of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex determined from negative stain and cryoelectron microscopy images. *J Biol Chem*, 267: 24769–24775.
53. Wagenknecht T, Grassucci R, Schaak D. (1990) Cryoelectron microscopy of frozen-hydrated  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complexes from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 265: 22402–22408.
54. Brautigam CA, Wynn RM, Chuang JL, Machius M, Tomchick DR, Chuang DT. (2006) Structural Insight into Interactions between Dihydrolipoamide Dehydrogenase (E3) and E3 Binding Protein of Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Structure*, 14: 611–621.
55. Ciszak EM, Makal A, Hong YS, Vettaikorumakankauv AK, Korotchkina LG, Patel MS. (2005) How Dihydrolipoamide Dehydrogenase-binding Protein Binds Dihydrolipoamide Dehydrogenase in the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *J Biol Chem*, 281: 648–655.

56. Hiromasa Y, Fujisawa T, Aso Y, Roche TE. (2004) Organization of the Cores of the Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex Formed by E2 and E2 Plus the E3-binding Protein and Their Capacities to Bind the E1 and E3 Components. *J Biol Chem*, 279: 6921–6933.
57. Wang J, Nemeria NS, Chandrasekhar K, Kumaran S, Arjunan P, Reynolds S, Calero G, Brukh R, Kakalis L, Furey W, Jordan F. (2014) Structure and function of the catalytic domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase component in *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem*, 289: 15215–15230.
58. Yu X, Hiromasa Y, Tsen H, Stoops JK, Roche TE, Zhou ZH. (2008) Structures of the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex Cores: A Highly Conserved Catalytic Center with Flexible N-Terminal Domains. *Structure*, 16: 104–114.
59. Jiang J, Baiesc FL, Hiromasa Y, Yu X, Hui WH, Dai X, Roche TE, Zhou ZH. (2018) Atomic Structure of the E2 Inner Core of Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Biochemistry*, 57: 2325–2334.
60. Vijayakrishnan S, Kelly SMM, Gilbert RJCJC, Callow P, Bhella D, Forsyth T, Lindsay JGG, Byron O. (2010) Solution Structure and Characterisation of the Human Pyruvate Dehydrogenase Complex Core Assembly. *J Mol Biol*, 399: 71–93.
61. Milne JLS, Shi D, Rosenthal PB, Sunshine JS, Domingo GJ, Wu X, Brooks BR, Perham RN, Henderson R, Subramaniam S. (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J*, 21: 5587–5598.
62. Solmonson A, DeBerardinis RJ. (2018) Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J Biol Chem*, 293: 7522–7530.
63. Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science*, 295: 1073–1077.

64. Petrat F, Paluch S, Dogruöz E, Dörfler P, Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, De Groot H. (2003) Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro: Implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool. *J Biol Chem*, 278: 46403–46413.
65. Igamberdiev AU, Bykova N V, Ens W, Hill RD. (2004) Dihydrolipoamide dehydrogenase from porcine heart catalyzes NADH-dependent scavenging of nitric oxide. *FEBS Lett*, 568: 146–150.
66. Xia L, Björnstedt M, Nordman T, Eriksson LC, Olsson JM. (2001) Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase: An antioxidant regenerating pathway. *Eur J Biochem*, 268: 1486–1490.
67. Olsson JM, Xia L, Eriksson LC, Björnstedt M. (1999) Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc. *FEBS Lett*, 448: 190–192.
68. Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD. (2002) The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 357–375.
69. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24: 7779–7788.
70. Babady NE, Pang Y-P, Elpeleg O, Isaya G. (2007) Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 6158–6163.
71. Brautigam CA, Chuang JL, Tomchick DR, Machius M, Chuang DT. (2005) Crystal Structure of Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase: NAD<sup>+</sup>/NADH Binding and the Structural Basis of Disease-causing Mutations. *J Mol Biol*, 350: 543–552.
72. DLD dihydrolipoamide dehydrogenase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1738> (hozzáférés dátuma: 2019. 07. 15.)



73. Yuan L, Cho Y-J, Kim H-J. (2008) Characterization of Two Naturally Occurring Mutations Close to Cofactors in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *Bull Korean Chem Soc*, 29: 2327–2328.
74. Yuan L, Kim H-J. (2010) Characterization of a Naturally Occurring Mutation (Arg-460 to Gly) Close to FAD in Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *Bull Korean Chem Soc*, 31: 3511–3512.
75. Hong YS, Korman SH, Lee J, Ghoshal P, Wu Q, Barash V, Kang S, Oh S, Kwon M, Gutman A, Rachmel A, Patel MS. (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. *J Inherit Metab Dis*, 26: 816–818.
76. Cerna L, Wenchich L, Hansiková H, Kmoch S, Peskova K, Chrastina P, Brynda J, Zeman J. (2001) Novel mutations in a boy with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Med Sci Monit*, 7: 1319–1325.
77. Quinonez SC, Seeley AH, Seeterlin M, Stanley E, Ahmad A. (2014) Newborn screening for dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency: Citrulline as a useful analyte. *Mol Genet Metab reports*, 1: 345–349.
78. Shany E, Saada A, Landau D, Shaag A, Hershkovitz E, Elpeleg ON. (1999) Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 262: 163–166.
79. Brassier A, Ottolenghi C, Boutron A, Bertrand A-M, Valmary-Degano S, Cervoni J-P, Chrétien D, Arnoux J-B, Hubert L, Rabier D, Lacaille F, de Keyzer Y, Di Martino V, de Lonlay P. (2013) Dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency: a still overlooked cause of recurrent acute liver failure and Reye-like syndrome. *Mol Genet Metab*, 109: 28–32.
80. Carrozzo R, Torraco A, Fiermonte G, Martinelli D, Di Nottia M, Rizza T, Vozza A,

- Verrigni D, Diodato D, Parisi G, Maiorana A, Rizzo C, Pierri CL, Zucano S, Piemonte F, Bertini E, Dionisi-Vici C. (2014) Riboflavin responsive mitochondrial myopathy is a new phenotype of dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. The chaperon-like effect of vitamin B2. *Mitochondrion*, 18: 49–57.
81. Quinonez SC, Thoene JG. (1993) Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency. GeneReviews. University of Washington, Seattle.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25032271> (hozzáférés dátuma: 2015. 10. 25.)
82. Calingasan NY, Ho DJ, Wille EJ, Campagna MV, Ruan J, Dumont M, Yang L, Shi Q, Gibson GE, Beal MF. (2008) Influence of mitochondrial enzyme deficiency on adult neurogenesis in mouse models of neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 153: 986–996.
83. Hong YS, Kerr DS, Liu TC, Lusk M, Powell BR, Patel MS. (1997) 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: 160–168.
84. Sansaricq C, Pardo S, Balwani M, Grace M, Raymond K. (2006) Biochemical and molecular diagnosis of lipoamide dehydrogenase deficiency in a North American Ashkenazi Jewish family. *J Inher Metab Dis*, 29: 203–204.
85. Yuan L, Kim H-J. (2012) 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: 1445–1446.
86. Hong YS, Kerr DS, Liu T-C, Lusk M, Powell BR, Patel MS. (1997) Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del). *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1362: 160–168.
87. Shany E, Saada A, Landau D, Shaag A, Hershkovitz E, Elpeleg ON. (1999) Lipoamide Dehydrogenase Deficiency Due to a Novel Mutation in the Interface Domain.

Biochem Biophys Res Commun, 262: 163–166.

88. Odièvre M-H, Chretien D, Munnich A, Robinson BH, 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. *Hum Mutat*, 25: 323–324.
89. Cameron JM, Levandovskiy V, MacKay N, Raiman J, Renaud DL, Clarke JTR, Feigenbaum A, Elpeleg O, Robinson BH. (2006) Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *Am J Med Genet Part A*, 140A: 1542–1552.
90. Hong Y. (1996) Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet*, 5: 1925–1930.
91. Shaag A, Saada A, Berger I, Mandel H, Joseph A, Feigenbaum A, Elpeleg ON. (1999) Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet*, 82: 177–182.
92. Gibson GE, Park LC., Sheu K-FR, Blass JP, Calingasan NY. (2000) The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem Int*, 36: 97–112.
93. Wang YC, Wang ST, Li C, Chen LY, Liu WH, Chen PR, Chou MC, Liu TC. (2008) The role of amino acids T148 and R281 in human dihydrolipoamide dehydrogenase. *J Biomed Sci*, 15: 37–46.
94. Liu TC, Kim H, Arizmendi C, Kitano A, Patel MS. (1993) Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 5186–5190.
95. Ambrus A, Adam-Vizi V. (2018) Human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) deficiency: Novel insights into the structural basis and molecular pathomechanism. *Neurochem Int*, 117: 5–14.

96. Quintana E, Pineda M, Font A, Vilaseca MA, 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. *J Inherit Metab Dis*, 33: 315–319.
97. 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. *Mol Ther*, 16: 691–697.
98. Quinonez SC, Leber SM, Martin DM, Thoene JG, Bedoyan JK. (2013) Leigh syndrome in a girl with a novel DLD mutation causing E3 deficiency. *Pediatr Neurol*, 48: 67–72.
99. Feigenbaum AS, Robinson BH. (1993) The Structure of the Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase Gene (DLD) and Its Upstream Elements. *Genomics*, 17: 376–381.
100. Bhattacharya K, Khalili V, Wiley V, Carpenter K, Wilcken B. (2006) Newborn screening may fail to identify intermediate forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*, 29: 586–586.
101. Oglesbee D, Sanders KA, Lacey JM, Magera MJ, Casetta B, Strauss KA, Tortorelli S, Rinaldo P, Matern D. (2008) Second-Tier Test for Quantification of Alloisoleucine and Branched-Chain Amino Acids in Dried Blood Spots to Improve Newborn Screening for Maple Syrup Urine Disease (MSUD). *Clin Chem*, 54: 542–549.
102. Puckett RL, Lorey F, Rinaldo P, Lipson MH, Matern D, Sowa ME, Levine S, Chang R, Wang RY, Abdenur JE. (2010) Maple syrup urine disease: Further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Mol Genet Metab*, 100: 136–142.
103. Chiong MAD, Tan MA, Cordero CP, Fodra EGD, Manliguis JS, Lopez CP, Dalmacio LMM. (2016) Plasma amino acid and urine organic acid profiles of Filipino patients with maple syrup urine disease (MSUD) and correlation with their neurologic features. *Mol Genet Metab Reports*, 9: 46–53.

104. Fernández-Guerra P, Birkler RID, Merinero B, Ugarte M, Gregersen N, Rodríguez-Pombo P, Bross P, Palmfeldt J. (2014) Selected reaction monitoring as an effective method for reliable quantification of disease-associated proteins in maple syrup urine disease. *Mol Genet Genomic Med*, 2: 383–392.
105. Haviv R, Zeharia A, Belaiche C, Haimi Cohen Y, Saada A. (2014) Elevated plasma citrulline: look for dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr*, 173: 243–245.
106. Lin N, Ye J, Qiu W, Han L, Zhang H, Gu X. (2013) Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis and follow-up of maple syrup urine disease in a Chinese population. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 26: 433–439.
107. Couce Pico M, Castiñeiras Ramos D, Bóveda Fontán M, Iglesias Rodríguez A, Cocho de Juan J, Fraga Bermúdez J. (2007) Avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de jarabe de arce, experiencia en Galicia. *An Pediatría*, 67: 337–343.
108. Jeong J-S, Sim H-J, Lee Y-M, Yoon H-R, Kwon H-J, Hong S-P. (2011) Chromatographic diagnosis of maple syrup urine disease by measuring the l-alloisoleucine/l-phenylalanine ratio in dried blood spots. *J Chromatogr B*, 879: 2171–2174.
109. Starkov AA. (2013) An update on the role of mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase in oxidative stress. *Mol Cell Neurosci*, 55: 13–16.
110. Tretter L, Adam-Vizi V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 360: 2335–2345.
111. Ambrus A, Tretter L, Adam-Vizi V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *J Neurochem*, 109: 222–229.
112. 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. *Hum Mol Genet*, 20: 2984–2995.
113. Ambrus A, Nemeria NS, 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 Radic Biol Med*, 89: 642–650.
114. Klyachko NL, Shchedrina VA, Efimov A V, Kazakov S V, Gazaryan IG, Kristal BS, Brown AM. (2005) pH-dependent Substrate Preference of Pig Heart Lipoamide Dehydrogenase Varies with Oligomeric State. *J Biol Chem*, 280: 16106–16114.
115. Tsai CS, Templeton DM, Wand AJ. (1981) Multifunctionality of lipoamide dehydrogenase: Activities of chemically trapped monomeric and dimeric enzymes. *Arch Biochem Biophys*, 206: 77–86.
116. Ambrus A, Wang 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. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1862: 2098–2109.
117. Wang YC, Wang ST, Li C, Liu WH, Chen PR, Chen LY, Liu TC. (2007) The role of N286 and D320 in the reaction mechanism of human dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) center domain. *J Biomed Sci*, 14: 203–210.
118. 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. *Biochem Biophys Reports*, 2: 50–56.
119. 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. *Arch Biochem Biophys*, 538:

145–155.

120. Vaubel RA, Rustin P, Isaya G. (2011) Mutations in the Dimer Interface of Dihydrolipoamide Dehydrogenase Promote Site-specific Oxidative Damages in Yeast and Human Cells. *J Biol Chem*, 286: 40232–40245.
121. Liu TC, Korotchkina LG, Hyatt SL, Vettakkorumakankav NN, Patel MS. (1995) Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its site-directed mutants. *J Biol Chem*, 270: 15545–15550.
122. Keeler J. (2002) *Relaxation*. SpringerReference. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2002: 211-250.
123. Levitt MH. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons (Verlag), Chichester, 2008: 507-595.
124. Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. (1976) Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys*, 64: 2229–2246.
125. Sandström J. *Dynamic NMR Spectroscopy*. Academic Press, London, 1982: 1-226.
126. Bain AD. Chapter 2 Chemical Exchange, In: Webb G.A. (szerk.) *Modern Magnetic Resonance*. Springer, Dordrecht, 2008: 421-427.
127. Kleckner IR, Foster MP. (2011) An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1814: 942–968.
128. Morris GA. Diffusion-Ordered Spectroscopy, In: R. K. Harris RK, Wasylishen RE (szerk.) *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2009: 1-17.
129. Johnson CS. (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 34: 203–256.
130. Valentini M, Vaccaro A, Rehor A, Napoli A, Hubbell JA, Tirelli N. (2004) Diffusion NMR Spectroscopy for the Characterization of the Size and Interactions of Colloidal

- Matter: The Case of Vesicles and Nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 126: 2142–2147.
131. Rothwell RG, Rack FR. (2006) New techniques in sediment core analysis: an introduction. *Geol Soc London, Spec Publ*, 267: 1–29.
132. Wu W, Miller KL. (2017) Image formation in diffusion MRI: A review of recent technical developments. *J Magn Reson Imaging*, 46: 646–662.
133. Ambrus A, Yang D. (2007) Diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of DNA secondary structural elements. *Anal Biochem*, 367: 56–67.
134. Avram L, Cohen Y. (2015) Diffusion NMR of molecular cages and capsules. *Chem Soc Rev*, 44: 586–602.
135. Carrara C, Viel S, Delaurent C, Ziarelli F, Excoffier G, Caldarelli S. (2008) Chromatographic NMR in NMR solvents. *J Magn Reson*, 194: 303–306.
136. Hoffman RE, Arzuan H, Pemberton C, Aserin A, Garti N. (2008) High-resolution NMR “chromatography” using a liquids spectrometer. *J Magn Reson*, 194: 295–299.
137. Pemberton C, Hoffman R, Aserin A, Garti N. (2011) New insights into silica-based NMR “chromatography.” *J Magn Reson*, 208: 262–269.
138. Augé S, Schmit P-O, Crutchfield CA, Islam MT, Harris DJ, Durand E, Clemancey M, Quoineaud A-A, Lancelin J-M, Prigent Y, Taulelle F, Delsuc M-A. (2009) NMR Measure of Translational Diffusion and Fractal Dimension. Application to Molecular Mass Measurement. *J Phys Chem B*, 113: 1914–1918.
139. Reile I, Aspers RLEG, Feiters MC, Rutjes FPJT, Tessari M. (2017) Resolving DOSY spectra of isomers by methanol-d<sub>4</sub> solvent effects. *Magn Reson Chem*, 55: 759–762.
140. Lucas LH, Larive CK. (2004) Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts Magn Reson Part A Bridg Educ Res*, 20: 24–41.
141. Sinnaeve D. (2012) The Stejskal-Tanner equation generalized for any gradient shape-



- an overview of most pulse sequences measuring free diffusion. *Concepts Magn Reson Part A*, 40A: 39–65.
142. Hayamizu K, Price WS. (2004) A new type of sample tube for reducing convection effects in PGSE-NMR measurements of self-diffusion coefficients of liquid samples. *J Magn Reson*, 167: 328–333.
143. Tanner JE. (1970) Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. *J Chem Phys*, 52: 2523–2526.
144. Xia Y, Callaghan PT. (1991) Study of shear thinning in high polymer solution using dynamic NMR microscopy. *Macromolecules*, 24: 4777–4786.
145. Callaghan PT, Xia Y. (1991) Velocity and diffusion imaging in dynamic NMR microscopy. *J Magn Reson*, 91: 326–352.
146. Jerschow A, Müller N. (1997) Suppression of Convection Artifacts in Stimulated-Echo Diffusion Experiments. Double-Stimulated-Echo Experiments. *J Magn Reson*, 125: 372–375.
147. Gibbs SJ, Johnson CS. (1991) A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents. *J Magn Reson*, 93: 395–402.
148. Macchioni A, Ciancaleoni G, Zuccaccia C, Zuccaccia D. (2008) Determining accurate molecular sizes in solution through NMR diffusion spectroscopy. *Chem Soc Rev*, 37: 479–489.
149. Einstein A. (2005) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann Phys*, 14: 182–193.
150. Kunz D, Thurn A, Burchard W. (1983) Dynamic light scattering from spherical particles. *Colloid Polym Sci*, 261: 635–644.
151. Deng B, Lento C, Wilson DJ. (2016) Hydrogen deuterium exchange mass

- spectrometry in biopharmaceutical discovery and development – A review. *Anal Chim Acta*, 940: 8–20.
152. Tsutsui Y, Wintrode PL. (2007) Hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry: a powerful tool for probing protein structure, dynamics and interactions. *Curr Med Chem*, 14: 2344–2358.
153. Masson GR, Jenkins ML, Burke JE. (2017) An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 12: 981–994.
154. Walters BT, Mayne L, Hinshaw JR, Sosnick TR, Englander SW. (2013) Folding of a large protein at high structural resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 18898–18903.
155. Dautant A, Meyer P, Georgescauld F. (2017) Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Reveals Mechanistic Details of Activation of Nucleoside Diphosphate Kinases by Oligomerization. *Biochemistry*, 56: 2886–2896.
156. Mysling S, Betzer C, Jensen PH, Jorgensen TJD. (2013) Characterizing the Dynamics of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Using Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry. *Biochemistry*, 52: 9097–9103.
157. Anand GS, Law D, Mandell JG, Snead AN, Tsigelny I, Taylor SS, Ten Eyck LF, Komives EA. (2003) Identification of the protein kinase A regulatory R1alpha-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 13264–13269.
158. Graham BW, Tao Y, Dodge KL, Thaxton CT, Olaso D, Young NL, Marshall AG, Trakselis MA. (2016) DNA Interactions Probed by Hydrogen-Deuterium Exchange (HDX) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Confirm External Binding Sites on the Minichromosomal Maintenance (MCM) Helicase. *J Biol Chem*, 291: 12467–12480.

159. Marciano DP, Dharmarajan V, Griffin PR. (2014) HDX-MS guided drug discovery: small molecules and biopharmaceuticals. *Curr Opin Struct Biol*, 28: 105–111.
160. Mouchlis VD, Bucher D, McCammon JA, Dennis EA. (2015) Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A2, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E516-E525.
161. Hvidt A, Linderstrøm-Lang K. (1954) Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *Biochim Biophys Acta*, 14: 574–575.
162. Englander SW. (2006) Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry: A Historical Perspective. *J Am Soc Mass Spectrom*, 17: 1481–1489.
163. Chandrasekhar K, Wang J, Arjunan P, Sax M, Park Y-HY-HY-H, Nemeria NS, Kumaran S, Song J, Jordan F, Furey W. (2013) Insight to the Interaction of the Dihydrolipoamide Acetyltransferase (E2) Core with the Peripheral Components in the Escherichia coli Pyruvate Dehydrogenase Complex via Multifaceted Structural Approaches. *J Biol Chem*, 288: 15402–15417.
164. Kan Z-Y, Mayne L, Chetty PS, Englander SW, Sevugan Chetty P, Englander SW. (2011) ExMS: data analysis for HX-MS experiments. *J Am Soc Mass Spectrom*, 22: 1906–1915.
165. Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander SW. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins Struct Funct Genet*, 17: 75–86.
166. Molday RS, Englander SW, Kallen RG. (1972) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Biochemistry*, 11: 150–158.
167. Bragg WL. (1912) The specular reflection of x-rays. *Nature*, 90: 410.
168. Perutz MF. (1942) Crystal structure of oxyhæmoglobin. *Nature*, 150: 324–325.
169. Perutz MF, Weisz O. (1947) Crystal structure of human carboxyhæmoglobin [1]. *Nature*, 160: 786–787.

170. Giegé R. (2013) A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *FEBS J*, 280: 6456–6497.
171. McPherson A, Gavira JA. (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*, 70: 2–20.
172. Gavira JA. (2016) Current trends in protein crystallization. *Arch Biochem Biophys*, 602: 3–11.
173. McPherson A. (2017) Protein crystallization. *Methods Mol Biol*, 1607: 17–50.
174. Moreno A. (2017) Advanced methods of protein crystallization. *Methods Mol Biol*, 1607: 51–76.
175. Vekilov PG, Vorontsova MA. (2014) Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*, 70: 271–282.
176. Abola E, Kuhn P, Earnest T, Stevens RC. (2000) Automation of X-ray crystallography. *Nat Struct Biol*, 7: 973–977.
177. Dauter Z. (2017) Collection of X-ray diffraction data from macromolecular crystals. *Methods Mol Biol*, 1607: 165–184.
178. Jaskolski M. (2017) Structure refinement at atomic resolution. *Methods Mol Biol*, 1607: 549–563.
179. Nicholls RA, Kovalevskiy O, Murshudov GN. (2017) Low resolution refinement of atomic models against crystallographic data. *Methods Mol Biol*, 1607: 565–593.
180. Wlodawer A, Dauter Z, Porebski PJ, Minor W, Stanfield R, Jaskolski M, Pozharski E, Weichenberger CX, Rupp B. (2018) Detect, correct, retract: How to manage incorrect structural models. *FEBS J*, 285: 444–466.
181. Srivastava A, Nagai T, Srivastava A, Miyashita O, Tama F. (2018) Role of Computational Methods in Going beyond X-ray Crystallography to Explore Protein Structure and Dynamics. *Int J Mol Sci*, 19: 3401–3423.

182. Hauptman H. (1997) Phasing methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, 7: 672–680.
183. Adams PD, Baker D, Brunger AT, Das R, DiMaio F, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC. (2013) Advances, Interactions, and Future Developments in the CNS, Phenix, and Rosetta Structural Biology Software Systems. *Annu Rev Biophys*, 42: 265–287.
184. (IUCr) Crystallographic software list <https://www.iucr.org/resources/other-directories/software> (hozzáférés dátuma: 2019. 07. 19.)
185. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, Graf E, Carver T, Asel E, Springer BA, Lane P, Salemme FR. (2001) High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J Biomol Screen*, 6: 429–440.
186. Senisterra GA, Markin E, Yamazaki K, Hui R, Vedadi M, Awrey DE. (2006) Screening for ligands using a generic and high-throughput light-scattering-based assay. *J Biomol Screen*, 11: 940–948.
187. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*, 2: 2212–2221.
188. Vedadi M, Niesen FH, Allali-Hassani A, Fedorov OY, Finerty PJ, Wasney GA, Yeung R, Arrowsmith C, Ball LJ, Berglund H, Hui R, Marsden BD, Nordlund P, Sundstrom M, Weigelt J, Edwards AM. (2006) Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 15835–15840.
189. Lomenick B, Olsen RW, Huang J. (2011) Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol*, 6: 34–46.
190. Garbett NC, Chaires JB. (2012) Thermodynamic studies for drug design and

- screening. *Expert Opin Drug Discov*, 7: 299–314.
191. Müller I. (2017) Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallogr Sect D, Struct Biol*, 73: 79–92.
192. Layton CJ, Hellinga HW. (2011) Quantitation of protein-protein interactions by thermal stability shift analysis. *Protein Sci*, 20: 1439–1450.
193. Vedadi M, Arrowsmith CH, Allali-Hassani A, Senisterra G, Wasney GA. (2010) Biophysical characterization of recombinant proteins: a key to higher structural genomics success. *J Struct Biol*, 172: 107–119.
194. Magliery TJ, Lavinder JJ, Sullivan BJ. (2011) Protein stability by number: high-throughput and statistical approaches to one of protein science’s most difficult problems. *Curr Opin Chem Biol*, 15: 443–451.
195. Mateus A, Määttä TA, Savitski MM. (2016) Thermal proteome profiling: unbiased assessment of protein state through heat-induced stability changes. *Proteome Sci*, 15: 13–20.
196. Nettleship JE, Brown J, Groves MR, Geerlof A. (2008) Methods for protein characterization by mass spectrometry, thermal shift (ThermoFluor) assay, and multiangle or static light scattering. *Methods Mol Biol*, 426: 299–318.
197. Ericsson UB, Hallberg BM, DeTitta GT, Dekker N, Nordlund P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem*, 357: 289–298.
198. Mezzasalma TM, Kranz JK, Chan W, Struble GT, Schalk-Hihi C, Deckman IC, Springer BA, Todd MJ. (2007) Enhancing recombinant protein quality and yield by protein stability profiling. *J Biomol Screen*, 12: 418–428.
199. McPherson A, Cudney B. (2014) Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr Sect F, Struct Biol Commun*, 70: 1445–1467.

200. Ambrus A, Torocsik B, Adam-Vizi V. (2009) Periplasmic cold expression and one-step purification of human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Protein Expr Purif*, 63: 50–57.
201. Wu DH, Chen AD, Johnson CS. (1995) An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *J Magn Reson Ser A*, 115: 260–264.
202. Morris KF, Johnson CS. (1992) Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 114: 3139–3141.
203. Schichman SA, Amey RL. (1971) Viscosity and local liquid structure in dimethyl sulfoxide-water mixtures. *J Phys Chem*, 75: 98–102.
204. Hamuro Y, Coales SJ, Molnar KS, Tuske SJ, Morrow JA. (2008) Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22: 1041–1046.
205. Kabsch W, Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22: 2577–2637.
206. Joosten RP, Te Beek TAH, Krieger E, Hekkelman ML, Hooft RWW, Schneider R, Sander C, Vriend G. (2011) A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res*, 39: D411-D419.
207. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
208. Kabsch W, IUCr. (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J Appl Crystallogr*, 21: 67–72.
209. Kabsch W, IUCr. (2010) XDS. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 66: 125–132.

210. Bourenkov GP, Popov AN. (2006) A quantitative approach to data-collection strategies. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 62: 58–64.
211. Popov AN, Bourenkov GP. (2003) Choice of data-collection parameters based on statistic modelling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59: 1145–1153.
212. Ando N, Yamamoto Y, Oda J, Inouye Y. (1979) Effect of Complexation by Crown Ethers on Anisochrony of Diastereotopic Groups in NMR Spectra. *Bull Chem Soc Jpn*, 52: 2369–2371.
213. Orton HW, Huber T, Otting G. (2020) Paramagpy: software for fitting magnetic susceptibility tensors using paramagnetic effects measured in NMR spectra. *Magn Reson*, 1: 1–12.
214. Schmidt TGM, Koepke J, Frank R, Skerra A. (1996) Molecular interaction between the strep-lag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255: 753–766.
215. Schmidt TGM, Skerra A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng Des Sel*, 6: 109–122.
216. Pai CH, Lichstein HC. (1967) Biosynthesis of biotin in microorganisms. VI. Further evidence for desthiobiotin as a precursor in *Eschericia coli*. *J Bacteriol*, 94: 1930–1933.
217. Choi-Rhee E, Cronan JE. (2005) Biotin synthase is catalytic in vivo, but catalysis engenders destruction of the protein. *Chem Biol*, 12: 461–468.
218. Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson IA, Lesley SA, Godzik A. (2007) XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 23: 3403–3405.
219. Li CF, Du LM, Zhang HM. (2010) Study on the inclusion interaction of cucurbit[n]urils with sanguinarine by spectrofluorimetry and its analytical application.



*Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*, 75: 912–917.

220. Miskolczy Z, Megyesi M, Tárkányi G, Mizsei R, Biczók L. (2011) Inclusion complex formation of sanguinarine alkaloid with cucurbit[7]uril: Inhibition of nucleophilic attack and photooxidation. *Org Biomol Chem*, 9: 1061–1070.
221. Schneider H-J, Yatsimirsky AK. (2008) Selectivity in supramolecular host–guest complexes. *Chem Soc Rev*, 37: 263–277.
222. Schneider H-J. (2009) Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes. *Angew Chemie Int Ed*, 48: 3924–3977.
223. Biedermann F, Vendruscolo M, Scherman OA, De Simone A, Nau WM. (2013) Cucurbit[8]uril and blue-box: High-energy water release overwhelms electrostatic interactions. *J Am Chem Soc*, 135: 14879–14888.
224. Biedermann F, Uzunova VD, Scherman OA, Nau WM, De Simone A. (2012) Release of high-energy water as an essential driving force for the high-affinity binding of cucurbit[n]urils. *J Am Chem Soc*, 134: 15318–15323.
225. Huang Z, Qin K, Deng G, Wu G, Bai Y, Xu JF, Wang Z, Yu Z, Scherman OA, Zhang X. (2016) Supramolecular Chemistry of Cucurbiturils: Tuning Cooperativity with Multiple Noncovalent Interactions from Positive to Negative. *Langmuir*, 32: 12352–12360.
226. Baudet K, Guerra S, Piguet C. (2017) Chemical Potential of the Solvent: A Crucial Player for Rationalizing Host-Guest Affinities. *Chem - A Eur J*, 23: 16787–16798.
227. Biedermann F, Nau WM, Schneider H-J. (2014) The Hydrophobic Effect Revisited- Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angew Chemie Int Ed*, 53: 11158–11171.
228. Nau WM, Florea M, Assaf KI. (2011) Deep Inside Cucurbiturils: Physical Properties and Volumes of their Inner Cavity Determine the Hydrophobic Driving Force for Host-Guest Complexation. *Isr J Chem*, 51: 559–577.

229. Lee JW, Samal S, Selvapalam N, Kim H-JJ, Kim K. (2003) Cucurbituril homologues and derivatives: new opportunities in supramolecular chemistry. *Acc Chem Res*, 36: 621–630.
230. Park I-HH, Venable JD, Steckler C, Cellitti SE, Lesley SA, Spraggon G, Brock A. (2015) Estimation of Hydrogen-Exchange Protection Factors from MD Simulation Based on Amide Hydrogen Bonding Analysis. *J Chem Inf Model*, 55: 1914–1925.
231. Persson F, Halle B. (2015) How amide hydrogens exchange in native proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 112: 10383–10388.
232. Skinner JJ, Lim WK, Bédard S, Black BE, Englander SW. (2012) Protein hydrogen exchange: Testing current models. *Protein Sci*, 21: 987–995.
233. Kim H, Patel MS. (1992) Characterization of two site-specifically mutated human dihydrolipoamide dehydrogenases (His-452----Gln and Glu-457----Gln). *J Biol Chem*, 267: 5128–5132.
234. Szabo E, Mizsei R, Wilk P, Zambo Z, Torocsik B, Weiss MS, Adam-Vizi V, Ambrus A. (2018) Crystal structures of the disease-causing D444V mutant and the relevant wild type human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*, 124: 214–220.
235. 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: 3339–3354.
236. Wang R, MacGillivray BC, Macartney DH. (2009) Stabilization of the base-off forms of vitamin B12 and coenzyme B12 by encapsulation of the  $\alpha$ -axial 5,6-dimethylbenzimidazole ligand with cucurbit[7]uril. *Dalt Trans*, 3584–3589.
237. Shaikh M, Dutta Choudhury S, Mohanty J, Bhasikuttan AC, Nau WM, Pal H. (2009)

- Modulation of Excited-State Proton Transfer of 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzimidazole in a Macrocyclic Cucurbit[7]uril Host Cavity: Dual Emission Behavior and pK<sub>a</sub> Shift. *Chem - A Eur J*, 15: 12362–12370.
238. Klöck C, Dsouza RN, Nau WM. (2009) Cucurbituril-Mediated Supramolecular Acid Catalysis. *Org Lett*, 11: 2595–2598.
239. Praetorius A, Bailey DM, Schwarzlose T, Nau WM. (2008) Design of a Fluorescent Dye for Indicator Displacement from Cucurbiturils: A Macrocycle-Responsive Fluorescent Switch Operating through a p K<sub>a</sub> Shift. *Org Lett*, 10: 4089–4092.
240. Shaikh M, Mohanty J, Singh PK, Nau WM, Pal H. (2008) Complexation of acridine orange by cucurbit[7]uril and β-cyclodextrin: photophysical effects and pK<sub>a</sub> shifts. *Photochem Photobiol Sci*, 7: 408–414.
241. Mohanty J, Bhasikuttan AC, Nail WM, Pal H. (2006) Host-guest complexation of neutral red with macrocyclic host molecules: Contrasting pK<sub>a</sub> shifts and binding affinities for cucurbit[7]uril and β-cyclodextrin. *J Phys Chem B*, 110: 5132–5138.
242. Saleh N, Koner AL, Nau WM. (2008) Activation and Stabilization of Drugs by Supramolecular p K<sub>a</sub> Shifts: Drug-Delivery Applications Tailored for Cucurbiturils. *Angew Chemie Int Ed*, 47: 5398–5401.
243. Wang R, Macartney DH. (2008) Cucurbit[7]uril host–guest complexes of the histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonist ranitidine. *Org Biomol Chem*, 6: 1955–1960.
244. Hettiarachchi G, Nguyen D, Wu J, Lucas D, Ma D, Isaacs L, Briken V. (2010) Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One*, 5: e10514.
245. Uzunova VD, Cullinane C, Brix K, Nau WM, Day AI. (2010) Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study. *Org Biomol Chem*, 8: 2037–2042.
246. Oun R, Floriano RS, Isaacs L, Rowan EG, Wheate NJ. (2014) The ex vivo neurotoxic,

- myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles. *Toxicol Res*, 3: 447–455.
247. Kim K, Selvapalam N, Ko YH, Park KM, Kim D, Kim J. (2007) Functionalized cucurbiturils and their applications. *Chem Soc Rev*, 36: 267–279.
248. Park KM, Baek K, Ko YH, Shrinidhi A, Murray J, Jang WH, Kim KH, Lee J-S, Yoo J, Kim S, Kim K. (2018) Mono-allyloxyated Cucurbit[7]uril Acts as an Unconventional Amphiphile To Form Light-Responsive Vesicles. *Angew Chemie Int Ed*, 57: 3132–3136.
249. Ayhan MM, Karoui H, Hardy M, Rockenbauer A, Charles L, Rosas R, Udachin K, Tordo P, Bardelang D, Ouari O. (2015) Comprehensive Synthesis of Monohydroxy–Cucurbit[ n ]urils ( n = 5, 6, 7, 8): High Purity and High Conversions. *J Am Chem Soc*, 137: 10238–10245.
250. Gilberg L, Khan MSA, Enderesova M, Sindelar V. (2014) Cucurbiturils Substituted on the Methylene Bridge. *Org Lett*, 16: 2446–2449.
251. Benyettou F, Alhashimi M, O’Connor M, Pasricha R, Brandel J, Traboulsi H, Mazher J, Olsen J-C, Trabolsi A. (2017) Sequential Delivery of Doxorubicin and Zoledronic Acid to Breast Cancer Cells by CB[7]-Modified Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9: 40006–40016.
252. Ma D, Hettiarachchi G, Nguyen D, Zhang B, Wittenberg JB, Zavalij PY, Briken V, Isaacs L. (2012) Acyclic cucurbit[n]uril molecular containers enhance the solubility and bioactivity of poorly soluble pharmaceuticals. *Nat Chem*, 4: 503–510.
253. Steffen A, Karasz M, Thiele C, Lengauer T, Kämper A, Wenz G, Apostolakis J. (2007) Combined similarity and QSPR virtual screening for guest molecules of  $\beta$ -cyclodextrin. *New J Chem*, 31: 1941–1949.
254. Schneider H-J. (2018) Comment on “HYDROPHOBE Challenge: A Joint Experimental and Computational Study on the Host-Guest Binding of Hydrocarbons

- to Cucurbiturils.” *J Phys Chem B*, 122: 2825–2826.
255. Murray JS, Politzer P. (2017) Molecular electrostatic potentials and noncovalent interactions. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, 7: 1326–1336.
256. Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F. (2001) The glycine decarboxylase system: A fascinating complex. *Trends Plant Sci*, 6: 167–176.
257. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Japan Acad Ser B*, 84: 246–263.
258. Okamura-Ikeda K, Hosaka H, Maita N, Fujiwara K, Yoshizawa AC, Nakagawa A, Taniguchi H. (2010) Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system: Implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. *J Biol Chem*, 285: 18684–18692.
259. Nakai T, Nakagawa N, Maoka N, Masui R, Kuramitsu S, Kamiya N. (2005) Structure of P-protein of the glycine cleavage system: Implications for nonketotic hyperglycinemia. *EMBO J*, 24: 1523–1536.
260. Hasse D, Andersson E, Carlsson G, Maslobov A, Hagemann M, Bauwe H, Andersson I. (2013) Structure of the homodimeric glycine decarboxylase P-protein from *synechocystis* sp. PCC 6803 suggests a mechanism for redox regulation. *J Biol Chem*, 288: 35333–35345.
261. Faure M, Bourguignon J, Neuburger M, Macherel D, Sieker L, Ober R, Kahn R, Cohen-Addad C, Douce R. (2000) Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. 2. Crystal structures of H- and L-proteins. *Eur J Biochem*, 267: 2890–2898.
262. Patel MS, Korotchikina LG, Sidhu S. (2009) Interaction of E1 and E3 components with

the core proteins of the human pyruvate dehydrogenase complex. *J Mol Catal B Enzym*, 61: 2–6.

263. Lanterman MM, Dickinson JR, Danner DJ. (1996) Functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae* of naturally occurring amino acid substitutions in human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Hum Mol Genet*, 5: 1643–1648.
264. Grafakou O, Oexle K, van den Heuvel L, Smeets R, Trijbels F, Goebel HH, Bosshard N, Superti-Furga A, Steinmann B, Smeitink J. (2003) Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation. *Eur J Pediatr*, 162: 714–718.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### A dolgozat tárgyához kapcsolódó közlemények

Ambrus, A\*, Wang, 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 (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862: 2098–2109. \*első szerzők

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

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.

Miskolczy Zs, Megyesi M, Tárkányi G, Mizsei R, Biczók L. (2011) Inclusion complex formation of sanguinarine alkaloid with cucurbit[7]uril: inhibition of nucleophilic attack and photooxidation. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9: 1061-1070.

## További közlemények

Agg, B., Csaszar, A., Szalay-Beko, M., Veres, D. V., Mizsei, R., Ferdinandy, P., Csermely, P., and Kovacs, I. A. The EntOptLayout Cytoscape plug-in for the efficient visualization of major protein complexes in protein-protein interaction and signalling networks. *Bioinformatics* (elfogadott kézirat, 2019), *arXiv:1904.03910*, IF: 5,481

Kovács I. A., Mizsei R., P. Csermely: A unified data representation theory for network visualization, ordering and coarse-graining. *Scientific Reports* 5, Article number: 13786 (2015), DOI: 10.1038/srep13786, IF: 5,578

Pálmai M., Nagy NL., Mihály J., Varga Z., Tárkányi G., Mizsei R., Szigyártó ICs., Kiss T., Kremmer T., Bóta A.: Preparation, purification, and characterization of aminopropyl-functionalized silica sol, *Journal of Colloid and Interface Science*, 390, 34-40, (2013), DOI: 10.1016/j.jcis.2012.09.025, IF: 3,070

Tárkányi G., Németh K., Mizsei R., Tőke O., Visy J., Simonyi M., Jicsinszky L., Szemán J., Sente L.: Structure and stability of warfarin-sodium inclusion complexes formed with permethylated monoamino-beta-cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 292-298, (2013), DOI: 10.1016/j.jpba.2012.09.003, IF: 2,967

Mizsei R.: Döntések a növények életében, *Kémiai Panoráma*, 10, 34-38 (2013)

Kubinyi M., Varga O., Baranyai P., Kállay M., Mizsei R., Tárkányi G., Vidóczy T.: Metal complexes of the merocyanine form of nitrobenzospiran: Structure, optical spectra, stability, *Journal of Molecular Structure*, 1000, 77-84, (2011), DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.05.055, IF: 1,599

Németh K., Tárkányi G., Varga E., Imre T., Mizsei R., Iványi R., Visy J., Szemán J., Jicsinszky L., Sente 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, 475-481, (2011), DOI: 10.1016/j.jpba.2010.09.020, IF: 2,453

Mizsei R.: Módosított élelmiszerek, *Kémiai Panoráma*, 5, 15-17 (2011)



## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Ambrus Attilának, és konzulensemnek, dr. Tárkányi Gábornak, a doktori munkám során nyújtott támogató hozzáállását, hogy az egyes tudományos problémákra felhívták a figyelmemet és segítettek a kutatási folyamat megtervezésében. Köszönöm az MTA Természettudományi Kutatóközpont, NMR Laboratórium munkatársainak, hogy változatos szerkezeti kémiai kérdések megoldásába vontak be, és azt, hogy rendszeresen lehetőséget kaptam újszerű NMR mérések kipróbálására. Hálával tartozom kollégáimnak a Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémia Intézetben, hogy támogatták a szerkezeti biológiai iránti lelkesedésemet, bevezettek a fehérje előállítás és tisztítás lépéseibe, tanulmányútjaim biztosításával lehetőséget nyújtottak új mérés technikák elsajátításra, és alkalmat kaptam oktatási feladatok ellátására.

Az értekezés alapját képező publikációk együttműködések révén jöttek létre, így szeretném elismerni minden társszerzőm munkáját is. dr. Biczók László és munkatársai a kukurbiturilra, mint komplexképzőre hívták fel a figyelmünket és biztosították a vizsgálatokhoz szükséges anyagokat. dr. Manfred Weiss és a Macromolecular Crystallography, Helmholtz-Zentrum Berlin laboratórium munkatársai bevezettek a fehérje kristályosítás, a röntgendiffrakciós mérés és a szerkezetmegoldás lépéseibe és közel fél évig biztosították a munkámhoz szükséges tárgyi feltételeket. Külön köszönöm dr. Szabó Eszter munkáját, aki a humán dihidrolipoamid-dehidrogenáz patogén mutánsainak kristályosítási feladatait tovább vitte, a Protein Data Bank adatbázisban elhelyezett 5J5Z kódú szerkezetet véglegesítette és jelentős erőforrásokat fektetett annak a dolgozatban nem tárgyalt elemzésébe. Köszönettel tartozom Professzor Frank Jordannak a Rutgers Egyetemen és dr. Junjie Wangnak a Rockefeller Egyetemen, hogy rövid látogatásaim során bemutatták a hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometriás mérőberendezést, lehetőséget nyújtottak mérések elvégzésére és megismertettek a kiértékelés lépéseivel.

Köszönöm az anyagi támogatást az MTA fiatal kutatói ösztöndíjának, az ERASMUS ösztöndíjaknak, a Nemzeti Tehetség Programnak, valamint a Rosztoczy Alapítványnak.