

Záró beszámoló az OTKA IN-85082 pályázathoz

Három hónapot töltött Dr. Ambrus Attila (2012. május-július) a Rutgers Egyetemen (Prof. Frank Jordan laboratóriumában) a Fulbright Ösztöndíj és ezen OTKA pályázat támogatásával. Itt bekapcsolódott egy a dehidrogenáz enzimek mechanisztikus vizsgálatával foglalkozó munkacsoport munkájába. Mivel a saját munkacsoportunk az E3 alegységgel foglalkozott eddig, ezért itt különösen érdekes kísérleteket sikerült kivitelezni, hiszen a Rutgers csoport rendelkezett az E1 és E2 rekombináns alegységekkel, amelyekkel kiegészülve egyesíthettük a teljes humán piruvát és alfa-ketoglutarát dehidrogenáz enzimkomplexeket (hPDHc, hKGDHc) (utóbbit először az irodalomban; az E3 azonos a két komplexben). Ez azért fontos, mert eddig eukarióta izolált KGDHc enzimen az irodalomban a sertésszív enzimen tudtak mindössze dolgozni, amely meglehetősen szennyezett más fehérjékkel. A csoport szintén rendelkezett a fenti komplexek *E. coli* verzióival is (azok mind a 3 komponensével), ami lehetőséget nyújtott a prokarióta/eukarióta különbségek vizsgálatára is. A négy komplexre vonatkozóan vizsgáltuk a rekonstitúció körülményeit, a komponensek sztöchiometriai arányának, az E2 komponens lipoiláltsági fokának és (a humán enzimeknél) az E3 mutánsainak hatását az enzimaktivásra és a ROS-képzésre (forward és reverz irányban). Szintén vizsgáltuk az E1 és E2 alegységek lehetséges szerepét a ROS-képzésben. A tisztított, rekombináns alegységekkel több alapvetően fontos megállapítást sikerült tennünk a komplexek működésével és ROS-képzésével kapcsolatban: i., A PDHc molekuláris szinten ugyanolyan erős ROS-termelő, mint a KGDHc, ii., a két prokarióta komplex (PDHc, KGDHc) szintén termel ROS-t, iii., a négy komplex közül csak a humán KGDHc E1 alegysége és E1-E2 alkomplexe képes önmagában is számottevő mennyiségben ROS-t termelni, iv., az E3 G194C patológiás mutációja a hPDHc és a hKGDHc aktivitását is csökkenti és növeli a hKGDHc ROS-képzését a reverz reakcióban.

Az E1 alegységen történő szuperoxid/hidrogén-peroxid keletkezés különösen érdekes és váratlan jelenség. Kiegészítő munkánk során további fontos megállapításokat tettünk: i., az E1 alegységen α -ketoglutarát (α -KG) hozzáadására stabil kation-gyököt lehetett észlelni elektron spin-rezonancia spektroszkópia alkalmazásával (C2-(α -hidrox)- γ -karboxipropilidén-tiamin-difoszfát kation-gyök), ii., különösen stabil C2-(α -hidrox)- γ -karboxipropilidén-tiamin-difoszfát (a dekarboxiláció utáni első) átmeneti terméket sikerült azonosítani (E1-kötött enamin), amelyet valószínűleg az α -KG C5-karboxil csoportja stabilizál hidrogén-kötésen keresztül; a leírt mechanizmus új az irodalomban, iii., ez utóbbi enamin reagál eredményeink alapján az oxigénnel és eredményez szuperoxidot - majd spontán diszmutáció után hidrogén-peroxidot – illetve egy kation gyököt (lásd az i., pontot), iv., a szuperoxidot eredményező reakció <1%-ban végbemenő párhuzamos mellékreakció. Ez a mellékreakció korábbi eredményeinkből következően nem jelenik meg a teljes komplex szintjén fiziológias körülmények között, hiszen korábban éppen a mi munkacsoportunk mutatta meg, hogy NAD^+ jelenlétében a KGDH komplex nem termel számottevő mennyiségű ROS-t. E2 deficienciával jelentkező patológiás körülmények között azonban lehet jelentősége és akár terápiás értéke is megfigyelésünknek; számos irodalmi eredmény mutat afelé, hogy emelkedett ROS szint ill. oxidatív stressz jelentkezik E2-deficiencia eredményeképpen. E2 sztöchiometrikus jelenlétében az E1 aktív centruma - az eredmények alapján - nem elérhető az oxigén számára (csak a természetes szubsztrátok/átmeneti termékek mozognak a komplexen belül létrejövő szubsztrát-csatornákon keresztül, ahogy ez várható is).

Az E1 ROS-képzésére vonatkozó eredményeket a *Journal of Biological Chemistry* újságban közzeltük, míg a teljes komplexekről szóló eredményeket előkészítés után a *FASEB Journal*-ban próbáljuk majd meg hamarosan publikálni.

A két munkacsoport együttműködése a továbbiakban is folytatódik, számos közös projekt jelenleg is folyik illetve folyamatosan új közös elképzelések is körvonalazódnak látszanak.