

Ph. D . ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Varga Balázs

okleveles vegyész és angol szakfordító

**DUTPÁZOK SZERKEZET-FUNKCIÓ VIZSGÁLATA A
KATALÍTIKUS MECHANIZMUS LEÍRÁSÁRA ÉS
INHIBITOROK TESZTELÉSÉRE**

*A Homo sapiens és a Mycobacterium tuberculosis dUTPázok
jellemzése*

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

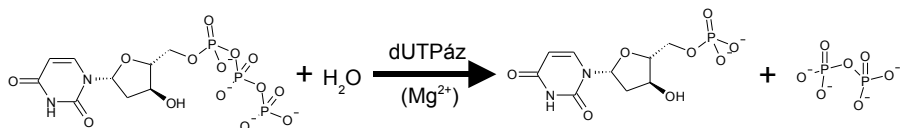
A biológiai tudományok doktora, Tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ,
Enzimológiai Intézet

2008.

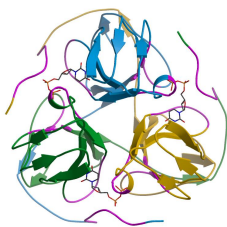
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A 2'-dezoxiuridin 5'-trifoszfát nukleotidohidrolázok (EC 3.6.1.23) a dUTP hidrolízisét katalizálják:

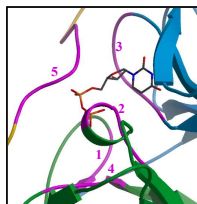


A dUTPázok három azonos aktív helyvel rendelkező homotrimerik. A monomerekben öt, szigorúan konzervált motívum található, ezekből épülnek fel az egyes aktív helyek (1. ábra).

A



B



1. ábra Az FIV dUTPáz:dUDP komplex szerkezete (PDB ID: 1F7R). **A.** A homotrimer szerkezete. **B.** Aktív hely közelkép. Az 1, 2 és 4 motívumot az egyik monomer adja, a 3 motívumot a második, az 5 motívumot pedig a harmadik.

A dUTPáz katalitikus reakciója egyrészt alacsonyan tartja a dUTP/dUMP arányt, másrészt terméke, a dUMP, a dTTP *de novo* bioszintézisének az alapja. Az enzimműködés hiánya timinmentes sejthalálhoz vezet.

A *de novo* timidilát bioszintézis enzimei gyakori célpontjai a rák- és antivirális terápiáknak. Ezen gyógyszerek a sejtbeli dUTP/dTTP arány megzavarásával timinmentes sejthalált eredményeznek. Ez az aktív DNS szintézissel rendelkező sejteket nagyobb mértékben sújítja. Ezen okok miatt a dUTPáz ígéretes célpont lehet a gyógyászatban, a már használatos, timidilát szintáz és dihidrofolát reduktáz enzimeket támadó szerekkel kombinálva.

A timinmentes sejthalál kiváltásának terápiás lehetőségét azonban a *Mycobacterium tuberculosis* esetében is ki lehetne aknázni.

Fontosságuk ellenére sem a humán, sem pedig a *M. tub.* dUTPáz enzimatiságai nem voltak ismeretesek ezen tanulmány előtt. Célunk így egyrészt a humán dUTPáz kvantitatív kinetikai modelljének felállítása volt a szerkezet-funkció kapcsolat megismerésén keresztül, másrészt pedig, a *M. tub.* dUTPáz esetében, a fajspecifikus szerkezeti elemek

azonosítása, valamint egy nagy átteresztőképességű, folytonos aktivitás mérő rendszer kidolgozása az esetleges gátlómolekula-jelöltek tesztelésére.

2. MÓDSZEREK

E. coli BL21(DE3) sejtvonalba nagy hatékonyságú fehérje termelő rendszert hoztunk létre az összes dUTPáz enzim konstrukt termeltetésére.

A humán dUTPáz hőstabilitásának vizsgálatára a fehérjék hő hatására történő kitekeredésének követésére alkalmas differenciális pásztázó kalorimetriát alkalmaztuk.

Limitált tripszinolízis az oldatbeli fehérje flexibilis részeiről ad felvilágosítást, így ezt a módszert alkalmaztuk a humán dUTPázon, és nukleotidokkal alkotott komplexein, hogy megállapítsuk az esetleges szubsztrát/termék okozta konformáció változásokat.

Egyensúlyi ligandum kötődési vizsgálatokat végeztünk izotermális titrálási kalorimetriával és fluorimetriával a kötődési hőváltozást, ill. a Trp mutáns dUTPáz enzimek fluoreszcencia jelét követve.

A kinetikai mérések esetében a különböző rendszerek abszorbancia változását követtük spektrofotométerrel, ill. fluoreszcencia jelet detektáltuk megállított áramlásos készülékkel.

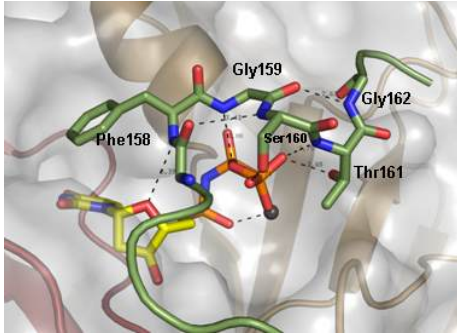
3. EREDMÉNYEK

3.1 A humán dUTPáz szerkezeti elemzése

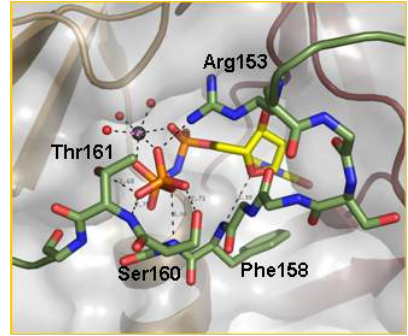
Laboratóriumunkban sikerült megoldani a humán dUTPáz: α,β -imido-dUTP:Mg²⁺ komplex 2.2 Å felbontású kristályszerkezetét. A korábbi humán dUTPáz szerkezetekkel ellentétben sikerült a flexibilis, és éppen ezért a legtöbb dUTPáz kristályszerkezetében láthatatlan C-terminális kart lokalizálni két monomerben. Ez a szerkezet emellett tartalmazza az izosztérikus szubsztrát analógot a katalízisnek megfelelő *gauche* konformációban, ill. a Mg²⁺ kofaktort is. Az elemzéssel a következőket sikerült megállapítani: A C-terminális kar és a dUMP molekularészlet között csak a Phe158 és uracil gyűrű közötti átlapoló kölcsönhatás, ill. a Phe158 amid N atomja és a dezoxiribóz gyűrű O atomja közötti H-kötés látható. (2.A ábra). A Gly159–Thr161 aminosavak főláncatomjai H-kötést alakítanak ki a β - and γ -foszfátokkal. Az Arg153 hozzájárul a γ -foszfát negatív töltésének semlegesítéséhez. Először sikerült a Ser160 és Thr161 aminosavak korábban csak feltételezett, fontos szerepét láthatóvá tenni. Hidroxil-csoportjaik H-

kötést alakítanak ki a γ -foszfát Mg^{2+} ionnal nem komplexálódó két O atomjával (2.B ábra).

A



B



2. ábra A humán dUTPáz: α,β -imido-dUTP: Mg^{2+} komplex térszerkezete. **A.** A C-terminális kar kölcsönhatásai a ligandum molekulával. **B.** Közelkép az Arg153 által kialakított kölcsönhatásokról.

A C-terminális kart is tartalmazó két aktív helyen láthatóvá vált a kvázi-katakítikus konformáció, mivel a nukleofil támadó vízmolekula O atomja az α -P atomtól a H-kötés (3.32 Å) távolságán belül található (2.77, ill. 2.79 Å)

3.2 Hőstabilitás

A humán dUTPáz differenciális pásztázó kalorimetriával meghatározott olvadási hőmérséklete 61.7°C-nek adódott, mely érték az *E. coli* dUTPázénál (74.7°C) jelentősen alacsonyabb.

3.3 Oldatbeli flexibilitás

A humán dUTPázon, és a szubsztrát analógiával ill. termékével alkotott komplexein végzett tripszinnel való limitált emésztéses kísérletek két fő triptikus hasítóhelyet mutattak a Arg15 és Arg153 aminosavaknál, jelezve az N- és C-terminális régiók nagyobb mértékű flexibilitását. A C-terminálison levő hasítóhelyet mind a szubsztrát analóg, mind pedig a termék részlegesen árnyékolja, ami az ezen régióknak a nukleotidok bekötődésének hatására bekövetkező konformációs rendeződésére utal.

3.4 Izotermális kalorimetriával végzett kötődési vizsgálatok

Izotermális titrálási kalorimetriával felvettük a humán dUTPáz: α,β -imido-dUTP kötődési izotermáját, melyből – a szoftver által megadott egyszerű kötődési modell illesztésével – a $K_d = 7.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ érték adódott.

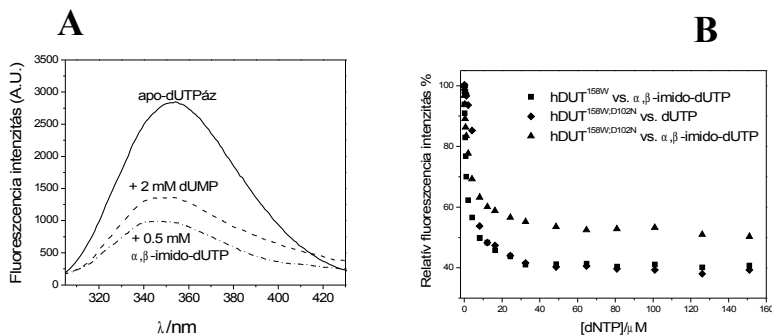
3.5 A két Trp mutáns humán dUTPáz előállítás

Az aktív helyen bekövetkező konformációs változások követésére egy érzékeny Trp szenzort építettünk be a szigorúan megőrződött 5-ös motívum

Phe158 aminosavának helyére, és az így létrehozott mutáns enzim Trp fluoreszcenciáját követve kötődési vizsgálatokat végeztünk. A valódi szubsztráttal való egyensúlyi kötődés vizsgálatára ezen Trp mutáns enzimben a Asp102 aminosavat Asn aminosavra cseréltük, és így egy Trp érzékelővel rendelkező, inaktív mutáns enzimet kaptunk.

3.6 Fluoreszcens egyensúlyi kötődés vizsgálatok

A K_d értékek az α,β -imido-dUTP esetében $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ -nak, a dUMP esetében pedig $26.3 \pm 2.8 \mu\text{M}$ -nak adódtak (3.A ábra).

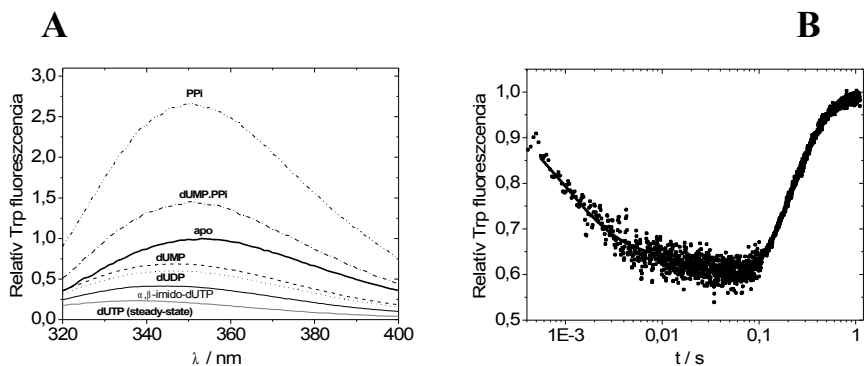


3. ábra Fluoreszcenciával követett egyensúlyi kötődés vizsgálatok. **A.** Az apo-dUTPáz (folytonos vonal), dUTPáz: α,β -imido-dUTP komplex (szaggatott vonal) és dUTPáz:dUMP komplex (pontozott vonal) fluoreszcens spektrumai. **B.** A telítési görbék mutatják a két nukleotid különböző kötődését. hDUT^{158W} vs α,β -imido-dUTP (négyzet), hDUT^{158W,102N} vs dUTP (rombusz) és hDUT^{158W,102N} vs α,β -imido-dUTP (háromszög) telítési görbék.

Az inaktív enzim szubsztráttal és annak analógjával mutatott telítési profilja a két nukleotid eltérő kötődését mutatja (3.B ábra).

3.7 Tranziens kinetika

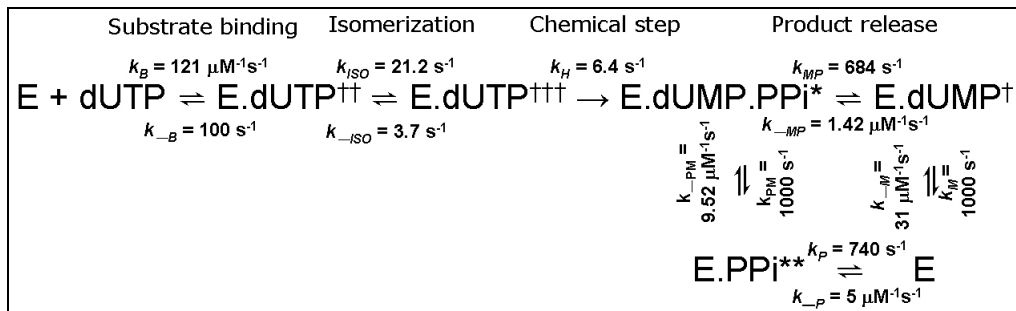
Az egyensúly kötődési vizsgálatok (v.ö. az előző fejezettel és a 4.A ábrával) alapján a komplex reakciógörbét értelmezni tudtuk.



4. ábra A beépített Trp érzékelő jele. **A.** A hDUT^{158W} fluoreszcens spektrumai telítési ligandum koncentrációk mellett. Az adatok az apo-enzim jelére vannak normalizálva. [hDUT^{158W}] = 4 μM, [dUMP] = 500 μM, [dUDP] = 300 μM, [α,β-imido-dUTP] = 100 μM, [dUTP] = 2mM, [PPI] = 5mM. A dUTP telített állapotot nagy feleslegű dUTP hozzáadásával rögzítettük, a dUTP hozzáadása után 30 másodperccel. **B.** 7.5 μM hDUT^{158W} + 5.25 μM dUTP reakciógörbéje. A folytonos vonal az adatokra illesztett kinetikai modell.

A dUTP hidrolízisének ciklusa legalább négy elkülönülő enzimátikus lépésből áll (5. ábra): (i) gyors szubsztrát kötődés, (ii) az enzim-szubsztrát komplex izomerizációja a katalitikus konformációba, (iii) hidrolízis (kémiai)

lépés, és (iv) a termékek gyors, nem rendezett távozása. Független kvincselte áramlásos kísérletek azt mutatják, hogy a hidrolízis lépés az enzimatikus ciklus sebesség meghatározó lépése.



5. ábra A dUTPáz enzimatikus ciklusa.

3.8 A *M. tub.* dUTPáz szerkezeti elemzése

Laboratóriumunkban sikerült megoldani a *M. tub.* dUTPáz: α - β -imido-dUTP:Mg²⁺ komplex 1.5 Å felbontású kristályszerkezetét. Sikerült azonosítani az esetlegesen terápiás céllal támadható, fajra jellemző szerkezeti elemeket, valamint lokalizálni a más dUTPázokban szigorúan konzervált Phe aminosavat helyettesítő His aminosavat. Ez a His145 aminosav, a humánban megfigyelt Phe aminosavhoz hasonlóan, átlapol a szubsztrát analóg uracil gyűrűjével. Az egyik fajspecifikus szerkezeti elem, a C-terminális tetrapeptid, valószínűleg az 5 motívum aktív helyre való rendeződését (rázáródását) segíti

elő. A *M. tub.* specifikus, öt aminosavnyi hurok (Glu132-Gly137) megváltoztatja a lokális peptidlánc konformációt, aminosavai azonban sem az aktív hellyel, sem pedig a fehérje felszínnel nem mutatnak kölcsönhatást.

3.9 *A M. tub. dUTPáz Trp szenzor*

A szerkezeti elemzés alapján a His145 aminosav helyére egy Trp aminosavat építettünk be, ami a humán enzimnél tapasztalhatóhoz hasonlóan érzékeny szenzort eredményezett. A *M. tub.* dUTPáz az α - β -imido-dUTP szubsztrát analógot $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ erősséggel köti. Ez az érték jóval alacsonyabb, mint a humán enzimre mért érték ($K_d = 1.6 \mu\text{M}$), ami jelzi, hogy a *M. tub.* dUTPáz a humán enzimnél jóval erősebben köti a szubsztrátját.

3.10 **Csatolt enzimreakciók a pirofoszfát képződésének követésére**

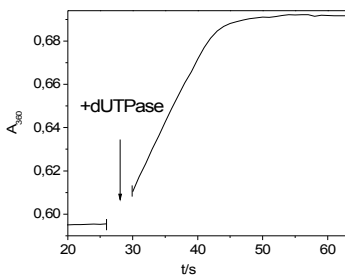
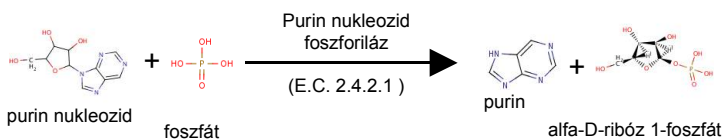
A kereskedelmi forgalomban kapható, azonban csak végpont meghatározásra használható pirofoszfát csatolt rendszert (EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit) optimalizáltuk irodalmi leírás alapján (6.A ábra). Így sikerült egy igen hatékony, a katalitikus reakciót folytonos módon követő, a korábbi, konvencionális dUTPáz aktivitás követő módszernél nyolcszor

érzékenyebb kísérleti alkalmazást összeállítanunk, melynek áteresztőképessége lehetőséget ad nagyszámú gátlószer jelölt molekula tesztelésére is (6.B ábra).

A



B



6. ábra A csatolt enzim rendszer a pirofoszfát detektálására. **A.** A csatolt enzim reakciók. A pirofoszfátot a szervetlen difoszfátáz két foszfáttá hasítja, melyeket a purin nukleozid foszfátáz használ fel a második reakcióban egy purin nukleozid foszforilálására. A reakció termékei ribóz-foszfát és a purin származék, melynek képződését a 360 nm-es hullámhosszon való fényelnyelésével követjük. **B.** A dUTPáz-pirofoszfát csatolt enzimreakció egy tipikus lefutási görbéje.

4. ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEK

A mind a humán mind a *M. tub.* dUTPáz esetében újonnan megismert szerkezeti részletek fontos információt adnak a katalízis szempontjából kiemelkedő fontosságú C-terminális kar kölcsönhatásairól (alátámasztva oldatfázisú mérésekkel), melyek alapot teremtenek fajspecifikus gátlómolekulák tervezésére.

Az enzimek aktív helyére beépített Trp érzékelő, kivételes érzékenységének köszönhetően, megbízható információt ad az aktív hely konformációs változásairól, mely lehetőséget ad az aktív helyre kötődő (gátló)molekulák mérésére, ill. a lehetséges aktív helyre kötő gátlómolekulák kötődési állandóinak meghatározására (kvantitatív analízis).

Az optimalizált, folytonos aktivitás követő rendszer nagy áteresztőképességű módszer, mely lehetőséget teremt akár nagyszámú molekula tesztelésére is. A módszer előnye a Trp érzékelővel szemben az, hogy míg a fluoreszcencia jel igen komplex, ebben a rendszerben egyszerűen kvantifikálható, lineáris jelet kapunk.

5. KÖZLEMÉNYEK

5.1 Hozzájárulásom a közleményekhez

Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase; FEBS Letters **581**, 4783-4788 (2007):

Mutáns fehérjék létrehozása, oldatfázisú mérések (DSC, ITC, fluorimetria, tripszinolízis, aktivitás mérés), adatok feldolgozása, értékelés, részben a szerkezeti elemzés és a kézirat megírása.

Kinetic mechanism of human dDUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme; J Biol Chem. **282**, 33572-82 (2007):

Kötődési vizsgálatok, megállított áramlásos mérések egy része.

Experimental study on dUTPase-inhibitor candidate and dUTPase/disaccharide mixtures by PCS and ENS; Journal of Molecular Structure, in press:

Az idevonatkozó rész (fehérje termeltetés és tisztítás optimalizálása, a kézirat vonatkozó részének megírása).

Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor; BBRC accepted:

Oldatfázisú mérések (fluorimetria), aktivitásmérő rendszerek optimalizálása, tesztelése, a kézirat megírásának egy része.

5.2 A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

- 1.) **Varga Balázs**, Barabás Orsolya, Kovári Júlia, Tóth Judit, Hunyadi-Gulyás Éva, Klement Éva, Medzihradzky F. Katalin, Tölgyesi Ferenc, Fidy Judit, Vértessy G. Beáta: *Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase*; FEBS Letters **581**, 4783-4788 (2007).
- 2.) Tóth Judit, **Varga Balázs**, Kovács Mihály, Málnási-Csizmadia András, Vértessy G. Beáta: *Kinetic mechanism of human dDUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme*; J Biol Chem. **282**, 33572-82 (2007).
- 3.) **Varga Balázs**, Federica Migliardo, Takács Enikő, Vértessy G. Beáta, Salvatore Magazù: *Experimental study on dUTPase-inhibitor candidate and dUTPase/disaccharide mixtures by PCS and ENS*; Journal of Molecular Structure, in press.
- 4.) **Varga Balázs**, Barabás Orsolya, Takács Enikő, Nagy Nikolett, Nagy Péter, Vértessy G. Beáta: *Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor*; BBRC, in press.

5.3 A doktori értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások

- 1.) **Varga B.**, Barabás, O., Tóth, J., Vértessy, B. G.: Structure-function studies on homotrimeric human dUTPase, SPINE2-Complexes 1st annual conference; Prága, Csehország. (2007)

- 2.) **Varga, B.**, Due, A., Kuper, J., Wilmanns, M., Vértessy, B. G.: *Inhibitor jelöltek in vitro tesztje két Mycobacterium tuberculosis fehérjére*, A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes. (2007) (magyar nyelven)

- 3.) **Varga, B.**, Due, A., Kuper, J., Wilmanns, M., Vértessy, B. G.: *In vitro* screening of *in silico* identified candidates against two target proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, Alexander von Humboldt workshop; Mátraháza. (2007)

- 4.) **Varga, B.**, Kovári, J., Barabás, O., Málnási-Csizmadia, A., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzsky, K. F., Tölgyesi, F., Fidy, J., Vértessy, B. G.: *Structural and kinetic investigations of cooperativity in human dUTPase*, Straub- napok, az MTA SzBK éves konferenciája; Szeged. (2005)

- 5.) **Varga, B.**, Due, A., Kuper, J., Wilmanns, M., Vértessy, B. G.: *In vitro* screening of *in silico* identified candidates against two target proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, EMBO

Workshop on Integrated Approaches in Structural Enzymology, EMBL Hamburg, Németország. (2007) (poszterelőadás)

6.) **Varga, B.**, Barabás, O., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky, K. F., Tölgyesi, F., Fidy, J., Vértessy, B. G.: Negative cooperativity in human dUTPase homotrimer, EMBO/HHMI CEM2006; Dubrovnik, Croatia. (2006) (poszterelőadás)

7.) **Varga, B.**, Kovári, J., Barabás, O., Takács, E., Málnási-Csizmadia, A., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky, K. F., Tölgyesi, F., Fidy, J., Vértessy, B. G.: Cooperativity in human dUTPase homotrimer, FEBS JOURNAL 273, 192-192 (2006). (poszterelőadás)

5.4 **A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények**

1.) Kovári Júlia, Barabás Orsolya, **Varga Balázs**, Békési Angéla, Tölgyesi Ferenc, Fidy Judit, Nagy József, Vértessy G. Beáta: *Methylene substitution at the α - β bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site*; Proteins **71**, 308-19 (2008).