



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR

Nukleokapszid-dUTPáz, egy retrovirális fehérje szerkezete és funkciója

Tézisfüzet

Németh Veronika

Okleveles biomérnök

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

A biológiai tudományok doktora, Tudományos tanácsadó

Készült:

a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében



2009.

1. Bevezetés

A dezoxi-uridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz (dUTPáz) enzim az uracil DNS-be történő beépülését szabályozza és így egyedi módon preventív DNS-javító szerepet játszik. A dUTPáz által katalizált reakció a dUTP hidrolízise dUMP-vé és pirofoszfáttá. A homotrimer dUTPázok térszerkezete három azonos aktív centrummal rendelkező alegységből épül fel. Az alegységek öt, konzervált szekvencia motívumot tartalmaznak, amelyek az aktív centrumok kialakításában vesznek részt.

A dUTPáz a dUTP hidrolízise által alacsony szinten tartja a sejtbeli dUTP/dTTP arányt, illetve biztosítja a dTTP *de novo* bioszintézis előanyagát, a dUMP-t. Az enzim működésének hiánya timinmentes sejthalált eredményez. Az enzim jelenléte pro- és eukariótákban esszenciális, de herpeszvírusok és retrovírusok is egyaránt kódolják

A retrovírusok családjában többek között a béta-retrovírusok tartalmazzák genomjukban az enzimatikusan aktív dUTPázt. A béta-retrovirális dUTPázok érdekessége, hogy ezek az enzimek tulajdonképpen bifunkciós fúziós fehérjék, mivel a fehérje két egységet, a dUTPáz és a nukleokapszid (NC) domént tartalmaz. Felvetődik a kérdés, hogy ezeknek a retrovírusoknak miért van szükségük saját dUTPázra, miért nem a gazdasejt által kódolt dUTPázt használják fel, illetve miért alakul ki a kovalens kapcsolat a dUTPáz és az NC között ellentétben más retrovírusokkal.

2. Irodalmi háttér

A sejtbeli DNS integritását szünet nélkül számos endogén és exogén ágens veszélyezteti. Az uracil bázisok beépülése a DNS láncba a genetikai állomány mutációjához vezethetnek. A sejtek számos mechanizmussal rendelkeznek, amelyek megőrzik a genom alacsony uracil tartalmát. A vírusok, amelyek a genomjukat különböző gazdasejtekben szaporítják tovább, a sejtekhez hasonlóan kifejlesztettek olyan stratégiá(ka)t, amely megelőzi illetve kijavítja az uracil hibát a virális DNS-ben. A herpes-, pox- és retrovírusok családjainak genomja saját dUTPáz és/vagy UNG fehérjék kódját tartalmazza amely arra utal, hogy ezek a vírusok különösen érzékenyek az uracil hibára az örökítő anyagukban. A retrovírusok családjában a béta-retrovírusok és a nem főemlős lentivírusok genomjában megtalálható az enzimatikusan aktív dUTPáz kódja. Ezek az exogén vírusok T- illetve B-sejtekben és makrofágokban szaporodnak, ezáltal számos - többek között immunhiányos - betegségnek kórokozói¹. A béta-retrovírusok csoportjába tartozó exogén vírusok között az MMTV, M-PMV, JSRV és SRVs összefüggésbe hozhatóak különböző rákos illetve immunhiányos megbetegedésekkel.

Miért tartalmazza ezen vírusok genomja a dUTPázt? A kérdés feltevése azért jogos, mivel ez az enzim a legtöbb pro- és eukarióta DNS-ben megtalálható. Válasz lehet az, hogy ezeknek a vírusoknak a gazdasejtjei alapvetően nem szaporodó sejtek, ugyanakkor a dUTPáz szaporodó sejtekben termelődik nagy mennyiségben. A retrovírusok lentivírus csoportjának jellegzetes tulajdonsága a nem-szaporodó sejtekben történő replikáció. Az onkogén retrovírusokkal ellentétben, amelyek a gazdasejt proliferációját igénylik, a lentivírusok képesek megfertőzni a sejtciklusban megrekedt sejteket². A lentivírusok nemzetségéhez tartozó, nem főemlős fajokat fertőző vírusokkal, mint a ló (EIAV), kecske (CAEV) és macska (FIV) lentivírusokkal elvégzett kísérletek részletesen vizsgálták a dUTPáz szerepét ezen vírusok szaporodásában és patogenezisében.

1 Payne, S.L. and J.H. Elder, *The role of retroviral dUTPases in replication and virulence*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 381-8.

2 Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman, *Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 3053-8.

Turelli és csoportja a CAEV vírus genomjában lévő dUTPáz gén módosítása (nukleotid beépítése illetve kivágása) során olyan mutánsokat hoztak létre, amelyeknek a replikációja nem szaporodó sejtekben korlátozott³. Hasonló körülmények között (inaktív dUTPáz) a FIV vírus szaporodása is visszaszorul⁴. Ezzel szemben a dUTPáz hiányos CAEV vírus replikációja szaporodó sejtek fertőzése esetén csak kis mértékben csökken le. Ez utalhat arra, hogy az aktívan szaporodó sejtek magas dUTPáz tartalma helyettesítheti a virális dUTPázt a replikáció illetve a vírus életciklusa során⁵. Inaktív dUTPázt kódoló EIAV vírussal elvégzett kísérletek is hasonló eredményt hoztak⁶. Hasonló kísérletek béta-retrovírusokkal még nem történtek, de mivel ezen vírusok gazdasejtjei szintén nem szaporodó sejtek, ezért feltételezhető, hogy a dUTPáz hiánya hasonlóan gátolja a vírus szaporodását.

Dolgozatomban egy béta-retrovirális, a Mason-Pfizer majom vírus dUTPáz jellemzését tűztem ki célul. Az irodalomban már számos publikáció megjelent különböző fajokból (humán, *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*) származó dUTPázok jellemzéséről, míg a retrovirális dUTPázok kevésbé ismertek. A választásom a retrovírusokon belül a béta-retrovírusok csoportjára esett, mivel az általuk kódolt dUTPázok érdekessége, hogy a fehérje két doménből áll össze. Egy nukleokapszid (NC) és egy dUTPáz fehérje kapcsolódik össze kovalens módon és alkot egy bifunkciós fehérjét. Első lépésként olyan kísérleteket tűztem ki célul, amelyekkel a dUTPáz domén katalitikus aktivitását és ligandum kötő képességét vizsgálhatom az NC domén jelenlétében. A retrovirális dUTPáz szerkezetének pontosabb megismerésére, a fehérje kristályosítását és krisztallográfiai szerkezetének megoldását terveztem. Mivel az NC-dUTPáz szerepe a virális életciklusban nem ismert, ezért célom volt, hogy megvizsgáljam milyen, más virális fehérjékkel léphet kölcsönhatásba ez a fúziós fehérje.

3 Turelli, P., F. Guiguen, J.F. Mornex, R. Vigne, and G. Querat, *dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-a substitutions*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4522-30.

4 Lerner, D.L., P.C. Wagaman, T.R. Phillips, O. Prospero-Garcia, S.J. Henriksen, H.S. Fox, F.E. Bloom, and J.H. Elder, *Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7480-4.

5 Turelli, P., F. Guiguen, J.F. Mornex, R. Vigne, and G. Querat, *dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-a substitutions*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4522-30.

6 Threadgill, D.S., W.K. Steagall, M.T. Flaherty, F.J. Fuller, S.T. Perry, K.E. Rushlow, S.F. Le Grice, and S.L. Payne, *Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant*. J Virol, 1993. **67**(5): p. 2592-600.

3. Módszerek

A vad és mutáns típusú enzimeket *E. coli* BL21(DE3) sejtvonalonban termeltettem.

A fehérje felxibilis régióinak felderítésére a VL3H (DISPROT) - fehérje rendezetlenséget jöslő - programot és a limitált proteolízis módszert használtam.

A fehérje térszerkezetének meghatározásához a fehérjét kristályosítottuk, majd röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat alkalmazásával megoldottuk az apoenzim, egy mutáns enzim és az enzim-szubsztrát komplex szerkezetét.

Dinamikus fehérje modellezés módszerét használtuk fel, hogy meghatározzuk az NC-dUTPáz C-terminális karjának elhelyezkedését, alapul véve a humán dUTPáz szerkezetét.

Kisszögű röntgenszórás (Small-angle X-ray scattering – SAXS) alkalmazásával megmértem, hogy a dUTPáz domén oldatban, oligonukleoid hozzáadás hatására, milyen szerkezeti változásokon megy át.

Az NC-dUTPáz virális fehérje partnereinek felderítésére a far Western dotblot és a felszíni plazmon rezonancia módszereket használtam.

4. Eredmények

4.1. A dUTPáz enzim, az NC fehérjével alkotott, fúziós fehérje formában van jelen az M-PMV vírusban [1].

Az M-PMV vírusrészecskék fehérjetartalmának Western blot analízisével kimutattuk, hogy a dUTPáz csak az NC-dUTPáz fúziós fehérje formájában van jelen a vírusban. *In vitro* kísérlet igazolja azt, hogy a retrovirális proteáz nem képes elhasítani a dUTPáz és az NC domének közötti kötést.

4.2. Az NC-dUTPáz katalitikus aktivitása jelentősen kisebb más dUTPázokhoz képest [1].

Az NC-dUTPáz enzimikus aktivitása egy nagyságrenddel alacsonyabb *E. coli*, *D. mel.* vagy humán dUTPázokhoz képest. Az aktivitás mértékét az NC domén jelenléte nem befolyásolja, jelzik ezt az NC domén nélküli dUTPázzal elvégzett aktivitásmérési kísérleteim. Oligonukleotid jelenlétében az aktivitás kis mértékben növekszik.

4.3. Az NC-dUTPáz szerkezete, más dUTPázokhoz hasonlóan homotrimer [1].

Dinamikus fényszórással és analitikai gélszűrőssel megvizsgáltuk az NC-dUTPáz oligomerizációját. Az NC domén jelenléte a dUTPázokra jellemző homotrimer térszerkezet kialakulását nem befolyásolja.

4.4. A ligandum elhelyezkedése az aktív centrumban hasonló a humán dUTPázhoz [4].

Az M-PMV dUTPáz egyes alegységei ugyanazt a „lekvárostekercs” szerkezetet mutatják, amely a dUTPáz monomerek negyedleges szerkezetére jellemző. A szubsztrátanalóg más dUTPázokhoz nagyon hasonló módon helyezkedik el az aktív centrumban. Az uracil és a dezoxiribóz gyűrű az A alegység III. motívumbeli β -hairpin-nel alakítanak ki kölcsönhatást. A II. és IV. motívum oldalláncai a B alegységből a szubsztrát foszfátláncával hatnak kölcsön. B alegység I. motívuma egy aszpartát oldallánccal, amely a katalitikus Mg^{2+} kofaktort koordinálja, járul hozzá a ligandum kötéséhez. A C terminális kar V. motívuma az elektronsűrűségi térképen nem lokalizálható. Ez nagyfokú mozgékonyágának köszönhető. Az V. motívumot a C alegység szolgáltatja.

4.5. Az aktív centrum felépítése eltér a humán dUTPázhoz képest [4].

Az aktív centrum felépítése és az alegységek egymással való kölcsönhatása néhány érdekes eltérést mutat a korábban meghatározott dUTPáz és dUTPáz-ligandum szerkezetekhez képest. Jelentős különbség elsősorban az N- és a C-terminális régióban mutatkozik. Az M-PMV dUTPáz esetében az N-terminális béta-szál hiányzik, mivel az N-terminális elhagyja a fehérje magot hogy a nukleokapszid doménhez csatlakozzon. Így az N-terminális béta-redő hiányában a legfontosabb kapcsolat két monomer között elveszik. Ezenkívül, annak ellenére, hogy a teljes C-terminális kar flexibilitásának köszönhetően nem lokalizálható, az elektronsűrűségi térkép mégis jelzi, hogy a kar kezdeti szakasza a humán enzimtől teljesen eltérő konformációval rendelkezik.

4.6. A C-terminális kar esszenciális a retrovirális dUTPáz működéséhez [4].

Olyan mutáns enzimkonstrukciókat (Gln220STOP, Arg223Lys) hoztam létre, amelyekben a C-terminális kar hiányzik illetve pontmutációt tartalmaz. Ezen mutánsok kinetikai állandója $>10^5$ -szeres csökkenést mutat. Ez bizonyítja, hogy az NC-dUTPáz működéséhez szükséges a kar jelenléte.

4.7. A C-terminális kar a saját alegység aktív centruma felett lapol át [4].

A C-terminális kar helyzetét illetően felmerült kérdések tisztázására homológia modellezést alkalmaztunk. Olyan kiindulási modellt építettünk fel, ahol a megkötés az volt, hogy az Arg223 és Phe228 aminosavak a ligandum, dUTP megfelelő csoportjaival hozzanak létre kölcsönhatást függetlenül attól, hogy a ligandum melyik alegység aktív centrumában helyezkedik el. Molekuláris dinamikai szimulációkkal teszteltük ezeknek a kölcsönhatásoknak a stabilitását és a kar mozgékonyágát abban a modellben, ahol a C-terminális kar a saját alegység aktív centrumában kötött szubsztrát fölé hajlik vissza. Az egyensúlyba hozás után a fehérje nagyon stabil maradt.

4.8. A NC domén megtartja Zn^{2+} ion kötő képességét [4].

Az NC doménnel nem rendelkező *E. coli* dUTPáz viselkedését hasonlítottuk össze az NC domént tartalmazó M-PMV NC-dUTPáz fehérjével és az NC domént nem tartalmazó M-PMV dUTPáz fehérje szegmenssel. Jelentős fluoreszcens kioltás csak az NC-dUTPáz esetében figyelhető meg, köszönhetően annak, hogy a három fehérje közül az NC-dUTPáz NC doménje képes megkötni a hozzáadott Zn^{2+} ionokat.

4.9. Az NC domén a fúziós fehérjén belül oligonukleotid kötés hatására zártabb konformációt vesz fel, mint önálló formában [4].

A SAXS mérési eredményekből kiszámolt szerkezeti paraméterek alapján jelentős csökkenés tapasztalható az oligonukleotiddal kötött NC-dUTPáz hidratált térfogatában, illetve valamivel kisebb a maximális méret és a girációs sugár esetében. Ez arra utal, hogy az oligonukleotid megkötése során a fehérje egy kompaktabb szerkezetet vesz fel. A fehérje-oligonukleotid komplex *ab initio* modellje nagyon hasonló a szabad NC-dUTPáz *ab initio* modelljéhez, de a szerkezete valamivel kompaktabb. Ez a tény megfelel annak az eredménynek, amelyet a mérési paraméterek összehasonlító analiziséből kaptunk. Az NC-dUTPáz oldatbeli alakjának további vizsgálatához a "rigid body" módon a BUNCH program felhasználásával számolt modellt vetettük össze a kísérleti adatokkal. A fehérjék alakja nagyon hasonló a megfelelő, *ab initio* módon számolt modellekéhez. Érdekesség, hogy az NC régió számolt szórása a szabad NC-dUTPáz modellből számolva nagyon jó egyezést ad a szabad NC kísérletes szórására. Az oligonukleotiddal kötött NC esetében ez az összehasonlítás valamivel rosszabb eredményt ad, mutatva azt, hogy az NC a teljes hosszúságú NC-dUTPázon belül oligonukleotid megkötése esetén kompaktabb szerkezetet vesz fel, mint ha önmagában hozná létre a komplexet.

4.10. Az NC-dUTPáz kölcsönhatást alakít ki más virális fehérjékkel [3].

Far western csepp blot kivitelezése során a következő virális fehérjék és az M-PMV dUTPáz között kialakuló kölcsönhatásokat vizsgáltam: integráz (IN), kapszid (CA), kapszid-nukleokapszid (CA-NC), p12, mátrix (MA), nukleokapszid (NC). Az IN, a CA, a CA-NC és az NC fehérjék esetében kaptam pozitív eredményt. A fent felsorolt pozitív reakciók közül a CA-NC és a dUTPáz között létrejött kölcsönhatást felszíni plazmon rezonanciával is megerősítettem.

5. Tézisek

5.1. A dUTPáznak csak az NC-vel kovalensen kapcsolt formája fejeződik ki az M-PMV vírusban, a dUTPáz domén önálló alakban nincs jelen [1].

5.2. Katalitikus aktivitása, összehasonlítva humán, *Drosophila melanogaster* és *Escherichia coli* dUTPázokkal, egy nagyságrenddel alacsonyabb, de az NC régióval való kapcsolata nem befolyásolja a dUTPáz domén enzimaktivitását illetve ligandumkötő képességét [1].

5.3. Az NC-dUTPáz, más dUTPázokhoz részben hasonló módon köti meg a ligandumot az aktív centrumban. Az NC-dUTPáz C-terminális karja a saját alegységének aktív centruma felett lapol át, ellentétben a humán és más dUTPázokkal, amelyekben a kar a szomszédos alegység aktív centrumában lévő ligandummal alakít ki kölcsönhatást [4].

5.4. Az NC fehérje Zn^{2+} ion és nukleinsavkötő képességgel rendelkezik. Ezt a két funkcióját a fúziós fehérjén belül is megtartja. A szabad formában jelenlevő NC fehérje oligonukleotid kötés során zártabb konformációt vesz fel. Az szerkezetének nagyobb mértékű rendeződése figyelhető meg a fúziós fehérjén belül [4].

5.5. Az NC-dUTPáz az integráz, kapszid, nukleokapszid és a kapszid-nukleokapszid fúziós fehérjével lép kölcsönhatásba [3].

6. Alkalmazási lehetőségek

A retrovirális NC-dUTPázzal elvégzett kísérletek megmutatták, hogy az NC domén nem gátolja a dUTPáz működést és az NC domén a fúziós fehérjén belül is megtartja nukleinsavkötő képességét. A dUTPáz enzim NC fehérjével kapcsolt formája az enzim egy továbbfejlesztett változata lehet. Az NC nukleinsavkötő képessége folytán segítheti a dUTPáz lokalizációját a genom közelében és ezáltal az enzim ott fejt ki hatását, ahol a legnagyobb szükség van a dUTP hidrolízisére.

Az NC-dUTPáz térszerkezetében a C-terminális kar konformációjának jelentős eltérése a humán dUTPázhoz képest és az enzim csökkent katalitikus aktivitása között valószínűsíthető összefüggés alapot adhat térszerkezeti változást okozó dUTPáz gátlás kifejlesztésére.

Gátlómolekulák tervezéséhez fontos támpontot adhat a célzott enzim kölcsönható fehérjepartnereinek ismerete. Az NC-dUTPáz esetében az integrázzal kialakuló kölcsönhatás egyrészt utalhat az enzim elhelyezkedésére a sejten belül, illetve kiinduló pontot adhat antivirális szer kifejlesztésére.

7. Közlemények

7.1 A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

- [1] Barabás O., Rumlová M., Erdei A., **Pongrácz V.**, Pichová I., Vértessy B.G. *dUTPase and nucleocapsid polypeptids of the Mason-Pfizer Monkey virus form a fusion protein in the virion with homotrimeric organisation and low catalytic efficiency* J Biol Chem. (2003); 278 (40): 38803-12.
- [2] Barabás O., **Pongrácz V.**, Kovári J., Wilmanns M., Vértessy B.G. *Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase* J Biol Chem. (2004); 279(41):42907-15
- [3] **Németh-Pongrácz, V.**, Snasel, J., Rumlova, M., Pichova, I., Vértessy, G.B. *Interacting Partners of M-PMV nucleocapsid-dUTPase* Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids (2006) 25(9):1197-200.
- [4] **Németh-Pongrácz, V.**, Barabás, O., Fuxreiter, M., Simon, I., Pichová, I., Rumlová, M., Zábranská, H., Svergun, D., Petoukhov, M., Harmat, V., Klement É., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky F.K., Kónya, E., Vértessy, G.B. *Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins* Nucleic Acids Research (2007) 35(2):495-505
- [5] Barabás, O., **Németh, V.**, Vértessy, G.B. *Crystallization and preliminary X-ray studies of dUTPase from Mason-Pfizer monkey retrovirus* Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun. (2006) 62:399-401

7.2 A doktori értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások

Pongrácz V., Barabás O., Rumlová M., Kónya E., Pichová I., Vértessy B.G. *The bifunctional retroviral nucleocapsid-dUTPase in the virion and in the test tube* (2004) FEBS Forum for Young Scientists, Varsó, Lengyelország

Németh-Pongrácz, V., Barabás, O., Fuxreiter, M., Simon, I., Pichová, I., Rumlová, M., Zábranská, H., Svergun, D., Petoukhov, M., Harmat, V., Klement É., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky F.K., Kónya, E., Vértessy, G.B. *Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins* (2006) Straub napok, Szeged

7.3 Az adatbázisban elhelyezett fehérjeszerkezetek

2D4L Németh, V., Barabás, O., Vértessy, G.B.

Crystal structure of truncated in C-terminal M-PMV dUTPase, 2006 11. 07.

2D4M Németh, V., Barabás, O., Vértessy, G.B.

Crystal Structure of apo M-PMV dUTPase, 2006 11. 21.

2D4N Németh, V., Barabás, O., Vértessy, G.B.

Crystal Structure of M-PMV dUTPase complexed with dUPNPP, substrate analogue, 2006 11. 21.

7.4 A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

Kovári J., Barabás O., Takács E., Békési A., Dubrovay Z., **Pongrácz V.**, Zagyva I., Imre T., Szabó P., Vértessy B. G. *Altered active site flexibility and a structural metal-binding site in eukaryotic dUTPase: kinetic characterization, folding, and crystallographic studies of the homotrimeric Drosophila enzyme*. J Biol Chem (2004) Apr 23;279(17):17932-44

Békési A., Zagyva I., Hunyadi-Gulyás É., **Pongrácz V.**, Kovári J., Nagy Á., Erdei A., Medzihradszky, F.K., Vértessy B.G. *Developmental regulation of dUTPase in Drosophila melanogaster* J Biol Chem (2004) May 21;279(21):22362-70.