

**A dUTPáz sejtbeli szerepének *in vivo* analízise mikobaktériumban és  
szerkezet-funkció kapcsolatának *in vitro* elemzése humán és  
mikobakteriális enzimekben**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Pécsi Ildikó**  
Okleveles Biológus

Témavezető:

**Dr. Tóth Judit**

Tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője:

**Prof. Erdei Anna**  
Szerkezeti Biokémia Program  
Programvezető:  
**Prof. Gráf László**



Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai  
Intézetében Budapesten 2011-ben.

## Bevezetés és célkitűzések

A dUTPáz a dUTP hidrolízisét katalizálja, ami által a sejt számára egyrészt a dTTP nukleotid bioszintézishez szükséges dUMP prekursor molekulát biztosítja, másrészt szervetlen pirofoszfát ( $PP_i$ ) keletkezik. Aktivitása révén csökkenti a DNS-be hibaként beépülhető uracil mennyiségét, hozzájárulva így a nukleinsav integritásának megőrzéséhez [1]. A dTTP szintéziséért emberben 3 fő útvonal felelős (két *de novo* és egy menekítő), a mikobaktériumokban viszont egyetlen útvonal látja el ezt a feladatot, nevezetesen a *dut* gén által kódolt dUTPáz. A dUTPáz létfontosságát két szervezetben (*E.coli* és *S.cerevisiae*) korábban már leírták [2-4]. Egy genomi méretű mutagenézisen alapuló vizsgálat szerint, a dUTPáz nélkülözhetetlen a sejtszétváláshoz a *M. tuberculosis* baktériumban [5]. Az eddig ismert összes mikobakteriális genom nagyfokú hasonlósággal tartalmazza a dUTPázt, azonban ennek mikobaktériumban való létfontosságáról bizonyítékok nem állnak rendelkezésünkre. Mi a dUTPáz gén kiütésének fiziológiai hatása *in vivo M. smegmatis*-ban? Létfontosságú-e ez a fehérje, és ezáltal javasolható-e ígéretes gyógyszer célmolekulának? A mikobakteriális dUTPázok egy mikobaktérium specifikus szerkezeti motívummal is rendelkeznek, amely a humán enzimből hiányzik. Mi lehet ennek a specifikus motívumnak a szerepe *in vivo* mikobaktériumban és *in vitro* az enzimmechanizmusban? A homotrimer dUTPázok egy flexibilis C-terminális karral rendelkeznek, amely az aktív zseb kialakításában is részt vesz [6, 7]. Ezen belül található egy P-loop-szerű hurok szekvencia. Ebben a szekvenciában található konzervált aminosavak nagymértékben járulhatnak hozzá a dUTPáz hatékony katalíziséhez, ahogy ez a korábbi kristályszerkezetek alapján elmondható [8, 9]. Az egyik ilyen konzervált aminosav a humán dUTPázban a 158-as fenilalanin és a mikobakteriális enzimben a 145-ös hisztidin. Ezek az aromás oldalláncú aminosavak a szubsztrát uracil gyűrűjével mintegy átlapolva, szoros kölcsönhatást alakítanak ki. Mi lehet ennek az aromás kölcsönhatásnak a szerepe a szubsztrátkötésben és a termék felszabadulásban? A dUTPázok nagyfokú szubsztrát specifitással rendelkeznek a nukleozid foszfátlánc hosszára nézve. Megkülönböztetik az NDP (nincs hidrolízis) és NTP ligandumokat annak ellenére, hogy a hidrolízis az  $\alpha$ - $\beta$  foszfátok között történik. Miért? A szubsztrát  $\gamma$ -foszfátjának koordinációjáért felelős aminosavak szintén a P-loop-szerű hurok

motívumon belül található. Korábban *C.elegansban* kimutatták, hogy a dUTPáz csendesítése embrionális letalitást eredményez az apoptózis útvonal aktivációja révén, amiben egy DNS-javító mechanizmus is részt vesz [10]. A dUTPáz csendesített hermafrodita embriókban az autofágia gének expressziója felülszabályozódik. ATF-2 és CES-2 fehérjék képesek-e kötni az *lgg-1* és *bec-1* autofágia gének promóter régióit *in vitro*? Ennek eldöntésére EMSA kísérleteket végeztünk.

## Alkalmazott módszerek

- Blast-p aminosav-szekvencia analízis:

a mikobaktériumok timidin metabolizmusában szereplő enzimek hasonlóságának meghatározása.

- „Flexibilis kazetta” módszer:

kétlépcsős homológ rekombináción alapuló, több szelekciós markert tartalmazó módszer, amely egy „öngyilkos” és egy komplement plazmidnak az adott baktérium genomjába történő integrálódásán alapszik; amit a *Mycobacterium smegmatis* dUTPáz (*dut* gén által kódolt) génkiütött mutáns sejtvonalak előállításához alkalmaztunk.

- „Switching” módszer:

a komplement vektor kivágását szolgáló (pSM128) plazmid, amely rekombináz és hely specifikus integrációs forrással rendelkezik.

- Fehérje előállítása:

a mutáns *M. tuberculosis* és humán dUTPáz fehérjék létrehozásához a Stratagene cég QuikChange irányított mutagenezis kitjét használtuk.

- Fehérje expresszió:

*E. coli* BL21pLysS sejtekben történt. (konstrukciók: WT hDUT, hDUT<sup>armless</sup>, hDUT<sup>F158A</sup>, hDUT<sup>R/K</sup>, hDUT<sup>ST/AA</sup>, hDUT<sup>F158W</sup>, mtDUT<sup>H145W</sup>, és az mtDUT<sup>H145A</sup> ).

- Fehérje tisztítás: Ni-NTA affinitás kromatográfia

- Fehérjeminták koncentrációjának meghatározása:

Bradford módszerrel és/vagy a fehérje ultraibolya (UV) spektruma alapján történt.

- Steady-state kinetika:

- a dUTPáz által katalizált reakció során felszabaduló protonok mennyiségét egy fenolvörös sav-bázis indikátor színváltozásának spektrofotometriás mérésével követtük.
- Fluorimetriás és cirkuláris dikroizmus titrálások:  
a különböző mutáns dUTPáz-nukleotid komplexek disszociációs állandóit ( $K_d$ ) a Jobin Yvon Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméter és a Jasco 720 Spektropolariméter segítségével határoztuk meg.
  - Gyors-kinetikai módszerek:  
fluoreszcens stopped-flow méréseket (Applied Photophysics SX-20) végeztünk az aktívhely titráláshoz és a szubsztrát (dUTP) kötés vizsgálatához; quench-flow mérésekkel (RQF-3 KinTec Corp., Austin, Texas, USA) a dUTPáz által katalizált reakció során keletkezett  $^{32}\text{PP}_i$  termék mennyiségét határoztuk meg.
  - Röntgen diffrakciós szerkezetvizsgálat:  
az mtDUT<sup>H145W</sup> és mtDUT<sup>H145A</sup> fehérjéknek az  $\alpha,\beta$ -imido-dUTP szubsztrát analóggal alkotott komplexeinek egyidejű kristályosítása a függőcsepp módszerrel készült.
  - Ioncserélő kromatográfia:  
a Bio-Scale Q2 –es oszlopon (Bio-Rad) egy AKTA Purifier (GE Healthcare) kromatográfias rendszeren végeztük a kísérletet, a lehetséges dUDP hidrolízisének detektálására.
  - DNS-fehérje kötési vizsgálatok (EMSA): az ATF-2 és CES-2 fehérjéknek a lgg-1, bec-1 és atg-18 autofág gének promóter régióinak kötési vizsgálataihoz.

## **Eredmények (tézisek)**

1. A timidin bioszintézisben szereplő dUTPázt és a többi kulcsenzimeket nagyfokú hasonlósággal kódolják genomjukban a *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* és más patogén (*M. leprae*, *M. ulcerans*, és *M. bovis*) mikobaktériumok is.
2. Különböző fajokból származó (*Echerichia coli*, *Equine infectious anemia virus*, *Vaccinia virus*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Homo sapiens*) dUTPázok C-terminális aminosav szekvenciáinak illesztése egyértelműen igazolt egy 5 aminosav hosszú inzerit szekvenciát, amely a mikobakteriális dUTPázokat egyértelműen megkülönbözteti a humán és más fajokban található dUTPázoktól.

3. A dUTPáz kódoló *dut* gén kiütése letális a *M. smegmatisban*.
4. A „switching” módszerrel maradéktalanul igazoltuk, hogy kizárólag a *dut* gén hiánya okozza a letalitást a *M. smegmatisban*.
5. A mikobaktérium-specifikus hurok (loop) motívum deléciója letális fenotípust mutat *M. smegmatisban*.
6. A *M.tuberculosis* dUTPáz loop motívum deléciója az enzim steady-state aktivitását szignifikáns mértékben nem változtatta meg (1,3- szoros  $V_{\max}$  értékcsökkenés), viszont a dUPNPP ligandum kötés erősségét kismértékben (11-szeres  $K_d$  érték különbség) csökkentette.
7. A homotrimer dUTPázok aktív helyén (C-terminális részén belül található P-loop-szerű hurok szekvenciában) található fenilalanin konzervált.
8. Az mtDUTH145W kristályszerkezete az aromás kölcsönhatás konzerváltságát tükrözi.
9. Az aromás kölcsönhatás megszüntetése nincs hatással a dUTPáz általános konformációjára, sem a szubsztrátkötő zseb szerkezetére.
10. A  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás megszüntetése a steady-state reakciósebességet  $0,3 \text{ s}^{-1}$  –ra csökkentette a vad típushoz képest ( $5,8 \text{ s}^{-1}$ ) míg a szubsztrát kötés affinitást csak 3 x szoros mértékben csökkentette. Ezt követően gyors kinetikai mérésekkel meghatároztuk, hogy a hDUT<sup>F158A</sup> mutánsban a csökkent enzimaktivitásért a hidrolízis lépés felelős.
12. A P-loop-szerű hurok mutáns dUTPázok nem tudnak különbséget tenni a dUDP és a dUPNPP nukleotidok kötése között (mindkettőt kötik) és a pirofoszfát kötése nem volt detektálható. Ugyanakkor a bevitt mutációk a steady-state reakciósebességet szignifikáns mértékben csökkentették. Ezt követően gyors-kinetikát alkalmaztunk annak meghatározásához, hogy az enzimmechanizmus melyik lépését befolyásolhatják. Kimutattuk, hogy a hidrolízis lépés sebességi állandóját csökkentették.
13. Az ioncserélő kromatográfiás kísérletekkel igazoltuk, hogy a humán dUTPáz a dUTP analóg dUDP.BeFx komplexet nem hidrolizálja el, amit további fluoreszcencia spektrumok jelintenzitás változásai is alátámasztottak.
14. Kimutattuk, hogy az CES-2 köti a *bec-1* gén promóter szakaszát és az ATF-2 fehérje is kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* gének promóter régióihoz, specifikusan. Mivel a mutáns génekkel történt kísérlet során fehérje-DNS komplex képződést nem detektáltunk.

## Következtetések

1. Kimutattuk, hogy a *dut* gén által kódolt dUTPáz enzim esszenciális a *M. smegmatis*ban *in vivo*, továbbá a mikobakterium specifikus motívum is nélkülözhetetlen a baktérium növekedéséhez. Szekvencia elemzésekkel igazoltuk, hogy a *M. smegmatis* és a *M. tuberculosis* fajokon kívül más patogén mikobaktériumok genomjában is megtalálható a dUTPáz és a timidin bioszintézisben résztvevő többi enzimek is, nagyfokú hasonlósággal.
2. Kimutattuk, hogy a loop deléciója nem járt drasztikus aktivitásbeli és szubsztrátkötési következményekkel. Kristályszerkezetben jól látható, hogy az öt aminosav (AGLAS) a homotrimer fehérje monomer egységeinek a felszínén egy hurok konformációt alakít ki. Ezek a tények arra engednek következtetni, hogy ez a mikobaktérium specifikus inzert egy kölcsönható partnernek, avagy ligandumnak szolgáltathat kötőhelyet. Ez alapján, feltételezhetjük, hogy ez a kölcsönhatás közvetítheti a loop motívum esszencialitását, amit az *in vivo* kísérletekben kimutattunk.
3. Kimutattuk, hogy a dUTPázok aktív helyén található aminosav, amelyik a szubsztrát uracillal átlapol az aromás oldallánc tekintetében konzervált, amit kristályszerkezetekkel is igazoltunk. Stopped-flow és quench-flow módszerekkel igazoltuk, hogy a mutáns hDUT<sup>F158A</sup> csökkent aktivitásáért a hidrolízis lépés a felelős. Fluoreszcencia kísérletekkel kimutattuk, hogy az átmeneti állapotból a következő konformációs állapot eljutásáig további F-jelkioltás történik, ami feltételezhetően az enzim és a szubsztrát között kialakult  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatásnak tulajdonítható. Konklúzióként elmondhatjuk, hogy a dUTPázban található konzervált aromás aminosavnak a szubsztráttal alkotott elektrosztatikus kölcsönhatása, a foszfátészter hidrolízist az átmeneti állapot stabilizációja révén elősegíti.
4. Kimutattuk, hogy a másodlagos kölcsönhatások megszüntetése a P-loop-szerű hurok motívum és a szubsztrát  $\gamma$ -foszfátja között csökkentette az enzim-szubsztrát komplex katalitikusan kompetens konformációjának a kialakulását. Steady-state aktivitásméréseink igazolták, hogy a hidrolízis mindegyik mutánsban megtörténik az okozott mutáció mértékének függvényében. Feltételezhetjük, hogy a di-és a tri-foszfát nukleotidok megkülönböztetése a  $\gamma$ -foszfát és a P-loop-szerű hurok motívum között kialakult kölcsönhatás révén következik be. Ioncserés kísérleteink eredményei arra

engednek következtetni, hogy a  $\gamma$ -foszfát és a nukleotid többi része között kialakuló foszfátészter kötés teljes egészében szükségeltetik ahhoz, hogy a P-loop-szerű hurok motívum hatása a hidrolízis helyén, az  $\alpha$ -foszfáton érvényesüljön.

5. A dUTPáz funkcionális szempontból két releváns fehérjével, a *Campylobacter jejuni* kétfunkciós dUDP/dUTPázával és a *Dictyostelium discoideum* II-es miozinnal hasonlítottuk össze. A következőket találtuk: *i)* a kétfunkciós enzim esetében a kötött dUTP  $\gamma$ -foszfátját egyedül csak vízmolekulák koordinálják, míg a dUTPázban a szubsztrát  $\gamma$ -foszfátja és a P-loop-szerű hurok motívum között másodlagos kölcsönhatások vannak; *ii)* a kétfunkciós dUDP/dUTPáz enzim nem rendelkezik P-hurok motívummal. *iii)* míg a miozinoknál a P-hurok körbeveszi mindkét foszfátot ( $\beta$  és  $\gamma$ ), addig a dUTPáz esetében a P-loop-szerű hurok struktúra kizárólag a  $\gamma$ -foszfáttal alakít ki kölcsönhatást. Ez a különbség feltehetőleg a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumának elhelyezkedésével hozható összefüggésbe, amely a C-terminális karon belül található, ahol szubsztrátjával egy fedő („eclipsed”) dUTP kötött konformációt alakít ki.

6. Az összehasonlítások eredményeképpen feltételezhető, hogy a dUTPáz P-loop-szerű hurok motívumának egyedi szerepét feltehetőleg funkcionális adaptációval szerezte meg az enzim, a DNS hibajavító rendszerek egyidejű tökéletesedésével.

7. Kimutattuk, hogy az ATF-2 fehérje specifikusan kötődik a *bec-1* és az *lgg-1* promóterekhez. Elmondhatjuk, hogy az autofág gének és az apoptotikus útvonal egymást kiegészítve szabályozhatják a *C.elegans* korai egyedfejlődését. A sejtbeli dUTPáz aktivitás csökkenése és a timidin anyagcserére ható metabolitok ezt a kettős élet-halál választ hatékonyan képesek kiváltani.

## Összefoglalás

Összefoglalásként elmondhatom, hogy a dUTPáz enzim és az 5 aminosavból álló hurok motívuma létfontosságú a *M. smegmatis* organizmusban. Érdekes módon a *M. tuberculosis* dUTPáz hurok motívumának a törlésével nem szűnt meg az aktivitása. A dUTPázok foszfátészter hidrolízisének hatékonyságához, az aromás  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás az átmeneti állapot stabilizációja révén nagymértékben hozzájárul. Továbbá a dUTPázok nagyfokú szubsztrát specifitását, a nukleozid foszfátlánc hosszára nézve, a P-loop-szerű hurok motívum megjelenése és funkciója biztosítja, kísérleteink eredményei alapján.

Továbbá a dUTPáznak a *C.elegans* egyedfejlődésében egy közvetítő szerepet feltételezhetünk az autofág gének és az apoptózis útvonal között.

### **Tézisek alapjául szolgáló publikációs lista**

**Pecsi I\***, Leveles I\*, Harmat V, Vertessy BG, Toth J. „*Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase* „ **Nucleic Acids Res.** 2010 Nov 1;38(20):7179-86. Epub 2010 Jul 2. \* megosztott első szerzők

Erdélyi P, Borsos E, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M, **Pécsi I**, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, Vellai T. „*Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in Caenorhabditis elegans*” **J Cell Sci.** 2011 May 1;124(Pt 9):1510-8.

**Ildiko Pecs**i, Rita Hirmondo, Amanda C.Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G. Vertessy and Judit Toth. „*The dUTPase enzyme is required for mycobacterial viability*” **A Journal of Bacteriology**-ba elbírálás alatt. 2011

**Ildiko Pecs**i\*, Judit Szabo\*, Scott Adams, Istvan Simon, James R. Sellers, Beata G. Vertessy and Judit Toth. „*Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination* „ **PNAS**-be elbírálás alatt. 2011  
\* megosztott első szerzők

### **Szóbeli előadás (előadó neve aláhúzva)**

Pécsi Ildikó, Hirmondó Rita, Amanda C. Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta és Tóth Judit. „*A dUTPáz enzim faj specifikus szerkezeti motívumának esszencialitása a Mycobacterium smegmatisban: új célmolekula azonosítása a tuberkulózis gyógyszerterápiában*” IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Siófok, 2011. március 25-27.



### **Poszter előadások (előadó neve aláhúzva):**

- 1.) I. Pecsí, R.Hirmondo, A. C. Brown, A. Lopata, T. Parish, V. G. Beata and J. Toth  
P1017,, *A genus-specific loop in dUTPase is essential for mycobacterial viability* ”  
21<sup>st</sup> ECCMID 27<sup>th</sup> ICC (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases and International Congress of Chemotherapy) Milan, Italy 7-10 May 2011.
- 2.) Ildiko Pecsí, Rita Hirmondo, Amanda C.Brown, Anna Lopata, Tanya Parish, Beata G. Vertessy and Judit Toth. Pos-360: *“Proving the essentiality of dUTPase mediated by its mycobacterium-specific structural motif identifies a novel TB drug target”*  
Keystone Symposia, Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis- Back to the Basics; January 15-20, 2011 Vancouver, Canada.
- 3.) Ildiko Pecsí, Tanya Parish, Amanda C. Brown, Beata G. Vertessy and Judit Toth.  
Pos-B245: *“Essentiality of dUTPase, a key enzyme in the thymidylate synthesis pathway in mycobacteria”* The EMBO meeting 2010 Barcelona 4-7 September.
- 4.) Ildiko Pecsí, Judit E. Szabo, Beata G.Vertessy, Judit Toth;  
2325-Pos: *“The role of P-loop in the enzymatic mechanism of nucleotide pyrophosphatases”* Biophysical Society; February 2010 San Francisco, California.
- 5.) Judit Toth, Ildiko Pecsí, and Beata G. Vertessy. 272.02-Pos *“The Role of  $\gamma$ -phosphate Binding in the Catalytic Mechanism of dUTPase”* Biophys. J. 2008 94: 272-b. San Francisco, California.
- 6.) Judit Toth, Ildiko Pecsí, Scott Adams, Beata G. Vertessy.  
*“The role of P-loop in the mechanism of  $\alpha$ - $\beta$  phosphate; nucleotide hydrolysis catalyzed by dUTPase”* The International conference on Arginine and Pyrimidines 2008 London.
- 7.) Pecsí Ildiko, Borsos Eva, Takacs Krisztina, Vellai Tibor, Toth Judit and Vertessy G. Beata. *“Study of the dUTPase enzyme function and mechanism on C.elegans model organism”* Institute of Enzymology, BRC Budapest, Faculty of Science of Eotvos Lorand University, Department of Genetics, Budapest, Hungary 2007.

### **Irodalomjegyzék**

1. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. 42(1): p. 97-106.

2. el-Hajj, H.H., H. Zhang, and B. Weiss, *Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1988. 170(3): p. 1069-75.
3. Gadsden, M.H., et al., *dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 1993. 12(11): p. 4425-31.
4. Guillet, M., P.A. Van Der Kemp, and S. Boiteux, *dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(7): p. 2056-66.
5. Sassetti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. Mol Microbiol, 2003. 48(1): p. 77-84.
6. Mol, C.D., et al., *Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits*. Structure, 1996. 4(9): p. 1077-92.
7. Barabas, O., et al., *Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase*. J Biol Chem, 2004. 279(41): p. 42907-15.
8. Chan, S., et al., *Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: insights into the catalytic mechanism*. J Mol Biol, 2004. 341(2): p. 503-17.
9. Nemeth-Pongracz, V., et al., *Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. 35(2): p. 495-505.
10. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. EMBO Rep, 2006. 7(10): p. 1046-51.