

Zárójelentés

OTKA-azonosító: 68229, K típus

Humán dUTPáz: kooperativitás és sejtbeli kölcsönhatások

Vértessy G. Beáta

MTA Doktora, egyetemi tanár

1. Számszerűsíthető adatok

Publikációk – folyóiratcikkek

A jelen OTKA pályázat támogatásának felhasználásával 22 olyan folyóiratcikk született (mind nemzetközi referált folyóiratban), melyben a jelen OTKA pályázat száma fel van tüntetve. Ezek összesített impakt faktora: 92,379. Három további kézirat kedvező szerkesztői és opponensi vélemény alapján átdolgozás alatt áll: az átdolgozott változat két esetben már visszaküldésre került. További négy kézirat esetén a kísérletes eredmények már megvannak, a kézirat szövegezés alatt áll. Ezen kéziratokról további információval igény szerint szívesen állok rendelkezésre. A megadott publikációs jegyzék alapján a kutatás részletes eredményei is megismerhetők. Az alábbi jelentésben csupán néhányat emelünk ki az eredmények közül.

A közlemények közül kiemelkedő jelentőségűnek tartom a Tóth és mtsai, 2007, J. Biol. Chem., a Vértessy és Tóth, 2009, Accounts Chemical Research, a Merényi és mtsai, 2011, Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acids, valamint a Pécsi és mtsai, 2011, PNAS cikkeket.

PhD disszertációk

A jelen OTKA pályázatban nyert eredmények képezték alapját a következő megvédett PhD értekezéseknek:

Kovári Júlia, 2007, summa cum laude

Varga Balázs, 2008, cum laude

Németh-Pongrácz Veronika, 2009, cum laude

Takács Enikő, 2009, summa cum laude

Muha Villő, 2010, summa cum laude

Merényi Gábor, 2011, summa cum laude

(további információk: www.doktori.hu, Vértessy G. Beáta adatai)

2. Főbb eredmények (válogatás az egyes célkitűzésekhez kapcsolódóan)

1. célkitűzés. A. Az enzimműködés mechanizmusának tisztázása, a kinetikai és egyéb oldatfázisú valamint a kristályszerkezeti adatok átfogó értelmezése, a katalitikus ciklus részletes leírása.

(A közleményjegyzékben az 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 16, 21 számú cikkeken írtuk le az ide tartozó eredményeket):

Ezen a célkitűzésen belül sikerült két lényegi ponton részletes jellemzést adnunk a katalitikus ciklusról mind humán, mind mikobakteriális dUTPázok enzimek esetén. Egyrészt megvizsgáltuk a humán és mikobakteriális dUTPázok konzervált I. szekvenciamotívumán belül szereplő aszparaginsav oldallánc szerepét az enzimek funkciójában. Ezen oldallánccról korábban úgy vélték, hogy a magnézium ion kofaktor koordinálásáért felelős. Oldatbeli kísérletes technikák (tranzien és steady-state kinetika, ligandum kötődés egyensúlyi vizsgálata a korábban általunk bevezetett aktív centrumbeli triptofán oldallánc felhasználásával) és 3D nagyfelbontású (1.80 angström) térszerkezetek elemzésének összevetett eredményeiből a vad típusú és az Asp/Asn mutánsok valamint a C-terminális régióban csonkolt mutáns enzimek révén kiderítettük, hogy ez az oldallánc kiemelt jelentőségű molekuláris kölcsönhatásokat biztosít mind a monomeren belül, mind a homotrimer felépítésében, és nincs jelentős szerepe a fémion koordinálásában.

Másrészt megvizsgáltuk a C-terminális konzervált V. szekvenciamotívumbeli aromás oldallánc (humán enzimben és a dUTPáz szekvenciák túlnyomó részében fenilalanin, mikobakteriális enzimben hisztidin) szerepét a katalitikus ciklusban. Kimutattuk, hogy a szubsztrát dUTP uracil gyűrűje és az aromás oldallánc gyűrűje között pi-pi átlapolás jön létre, ami nagyban hozzájárul a nukleotid hidrolízis katalitikus reakciója során létrejövő átmeneti állapot stabilizálásához. Ezen eredmény kiemelkedő érdekességét és újszerűségét az adja, hogy a jelen esetben a pi-pi átlapolásban résztvevő gyűrűk viszonylag messze esnek a katalízis során a kémiai reakcióban közvetlenül szerepet játszó alfa-foszfátcsoporttól.

A dUTPáz által katalizált reakció mechanizmusának leginkább részletes leírását a fehérjekrisztallográfia, a ^{31}P NMR, és a QM-MM számításmódszerek, valamint bioinformatikai analízis együttes alkalmazása révén sikerült megadnunk. A reakciókoordináta mentán a reakció időbeli lefolyása során 13 kristályszerkezetet rögzítettünk (PDB kódok: 3TPN, 3TPS, 3TPY, 3TQ3, 3TQ4, 3TQ5, 3TRL, 3TRN, 3TS6, 3TSL, 3TTA, 3TPW, 3TP1) és ezek alapján négy eddig ismeretlen intermedier állapotot sikerült azonosítani. Az eredmények alapján megismertük az átmeneti állapot szerkezetét, amely sikeres inhibitor tervezések kiindulópontja lehet. Az eredményeket leíró kézirat kedvező editorai és opponensi vélemények alapján ártírt változata jelenleg az *Angewandte Chemie International Edition* nagypresztízsű folyóiratnál editorai elbírálás alatt áll. A kézirat első oldalát csatolom a zárójelentéshez.

A kooperatív mechanizmusra nézve nincsenek olyan adataink, melyek egyértelműen bizonyítanák a homotrimer kooperativitását. Ezen kérdés további vizsgálatára kovalens pszeudo-trimereket hoztunk létre, melyekben a három aktív centrum közül egyet vagy kettőt tudunk specifikusan inaktiválni. A mérések folyamatban vannak, az ezeket összefoglaló kézirat közlésre való beküldése 2012-ben várható.

A homotrimer dUTPázok szerkezeti analízise során azonosítottuk az egyes kölcsönhatási elemek viszonylagos hozzájárulásának jelentőségét a homotrimer kialakításában. Megállapítottuk, hogy a hidrofób kölcsönhatások dominanciája elsősorban a bakteriális (*E. coli*, *M. tuberculosis*) eredetű enzimfehérjékre jellemző. Meghatároztuk a C-terminális átlapoló kar szerepét a szerkezet stabilizálásában. Meghatároztuk az *ecetmuslica* dUTPáz enzim 3D szerkezetét, és itt meglepő módon egy eddig nem észlelt oligomer formát tapasztaltunk a kristályosítás során (dimer). Az

oldatban homotrimer, de a kristályfázisban dimert mutató fehérje szerkezeti analízise egyértelműen rámutatott az átlapoló kar által létrehozott kölcsönhatások kiemelkedő jelentőségére. A humán dUTPáz szerkezeti analízisét kisszögű röntgenszórással is elvégeztük (SAXS). Ezek a vizsgálatok először tették lehetővé, hogy a kiemelt flexibilitású N-terminális kar hozzávetőleges orientációját és alakját is meghatározhassuk. Ez a szegmens élettanilag is fontos, mert itt található a dUTPáz kognáns lokalizációjához elengedhetetlen nukleáris lokalizáció szignál (NLS) peptidszegmens.

1. célkitűzés B. A humán dUTPáz kis RNS-el történő sejtbeli csendesítése. (A közleményjegyzékben a 20. számú cikkben írtuk le az ide tartozó eredményeket):

Sokrétű kísérlet sorozat eredményeképpen sikeres siRNS csendesítést alkalmaztunk: HeLa sejt vonalon a human dUTPáz fehérjeszintjét a kimutatási határ alá vittük. Ezen perturbáció során a sejt vonal 5'-fluoro-uracillal és 5'-fluoro-deoxiuridinnel szembeni érzékenysége nagymértékben megnövekedett. Ugyanakkor a csendesítés során 6%-os enzimaktivitás még mérhető maradt. Valószínűleg ez az aktivitás elegendő volt a HeLa sejt vonal életképességének fenntartásához, így az E. coli dUTPáz enzimmel végzendő menekítési kísérletek elvégzése akkor várható, amikor a dUTPáz teljes kiütését kivitelezni tudjuk. Erre vonatkozó kísérleteinket az idén már elérhető új Zn-finger nukleáz technológiával kívánjuk a jövő évben megvalósítani, többféle sejt vonalon.

2. célkitűzés és 3. célkitűzés. A dUTPáz kölcsönható hálózat elemzése.

Hsc70 gén klónozása pET expressziós rendszerbe, Hsc70 fehérje expressziója és tisztítása

Hsc70 és dUTPáz fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata.

- felszíni plazmon rezonanciával nyert eredményeink szerint a kölcsönhatás a dUTPáz és a Hsc70 fehérje kognáns nukleotid ligandjaival modulálható
- izotermális titráló mikroklorimetriás eredményeink szerint a Hsc70-dUTPáz komplex disszociációs állandója hozzávetőlegesen 400 μ M feletti érték. Feltehető, hogy ez a laza komplex nehezen lesz együtt kristályosítható. Feltevésünk szerint más sejtbeli partnerek erősíthetik a kölcsönhatást – ezért “halászhattuk ki” eredeti immunprecipitációs kísérleteinkben a Hsc70 fehérjét, mint a human dUTPáz kölcsönható partnerét.

Elvégeztük a humán dUTPáz fehérje és a humán APE fehérje, valamint a PARP-kötő fehérje in vitro komplexálódási kísérleteit ThermoFluor technikával. Mindkét esetben azt az eredményt kaptuk, hogy a komplexek látszólagos disszociációs állandói 500 μ M-nál nagyobbak. Ezen esetekben is tehát azt a következtetést vontuk le, hogy más sejtbeli partnerek erősíthetik a kölcsönhatást – ezért “halászhattuk ki” eredeti immunprecipitációs kísérleteinkben a Hsc70 fehérjét, mint a human dUTPáz kölcsönható partnerét.

Makromolekuláris felismerés szabályozása sejt ciklus-függő foszforilációval a humán dUTPáz sejt magi transzportja során.

A jelen projekten belüli TAP-tag kísérleteinkben azonosítottuk az importin-alfa fehérjét, mint a

humán dUTPáz egyik további sejtbeli kölcsönható partnerét. A kölcsönhatás jelentősége és fontos háttere az, hogy az eukarióták genetikai állományukat külön kompartmentumba különítik el, és így egy térben és időben rendkívül hatásos szabályozási lehetőséghez jutnak. A >40 kDa makromolekulák magi transzportjéért azok Nukleáris Lokalizációs Szignálja felelős. A humán dUTPáz domináns izoformája jellegzetes NLS-t hordoz. A dUTPáz működése elengedhetetlen a genomi integritás megőrzéséhez; hiányában nagymennyiségű uracil épül a DNS-be, ami apoptózishoz vezet. Osztódó sejtekben az enzim zömében foszforilált formában található, ám ezen módosítás funkciója ismeretlen volt. A foszforilációs hely a fehérje NLS-ének közvetlen szomszédságában található, és a CDK1 kináz konszenzus foszforilációs motívumába esik. Bizonyítottuk, hogy ez a foszforiláció kihat a dUTPáz intracelluláris lokalizációjára: az NLS-mellett foszforilált fehérjét mimikáló mutáns kireked a sejtmagból. A vad típusú enzim, egy hiperfoszforilációt, valamint egy hipofoszforilációt mimikáló mutáns forma magi akkumulációjának dinamikáit videomikroszkópos kísérletekkel hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy az utódsejtekbe jutó foszforilált dUTPáz pool a sejtciklus előrehaladtával, valószínűleg defoszforilációt követően újra akkumulálódhat a magban, de ez a folyamat lassú. A hipofoszforilációt mimikáló mutáns az utódsejtben sokkal gyorsabban jut be újra a magba. A dUTPáz és az importin rendszer kölcsönhatását *in vitro* kötődésvizsgálatokkal igyekszünk jellemezni.

A humán dUTPáz és kölcsönható partnere, az importin-alfa komplexeinek krisztallográfiája és komplex kristályszerkezetek finomítása.

A komplexképződést a fenti mutációk jellegzetesen befolyásolják, amit számos biofizikai módszerrel igazoltunk. A két fehérje kölcsönhatását és a foszforiláció hatására bekövetkező változásokat az importin-alfa és dUTPáz NLS peptidek kristályszerkezetének tanulmányozásán keresztül próbáljuk megérteni. Sikeresen kristályosítottuk az importin-dUTPáz NLS komplexeket, mind a vad típus, mind több pontmutáns esetében. Eddigi röntgendiffrakciós vizsgálataink során három komplex szerkezetet sikerült megoldanunk és 1.9 – 2.1 angström felbontásig finomítanunk. További kutatásaink rámutattak, hogy a CDK1-konszenzusnak megfelelő foszforilációs pozíció számos egyéb magi fehérje (p53, APC, ubikvitin-aktiváló enzim) NLS-ében megtalálható. Ezért felmerül az általunk azonosított sejtciklus-függő transzlokáció általános jelentősége is, amit tovább kívánunk vizsgálni.

A humán dUTPáz – importin kölcsönhatást leíró kéziratunk közlésre való beküldését még 2011-re tervezzük.

3. Beküldött kézirat első oldala (kedvező editori és opponensi vélemények alapján átírt verzió, jelenleg elbírálás alatt).

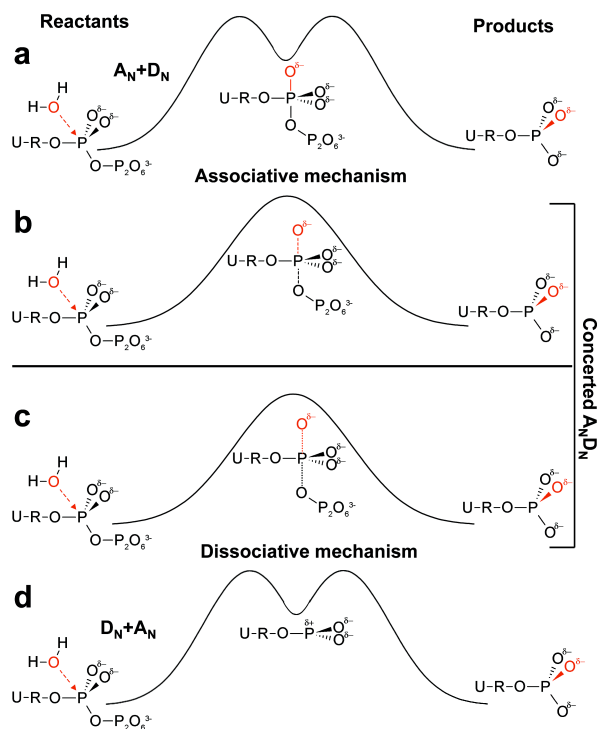
Catch phrase:

Enzyme action revealed in four dimensions using crystallography, ^{31}P -NMR, computation and kinetics

Structural Snapshots of Enzyme-Catalysed Nucleotide Hydrolysis Directly Visualize In-line Attack and Inversion

Orsolya Barabás^{1,2,3,*}, Veronika Németh¹, Andrea Bodor⁴, András Perczel^{4,5}, Edina Rosta⁶, Zoltán Kele⁷, Imre Zagyva¹, Zoltán Szabadka⁸, Vince I. Grolmusz⁸, Matthias Wilmanns⁹ & Beáta G. Vértessy^{1,10*}

Nucleophilic substitution reactions on phosphoric acid derivatives (such as anhydrides or esters) are involved in metabolism, signal transduction, and nucleic acid biosynthesis and processing. While the γ -phosphate group of nucleotides is quite reactive (e.g. ATP or GTP γ -phosphate), their α -phosphate position and the phosphodiester linkage in nucleic acid polymers, are significantly more inert to prevent unwanted modifications^{[1],[2, 3]}. Reactions at these sites require superb enzyme catalysts (e.g. nucleases, polymerases, Nudix hydrolases and dUTPases) and follow one of three alternative pathways^[4-6] (Scheme 1a-d). In the associative pathway (A_N+D_N) nucleophilic attack occurs in-line with the scissile bond, generates a pentacoordinated phosphorane intermediate, and results in inversion on the phosphorus reaction centre (Scheme 1a). In an alternative two-step mechanism (dissociative or D_N+A_N), unimolecular dissociation generates a metaphosphate intermediate, which may attract any nearby nucleophile with or without inversion (Scheme 1d). Bond breaking and forming may also occur simultaneously (one-step concerted pathway) through a single transition state (TS), with either associative (Scheme 1b) or dissociative character (Scheme 1c). Enzymatic reactions are thought to proceed via an associative character (A_N+D_N or A_ND_N)^[4, 7], but direct evidence and a visual grasp on the pathway of these important reactions has been long sought^[8].



Scheme 1 Four possible pathways of hydrolysis at the α -phosphate position. Characteristic energy landscapes are shown for each pathway with key intermediates or transition states. Dashed lines (b) indicate high bond order in the transition state while dotted lines (c) stand for low bond order.

Current approaches to investigate enzyme mechanism at the atomic level (X-ray crystallography^[9-11], ^{31}P -NMR spectroscopy^[4, 12], *ab initio* QM/MM simulations^[13-17], etc.) have their inherent limitations requiring integration of multiple methods. In the present work, we have taken advantage of the low k_{cat} value of the Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) dUTPase^[18] (Figure 1) and a suboptimal substrate, α,β -imido-dUTP^[19] (cf. Supporting Information) to study the reaction mechanism in four dimensions. The ubiquitous enzyme dUTPase contributes to maintain genome integrity by removing dUTP and generating the dTTP precursor dUMP^[20-22]. Here we combine enzyme kinetics, mass spectrometry, ^{31}P -NMR spectroscopy, X-ray crystallography and theoretical calculations to analyze the molecular structures formed during the catalytic reaction of this essential enzyme.

The M-PMV dUTPase-catalyzed dUTP and α,β -imido-dUTP cleavage (Figure 1a) was followed in ^{18}O water by mass spectrometry. Results showed that nucleophilic attack by the incoming water oxygen occurs invariably at the α -phosphorus atom (c.f. Supporting Information). We also quantitatively characterized the kinetics of α,β -imido-dUTP cleavage by ^{31}P -NMR in solution (Supporting Information, Figure S1). The ^{31}P -NMR assay method provided independent physico-chemical proof of the site of the nucleophilic attack and showed that the reaction was slow enough to potentially allow collection of crystallographic snapshots along the reaction coordinate. Optimization of crystallization for rapid growth resulted in well-diffracting crystals that grew in three days in the presence of α,β -imido-dUTP, and were analysed in the X-ray beam at various time intervals. To obtain structures at early stages of the reaction, we introduced apo enzyme

¹Institute of Enzymology, Hung. Acad. Sci., Budapest, H-1113 Hungary; ²Laboratory of Molecular Biology, NIDDK, NIH, Bethesda, MD 20892, USA; ³EMBL, Heidelberg, D-69117 Germany; ⁴Protein Modelling Group MTA-ELTE, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, H-1117 Hungary; ⁵Laboratory of Structural Chemistry and Biology, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, H-1117 Hungary; ⁶Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH, Bethesda, MD 20892, USA; ⁷Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Hungary; ⁸Department of Computer Science, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary; ⁹EMBL, Hamburg Outstation, Hamburg, D-22603 Germany; ¹⁰Department of Applied Biotechnology, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary

*Corresponding authors. E-mails: barabas@embl.de, vertessy@enzim.hu