

A timidilát bioszintézis és a genomi integritás preventív védelme

Doktori értekezés tézisei

Hirmondó Rita
Okleveles biológus

Témavezető: **Dr. Tóth Judit**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,
Szerkezeti Biokémia Program



A doktori iskola vezetője: **Prof. Erdei Anna**
Programvezető: **Prof. Nyitray László**

2015. Budapest



Készült: Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi
Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

1 Irodalmi áttekintés

Az egyes nukleotidok (dezoxiribonucleozid-5-trifoszfát, dNTP) sejtbeli koncentrációjának pontos szabályozása elengedhetetlen a genom hatékony és pontos replikációjához, valamint a genomi integritás fenntartásához [1]. A négy kanonikus DNS alkotó dNTP közül három (dATP, dCTP és dGTP) a szerkezetileg megfelelő ribonukleozid difoszfát redukálásával keletkezik [2]. Ezzel szemben a dTTP közvetlen ribonukleotid megfelelője hiányzik a NTP készletből, ezért a timidin bioszintézise az alábbiakban ismertetett független útvonalakon keresztül valósul meg.

A dTTP *de novo* bioszintézise általában valamilyen uraciltartalmú köztiterméken át történik az élővilág nagy részében, ugyanis a timidilát szintáz reakció közvetlen szubsztrátjaként a dUMP szolgál. A legtöbb élőlényben a dUMP fő forrása valamilyen citozin dezoxinukleotid dezaminálásából származik (dCMP vagy dCTP), míg a dUDP defoszforilációja kisebb jelentőséggel bír [3]. A dCTP dezaminálásából származó dezoxiuridin trifoszfát (dUTP) pirofoszforolízis reakcióját a széleskörűen elterjedt dUTPáz enzim katalizálja, ami a dUMP előállításán túl a genom uracilosodását is megelőzi azáltal, hogy lebontja a sejtben keletkező dUTP-t [4]. A dUTPáz (Dut) enzim szerkezetileg nagyon hasonló a dCTP dezamináz (Dcd) és a bifunkciós dCTP dezamináz:dUTPáz (Dcd:dut) enzimmel is. Mindhárom enzim a dUTPáz szupercsaládba tartozik. Habár az uracil adeninnel szemben beépülve nem mutagén, a DNS-ben jelenlévő uracil hibaként jelenik meg és indukálja az uracil kivágó javítási mechanizmusok aktiválódását [5]. Magas dUTP/dTTP aránynál ezért a hibajavító folyamatok túlzott aktivitása sejthalálhoz vezethet. A dUTPáz emellett, egyes élőlényekben a génexpresszió szabályzásában is fontos szerepet tölthet be [6,7]. Például a *Staphylococcus aureus* egyik patogenicitási szigetének represszora, az Stl képes kölcsönhatni a helper fág dUTPázával, ezáltal a dUTPáz aktiválja a patogenicitási sziget fehérjéinek átírását és a sziget terjedését [7]. Érdekes módon az Stl a *Staphylococcus aureus* $\Phi 11$ fág dUTPáz fehérje hatékony inhibitorának mutatkozott [6].

Tehát összefoglalva, a Dut egyrészt katalizálja a dUTP hidrolízisét, ezáltal részt vehet a dTTP bioszintézisében, valamint az alacsony dUTP/dTTP arány fenntartásával megelőzi az uracil hibás beépülését a genomba, másrészt egyéb interakciókban is részt vehet. A dUTPáz enzim dTTP bioszintézisében és genomi integritás megőrzésében betöltött szerepét nehéz pontosan meghatározni az útvonal komplexsége és az enzimek gyakori esszencialitása miatt. Mivel a dTTP bioszintézise számos gyógyszer terápia célpontja lehet, ezért fontos megvizsgálni, hogy a Dut kulcsszerepet játszik-e az útvonalban.

2 Célkitűzések

A mikobaktériumok természetesen előforduló modellként szolgálhatnak mind a dUTPáz reakció sejtbeli lefolyásának tanulmányozására, mind a dUTP elimináció és dTTP bioszintézis útvonalak fiziológias kapcsolódásának felderítésére. Mivel mikobaktériumokban a timidilát bioszintézise kizárólagosan a dUTPáz reakció közreműködésével valósulhat csak meg, ezekben az organizmusokban nem zavarja a reakció követését más forrásokból megjelenő dUMP vagy dTMP. A menekítő útvonalak általi dTMP szintézis ugyanis más modell organizmusokban gyakran elfedi a dUTPáz reakció hatékonyságának megváltoztatását, például a dUTPáz csendesítése humán sejtekben alig van hatással a dTTP és dUTP szintekre. A képet tovább bonyolítja a dUTPáz genomi integritás fenntartásában betöltött szerepe.

A dUTPáz timidilát bioszintézisében és a genom preventív védelmében betöltött szerepének vizsgálatára az alábbi célokat tűztük ki:

1. dUTPáz génkiütött (KO) baktérium törzset kívántunk létre hozni a dUTPáz sejtbeli funkciójának vizsgálatára, valamint a pontmutáns dUTPáz enzimet kódoló törzseket is ebből a törzsből kiindulva kívántuk létrehozni.
2. A dUTP elimináció és a dTTP bioszintézis fiziológias kapcsolódásának felderítésére különböző pontmutáns dUTPáz és bifunkciós Dcd:dut enzimeket, és a pontmutáns enzimeket kódoló *Mycobacterium smegmatis* törzseket terveztünk. A mutáns törzsekben pedig különböző, a két enzim fiziológias funkcióját feltáró mérésekkel kívántuk felderíteni a Dut és a bifunkciós enzim timidilátszintézis útvonalban betöltött szerepét.
3. Egy nemrég fölfedezett fehérje természetű dUTPáz inhibítor és a mikobakteriális dUTPáz lehetséges kölcsönhatását is tesztelni kívántuk mind *in vitro*, mind sejtes körülmények között.

3 Anyagok és módszerek

A laborunkban történt humán és *E. coli* dUTPáz enzimeken folytatott vizsgálatok alapján [8,9], olyan fokozatosan csökkenő aktivitással rendelkező mutáns enzimeket terveztünk, melyek egy vagy több nagyságrendű enzimaktivitás csökkenést mutatnak. A mutáns *M. tuberculosis* enzimeket irányított mutagenézissel hoztuk létre és *in vitro* mérésekkel karakterizáltuk. Ezek után az ismert aktivitás-csökkenéssel bíró enzimeket egyetlen kópiaként kódoló *M. smegmatis* törzseket hoztunk létre, melyek felhasználásával az élő sejtben vizsgálhattuk a dUTPáz aktivitás csökkenésének hatásait. A mutáns törzsek életképességét stresszmentes körülmények között növesztve, a folyadék kultúra optikai denzitásának követésével ellenőriztük.

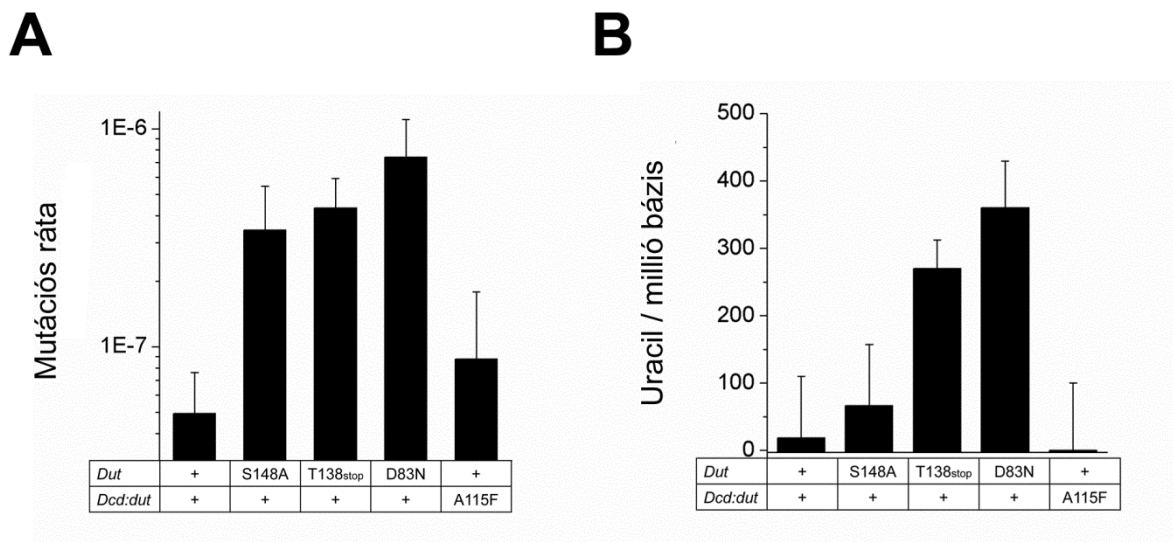
A mutáns törzsek spontán mutációs rátáját David és munkatársai által leírt módszer alapján, a rifampicin antibiotikumra kialakuló rezisztencia detektálásával mértük [10]. A mutációs mintázat felderítése érdekében spontán rifampicin rezisztens kolóniák mutációs mintázatát vizsgáltuk a rifampicin rezisztenciáért felelős *rpoB* gén 1000 bp hosszú mutációs hot-spot régiójának szekvenálásával (rifampicin rezisztencia assay). A törzsek genomi uracil szintjét egy q-PCR alapú módszerrel mértük [11]. A mutánsok sejtbeli pirimidin nukleotid készletét (dUTP, dTTP és dCTP) egy PCR-alapú módszerrel határoztuk meg [12]. A mérés során a trícium jelölt dATP beépülését a mérendő nukleotidra specifikus templátba a sejtexteraktum dNTP tartalma limitálja.

Natív gélelektroforézissel vizsgáltuk, hogy a nemrég fölfedezett dUTPáz inhibitor, az Stl vajon egy filogenetikailag távoli genusz, a mikobaktériumok dUTPázához is képes-e kötődni. Az Stl jelenlétében steady-state dUTPáz aktivitás méréseket is végeztünk, hogy megállapítsuk, az Stl képes-e gátolni a mikobakteriális dUTPáz enzimaktivitást is. A gátlási vizsgálatokat vad típusú és a kvázi vad típusú (H145W), az aktívhelyen triptofánt tartalmazó variánson végeztük. A sejtbeli gátlás vizsgálatára olyan *M. smegmatis* törzseket hoztunk létre, amelyek az Stl-t állandó vagy indukálható módon expresszálták. A törzsek sejtbeli pirimidin nukleotid készletét (dUTP, dTTP és dCTP) egy korábban a dUTPáz mutáns baktériumoknál alkalmazott PCR-alapú módszerrel határoztuk meg [12]. Az Stl-t expresszáló törzsek kolónia számát az Stl expresszió indukálása után specifikus időközönként határoztuk meg a telepek számolásával.

4 Eredmények és megvitatásuk

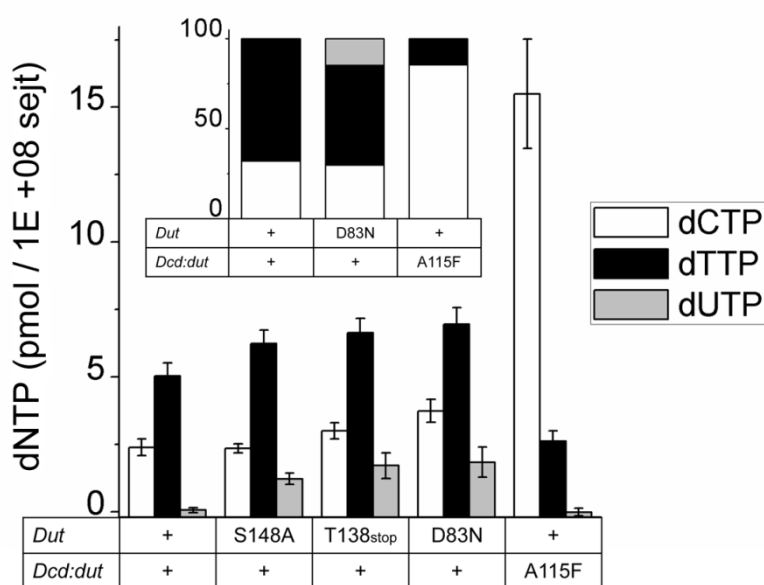
A dTTP bioszintézise és a genomi uracilosodás megelőzése a dUTPáz reakció által összekapcsolt folyamat. A hidrolízis reakció végterméke, a dUMP fontos prekuzorként szolgál a dTTP bioszintéziséhez, míg a sejtbeli dUTP elbontása segít, hogy a sejt hatékonyan elkerülhesse az uracil beépülését a DNS-be a replikáció során. Kísérleteink során a dUTPáz reakció és dUTPáz aktivitású enzimek kettős szerepét derítettük föl.

- *In silico* analízisünk szerint a mikobaktériumok jó modell organizmusok vizsgálataink elvégzéséhez, ugyanis a dUMP keletkezése kizárólag a két dUTPáz enzim által katalizált reakciókon keresztül történhet.
- Az enzimek fiziológiás szerepének meghatározására fokozatosan csökkenő aktivitással rendelkező pontmutáns *Mycobacterium smegmatis* törzseket hoztunk létre és karakterizáltuk az enzimaktivitásokat a sejten belül.
- Kimutattuk, hogy bármelyik dUTPáz enzim aktivitása elegendő a normál timidilátszintézis, ezáltal a baktérium életképességének fenntartásához.
- Azt találtuk, hogy a mutációs ráta és a genomi uracilszint az aktivitás csökkenésének függvényében emelkedett, míg a mutációk típusai nem változtak számottevően a vad típusú törzshöz viszonyítva.



1. Ábra A.) A vizsgált törzsek mutációs rátája. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával. **B.)** A vizsgált törzsek genomi uracil szintje. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk a legkisebb mért értékre normálva, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával.

- Ezzel szemben a *dcd:dut* mutáns törzsben erősen eltolódott dNTP arányokat és mutációs spektrumot detektáltunk.
- Kimutattuk, hogy az egyébként nagyon hasonló szerkezettel rendelkező dUTPáz (*dut*) és a bifunkciós dCTP dezamináz/dUTPáz (*dcd:dut*) funkciója evolúciósan szeparálódhatott a genomi integritás fenntartásra és a dNTP készlet szabályozására.
- A dNTP bioszintézis szabályozásának és a DNS-be beépíthető uracil mennyiségének alacsony szinten tartásának evolúciós különválása valószínűsíthetően előnyös a genomi integritás fenntartásában.



2. Ábra A mutáns törzsek pirimidin nukleotid készlete. A *dTTP*, *dUTP* és *dCTP* nukleotid mennyiségét egy PCR alapú módszerrel határoztuk meg. A mutáns és wt törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk, a wt enzimet '+'-al jelöltem. A mért értékek jól korrelálnak az adott mutáns enzim *in vitro* aktivitásával. A belső ábrán a pirimidin nukleotidok százalékos megoszlását ábrázoltam a wt, a D83N *dut* mutáns és a A115F *dcd:dut* mutáns esetén.

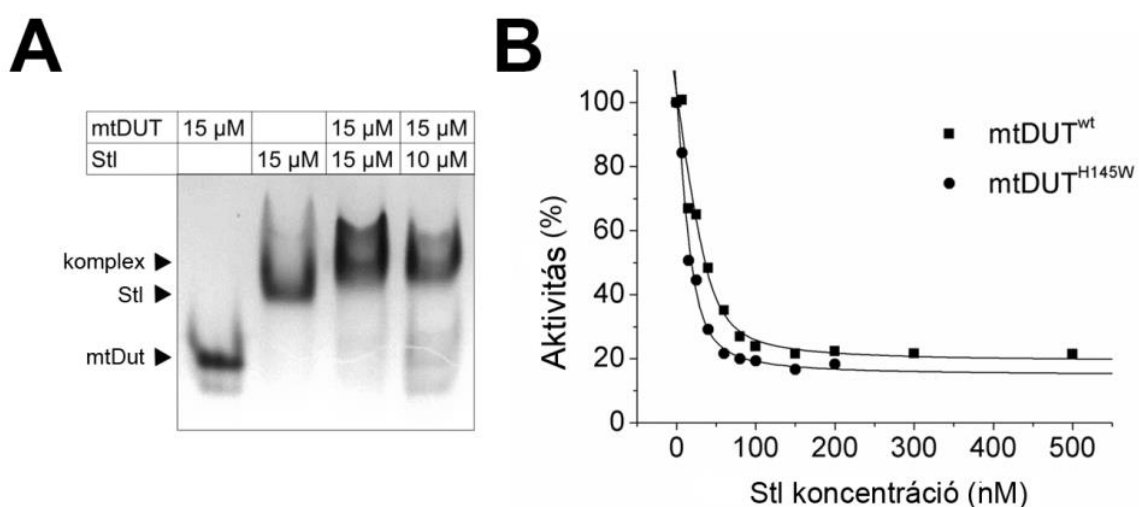
A dUTPáz enzimek a dTTP bioszintézisében és a genomi integritás megőrzésében betöltött szerepét nagyon nehéz volt szétválasztani az eddigi tanulmányok alapján az útvonal komplexsége és az enzimek gyakori esszencialitása miatt. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a menekítő útvonalon keletkező dTMP elfedheti az ezen enzimek funkciójának részletes karakterizálására irányuló kísérletek eredményeit. A mikobaktériumok egy természetesen előforduló, jó modellt nyújtanak ezen reakciók, enzimek vizsgálatára, ugyanis ezekben az organizmusokban sem menekítő útvonal, sem dCMP dezamináz enzim nincs jelen, így a dTMP szintézise csakis a dUTPáz reakción keresztül valósulhat meg. Eredményeinkből

kiderül, hogy a timidilát bioszintézise és a dUTP eliminálása külön szabályozás alatt áll a mikobakteriális sejtekben. Ez a megállapítás azonban nemcsak mikobaktériumokra, hanem az élővilág szélesebb körében is igaz lehet. Ismert, hogy a citozin-nukleotid dezamináz enzimek (Dcd, Dcd:dut, Dctd) mind allosztérikusan szabályozhatóak, ezáltal képesek lehetnek kontrollálni a pirimidin nukleotid szinteket és a nukleotidok arányát is a dNTP készletben. Ezzel szemben a dUTPáz enzim nagy specificitású és hatékonyságú reakciót katalizál, amely a sejtben képződő dUTP-t azonnal és nagy hatékonysággal hidrolizálja, ezáltal tisztán tartja a dNTP készletet, és megóvjva a genomi DNS-t a replikáció során az esetleges uracilbeépüléstől.

Eredményeink alapján a Dut enzim antituberkulotikus hatóanyagok potenciális célpontjaként is szolgálhat a génusz specifikus motívumnak köszönhetően, valamint a mikobakteriális dUTPázok valószínűsíthetően egy másodlagos, ma még ismeretlen funkcióval is bírnak.

- Megmutattuk, hogy a mikobaktérium specifikus motívum törlése a Dut felszínéről letális hatású a baktériumra nézve.
- A specifikus motívum törlése ezzel szemben az *in vitro* enzim aktivitást nem befolyásolta jelentősen, így valószínűsíthetően az általunk detektált letalitást egy még ismeretlen, feltérképezésre váró a hurok (loop) motívum közvetített interakció okozhatja.

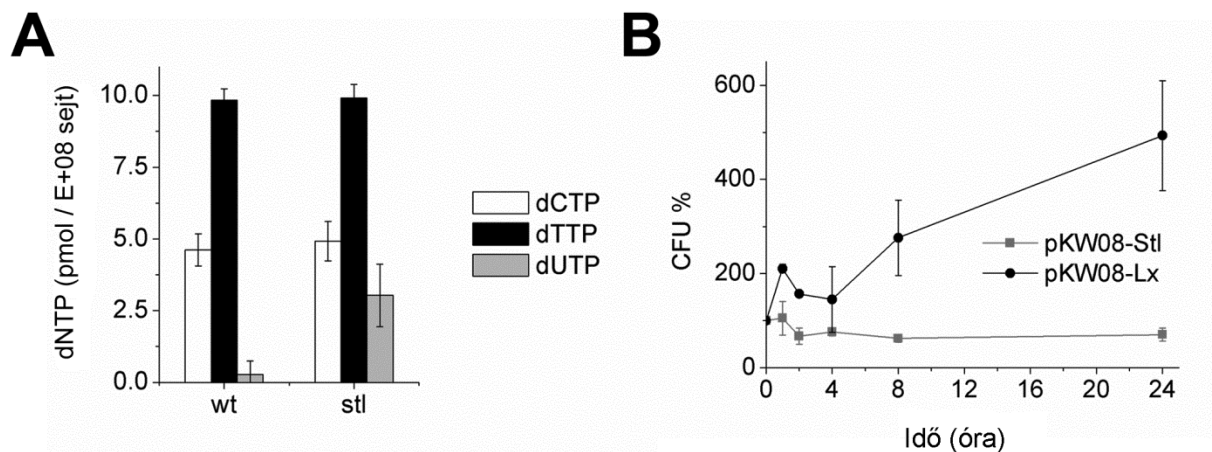
Emellett azt is megvizsgáltuk, hogy egy *Staphylococcus* patogenezitási sziget represszor fehérje, az Stl_{SaPI_{bov1}}(Stl) képes-e gátolni a dUTPáz reakciót mikobaktériumokban.



3. Ábra A.) Az Stl és a *M. tuberculosis* dUTPáz (mtDut) komplexálódása natív gélen. Az alkalmazott fehérjék koncentrációját monomerekben adtuk meg. B.) Az Stl gátló hatása a mikobakteriális dUTPáz (

mtDUT^{WT}, *mtDUT^{H145W}*) aktivitására. Az adatokat a két dUTPáz variáns gátolatlan aktivitására normáltuk. Az adatokra kvadratikus egyenletet illesztve a következő paramétereket kaptuk: látszólagos $K_i = 5,5 \pm 4,6$ nM a *mtDUT^{WT}* és $4,4 \pm 2,8$ nM a *mtDUT^{H145W}* enzimre. Az aktivitás csökkenés maximális amplitúdója $83,8 \pm 6,7$ % volt a *mtDUT^{WT}* és $87,1 \pm 5,8$ % a *mtDUT^{H145W}* enzimre.

- Eredményeink szerint a *Staphylococcus aureus* Stl és a *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz stabil komplexet képeznek, valamint a dUTPáz aktivitása ebben a komplexben erősen gátolt.
- Emellett az Stl-t mikobakteriális sejtben expresszálva a sejtbeli dUTP szint megemelkedését detektáltuk, valamint a dUTPáz inhibitor sejtbeli expressziója zavart okozott a *M. smegmatis* kolóniaképzésében.
- Ismereteink szerint ez az első irodalmi adat, amelyben különböző fajok fehérjei között működő gátlást írtak le dUTPázok esetén.



4. Ábra A.) Az *Stl*-t expresszáló törzs pirimidin nukleotid készlete. A dTTP, dUTP és dCTP nukleotid mennyiségét egy PCR alapú módszerrel határoztuk meg. A törzsekből három párhuzamos mérés átlagát és hibáját ábrázoltuk. B.) Az *Stl* expressziójának hatása a törzsek kolónia számára. A számok az indukálás óta eltelt időt jelölik órában megadva.

Eredményeink szerint az Stl potenciális általános dUTPáz inhibitor lehet, valamint fontos reagensként használhatjuk különböző *in vitro/in situ* vagy *in vivo* dUTPáz gátlási kísérletekben.

5 Irodalomjegyzék

- [1] C.K. Mathews, Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators., *FASEB J.* (2014) 1–9. doi:10.1096/fj.14-251249.
- [2] P. Nordlund, P. Reichard, Ribonucleotide reductases., *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 681–706. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443.
- [3] V. Bianchi, E. Pontis, P. Reichard, Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells., *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 4218–24.
- [4] B.G. Vértessy, J. Tóth, Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases., *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 97–106. doi:10.1021/ar800114w.
- [5] T. Visnes, B. Doseth, H.S. Pettersen, L. Hagen, M.M.L. Sousa, M. Akbari, et al., Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364 (2009) 563–8. doi:10.1098/rstb.2008.0186.
- [6] J.E. Szabó, V. Németh, V. Papp-Kádár, K. Nyíri, I. Leveles, A.Á. Bendes, et al., Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control., *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 11912–20. doi:10.1093/nar/gku882.
- [7] M.A. Tormo-Más, I. Mir, A. Shrestha, S.M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, et al., Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands., *Nature.* 465 (2010) 779–82. doi:10.1038/nature09065.
- [8] O. Barabás, V. Pongrácz, J. Kovári, M. Wilmanns, B.G. Vértessy, Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42907–15. doi:10.1074/jbc.M406135200.
- [9] I. Pécsi, J.E. Szabó, S.D. Adams, I. Simon, J.R. Sellers, B.G. Vértessy, et al., Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 14437–42. doi:10.1073/pnas.1013872108.
- [10] H.L. David, Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*., *Appl. Microbiol.* 20 (1970) 810–4. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=377053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [11] A. Horváth, B.G. Vértessy, A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e196. doi:10.1093/nar/gkq815.
- [12] P. Ferraro, E. Franzolin, G. Pontarin, P. Reichard, V. Bianchi, Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates., *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e85. doi:10.1093/nar/gkp1141.

6 Közlemények listája

6.1 A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

6.1.1 Referált szakmai folyóiratban megjelent közlemények

Pécsi Ildikó, **Hirmondó Rita**, Amanda C. Brown, Lopata Anna, Tanya Parish, Vértessy G. Beáta, & Tóth Judit (2012). The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. PLoS One, 7(5), e37461. doi:10.1371/journal.pone.0037461

Hirmondó Rita, Szabó Judit Eszter, Nyíri Kinga, Tarjányi Szilvia, Dobrotka Paula, Tóth Judit, & Vértessy G. Beáta (2015). Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal StI protein perturbs dNTP pool and colony formation in *Mycobacterium*. DNA Repair. doi:10.1016/j.dnarep.2015.03.005

6.1.2 Referált szakmai folyóiratban közlés alatt álló publikációk (megosztott első szerzők*)

Hirmondó Rita*, Lopata Anna*, Vértessy G. Beáta, & Tóth Judit. Distinct control of dNTP biosynthesis and genome integrity maintenance by dUTPases. NAR, bírálat alatt

6.2 További, a doktori értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Könnyű Balázs, Kashif S. Sadiq, Turányi Tamás, **Hirmondó Rita**, Barbara Müller, Hans-Georg Kräusslich, Peter V. Coveney, & Müller Viktor. (2013). Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. PLoS Computational Biology, 9(6), e1003103. doi:10.1371/journal.pcbi.1003103

6.3 Konferencián tartott előadások (Az előadó neve aláhúzva)

Hungarian Molecular Life Sciences 2013 (szóbeli előadás, Siófok, 2013) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B. and Tóth J.: *In vivo* enzymology: distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination

EMBO Conference on Microbiology after the genomics revolution: Genomes 2014 (poszter előadás, Pasteur Institute, Paris, France, 2014) Hirmondó R., Lopata A., Pécsi I., Vértessy B., and Tóth J.: Distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination.

EMBO|EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology (poszter előadás, EMBL Heidelberg, Germany, 2013) R. Hirmondó, A. Lopata, B.G. Vértessy and J. Tóth: Distinct control of dTTP biosynthesis and dUTP elimination in *Mycobacterium smegmatis*