



Doctoral Thesis

## **Expression, purification, crystallization and structure determination of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase**

**Author(s):**

Bohner, Thomas

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001755541> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 11775

**Expression, Purification, Crystallization and Structure  
Determination of Herpes Simplex Virus Type 1  
Thymidine Kinase**

A dissertation submitted to the  
**Swiss Federal Institute of Technology Zurich**  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Thomas Bohner**  
pharmacist (approbierter Apotheker)  
born January 27, 1966  
Stuttgart, Germany

accepted on recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner  
Dr. J. Fetzer, co-examiner  
Dr. R. Hofbauer, co-examiner

1996

## II. Summary

The development of antiviral drugs proves to be difficult because of many aspects. Firstly, the viruses are very small, which hinders their detection, and secondly, they use the metabolism of the infected cell to reproduce. In a consequence this means that agents which restrict or block the virus reproduction also influence the healthy, non-infected cells.

The thymidine kinase (TK) encoded by the herpes simplex virus type 1 (HSV 1) is an ideal target for antimetabolic agents, since it varies significantly from cellular thymidine kinase with regard to a number of functions.

To prove the idea that these differences of both thymidine kinases (HSV1 TK and cellular TK1) are related to their three-dimensional structure, methods to solve the structure of HSV1 TK were established.

First of all a quick and gentle process for the production of highly pure recombinant wildtype HSV1 TK was developed. Therefore heterologous HSV1 TK was expressed in *E. coli* (*Escherichia coli*) as an N-terminal fusion protein with glutathione-S-transferase (GST) [Fetzer 1992, 1994].

This expression process has been optimized and scaled up to a 30 liter large bacterial culture quantity so that the HSV1 TK could be produced as a GST-TK fusion protein in milligram quantities.

In order to solubilize the bacteria an automatic process was developed which enabled quick and gentle processing of the cell extracts.

The GST-TK fusion protein was purified by glutathione affinity chromatography and then cleaved directly on the affinity column with thrombin.

At the N-terminal end of the HSV1 TK sequence the thrombin unexpectedly cleaved two further peptide bonds, resulting in a truncation of the recombinant HSV1 TK of 33 amino acids compared to the wildtype

enzyme. It turned out, that this "shortened" HSV1 TK possessed identical biological characteristics as the native HSV1 TK, therefore it was possible to carry on all investigations with the recombinant truncated HSV1 TK.

In a second purification step the recombinant HSV1 TK was separated from the thrombin and from the cleavage products by ATP affinity chromatography,.

The result of this two step purification was fully active, highly pure HSV1 TK. Crystallization experiments were accomplished with this highly purified HSV1 TK according to the "hanging drop" method.

It was possible to establish conditions for crystallizing the HSV1 TK using a screening scheme with different buffers [Jancarik 1991]. These crystallization conditions were constantly improved until the crystals had a size of 350 x 250 x 250  $\mu\text{m}$ . An X-ray structure analysis was carried out on these crystals and the three dimensional structure of the HSV1 TK with its substrates ATP and thymidine was solved using MIR as well as molecular replacement methods.

Subsequently a co-purification of the HSV1 TK with the substrate analogous 5-jodo-2'-deoxyuridine (JdU) and crystallization of the complex was performed. The X-ray structure of the HSV1 TK with JdU and ATP has also been solved.

All techniques established for the purification and crystallization of the HSV1 TK were then adapted for purification of the human thymidine kinase 1 (cellular TK1). The cDNA of the human TK1 was cloned in the pGEX2T system and expressed in *E. coli* as a GST fusion protein. The obtained fusion protein was purified with a glutathione affinity column. At the same time the thrombin cleavage caused less difficulties, since no further thrombin cleavage sites were present in the human TK1. A second affinity step led to fully active highly pure human thymidine kinase 1.

### III. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Virustatika erweist sich in vielerlei Hinsicht als schwierig. Zum einen sind Viren sehr klein, was ihre Detektion oft erschwert und zum anderen benützen sie den Stoffwechsel der infizierten Zelle um sich zu vermehren, was bedeutet, dass jeder Arzneistoff, der die Virusvermehrung hemmt oder blockiert auch die gesunden, nichtinfizierten Zellen beeinflusst.

Die Thymidinkinase (TK) des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV1) ist ein ideales Ziel für Wirkstoffe, weil sie sich von der zellulären Thymidinkinase in einigen Funktionen deutlich unterscheidet.

Um diese Unterschiede für eine therapeutische Anwendung zu nutzen, war es das Ziel dieser Arbeit die dreidimensionale Struktur der HSV1 TK aufzuklären.

Zuerst wurde ein schnelles und schonendes Verfahren zur Produktion von hochreiner rekombinanter Wildtyp HSV1 TK entwickelt. Dazu wurde die HSV1 TK heterolog in *E. coli* als N-terminales Fusionsprotein mit Glutathion-S-transferase (GST) exprimiert [Fetzer 1992, 1994].

Dieses Expressionsverfahren konnte so optimiert werden, dass die HSV1 TK im Milligrammasstab als GST-TK-Fusionsprotein in einem 30 Liter Bakterienkultur umfassenden Grossansatz gewonnen werden konnte. Für das Aufschliessen der Bakterien wurde ein automatisches Verfahren entwickelt, das eine schnelle und schonende Verarbeitung der angefallenen Zellextrakte ermöglichte.

Das GST-TK-Fusionsprotein wurde über einen Glutathion-Affinitätschromatographieschritt gereinigt und direkt auf der Affinitätssäule mit Thrombin gespalten.

Zu Beginn der HSV1 TK-Sequenz spaltete das Thrombin unerwarteterweise zwei weitere Peptidbindungen, so dass die

rekombinante HSV1 TK N-terminal um insgesamt 33 Aminosäuren kürzer war als die Native. Dadurch, dass diese „verkürzte“ HSV1 TK dieselben biologischen Eigenschaften hatte wie die native HSV1 TK, konnte mit der „kurzen“ HSV1 TK weitergearbeitet werden.

In einem zweiten Reinigungsschritt wurde die rekombinante HSV1 TK dann mittels ATP-Affinitätschromatographie von Thrombin und den kleineren, durch die Thrombinspaltung verursachten, Spaltstücken abgetrennt.

Das Ergebnis dieser zweistufigen Reinigung war vollständig aktive, hochreine HSV1 TK. Mit dieser hochgereinigten HSV1 TK wurden Kristallisationsexperimente nach der „Hanging-Drop“-Methode durchgeführt.

Es konnten Bedingungen gefunden werden, die zu einer Kristallisation der HSV1 TK geführt haben. Diese Kristallisationsbedingungen wurden immer wieder verfeinert bis die Kristalle eine Grösse von 350 x 250 x 250 µm hatten. Mit diesen Kristallen wurde eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt und die dreidimensionale Struktur der HSV1 TK mit ihren Substraten ATP und Thymidin aufgeklärt.

Danach wurde eine Coreinigung der HSV1 TK mit dem Substratanalogon 5-jodo-2'-deoxyuridin (JdU) und anschliessender Kristallisation durchgeführt. Die Röntgenstruktur der HSV1 TK mit JdU und ATP konnte ebenfalls gelöst werden.

Alle Methoden, die für die Reinigung und Kristallisation der HSV1 TK etabliert wurden, konnten daraufhin an die humane Thymidinkinase 1 angepasst werden. Die cDNA der humanen TK 1 (zelluläre TK1) wurde in das pGEX2T-System kloniert und in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert. Das erhaltene Fusionsprotein wurde über eine Glutathion-

Affinitätssäule gereinigt. Die Thrombinspaltung bereitete dabei weniger Schwierigkeiten als bei der HSV1 TK, da in der humanen TK1 keine weiteren Spaltstellen für Thrombin vorhanden waren. Ein zweiter Affinitätsschritt führte zu vollständig aktiver, hochreiner, humaner Thymidinkinase 1.