

Dissertation ETH No. 13456

**Structure elucidation of viral and human  
Thymidine kinases and Enolase  
from *Alternaria alternata***

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

presented by

**Andrea E. Prota**

Pharmacist (Eidg. dipl. Apotheker)  
ETH Zürich

born January 12th, 1969  
citizen of Spreitenbach, Switzerland  
&  
Villafranca in Lunigiana, Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner  
Dr. L. Scapozza, co-examiner  
Dr. O. Zerbe, co-examiner

**1999**

## SUMMARY

Thymidine kinase (TK) catalyzes via the so-called thymidine salvage pathway the phosphorylation of thymidine (dT) to thymidine monophosphate in the presence of adenosine triphosphate (ATP) and magnesium ions. Based on their physico-chemical characteristics TKs are subdivided into two groups, the type I and type II TKs. A representative of the type I TK is *herpes simplex virus type 1* (HSV 1) TK that exhibits a broad substrate diversity and phosphorylates not only pyrimidine analogs (e.g. BVdU and IdU) but also guanine and adenine analogs. Furthermore, it accepts bases carrying acyclic or carbocyclic sugar moiety substituents. In contrast, the human cellular TK, a representative of the type II TK, exhibits a rather high substrate specificity and accepts only pyrimidine substrate analogs and restricted changes in the sugar moiety. The difference in substrate acceptance is crucial for therapeutic applications linked to TK. TK established itself as a major tool in many applications such as gene therapeutical treatment of cancer and AIDS, as a control system in allogeneic bone marrow transplantation and AIDS vaccine, as an expression reporter gene and is an important target in antiviral therapy.

The main aspect of this work is the exploration of the differences in substrate specificity between the viral and the host cell TKs at a structural level by X-ray crystallography. These new structural details would provide us with a base for rational design of new tailor-made substrates and mutants to improve the efficacy of antiviral therapy and anticancer gene therapy.

The human cytosolic TK1 was expressed in full-length or the C-terminally truncated mutant ( $\Delta 40$ TK1) in *E.coli* BL21 as the thrombin- or PreScission-cleavable glutathion-S-transferase-fusion protein, as well as in *E.coli* XL-1 blue as the his-tag-protein. With the exception of the deletion mutant, all other forms of the enzyme showed sequence heterogeneity, detected as double bands by SDS-PAGE, coming from the heterogeneous expression in *E.coli*. These protein forms were characterized by their tendency to aggregate thereby preventing crystallization. These issues were successfully addressed by the creation of a fully active deletion mutant, which could be purified by affinity chromatography.

The active site mutants Q125N, Y101F and H58LM128FY172F of HSV 1 TK were also expressed in *E.coli* BL21 as thrombin-cleavable glutathion-S-transferase-fusion proteins. They were purified to homogeneity in a single step procedure by affinity chromatography. For activity screenings a coupled UV-spectrophotometric assay involving pyruvate kinase and lactate dehydrogenase was applied. To quantify substrate conversion an established HPLC assay was used. The monodispersity of the proteins was analyzed either by FPLC or by dynamic light scattering (DLS).

The first target of crystallization was human TK1, which finally crystallized as the engineered fully-active deletion mutant. That allowed to prevent precipitation linked to instability or inhomogeneity. The crystals obtained did not diffract X-rays due to their small size. Attempts to increase their size were not successful. Nevertheless, the crystallization experiments with this enzyme provided us with notable experience in this field that was successfully applied in further crystallization experiments.

One of these experiments represented also the second target of this work and consisted in the elucidation of several active-site mutants of HSV 1 TK. Two of them were crystallized under conditions similar to those used for the wild type enzyme. Q125N was crystallized in complex with the natural substrate thymidine, while Y101F and the wild-type enzyme formed complexes with (N)-methanocarba-thymidine, an antiviral drug with a conformationally restricted pucker of the sugar ring. The structures of the two HSV1 TK mutants were solved to 2.4Å resolution whereas the wild-type structure was refined to 1.7Å resolution. All crystallographic data were collected under cryogenic conditions. The final models were built using molecular replacement and provided us fundamental insights into the role of water and of different amino acid residues during catalysis. Furthermore, we were able to gain a better understanding of the broad substrate acceptance of HSV 1 TK and of the effect of a conformationally restricted sugar-like moiety.

A further aspect of this work was the necessity to gain structural knowledge of the enolase from *Alternaria alternata* in order to identify the enzyme's epitope responsible for the allergic reaction with the IgE. This enzyme shares a high degree of sequence identity with known enolases from yeast and other not related

fungi, and was reported to be a major trigger of mould allergies of the respiratory tract. The enolase from *Alternaria alternata* and enolase extracts from yeast have shown immunological cross-reactivity with patients' IgE. Interestingly, the enolase from yeast was not reported to cause allergies. New insights into the structural details of this enzymes will broaden our knowledge in understanding fungal allergies.

The recombinant enolase from *Alternaria alternata* was available for us as lyophilized enzyme. Crystallization screenings were set up using standard methods. The enzyme could be crystallized, but could unfortunately not be grown to a size amendable to single-crystal diffraction.

In conclusion, the presented work was dedicated to crystallization of TK and enolase and allowed the elucidation of four new structures providing useful information for the rational design of resistance repellent drugs for antiviral therapy and for the development of new tailor made mutants and substrates for gene therapy.

## ZUSAMMENFASSUNG

Thymidinkinasen (TK) katalysieren die Phosphorylierung von Thymidin (dT) zu Thymidinmonophosphat über den sogenannten „*salvage pathway*“ unter Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) in Anwesenheit von Magnesiumionen. Die Thymidinkinasen sind aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt: die Thymidinkinasen vom Typ I und vom Typ II. Ein typischer Vertreter der Typ I TKs ist die *Herpes Simplex Virus Typ 1* Thymidinkinase (HSV 1 TK). Sie besitzt die Eigenschaft, nicht nur das natürliche Substrat Thymidin, sondern auch eine ganze Reihe weiterer Substrate wie zum Beispiel Guanosin- und Adenosinanaloga zu phosphorylieren. Im Gegensatz dazu besitzt die humane zytosolische Thymidinkinase, ein Vertreter der Typ II TKs, ein eher beschränktes Substratspektrum und akzeptiert nur Pyrimidinanaloga und minimale Variationen der Zuckereinheit. Dieser Unterschied bezüglich der Substratspezifität bildet den Grundstein für verschiedene Therapieansätze in der antiviralen und der Gentherapie von Tumoren.

Der Hauptaspekt dieser Arbeit ist die Erforschung der Unterschiede in der Substratspezifität zwischen viralen und zellulären Thymidinkinasen auf Strukturebene mittels Röntgenkristallographie. Diese neuen strukturellen Details liefern uns wichtige Informationen für die rationale Entwicklung neuer massgeschneiderter Substrate und Enzyme mit dem klaren Ziel, den Erfolg der existierenden therapeutischen Ansätze in der antiviralen und der Krebstherapie zu verbessern.

Die humane Thymidinkinase wurde sowohl als ganzes, als auch C-terminal verkürztes Enzym ( $\Delta 40\text{TK1}$ ) in *E.-Colibakterien* als Fusionsprotein exprimiert, das mit Thrombin oder einer PreScission Protease spaltbar ist. Zusätzlich wurde die humane TK1 auch als His-tag-Protein exprimiert. Alle erzeugten Enzyme, bis auf die verkürzte Form, zeigten Sequenz-Heterogenität, die mittels SDS-Gelelektrophorese in Form von Doppelbanden detektiert werden konnte. Diese Inhomogenität war auf die heterogene Expression in *E.-Colibakterien* zurückzuführen. Diese Proteine neigten sehr stark zur Bildung unterschiedlicher Aggregate und stellten somit ein Hindernis für die Kristallisation dar. Durch die

Konstruktion des C-terminal verkürzten Enzymes wurde dieses Hindernis überwunden und das Protein konnte via Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Die HSV 1 TK-Mutanten Q125N, Y101F und H58LM128FY172F wurden auch in E.-Colibakterien als Thrombin-spaltbare Fusionsproteine exprimiert und via Affinitätschromatographie gereinigt. Die Aktivität der gereinigten Enzyme wurde UV-spektrophotometrisch mittels einer Enzym-gekoppelten Reaktion mit Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase getestet. Die Charakterisierung der Substratumsetzung wurde mittels HPLC durchgeführt. Die Monodispersität des Proteins wurde entweder mittels FPLC oder *Dynamic Light Scattering (DLS)* analysiert.

Das erste Zielenzym der Kristallisation war die humane Thymidinkinase, die nach Beseitigung der oben erwähnten Hindernisse wie Aggregation und Inhomogenität als C-terminal verkürztes Enzym kristallisiert werden konnte. Die Kristalle streuten allerdings nicht ausreichend gut im Röntgenstrahl, was auf ihre kleine Grösse zurückzuführen war. Alle Versuche, die gemacht wurden, um die Kristalle zu vergrössern, schlugen fehl. Trotzdem wurden mit den durchgeführten Experimenten viel Erfahrungen gesammelt, die dann bei den weiteren Kristallisationsexperimenten positiv umgesetzt werden konnten.

Eines dieser weiteren Experimente war die Kristallisation der HSV 1 TK-Mutanten. Zwei davon wurden erfolgreich kristallisiert. Die Mutante Q125N wurde als Komplex mit dem natürlich vorkommenden Substrat Thymidin kristallisiert, und die Mutante Y101F und die wild-Typ TK als Komplex mit (N)-Methanocarbathymidin, einem antiviralen Stoff mit einem in seiner Konformation fixierten Zuckerring. Die Strukturen der Mutanten wurden bei 2.4Å, die der wild-Typ TK bei 1.7Å gelöst. Alle kristallographischen Daten wurden unter Cryo-Bedingungen gesammelt. Die Modelle wurden unter Verwendung der Methode des „*molecular replacement*“ gebaut. Diese Strukturen lieferten uns fundamentale Erkenntnisse über die Funktion von Wasser und bestimmten Aminosäuren während der katalytischen Reaktion im aktiven Zentrum des Enzyms und führten zu einem besseren Verständnis der breiten Substratspezifität der HSV 1 TK auch in bezug auf den Effekt von rigidisierten Zuckereinheiten.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Erlangung struktureller Informationen über die Enolase von *Alternaria alternata*. Hiermit wird es möglich, die Epitope des Enzyms zu charakterisieren, die für die allergische Reaktion mit IgE verantwortlich sind. Dieses Enzym zeigt hohe Sequenzidentität mit anderen Enolasen aus Hefen und anderen nicht verwandten Pilzen. Sie wurde als eine der wichtigsten Auslöser für Allergien des Respirationstraktes erkannt. Versuche mit dieser Enolase und der Enolase aus Hefeextrakten haben Kreuzreaktivität mit IgE von sensibilisierten Patienten gezeigt. Interessanterweise zeigt die Enolase von Hefe keine allergischen Eigenschaften. Neue Einsichten in strukturelle Details dieser Enzyme werden unsere Kenntnis über die Entstehung solcher Allergien erweitern.

Die rekombinante Enolase aus *Alternaria alternata* war als Lyophilisat erhältlich. Kristallisations-Experimente wurden unter Verwendung von Standardmethoden durchgeführt. Das Enzym wurde zwar kristallisiert, konnte aber nicht in einer Grösse erhalten werden, die für die Messung eines X-Ray Datensatzes geeignet wäre.

Schlussfolgernd erlaubt diese Arbeit, die der Kristallisation von Thymidinkinasen und der Enolase gewidmet war, die Diskussion von vier neuen Strukturen, die uns nützliche Informationen geliefert haben für die rationale Entwicklung von neuen antiviralen Arzneistoffen. Diese sind auch gegen resistente Viren wirksam. Ferner erhielten wir hilfreiche Erkenntnisse für die Entwicklung von massgeschneiderten Enzymen und Substraten für den Einsatz in der Gentherapie.