



Doctoral Thesis

The crystal structure of human cytosolic thymidine kinase and its biochemical characterisation

Author(s):

Birringer, Markus Stephan

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004941409> →

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](#).

Dissertation ETH No. 15919

**The Crystal Structure of
Human Cytosolic Thymidine Kinase
and its Biochemical Characterisation**

A dissertation submitted to the
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF
TECHNOLOGY ZURICH**
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Markus Stephan Birringer

Approbierter Apotheker

born 12. 02. 1974

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner

Prof. Dr. L. Scapozza, co-examiner

2005

Summary

Deoxyribonucleotides are essential for nearly all living organisms for the replication and repair of DNA. The deoxyribonucleotides can be provided by *de novo*-synthesis and the salvage pathway, which recycle deoxyribonucleotides from metabolic decomposition or from enteral resorption. Human cytosolic thymidine kinase (hTK1) is the key enzyme of the salvage pathway, catalysing the γ -phosphate transfer from ATP to deoxythymidine yielding deoxythymidine monophosphate. After further activation to the triphosphorylated form, this DNA precursor is implemented into DNA.

In contrast to other thymidine kinases, hTK1 exhibits a high substrate specificity and phosphorylates only pyrimidine substrate analogues with restricted changes in the sugar moiety. This difference in substrate acceptance is exploited in many diagnostic and therapeutic applications of diseases. Moreover, hTK1 shares a high sequence identity with enzymes of other therapeutic relevant organisms and viruses, thus it reveals the structural information for homology modeling of other thymidine kinases.

Therefore, the main aspect of this work was the crystal structure solution of hTK1.

In order to achieve this, the wild type hTK1, as well as a truncated form of the enzyme (hTK1M) carrying deletions at the N- and C-terminal regions, were cloned as His₆-tagged fusion proteins. Expression, isolation and purification protocols have been established. They allow the production of large quantities of soluble, highly pure and active wild type and modified hTK1 constructs.

The wild type enzyme and hTK1M were biochemically characterized and showed pronounced enzymatic stability over a broad range of pH, temperature and ionic strength. The thermal stability for both constructs is similar with a T_m of 78°C. The studies showed, that wild type hTK1 is a tetramer in solution. In contrast, the truncated construct hTK1M appears to be a dimer. Kinetic studies show a K_M of 0.51 μM and k_{cat} of 0.28 s^{-1} for wild type hTK1 and a K_M of 0.87 μM and k_{cat} of 1.65 s^{-1} for the truncated form of the enzyme. The biochemical data helped to improve the crystallisation buffers. After testing numerous crystallisation conditions and with the help of different crystallisation techniques, nice and well diffracting hTK1M crystals were obtained.

The structure of hTK1M in complex with its feedback inhibitor 2'-deoxythymidine-5'-triphosphate (dTTP) was determined at 1.8 Å resolution. This structure is the first representative of the type II thymidine kinases found in several pathogens. The structure deviates strongly from the known structures of type I thymidine kinases such as the *Herpes simplex* viral enzyme. It contains a zinc-binding domain with four cysteins complexing a structural zinc ion.

VI

Interestingly, the backbone atoms of the type II enzyme bind the substrate thymine via hydrogen-bonds, in contrast to type I, where side chains are involved. This results in a specificity difference exploited for antiviral therapy. The presented structure will foster the development of new drugs and prodrugs for numerous therapeutic applications.

Zusammenfassung

Die meisten lebenden Organismen benötigen Deoxyribonukleotide zur Replikation und Reparatur von DNS. Diese können dem Organismus über die *de novo*-Synthese und den “salvage pathway”, welche die Desoxyribonukleotide aus dem Metabolismus oder aus der enteralen Resorption rezyklieren, zur Verfügung gestellt werden. Die humane cytosolische Thymidinkinase (hTK1) ist das Schlüsselenzym des “salvage pathway” und katalysiert die Phosphorylierung von Thymidin zu Thymidinmonophosphat unter Verbrauch von ATP. Nach weiterer Aktivierung zum Triphosphat wird es in die DNS eingebaut.

Im Gegensatz zu anderen Thymidinkinasen hat die hTK1 eine sehr hohe Substratspezifität und phosphoryliert nur Pyrimidinsubstratanaloga mit geringfügigen Änderungen des Zuckeres. Diese Besonderheit wird für viele diagnostische Verfahren und bei der Therapie von Krankheiten genutzt.

Darüber hinaus zeigt die hTK1 eine grosse Sequenzübereinstimmung mit vielen Enzymen von verschiedenen Organismen und Viren, die therapeutisch sehr interessant sind. Die hTK1 beinhaltet deshalb die strukturelle Information für das “Homology Modeling” für viele andere Thymidinkinasen, deren Struktur noch nicht gelöst ist.

Aus diesen Gründen war das Ziel dieser Arbeit die Lösung der Kristallstruktur der hTK1.

Um dies zu erreichen wurden die Wildtyp-Form der hTK1 und eine modifizierte Variante mit Verkürzungen am N- und C-Terminus (hTK1M) als His₆-tag-Fusionsproteine kloniert. Die Protokolle zur Expression, Isolierung und Reinigung der hTK1 wurden entwickelt und erlauben die Produktion von grossen Mengen an löslichem, reinem und aktivem Enzym.

Durch die biochemische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Form des Enzyms und das Konstrukt hTK1M über eine hohe enzymatische Stabilität innerhalb eines grossen pH-Bereichs, bei unterschiedlichen Temperaturen und bei niedriger sowie hoher Ionenstärke verfügen. Beide hTK1 Konstrukte zeigen ähnliche Temperaturstabilität mit einem Schmelzpunkt T_m von 78°C. Das Wildtyp-Enzym liegt in Lösung als Tetramer vor, wohingegen das modifizierte Konstrukt hTK1M ein Dimer ist. Kinetische Untersuchungen zeigen einen K_M von 0.51 μM und k_{cat} von 0.28 s^{-1} für das Wildtyp-Enzym und einen K_M von 0.87 μM und k_{cat} von 1.65 s^{-1} für das verkürzte Konstrukt hTK1M. Die gesammelten biochemischen Daten waren hilfreich bei der Verbesserung der Kristallisationspuffer. Nachdem eine Vielzahl verschiedener Kristallisationsbedingungen getestet worden waren, gelang es mit Hilfe unterschiedlicher Kristallisationstechniken, gut streuende hTK1M Kristalle zu züchten.

Die Struktur der hTK1M im Komplex mit dem Feedback-Inhibitor 2'-Deoxythymidine-5'-triphosphate (dTTP) wurde mit einer Auflösung von 1.8 Å gelöst.

VIII

Diese Struktur ist der erste Repräsentant einer Typ II Thymidinkinase, die in vielen Pathogenen vertreten ist. Sie weist grosse Unterschiede zu den Typ I Thymidinkinasen auf, wie z.B. dem viralen Enzym des *Herpes simplex*. Die hTK1 enthält eine Zinkbindungsdomäne mit vier Cysteinen, die ein Zinkion komplexieren. Interessanterweise bindet das Typ II Enzym das Substrat Thymidin mittels Wasserstoffbrücken über die Hauptkettenatome, im Gegensatz zu den Typ I Enzymen, wo dies über die Seitenketten geschieht. Dies führt zu den bekannten Spezifitätsunterschieden, die für die antivirale Therapie genutzt werden. Die gelöste Struktur wird die Entwicklung von neuen Arzneistoffen und Prodrugs für viele therapeutische Anwendungen fördern und nachhaltig positiv beeinflussen.