ETH zürich

ETH Library

Thermodinamic characterization of protein/ligand-interactions of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and the periplasmic domain of the histidine autokinase CitA

Doctoral Thesis

Author(s):
Perozzo, Remo

Publication date:
1999

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-003886133

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. 13350

Thermodynamic Characterization of Protein/Ligand-Interactions of Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase and the Periplasmic Domain of the Histidine Autokinase CitA

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

presented by

Remo Perozzo

Pharmacist (Eidg. dipl. Apotheker)
ETH Zurich

born November 19th, 1968
citizen of Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Dr. L. Scapozza, co-examiner
Dr. I. Jelesarov, co-examiner

1999

Summary

Understanding of molecular recognition processes as in substrate and inhibitor binding, receptor and ligand binding or protein-protein interactions requires a complete characterization of the binding energetics and correlation of thermodynamic data with interacting structures involved. A quantitative description of the forces that govern molecular associations include determination of changes of all thermodynamic parameters, including free energy of binding (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) of binding and the heat capacity change (ΔCp). Such a close insight into the binding process is of significant and practical interest, since it provides the fundamental know-how for development of structure-based molecular design strategies. Isothermal titration calorimetry (ITC) has emerged as the premier tool for characterizing interactions in terms of thermodynamic parameters.

The main aspect of the present work is the investigation and elucidation of binding characteristics from a thermodynamic point of view, exemplified for two different systems. The first system discusses the ligand-enzyme interactions of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1 TK) with respect to all elementary steps forming the catalytically competent state. As for ligand-receptor interactions, the second focus of this work is the investigation of the sensory properties of the periplasmic domain (CitAP) of the histidine autokinase CitA.

Thymidine kinase is a key enzyme in the pyrimidine salvage pathway catalyzing the γ-phosphate transfer from ATP to thymidine (dT) in presence of magnesium cations to form thymidine monophosphate (dTMP). HSV1 TK has become an important target in medicinal chemistry because of its links with therapy of viral infections and gene therapy of cancer and AIDS. Thus, the accurate knowledge of the binding properties of HSV1 TK is a prerequisite for rational drug design of new and effective compounds for antviral and antitumor therapy. The wild-type and mutant enzymes of HSV1 TK were expressed as thrombin cleavable glutathione S-transferase fusion proteins using E. coli. BL21 as the host. Activity studies and kinetic measurements showed enhanced stability of the fusion protein compared to cleaved HSV1 TK. Thus, a single-step purification protocol (affinity chromatography) has been established to yield high amounts of active and ligand free fusion protein. Conditions

for ITC measurements were subsequently optimized and verified in order to avoid possible systematic errors.

ITC has been used to investigate the binding energetics of the natural substrate dT and natural cofactor ATP to HSV1 TK, either in isolation or in presence of the other ligand, in the temperature range of 10-25°C. The results of the thermodynamic measurements show that dT is bound in the micromolar range (K_D 5.3 µM; pH 7.5). Under the same conditions no binding of ATP is detectable. The measurement of the binary complexes showed a dramatic increase of affinity of both dT and ATP (46 nM and 0.26 µM, respectively). Associations are driven by favorable enthalpy changes while the entropic contributions are large and negative over the whole temperature range. The temperature dependent binding enthalpy revealed heat capacity changes in the range of 140 to 520 $calK^{-1}mol^{-1}$.

Experimentally obtained thermodynamic quantities were linked by structure-based thermodynamic analysis to the known structure of the ternary HSV1 TK:dT:ATP complex. The pronounced changes in heat capacity as well as the observed unfavorable entropy changes indicate a sequential binding pathway, which is possibly realized by structural rearrangements of the enzyme coupled to binding of substrate and cofactor. In analogy to other nucleotide kinases, we propose a large movement of the dT binding domain and a smaller but still substantial movement of the LID domain, with the protein going from an empty (open) and less ordered conformation to a closed and compact one. Calorimetric studies of HSV1 TK harboring mutations in the residue triad H58/M128/Y172 demonstrate the strength of the calorimetric approach. Inactive mutants (M128F, M128F/Y172F) that were not distinguishable from each other by kinetic measurements, have shown to lose phosphorylation activity due to extensive alterations in binding mechanisms. Affinity is reduced by more than two orders of magnitude with much less favorable enthalpic contributions. In contrast, entropic contributions become less unfavorable, with the double mutant M128F/Y172F exhibiting even positive entropy of binding. The triple mutant H58L/M128F/Y172F regains phosphorylation activity which is also mirrored in the thermodynamic parameters revealing similar values as for the wild type enzyme. This further corroborates the importance of the interplay between binding and structural rearrangement of substrate and cofactor binding of HSV1 TK.

CitA is 547 amino acids in length and is composed of an aminoterminal periplasmic domain (131 amino acids), cytoplasmic domain, and a carboxyterminal cytoplasmic

kinase domain harboring the autophoshorylable histidine residue. It is the sensor kinase of the two-component regulatory system CitAB of *K. pneumoniae*, which is responsible for the induction of responsible enzymes involved in citrate fermentation under anaerobic conditions. The activation of the two-component regulatory system occurs in presence of citrate.

For this work, the receptor was provided in form of the recombinantely overproduced periplasmic domain with a C-terminally attached histidine tag ($CitAP_{His}$). Similarly to HSV1 TK, optimal ITC conditions have been established for this system to elucidates the binding characteristics of $CitAP_{His}$.

Purified $CitAP_{His}$ binds citrate with high affinity (K_D 5 μM, pH 7) in a 1:1 stoichiometry. In contrast, neither isocitrate nor tricarballylate exhibit demonstrable binding. Association is driven by a favorable enthalpy change while the entropic contribution is large and negative. The pH-dependence of the binding reaction indicated that the dianionic form H-citrate^{2-} is the recognized species . In the presence of Mg^{2+} ions the dissociation constant significantly increased, suggesting that the Mg-citrate complex is not bound by $CitAP_{His.}$ The result of this work reveals that the periplasmic domain of CitA is as a highly specific citrate receptor.

This work confirms that ITC is valuable method for characterizing recognition processes of small ligand and biological macromolecules. The informational content of thermodynamic data is large, and it is anticipated that it will play an important role in the elucidation of binding mechanisms and, through the link to structural data, also in rational drug design.

Zusammenfassung

Die Beschreibung von molekularen Erkennungsprozessen, wie sie bei der Bindung von Substraten und Inhibitoren, bei Rezeptor/Ligand- oder Protein/Protein-Wechselwirkungen stattfinden, bedarf der umfassenden Charakterisierung aller zur Bindung beitragenden Kräfte. Die quantitative Beschreibung der dirigierenden Kräfte schliesst die Bestimmung aller thermodynamischer Parameter mit ein: Änderungen der freien Bindungsenergie (ΔG), der Bindungsenthalpie (ΔH), der Entropie (ΔS) und der Wärmekapazität (ΔCp). Die Korrelation dieser Daten mit den beteiligten Strukturen auf molekularer Ebene bietet einen tiefen Einblick in Bindungsprozesse und liefert fundamentales Wissen zur Entwicklung von Strategien zum Rational Drug Design. In diesem Zusammenhang hat sich die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) als Methode erster Wahl zur Bestimmung und Beschreibung von molekularen Wechselwirkungen auf der Basis von thermodynamischen Parametern etabliert.

Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung und die Aufklärung von Bindungseigenschaften aus einem thermodynamischen Blickwinkel, gezeigt an zwei verschiedenen Systemen. Ein erstes System befasst sich mit Enzym/Ligand-Wechselwirkungen der Thymidinkinase des Herpesvirus Typ 1 (HSV1 TK) bezüglich aller elementaren Bindungsschritte, die zum katalytisch kompetenten Komplex führen. Als Beispiel für Rezeptor/Ligand-Interaktionen dient die periplasmatische Domäne (CitAP) der Histidin-Autokinase CitA, deren sensorischen Eigenschaften bezüglich Citrat, Isocitrat und Tricarballylat untersucht worden ist.

Thymidinkinase ist das Schlüsselenzym zur metabolischen Wiederverwertung von Pyrimidinen, wobei durch die Übertragung des endständigen Phosphatrestes von Adenosintriphosphat (ATP) auf Thymidin (dT) in Gegenwart von Magnesiumkationen Thymidinmonophosphat entsteht. Zwischen HSV1 TK und der Behandlung von viralen Erkrankungen sowie der Gentherapie von Krebs und AIDS wurde ein Zusammenhang gefunden, weshalb das Enzym zu einem interessanten Zielobjekt für die medizinische Forschung geworden ist. Unter diesen Umständen ist es von grossem Interesse, präzise und detaillierte Angaben über die Bindungseigenschaften von HSV1 TK zu erhalten, um mittels rationalem Wirkstoffdesign neue und effiziente Wirkstoffe für die antivirale und antineoplastische Therapie zu entwickeln. Dazu

wurden Wildtyp und Mutanten der HSV1 TK in Form des Glutathion S-Transferase-Fusionsproteins exprimiert und gereinigt. Da Aktivitätsstudien und kinetische Messungen eine bessere Stabilität für das Fusionsprotein zeigten, wurde eine einstufige Reinigungsprozedur, basierend auf Affinitätschromatographie, zur Reinigung und isolierung von aktivem und ligandfreiem Fusionsprotein etabliert. Kalorimetrische Messbedingungen wurden fortlaufend optimiert und mittels verschiedener Methoden auf systematische Fehler untersucht.

Mittels ITC wurden die Bindungseigenschaften des natürlichen Substrates dT und des Kofaktors ATP an HSV1 TK im Temperaturbereich von 10°C bis 25°C untersucht, jeweils mit ligandfreiem Enzym und mit den korrespondierenden binären Mischungen. Die Resultate zeigen, dass dT im mikromolaren Bereich (K_D 5.3 μM; pH 7.5) bindet, während unter den gleichen Bedingungen keine Bindung von ATP detektiert werden kann. Die binären Mischungen hingegen zeigen stark erhöhte Affinität für dT und ATP (46 nM bzw. 0.26 μM). Im untersuchten Temperaturbereich werden alle Wechselwirkungen von günstigen enthalpischen und ungünstigen entropischen Beiträgen dominiert. Die Enthalpiewerte erwiesen sich in allen Versuchen als stark temperaturabhängig mit Werten für ΔCp zwischen -140 bis -510 $calK^{-1}mol^{-1}$.

Die Korrelation von experimentellen Daten mit der Kristallstruktur des ternären HSV1 TK:dT:ATP Komplexes lässt den Schluss zu, dass die starken Änderungen der Wärmekapazität und der Entropie bei der Bindung von Substrat und Kofaktor sowohl auf einen sequentiellen Bindungsmechanismus, als auch auf eine signifikante Strukturänderung des Enzyms zurückzuführen sind. In Analogie zu anderen Nukleotidkinasen geht die HSV1 TK von einer leeren, offenen und weniger geordneten in eine geschlossene, kompakte Konformation über. Diese Konformationsänderung wird durch eine grosse Bewegung in der NMP_{bind}-Domäne und durch eine weniger ausgedehnte Bewegung in der LID-Domäne verursacht. Anhand von kalorimetrischen Studien von Mutanten der Aminosäuren-Triade H58/M128/Y172 konnte die Bedeutung des thermodynamischen Ansatzes gezeigt werden. Der Aktivitätsverlust der inaktiven Mutanten (M128F; M128F/Y172F), die sich durch kinetischen Messungen nicht voneinander unterscheiden lassen, ist auf massive und für jede Mutante unterschiedliche Änderungen des Bindungsmechanismus zurückzuführen. Die Affinität ist um zwei Grössenordnungen

reduziert und die günstigen enthalpische Beiträge sind stark reduziert. Insgesamt ist aber der ungünstige entropische Beitrag geringer, und die Doppelmutante M128F/Y172F zeigt sogar einen positiven Einfluss. Die Tripelmutante H58L/M128F/Y172F erlangt die Aktivität zurück. Das widerspiegelt sich auch in den thermodynamischen Parametern, werden doch ähnliche Werte wie für den Wildtyp gefunden. Diese Beobachtungen zeigen nochmals die Wichtigkeit des Zusammenspiels von Bindung und strukturellen Anpassungen bei der Interaktion von Substrat und Kofaktor mit HSV1 TK.

CitA ist ein 547 Aminosäuren langes Protein, bestehend aus einer aminoterminalen periplasmatischen Domäne (131 Aminosäuren), einer cytoplasmatischen Domäne, und einer carboxyterminalen Kinase-Domäne, die das autophosphorylierbare Histidin trägt. CitA ist die Sensorkinase des Zweikomponenten-Regulationssystems CitAB von *K. pneumoniae*, das für die Induktion der Enzyme des Citrat-Stoffwechsels unter anaeroben Bedingungen verantwortlich ist, wobei die Aktivierung in Gegenwart von Citrat erfolgt.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Rezeptor in Form der rekombinant exprimierten und mit einem Polyhistidinrest modifizierten periplasmatischen Domäne ($CitAP_{His}$) eingesetzt. Analog zu HSV1 TK wurde ein experimentelles System etabliert, um die Bindungseigenschaften mittels ITC untersuchen zu können.

Gereinigtes $CitAP_{His}$ bindet Citrat mit hoher Affinität (K_D 5 µM; pH 7) und mit einer 1:1 Stöchiometrie. Unter gleichen Bedingungen binden Citratanaloge wie Isocitrat und Tricarballylat nicht. Die Interaktion zeichnet sich durch günstige enthalpische und unvorteilhafte entropische Beiträge aus. In Gegenwart von Magnesiumkationen ist die Bindung signifikant reduziert. Die Affinität ist pH-abhängig, und es konnte gezeigt werden, dass die dianionische Form H-Citrat^{2-} erkannt wird und der Mg:Citrat-Komplex nicht an $CitAP_{His}$ bindet. Die periplasmatische Domäne von CitA kann somit als ein hochspezifischer Citrat-Rezeptor bezeichnet werden.

Diese Arbeit zeigt deutlich, wie wertvoll die ITC für die Charakterisierung von Wechselwirkungsprozessen von kleinen Ligandmolekülen mit biologischen Makromolekülen ist. Thermodynamische Daten liefern viele Informationen, und es darf angenommen werden, dass die ITC in Zukunft einen hohen Stellenwert einnehmen wird, wenn es um die Aufklärung von Bindungsmechanismen und um rationales Wirkstoffdesign geht.