

University of Groningen

Biochemical and functional characterization of Nudix hydrolase enzymes with novel regulatory roles in Gram positive methylotrophic bacteria

Kloosterman, Harmen

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Kloosterman, H. (2005). *Biochemical and functional characterization of Nudix hydrolase enzymes with novel regulatory roles in Gram positive methylotrophic bacteria*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 8

Summary and Concluding Remarks

Chapter 9

Samenvatting

De familie van Nudix hydrolase enzymen omvat een groep verwante eiwitten die een specifieke chemische omzetting in nucleotieden kunnen faciliteren. In dit proefschrift worden twee leden van deze eiwit familie beschreven met een regulerende functie. De kennis over de functies van Nudix hydrolase enzymen is in veel gevallen beperkt tot het substraat dat door leden van deze eiwit familie wordt omgezet. In deze studie worden twee Nudix hydrolase enzymen beschreven, waarvan niet alleen het nucleotide dat wordt omgezet is vastgesteld, maar er is ook gepoogd een antwoord te vinden op de vraag wat het nut van deze omzetting is voor het organisme waarvan zij deel uitmaken: In de eerste plaats is dit het activator eiwit van een methanol dehydrogenase enzym uit de bacterie *Bacillus methanolicus*, en in de tweede plaats de Nudix hydrolase welke gecodeerd wordt door het pMEA300 plasmide van de bacterie *Amycolatopsis methanolica*.

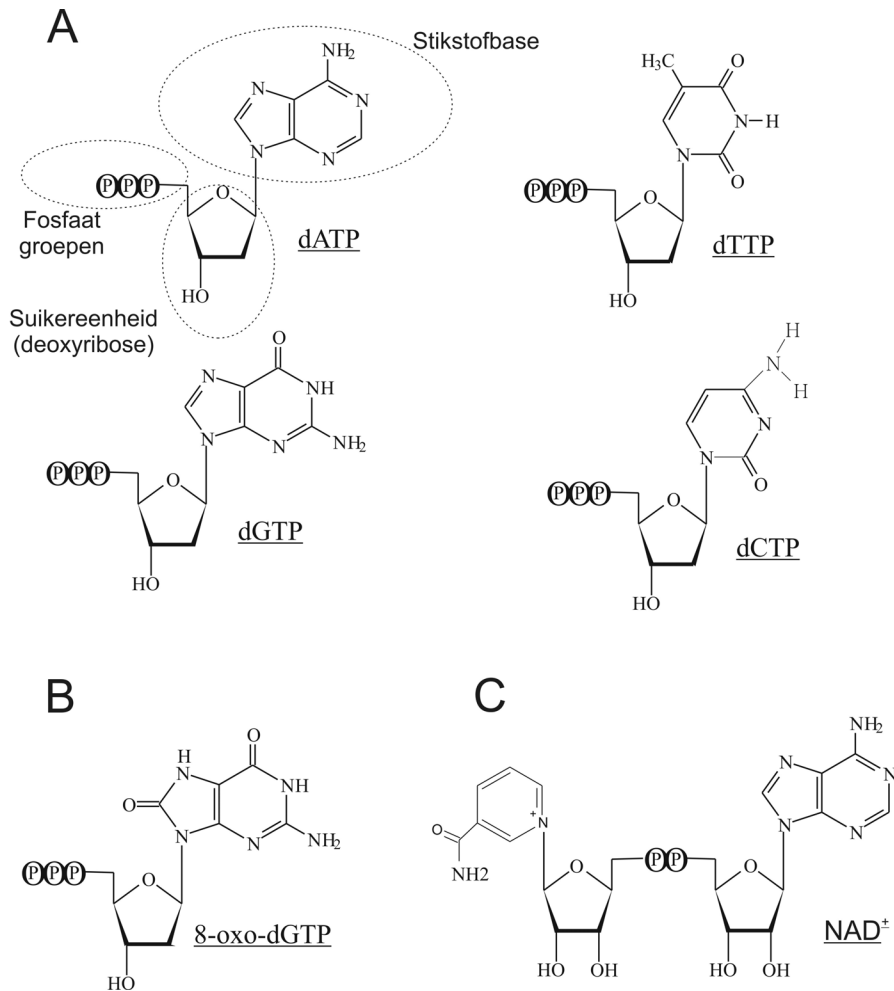
De structuur en functies van nucleotieden.

Nucleotieden zijn essentiële moleculen voor alle levende organismen, die een belangrijke rol vervullen bij verschillende cellulaire processen. Ze zijn opgebouwd uit drie basis onderdelen: een stikstof base, een suiker en één of meerdere fosfaatgroepen (Fig. 1A). De stikstof base is het meest functie en structuur bepalende deel van de nucleotide; hiervan worden er ruim tien in de natuur onderscheiden. De suikereenheid is óf ribose óf deoxyribose, terwijl het aantal fosfaatgroepen varieert van één tot drie. De in figuur 1A afgebeelde nucleotieden zijn allemaal trifosfaten; ze hebben allemaal drie fosfaatgroepen (b.v. dATP is de (engelse) afkorting van **deoxyadenosine triphosphate**; naast deze trifosfaat vorm bestaat er ook een di- en een monofosfaat vorm: dADP en dAMP, resp.). Hoe groter het aantal fosfaatgroepen, hoe hoger het energiegehalte van de nucleotide.

Naast deze zogenaamde mononucleotieden bestaan er ook dinucleotieden; twee mono nucleotieden, die via de fosfaatgroepen gefuseerd zijn. De meest bekende dinucleotide is NAD^+ , een fusie tussen de twee mononucleotieden adenosine monofosfaat en nicotinamide mono fosfaat.

De functies van nucleotieden zijn zeer divers, maar kunnen globaal in drie functionele hoofdcategorieën worden ingedeeld: structurele eenheden van DNA en RNA, energiedrager, en signaalmolecuul. De vier mononucleotieden afgebeeld in figuur 1A vormen gezamenlijk de structuur van de drager van de genetische code, DNA. RNA -het molecuul dat de tussenschakel vormt tussen DNA en eiwit- wordt samengesteld uit een gewijzigde vorm van dezelfde vier nucleotieden: de suiker eenheid is in dit geval niet deoxyribose, maar ribose. Verder is de stikstofbase van dTTP anders van structuur. De dinucleotieden en de mononucleotide ATP hebben over het algemeen de functie van energiedrager. Ze spelen een belangrijke rol bij de overdracht van energie die vrijkomt bij de oxidatie (afbraak) van voedingsstoffen (b.v. suikers), zodat het ten goede komt aan het organisme waarin deze oxidatie plaatsvindt. De nucleotieden die een signaal functie vervullen zijn zeer divers in chemische structuur. Zowel mono- als dinucleotieden kunnen deze functie vervullen.

Chapter 9



Figuur 1. A. Chemische structuur van de vier nucleotieden (dATP, dCTP, dGTP en dTTP) die gezamenlijk de structuur van DNA bepalen **B.** Structuur van 8-oxo-dGTP (geoxideerde vorm van dGTP) welke aanleiding kan geven tot mutaties in de genetische code vastgelegd op het DNA van een organisme. **C.** Structuur van de energiedrager NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide).

Nudix hydrolases

Dit is een familie van enzymen die op een specifieke plaats mono- en dinucleotieden kunnen afbreken. Dit doen ze m.b.v. een watermolecuul en daarom worden ze Nudix hydrolases genoemd. Deze enzymen kunnen nucleotieden hydrolyseren tussen twee fosfaatgroepen. Het is dus een vereiste dat het substraat (de stof die door een enzym wordt omgezet) twee fosfaatgroepen heeft. Dit verklaart tevens het acroniem **Nudix** hydrolase: een hydrolase van een **N**ucleotide **d**ifosfaat, waaraan nog een generieke groep **X** zit gekoppeld. Deze **X** kan een waterstof atoom (H) zijn (het substraat is dan een dinucleotide), een derde fosfaat groep (het substraat is dan een trinucleotide) of nog een mononucleotide (in dit geval is het substraat een dinucleotide).

Samenvatting

De eerste Nudix hydrolase waar veel onderzoek naar is verricht is het MutT eiwit. Dit eiwit, dat in vrijwel alle organismen -van bacterie tot mens- voorkomt, is in staat 8-oxo-dGTP af te breken (Figuur 1B). Dit is een geoxideerde vorm van dGTP, één van de vier nucleotieden van waaruit DNA wordt samengesteld. Bij de samenstelling van DNA worden er steeds mononucleotieden aan elkaar gekoppeld, waardoor er een lange keten (een polymeer) deoxyribonucleotieden ontstaat. Zoals voor elke samenstelling is ook voor deze reactie energie nodig. Deze wordt geleverd door de afsplitsing van twee fosfaatgroepen van de nucleotide trifosfaat door het eiwit dat het DNA synthetiseert (DNA-polymerase). Het DNA-polymerase benut de vrijgekomen energie om het ontstane mononucleotide aan het groeiende DNA polymeer te koppelen. Soms raken de nucleotide trifosfaten beschadigd, bijvoorbeeld t.g.v. UV-straling: er ontstaat een geoxideerde vorm, zoals 8-oxo-dGTP (Figuur 1B). Deze nucleotide is sterk mutageen (het kan aanleiding geven tot verandering van de genetische code), omdat 8-oxo-dGTP door DNA-polymerase zowel kan worden herkend als een dGTP en als een dTTP. Om dit te voorkomen hydrolyseert de Nudix hydrolase MutT 8-oxo-dGTP tot 8-oxo-dGMP, door er twee fosfaatgroepen vanaf te splitsen. Het kan nu niet langer in DNA worden ingebouwd, omdat de benodigde energie hiervoor ontbreekt.

Het genoom van de muis bevat twee genen die coderen voor een MutT eiwit. Gebleken is dat na uitschakeling van één van deze genen, de spontane tumorontwikkeling bij deze muizen verdubbeld. Evenals de muis, bevat ook het menselijk genoom twee MutT coderende genen. Het is aannemelijk dat door introductie van mutaties in het menselijk DNA t.g.v. deficiënte MutT eiwitten er -evenals bij de muis- bepaalde tumoren kunnen ontstaan.

Het activator eiwit van *Bacillus methanolicus* methanol dehydrogenase

De bodem bacterie *Bacillus methanolicus* heeft de specifieke eigenschap tot groei op methanol, een voor de mens giftig alcohol wat bij consumptie aanleiding kan geven tot blindheid en uiteindelijk zelfs de dood tot gevolg kan hebben. Net zoals suikers en andere voedingsstoffen in de mens en in bacteriën in enkele tientallen stappen worden omgezet in uiteindelijk water en koolzuurgas, wordt ook methanol in deze bacterie in een serie stappen omgezet tot dezelfde eindproducten. In de eerste omzetting wordt methanol omgezet in formaldehyde, een stof die in het verleden veel werd toegepast als ontsmettingsmiddel. Deze eerste stap in de afbraak van methanol wordt in *Bacillus methanolicus* gekatalyseerd door het enzym methanol dehydrogenase (MDH). De energie die vrijkomt bij deze eerste oxidatie- of afbraakstap wordt door het enzym overgedragen op NAD^+ (figuur 1C), dat vervolgens weer bij energie vragende reacties kan worden benut. NAD^+ functioneert in deze stap als coenzym (spreek uit als co-enzym).

MDH kan vrij gemakkelijk uit een hoeveelheid cellen van *Bacillus methanolicus* worden geïsoleerd, omdat het in een hoge concentratie aanwezig is. Met gezuiverd MDH kunnen de eigenschappen van dit enzym goed in kaart worden gebracht. Al snel bleek echter dat de reactiesnelheid van het enzym laag was en dat de snelle groei van *Bacillus methanolicus* hierdoor niet verklaard kon worden. Verder onderzoek leidde tot de isolatie van een tweede eiwit betrokken bij de MDH reactie, nl. een MDH activator eiwit, welke op grond van zijn structuur behoort tot de familie van de Nudix hydrolases (hoofdstuk 3). Activator eiwit bleek een sterk stimulerende invloed te hebben op de reactiesnelheid van MDH, maar het onderliggende mechanisme bleef onduidelijk.

Uit verdere karakterisatie van MDH bleek dat dit enzym naast een coenzym NAD^+ , nog gebruik maakt van een NAD^+ cofactor. NAD^+ coenzymen zijn alleen tijdens de reactie aan het enzym gebonden, zodat er energieoverdracht kan plaatsvinden. Een cofactor daarentegen zit permanent gebonden aan het enzym. MDH gebruikt deze cofactor NAD^+ als tijdelijke energie opslag en geeft de energie uiteindelijk weer door aan het coenzym NAD^+ . Identificatie en

Chapter 9

modificatie van een specifieke regio van het MDH enzym dat verantwoordelijk bleek voor de binding van de cofactor leidde tot de isolatie van een gewijzigd MDH eiwit (mutant eiwit) dat niet langer een gebonden cofactor NAD^+ bezat. Verrassend genoeg bleek deze wijziging in MDH structuur tevens aanleiding te geven tot een sterk verhoogde reactiesnelheid, die overeen kwam met door activator eiwit geactiveerd MDH (hoofdstuk 4). Onderzoek naar het effect van activator eiwit op de cofactor van MDH resulteerde vervolgens in de ontdekking dat het mechanisme van activatie van MDH door activator eiwit bestaat uit de hydrolyse van de NAD^+ cofactor van MDH (hoofdstuk 3). Net als het mutante MDH welke geen NAD^+ cofactor meer bezit, bevat geactiveerd MDH geen functionele cofactor meer. De MDH reactie verloopt nu cofactor onafhankelijk. De energie die vrijkomt bij de eerste oxidatiestap van methanol wordt nu direct overgedragen op het coenzym NAD^+ . Zonder de interferentie van de cofactor verloopt de reactie bijna 10 maal zo snel. Maar ook dit voordeel heeft een nadeel: In het geval dat het milieu waarin *B. methanolicus* groeit veel methanol bevat, kan de omzettingssnelheid van methanol naar formaldehyde zó hoog worden dat formaldehyde ophoping in de cel plaatsvindt. Een te hoge concentratie van deze bij desinfectie toegepaste uiterst toxische stof leidt snel tot de dood van de bacterie cel. De cel beschikt echter over een terugkoppelingsmechanisme: NAD^+ dat reactie-energie heeft opgenomen gaat over in een andere structuur, welke NADH wordt genoemd. Dit NADH kan wel door activator eiwit worden gebonden, maar niet worden gehydrolyseerd. Bij een hoge methanol omzettingssnelheid wordt er dus veel NADH geproduceerd, wat door een toenemend aantal activator eiwit moleculen wordt gebonden en het vervolgens blokkeert in activiteit. MDH kan nu minder worden geactiveerd en neemt nu langzaam gas terug door het opnemen van cofactor. Dit mechanisme stelt *B. methanolicus* in staat tot optimale groei op methanol, zonder dat het organisme aan een te hoge concentratie formaldehyde te gronde gaat. Met de ontdekking dat activator eiwit in staat is de dinucleotide cofactor van MDH te hydrolyseren en daarmee de reactiesnelheid van het enzym kan wijzigen, is een geheel nieuwe functie voor Nudix hydrolase eiwitten gevonden: regulering van de activiteit van andere eiwitten.

Het plasmide pMEA300 van de actinomyceet *Amycolatopsis methanolica*

Net als *B. methanolicus* is *Amycolatopsis methanolica* een bacterie die uit de grond kan worden geïsoleerd. Dit organisme behoort echter wel tot een totaal andere bacterie familie: de actinomyceten. Qua groeiwijze gelijken deze organismen op schimmels, maar de opbouw van de cel is echter duidelijk bacterieel. Deze familie van bacteriën is van groot medisch en economisch belang voor de mens, omdat zij verantwoordelijk zijn voor de productie van vele antibiotica, die bij mens en dier worden toegepast. Van nature zijn de hoeveelheden antibiotica die worden geproduceerd laag en dienen zeer waarschijnlijk om de competitie met andere bacteriën die in de bodem leven aan te kunnen. Een middel waarmee deze productie kan worden verhoogd is genetische modificatie. Hiervoor zijn echter gereedschappen noodzakelijk. Eén hiervan is de toepassing van plasmiden; dit zijn genetische elementen, stukjes circulair DNA, die onafhankelijk van het bacteriële chromosoom opereren.

Ook de actinomyceet *Amycolatopsis methanolica* bezit zo'n plasmide: pMEA300 genaamd. Het bestaat uit ruim 13 duizend nucleotieden, coderend voor een 20-tal genen, die de eigenschappen van het pMEA300 plasmide bepalen. Zo kan het, net als alle andere plasmiden, autonoom repliceren, d.w.z. het kan zich onafhankelijk van het chromosoom vermenigvuldigen, met als gevolg dat er soms maar één kopie en soms meer dan honderd kopieën in de cel aanwezig zijn, afhankelijk van de groeiomstandigheden. Naast autonome replicatie kan het plasmide echter ook integreren in het chromosoom van de bacterie cel. Dit proces gebeurt in het geval van pMEA300 altijd op een specifieke plaats in het chromosoom en wordt gekatalyseerd door het integrase eiwit, dat gecodeerd wordt door één van de genen van

pMEA300. Na integratie kan het plasmide ook weer uit het chromosoom vertrekken. Dit proces wordt gekatalyseerd door het excisionase eiwit, eveneens gecodeerd door een gen van pMEA300. Tot slot kan nog een derde eigenschap van pMEA300 worden genoemd: conjugatie. Dit is een proces waarbij het plasmide kan worden overgedragen van ene bacterie cel naar de andere. Bij dit proces zijn tien pMEA300 genen betrokken. Overgang van het plasmide van de ene bacterie cel naar de andere geeft bij actinomyceten vaak een speciale verschijningsvorm: pock formatie (hoofdstuk 5) . Na overdracht van het plasmide produceert de ontvangende bacteriecel een stof die de groei van omringende cellen sterk vertraagt. Op een groeimedium is een dergelijke ontwikkelende bacterie kolonie waar te nemen door de heldere zone rondom deze kolonie, doordat andere bacteriën die geen plasmide ontvangen hebben zich niet kunnen ontwikkelen (figuur 3, hoofdstuk 5).

De overige genen die aanwezig zijn op pMEA300 coderen voor eiwitten die een regulerende invloed hebben op de verschillende pMEA300 gecodeerde functies. Eén van die genen codeert voor een Nudix hydrolase eiwit.

De functie van de Nudix hydrolase van pMEA300

Een drietal genen van pMEA300 coderen voor eiwitten die de bovengenoemde eigenschappen van het plasmide reguleren. De functionaliteit van deze eiwitten -KorA, Stf en de Nudix hydrolase Orf192- is onderzocht door de genen die voor deze eiwitten coderen uit te schakelen. Dit kan worden gedaan door de volgorde van de nucleotide sequentie waarop het betreffende gen ligt te verstoren of volledig te verwijderen. Deze regulatie van activiteiten kan globaal op twee manieren plaatsvinden: op DNA niveau of op eiwit niveau. In het eerste geval wordt één of meerdere genen tot zwijgen gebracht waardoor er van deze genen geen RNA meer kan worden gemaakt, met als gevolg dat de door betrokken genen gecodeerde eiwitten niet meer worden gesynthetiseerd. KorA is zo'n eiwit: het is in staat om een stukje DNA te binden vlak voor de tien genen die coderen voor het conjugatie proces van pMEA300. Elk gen of gencluster wordt vooraf gegaan door een promotor. Dit is een DNA gedeelte dat herkend wordt als het startpunt van het eiwit dat DNA kopieert tot RNA, het DNA-afhankelijke RNA polymerase. Als de promotor echter al gebonden is door een ander eiwit (b.v. KorA), dan kan het niet meer worden herkend, wordt het niet gecopieerd tot RNA met als gevolg dat er geen eiwit(ten) worden gevormd van het gen of het gencluster. KorA repressert op deze wijze de expressie van de conjugatie genen.

Stf en Orf192 zijn beide regulatie eiwitten. Orf192 is zeer waarschijnlijk op eiwit niveau werkzaam, terwijl Stf mogelijk op DNA niveau werkzaam is. Laatstgenoemde bevat echter geen bekende DNA bindende structuren, zoals wel aanwezig in KorA, en ook experimenteel kon DNA binding (nog) niet worden vastgesteld. Dit laatste is noodzakelijk om te onderzoeken, omdat er nog zeer veel eiwitten zijn waarvan de functie niet bekend is. Mogelijk bevat Stf een tot nu toe onbekende eiwit structuur, die in staat is tot DNA binding. Deletie van Stf toont aan dat het een activator is van replicatie en conjugatie, terwijl het de specifieke integratie juist remt (hoofdstuk 5 en 6). Het niveau van integratie neemt bijna 100voudig toe als het Stf coderende gen uit pMEA300 wordt gedeleteerd. De pMEA300 Nudix hydrolase is de antagonist van Stf. Het duidelijkst komt dit naar voren in het verschijnsel Superpock formatie (Hoofdstuk 5, figuur 3). Deletie van het *orf192* coderende gen uit pMEA300 leidt tot overdreven grote pockstructuren en groeivertraging van de plasmide ontvangende cellen, na overdracht van dit gemodificeerde pMEA300 plasmide. Er is een onbalans ontstaan door een te hoog niveau aan eiwitten betrokken bij conjugatie, door de afwezigheid van de antagonist Orf192. Deze onbalans kan weer worden hersteld door ook het gen coderend voor Stf uit pMEA300 te deleteren.

Karakterisatie van gezuiverd Orf192 eiwit bracht aan het licht dat het twee

Chapter 9

nucleotieden kan hydrolyseren: NAD^+ en ADP-ribose. Laatstgenoemde, welke het meest efficiënt door Orf192 kan worden omgezet, is een derivaat van NAD^+ , waarbij de nicotinamide stikstof base van NAD^+ ontbreekt (figuur 1). Deze verbinding doet vaak dienst als signaalmolecuul bij zeer uiteenlopende cellulaire processen. Of en hoe deze verbinding werkzaam is in pMEA300 regulatie, is nog niet bekend. Mogelijk is ADP-ribose een signaal molecuul voor de activatie van Stf. Hydrolyse van het signaal molecuul door Orf192 moduleert het signaal waardoor ongewenste over-activatie (super pock formatie) achterwege blijft. Verder onderzoek zal de exacte regulatie van pMEA300 aan het licht moeten brengen.