



# SEBBM DIVULGACIÓN

## ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS

### La dUTPasa, una NTP-pirofosfatasa todo- $\alpha$ que controla el nivel de uracilo en el ADN

Dolores González-Pacanowska  
 Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada, CSIC

#### Biografía Resumen

Dolores González-Pacanowska es Profesora de Investigación en el Instituto de Parasitología y Biomedicina. Licenciada en Biología y Doctor en Bioquímica por la Universidad de Granada realizó una estancia postdoctoral en la Universidad de California, San Francisco, estudiando aspectos de la estructura y función de enzimas implicadas en la síntesis de timidilato. Tras unos años como Profesora Titular de Bioquímica en la Universidad de Granada se trasladó al Instituto de Parasitología y Biomedicina del CSIC. Su actividad investigadora ha estado centrada en el estudio de la biología de protozoos de elevado impacto médico y ha contribuido de manera significativa a la identificación de nuevas dianas farmacológicas y estrategias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades olvidadas. Sus principales hallazgos están relacionados con el metabolismo de la timina y el uracilo habiendo caracterizado extensamente una nueva superfamilia de enzimas, las nucleótido hidrolasas todo- $\alpha$ .

*El pool de nucleótidos celular contiene nucleósidos trifosfato no-canónicos que resultan de procesos de oxidación o desaminación o que son intermediarios del metabolismo celular como el dUTP. La eliminación de estos nucleótidos es fundamental para la preservación de la integridad genética. Dentro de las diferentes superfamilias de nucleótido hidrolasas que existen desde el punto de vista estructural está la superfamilia de las NTP-pirofosfatasa todo- $\alpha$ , un conjunto de enzimas que, entre otras funciones, hidrolizan el dUTP.*

#### Summary

*The cellular nucleotide pool contains non-canonical nucleoside triphosphates that result from both oxidation and deamination events of canonical nucleotides and intermediary nucleotide metabolism (such as dUTP). The elimination of these nucleotides is essential for preservation of genetic integrity. Proteins hydrolyzing NTPs with cleansing functions can be found in structurally different superfamilies. One of such families is the all- $\alpha$ -pyrophosphatase superfamily that includes enzymes that efficiently hydrolyze dUTP.*

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA: [http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos\\_10/acercate-a-nuestros-cientificos\\_107](http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107)

El ADN y sus precursores, el pool de desoxirribonucleótidos, están expuestos a la acción de compuestos tóxicos. Los nucleótidos canónicos son constantemente modificados bajo condiciones fisiológicas, por reacciones de oxidación o desaminación, o debido a la exposición a agentes químicos exógenos como compuestos alquilantes. Algunos de los nucleótidos libres modificados o no-canónicos más comunes, son por ejemplo 8oxo-dGTP, 8oxo-dATP o 2oxo-dATP. También existen nucleótidos no-canónicos intermediarios del metabolismo cuya concentración debe ser controlada, como dITP, dXTTP y dUTP. La eliminación de nucleótidos no-canónicos antes de que sean incorporados al ADN durante la replicación es esencial para el mantenimiento de la integridad genética. Las enzimas responsables de su eliminación son las NTP pirofosfatasa cuya función es hidrolizar los nucleósidos trifosfato y convertirlos en su forma monofosfato correspondiente, iniciando de esta forma un proceso de tipo catabólico. La actividad de estas nucleótido hidrolasas se incluye así en una función celular más general denominada *house-cleaning*. Hasta la fecha se han descrito cuatro superfamilias estructuralmente distintas: hidrolasas Nudix, dUTPasas triméricas, ITPasas y NTP-pirofosfatasa todo- $\alpha$ . Una especial importancia como diana farmacológica ha adquirido recientemente MTH1, una proteína de la familia Nudix que hidroliza los nucleótidos 8-oxodGTP o 2-OH-dATP ya que inhibidores de la misma reducen eficazmente el crecimiento de células tumorales (Gad H *et al*, 2014).

En el caso concreto del uracilo, se considera en líneas generales que no es un componente usual del ADN pero sin embargo está presente en el genoma como resultado de la desaminación de la citosina o a partir de una incorporación errónea de dUTP por parte de la ADN polimerasa durante la replicación. La desaminación de la citosina puede ser espontánea o mediada por enzimas específicas. En cuanto a la incorporación, la inserción de uracilo tiene lugar con una frecuencia de aproximadamente 100 residuos por día en células de mamíferos. Es llamativo que el dUTP, que no es un precursor canónico del ADN, se haya mantenido a lo largo de la evolución y sugiere un papel específico del uracilo en

procesos de diversificación y muerte celular lo que conlleva la existencia de mecanismos estrictos que permiten el control del cociente dUTP/dTTP durante la replicación. Una enzima que tiene un papel esencial en este proceso es la desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa) (E.C.3.6.1.23). La dUTPasa cataliza la hidrólisis del dUTP a dUMP y pirofosfato, proporcionando el sustrato para la generación de dTMP y manteniendo baja la relación dUTP/dTTP para evitar que el dUTP sea incorporado erróneamente al ADN.

Protozoos de la familia *Trypanosomatidae* tienen un interés prioritario para el desarrollo de nuevos fármacos ya que son los agentes causales de enfermedades de gran impacto sobre todo en países del tercer mundo. La leishmaniasis, la enfermedad de Chagas o la enfermedad del sueño son enfermedades devastadoras que afectan a millones de personas (Dujardin *et al.*, 2010). Adicionalmente el protozoo *Trypanosoma brucei* constituye un paradigma para el estudio de diversos procesos como la variación antigénica o la edición del RNA. Hemos caracterizado el proceso de hidrólisis del dUTP en tripanosomátidos y explorado su papel en el metabolismo celular y en el mantenimiento de la integridad genética. Es de destacar que en la mayoría de los organismos desde eucariotas superiores pasando por bacterias y arqueas las dUTPasas son triméricas y están muy conservadas desde un punto de vista estructural. Por el contrario trabajo desarrollado en nuestro laboratorio ha permitido establecer que la familia *Trypanosomatidae* son hasta la fecha los únicos organismos eucarióticos que exhiben una forma dimérica (Harkiolaki *et al.*, 2004). Esta clase de dUTPasas son análogos y no homólogos de las dUTPasas triméricas tales como la enzima humana o la de *Plasmodium falciparum*. La identificación de una nueva clase de dUTP pirofosfatasa dimérica en los protistas *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* dio lugar a la descripción de la nueva superfamilia de enzimas, las NTP-pirofosfatasa todo- $\alpha$ , estructuralmente diferenciadas por una alta composición en hélices alfa (Moroz *et al.* 2004). A través de un análisis estructural, se identificaron nuevos miembros de la superfamilia como la fosforribosil-ATP pirofosfatasa HisE, implicada en la síntesis de histidina, la NTP-pirofosfatasa MazG y las familias DR2231 y RS21-C6. Todas estas proteínas tienen como característica común un dominio MazG (Moroz *et al.*, 2005). Posteriormente se han identificado homólogos de la dUTPasa dimérica en los genomas de varias bacterias gram-positivas y sus fagos, que muestran que esta clase de enzimas no se limita a los parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. Además de las diferencias ya descritas, las dUTPasas diméricas también se caracterizan por la existencia de inhibición por producto y de la capacidad de utilizar tanto dUTP y dUDP como sustratos, produciendo en ambos casos dUMP como producto final. La disminución de los niveles de dUTPasa en *Trypanosoma* produce un aumento en la tasa de mutación y recombinación, la formación de roturas de cadena de ADN y un aumento de la frecuencia de variación antigénica (Castillo-Acosta *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la superfamilia de nucleótido hidrolasas todo- $\alpha$  habiéndose

**Pie de figura. Origen y consecuencias del uracilo en el ADN.**

demostrado que algunas hidrolizan dUTP o, en el caso de MazG, que eliminan 5OH-dCTP teniendo por tanto un papel muy importante en la respuesta a estrés oxidativo. Recientemente hemos analizado el papel de la enzima DCTPP1 (de la familia RS21-C6), una nucleótido hidrolasa presente en células de mamífero tanto en el núcleo como en la mitocondria que hidroliza el dCTP, el metil-dCTP, nucleótidos halogenados en posición 5 y el 5-formil-dCTP. DCTPP1 tiene un papel fundamental en la homeostasis de nucleótidos primidínicos habiendo establecido que participa en el mantenimiento de los niveles intracelulares de dCTP (Requena *et al.*, 2014).

En definitiva las NTP pirofosfatasa desempeñan importantes funciones en la homeostasis de nucleótidos no-canónicos y en la preservación de la integridad genética. Algunas están emergiendo como prometedores blancos de acción de fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer. El conocimiento de su estructura y la colaboración en consorcios multidisciplinares con químicos y la industria farmacéutica está permitiendo la identificación de inhibidores específicos con potencial farmacológico.

## Referencias

- 1.-Castillo-Acosta VM, Aguilar-Pereyra F, Bart JM, Navarro M, Ruiz-Pérez LM, Vidal AE, González-Pacanowska D. Increased uracil insertion in DNA is cytotoxic and increases the frequency of mutation, double strand break formation and VSG switching in *Trypanosoma brucei*. DNA Repair (Amst). 2012 Dec 1;11(12):986-95.
- 2.-Dujardin JC, González-Pacanowska D, Croft SL, Olesen OF, Späth GF. Collaborative actions in anti-trypanosomatid chemotherapy with partners from disease endemic areas. Trends Parasitol. 2010 Aug;26(8):395-403.
- 3.- Gad H, Koolmeister T, Jemth AS, Eshtad S, Jacques SA, Ström CE, Svensson LM, Schultz N, Lundbäck T, Einarsdóttir BO, Saleh A, Göktürk C, Baranczewski P, Svensson R, Berntsson RP, Gustafsson R, Strömberg K, Sanjiv K, Jacques-Cordonnier MC, Desroses M, Gustavsson AL, Olofsson R, Johansson F, Homan EJ, Loseva O, Bräutigam L, Johansson L, Höglund A, Hagenkört A, Pham T, Altun M, Gaugaz FZ, Vikingsson S, Evers B, Henriksson M, Vallin KS, Wallner OA, Hammarström LG, Wiita E, Almlöf I, Kalderén C, Axelsson H, Djureinovic T, Puigvert JC, Häggblad M, Jeppsson F, Martens U, Lundin C, Lundgren B, Granelli I, Jensen AJ, Artursson P, Nilsson JA, Stenmark P, Scobie M, Berglund UW, Helleday T. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. Nature. 2014 Apr 10;508(7495):215-21.
- 4.-Harkiolaki M, Dodson EJ, Bernier-Villamor V, Turkenburg JP, González-Pacanowska D, Wilson KS. The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold. Structure. 2004 Jan;12(1):41-53.
- 5.-Moroz OV, Harkiolaki M, Galperin MY, Vagin AA, González-Pacanowska D, Wilson KS. The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases. J Mol Biol. 2004 Oct 1;342(5):1583-97.
- 6.-Moroz OV, Murzin AG, Makarova KS, Koonin EV, Wilson KS, Galperin MY. Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions. J Mol Biol. 2005 Mar 25;347(2):243-55.
- 7.-Requena CE, Pérez-Moreno G, Ruiz-Pérez LM, Vidal AE, González-Pacanowska D. The NTP pyrophosphatase DCTPP1 contributes to the homeostasis and cleansing of the dNTP pool in human cells. Biochem J. 2014 Apr 1;459(1):171-80.

