



NMR Study of Temperature-Dependent Single-Stranded DNA Binding Affinity of Human Replication Protein A

Min-Gyu Kim^{1,†}, Tae-Hoan Shin^{1,†}, Seo-Ree Choi², Jae-Gyu Choi¹ and Joon-Hwa Lee^{2,*}

¹Gyeongnam Science High School, Jinju, Gyeongnam 52620, Republic of Korea

²Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Republic of Korea

Received Aug 10, 2016; Revised Sep 1, 2016; Accepted Sep 2, 2016

Abstract The replication protein A (RPA), is a heterotrimer with 70, 32 and 14 kDa subunits and plays a crucial role in DNA replication, recombination, and repair. The largest subunit, RPA70, binds to single-stranded DNA (ssDNA) and mediates interactions with many cellular and viral proteins. In this study, we performed nuclear magnetic resonance experiments on the complex of the DNA binding domain A of human RPA70 (RPA70A) with ssDNA, d(CCCC), at various temperatures, to understand the temperature dependency of ssDNA binding affinity of RPA70A. Essential residues for ssDNA binding were conserved while less essential parts were changed with the temperature. Our results provide valuable insights into the molecular mechanism of the ssDNA binding of human RPA.

Keywords RPA70A, ssDNA, DNA binding protein, temperature dependence, NMR

서문

단일가닥 DNA (ssDNA) 결합 단백질 (SSBs)은 진핵세포, 원핵세포, 미토콘드리아, 파지 그리고 바이러스에서 DNA 기능에 필수적인 역할을 한다.¹ 복제 단백질 A(RPA)

는 진핵세포에서 발견되는 SSB로 70, 32, 14kDa의 세 개의 소단위체를 가진 삼량체이다.² 가장 큰 소단위체인 RPA70은 단일가닥(ss)DNA와 결합하고, 많은 세포 및 바이러스 단백질의 상호작용을 중재한다.³⁻⁵ RPA의 높은 DNA 결합능력은 RPA70의 중간에 위치하고 있는 두 개의 DNA 결합 도메인 (DBD)인 RPA70A (RPA70₁₈₁₋₂₉₀)과 RPA70B (RPA70₃₀₀₋₄₂₂)에 의해 나타난다.^{6,7} RPA70AB와 DNA dC₈과의 복합체의 결정구조는 각 도메인이 ssDNA의 3 뉴클레오티드 (nt) 씩 결합하는 것을 밝혔다.⁸ 본 연구에서 온도 변화에 따른 RPA70A의 DNA 결합능력 변화를 알아보기 위해 RPA70A와 5-nt ssDNA, d(CCCC) (dC₅)의 복합체 대한 핵자기공명 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) 실험을 다양한 온도에서 수행하였다. 다양한 온도에서 RPA70A의 HSQC 스펙트럼을 얻고 dC₅ 첨가에 따른 HSQC 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 본 연구 결과는 RPA70A의 ssDNA 결합 기작을 이해하는 데 필요한 중요한 정보를 제공할 것이다.

실험방법

시료 준비 - 5-nt ssDNA인 dC₅는 M-biotech에서 구매하였고 Sephadex G-25

† These two authors contributed equally to this work.

* Address correspondence to: **Joon-Hwa Lee**, Department of chemistry and RINS, Gyeongsang National University, Jinju Gyeongnam 52828, Republic of Korea, Tel: 82-55-772-1490; E-mail: joonhwa@gnu.ac.kr

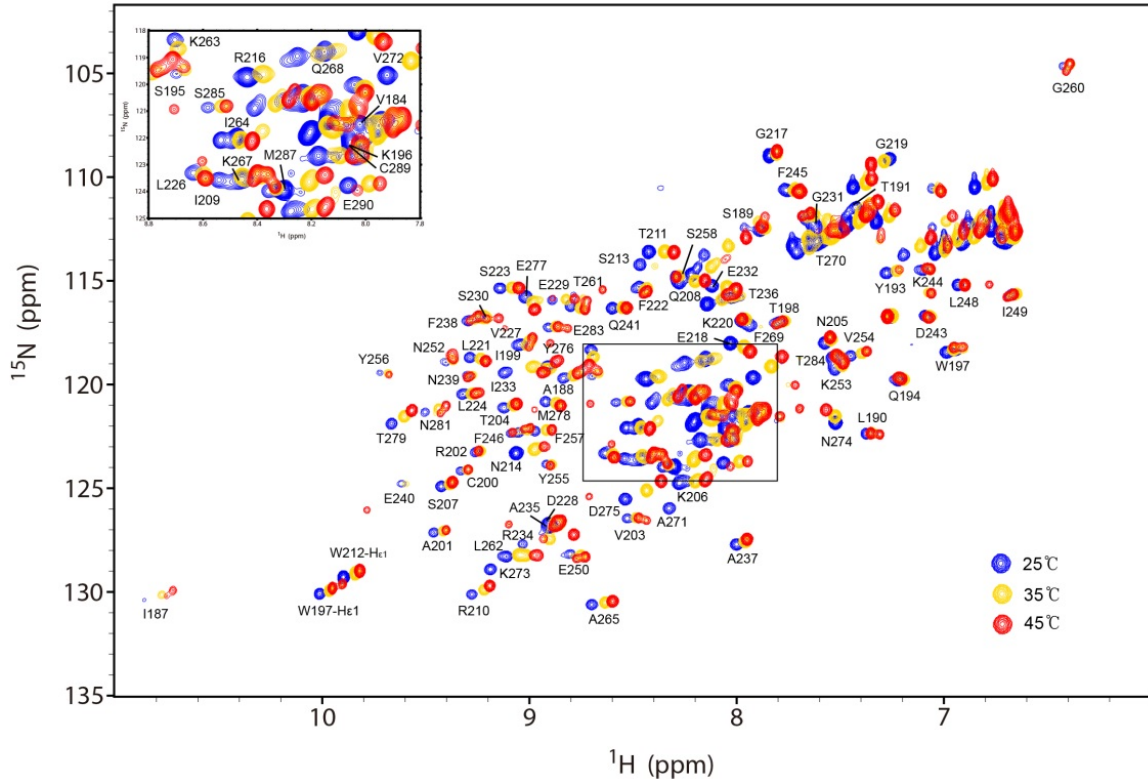


Figure 1. Superimposition of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of RPA70A in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O NMR buffer containing 25mM sodium phosphate (pH 7.5), 50mMNaCl and 5mM DTT. Blue, 25 °C; Yellow, 35 °C; Red, 45 °C

gel 거름 컬럼을 이용하여 정제하였다. 대장균 발현 플라스미드 pET14b (Novagen, WI, USA)에 RPA70A의 181~304번 잔기들을 발현하는 DNA를 포함시켜 단백질을 발현하였다. ^{15}N 표지된 RPA70A은 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 포함한 M9 배지에서 형질 전환된 C41 (DE3) 대장균을 배양시켜 얻었다. ^{15}N 으로 표지된 RPA70A 단백질은 Ni-NTA 컬럼과 SephacrylS-100 gel 여과컬럼(GE Healthcare, USA)으로 정제하였다. DNA와 단백질 시료는 25mMNaPi (pH7.5)와 50mM의 NaCl, 5mM DTT를 포함하는 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O NMR buffer에 녹였다.

NMR 실험— 모든 NMR 실험은 극저온 삼중공명 탐침을 구비하고 있는 Agilent DD2 700-MHz 분광기(경상대학교, 진주)를 통해 수행되었다. 모든 2차원의 이중 공명 실험들은 ^{15}N 으로 표지된 1mMRPA70A 단백질로 수행

되었으며 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼은 25°C, 35°C, 45°C에서 2.5mM CdCl_2 를 1mM ^{15}N 으로 표지된 hRPA70A 단백질에 첨가에 의해 만들어진 복합체에서 얻었다. 모든 2차원 (2D) NMR 데이터는 NMRPipe⁹ 프로그램으로 처리하고 Sparky¹⁰ 프로그램으로 분석하였다. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC의 두 상태 사이의 평균적인 아마이드 양성자와 질소 공명의 화학적 이동은 다음 수식으로 계산되었다.

$$\Delta\delta_{\text{avg}} = \sqrt{(\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}}/5.88)^2}$$

여기서, $\Delta\delta_{\text{H}}$ 와 $\Delta\delta_{\text{N}}$ 는 각각 아마이드 수소와 질소 공명의 화학적 이동이다.

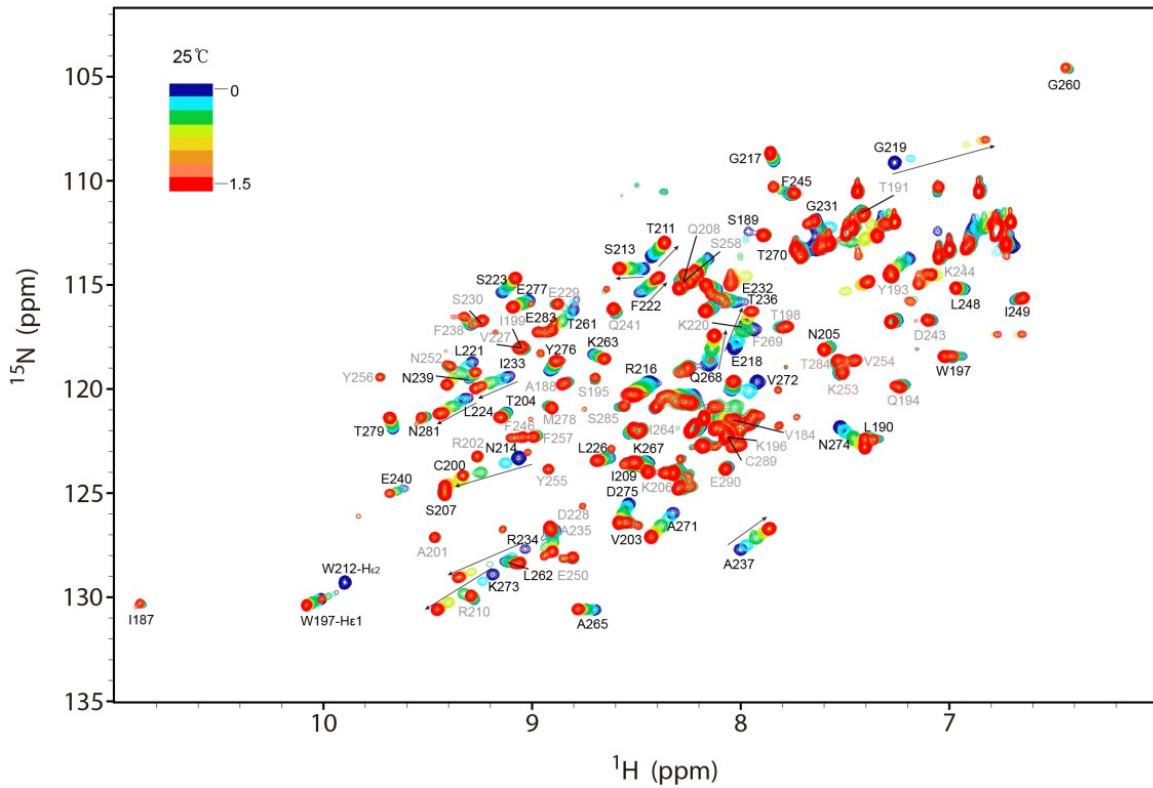


Figure 2. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC of RPA70A upon titration with dC₅. The cross-peak color changes gradually from blue (free) to red (bound) according to the [N]/[P] ratio.

실험결과 및 고찰

그림 1은 여러 온도 (25°C, 35°C, 45°C)에서 관측한 RPA70A의 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼을 겹쳐본 것이다. 온도가 높아질수록 대부분의 피크들이 오른쪽 위로 향하는 것을 볼 수 있으나 예외적으로 G219는 왼쪽 아래로 향하고 N274는 왼쪽 위로 향하는 것을 관찰할 수 있다. 중앙에 위치한 ^1H 8ppm과 ^{15}N 120ppm 부근의 피크는 굉장히 복잡하여 그림 1 상단에 따로 표시하였다.

RPA70A 단백질에 ssDNA dC₅를 조금씩 적정하여 여러 온도 (25°C, 35°C, 45°C)에서 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC를 측정하였다. 그 중 25°C 데이터를 그림 2에 나타내었다. 파란색은 DNA를 넣지 않은 단백질만 존재하는 상태이고 빨간색으로 갈수록 DNA를 점점 첨가하여 DNA:단백질몰비율 ([N]/[P] ratio)가 1.5가 될 때까지 적정하여 얻은 스펙트럼이다. 화살표로 표시

한 잔기들이 매우 큰 화학적 이동을 보이며 잔기마다 이동하는 방향이 보이므로 NMR 시간대에서 fast exchange의 형태를 보인다.

그림 3에서는 [N]/[P] ratio 변화에 따른 몇 가지 잔기의 ^1H 와 ^{15}N 의 화학적 이동을 온도에 따라 적정 곡선을 나타내었다. 먼저 그림 3A에서 화학적 이동은 G219 잔기가 제일 큰 변화를 보였고 온도가 높아질수록 더 많이 이동한 결과를 알 수 있었다. 하지만 I233은 경향에서 벗어난 그래프를 보였다. 그림 3B는 ^{15}N 의 화학적 이동에서 K273이 가장 큰 변화를 보였다. 특이하게도 L221의 경우 45°C 적정 곡선에서 꺾인 부분이 존재하는데 이는 스펙트럼상의 overlap으로 인한 값의 오류로 보여진다. 또한 다른 온도에 비하여 45°C에서 대부분의 잔기들이 매우 높은 화학적 이동 값을 보였다. 단백질과 DNA-단백질 복합체 사이에서 얻어진 화학적 이동 값을 이용하여 RPA70A 구조에 맵핑했다. 빨간색은 0.20ppm 이상 값, 보라

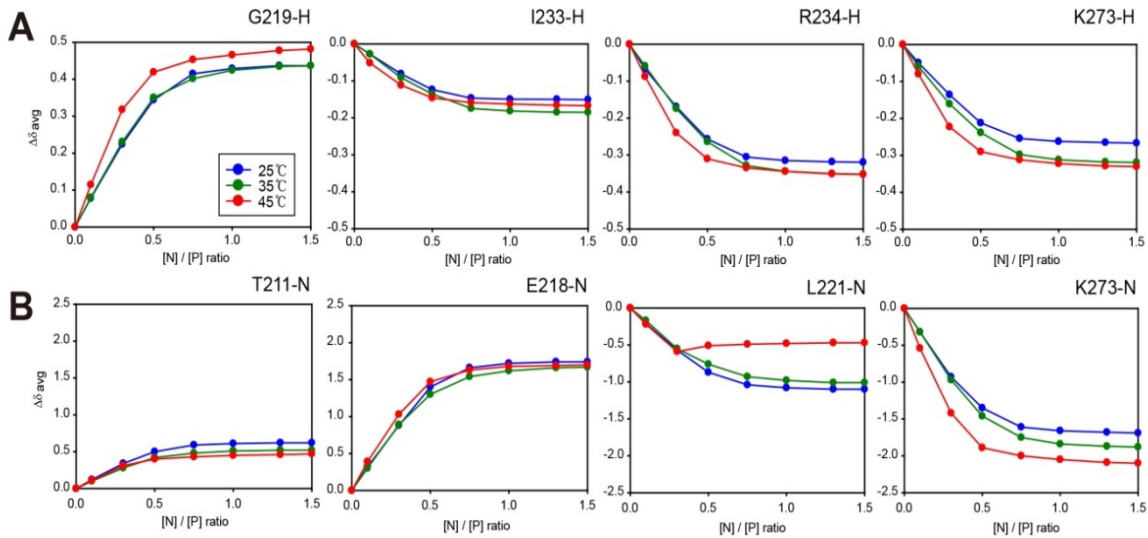


Figure 3. The $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC titration curves for RPA70A with dC_5 as a function of $[\text{N}]/[\text{P}]$ ratio.

색은 0.10–0.20ppm 이상 값, 노란색은 0.05–0.10ppm 사이의 값을 갖는 잔기들이다. 세 온도에서 E218, G219, A237, V272, K273, N274, R234 잔기들은 모두 0.20ppm 이상의 큰 이동 값을 보여 DNA 결합에 가장 중요한 잔기인 것으로 판단된다. A 그림과 B 그림은 β_2 , β_3 , β_4 에서 큰 화학적 이동 값을 보이지만 C 그림은 β_3 , β_4 , β_7 에서 큰 화학적 이동 값을 보였다. 따라서 온도가 올라감에 따라 DNA 와 결합하는 잔기가 달라짐을 알 수 있었다.

본 연구는 온도에 따른 RPA70A 와 단일가닥 DNA 와의 결합 차이를 조사 하였다. 적정실험 결과 RPA70A 와 dC_5 는 1:1 결합인 것을 확인하였다. 25°C와 35°C 의 단백질은 매우 안정하였으나 45°C의 단백질은 튜브 안에서 하얗게 침전이 생겨 불안정한 것을 확인할 수 있었고 농도가 줄었을 것으로 예상된다. 때문에 그림 3 번에서 45°C의 $[\text{N}]/[\text{P}]$ ratio 가 1.0 이 넘어서 까지 피크가 이동함을 볼 수 있다. RPA70A 는 체온보다 높은 45°C 에서 기존에 DNA 와 결합하던 위치와는 다른 위치에서 DNA 와 결합한다는 사실을 알 수 있었다.

결론

RPA70A 는 사람에 존재하는 단일 가닥 DNA 결합 단백질이다. 본 연구에서는 dC_5 를 이용하여 다양한 온도에서의 결합 관련성에 대해 NMR 분광기를 이용하여 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 실험을 진행하였다. 그 결과 가장 중요한 잔기들은 온도가 높아져도 DNA 와 결합하지만 전체적으로 보았을 때 온도가 높아짐에 따라 DNA 결합 위치가 달라진다는 사실을 알 수 있었다.

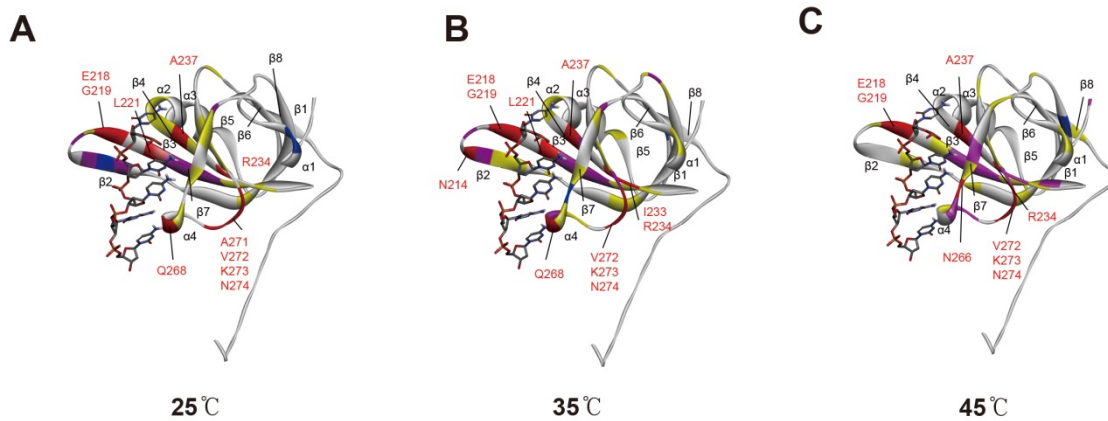


Figure 4. Secondary structure models for RPA70A-dC₅ complex. Colors used to illustrate ¹H/¹⁵N chemical shift changes ($\Delta\delta_{\text{avg}}$) between the protein only state and RPA70A-dC₅ complex : red, >0.20 ppm; purple, >0.10-0.20 ppm; yellow ; 0.05-0.10 ppm. The blue color indicates the disappeared residues. Coordinates for RPA70A were derived from X-ray crystal structure (PDB id = 1JMC).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21 프로그램 (SSAC, no. PJ01117701)의 지원으로 수행되었고 NMR 연구 수행을 지원해준 경상대학교 공동실험관에 감사를 전한다.

References

1. M. S. Wold, *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 61 (1997)
2. M. P. Fairman, and B. Stillman, *EMBO J.* **7**, 1211 (1988)
3. M. E. Stauffer, and W. J. Chazin, *J. Biol. Chem.* **279**, 25638 (2004)
4. G. W. Daughdrill, G.W. Buchko, M.V. Botuyan, C. Arrowsmith, M. S. Wold, M. A. Kennedy, and D. F. Lowry, *Nucleic Acids Res.* **31**, 4176 (2003)
5. J.-H. Lee, C.-J. Park, A. I. Arunkumar, W. J. Chazin, and B.-S. Choi, *Nucleic Acids Res.* **31**, 4747 (2003)
6. X. V. Gomes, and M. S. Wold, *Biochemistry* **35**, 10558 (1996)
7. R. A. Pfuetzner, A. Bochkarev, L. Frappier, and A. M. Edwards, *J. Biol. Chem.* **272**, 430 (1997)
8. A. Bochkarev, R. A. Pfuetzner, A. M. Edwards, and L. Frappier, *Nature* **385**, 176 (1997)
9. F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, *J. Biomol. NMR* **6**, 277 (1995)
10. T. D. Goddard, and D. G. Kneller, SPARKY 3. University of California, San Francisco, CA. (2003)