



## NMR Study of the pH Effect on the DNA Binding Affinity of Human RPA

Min-Woo Lee<sup>1,†</sup>, Ju-Hyeok Choi<sup>1,†</sup>, Jae-Gyu Choi<sup>1</sup>, Ae-Ree Lee<sup>2</sup> and Joon-Hwa Lee<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Gyeongnam Science High School, Jinju, Gyeongnam 52620, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Republic of Korea

Received Aug 15, 2016; Revised Sep 1, 2016; Accepted Sep 2, 2016

**Abstract** The replication protein A (RPA) plays a crucial role in DNA replication, recombination, and repair. RPA consists of 70, 32 and 14 kDa subunits and has high single-stranded DNA (ssDNA) binding affinity. The largest subunit, RPA70, mainly contributes to bind to ssDNA as well as interact 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(CCCCC), at various pH, to understand the effect of pH on the ssDNA binding of RPA70A. The chemical shift perturbations of binding residues were most significant at pH 6.5 and they reduced with pH increment. This study provides valuable insights into the molecular mechanism of the ssDNA binding of human RPA.

**Keywords** RPA-A, NMR, pH-dependence, DNA binding affinity

### 서문

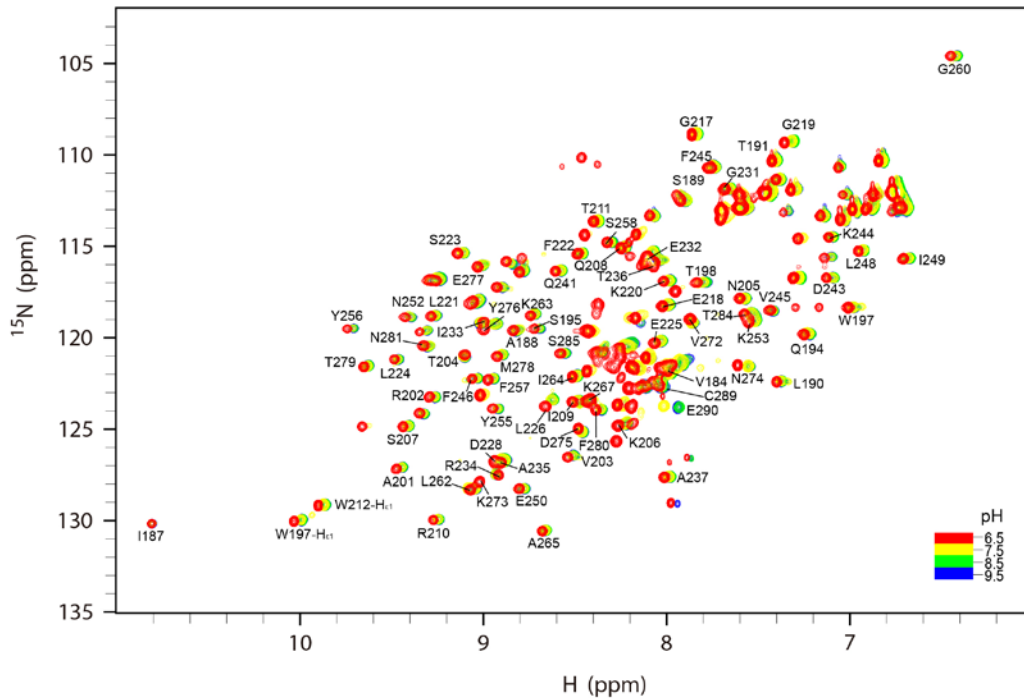
복제 단백질 A (RPA)는 진핵생물의 단일가닥 DNA에 결합하는 단백질로 DNA 복제, 재조합, 수선에서 중요한 역할을 한다.<sup>1</sup> RPA는 70, 32, 14 kDa의 소단위체로 이루어지는 heterotrimer이다.<sup>2</sup> DNA 복제과정에서 RPA는 helicase에 의해 단일가닥 DNA에 결합하여

DNA가 다시 이중가닥으로 되돌아가는 것을 방지하고 이를 통해 DNA polymerase가 복제할 수 있도록 풀림을 유지한다.<sup>1</sup> 가장 큰 소단위체인 RPA70은 단일가닥 DNA (ssDNA)와 결합할 뿐 아니라 다양한 단백질과도 상호작용을 하고 있다.<sup>3-5</sup> RPA의 DNA에 대한 높은 친화력은 RPA70의 중심 부분 안의 두 개의 DNA 결합 도메인인 RPA70A (RPA70<sub>181-290</sub>)와 RPA70B (RPA70<sub>300-422</sub>)에 의해 유도된다.<sup>6,7</sup> dC<sub>8</sub>과 결합된 RPA70A의 결정구조는 ssDNA의 2 뉴클레오티드 (nt)의 간격을 두고 각 도메인이 3-nt 씩 결합하는 것이라고 보고하였다.<sup>8</sup>

단백질의 기능은 온도와 pH 변화에 따라 활성도가 달라지게 된다. pH가 변하게 되면 RPA70A 잔기들의 전하가 달라지고 이로 인해 ssDNA와의 정전기적인 상호작용이 변하게 된다. 본 연구에서 RPA70A의 DNA 결합 능력의 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 RPA70A와 5-nt ssDNA, dCCCCC (dC<sub>5</sub>)의 복합체 대한 NMR 실험을 다양한 pH에서 수행하였다. 다양한 pH에서 RPA70A의 HSQC 스펙트럼을 얻고 dC<sub>5</sub> 첨가에 따른 HSQC 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 본 연구결과는 RPA70A의 ssDNA 결합 기작과 단백질-핵산 상호작용을 이해하는 데 필요한 중요한 정보를 제공할 것이다.

† 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, South 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 free RPA70A in NMR buffer pH 6.5(red), 7.5(yellow), 8.5(green), 9.5(blue) containing 50 mM NaCl at 35 °C.

## 실험방법

**샘플 준비-** 5-nt dC<sub>5</sub>는 M-biotech에서 구매하였고 Sephadex G-25 gel 거름 컬럼을 통과시켜 정제하였다. 대장균 발현 플라스미드 pET14b (Novagen, WI, USA)에 RPA70A의 181~304번 잔기들을 발현하는 DNA를 포함시켜 단백질을 발현하였다.  $^{15}\text{N}$  표지된 RPA70A은  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 포함한 M9 배지에서 형질 전환된 C41 (DE3) 대장균을 배양시켜 얻었다.  $^{15}\text{N}$ 으로 표지된 RPA70A 단백질은 Ni-NTA 컬럼과 Sephacryl S-100 gel 여과 컬럼 (GE Healthcare, USA)으로 정제하였다. DNA와 단백질 시료는 25 mM NaPi (pH= 6.5, 7.5, 8.5 또는 9.5)와 50 mM의 NaCl, 5 mM DTT를 포함하는 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O NMR buffer에 녹였다.

**NMR 실험-** 모든 NMR 실험은 극저온 삼중공명 탐침을 구비하고 있는 Agilent DD2 700-MHz 분광기(경상대학교, 진주)를 통해 수행되었다. 모든 2차원 이중 공명 실험들은

1mM 농도의  $^{15}\text{N}$ 으로 표지된 RPA70A 단백질을 가지고 수행되었으며  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼은 35 °C 에서 2.5mM dC<sub>5</sub>를 1mM  $^{15}\text{N}$ 으로 표지된 hRPA70A 단백질에 첨가에 의해 만들어진 복합체에서 얻었다. 모든 2차원 (2D) NMR 데이터는 NMRPipe<sup>9</sup> 프로그램으로 처리하고 Sparky<sup>10</sup>프로그램으로 분석하였다.

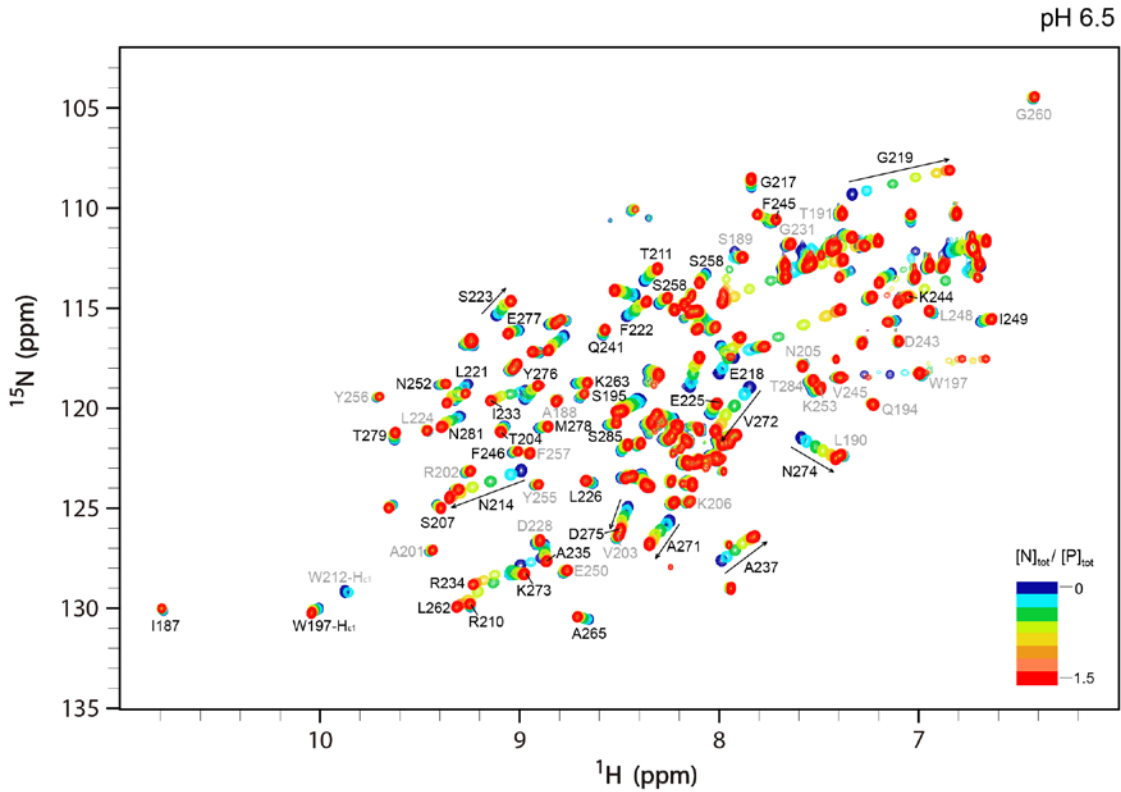
$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 의 두 상태 사이의 평균적인 아마이드 양성자와 질소 공명의 화학적 이동은 다음 수식으로 계산되었다.

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

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

## 실험결과

35 °C에서 20 mM Tris-HCl (pH 6.5 or 7.5or 8.5 or 9.5), 50 mM NaCl, 5 mM DTT 조건으로 free RPA70A 의  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼



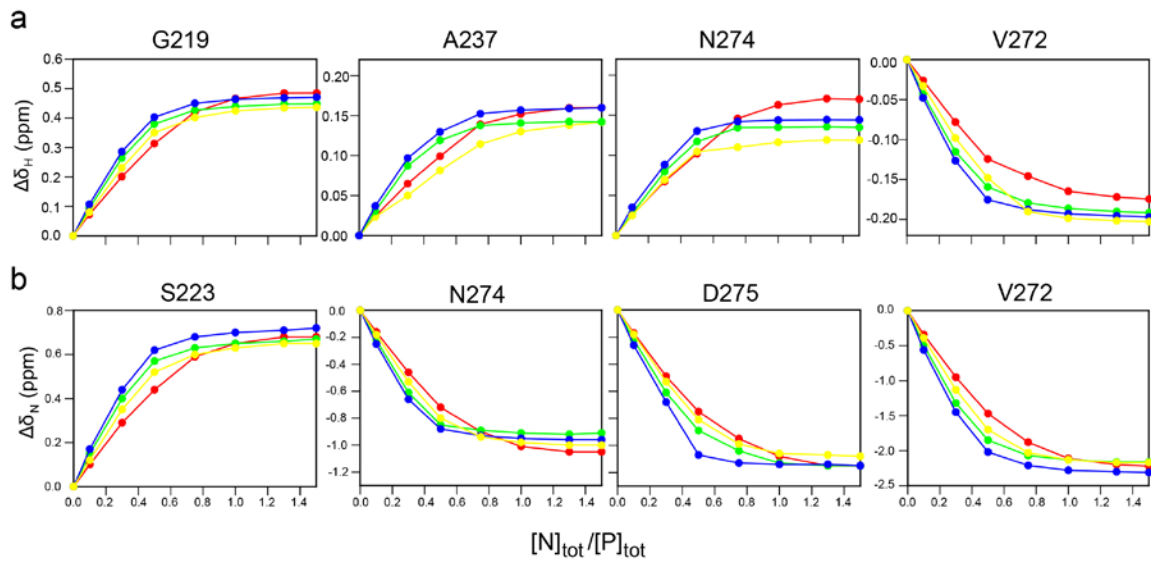
**Figure 2.** The change in  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of hRPA70A by addition of  $\text{dC}_5$  in NMR buffer pH 6.5 containing 50 mM NaCl. The cross-peak color changes gradually from blue (free) to red (bound) according of the  $[\text{N}]_{\text{tot}}/[\text{P}]_{\text{tot}}$  ratio.

을 겹쳐 그림 1에 나타내었다. pH 6.5 (빨간색), pH 7.5 (노란색), pH 8.5 (초록색), pH 9.5 (파란색)을 의미한다. 대부분의 피크들은 pH가 낮아짐에 따라 다운필드로 이동하였다. pH 7.5에서의 NMR data는 선행연구 결과를 참조하였다.<sup>11</sup>

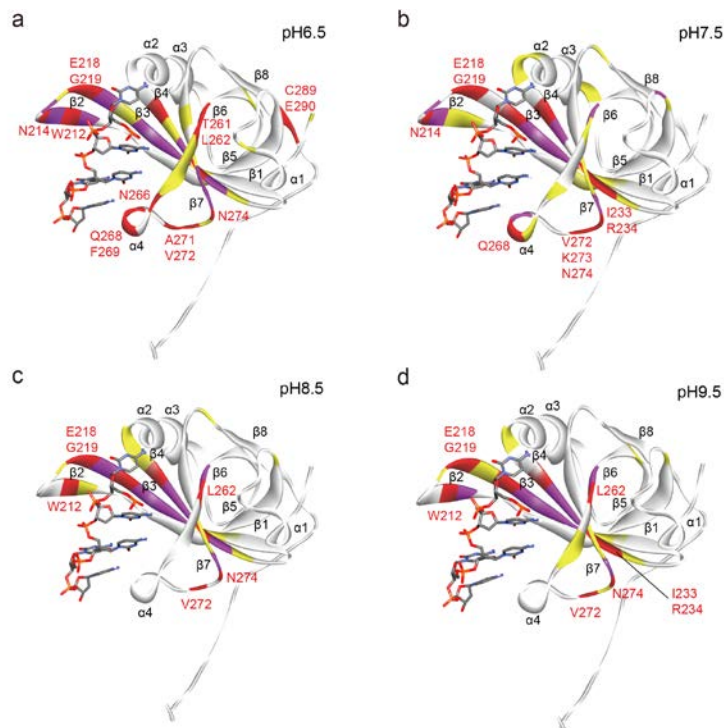
그림 2는 pH 6.5에서 RPA70A와  $\text{dC}_5$ 에 적정된  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼 변화를 보여주는데, hRPA70A는 pH 증가에 따라 낮은 결합 활성을 보여준다. RPA70A- $\text{dC}_5$  복합체의  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼에서,  $\beta 2-\beta 3$  루프 부분에서 W212, N214 그리고 E218, G219 잔기들이 0.2 ppm 이상의 중요한 화학적 이동을 보였다. 또한  $\beta 4$  시트에서도 A237 잔기가 큰 화학적 이동을 보였다. 그리고  $\beta 6-\alpha 4-\beta 7$  loop 부분에서 N266, Q268, F269 그리고 A271, V272, N274가 0.2 ppm 이상의 중요한 화학적 이동을 보였다. pH 8.5 그리고 9.5

에서,  $\alpha 4$ -helix 부분이 화학적 이동이 없는 것으로 보아, pH 의존일 때 Q268, F269 잔기들이  $\text{dC}_5$ 와 결합하는데 중요한 역할을 하는 잔기임을 알 수 있었다.

다양한 pH 조건에서 hRPA70A- $\text{dC}_5$ 의  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼은, 몇몇 잔기들은 아마이드 공명이 완전히 사라지거나 매우 약했다. 우리는 화학적 이동 차이 결과를 더 명확하게 위해서 RPA70A의  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC 스펙트럼을 다양한  $[\text{N}]_{\text{tot}}/[\text{P}]_{\text{tot}}$  비율로 35 °C에서 측정하였고, HSQC 적정 커브를 분석했다 (그림 3). 모든 pH에서  $\beta 2-\beta 3$  그리고  $\beta 6-\alpha 4-\beta 7$  부분에 있는 잔기들이 큰 화학적 이동을 보였다. 그리고 N/P ratio=1.0에서 대부분의 잔기들이 포화 상태에 도달하였다.  $\Delta\delta_{\text{H}}$ 에서 G219, A237, N274 그리고 V272 잔기들이 큰 화학적 이동을 보였고,  $\Delta\delta_{\text{N}}$ 에서는 G223, N274, D275 그리고



**Figure 3.** Fitting of the  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC titration curves for hRPA70A with  $\text{dC}_5$  as a function of  $[\text{N}]_{\text{tot}}/[\text{P}]_{\text{tot}}$  ratio at pH 6.5, 7.5, 8.5, 9.5. (Red: pH 6.5, Yellow: pH 7.5, Green: pH 8.5, and Blue: pH 9.5)



**Figure 4.** Mapping the location of the residues having large  $\Delta\delta_{\text{avg}}$  on to the NMR structure of hRPA70A- $\text{dC}_5$  complexes for the (a) pH 6.5 (b) pH 7.5 (c) pH 8.5 (d) pH 9.5 at 50 mM NaCl.

V272가 가장 큰 이동을 보였다.

다양한 pH 에서 N/P ratio=1.0 일 때 hRPA70A-dC<sub>5</sub> 복합체의 2 차 구조를 보면 (그림 4), 낮은 pH 6.5 에서 가장 큰 화학적 이동을 보였다. 이것은 hRPA70A가 pH 6.5 일 때 더 결합을 잘한다는 것을 의미하는데 이는  $\alpha 4$  나선에 있는 N266, Q268 그리고 F269 잔기 때문이다. pH 8.5 그리고 9.5 일 때 다음 잔기들의 화학적 이동은 거의 없다.

본 연구는 hRPA70A의 pH 에 따른 dC<sub>5</sub> 결합 활성을 NMR 을 통해 비교 분석 하였고 hRPA70과 dC<sub>5</sub>의 상호작용을 이해하고 pH 에 의존함을 확인하였다.

## 결론

RPA70A는 낮은 pH 6.5 조건에서 가장 높은 결합 활성을 보였고 pH가 높아질수록 중요한 잔기들의 화학적 이동 감소를 확인하였다. 이는 dC<sub>5</sub>가 단백질의 양전하가 강할 때 결합하게 되는데 높은 pH에서는 Lys과 Arg 잔기들의 양전하가 감소하므로 결합 활성을 떨어지게 된다.

## 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 Research.* **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)
11. M.-G. Kim, T.-H. Shin, S.-R. Choi, J.-G. Choi, and J.-H. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **20**, 66 (2016)